

中国科技核心期刊 中文核心期刊

2016

ISSN 2095-9869  
CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第37卷 VOL.37 第6期 NO.6



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 37 卷 第 6 期

2016 年 12 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 录

### 研究论文

- 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用.....单秀娟 陈云龙 金显仕 杨 涛 戴芳群 (1)
- 茜素络合物对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)苗种耳石的染色标记效果.....徐永江 柳学周 史 宝 翟介明 (11)
- 鳃科(Engraulidae)鱼类 DNA 条形码电子芯片研究.....柳淑芳 李献儒 李 达 庄志猛 (19)
- 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)仔鱼发育过程.....姜云荣 于道德 刘洪军 官曙光 张少春 张 岩 (26)
- 蛋白营养对工业养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应.....张 静 高婷婷 李 勇 赵宁宁 马 骏 (34)
- 裂壶藻对津新鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)生长、血液非特异性免疫指标及抗病力的影响.....刘宏超 程镇燕 翟胜利 林城丽 王金娥 乔秀亭 白东清 (42)
- 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雄性亲鱼繁殖性能及抗氧化功能的影响.....赵 敏 梁萌青 郑珂珂 徐后国 (49)
- 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性.....王津津 刘 莹 于 力 贾 鹏 陈 兵 史秀杰 郑晓聪 兰文升 何俊强 刘 荭 (56)
- 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、黑石斑鱼(*Centropristis striata*)的营养成分及加工品质比较.....赵 睿 娄方瑞 丁福红 马爱军 王 婷 (62)
- 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)外部性征的分化及发育.....冯政夫 林晓菲 葛蕾蕾 朱 伟 (68)
- 分段养殖模式在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中的应用.....李俊伟 颀晓勇 郭永坚 朱长波 常 华 王豪杰 陈素文 (74)
- 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体与韩国群体杂交子一代的生长和存活比较.....蔡忠强 郑言鑫 任利群 赵春暖 吴 彪 王肖君 于 涛 杨爱国 林建国 (81)
- 盐度、pH 对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率和摄食率的影响.....杨杰青 蒋 玫 李 磊 董 冉 许高鹏 沈新强 (87)
- 体外仿生消化在华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)体内镉的生物可给性中的应用.....杨妙峰 (94)
- 人工鱼礁材料添加物碳封存能力及其对褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)固碳量的影响.....李 娇 公丕海 关长涛 刘 毅 (100)
- 金乌贼(*Sepia esculenta*)早期发育阶段相关酶活性的变化.....刘长琳 刘思玮 赵法箴 陈四清 刘春胜 燕敬平 (105)
- 不同卵色皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)幼鲍的生长与免疫比较.....赵海峰 冯艳微 刘相全 姜 绪 韦秀梅 刘佳乐 江海林 (110)
- 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长、体组成及免疫指标的影响.....张德瑞 张利民 马晶晶 李宝山 夏 斌 谭 清 王际英 (115)
- 海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因的 cDNA、基因组克隆与表达分析.....杨 洪 朱 玲 骆晓蕊 周春娅 庄志猛 (123)
- 长江野生和池塘养殖河蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹种早期养殖性能、抗病力和非特异性免疫性能的比较.....姜晓东 吴旭干 刘 青 何 杰 张庆华 王幼鹏 成永旭 (131)
- 不同近交程度对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)繁殖性能的影响.....王好锋 高保全 刘 萍 李 健 潘鲁青 (138)
- 固相吸附毒素跟踪技术监测牡蛎养殖区中腹泻性贝毒.....宿志伟 赵 峰 刘远平 徐 娜 周德庆 姚建华 李钰金 刘志敏 (144)
- 溶藻细菌 A3 的溶藻特性.....郝建云 曹煜成 徐武杰 胡晓娟 徐 煜 许云娜 李卓佳 文国樑 李莎莎 (151)
- 《渔业科学进展》2016 年第 37 卷总目录..... (160)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.37 No.6 December 2016

Reshaping the Distribution of Fish Abundance by Climate Change: A Case Study in the Yangtze River Estuary .....	(1)
..... SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, JIN Xianshi, YANG Tao, DAI Fangqun	
Alizarin Complexone Marking of Otoliths of Juvenile <i>Cynoglossus semilaevis</i> .....	(11)
..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, ZHAI Jieming	
Development of DNA Barcode-Microarray for Identification of Engraulidae Fishes .....	(19)
..... LIU Shufang, LI Xianru, LI Da, ZHUANG Zhimeng	
Observations on Larval Development of Pacific Cod ( <i>Gadus macrocephalus</i> Tilesius) .....	(26)
..... JIANG Yunrong, YU Daode, LIU Hongjun, GUAN Shuguang, ZHANG Shaochun, ZHANG Yan	
Effects of the Protein Level on the Growth, Ammonia-Nitrogen Excretion, and Amino Acid Accumulation in the Muscle of Industrially-Cultured Juvenile Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> L.) .....	(34)
..... ZHANG Jing, GAO Tingting, LI Yong, ZHAO Ningning, MA Jun	
Effects of Dietary <i>Schizochytrium</i> on the Growth Performance, Serum Nonspecific Immunity Indices, and Disease Resistance of <i>Cyprinus carpio</i> var. Jian .....	(42)
..... LIU Hongchao, CHENG Zhenyan, ZHAI Shengli, LIN Chengli, WANG Jin'e, QIAO Xiuting, BAI Dongqing	
Effects of Dietary Antarctic Krill on the Reproductive Performance and Antioxidant Function in Male Broodstock Tongue Sole ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> ) .....	(49)
..... ZHAO Min, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XU Houguo	
Characterization of Grass Carp ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus .....	(56)
..... LIU Ying, YU Li, JIA Peng, CHEN Bing, SHI Xiujie, ZHENG Xiaocong, LAN Wensheng, HE Junqiang, LIU Hong	
The Nutritional Value and Processing Quality of <i>Ctenopharyngodon idellus</i> , <i>Liza haematocheila</i> , and <i>Centropristis striata</i> .....	(62)
..... ZHAO Rui, LOU Fangrui, DING Fuhong, MA Aijun, WANG Ting	
Differentiation and Development of External Sex Characteristics of Shrimp ( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ) .....	(68)
..... FENG Zhengfu, LIN Xiaofei, GE Leilei, ZHU Wei	
Application of Culturing in Stages in the Shrimp Culturing Pond .....	(74)
..... LI Junwei, XIE Xiaoyong, GUO Yongjian, ZHU Changbo, CHANG Hua, WANG Haojie, CHEN Suwen	
Growth and Survival of the First Hybrid Generation of Chinese and Korean Populations of <i>Scapharca broughtonii</i> .....	(81)
..... CAI Zhongqiang, ZHENG Yanxin, REN Liqun, ZHAO Chunnuan, WU Biao, WANG Xiaojun, YU Tao, YANG Aiguo, LIN Jianguo	
Effects of Salinity and pH on the Filtration Rate and Ingestion Rate of <i>Meretrix meretrix</i> .....	(87)
..... YANG Jieqing, JIANG Mei, LI Lei, DONG Ran, XU Gaopeng, SHEN Xinqiang	
Preliminary Application of <i>in vitro</i> Bionics Digestion Model for Bioaccessibility of Cd in <i>Chlamys nobilis</i> .....	(94)
..... YANG Miaofeng	
Carbon Sequestration of Additives of Artificial Reefs and Its Effect on Carbon Fixation of <i>Ostrea plicatula</i> Gmelin .....	(100)
..... LI Jiao, GONG Pihai, GUAN Changtao, LIU Yi	
Changes in Activities of Related Enzymes in Early Developmental Stages of <i>Sepia esculenta</i> .....	(105)
..... LIU Changlin, LIU Siwei, ZHAO Fazhen, CHEN Siqing, LIU Chunsheng, YAN Jingping	
Growth and Immune Diversity of <i>Haliotis discus hannai</i> Juvenile Abalone with Different Egg Colors .....	(110)
..... ZHAO Haifeng, FENG Yanwei, LIU Xiangquan, JIANG Xu, WEI Xiumei, LIU Jiale, JIANG Hailin	
Effect of Dietary Dried Distiller's Grains with Solubles (DDGS) on the Growth, Body Composition, and Immune Enzymes Activities of Sea Cucumber ( <i>Apostichopus japonicus</i> ) .....	(115)
..... ZHANG Derui, ZHANG Limin, MA Jingjing, LI Baoshan, XIA Bin, TAN Qing, WANG Jiying	
cDNA, Genome Cloning, and mRNA Expression of Phospholipase A <sub>2</sub> Gene from the <i>Rhopilema esculentum</i> .....	(123)
..... YANG Hong, ZHU Ling, LUO Xiaorui, ZHOU Chunya, ZHUANG Zhimeng	
Comparison of the Early Culture Performance, the Disease Resistance, and the Non-Specific Immunity Between Wild-Caught and Pond-Reared Juvenile Chinese Mitten Crab <i>Eriocheir sinensis</i> .....	(131)
..... JIANG Xiaodong, WU Xugan, LIU Qing, HE Jie, ZHANG Qinghua, WANG Youpeng, CHENG Yongxu	
Effects of Different Inbreeding Degree on Reproductive Performance of Swimming Crab ( <i>Portunus trituberculatus</i> ) .....	(138)
..... WANG Haofeng, GAO Baoquan, LIU Ping, LI Jian, PAN Luqing	
Monitoring of Diarrhetic Shellfish Poisons in Aquatic Environment by Solid Phase Adsorbent Toxin Tracking Technology .....	(144)
..... SU Zhiwei, ZHAO Feng, LIU Yuanping, XU Na, ZHOU Deqing, YAO Jianhua, LI Yujin, LIU Zhimin	
Characteristics of Algicidal Activity of Bacterial Strain A3 .....	(151)
..... XI Jianyun, CAO Yucheng, XU Wujie, HU Xiaojuan, XU Yu, XU Yunna, LI Zhuojia, WEN Guoliang, LI Shasha	
Total Contents of <i>PROGRESS IN FISHERY SCIENCES</i> , Vol. 37, 2016 .....	(160)

# 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用\*



单秀娟<sup>1,2</sup> 陈云龙<sup>1,3</sup> 金显仕<sup>1,2①</sup> 杨 涛<sup>1</sup> 戴芳群<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 本研究以 2012–2013 年长江口鱼类资源密度分布为基础, 通过动态生物气候分室模型 (DBEM) 预估了不同气候变化情景下 (IPCC, RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5) 长江口鱼类资源密度增量分布的变化。在 RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5 这 3 种气候变化情景下, 鱼类资源密度增量、底层鱼类资源密度增量随着时间推移均呈递增趋势, 且递增程度和增量重心分布范围随着温室气体排放的增加而扩大 (RCP8.5>RCP6.0>RCP2.6)。鱼类资源密度增量重心主要分布在长江口崇明岛沿岸水域, 长江口外侧水域资源密度增量相对较低, 并且资源密度增量重心有向南迁移的趋势。

**关键词** 长江口; 鱼类资源密度分布; 气候变化情景; 动态生物气候分室模型

**中图分类号** S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0001-10

气候变化已成为当前国际社会公认的全球性问题之一, 海洋生态系统在气候变化背景下也正发生着巨大的变化 (Belkin, 2009), 如海水温度升高、溶氧降低、海洋酸化、冰川融化及海平面上升等。作为海洋生态系统生物主体的渔业资源也经历着不可逆转的演替: (1) 渔业生物生长、发育、繁殖、死亡等生命过程的变化 (Bakun, 1990; Nissling *et al.*, 1998; Pörtner *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2013a); (2) 渔业生物多样性演替和生物量分布迁移 (MacKenzie *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2005; Dulvy *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2008、2009、2010、2013b); (3) 渔业生物栖息环境破坏和饵料基础的转换 (Beaugrand *et al.*, 2002; Sheppard, 2003; Grandcourt *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2004)。渔业生物通过这些被动或主动的适应性改变着生态系统的结构和功能, 进而对生态系统的食物可持续产出产生影响 (Cardinale *et al.*, 2006、2012)。研究不同气候变化

情景对渔业资源分布的潜在影响, 对科学认识气候变化对海洋生态系统的影响及采取正确、及时的应对策略具有重要意义。

目前, 关于气候变化对渔业资源影响的研究多注重用实测数据结合环境变量进行探讨, 以分析气候变化对渔业资源的影响 (刘允芬, 2000; Perry *et al.*, 2005; Pörtner *et al.*, 2007; 李玉尚等, 2007; Dulvy *et al.*, 2008; 李玉尚, 2010; 王跃中等, 2011、2012)。如利用渔业史资料分析了黄、渤海鲱鱼 (*Clupea pallasii*) 数量周期性变动与气候变化产生的海洋水文条件波动的相关性 (李玉尚, 2010), 厄尔尼诺 (ENSO) 事件与海洋环流对渔业资源量的影响 (何发祥等, 1995、2003; 洪华生等, 1997; Klyashtorin, 1998)。Cheung 等 (2008、2009、2010) 研究了全球范围内不同气候变化情景下海洋生物多样性和生物量分布趋势。在中国近海, 涉及气候变化的预估分析仅见于苏杭等 (2015) 关于海水

\* 鳌山科技创新计划 (2015ASKJ02-05)、农业部财政项目“黄渤海渔业资源调查”和山东省泰山学者专项基金共同资助。单秀娟, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 金显仕, 研究员, E-mail: jin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-02-15, 收修改稿日期: 2016-03-24



表面温度(SST)升高(SST 分别拟定升高 0.5℃、1℃、2℃和 4℃)对鲈(*Scomber japonicus*)栖息地分布面积的研究,而针对不同气候变化情景对渔业资源分布潜在影响的评估尚未见报道。

河口生态系统是气候变化和人类活动集中作用的典型区域,同时又是渔业生物生长、繁殖和育幼的重要场所,也是众多洄游性鱼类的必经通道。因此,河口生态系统对渔业资源的可持续补充有重要的意义(罗秉征等, 1992; Whitfield *et al*, 2003)。本研究选择长江口作为研究区域,以 2012–2013 年长江口鱼类资源密度分布为基础,采用动态生物气候分室模型(Dynamic bioclimate envelope model, DBEM)预估了不同气候变化情景下长江口鱼类资源密度增量的分布,以期气候变化背景下近海渔业生态系统演变及适应性渔业管理的研究提供基础和科学范例。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

数据来源于 2012 年 6 月、8 月、11 月、2013 年 1 月、5 月、8 月、10 月长江口水域 6 个断面的渔业底拖网调查。调查区域、调查网具、调查取样等见孙鹏飞等(2015);利用 CTD 测定每个站位的温度、盐度等环境因子。对渔业种类进行鉴定,记录每种的重量和数量,数据标准化到 1 h,以单位面积的渔获量(kg/km<sup>2</sup>)表示。本研究仅包括鱼类,其中,底层鱼类包括小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、发光鲷(*Acropoma japonicum*)、白姑鱼(*Argyrosomus argentatus*)、龙头鱼(*Psenopsis anomala*)、长吻红舌鲷(*Cynoglossus lighti*)、棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)、红狼牙鰕虎鱼(*Odontamblyopus rubicundus*)、六丝钝尾鰕虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)、黄鲛鲷(*Lophius litulon*)等;中上层鱼类包括黄鲫(*Setipinna taty*)、凤鲚(*Coilia mystus*)、赤鼻棱鳀(*Thryssa kammalensis*)、鳀(*Engraulis japonicus*)、康氏小公鱼(*Stolephorus commersonii*)、竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)、鲈等,以上种类以暖温性和暖水性种类为主。

### 1.2 鱼类资源密度增量分布预估方法

**1.2.1 气候变化情景** 本研究采用政府间气候变化委员会(Intergovernmental panel on climate change, IPCC)新一代温室气体排放情景(Representative concentration pathways, RCPs),即典型浓度目标分别为 RCP2.6、RCP4.5、RCP6.0 和 RCP8.5(表 1),分别代表最低、较低、中和最高程度的温室气体排放情景。

表 1 典型浓度目标

情景 Pathways	描述 Descriptions
RCP2.6	把全球平均温度升高限制在 2℃ 以内,辐射强迫到 2100 年下降至 2.6 W/m <sup>2</sup> , 21 世纪后半叶能源应用为负排放。
RCP4.5	辐射强迫稳定在 4.5 W/m <sup>2</sup> , 涉及限制温室气体排放的诸多因素,包括能源体系的改变、低排放能源技术的革新、地质储藏技术的发展等。
RCP6.0	辐射强迫稳定在 6.0 W/m <sup>2</sup> , 温室气体排放峰值出现在 2060 年左右,其后能源体系改变和能源技术创新提高,温室气体排放持续减小。
RCP8.5	辐射强迫稳定在 8.5 W/m <sup>2</sup> , 为温室气体排放最高情景,此情景模式假定人口最多、能源改善速度缓慢、技术创新速度不高、应对气候变化的对策不足,从而导致长时间对能源的高需求以及温室气体的高排放量。

在实际分析中, RCP4.5 和 RCP6.0 情景温度变化不存在显著差异,故本研究只分析 RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5 这 3 种温室气体排放情景。长江口水域温度和盐度变化预测通过美国国家海洋与大气管理局(NOAA)地球物理流体动力学实验室(The Geophysical Fluid Dynamics Laboratory, GFDL)的物理耦合模型(Coupled physical model, CM3)实现。CM3 是 GFDL 基于耦合模式比较计划第 5 阶段(CMIP5)的新一代全球气候模式的预估研究和评估,具体见 <http://www.gfdl.noaa.gov/coupled-physical-model-cm3>。长江口水域温度和盐度在不同气候变化情景下的变化预测见图 1 和图 2。

**1.2.2 动态生物气候分室模型** 动态生物气候分室模型已被广泛用于预测陆地和海洋对于气候变化的响应(Berry *et al*, 2002; Peterson *et al*, 2002; Pearson

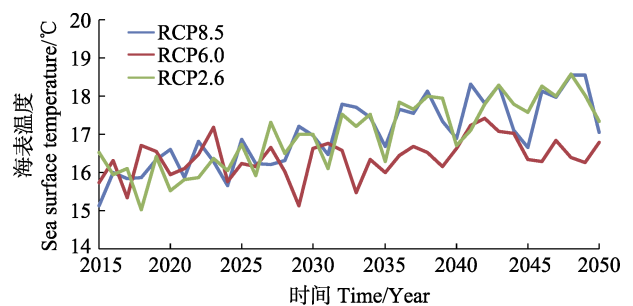


图 1 不同气候变化情景下长江口水域温度的变化(2015–2050 年)

Fig.1 Projections of temperature changes in the Yangtze River estuary under different climate change scenarios (2015–2050)

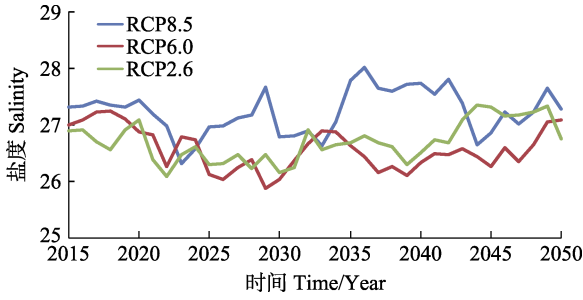


图 2 不同气候变化情景下长江口水域盐度的变化 (2015–2050 年)

Fig.2 Projections of salinity changes in the Yangtze River estuary under different climate change scenarios (2015–2050)

et al, 2003; Keith et al, 2008; Cheung et al, 2009、2010)。本研究的动态生物气候分室模型主要参考 Cheung 等(2008), 并在此基础上, 针对长江口水域的环境和鱼类的具体参数作了调整。

该模型中, 海区按照经纬度分成  $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$  的地理单元, 每个地理单元对应着相应的鱼类资源密度指数(Resource density index, RDI)。RDI 计算公式如下:

$$RDI = \frac{C}{a \cdot q}$$

式中,  $C$  为每个站位的渔获量, 单位为  $\text{kg}/\text{km}^2$ ,  $a$  为底拖网扫海面积,  $q$  为捕获系数, 其值参考金显仕等(2006)。

本研究用鱼类资源密度重心来描述其空间分布的迁移和变化(牛明香等, 2012)。鱼类资源密度重心计算公式如下:

$$X = \frac{\sum_i^n C_i \cdot X_i}{\sum_i^n C_i}$$

式中,  $X$  为鱼类资源密度重心的经纬度,  $C_i$  为地理单元  $i$  的 RDI 值,  $n$  为鱼类出现的地理单元的总个数。

模型中定义了一个环境适合度函数, 用来反映不同环境条件环境变量对鱼类的影响, 本研究的环境变量包括海表温度( $T$ )和海表盐度( $S$ )。环境适合度( $P$ )函数公式如下:

$$P = P(T) \times P(S)$$

模型中, 假定环境容纳量与环境适合度是正相关, 这样随着不同地理单元环境适合度的变化, 鱼类环境容纳量也随之变化。环境变量的变化导致环境适合度的改变, 从而造成环境容纳量的改变, 进而对鱼类生存和洄游产生影响。当一个地理单元的环境变量更适合鱼类生存时, 其环境容纳量也相应增加。

在预测鱼类资源密度增量分布时, 用逻辑斯蒂生

长模型来驱动鱼类资源密度增量, 具体如下:

$$\frac{dA_i}{dt} = \sum_{j=1}^N G_i + I_{ji} + L_{ji}$$

式中,  $A_i$  为  $0.25^{\circ} \times 0.25^{\circ}$  地理单元鱼类资源密度增量,  $G_i$  为鱼类种群的内秉增长率,  $L_{ji}$ 、 $I_{ji}$  分别为幼鱼、成鱼从相邻地理单元  $j$  的净迁入量。鱼类内秉增长率由其增长率和环境容纳量决定:

$$G_i = r \cdot A_i \cdot [1 - (A_i / KC_i)]$$

式中,  $r$  是鱼类内秉增长率,  $A_i$  和  $KC_i$  分别是鱼类所在地理单元  $i$  的资源密度增量和环境容纳量。

针对地理单元中成鱼的迁入和迁出问题, 应用欧拉空间生态系统模拟模型(Eulerian spatial ecosystem simulation model)中的 Ecospace 定理, 把研究的地理单元分为东-西和南-北两个方向, 假定鱼类沿着这两个方向运动, 环境适合度越高的地理单元, 越容易引起鱼类迁入。

$$m_i = \frac{m_{i(\text{base})} \cdot k}{k + D}$$

式中,  $m_i$  为  $i$  地理单元中鱼类的迁移率,  $m_{i(\text{base})}$  为相邻地理单元不存在环境适合度梯度时的迁移率,  $k$  为尺度因子, 用来反映迁移率对环境适合度变化的敏感程度。 $D$  为相邻地理单元环境适合度比值, 定义如下:

$$D_{ij} = P_i / P_j$$

式中,  $P_i$  和  $P_j$  分别为相应地理单元的环境适合度。

同时, 新迁入的鱼类还有可能回到原来迁出的地理单元  $i$ , 这取决于其新迁入地理单元  $j$  的资源密度与环境容纳量的比值( $KR_j$ )。

$$KR_j = \frac{A_j}{KC_j}$$

式中,  $A_j$  为地理单元  $j$  的鱼类相对丰度,  $KC_j$  为地理单元  $j$  的环境容纳量。

返回原地理单元  $i$  的鱼类资源密度( $RE_{ji}$ ):

$$RE_{ji} = \frac{m_i \cdot A_i \cdot k}{k + (1 - KR_j)}$$

式中,  $m_i$  为鱼类的迁移率,  $A_i$  为地理单元  $i$  的鱼类相对丰度,  $k$  为尺度因子,  $KR_j$  为地理单元  $j$  鱼类相对丰度接近于该单元最大环境容纳量的程度。

因此, 从地理单元  $i$  净迁出到地理单元  $j$  的鱼类资源量( $I_{ij}$ )为迁出到地理单元  $j$  的资源量( $E_{ij}$ )减去迁回到地理单元  $i$  的资源量( $RE_{ji}$ ):

$$I_{ij} = E_{ij} - RE_{ji}$$

同时, 鱼类在时间  $t$  时, 地理单元  $i$  中的总死亡( $M_{i,t}$ )由捕捞死亡( $M_{i,f,t}$ )和自然死亡( $M_{i,m,t}$ )共同作用:

$$M_{i,t} = M_{i,f,t} + M_{i,m,t}$$

且自然死亡( $M_{i,m}$ )随着地理单元中环境适合度改变等比例的变化。

### 1.2.3 环境适合度函数的构建

**1.2.3.1 温度** 每种鱼类均具有其存活温度范围及最适温度,鱼类温度的适合度函数  $P(T)$  定义为鱼类在不同温度的出现频率。为求得  $P(T)$ , 首先对 GFDL 的海表温度数据进行内插,使其与模型的分辨率相一致,然后对长江口水域 2012–2013 年调查数据进行分

析,得到鱼类温度适合度函数。判断适合度函数是否合理,需要满足两个条件:(1)数据分布应为单峰分布;(2)物种最适温度范围的变异系数要小于 50%。如果适合度函数不是单峰分布,需要对其进行相邻单位的平滑处理。为了减小相对于原始数据的误差,平滑处理从相邻两个单位开始,直到获得单峰的函数分布为止。以鳃鱼为例,对由原始数据得到的鱼类温度适合度函数(图 3-A)进行平滑处理,得到其单峰分布图(图 3-B)。

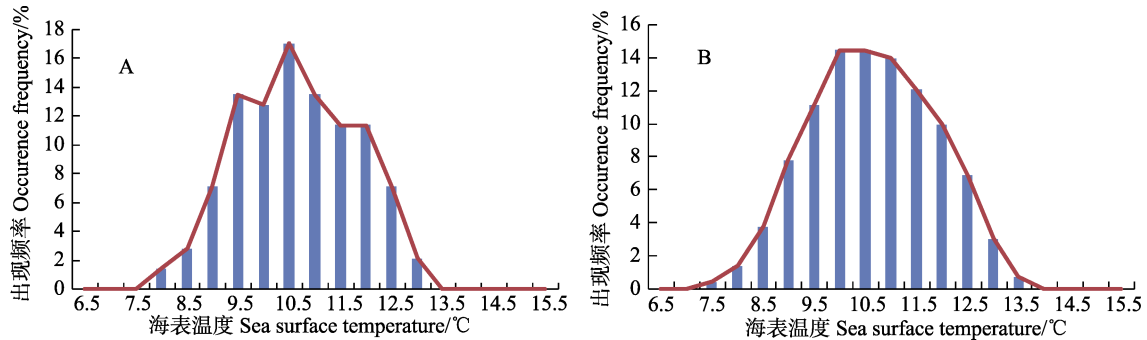


图 3 鳃鱼的温度适合度函数

Fig.3 The function of suitable temperature for *E. japonicus*

A: 原始; B: 平滑后

A: Original; B: After curve fitting

**1.2.3.2 盐度** 盐度适合度函数  $P(S)$  具体方法同 1.2.3.1, 以鳃鱼为例, 根据原始数据得到的盐度适合度函数见图 4。

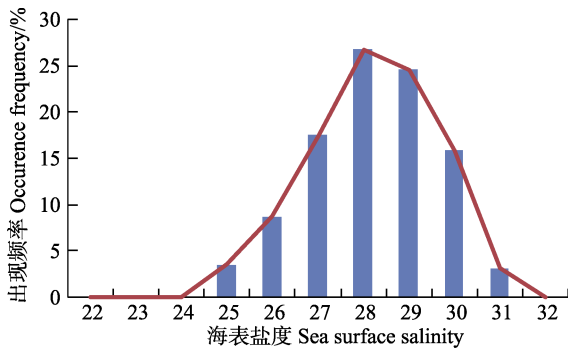


图 4 鳃鱼的盐度适合度函数

Fig.4 Curve fitting of the function of suitable salinity for *E. japonicus*

## 2 结果

### 2.1 RCP2.6 情景下鱼类资源密度增量分布

**2.1.1 底层鱼类资源密度增量分布** 2013 年, 底层鱼类资源高密度区主要分布在长江口中部和南部, 北部资源密度较低, 并在长江口水域内散落着较小面积的低密度区域。2020 年, 底层鱼类资源密度增量普遍较小, 在靠近崇明岛及其外侧水域, 资源密度增

量相对较高。2030 年, 底层鱼类资源密度增量增加, 长江口北部和外侧资源密度增量较低, 资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域, 并以此为中心呈递减趋势。2050 年, 底层鱼类资源密度增量显著增加, 长江口北部和外侧水域资源密度增量相对较低, 崇明岛附近水域资源密度增量较高, 并随着向外侧水域扩展呈递减趋势(图 5)。

**2.1.2 中上层鱼类资源密度增量分布** 2013 年, 中上层鱼类资源密度聚集区主要分布在长江口中部, 在长江口北部和沿岸水域, 资源密度较低。2020 年, 中上层鱼类资源密度增量较低, 资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域。2030 年, 资源密度增量升高, 但主要分布在沿岸水域, 长江口外侧水域资源密度增量较低, 在崇明岛外侧水域存在中上层鱼类的资源密度增量重心。2050 年, 资源密度增量进一步增大, 资源密度增量重心进一步向沿岸集中, 从沿岸向外侧水域, 资源密度增量呈递减趋势, 长江口南部水域资源密度增量相对较低(图 5)。

**2.1.3 鱼类资源密度总增量分布** 2013 年, 鱼类资源密度聚集区主要分布在长江口中部, 在长江口北部, 鱼类资源密度较低。2020 年, 鱼类资源密度增量较低, 资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域。2030 年, 资源密度增量升高, 资源密度增量重心主要分布在崇明

岛附近的沿岸水域, 长江口外侧和北部水域资源密度增  
量较低。2050 年, 资源密度增量进一步增大, 资源密

度增量重心分布范围扩大, 主要分布在长江口崇明岛的  
外侧水域, 长江口北部资源密度增量较低(图 5)。

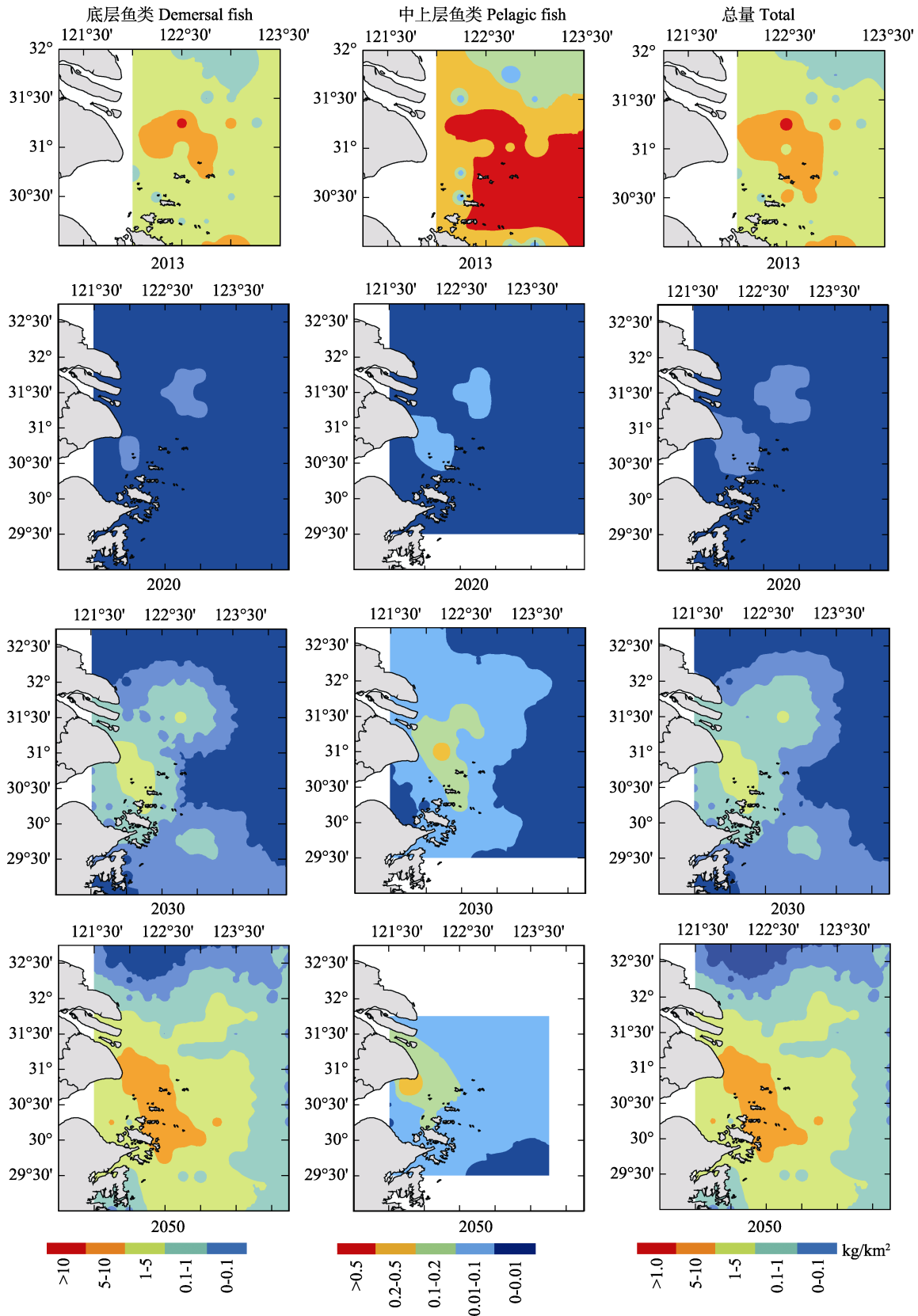


图 5 长江口鱼类资源密度分布(2013 年)和 RCP2.6 情景下资源密度增量分布

Fig.5 The distribution of fish biomass in 2013 and projections of its increment in Yangtze River estuary in the RCP2.6 scenario



## 2.2 RCP6.0 情景下鱼类资源密度增量分布

**2.2.1 底层鱼类资源密度增量分布** 2020 年, 底层鱼类资源密度增量较低, 在长江口沿岸水域, 资源密度增量相对较高。2030 年, 底层鱼类资源密度增量增加, 长江口北部和外侧资源密度增量较低, 资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域, 并且以此为中心呈递减趋势, 与 RCP2.6 情景下的分布一致, 但资源密度增量重心分布范围扩大。2050 年, 底层

鱼类资源密度增量显著增加, 资源密度增量大于 RCP2.6 情景下资源密度增量, 长江口北部和外侧水域资源密度增量相对较低, 崇明岛附近水域资源密度增量较高, 并向外侧水域扩展呈递减趋势, 在崇明岛外侧存在一个资源密度增量重心(图 6)。

**2.2.2 中上层鱼类资源密度增量分布** 2020 年, 中上层鱼类资源密度增量较低, 资源密度增量重心与 RCP2.6 情景分布一致, 主要是在长江口沿岸水域。2030 年, 资源密度增量升高, 主要分布在崇明岛沿

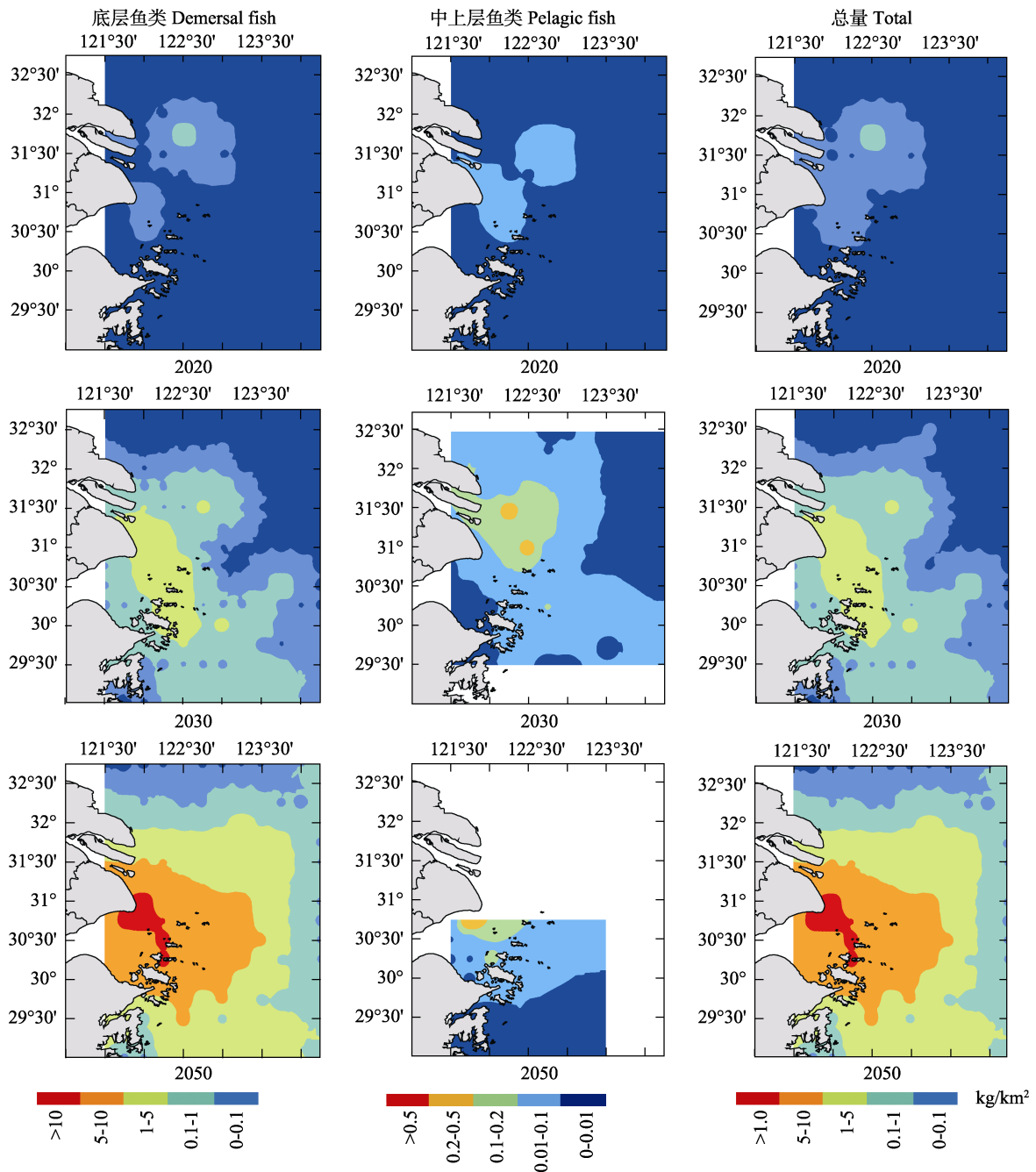


图 6 RCP6.0 情景下长江口水域鱼类资源密度增量分布

Fig.6 Projections of the distribution of fish biomass increment in the Yangtze River estuary in the RCP6.0 scenario

岸水域, 长江口外侧水域资源密度增量较低, 在崇明岛南部沿岸水域存在中上层鱼类的低资源密度增量聚集区。2050 年, 资源密度增量进一步增大, 主要分布在长江口北部, 从北向南呈递减趋势, 长江口南部资源密度增量最低, 长江口北部资源密度增量为 0 (图 6)。

**2.2.3 鱼类资源密度总增量分布** 2020 年, 鱼类资源密度增量较低, 资源密度增量重心与 RCP2.6 情景分布一致, 但范围有所扩大。2030 年, 资源密度增量升高, 资源密度增量重心分布范围扩大, 主要分布在崇明岛附近的沿岸水域, 长江口外侧和北部资源密度增量较低。2050 年, 资源密度增量进一步增大, 资源密度增量重心分布范围进一步扩大, 主要分布在崇明岛的外侧水域, 长江口北部资源密度增量较低(图 6)。

### 2.3 RCP8.5 情景下鱼类资源密度增量分布

**2.3.1 底层鱼类资源密度增量分布** 2020 年, 底层鱼类资源密度增量显著降低, 资源密度增量重心与 RCP2.6、RCP6.0 情景下分布一致, 但范围有所扩大。2030 年, 底层鱼类资源密度增量增加, 长江口北部和外侧资源密度增量较低, 资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域, 并且以此为中心呈递减趋势, 与 RCP2.6、RCP6.0 情景下的分布一致, 但资源密度增量重心分布范围扩大。2050 年, 底层鱼类资源密度增量显著增加, 资源密度增量与 RCP2.6、RCP6.0 情景下的资源密度增量分布趋势一致, 但资源密度增量显著高于 RCP2.6、RCP6.0 情景下的资源密度增量, 长江口北部和外侧水域资源密度增量相对较低, 在崇明岛外侧存在一个高密度增量聚集区(图 7)。

**2.3.2 中上层鱼类资源密度增量分布** 2020 年, 中上层鱼类资源密度较低, 资源密度聚集区与 RCP2.6、RCP6.0 情景分布一致, 但范围有所扩大。2030 年, 资源密度增量升高, 从长江口北部到南部资源密度增量呈递增趋势, 且崇明岛以北的外侧资源密度增量较高, 存在高资源密度增量重心。2050 年, 资源密度增量较低, 显著低于 2030 年水平, 从北向南呈递减趋势, 长江口南部资源密度增量最低, 并且长江口北部资源密度增量为 0 (图 7)。

**2.3.3 鱼类资源密度总增量分布** 2020 年, 鱼类资源密度增量较低, 资源密度增量重心与 RCP2.6、RCP6.0 情景分布一致, 但范围有所扩大。2030 年, 资源密度增量升高, 资源密度增量重心进一步扩大, 主要分布在崇明岛沿岸水域, 长江口北部资源密度增量较低。2050 年, 资源密度增量进一步增大, 资源密度增量重心分布区域进一步扩大, 主要分布在崇明

岛的外侧水域(图 7)。

## 3 讨论

气候变化是决定生物分布和多样性的重要因子 (Root *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004; Rosenzweig *et al.*, 2008)。在渔业生态系统中, 气候变化引起的海水温度、盐度等变化影响了渔业生物的代谢率, 这种影响可通过渔业生物本身的调节和适应引起其纬度 (Perry *et al.*, 2005; Hiddink *et al.*, 2008; 苏杭等, 2015) 和深度 (Dulvy *et al.*, 2008) 的迁移, 部分迁移能力和适应能力上受限制的种类会灭绝, 而适应能力强的种类会形成入侵。其中, 亚寒带海区、热带海区及陆架边缘海是种类灭绝的高发区, 而北冰洋区、南大洋区是种类入侵的高发区 (Thomas *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2009)。Cheung 等 (2013b) 以平均温度渔获量研究全球渔获量变化时发现, 海洋暖化引起热带鱼类向温带迁移, 温带鱼类向寒带迁移, 导致热带平均温度渔获量降低, 鱼类种类减少; 在中国的闽南-台湾浅滩渔场和黄海水域也有类似发现 (张学敏等, 2005; 李忠炉等, 2012)。长江口虽是区域性海域, 但气候变化对其影响在鱼类资源密度增量分布上也有所体现。不同气候变化情景下, 长江口水域鱼类资源密度增量在 2020 年、2030 年主要分布在长江口北部, 2050 年则转移至崇明岛外侧水域。资源密度增量重心主要分布在崇明岛外侧水域, 并且随着时间延长资源密度增量重心南移。在不考虑捕捞、污染等人类活动的影响条件下, 不同气候变化情景下鱼类资源密度增量随着温室气体排放的增加而增加,  $RCP2.6 < RCP6.0 < RCP8.5$ , 并且 RCP8.5 情景下鱼类资源密度增量重心的分布范围也最大, 这与底层鱼类资源密度增量变化趋势一致。这种变化与底层鱼类和中上层鱼类在本研究中入选种类的适温性有较大关系。在本研究中, 中上层鱼类资源密度较高的主要以暖水性种类为主, 如鳀、黄鲫、凤鲚、赤鼻棱鳀、康氏小公鱼和鲈等; 底层鱼类资源量相对较高的以暖温性种类为主, 如小黄鱼、黄鲛、六丝钝尾鰕虎鱼等。暖温性和暖水性鱼类对气候变化的响应不同, 暖水性鱼类受影响较大, 可引起较大幅度迁移, 因本研究区域范围受限, 故在资源密度预测中相对较低。另外, 本研究中的暖水性鱼类主要是一些小型的短生命周期的鱼类, Perry 等 (2005) 研究证明, 这一类型的鱼类在气候变化背景下比大型长生命周期的种类更容易引起迁移, 并具有较高的脆弱性, 其分布和资源量在气候变化背景下的波动更大。由上可见, 气候变化在长江口鱼类资源密度分布重塑中发挥了重要作用, 近海渔业资源的适应性管理中气候变

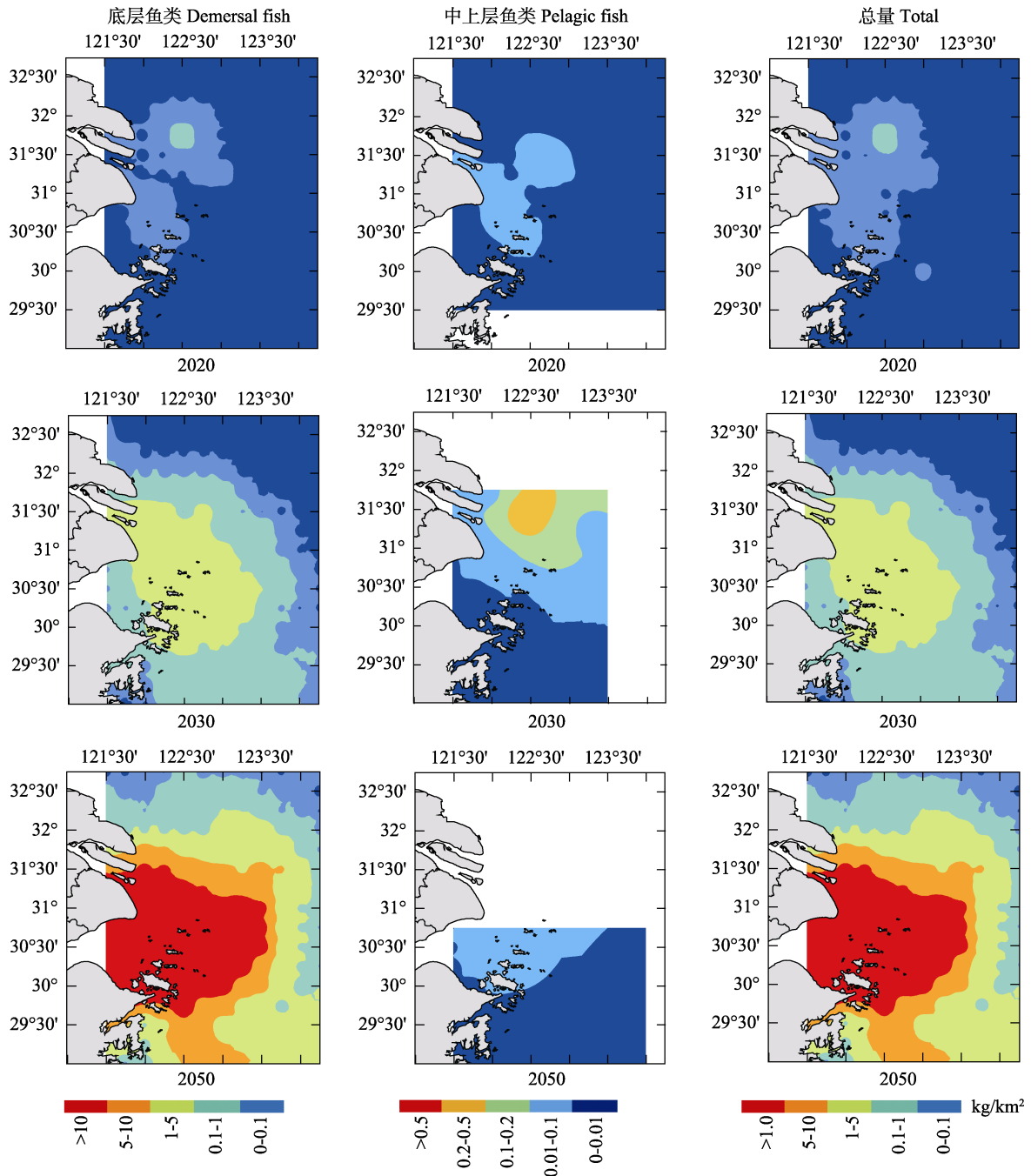


图 7 RCP8.5 情景下长江口水域鱼类资源密度增量分布

Fig. 7 Projections of the distribution of fish biomass increment in the Yangtze River estuary in the RCP8.5 scenario

化应作为一个重要因子考虑在内。

气候变化严重影响了渔业生物的分布、丰度及多样性,进而改变了生态系统的结构和功能(Cardinale *et al.*, 2006、2012; 徐炜等, 2016)。气候变化引起的资源量和种类组成的重新分布,不同海域和不同种类的变化有所不同,通常为高纬度区渔获量增加,低纬度区渔获量减少(Cheung *et al.*, 2010)。动态生物气候分室模型有效地模拟了这种气候变化引起的鱼类资源密度波动,如随着水温的升高,根据模型模拟结果,

崇明岛沿岸水域成为鱼类生长和繁殖更适宜的区域,鱼类资源密度增量相应增大;同时,长江口浮游植物和浮游动物生物量的变化也会引起部分鱼类分布范围的变化。其他研究也有类似发现,如 Cheung 等(2009)采用该模型发现,高纬度海区的生物多样性对气候变化比较敏感,与在实际观测中鱼类群落多样性变化趋势一致(Hiddink *et al.*, 2008),并且模型预测鱼类生理生态学效应,基本与实际效应值一致(Pörtner *et al.*, 2007)。但本研究模型中涉及的鱼类

主要是以中上层和底层种类为主, 一些底栖性鱼类并未包含在内。Hughes 等(2015)研究发现, 气候变化对低氧区有一定的调节作用, 而低氧对底层和底栖鱼类多样性及育幼场功能具有一定影响, 这对长江口鱼类资源密度增量评估会产生一定影响。另外, 鱼类资源密度分布与过度捕捞、栖息地破坏、污染等因素也密切相关, 并且气候变化会与这些因素协同作用从而影响鱼类的适应性, 在以后的研究中会进一步考虑气候变化与其他影响因子的协同作用。

## 参 考 文 献

- 王跃中, 孙典荣, 林昭进, 等. 捕捞压力和气候因素对黄渤海带鱼渔获量变化的影响. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1043–1050
- 王跃中, 贾晓平, 林昭进, 等. 东海带鱼渔获量对捕捞压力和气候变动的响应. 水产学报, 2011, 35(12): 1881–1889
- 牛明香, 李显森, 赵庚星. 黄海中南部越冬鳀鱼空间分布及其与水温年际变化的关系. 应用生态学报, 2012, 23(2): 552–558
- 刘允芬. 气候变化对我国沿海渔业生产影响的评价. 中国农业气象, 2000, 21(4): 1–5, 28
- 孙鹏飞, 戴芳群, 陈云龙, 等. 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 8–16
- 苏杭, 陈新军, 汪金涛. 海表水温变动对东、黄海鲈鱼栖息地分布的影响. 海洋学报, 2015, 37(6): 88–96
- 李玉尚, 陈亮. 清代黄渤海鲱鱼资源数量的变动——兼论气候变迁与海洋渔业的关系. 中国农史, 2007, 26(1): 24–32
- 李玉尚. 1600 年之后黄海鲱的旺发及其生态影响. 中国农史, 2010, 29(2): 10–21
- 李忠炉, 金显仕, 张波, 等. 黄海大头鳕(*Gadus macrocephalus*) 种群特征的年际变化. 海洋与湖沼, 2012, 43(5): 924–931
- 何发祥, 陈清花, 郑爱荣. 厄尔尼诺与浙江近海冬汛带鱼渔获量关系. 海洋湖沼通报, 1995(3): 17–23
- 何发祥, 洪华生, 陈刚. ENSO 现象与台湾海峡西部海区中下层鱼类渔获量关系. 海洋湖沼通报, 2003(1): 27–34
- 张学敏, 商少平, 张彩云, 等. 闽南-台湾浅滩渔场海表温度对鲈鳕鱼类群聚资源年际变动的初探. 海洋通报, 2005, 24(4): 91–96
- 罗秉征, 薛频, 卢继武, 等. 三峡工程对河口及邻近海域渔业影响的初步探讨. 海洋科学集刊, 1992, 33: 341–352
- 金显仕, 程济生, 邱盛尧, 等. 黄渤海渔业资源综合研究与评价. 北京: 海洋出版社, 2006
- 洪华生, 何发祥, 杨圣云. 厄尔尼诺现象和浙江近海鲈鳕鱼渔获量变化关系—长江口 ENSO 渔场学问题之二. 海洋湖沼通报, 1997(4): 8–16
- 徐炜, 马志远, 井新, 等. 生物多样性与生态系统多功能性: 进展与展望. 生物多样性, 2016, 24(1): 55–71
- Bakun A. Global climate change and intensification of coastal ocean upwelling. Science, 1990, 247(4939): 198–201
- Beaugrand G, Reid PC, Ibañez F, et al. Reorganization of North Atlantic marine copepod biodiversity and climate. Science, 2002, 296(5573): 1692–1694
- Belkin IM. Rapid warming of large marine ecosystems. Prog Oceanogr, 2009, 81(1–4): 207–213
- Berry PM, Dawson TP, Harrison PA, et al. Modelling potential impacts of climate change on the bioclimatic envelope of species in Britain and Ireland. Global Ecol Biogeogr, 2002, 11(6): 453–462
- Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, et al. Biodiversity loss and its impact on humanity. Nature, 2012, 486(7401): 59–67
- Cardinale BJ, Srivastava DS, Duffy JE, et al. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. Nature, 2006, 443(7114): 989–992
- Cheung WWL, Lam VWY, Pauly D. Modelling present and climate-shifted distribution of marine fishes and invertebrates. Fisheries Research Center Report, 2008
- Cheung WWL, Lam VWY, Sarmiento JL, et al. Large-scale redistribution of maximum fisheries catch potential in the global ocean under climate change. Global Change Biol, 2010, 16(1): 24–35
- Cheung WWL, Sarmiento JL, Dunne J, et al. Shrinking of fishes exacerbates impacts of global ocean changes on marine ecosystems. Nat Clim change, 2013a(3): 254–258
- Cheung WWL, Watson R, Pauly D. Signature of ocean warming in global fisheries catch. Nature, 2013b, 497(7449): 365–368
- Cheung WWL, Lam VWY, Sarmiento JL, et al. Projecting global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. Fish Fish, 2009, 10(3): 235–251
- Dulvy NK, Rogers SI, Jennings S, et al. Climate change and deepening of the North Sea fish assemblage: a biotic indicator of warming seas. J Appl Ecol, 2008, 45(4): 1029–1039
- Grandcourt EM, Cesar HS. The bio-economic impact of mass coral mortality on the coastal reef fisheries of the Seychelles. Fish Res, 2003, 60(2): 539–550
- Hiddink JG, Hofstede RT. Climate induced increases in species richness of marine fishes. Global Change Biol, 2008, 14: 453–460
- Hughes BB, Levey MD, Fountain MC, et al. Climate mediates hypoxic stress on fish diversity and nursery function at the land-sea interface. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(26): 8025–30
- Keith DA, Akçakaya HR, Thuiller W, et al. Predicting extinction risks under climate change: coupling stochastic population models with dynamic bioclimatic habitat models. Biol Lett, 2008, 4(5): 560–563
- Klyashtorin LB. Long-term climate change and main commercial fish production in the Atlantic and Pacific. Fish Res, 1998, 37(1): 115–125
- MacKenzie BR, Köster FW. Fish production and climate: sprat in the Baltic Sea. Ecology, 2004, 85(3): 784–794
- Nissling A, Larsson R, Vallin L, et al. Assessment of egg and larval viability in cod, *Gadus morhua*: methods and results from an experimental study. Fish Res, 1998, 38(2): 169–186
- Pearson RG, Dawson TP. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? Global Ecol Biogeogr, 2003, 12(5): 361–371
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, et al. Climate change and distribution shifts in marine fishes. Science, 2005, 308(5730): 1912–1915
- Peterson AT, Ortega-Huerta MA, Bartley J, et al. Future



- projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature*, 2002, 416(6881): 626–629
- Pörtner HO, Knust RC. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 2007, 315(5808): 95–97
- Richardson AJ, Schoeman DS. Climate impact on plankton ecosystems in the Northeast Atlantic. *Science*, 2004, 305(5690): 1609–1612
- Root TL, Price JT, Hall KR, *et al.* Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 2003, 421(6918): 57–60
- Rosenzweig C, Karoly D, Vicarelli M, *et al.* Attributing physical and biological impacts to anthropogenic climate change. *Nature*, 2008, 453(7193): 353–357
- Sheppard C. Predicted recurrences of mass coral mortality in the Indian Ocean. *Nature*, 2003, 425(6955): 294–297
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, *et al.* Extinction risk from climate change. *Nature*, 2004, 427(6970): 145–148
- Whitfield AK, Paterson AW. Distribution patterns of fishes in a freshwater deprived Eastern Cape estuary with particular emphasis on the geographical headwater region. *Water SA*, 2003, 29(1): 61–67

(编辑 马瑾艳)

## Reshaping the Distribution of Fish Abundance by Climate Change: A Case Study in the Yangtze River Estuary

SHAN Xiujuan<sup>1,2</sup>, CHEN Yunlong<sup>1,3</sup>, JIN Xianshi<sup>1,2①</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, DAI Fangqun<sup>1</sup>

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

**Abstract** Climate change affects the distribution of fish species and thus alters the pattern of fish abundance. However, effects of climate change on China coastal fisheries have not been studied yet. Estuaries play an important role in the function of marine ecosystem, hence they are key habitats for many fishery species and form ideal fishing grounds. Here we investigated the impacts of climate change on fish abundance by estimating the distribution of dominant and important species in the Yangtze River estuary. The analysis was performed using the dynamic bioclimate envelope mode, and the distribution data of fishery species were based on the survey during 2012–2013 in the Yangtze River estuary. Three climate change scenarios (RCP2.6, RCP6.0 and RCP8.5) were evaluated combined with the projection data from the Geophysical Fluid Dynamics Laboratory. The water temperature in the Yangtze River estuary was estimated. Without human activities, the increment of fish abundance, particularly the demersal fish abundance, increased over time in all three climate change scenarios. The increment and the distribution followed the order RCP8.5>RCP6.0>RCP2.6. The distribution of fish abundance increment in RCP8.5 was wider than those in the other two scenarios. It is expected that the fish abundance increment will be mainly in the north of the Yangtze River estuary in 2020 and 2030, and in 2050 the increment may migrate to the southern part, and there will be less increment in the offshore water body of the Yangtze River estuary. The center of fish abundance increment will be mainly located in the coastal area of the Chongming Island. These results suggest that the climate change greatly contributes to the fish abundance distribution in the Yangtze River estuary, and that the effects of climate change on fish abundance distribution vary in different scenarios. Therefore, climate change should be considered in the future adaptive fishery management in the coastal waters.

**Key words** Yangtze River estuary; Fish abundance distribution; Climate change scenarios; Dynamic bioclimate envelope model

① Corresponding author: JIN Xianshi, E-mail: jin@ysfri.ac.cn

# 茜素络合物对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 苗种耳石的染色标记效果\*



徐永江<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>1,2①</sup> 史宝<sup>1,2</sup> 翟介明<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

**摘要** 采用茜素络合物(Alizarin Complexone, ALC)分别浸泡标记 70 d 和 170 d 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)苗种耳石, 设置了 5 个浓度组和 3 个时间梯度组。结果显示, ALC 对半滑舌鲷 70–170 d 苗种的耳石染色效果明显。综合考虑存活率和标记效果, ALC 浸泡标记半滑舌鲷苗种耳石的适宜浓度为 100 mg/L (36 h 浸泡处理)和 150 mg/L(24 h 浸泡处理)。相同浸泡时间下, 随着 ALC 浓度的增加, 耳石上标记信号强度增加, 但实验鱼死亡率升高; 相同浸泡浓度下, 随着时间的增加, 耳石上标记信号强度增加, 实验鱼死亡率也会升高。对标记的 170 d 苗种进行养殖实验, 每 30 d 取样矢耳石进行观察, 发现 4 个月后实验鱼生长良好, 且耳石荧光信号仍可清晰检测到, 表明 ALC 在半滑舌鲷矢耳石上形成的荧光标记可长期存续, 标记效果好。研究结果可为半滑舌鲷大规模标志放流及早期生活史研究提供群体身份识别技术支持。

**关键词** 茜素络合指示剂; 半滑舌鲷; 耳石; 标记效果

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)06-0011-08

标记-回捕方法对研究鱼类的洄游、种群大小、生长率和行为等具有重要作用(Ricer, 1971)。耳石是鱼类生长和早期生活史研究的重要载体(Campana *et al*, 1985; Nielsen, 1992; Pannella, 1971; 杨青瑞等, 2007)。荧光染料标记鱼类耳石已被广泛使用, 荧光物质会在耳石上形成永久标记, 可应用于鱼类不同生活史阶段的相关研究(宋昭彬等, 1999)。硬骨鱼类的耳石位于鱼体内耳前庭区, 一共有 3 对耳石, 其中, 大的 1 对为矢耳石, 其余 2 对为星耳石和微耳石。Pannella(1971)提出鱼类日龄的概念, 此后耳石鉴定已成功应用于鱼类年龄鉴定(杨青瑞等, 2007)、生长分析(王菲等, 2010)、物种鉴别(Assis, 2003; 郭弘艺等, 2010)、近缘种鉴定(潘晓哲等, 2010)等研究领域, 取得了诸多研究进展。

鱼类耳石的主要成分为碳酸钙并含有有机物及

微量元素, 一旦形成, 很少发生再吸收现象, 比较稳定(高永华等, 2008)。同时, 因其可被荧光物质染色且可形成永久标记, 后来被广泛应用于鱼类的增殖放流回捕评估研究(Matsumura, 2000)。耳石标记具有操作简单、省时省力、对鱼类的存活和生长发育影响小等优点, 同时荧光物质标记不容易被破坏和冲洗, 所以在鱼类资源量调查、标记物种的放流识别、放流后生活习性跟踪调查、放流回捕及增殖效果评价等研究领域广泛应用(van Der Walt *et al*, 2003)。目前, 常用于耳石染色标记的荧光染料主要有盐酸四环素(Oxytetracycline, OTC)(Tsukamoto, 1995)、钙黄绿素(Calcein) (Wilson *et al*, 1987)、茜素络合物(Alizarin Complex-one, ALC) (Lang *et al*, 1993)、茜素红 S (ARS) (Unfer *et al*, 2013; Eckmann, 2003)。其中, ALC 因其使用安全性高、价格低廉和对耳石染色效果好等

\* 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022016003)和国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)共同资助。徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2016-01-05

优点成为最为常用的荧光染料之一, ALC 与钙离子螯合可形成猩红色荧光标记, 易于与耳石的自发荧光区别。另有研究表明, ALC 在耳石上形成的标记可以在显微镜自然光源下检测, 使标记检测更简单(Beckman *et al.*, 1996; 何春林等, 2008)。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为我国近海常见的暖温性大型底栖鱼类(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006)。近年来, 因过度捕捞和环境恶化引起其自然资源量不断下降, 已形不成渔获。2003年, 半滑舌鲷人工繁殖技术取得突破, 推动了养殖产业和资源增殖保护事业的快速发展。2006年以来, 我国开展了大规模的半滑舌鲷增殖放流活动, 为评估其放流增殖效果, 开发适宜的放流标志技术引起业界广泛关注。本研究利用 ALC 浸泡标记半滑舌鲷苗种耳石, 探索 ALC 适宜的浸泡时间和浸泡浓度, 以期建立高效的耳石荧光标记检测方法, 为半滑舌鲷标志放流和增殖效果评估提供群体身份识别技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼来源及培育

本研究在山东莱州明波水产有限公司开展, 实验用半滑舌鲷苗种为该公司人工培育的健康苗种, 苗种色泽正常, 大小规则整齐, 健康活泼, 摄食良好。

使用 70 d (全长 3–4 cm) 和 170 d (全长 8–10 cm) 2 个规格的实验鱼各 1000 尾, 实验开始前实验鱼在底面积为 25 m<sup>2</sup> 的水泥池中暂养 7 d。实验鱼培育条件: 水温为 18–20℃、盐度为 28–30、pH 为 7.8–8.3、溶解氧 5 mg/L 以上。实验鱼投喂配合饲料, 投喂量为鱼体重的 2%–3%, 每日清理培育池 1 次。

### 1.2 ALC 浸泡处理方案

实验用 ALC 购自 Sigma 公司。ALC 实验液配制方法: 先将 ALC 溶于蒸馏水中, 再加入少量 KOH 增加 ALC 的溶解性, 配成浓度为 1000 mg/L 的 ALC 储备液(调节盐度至 32), 然后用储备液加曝气的海水稀释成不同浓度的浸泡液。ALC 设置 5 个浓度梯度: 0(对照组)、50、100、150、200 mg/L。用 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液调节溶液的 pH 值至 8。

实验容器为圆柱形塑料桶(半径 50 cm, 高 50 cm), 实验前用自然海水清洗实验容器 2 次, 然后用自然海水浸泡 24 h。使用 20 个圆柱形塑料桶(100 L), 按照数字顺序编号标记, 每个桶中放置 100 尾实验鱼。其中, 1–5 号桶放置 70 d 鱼苗, 设置 1 组重复; 6–10 号桶为 170 d 鱼苗, 设置 1 组重复。将实验鱼置入实

验容器前饥饿 24 h, 对所有盛有染色液的容器进行遮光处理, 以减少环境对鱼体可能造成的胁迫影响。

观察并记录鱼苗在 ALC 染色液中 12 h、24 h、36 h 的成活率情况, 及时挑拣出死鱼。实验鱼死亡的标准: 实验鱼腹部朝上翻转或者以异物接触鱼体未见反应。浸泡处理过程中向实验水体中充气增氧, pH 保持在 8 左右, 水温保持在 18–19℃。实验结束后, 将实验鱼转移至新鲜海水快速清洗, 去除鱼体上的染色液, 然后将实验鱼分别置于盛有新鲜海水的相同实验容器中, 代谢 4 h, 继续去除鱼体上的 ALC 染色液, 培育并观察实验鱼的行为变化。

### 1.3 生长影响评价

ALC 染色结束后, 将 150 mg/L 组的 170 d 实验鱼进行养殖, 以评价 ALC 染色处理对生长的影响, 以未染色处理的实验鱼作为对照组。使用容积为 2 m<sup>3</sup> 的玻璃钢水槽进行养殖, 养殖时间为 4 个月。养殖条件: 水温为 17–20℃、盐度为 28–30、pH 为 7.8–8.3、溶解氧 5 mg/L 以上。养殖期间, 投喂人工配合饲料, 饱食投喂。日换水率为 100%, 每天清理实验容器底部。

记录实验鱼和对照组鱼在开始养殖和养殖结束时的全长和体重, 日瞬时生长速率按照如下公式计算:

$$G=100\times(\ln W_f-\ln W_i)/(t_f-t_i)$$

式中,  $W_i$  为起始体重,  $W_f$  为养殖结束后体重,  $t_f-t_i$  为饲养时间(d), 以  $G$  值为指标评价耳石标记对生长的影响。

### 1.4 耳石摘取方法

在 ALC 浸泡处理过程中, 在 12、24 和 36 h 自各实验组分别取实验鱼 5–6 尾, 以 MS-222 (300 mg/L) 麻醉致死, 以无水乙醇整体保存固定, 用于观察耳石的荧光标记情况。

对 200 mg/L 组的养殖鱼, 每 30 d 取实验鱼 9 尾, 摘取耳石用于荧光标记观察, 持续至养殖实验结束。耳石摘取及处理方法: 首先将实验鱼以 MS-222 麻醉致死, 然后以剪刀和解剖针快速取出耳石, 区分微耳石和矢耳石, 将耳石先用双蒸水清洗, 再用无水乙醇脱水, 晾干后, 把耳石放在二甲苯溶液里浸泡透明。半滑舌鲷耳石为内凹形, 使用砂纸(5000 目)将耳石进行打磨处理, 最后用少量中性树脂把耳石固定在载玻片上进行观察。耳石打磨处理期间, 使用 NIKON SMZ800 体视显微镜连续观察, 保证耳石处理到最佳厚度和可视度。耳石打磨完成后, 使用 NIKON ECLIPS 80i 正置显微镜观察耳石, 利用自带图像处理软件 NIS-Elements AR 进行拍照和图像处理。

### 1.5 耳石荧光信号观察

为了清晰地观察 ALC 对耳石的染色效果, 分别用可见光、黄绿光、蓝光和紫外光源照射激发耳石样本, 各种光源的激发滤光片和阻挡滤光片的波长见表 1。

耳石的染色标记效果以 4 个等级来区分标记效果, 分别为无(-)、可见(+)、较明显(++)、明显(+++)。

表 1 用于观察耳石 ALC 标记的滤光片波长  
Tab.1 The wave length of excitation filters and barrier filters used in the present study

光源 Light sources	波长 Wave length (nm)	
	激发滤光片 Excitation filter	阻挡滤光片 Barrier filter
绿光 Green light	510-560	590
蓝光 Blue light	450-490	520
紫外光 UV light	330-380	420

### 1.6 数据统计分析

本研究获得的实验鱼成活率数据为 2 个实验组的平均值, 日瞬时生长速率表达为平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行标记组与对照组实验鱼生长的差异显著性分析, 统计分析利用 SPSS 16.0 统计学软件进行。设定差异显著性水平  $P$  为 0.05, 当  $P < 0.05$  时为差异显著, 反之差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 ALC 对耳石标记的适宜浓度和处理时间

研究发现, 在 50、100 mg/L ALC 浓度下, 浸泡 36 h 后, 70 d 和 170 d 鱼苗成活率均达到 100%。在 150 mg/L ALC 浓度下, 70 d 鱼苗在浸泡 24 h 时开始出现死亡, 至 36 h 实验结束时成活率为 90%; 170 d 鱼苗在浸泡 12 h 时开始出现死亡, 成活率为 93%, 至 36 h 实验结束时成活率仅为 76%。而在 200 mg/L ALC 浓度下, 70 d 和 170 d 鱼苗在 12 h 即全部死亡。结果表明, 随着浸泡浓度增大和苗种日龄的增加, 半滑舌鲷对 ALC 浸泡处理的耐受力降低(表 2), ALC 的处理浓度应控制在 150 mg/L 以内。

通过可见光和荧光镜检发现, 不同浓度 ALC 在不同作用时间下对耳石的荧光标记率不同。在 50 mg/L ALC 浓度条件下, 36 h 时对 70 d 和 170 d 苗种矢耳石和微耳石的荧光标记率均低于 47%, 同时荧光信号强度较弱。100 mg/L ALC 浓度下, 24 h 对 70 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率分别达 76%和 79%, 至 36 h

时对耳石的标记率达到 100%; 对 170 d 鱼苗矢耳石和微耳石在 24 h 的荧光标记率分别达 79%和 82%, 至 36 h 时对耳石的标记率也都达到 100%。150 mg/L ALC 浸泡处理时, 70 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率在 24h 时分别达 90%和 85%, 至 36 h 时对耳石的标记率达到 100%, 170 d 鱼苗矢耳石的荧光标记率在 12 h 已达 86%, 在 24 h 时均达 100%; 在 200 mg/L ALC 处理组, 70 d 和 170 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率均在 12 h 时就已达 100%, 同时, 耳石的荧光信号最强, 但苗种出现大量死亡。综合考虑 ALC 浸泡处理后鱼苗成活率、耳石荧光标记率、耳石标记效果等因素, 认为 ALC 对半滑舌鲷幼鱼耳石标记的适宜浓度应为 100-150 mg/L(表 2)。

同时发现, 借助于蓝光、黄绿光和紫外等荧光手段对耳石 ALC 标记效果的检测更容易辨识, 可提高耳石标记的检出效率。另外, 无论是 70 d 组还是 170 d 组鱼苗, 不同浓度的 ALC 浸泡处理后矢耳石的荧光信号强度总体强于微耳石, 因此, 选择矢耳石作为观察对象较为适宜。

### 2.2 ALC 适宜浸泡时间

当 ALC 浸泡处理时间为 12 h 时, 可见光和荧光下均可发现耳石荧光染色信号, 但效果不明显。处理 24 h 时, 无论是可见光下还是荧光下都有较好的耳石染色信号, 处理 36 h 时, 虽然标记的荧光信号强度随着浸泡时间增加而增强, 但 24 h 和 36 h 的荧光反应强度没有显著差异, 反而死亡率随时间的延长呈上升趋势(表 2), 因此, ALC 浸泡处理半滑舌鲷苗种的适宜时间以 24 h 为宜。

### 2.3 ALC 对耳石染色效果及保持时间

本研究发现, 茜素络合剂对半滑舌鲷耳石的染色效果较好, 在显微镜下观察容易辨识标记, 又能长时间保留染色效果。

使用蓝光、黄绿光和紫外光检查实验鱼耳石发现, 蓝光对染色耳石观察的效果最佳, 其次为黄绿光, 再次为紫外光(图 1)。对实验鱼自实验开始连续 4 个月进行耳石取样, 发现各取样月份实验鱼耳石的染色信号强度差异不大, 即使在第 4 个月其信号强度与第 1 个月时并无明显差异(图 1), 表明茜素络合剂耳石的染色效果较为持久。

### 2.4 ALC 处理对生长的影响评价

在 4 个月的养殖实验中, ALC 实验组和对照组实验鱼未出现死亡。单因素方差分析表明, 养殖过程



表 2 不同浓度 ALC 对 2 种规格鱼苗在不同浸泡时间条件下的标记效果

Tab.2 Marking effects of ALC at different concentrations on two sized tongue sole juveniles under different treatment duration

浸泡液浓度 Treatment concentration (mg/L)	样本数 Fish number (ind)	标记 日龄 Fish age(d)	浸泡时间 Treatment duration (h)	成活率 Survival rate(%)	矢耳石 Sagitta				微耳石 Asteriscus			
					标记率(%)		标记强度		标记率(%)		标记强度	
					可见光	荧光	可见光	荧光	可见光	荧光	可见光	荧光
					Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light
50	100	70	12	100	0	12	-	+	0	11	-	+
100	100			100	23	50	-	+	28	57	+	+
150	100			100	65	90	+	++	65	85	+	++
200	100			0	100	100	++	+++	100	100	+	++
50	100		24	100	0	33	-	+	0	23	-	+
100	100			100	51	76	+	++	52	79	+	++
150	100			97	100	100	++	+++	100	100	++	++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
50	100		36	100	0	41	+	++	0	46	-	+
100	100			100	100	100	++	+++	91	100	++	+++
150	100			90	100	100	++	+++	100	100	++	+++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
0(对照组 Control group)	100		36	100	0	0	-	-	0	0	-	-
50	100	170	12	100	0	9	-	++	0	10	-	++
100	100			100	26	54	-	++	19	51	-	+
150	100			93	62	86	+	++	59	83	+	++
200	100			0	100	100	+	+++	89	100	+	++
50	100		24	100	2	31	-	++	2	35	-	+
100	100			100	45	79	+	++	49	82	+	++
150	100			89	100	100	+	+++	100	100	++	++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
50	100		36	100	3	42	-	++	2	45	-	+
100	100			100	89	100	+	++	100	100	+	++
150	100			76	100	100	++	+++	100	100	++	+++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
0(对照组 Control group)	100		36	100	0	0	-	-	0	0	-	-

中 ALC 实验组与对照组间在全长、体重方面无显著差异( $P>0.05$ )(表 3), 可见 ALC 标记对半滑舌鳎苗种的养殖生长无明显影响。

### 3 讨论

#### 3.1 耳石标记指示剂的选择

近年来, 在海洋鱼类的耳石标记所使用的指示剂中, ARS 和 ALC 已经逐渐取代了 OTC 和钙黄素, 其原因主要在于 ARS 和 ALC 对鱼体造成的损害较小, 标记后鱼类食用安全性高, 标记部位产生相对较弱的自发荧光。而 OTC 是一种抗生素, 且 OTC 随盐度的

增大, 游离 OTC 与钙结合, 导致 OTC 标记效果衰退, 不适宜标记海水鱼类耳石。

不同鱼类对荧光标记物的敏感性不一样, 随之带来的标记效果也不一样。Tsukamoto 等(1998)用一些小型鲤科鱼类的仔稚鱼进行 ALC 耳石标记实验, 表明产生可检测标记的 ALC 适宜浓度为 200 mg/L 或者更高。而欧阳斌等(1999)报道, 用 ALC 浸泡标记鮰鲫(*Gobiocypris rarus*)和彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *Pengze*)时, 150 mg/L 浓度时出现鱼体死亡, 200 mg/L 时鱼体全部死亡。本研究发现, 利用 ALC 浸泡标记半滑舌鳎时, 100 mg/L 组未发生死亡, 而 150 mg/L

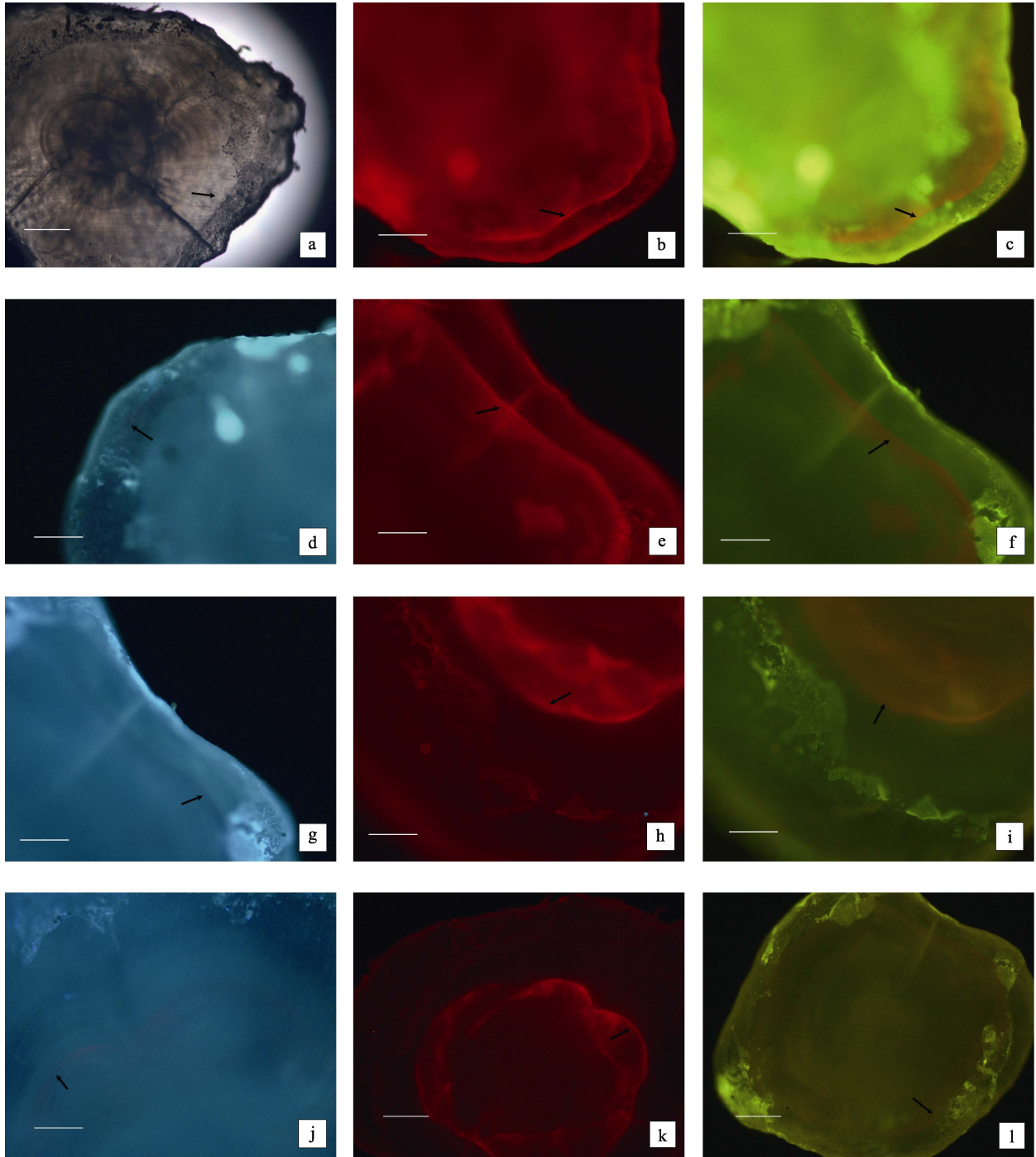


图 1 ALC 对半滑舌鳎耳石的标记效果

Fig.1 Marking effects of ALC on otoliths of juvenile tongue sole

a: 自然光下耳石整体; b: 标记后 1 个月耳石(黄绿光); c: 标记后 1 个月耳石(蓝光); d: 标记后 1 个月耳石(紫外光); e: 标记后 3 个月耳石(黄绿光); f: 标记后 3 个月耳石(蓝光); g: 标记后 3 个月耳石(紫外光); h: 标记后 4 个月耳石(黄绿光); i: 标记后 4 个月耳石(蓝光); j: 标记后 4 个月耳石(紫外光); k: 标记后 4 个月耳石整体观(黄绿光); l: 标记后 4 个月耳石整体观(蓝光)(注: 图 1-a、k、l 标尺为 500  $\mu\text{m}$ , 其他图片标尺为 250  $\mu\text{m}$ , 图中箭头示荧光标记部位)

a. unmarked sagittae; b. marked sagittae after one month (green light); c. marked sagittae after one month (blue light); d. marked sagittae after one month (UV light); e. marked sagittae after three months (green light); f. marked sagittae after three months (blue light); g. marked sagittae after three months (UV light); h. marked sagittae after four months (green light); i. marked sagittae after four months (blue light); j. marked sagittae after marked four months (UV light); k. whole marked sagittae after four months (green light); l. whole marked sagittae after four months (blue light) (Note: Bars indicated 500  $\mu\text{m}$  in figures 1-a, k, l, and 250  $\mu\text{m}$  in other figures. The arrows indicated marking sites)

表3 150 mg/L ALC 处理对 170 d 半滑舌鲷鱼苗生长的影响  
Tab.3 Effects of ALC of 150 mg/L on the growth of tongue sole juveniles

类别 Groups	实验开始 Beginning of experiment		实验结束 End of experiment (120 d)		日瞬时增长率 Daily instantaneous growth rate(%)
	全长 Total length(cm)	湿重 Wet weight(g)	全长 Total length(cm)	湿重 Wet weight(g)	
对照组 Control group	9.35±0.39	3.95±0.37	15.15±0.26	34.93±1.71	2.44±0.45
实验组 Experimental group	9.28±0.38	4.05±0.34	15.18±0.55	35.15±2.67	2.39±0.36

出现少量死亡, 200 mg/L 浓度时鱼苗则全部死亡, 表明高浓度 ALC 可造成半滑舌鲷苗种较高的死亡率。同时发现, ALC 浓度在 100–200 mg/L 时均能对半滑舌鲷幼鱼矢耳石和微耳石产生良好的标记效果, 且标记效果随着浸泡时间的延长而增强, 但浸泡时间为 24 h 和 36 h 时的标记效果差异不显著。另外, 实验鱼死亡率与浸泡时间和浸泡浓度成正比关系, 在 200 mg/L ALC 浓度下实验鱼死亡率达 100%, 150 mg/L ALC 浸泡 24 h 时 2 种规格鱼苗死亡率仅为 11% 和 3%。结果表明, ALC 适合浸泡标记半滑舌鲷耳石, 其适宜标记浓度为 100–150 mg/L, 适宜标记时间为 24 h。

本研究发现, 随着 ALC 浓度增大和浸泡时间延长, 耳石标记效果逐渐增强(表 2), 这与 Liu 等(2009)、Katayama 等(2007)对褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的研究结果一致。Liu 等(2009)研究发现, ALC 对褐牙鲈浸泡标记的最佳浓度为 300 mg/L, ALC 标记组与对照组间在养殖过程中全长、湿重无显著差异。Lagardère 等(2000)研究了 ALC 对大菱鲈的标记最适浓度为 120 mg/L, 同时表明其对大菱鲈的生长无影响。在本研究中, 半滑舌鲷浸泡标记的最佳浓度在 100–150 mg/L 之间, ALC 实验组与对照组间在养殖过程中无显著差异, 这与 Lagardère 等(2000)的研究结果一致。而在 200 mg/L 浓度下, 死亡率达到了 100%, 与牙鲈的标记结果不同, 可能是由不同物种对荧光染料的适应性不同造成的。另外, 本研究还发现, ALC 对鳍条的染色效果也较好, 浸泡 3 个月的鳍条硬棘的染色效果清晰可见。

### 3.2 ALC 对耳石标记效果的影响因素

已有研究表明, 影响 ALC 对鱼类耳石标记效果的因素主要有鱼日龄(宋昭彬等, 1999)、荧光物质浓度(Tsukamoto *et al.*, 1989)、浸泡时间(Beckman *et al.*, 1996)。作者认为, 随着鱼日龄的增大, 标记效果逐渐降低, 荧光物质在鱼类耳石中沉积的原理是鱼的新陈代谢促使荧光物质随着碳酸钙进入耳石, 参加下一轮的碳酸钙沉积, 随着时间的增加, 带有荧光物质的碳酸钙沉积越来越多, 逐渐形成一个荧光环。鱼日龄

越大, 新陈代谢降低, 碳酸钙沉积随之减慢, 使得荧光环变小或变淡。本研究发现, ALC 对 70 d 鱼苗的标记效果好于 170 d 鱼苗。荧光物质浓度对标记效果有明显的影响, 本研究中, 50 mg/L 和 100 mg/L ALC 虽能染色耳石, 但效果不明显。而 150 mg/L 和 200 mg/L ALC 染色效果则较为明显, 可见荧光物质浓度越高, 染色越明显。王正鲲等(2015)发现茜素络合物对唐鱼(*Tanichthys albonubes*)耳石染色的适宜浓度也随日龄增大而增加, 与本研究结果相似。赵亚鹏等(2013)利用茜素络合物标记滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)仔稚鱼耳石时同样发现, 在相同浸泡强度下, 20 日龄仔鱼耳石标记效果优于 90 日龄稚鱼, 其原因可能是低日龄苗种培育密度大, 对于荧光染料的利用率可能会高。影响标记效果的另外一个因素为浸泡时间, 浸泡时间越长, 染色效果越明显。但考虑到鱼体生理胁迫耐受力, 浸泡时间不宜过长。除此之外, 观察耳石之前对耳石的处理也是检测标记效果的重要原因, 半滑舌鲷耳石形状略显不同, 耳石中心位置突起对观察耳石、检测染色效果有很大影响, 需要对耳石进行打磨处理变薄, 从而更容易观察和检测。

Tsukamoto(1995)研究了马苏大马哈鱼(*Oncorhynchus masou*)经 ALC 浸泡标记后, 荧光标记的长期检测方法和标记保留时间, 表明马苏大马哈鱼耳石上形成的 ALC 荧光标记持续保留时间至少为 3 年。Liu 等(2009)利用茜素红对牙鲈耳石进行标记暂养 60 d 后, 也发现耳石荧光标记未出现消褪, 而本研究发现, 利用 ALC 浸泡标记半滑舌鲷苗种耳石后 120 d, 耳石上形成的荧光标记仍然清晰可见, 表明 ALC 对半滑舌鲷耳石的标记效果是长期保持的, 该标记方法可用于半滑舌鲷苗种的标志放流和增殖效果评估。

### 参 考 文 献

- 王正鲲, 赵天, 林小涛, 等. 茜素络合物对唐鱼耳石标记效果以及生长和存活率的影响. 生态学杂志, 2015, 34(1): 189–194  
王菲, 程家骅, 罗海忠. 东海条石鲷仔鱼耳石日轮与生长的

- 关系. 中国水产科学, 2010, 17(2): 320–328
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10–98
- 杨青瑞, 刘建虎, 吴强. 三峡水库太湖新银鱼耳石日轮与生长的研究. 淡水渔业, 2007, 37(3): 59–62
- 何春林, 付自东, 严太明. 用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石. 四川动物, 2008, 27(3): 331–334
- 宋昭彬, 曹文宣. 鳃鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证. 水生生物学报, 1999, 23(6): 677–682
- 欧阳斌, 常剑波. 荧光物质浸泡标记稀有鮟鮠和彭泽鲫仔、稚鱼. 水生生物学报, 1999, 23(4): 324–329
- 赵亚鹏, 潘晓赋, 杨君兴, 等. 滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)耳石的茜素红及茜素络合物标志. 动物学研究, 2013, 34(5): 499–503
- 柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 25–32
- 高永华, 李胜荣, 任冬妮, 等. 鱼耳石元素研究热点及常用测试分析方法综述. 地学前缘, 2008, 15(6): 11–17
- 郭弘艺, 魏凯, 唐文乔, 等. 基于矢耳石形态特征的中国鲚属鱼类种类识别. 动物分类学报, 2010, 35(1): 127–134
- 潘晓哲, 高天翔. 基于耳石形态的鱈属鱼类鉴别. 动物分类学报, 2010, 35(4): 799–805
- Assis CA. The lagenar otoliths of Teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. J Fish Biol, 2003, 62(6): 1268–1295
- Beckman DW, Schultz RG. A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. Trans Am Fish Soc, 1996, 125(1): 146–149
- Campana SE, Neilson JD. Microstructure of fish otoliths. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42(5): 1014–1032
- Wilson CA, Beckman DW, Dean JM, Charles A, Wilson DW. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. Trans Am Fish Soc, 1987, 116(4): 668–670
- Eckmann R. Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. Fish Manage Ecol, 2003, 10(4): 233–239
- Katayama S, Isshiki T. Variation in otolith macrostructure of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): A method to discriminate between wild and released fish. J Sea Res, 2007, 57(2–3): 180–186
- Lagardère F, Thibaudeau K, Anras MLB. Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions. ICES J Mar Sci, 2000, 57(4): 1175–1181
- Lang JB, Bnxtton CD. Validation of age estimation in sparid fish using fluorochrome marking. Afr J Mar Sci, 1993, 13(1): 195–203
- Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, et al. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Res, 2009, 98(1–3): 67–74
- Matsumura Y. Otolith marking for eggs, larvae and juveniles of ocellate puffer *Takifugu rubripes* by alizarin complexone and tetracycline. Nippon Suisan Gakkaishi, 2000, 71: 307–317
- Nielsen LA. Methods of marking fish and shellfish. New York: American Fisheries Society Special Publication, 1992, 23: 37–38
- Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. Science, 1971, 173(4002): 1124–1127
- Ricer WE. Methods for assessment of fish production in freshwater. Wiley-Blackwell Science Publication, 1971, 82–97
- Tsukamoto K, Kuwada H, Hirokawa J. Size-dependent mortality of red sea bream, *Pagrus major*, juveniles released with fluorescent otolith-tags in News Bay, Japan. J Fish Biol, 1989, 35(sA): 59–69
- Tsukamoto K. Use of otolith-tagging in a stock enhancement program for masu salmon, *Oncorhynchus masou*, in the Kaji River, Japan. Columbia: University of South Carolina Press, 1995, 403–422
- Unfer G, Pinter K. Marking otoliths of brown trout (*Salmo trutta* L.) embryos with alizarin red S. J Appl Ichthyol, 2013, 29(2): 470–473
- van Der Walt B, Faragher RA. Otolith marking of rainbow trout fry by immersion in low concentrations of alizarin complexone. N Am J Fish Manage, 2003, 23(1): 141–148



## Alizarin Complexone Marking of Otoliths of Juvenile *Cynoglossus semilaevis*

XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2</sup><sup>①</sup>, SHI Bao<sup>1,2</sup>, ZHAI Jieming<sup>3</sup>

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261418)

**Abstract** As a result of the scaled stock enhancement of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, since 2006 in China, millions of juveniles were released into the Bohai Sea and the Yellow Sea annually. However, it is difficult to evaluate the effectiveness of this operation because of a lack in efficient marking techniques. Here we tested the potential of alizarin complexone (ALC) as a marking material on tongue sole otolith. ALC solutions with 5 concentrations ranging from 0 to 200 mg/L in undiluted seawater were prepared. One hundred tongue sole juveniles of two sizes (70 d and 170 d post hatching) were randomly assigned into the 5 groups of ALC solutions and in each group the subjects were immersed into the solution for 12 hours, 24 hours, and 36 hours. Duplication was performed for each group. The results showed strong markings with ALC on otoliths of tongue soles. The optimal concentrations of ALC were 100 mg/L for 36-h marking and 150 mg/L for 24-h marking, which ensured both sound survival rate and strong marking signals. The marking quality (MQ) was assessed with scores from 0 to 3, and a score > 2 was regarded acceptable for adequate mark identification. The marking signals on the otolith were enhanced as the solution concentration increased, which however also increased the mortality rate. The marked juveniles (170 d) were cultured in indoor tanks for 4 months to determine how long the ALC marking could last. The marking signals were still clear at the end of the culture, and there was no difference in the growth between marked and unmarked subjects with the same size. These results indicated that ALC could form lasting signals on otoliths of tongue soles, and thus may be a useful tool in the evaluation of stock enhancement and the identification of tongue sole populations.

**Key words** Alizarin complexone; *Cynoglossus semilaevis*; Otolith; Marking effects

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

# 鳀科(Engraulidae)鱼类 DNA 条形码电子芯片研究

柳淑芳<sup>1,2</sup> 李献儒<sup>1,4</sup> 李 达<sup>1,5</sup> 庄志猛<sup>1,3①</sup>



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 5. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究将基于线粒体 *COI* 部分序列的 DNA 条形码和 DNA 芯片技术相结合,以鳀科 11 属 30 种鱼类为研究对象,在比对分析其 DNA 条形码序列的基础上,利用软件 Oligo Array 2.1 筛选探针,经 OligoCalc 优化探针,去除易形成发夹(Hairpin)、茎环(Stem-loop)及自身二聚体结构(Homodimers)的探针,再利用 Oligo heat map 对探针与靶标序列进行虚拟杂交,共有 14 个物种的 24 条探针能与靶标序列特异性结合。利用 DNA 条形码芯片技术能将 14 个物种鉴定到种,虽然物种识别能力仅占总物种数的 46.7%,但鉴定准确率可达 100%。因此,基于 *COI* 基因的 DNA 芯片技术对鳀科鱼类物种鉴定有一定的实用价值,但该技术对物种的识别能力尚有较大提升空间,通过筛选和优化得到高质量的分子探针则是突破该项技术的关键。

**关键词** 鳀科; DNA 条形码; 探针; DNA 芯片; 电子杂交

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0019-07

作为生物多样性保护的重要组成部分,物种的快速分类鉴定至关重要。形态学鉴定的局限性和不断缩减的形态分类学家队伍,使分类学的发展面临巨大的挑战。基于 DNA 条形码技术的分类系统是分类学中辅助物种鉴定的新技术(Austerlitz *et al.*, 2009),其原理为选择不同物种的一段同源 DNA 序列,通过序列比对和聚类分析,将物种鉴定为已知种或发现新物种(Xiao *et al.*, 2004; Moritz *et al.*, 2004)。Hebert 等(2003)通过 DNA 条形码技术成功区分了鳞翅目 200 个物种,认为以 *COI* 序列为基础的 DNA 条形码系统具有可靠、廉价、易推广等特点,并提出利用该技术进行生物分类鉴定的设想。随后,该团队又对 260 种北美鸟类进行了 DNA 条形码分析,发现种间差异约为种内差异的 18 倍,并成功将鸟类鉴定到种(Hebert *et al.*, 2004)。Ward 等(2005)利用 DNA 条形码技术对澳大利亚 207 种海洋鱼类进行分类,发现所有鱼类都能被成

功区分,认为该技术可应用于鱼类的分类鉴定。鉴于 DNA 条形码在物种鉴别上的广泛尝试和应用,2007 年,加拿大正式筹建了国际生命条形码数据库系统(Barcode of Life Data Systems, BOLD)。2008 年,我国成为 iBOL 四个中心节点之一。全球鱼类 DNA 条形码计划(Fish Barcode of Life Initiative, FISH-BOL)始于 2004 年,我国相关单位也积极参与其中,鱼类 DNA 条形码数据库不断得到扩充。本团队也陆续开发了一批近海鱼类、头足类等渔业生物 DNA 条形码(柳淑芳等, 2010; 王鹤等, 2011),并结合形态学分类结果探讨了 DNA 条形码在渔业生物分类鉴定上的可行性。

目前,国内外关于 DNA 条形码的研究仍然集中在积累数据,进而充实数据库。本研究尝试将 DNA 条形码与 DNA 芯片结合起来,以期利用 DNA 芯片的高通量、重复性好、操作性强等优点弥补 DNA 条

\* 山东省科技发展计划项目(2012GHY11531)、科技基础性工作专项(2013FY110700)和泰山学者建设工程专项经费共同资助。柳淑芳, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 庄志猛, 研究员, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-03, 收修改稿日期: 2015-12-30

形码需要测序、繁琐费时的不足。目前,开发了用于多种细菌病原体检测的特异性DNA芯片(Schena *et al.*, 1998; Kozal *et al.*, 1996; Dudda-Subramanya *et al.*, 2003; Santini *et al.*, 1999),但鲜见将该技术应用到渔业生物分类鉴定的研究报道。鳀科(Engraulidae)鱼类隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲱形目(Clupeiformes),为世界海洋渔业最主要的类群之一,其总产量在各类鱼类中位居世界第3位。例如,日本鳀(*Engraulis japonicus*)既是日本、朝鲜、俄罗斯和中国在西太平洋远东海洋渔业中的重要捕捞对象,也是海洋掠食者的重要饵料生物。我国的日本鳀资源量曾高达300万t(张世义,2001),是我国海洋渔业资源的重要组成部分(刘瑞玉,2008)。全世界的鳀科鱼类约16属139种(Whitehead *et al.*, 1988),我国分布有7属24种(张世义,2001)。本研究综合运用多种分子生物学软件,在鳀科鱼类物种DNA条形码的基础上筛选特异性分子探针,并探讨其在DNA电子芯片杂交中的有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究样本来自中国水产科学研究院黄海水产研究所渔业生物样本库,主要采自我国黄海、东海。参考《中国鱼类系统检索》、《鱼类分类学》(成庆泰等,1987;孟庆闻等,1995)进行形态学分类鉴定。鳀科鱼类样品共计37份,初步鉴定为5种(表1)。参考FishBase (<http://fishbase.org/>)和综合分类学信息系统(Integrated Taxonomic Information System, ITIS)对物种的有效名以及分类地位进行确定。对每个样本拍照记录,取背部肌肉组织用于DNA提取。

### 1.2 DNA提取、PCR扩增及测序

采用酚-氯仿法提取DNA(Maniatis *et al.*, 1985), $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR扩增采用DNA条形码通用引物(Ward *et al.*, 2005),由华大基因公司合成。引物序列为:F1(TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC);F2(TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC);R1(TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA);R2(ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA)。PCR反应总体积为25  $\mu\text{l}$ , $10\times$ 缓冲液成分为100 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)、500 mmol/L KCl、15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、0.1%明胶,dNTPs终浓度为200  $\mu\text{mol/L}$ ,各引物终浓度为1.0  $\mu\text{mol/L}$ ,Taq聚合酶0.125 U,总DNA量为50 ng。采用升式PCR,反应程

序为: $94^{\circ}\text{C}$  3 min; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $53^{\circ}\text{C}$  30 s, $72^{\circ}\text{C}$  40 s,8个循环; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $54^{\circ}\text{C}$  30 s, $72^{\circ}\text{C}$  40 s,8个循环; $94^{\circ}\text{C}$  30 s, $55^{\circ}\text{C}$  30 s, $72^{\circ}\text{C}$  40 s,16个循环; $72^{\circ}\text{C}$  10 min。每次PCR反应设立不含DNA模板的空白对照。

阳性PCR产物送至华大基因公司采用ABI PRISM<sup>TM</sup>3730XL DNA Analyzer DNA测序仪进行序列测定,用PCR扩增引物作为测序引物进行双向测序。

### 1.3 公共序列信息下载与筛选

从GenBank下载与本研究扩增区段一致的鳀科鱼类COI基因序列,通过BOLD数据库对下载序列进行准确性验证,同时在Fishbase中检验种名的有效性,最终从公共数据库中筛选出11属25种鳀科鱼类的64条序列,与本研究获取的5种鳀科鱼类37条序列合并为11属30种101条COI基因序列。相关信息见表1。

### 1.4 序列分析

**1.4.1 建立本地Blast数据库** 鳀科所有COI基因序列整合成序列文件seq.fasta,建立本地Blast数据库,将序列文件seq.fasta格式化,输出文件seq.fasta.nsq,用于搜索靶标序列和Blast数据库中所有序列的相似性,评估探针的特异性。

**1.4.2 筛选探针** 鳀科的11属30种101条序列为数据集1。利用软件Oligo Array 2.1为数据集分别筛选探针,输入序列为鳀科的序列文件及格式化文件。设置参数为:探针长度23-27 bp, $T_m$ 值 $70-82^{\circ}\text{C}$ ,GC含量40%-55%, $\text{Na}^+$ 和DNA浓度分别为1 mol/L和1  $\mu\text{mol/L}$ ,形成二级结构的最大 $T_m$ 值和交叉杂交最小 $T_m$ 值为 $65^{\circ}\text{C}$ ,2个探针间距离为25 bp,最大探针数为5,连续出现的单一碱基数不超过4个(如AAAA)。

**1.4.3 物种特异性探针的筛选** 本研究中使用NCBI-blast-2.2.24-win32.exe、Oligo Array 2.1和Oligo Array Aux 3.8软件筛选属级特异性及物种特异性探针。选取的标准是该探针为该属或物种所特有且与其他物种序列无同源性。所得探针在OligoCalc在线软件(<http://www.simgene.com/OligoCalc>)中优化,排除易形成发夹、茎环及自身二聚体结构的不合格探针。设定探针序列自身不存在大于5个碱基的互补配对,和大于4个碱基的反向互补配对。

**1.4.4 探针与靶标序列虚拟杂交** 各数据集序列利用ClustalX比对切齐。优化后的物种特异性探针与切齐序列在Oligo heat map (OHM)在线软件(<http://bioinfo.unice.fr/software/ohm/>)进行虚拟杂交,查看杂交结果。若探针能且只与其所代表物种的靶标序列

表 1 30 种鳀科鱼类 COI 基本信息  
Tab.1 Information of COI genes of 30 Engraulidae species

物种 Species	数量 Quantity	GenBank 序列号 GenBank Accession No.
欧洲鳀 <i>Engraulis encrasicolus</i>	3	AM911180; AM911181; AM911182
美洲鳀 <i>Engraulis mordax</i>	3	FJ164578; FJ164579; FJ164580
日本鳀 <i>Engraulis japonicus</i>	7	本研究(7)This study
阿根廷鳀 <i>Engraulis anchoita</i>	3	EU074422; EU074423; EU074424
新西兰鳀 <i>Engraulis australis</i>	2	EF609349; HQ167626
秘鲁鳀 <i>Engraulis ringens</i>	2	AM911170; HQ167627
银鳀 <i>Engraulis eurystole</i>	1	FJ918906
赤鼻棱鳀 <i>Thryssa kammalensis</i>	8	本研究(8) This study
长颌棱鳀 <i>Thryssa setirostris</i>	3	EF607597; EF607598; EF607599
汉氏棱鳀 <i>Thryssa hamiltonii</i>	3	EU148568; EU148569; EU148570
黄吻棱鳀 <i>Thryssa vitrirostris</i>	3	JF494691; JF494692; JF494693
马拉巴棱鳀 <i>Thryssa malabarica</i>	3	FJ347882; FJ347883; FJ347884
印度侧带小公鱼 <i>Stolephorus indicus</i>	3	EU595317; EU595318; EU595319
南非侧带小公鱼 <i>Stolephorus holodon</i>	3	JF494598; JF494599; JF494600
大眼小鳀 <i>Anchoa lamprotaenia</i>	3	JQ841067; JQ842365; JQ842366
墨西哥小鳀 <i>Anchoa ischana</i>	4	JQ398435; JQ398436; JQ398437; JQ398438
宽带小鳀 <i>Anchoa hepsetus</i>	3	JQ842002; JQ842003; JQ842004
绿小鳀 <i>Anchoa delicatissima</i>	2	GU440219; EU450645
高体小鳀 <i>Anchoa compressa</i>	2	EU450644; GU440218
浅湾小鳀 <i>Anchoa mitchilli</i>	3	JQ842367; JQ842368; JQ842369
刀鲚 <i>Coilia nasus</i>	7	本研究(7) This study
印度洋鲚 <i>Coilia ramacarti</i>	1	JX260855
太的黄鲫 <i>Setipinna taty</i>	7	本研究(7) This study
恒河黄鲫 <i>Setipinna phasa</i>	3	EU417790; EU417791; FJ459395
黄鲫 <i>Setipinna tenuifilis</i>	8	本研究(8) This study
宽带小公鱼 <i>Anchoviella lepidentostole</i>	3	JQ365220; JQ365221; JQ365222
尖吻半棱鳀 <i>Encrasicholina heteroloba</i>	3	EU392185; EU392186; EU392187
大西洋狼鳀 <i>Lycengraulis grossidens</i>	3	JX124803; EU074448; EU074449
太平洋鲸鳀 <i>Cetengraulis mysticetus</i>	1	JQ398441
大鳞多耙鳀 <i>Anchovia macrolepidota</i>	1	JQ398447

结合, 则此探针可作为代表物种的鉴别探针; 若探针不能与其靶标序列结合, 或者与其靶标序列结合的同时还能与其他物种的非靶标序列结合, 这两种情况下的探针均不能作为物种的鉴别探针。

## 2 结果与分析

### 2.1 鳀科鱼类 DNA 条形码信息

通过对鳀科的 11 属 30 种 101 条 COI 基因序列进行比对, 保留共有序列 615 bp 用于 DNA 条形码分析。结果显示, 30 种鳀科鱼类的 DNA 条形码序列的平均碱基组成为 A(24.2%)、T(28.4%)、C(28.2%)和 G(19.2%), 可见碱基组成表现出明显的偏倚性, A+T

含量(52.6%)高于 G+C 含量(47.4%)。所分析序列核苷酸位点中保守位点 501 个, 变异位点 114 个, 其中, 转换位点 70 个, 颠换位点 44 个。87%的转换和 98%的颠换发生在第 3 密码子位点; 第 2 密码子位点最稳定, 没有转换和颠换。

依据 K2P 模型计算 30 种鳀科鱼类的种内和种间遗传距离。结果显示, 种内平均遗传距离为 0.004, 种间平均遗传距离为 0.146, 种间与种内平均遗传距离比为 37; 仅有日本鳀和新西兰鳀(*Engraulis australis*) 2 个物种的种间/种内遗传距离比为 2.3; 其他物种均符合 Hebert 等(2004)提出的“10×规则”。

采用邻接法对 30 种鳀科鱼类的 COI 条形码序列构建分子系统进化树, 可以看出, 鳀科 30 种鱼类均

聚类成独立的分支,且具有较高支持度,各物种均能得到有效区分,表明 *COI* 基因作为 DNA 条形码用于鳀科物种分类鉴定是可行的。

## 2.2 鳀科物种探针信息及杂交结果

鳀科 30 个物种通过 Oligo Array 2.1 进行第 1 轮筛选,得到 24 个物种的 46 条特异性探针;通过 OligoCalc 检验去除 20 条不合格探针,第 2 轮得到 16 个物种的 26 条探针(表 2)。第 3 轮筛选,利用 Oligo heat map(OHM)将探针与鳀科物种 *COI* 基因序列虚拟电子杂交,杂交结果如图 1 所示, TZ53 为银鳀的探针,但它并没有与银鳀的靶标序列杂交,探针灵敏性不强。新西兰鳀的探针 TZ52 不仅与新西兰鳀的序列杂交,还与新日本鳀、欧洲鳀、银鳀的序列杂交, TZ71 为印度洋鲚的探针,还能与黄吻棱鳀的序列结合。上

述 2 条探针在于其靶标序列结合的同时还能与其他非靶标序列结合,探针特异性不强,故不能作为对应物种的特异性探针。其余 14 个物种的 24 条探针均能且只能与靶标序列特异性结合,均可以作为对应物种的鉴别探针。因此,本研究对 30 种鳀科鱼类的 *COI* 基因探针进行 3 轮筛选,最终获得 24 条特异性探针,这些探针可以准确、特异地检测出 14 种鳀科鱼类。虽然这批探针对鳀科鱼类的检测效率仅为 46.7% (14/30),但对杂交成功的物种的鉴定准确率可达 100%。

## 3 讨论

本研究利用在线软件筛选鳀科鱼类 DNA 条形码探针,经过两轮筛选优化后将探针与鳀科鱼类 *COI*

表 2 鳀科物种 24 条特异性探针编号及序列  
Tab.2 IDs and sequences of 24 probes of Engraulidae species

探针编号 Probe IDs	探针序列 Probe sequences	物种 Species
TZ51	TTTACTTCTCTCGCTCCCGGTTTTA	阿根廷鳀 <i>E. anchoita</i>
TZ52	TGACTTATTCCTCTATACTAGGGG	新西兰鳀 <i>E. australis</i>
TZ53	ACATTCTTATTCTTCCCGGATTCGG	银鳀 <i>E. eurystole</i>
TZ54	TAGCTGGTATTTTCATCTATTCTCGG	赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>
TZ55	CTGATATAGCCTTCCCGAATAAA	
TZ56	ACTGATTAGTACCGCTTATACTAGG	
TZ57	CCATCCTAGGAGCTATCAACTTCAT	汉氏棱鳀 <i>T. hamiltonii</i>
TZ58	GGAGCTATCAACTTCATCACTACAA	马拉巴棱鳀 <i>T. malabarica</i>
TZ59	TACCTCTCATGTTAGGAGCACCTGA	
TZ60	GGATCTCATCTATTCTAGGAGCAAT	长颌棱鳀 <i>T. setirostris</i>
TZ61	TGTTTCGTTTGATCAGTTCTCGTGAC	印度侧带小公鱼 <i>S. indicus</i>
TZ62	TTGGAGCAATCAACTTCATCACAAC	
TZ63	GTTGACCTGACAATCTTCTCCCTCC	
TZ64	GGTAGACCTAACAATCTTCTCTCTT	大眼小鳀 <i>A. lamprotaenia</i>
TZ65	TCCTAGGTGCCATCAATTTTCATCAC	宽带小鳀 <i>A. hepsetus</i>
TZ66	CCACTATCATCAATATGAAACCACC	墨西哥小鳀 <i>A. ischana</i>
TZ67	ACCACTATCATCAACATGAAACCAC	
TZ68	TTACTTCTTTCACTTCTGTCCTAG	浅湾小鳀 <i>A. mitchilli</i>
TZ69	CTTTTCACTTCACCTGGCCGGAATC	刀鲚 <i>C. nasus</i>
TZ70	ACTTAGTCAACCTGGGACACTCCTG	印度洋鲚 <i>C. ramacarti</i>
TZ71	TTCTCCTTTTATTAGCCTCATCTGG	
TZ72	CCATGCTTTCGTCATAATCTTCTTC	黄鲫 <i>S. tenuifilis</i>
TZ73	CTTACGATCTTTTCTCTCCACCTAG	
TZ74	CTTATTGCTCGCCTCTTCTGGAGTT	
TZ75	CGGACCGTAACTTAAACACCACCTT	尖吻半棱鳀 <i>E. heteroloba</i>
TZ76	AGTTCTCATCACGGCAGTACTTTTA	
TZ77	CTGGGAGACGACCAAATTTATAACG	



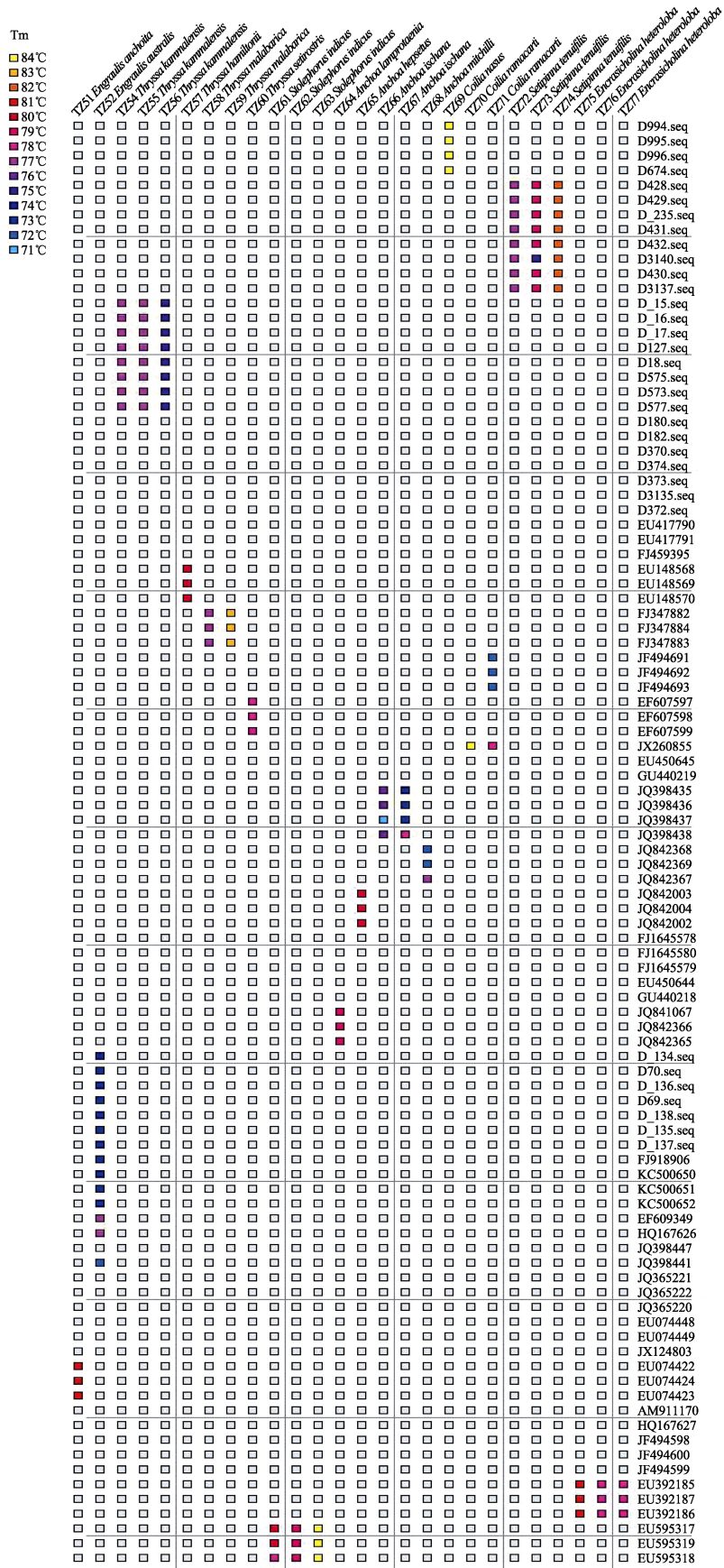


图 1 鯉科鱼类 DNA 条形码电子杂交

Fig.1 Electronic hybridization of DNA barcoding of Engraulidae species

基因序列进行虚拟电子杂交, 整个技术流程与实物 DNA 芯片大致相同, 包括探针的筛选、芯片的杂交和实验结果的统计分析 3 个步骤。作为流程的第 1 步, 探针筛选的质量高低直接影响最终实验结果, 准确的探针是芯片实验成功的必要条件(Hanharan *et al.*, 2003)。探针的筛选主要有三方面的要求: 同一性、灵敏性、特异性。由于探针均为在相同的条件下与靶标序列结合, 所以探针要有相似的特征, 即探针的同一性(包括探针长度、熔解温度、GC 含量等); 探针能与其靶标序列杂交即探针的灵敏性; 探针不能与其他物种的序列杂交即探针的特异性。寡核苷酸芯片探针的筛选需要复杂的生物信息学信息分析, 因此, 易于应用的探针设计软件非常重要(Li *et al.*, 2006)。Oligo Array 2.1 是在基因组水平上为寡核苷酸芯片的建立筛选探针的免费软件(Rouillard *et al.*, 2003)。该软件筛选探针基于三个标准: 一是寡核苷酸探针的熔解温度, 二是探针针对靶标序列的特异性, 三是在杂交温度下探针不能形成稳定的二级结构。本研究利用 Oligo Array 2.1 对鳃科 11 属 30 种鱼类筛选特异性探针, 共筛选出 24 个物种的 46 条探针, 占所选物种数的 80.0%。未能筛选出有效探针的物种主要是因其 DNA 序列设计探针的区段与其他物种的相似性较高, 导致与其他序列共享探针, 这种情况下的探针不具有物种特异性。可见, 物种间的同源性高, 序列相似度高, 会影响到探针的筛选。Trewick(2008)通过对新西兰特有属 *Sigauss* 进行条形码分析, 发现两种在形态学上具有明显差异的物种却拥有相同的 mtDNA 单倍型, 这种情况也无法成功筛选出物种特异性探针。

严格的探针筛选会大大降低探针的获取数量, 甚至一些物种无法获得物种特异性探针, 但这样筛选可增加探针的准确性、灵敏性和实用性。筛选出的探针必须能与靶标序列结合, 即探针的灵敏性要强。探针本身如果形成发夹、茎环及自身二聚体等结构, 则会影响到其与靶标序列的结合, 灵敏性降低。OligoCalc 是用来获得单链和双链 DNA 或 RNA 序列性质的在线软件, 这些性质包括熔解温度、序列分子量、GC 含量以及光吸收系数等。本研究利用 OligoCalc 对筛选出的 46 条探针进行进一步筛选, 去除易形成发夹、茎环及自身二聚体的探针, 最后剩余 16 个种的 26 条探针, 占所选物种数的比例下降到 53.3%。

探针筛选是为了检验探针能否与靶标序列结合, 进而达到物种鉴定的目的。OHM 是用来评估和显示寡核苷酸探针与 DNA 序列杂交的在线工具(Croce *et al.*, 2008)。本研究将筛选优化后的 16 个种共 26 条探针与靶标序列在 OHM 中虚拟杂交, 最后有 14 个

物种的 24 条探针可与其靶标序列特异性杂交, 可以作为物种的特异性鉴别探针。经过三轮筛选得到可用 DNA 芯片技术鉴别的物种数占总物种的 46.7%, 虽然检测效率不高, 但探针的特异性强。Kochzius 等(2010)利用 DNA 条形码和芯片技术对 50 种欧洲海洋鱼类进行分类分析, 结果只能鉴定出 10% 的物种。可见, DNA 条形码和芯片技术结合对物种的识别能力尚有较大提升空间。如果在保证探针质量的前提下增加有效探针的数量, 或者根据 DNA 条形码序列在不同区段设计多个探针同时与靶基因杂交, 则有望大大提高 DNA 条形码芯片技术对物种的识别能力。因此, 突破 DNA 条形码电子芯片技术的关键是如何筛选和优化获得高质量的分子探针。

## 参 考 文 献

- 王鹤, 林琳, 柳淑芳, 等. 中国近海习见头足类 DNA 条形码及其分子系统进化. 中国水产科学, 2011, 18(2): 245-255
- 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987
- 刘瑞玉. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 2008, 913-916
- 张世义. 中国动物志硬骨鱼纲(鲟形目、海鲢目、鲱形目、鼠鲭目). 北京: 科学出版社, 2001, 119-156
- 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 153-172
- 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232
- Austerlitz F, David O, Schaeffer B, *et al.* DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. BMC Bioinformatics, 2009, 10(S14): 296-300
- Croce O, Chevenet F, Christen R. OligoHeatMap (OHM): an online tool to estimate and display hybridizations of oligonucleotides onto DNA sequences. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 154-156
- Dudda-Subramanya R, Lucchese G, Kanduc D, *et al.* Clinical applications of DNA microarray analysis. J Exp Ther Oncol, 2003, 3(6): 297-304
- Hanharan R. The analysis of microarray data. Pharmacogenomics, 2003, 4(4): 477-497
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol, 2004, 2(10): 1657-1663
- Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, *et al.* Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. PLoS One, 2010, 5(9): 1-15
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, *et al.* Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. Nat Med, 1996, 2(7): 753-759
- Li WJ, Ying XM. Mprobe 2.0 computer-aided probe design for oligonucleotide microarray. Appl Bioinformatics, 2006, 5(3):

- 181–186
- Moritz C, Cicero C. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): 1529–1531
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. *Acta Biotechnol*, 1985, 5(1): 104
- Rouillard JM, Zuker M, Gulari E. Oligo Array 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(12): 3057–3062
- Santini JT, Cima MJ, Langer R. A controlled-release microchip. *Nature*, 1999, 397(6717): 335–338
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, *et al.* Microarray: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(7): 301–306
- Trewick SA. DNA barcoding is not enough: mismatch of taxonomy and genealogy in New Zealand grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Cladistics*, 2008, 24(2): 240–254
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1847–1857
- Whitehead PJP, Nelsonand GJ, Wongratana T. FAO species catalogue. Vol 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2-Engraulidae. FAO Fish Synop, 1988, 125(7/2): 305–579
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy. *Acta Zool Sin*, 2004, 50(5): 852–855

(编辑 冯小花)

## Development of DNA Barcode-Microarray for Identification of Engraulidae Fishes

LIU Shufang<sup>1,2</sup>, LI Xianru<sup>1,4</sup>, LI Da<sup>1,5</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1,3①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 5. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Species identification plays a key role in the protection of biodiversity. However, there have been great challenges in traditional morphological identification because of its innate limitations and the lack of experienced techniques. Recently thanks to the development of molecular biology, DNA-based identification is becoming a more accurate alternative method. The cytochrome oxidase I (*COI*) barcode is a short piece of DNA from a standard region of the mitochondrial genome, which can be used to identify and classify different species and has been proved to be highly effective in many species including fish. The advantage of *COI* is that it is long enough to identify variations among species yet short enough to be sequenced quickly at low cost. In this study, we analyzed DNA barcoding of Engraulidae species in order to explore the feasibility of DNA microarray technology in species identification. Oligonucleotide probes were designed based on the *COI* sequences of mitochondrial obtained from 101 individuals of 30 fish species in 11 genera. Forty-six specific probes obtained from 24 species were selected with online software Oligo Array 2.1, among which the probes potentially forming hairpin, stem-loop, or homo-dimers were identified with Oligonucleotide Properties Calculator and excluded. The remaining probes were virtually hybridized with the target sequences in Oligo Heat Map (OHM), and subsequently a total of 26 probes from 16 species bound to the target sequences specifically. The DNA microarray technology identified 14 species, accounting for 46.7% of the total with 100% accuracy. Therefore, DNA microarray based on *COI* sequences should have practical values in the identification of Engraulidae fish species. Nevertheless, this technique needs further improvement and the key step would be screening and optimization of high quality molecular probes.

**Key words** Engraulidae; DNA barcode; Probe; DNA Microarray; Electric hybridization

① Corresponding author: ZHUANG Zhimeng, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

# 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)

## 仔鱼发育过程\*



姜云荣<sup>1,2</sup> 于道德<sup>3</sup> 刘洪军<sup>3</sup> 官曙光<sup>3</sup> 张少春<sup>3</sup> 张岩<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 山东省海洋生物研究院 青岛 266002)

**摘要** 采用显微观察、拍照、测量的方法,对太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)人工培育苗种各阶段仔鱼的发育(0–80 dph day post hatching)进行了研究。结果显示,在水温为 2–12℃、盐度为 28–32、pH 为 7.8–8.2、光照为 800–1200 lx、微充气静水的培育条件下,太平洋鳕早期仔鱼发育主要特征为: 0–5 dph 仔鱼完全营内源性营养, 1 dph 仔鱼黑色素沉积较初孵仔鱼颜色加深, 眼球出现彩虹色素, 5 dph 仔鱼消化道已打通(除肝脏外); 6 dph 仔鱼开口摄食, 消化道内有小颗粒物质, 营混合性营养; 9 dph 大部分仔鱼卵黄囊吸收完毕, 消化道内充满褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*), 进入外源性营养期, 血细胞流动清晰可见; 12 dph 仔鱼头部黄色色素带明显; 15 dph 仔鱼黑色素和黄色素密集, 鳔器官开始形成; 17 dph 仔鱼开始出现彩虹色素; 20 dph 仔鱼眼球发育完善, 腹动脉可观察到明显的血流, 鱼体尾部色素点开始出现; 30–50 dph 仔鱼各鳍条雏形发育; 30 dph 仔鱼尾鳍条开始发育; 40 dph 仔鱼开始摄食卤虫(*Artemia* sp.), 第 1、2、3 背鳍已出现雏形; 50 dph 仔鱼尾椎骨开始上翘, 臀鳍、背鳍雏形已清晰可见; 60–80 dph 仔鱼色素细胞进一步发育, 各鳍条逐步发育完善, 胆囊清晰可见; 60 dph 仔鱼鳃部呈现红色; 70 dph 仔鱼腹部有银白色鳞片雏形出现; 80 dph 仔鱼鳃盖已基本发育完善, 腹鳍出现。本研究对太平洋鳕仔稚鱼发育过程进行了描述, 可为后续规模化人工繁育的开展提供基础数据。

**关键词** 太平洋鳕; 仔鱼发育; 形态特征

**中图分类号** S917.4; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0026-08

太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)又名大头鳕, 肉味鲜美、肉质口感好、个体抗病力强, 是一种物美价廉的海水鱼类, 其资源量较大, 是北太平洋(美国、俄罗斯、日本、加拿大、韩国和中国)最主要的渔获种类之一, 据 FAO 统计, 近年来太平洋鳕的世界产量在 40 万 t 左右。太平洋鳕在我国主要产于黄海, 历史上最高产量达 2.6 万 t, 其资源量存在周期波动, 曾维持较高水平(朱元鼎等, 1963; 沈汉祥等, 1987), 但近年来产量有所下降(高天翔等, 2003; 刘名,

2010<sup>1)</sup>)。

有关鱼类仔鱼发育的研究由来已久(刘筠, 1993; 李恒颂等, 2000; 易祖盛等, 2002; 谢恩义等, 2002; 张开翔, 1984; Wei *et al*, 2002), 对鱼类仔稚幼鱼的形态特征和生长发育的观察是鱼类资源保护和人工繁育的基础, 对鱼类的苗种培育具有重要的指导意义。目前, 对太平洋鳕苗种繁育过程中仔鱼发育的研究尚未见详细报道。本研究在太平洋鳕的人工繁殖过程中, 详细观察了其不同发育时期仔鱼的形态特征及发

\* 山东省科技发展计划(2013GHY11509)资助。姜云荣, E-mail: jxz5817@163.com

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

收稿日期: 2015-05-20, 收修改稿日期: 2015-12-25

1) 刘名. 太平洋鲱和大头鳕的群体遗传学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010

育速度, 可为太平洋鳕自然资源的开发利用以及深入开展太平洋鳕的工厂化人工育苗和规模化养殖提供基本的参考资料。

## 1 材料与方法

实验于2014年1-4月在山东省日照市福源育苗场进行。在太平洋鳕的人工繁殖和规模化苗种培育过程中, 从初孵仔鱼开始, 每天从育苗池中随机取样50尾, 使用Olympus sz61解剖镜和Nikon TS100显微镜观察仔鱼形态特征, 并拍照记录。

仔鱼通过人工授精方法获得, 苗种培育条件: 水温为2-12℃、盐度为28-32、pH为7.8-8.2, 前期微充气静水培养, 后期换水并逐渐加大换水量, 饵料为褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和卤虫(*Artemia* sp.)无节幼体。

根据仔鱼的营养来源将其划分为前期仔鱼期和后期仔鱼期, 全长以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 前期仔鱼期

0 dph (Day post hatching) 初孵仔鱼全长为(3.70±0.11) mm。卵黄囊较大、腹位、近头部已经部分被吸收。太平洋鳕卵异率孵化长达7 d左右。初孵仔鱼在水中呈倒悬浮状态, 无主动游泳能力, 偶尔以卵黄囊为中心, 靠尾部迅速摆动螺旋式向上运动; 眼球具黑色素, 呈现深棕色, 眼球下后方可见节律性跳动的心脏, 心率为(30±4)次/min; 腹腔上壁具黑色素丛, 消化道为实管状(图1-A); 躯干黑色素点状, 数量少, 不形成色素丛。

1 dph 仔鱼全长为(3.90±0.15) mm。卵黄囊吸收近1/2, 黑色素沉积较初孵仔鱼颜色加深, 眼球出现彩虹色素(图1-B)。仔鱼躯干部形成典型的双段环状色素丛, 为鳕鱼属特有的仔鱼形态特征(卞晓东, 2010)<sup>1)</sup>。仔鱼胸鳍出现(图1-C), 可保持身体平衡; 消化道未贯通, 肛门位于仔鱼鱼体右侧(图1-D)。

2 dph 仔鱼全长为(4.20±0.17) mm。卵黄囊进一步吸收, 由于不同仔鱼发育速度不同, 孵化出膜时间不同。此时, 卵黄囊大小不一, 有的少于1/2, 有的多于1/2; 眼球黑色。口裂出现(图1-E), 消化道继续膨大, 并向头部和尾部延伸。耳石清晰可见(图1-F), 黑色素分布区开始扩大; 心率增加至约50次/min。

3 dph 仔鱼全长为(4.30±0.20) mm, 卵黄囊进一步缩小, 由腹腔内膨大的消化道和肝脏填充(图1-G, 图1-H)。口裂继续扩大。

4 dph 仔鱼全长为(4.40±0.02) mm (图1-I)。吸收中的卵黄囊呈现不规则形状, 残存的卵黄囊边缘明显, 卵黄囊逐渐缩小。大部分仔鱼口裂形成, 但无张合动作, 头部开始出现黄色素带, 肠道及肝脏占据腹腔的大部分, 肠道内壁出现褶皱(图1-J)。肛门从体右侧移至腹部正中下方, 肛门末端未与外界相通。

5 dph 仔鱼全长为(4.60±0.12) mm。膀胱开始膨大(图1-K), 黑色素继续增多。上下颌已具张合能力, 部分仔鱼肛门处有蠕动, 消化道除近肝脏处仍未打通外, 其余部分均已打通(图1-L)。

6 dph 仔鱼全长为(4.60±0.10) mm。仔鱼开口摄食(图1-M, 图1-N), 上下颌张合频率较低, 初次摄食对象多为小球藻(*Chlorella* spp.)及其他小颗粒物质, 很少有摄食轮虫的个体出现。

9 dph 仔鱼全长为(4.80±0.07) mm。仔鱼上下颌张合频率提高, 摄食状况良好, 消化道内充满摄食的轮虫, 基本保持充盈状态(图1-O)。色素分布区扩散减慢, 呈现出较为清晰的大点状黑色素。血细胞流动清晰可见, 卵黄囊基本消失(图1-P)。

### 2.2 后期仔鱼期

12 dph 仔鱼全长为(5.50±0.19) mm。仔鱼摄食旺盛, 头部黄色素带明显(图2-A), 包括头颅处及其后的躯干部分, 黄色素无特定形状, 与黑色素的点状或放射状不同; 躯干的黑色素呈雪花状、点状分布(图2-B), 鳍膜基部开始出现黑色素(图2-C)。鳃盖后缘偶尔可见红色。

15 dph 仔鱼全长为(6.80±0.31) mm。黑色素和黄色素密集, 主要分布在头部上方、消化道上方和尾部的2个环状区域(图2-E); 肝脏前侧靠近头部的围心腔内, 发育中的血细胞呈粉红色, 颜色清晰可见(图2-F)。胸鳍发育较快, 已经出现放射条纹(图2-G)。部分个体鳔内开始充气(图2-H)。此阶段, 仔鱼出现大量死亡现象, 在水中极少数仔鱼分布, 3 d后水体中才出现仔鱼分布, 并由以前的避光聚集变为趋光聚集。

17 dph 仔鱼全长为(6.60±0.28) mm。桔红色点状色素颗粒大量分布于头颅上方、鼻孔附近、延髓与脑干连接处, 呈点状分布, 躯干其他部分的黄色素则无固定形状。此时, 躯干有扩散的黄色素带(图2-I), 同时

1) 卞晓东. 鱼卵、仔稚鱼形态生态学基础研究——兼报黄河口海域鱼类浮游生物调查. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010



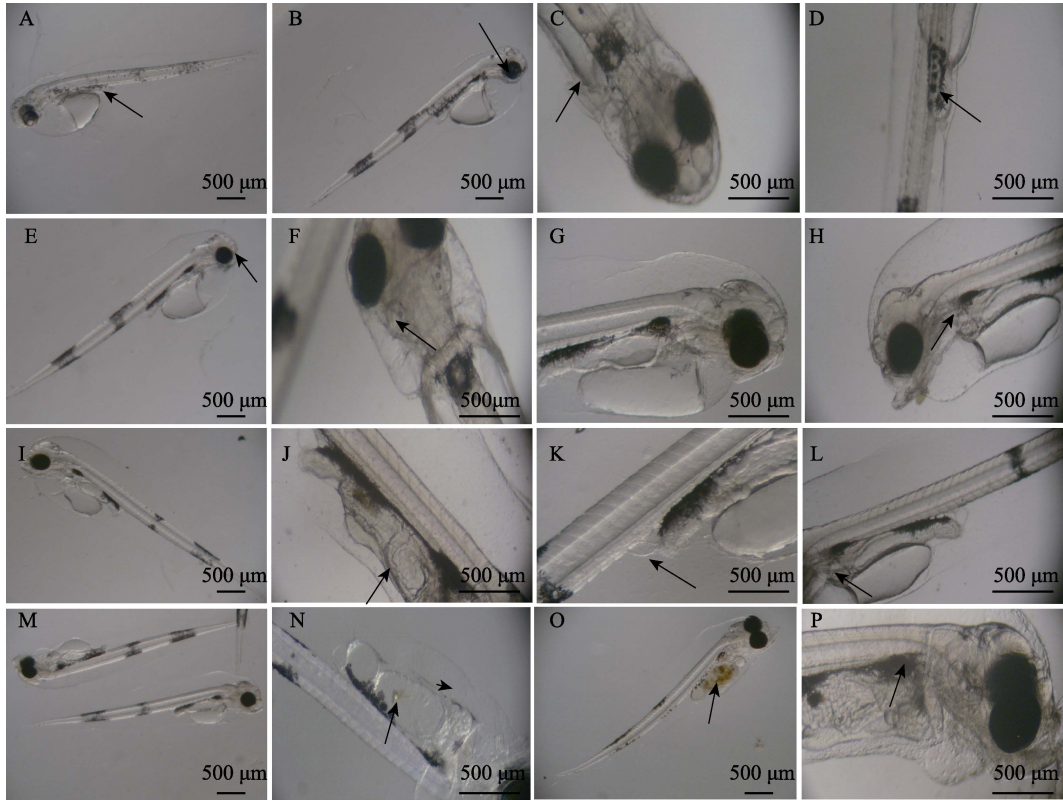


图 1 太平洋鲑前期仔鱼(0-9 dph)发育

Fig.1 The development of 0-9 dph *G. macrocephalus* larvae

A: 初孵仔鱼, 消化道(箭头所示)实心管状; B: 1 dph 仔鱼, 色素沉积颜色加深, 眼球彩虹色素(箭头所示)出现; C: 1 dph 仔鱼, 胸鳍(箭头所示)出现; D: 1 dph 仔鱼, 消化道末端在体右侧(箭头所示, 随机抽取 50 尾均在同侧); E: 2 dph 仔鱼, 口裂出现(箭头所示); F: 2 dph 仔鱼, 耳石(箭头所示)清晰可见; G: 3 dph 仔鱼, 消化道较 2 dph 仔鱼进一步膨大; H: 3 dph 仔鱼, 消化道及肝脏膨大(箭头所示); I: 4 dph 仔鱼, 口裂完成, 无张合功能; J: 4 dph 仔鱼, 消化道内壁出现褶皱(箭头所示); K: 5 dph 仔鱼, 膀胱(箭头所示)进一步膨大; L: 5 dph 仔鱼, 消化道于肝脏处仍未打通(箭头所示); M: 6 dph 仔鱼, 消化道完全打通; N: 6 dph 仔鱼, 消化道内小颗粒物质(箭头所示); O: 9 dph 仔鱼, 消化道内有轮虫存在; P: 9 dph 仔鱼, 血液循环系统清晰可见(图中箭头示血管)

A: Newly hatched larvae, digestive tract (indicated by the arrow) was a solid vessel; B: 1 dph larvae, pigmentation darkened, rainbow pigment appeared in eyeball (indicated by the arrow); C: 1 dph larvae, the pectoral fin appeared (indicated by the arrow); D: 1 dph larvae, the end of the digestive tract was in the right side of the body (indicated by the arrow, the digestive tracts of randomly selected 50 larvae were all in the same side); E: 2 dph larvae, schistostoma appeared (indicated by the arrow); F: 2 dph larvae, the otolith (indicated by the arrow) was visible; G: Digestive tract of 3 dph larvae expanded, comparing with 2 dph larvae; H: 3 dph larvae, digestive tract and liver enlarged; I: 4 dph larvae, schistostoma shaped, but the maxillary, mandible could not move; J: 4 dph larvae, folds appeared in the digestive tract (indicated by the arrow); K: 5 dph larvae, bladder enlarged (indicated by the arrow); L: 5 dph larvae, digestive tract still not canalized beside liver (indicated by the arrow); M: 6 dph larvae, digestive tract canalized completely; N: 6 dph larvae, small particles in the digestive tract (indicated by the arrow); O: 9 dph larvae, rotifera was found in digestive tract; P: 9 dph larvae, blood circulation was visible (blood vessel was indicated by the arrow)

具有黄、红两种点状色素颗粒(图 2-J)。约 10% 的个体可观察到已充气的鳔。

20 dph 仔鱼全长为(9.00±0.32) mm。眼球发育完善, 彩虹色素丰富, 在照片中可以明显看到大量反光色素点的存在, 呈现出蓝色、黄色、绿色等多种色彩(图 2-K-图 2-O)。充盈的消化道已将肝脏挤向腹腔的前下方。腹动脉可观察到明显的血流, 血细胞逐步变红, 使得围心腔、鳃部呈明显的红色。鱼体尾部色素

点开始出现, 无规律, 不同仔鱼尾部色素点分布情况见图 2-M 和图 2-N。

30 dph 仔鱼全长为(16.00±2.00) mm。躯干中部黄色素向背部方向延伸至仔鱼鳍膜, 仔鱼背鳍鳍膜退化, 鳍条开始发育; 尾鳍鳍膜出现色素颗粒, 以点状为主, 无规律, 尾鳍鳍条开始发育(图 2-P-图 2-S)。

40 dph 仔鱼全长为(22.00±2.20) mm。躯干后部黄色素更加明显, 鳍膜在躯干后部有裂口, 出现第 1、

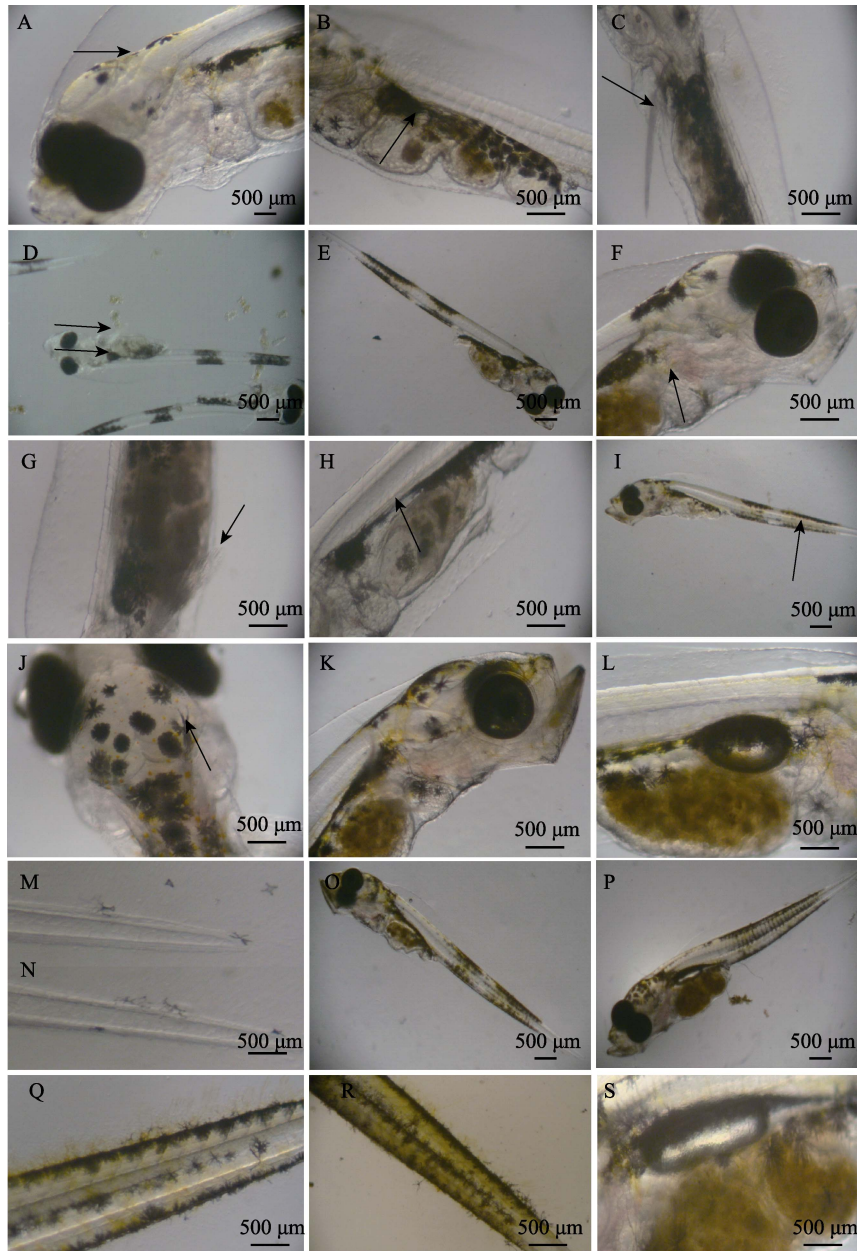


图 2 太平洋鳕后期仔鱼(12-30 dph)发育

Fig.2 The development of 12-30 dph *G. macrocephalus* larvae

A: 12 dph 仔鱼, 头部处黄色素(箭头所示); B: 12 dph 仔鱼, 躯干部黑色素(箭头所示); C: 12 dph 仔鱼, 胸鳍基部黑色素(箭头所示); D: 12 dph 仔鱼, 消化道内食物(箭头所示); E、F: 15 dph 仔鱼, 黑色素、黄色素呈三条带式, 肝脏靠近围心腔(箭头所示); G: 15 dph 仔鱼, 少数仔鱼胸鳍(箭头所示)发生; H: 15 dph 仔鱼, 少数仔鱼鳔器官(箭头所示)发生; I、J: 17 dph 仔鱼, 橘红色素(箭头所示)分布清晰; K: 20 dph 仔鱼, 眼球发育完善, 存在反光色素点; L: 20 dph 仔鱼, 鳔器官发育成型; M、N: 20 dph 仔鱼, 尾部色素分布无规律; O: 20 dph 仔鱼; P: 30 dph 仔鱼, 鳔发育完善; Q、R: 30 dph 仔鱼, 躯干色素向背、腹鳍膜扩散; S: 30 dph 仔鱼, 鳔器官及仔鱼摄食

A: 12 dph larvae, yellow pigment on head (indicated by the arrow); B: 12 dph larvae, melanin on body (indicated by the arrow); C: 12 dph larvae, melanin on pectoral fin (indicated by the arrow); D: 12 dph larvae, feed in the digestive tract (indicated by the arrow); E and F: 15 dph larvae, melanin and yellow pigment spread in three bands and liver near the pericardial cavity (indicated by the arrow); G: 15 dph larvae, pectoral fin developed in a few larvae (indicated by the arrow); H: 15 dph larvae, swim bladder developed in few larvae (indicated by the arrow); I and J: 17 dph larvae, orange pigment (indicated by the arrow) appeared clearly on body; K: 20 dph larvae, eye developed completely and there were reflection points of pigment; L: 20 dph larvae, developed complete swim bladder; M and N: 20 dph larvae, irregular distribution of pigment on the tail; O: The whole larvae body of 20 dph; P: 30 dph larvae, swimming bladder developed completely; Q and R: 30 dph larvae, the pigment migrated from the trunk to the back, and ventral fin membrane diffused; S: 30 dph larvae, swimming bladder and feed intakeing

2、3 背鳍的雏形；消化道进一步膨大，与躯干比例相对下降，口裂也进一步变大(图 3-A-图 3-D)，仔鱼可摄食少量卤虫，摄食量为 2-5 个。

50 dph 仔鱼全长为(29.00±1.80) mm。色素沉积相对 40 dph 更加明显，整个躯干部分色素均较深(图 3-E)。尾鳍进一步发育，尾椎骨开始上翘，放射丝少且分散，尾鳍鳍条数量较少但清晰可见(图 3-F)，臀鳍、背鳍雏形已清晰可见(图 3-E)。摄食卤虫量增加至 8-10 个。

56 dph 仔鱼全长为(33.00±1.60) mm。尾鳍鳍膜完全褪去，鳍条更加清晰，数量多且收拢密集。尾椎骨上翘程度与 50 dph 尾椎骨上翘程度相比有所下降(图 3-G、图 3-H)。

60 dph 仔鱼全长为(35.00±1.40) mm。黄色素在脊柱上下两侧呈对称性分布，点状黄色素逐渐变为条带状(图 3-I)；黑色素在脊柱两侧黄色素外侧沉积。绿色胆囊清晰可见；鳃部呈现红色(图 3-J)；臀鳍、背鳍清晰可见，鳍条数量较少且短。

70 dph 仔鱼全长为(46.00±0.97) mm。脊柱两侧红色血管对称存在(图 3-K)。臀鳍、背鳍趋于完善，幼鳍鳍膜褪去(图 3-L)。在解剖镜下观察，可以看见折光性很强呈颗粒的点状突起，腹部有银白色鳞片雏形出现(图 3-N)，标志着稚鱼期的开始。

80 dph 仔鱼全长为(59.00±2.70) mm。腹部、鳃前部有银白色存在(图 3-O)；鳃盖已基本发育完善，腹鳍出现(图 3-P)，此为太平洋鳕即将进入稚鱼期的另一个标志。80 dph 仔鱼的鳍条发育水平见图 3-Q；黑色素仍呈放射状，黄色素呈点状存在于体表(图 3-R)。

## 3 讨论

### 3.1 太平洋鳕仔鱼发育特征

作为低温鱼类，太平洋鳕的仔鱼发育过程十分缓慢，在 2-12℃ 范围内，仔鱼期经历近 80 d。本研究观察结果与车育(2009)<sup>1)</sup>对同为秋冬季繁殖的条斑星鲽(*Verasper moseri*)的研究结果相似。通过对比可发现，秋冬季繁殖鱼类的仔鱼发育有一些相似之处，如孵化、发育温度较低，孵化后开口摄食时间较长(6 d 以上)，发育过程均较缓慢等(表 1)，这有利于更加细致地观察其仔鱼发育。

### 3.2 死亡高峰期

观察发现，太平洋鳕在仔鱼培育期间，15 dph 仔鱼存在一个死亡高峰期。此时，仔鱼正处于鳔的发生

阶段，鳔发育异常可导致仔鱼脊柱弯曲，甚至造成仔鱼死亡。在黑海菱鲆(*Scophthalmus maeoticus*) (Spectorova *et al*, 1976)、鲮鱼(*Mugil cephalus*) (Nash *et al*, 1977)、金鲷(*Sparus auratus*) (Paperna *et al*, 1978; Chatain *et al*, 1990)、条纹鲈(*Morone saxatilis*) (Bennett *et al*, 1987)、大眼鲷(*Stizostedion vitreum*) (Colesante *et al*, 1986)等鱼类中也观察到鳔过度充气导致仔鱼大量死亡的现象，门强等(2003)也认为，仔鱼期鳔的形成和充气是影响闭鳔海水鱼类人工育苗成效的重要因素之一。本研究通过对太平洋鳕的观察认为，人工养殖条件下充气量过大是造成鳔过度充气的主要原因。在太平洋鳕人工繁育过程中，充气量的大小对仔鱼鳔的形成有重要影响，进而影响仔鱼的摄食、发育及存活。

### 3.3 太平洋鳕仔鱼发育分期

鱼类早期发育阶段大致可分为胚胎、仔鱼、稚鱼、幼鱼阶段。胚胎期一般指从受精至孵化，但也有作者认为，应从受精至开口摄食(Blaxter, 1988)。由于在太平洋鳕人工繁育过程中，鱼卵孵化后需要从孵化箱转移到培育池中进行培养，在育苗生产过程中，将胚胎期定义为从受精到孵化更利于育苗生产管理。

仔鱼期的划分也有着不同的标准，相当多的学者认为，孵化是仔鱼期的开始(Blaxter *et al*, 1963)。因为仔鱼孵化后更容易受外界环境的影响，其新陈代谢水平也显著增强(殷名称, 1991)，仔鱼孵出后其行为也发生了变化，并由于趋避等反应形成特定的时空分布规律。但持反对意见的学者认为，初孵仔鱼的发育状态在不同个体、不同种间存在着较大的差异，其孵化时间受内源性营养状况(如卵黄的质和量)和外部条件的制约，而倾向于以开口摄食作为胚胎和仔鱼的分界，并且这是鱼类从内源性营养转变为外源性营养的重大变化。这种划分主要是基于鱼类生理特性的变化。由于鱼类早期发育时间长、形态变化大，因此，难以筛选易于识别的特征。

近年来，有一种划分方法获得了大部分学者的认可，即将鱼类的早期生活史划分为胚胎期(从受精至孵化)、仔鱼期(从孵化至各鳍鳍条初步形成，特别是鳞片形成)、稚鱼期(鳞片形成至全身布满鳞片)。其中，仔鱼期又分为 2 个阶段，从孵化至卵黄完全吸收，称为早期仔鱼；其后称为晚期仔鱼。本研究参考了以上的划分方法，李艳秋(2013)<sup>2)</sup>对太平洋鳕早期发育阶段的生物学研究中也采取了这种划分方式。

1) 车育. 条斑星鲽人工繁育技术的研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2009

2) 李艳秋. 太平洋鳕(*Gadus macrocephalus* Tilesius)早期发育阶段的生物学研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2013



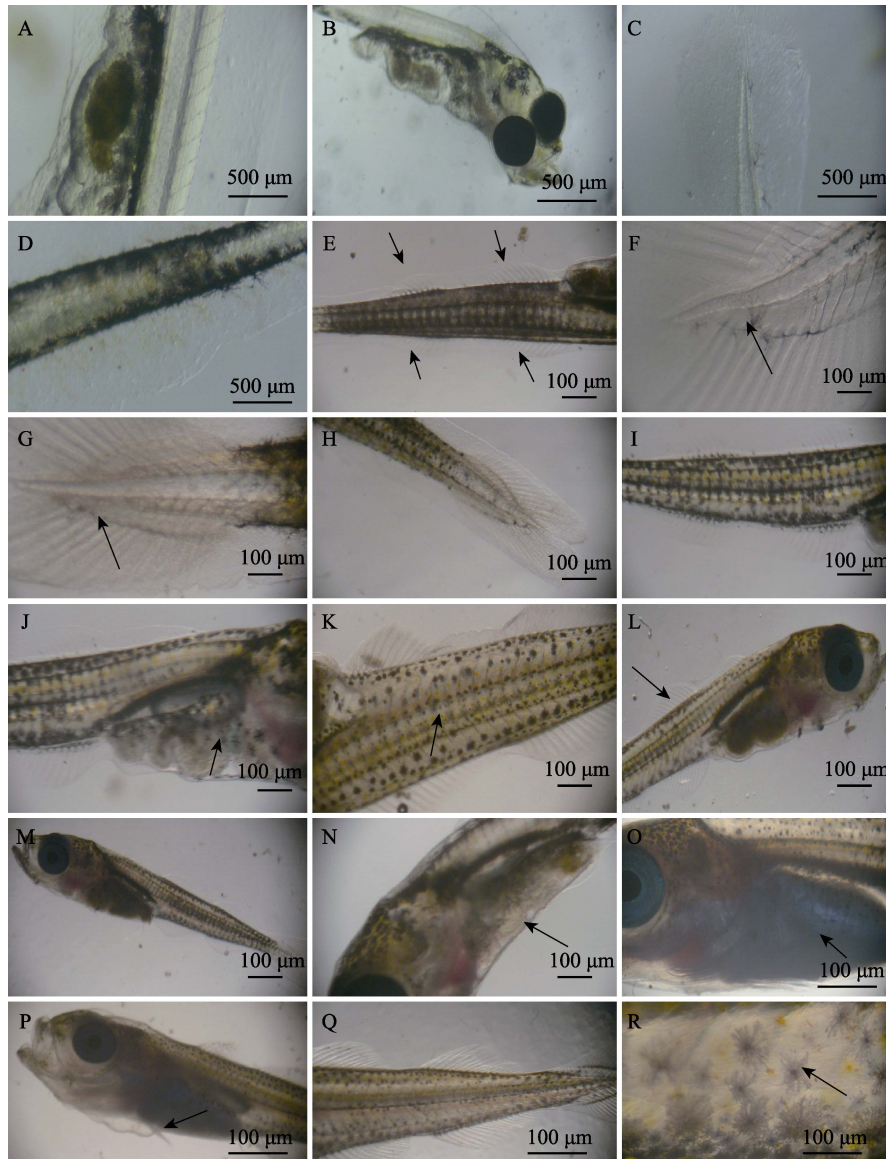


图 3 太平洋鳕后期仔鱼(40-80 dph)发育

Fig.3 The development of 40-80 dph *G. macrocephalus* larvae

A: 40 dph 仔鱼, 消化道内虫; B: 口裂进一步增大; C: 40 dph 仔鱼, 尾鳍幼鳍膜破裂, 开始退化; D: 40 dph 仔鱼, 背鳍幼鳍膜有裂口出现, 第 1、2、3 背鳍开始发生; E: 50 dph 仔鱼, 背鳍和臀鳍(箭头所示)进一步发育; F: 50 dph 仔鱼, 尾椎骨开始上翘(箭头所示); G and H: 56 dph 仔鱼, 尾鳍鳍条进一步发育(箭头所示); I and J: 60 dph 仔鱼, 臀鳍发生, 体色趋于完善, 鳔器官经过挤压变细长, 胆可见(箭头所示); K: 70 dph 仔鱼, 体内血管清晰可见(箭头所示); L: 70 dph 仔鱼, 背鳍, 鳍条清晰可见(箭头所示); M: 70 dph 仔鱼整体; N: 70 dph 仔鱼, 腹部出现细小颗粒状反光点(箭头所示), 鳞片开始发育; O: 80 dph 仔鱼, 腹部银亮色(箭头所示)更加明显; P: 80 dph 仔鱼腹鳍(箭头所示)出现; Q: 80 dph 仔鱼, 鳍条发育; R: 80 dph 仔鱼, 体表的黑色素(箭头所示)、黄色素

A: 40 dph larvae, there were *Artemia* sp. in the alimentary canal; B: 40 dph larvae, schistostoma became bigger; C: 40 dph larvae, the caudal fin membrane was broken and started to degenerate; D: 40 dph larvae, there were chasm in the dorsal fin membrane, indicated the development of the first, second, and third dorsal fin; E: 50 dph larvae, the dorsal fin and anal fin were further developed (indicated by the arrow); F: 50 dph larvae, the coccyx began to warp up (indicated by the arrow); G and H: 56 dph larvae, the tail fin was further developed (indicated by the arrow); I and J: 60 dph larvae, the development of the anal fin, and the body color matured, swimming bladder became longer and thinner after extruding, gallbladder was visible (indicated by the arrow); K: 70 dph larvae, blood vessels were visible (indicated by the arrow); L: 70 dph larvae, the fin ray of the dorsal fin was clearly visible (indicated by the arrow); M: full view of 70 dph larvae; N: 70 dph larvae, there were reflection points of pigment on the surface of the abdomen (indicated by the arrow), the scales started to appear; O: 80 dph larvae, the reflection points at the abdomen became more obvious (indicated by the arrow); P: the pelvic fin appeared (indicated by the arrow); Q: 80 dph larvae, the development of the fin ray; R: 80 dph larvae, the melanin and yellow pigment on fish (indicated by the arrow)

表1 太平洋鳕与条斑星鲽仔鱼发育比较  
Tab.1 Comparison of larvae development between *G. macrocephalus* and *V. moseri*

项目 Items	温度 Temperature (°C)	开口时间 Mouth-open time (dph)	油球 Oil-ball	发育完全时间 Time of fully developed (d)	参考文献 Reference
太平洋鳕 <i>G. macrocephalus</i>	2-11	6	无	80	本研究 This study
条斑星鲽 <i>V. moseri</i>	6-11	10-12	无	51	车育, 2009 <sup>1)</sup>

### 3.4 开口摄食期

不同种类仔鱼的开口时间不同,在本研究中共有6批受精卵成功获得了太平洋鳕仔鱼。本研究观察发现,在7°C水温条件下孵化的仔鱼,孵出后约4 d即可开口摄食;而在3°C水温条件下孵化的仔鱼,需经历6 d才可开口摄食。高温条件下仔鱼混合营养期也短于低温培养仔鱼的混合营养期,这说明在一定温度范围内,温度越高,仔鱼初次摄食时间越早。但较高温度下培育的后期仔鱼存活率仅为20%左右,明显低于较低温度培育仔鱼的存活率(60%),这说明太平洋鳕仔鱼发育的适宜温度应该在3°C左右。李艳秋等(2014)认为,太平洋鳕在10-11°C水温条件下孵出后第5天开始摄食,与本研究结果不同,其原因可能是仔鱼的摄食受各种因素的影响,如自身因素、水环境等,二者研究的亲鱼群体、地理位置(青岛和大连)和水质条件不同可能是其结果不同的主要原因。

### 3.5 太平洋鳕的开口饵料

在自然条件下,鱼类的开口饵料大部分是游动慢、易于消化、大小适口的浮游或底栖生物,以动物性为主,只有少数种类摄食藻类(朱成德, 1986)。在鱼类人工繁育过程中,大多以轮虫作为仔鱼的开口饵料,早期添加藻类的作用一般是为了改善水环境或者为轮虫提供饵料。但本研究发现,太平洋鳕开口后最早是以小球藻或其他小颗粒物质为食,在不到1 d的时间里,逐渐开始摄食轮虫,这可能与太平洋鳕初孵仔鱼口裂大小及张合能力弱有关。

Ellertsen 等(1980)也曾在太平洋鳕开口仔鱼肠道内观察到绿色食物,但认为藻类数量较少,因此是不重要的。但本研究观察发现,太平洋鳕开口仔鱼的摄食有一个从藻类向轮虫的转变过程,虽然这个过程只有不到1 d的时间,但其对太平洋鳕仔鱼是否必不可少还需要进一步的研究证实。在太平洋鳕人工繁育过程中,开口期投喂小球藻可能有着更重要的意义。

### 参 考 文 献

- 门强, 雷霖霖, 武云飞. 鳔器官的发育对人工培育鱼苗的影响. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 80-84
- 朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. 东海鱼类志. 北京: 科技出版社, 1963, 169-170
- 朱成德. 仔鱼的开口摄食及其饵料综述. 水生生物学报, 1986, 10(1): 86-95
- 朱杰, 张秀梅, 高天翔, 等. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞形态学观察. 水产学报, 2002, 26(3): 193-200
- 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 81-89
- 李恒颂, 邬国民, 范阳, 等. 银鲈胚胎和仔鱼的发育. 中国水产科学, 2000, 7(2): 5-9
- 李艳秋, 姜志强, 孙阳, 等. 太平洋鳕仔鱼饥饿实验及不可逆生长点的确定. 生态学报, 2014, 34(14): 3873-3878
- 沈汉祥, 李善勋, 唐小曼, 等. 远洋渔业. 北京: 海洋出版社, 1987, 285-295
- 张开翔. 太湖产乔氏短吻银鱼的胚胎发育. 水产学报, 1984, 8(2): 161-170
- 易祖盛, 王春, 陈湘舜. 尖鳍鲤的早期发育. 中国水产科学, 2002, 9(2): 120-124
- 殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. 水产学报, 1991, 15(4): 348-358
- 高天翔, 张肖荣, 王丹, 等. 几种鳕鱼的生物学初步研究. 海洋湖沼通报, 2003(1): 35-42
- 谢恩义, 阳清发, 何学福. 瓣结鱼的胚胎及幼鱼发育. 水产学报, 2002, 26(2): 115-121
- Wei G, Huang L, Chen Y, et al. Observation on the embryonic development of *Pseudobagrus nitidus*. 西南师范大学学报(自然科学版), 2002, 27(4): 567-571
- Bennett RO, Kraeuter JN, Woods LC, et al. Histological evaluation of swim bladder non-inflation in striped bass larvae *Morone saxatilis*. Dis Aquat Organ, 1987, 3(2): 91-95
- Blaxter JHS, Hempel G. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). J Cons Int Explor Mer, 1963, 28(2): 211-240
- Blaxter JHS. Pattern and variety in development. Fish Physiol, 1988, 11(A): 1-58
- Chatain B, Ounais-Guschemann N. Improved rate of initial swim bladder inflation in intensively reared *Sparus auratus*. Aquaculture, 1990, 84(3): 345-353
- Colesante RT, Youmans NB, Ziolkoski B. Intensive culture of walleye fry with live food and formulated diets. Prog Fish

1) 车育. 条斑星鲽人工繁育技术的研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2009



- Cult, 1986, 48(1): 33–37
- Ellertsen B, Solemdal P, Strømme T, *et al.* Some biological aspect of cod larvae (*Gadus morhua* L.). Fiskeridirektoratets skrifter, Serie Havundersøkelser, 1980, 17(1): 316
- Nash CE, Kuo CM, Madden WD, *et al.* Swim bladder inflation and survival of *Mugil cephalus* to 50 days. Aquaculture, 1997, 12(1): 89–94
- Paperna I, FAO RFD. Systemic granulomatosis, a diet-related disease in gilt-head bream *Sparus aurata* L., in marine culture. Symposium on Finfish Nutrition and Feed Technology, Hamburg, 1978
- Spectorova LV, Doroshev SI. Experiments on the artificial rearing of the Black Sea turbot (*Scophthalmus maeoticus* maeoticus). Aquaculture, 1976(9): 275–286

(编辑 马瑾艳)

## Observations on Larval Development of Pacific Cod (*Gadus macrocephalus* Tilesius)

JIANG Yunrong<sup>1,2</sup>, YU Daode<sup>3</sup>, LIU Hongjun<sup>3</sup>, GUAN Shuguang<sup>3</sup>,  
ZHANG Shaochun<sup>3</sup>, ZHANG Yan<sup>1①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

**Abstract** Larval development of pacific cod (*Gadus macrocephalus* Tilesius) (0–80 dph) was observed using microscope. The experimental conditions included water temperature 2–12°C, salinity 28–32, pH 7.8–8.2, and illumination intensity 800–1200 lx. Under the micro aeration hydrostatic conditions, it was observed that on 0–5 dph (day post hatching), the yolk-sac larvae supported by complete endogenous nutrition. Specifically, on 1 dph, the pigmentation became darker and rainbow pigment appeared in the eyeball; on 5 dph, the digestive tract was cleared except for the liver; on 6 dph: the larvae started feeding, and there were small particles in the digestive tract; on 9 dph: the yolk sac was absorbed by most of the larvae and they began to feed on exogenous nutrition, in addition the rotifera in the alimentary canal and the blood circulation became visible; on 12 dph, yellow pigment became obvious in the heads of larvae; on 15 dph, colors of melanin and yellow pigment were intense, and the blubber of larvae started to form; on 17 dph, the rainbow pigment was visible in the eyes; on 20 dph, the development of eye was completed, the blood circulation could be seen in abdominal arteries, and pigment was found in the tail. During 30–50 dph, the fin ray began to develop. On 30 dph, the tail fin began to develop; on 40 dph, the larvae started feeding artemia, and the first, second, and third dorsal fins came into view; on 50 dph, the coccyx curled up, and the anal and dorsal fins were apparently visible. During 60–80 dph, the pigment cells and fin ray were further developed, and the gallbladder could be clearly observed. On 60 dph, gills were covered in red; on 70 dph, silver scales appeared on the abdomen; on 80 dph, the caps of gills were greatly developed and pelvic fins could be seen. Our observation described the developmental process of pacific cod and may provide useful data for the future large-scale artificial breeding.

**Key words** *Gadus macrocephalus* Tilesius; Larval development; Morphological characteristics

① Corresponding author: ZHANG Yan, E-mail: zhangyan@ysfri.ac.cn

# 蛋白营养对工业养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应\*



张 静<sup>1,2</sup> 高婷婷<sup>1,2</sup> 李 勇<sup>1,2</sup>① 赵宁宁<sup>1,2</sup> 马 骏<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生物学重点实验室 海洋生态养殖技术国家地方联合工程实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 在封闭循环水养殖条件下, 选用体重为(145.08±0.56) g 大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼, 进行 4 种饲料蛋白质水平(41%、46%、50%和 55%, 即 I、II、III和IV组)的单因素实验 74 d, 研究蛋白营养变化对工业养殖大菱鲂幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的影响。结果显示: (1) 实验鱼增重率的提高随饲料蛋白含量升高先快后慢, III、IV组增重率极显著高于 I、II 组 18.48%–65.95% ( $P<0.01$ ), III、IV组间无显著差异; 饲料系数则相应下降, III、IV组分别极显著低于 I 组 25.64%、28.21% ( $P<0.01$ ), II、III、IV组间无显著差异; (2) 实验鱼氨氮排泄率与饲料蛋白水平呈正相关, 即随饲料蛋白水平提高, 实验鱼氨氮排泄率呈先缓增后趋平稳趋势, 饲料蛋白含量超过 50%时, 排泄率急剧上升。氨氮排泄率呈明显昼夜节律性, 即摄食后排泄率逐渐升高, 6–8 h 达排泄高峰, 后逐渐降低, 以此周期性循环。早投喂后 6 h 各组排泄率达高峰, IV组极显著高于其他 3 组 17.95%–35.07% ( $P<0.01$ ); 晚投喂后 8 h 各组排泄率达 1 d 内第 2 次高峰, IV组极显著高于 I 组 31.27% ( $P<0.01$ ), 显著高于 II 组 14.25% ( $P<0.05$ ); (3) 17 种常见氨基酸在各处理组肌肉内含量丰富, 总量均高于 65 mg/100 mg, 且随饲料蛋白含量升高呈渐增趋势, 其中, III、IV组无论肌肉氨基酸总量、必需氨基酸含量, 还是鲜味氨基酸含量, 均略高于 I、II 组, 但 4 组间差异不显著 ( $P>0.05$ ); 饲料蛋白含量变化对实验鱼肌肉氨基酸组成比例无显著影响。总之, 饲料蛋白水平过高, 不能显著改善生长性能, 却会显著提高氨氮排泄; 同时, 既不能改变肌肉氨基酸比例, 也难以显著增加肌肉氨基酸积累。研究表明, 大菱鲂幼鱼饲料适宜蛋白质水平为 45%–50%。

**关键词** 蛋白质; 生长; 氨氮排泄; 肌肉氨基酸; 大菱鲂; 封闭循环水

中图分类号 S963.71 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)06-0034-08

蛋白质是鱼虾必需的核心营养物质, 直接影响其生长、繁育、代谢和健康, 但同时也是鱼虾氨氮排泄及养殖水体自污染的主要因素(Mathis *et al*, 2003; Burford *et al*, 2004; 蒋克勇等, 2005)。在工业化循环水养殖模式下, 水体中氨氮及有害菌是养殖过程中监

控的关键因素。高浓度氨氮会造成养殖水体溶氧降低、水质恶化、病菌滋生, 影响正常养殖。因而, 蛋白质作为影响氨氮排泄的主要因素, 值得深入研究。

研究表明, 饲料蛋白水平在适当范围内升高能有效提高鱼类消化功能和饲料利用率, 促进生长(蒋克勇等,

\* “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD13B07)和中国科学院院地合作项目(Y12530101L)共同资助。张 静, E-mail: 1548316516@qq.com

① 通讯作者: 李 勇, 研究员, E-mail: liyong@qdio.ac.cn

收稿日期: 2015-11-24, 收修改稿日期: 2015-12-23

2005; 李爱杰等, 2001; 陈四清等, 2004; 马俊等, 2016; 李勇等, 2004; 梅琳等, 2015; Gonzalez-Rodriguez *et al*, 2014); 蛋白质摄入与鱼类血氨浓度、蛋白积累、氨氮排泄及尿素氮排泄之间的关系也在一些硬骨鱼类实验中得以发现(严俊丽等, 2016; Kaushik, 1980; Jobling, 1981; Kikuchi *et al*, 1991; Dosdat *et al*, 1995a, b), 但关于饲料蛋白营养变化影响工业养殖鱼类生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸积累的研究比较少或其效应不够明晰, 而对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)该方面研究更为鲜见。

在本课题组对海水鱼饲料蛋白营养影响养殖水生态研究(蒋克勇等, 2005; 李勇等, 2004; 李勇等, 2010a, b)的基础上, 本研究在工业化循环水养殖模式下, 探寻饲料蛋白含量变化对大菱鲆生长、氨氮排泄以及肌肉氨基酸积累的影响特征和规律, 为工业化海水鱼养殖的生态营养调控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计和管理

实验开始前对实验鱼禁食 24 h, 选择大小均匀 [(145.08±0.56) g]、健康、活力好的大菱鲆幼鱼, 随机分配于 12 个 85 cm × 55 cm × 45 cm 养殖箱中, 每箱 12 尾, 饲喂 4 种不同蛋白营养水平的饲料(秘鲁鱼粉为唯一变量, 蛋白水平分别为 41%、46%、50%和 55%, 以 I、II、III和IV组表示), 每种饲料设 3 个重复。

实验在室内封闭循环水系统中进行, 日换水 10%, 每天 45 个循环, 驯养 10 d, 正式实验 64 d, 实验水温为(15.5± 0.5)°C, 溶氧 9–10 mg/L, 盐度 22±1, 水深(40±2) cm, 光周期 L : D=11 : 13, 实验饲料配方见表 1。每天投喂 2 次(07:00 和 17:00)至饱食, 每次投喂 0.5 h 后, 将残饵虹吸, 记录剩余饲料颗粒数, 并乘以平均粒重, 从投饲量中扣除。发现死鱼及时捞出称重, 记录。实验结束前, 饥饿 24 h, 次日称重。

### 1.2 生长性能测定

$$\text{增重率}(\%) = \frac{\text{平均末重} - \text{平均初重}}{\text{平均初重}} \times 100$$

$$\text{特定增长率}(\%/d) =$$

$$\frac{\ln \text{平均末重} - \ln \text{平均初重}}{\text{实验天数}} \times 100$$

$$\text{饲料系数} = \frac{\text{摄食量}}{\text{平均末重} - \text{平均初重}}$$

### 1.3 氨氮排泄率测定

#### 1.3.1 水样采集 氨氮排泄测定采用 24 h 连续监

表 1 大菱鲆实验饲料组成及主要营养成分含量

Tab.1 Ingredients and composition of experimental diets for turbot (%)

原料组成 Ingredients	组别 Groups			
	I	II	III	IV
秘鲁鱼粉 Peruvian fishmeal	45.00	52.00	59.00	66.00
面粉 Wheat flour	33.44	27.06	25.06	31.34
精炼鱼油 Refined fish oil	8.00	8.00	8.00	8.00
玉米蛋白粉 Corn gluten powder	9.00	9.00	9.00	9.00
大豆粕 Soybean meal	6.00	6.00	6.00	6.00
血球蛋白粉 Dried-animal blood cells	1.50	1.50	1.50	1.50
粘合剂 Binder	1.50	1.50	1.50	1.50
复合维生素 Compound vitamin	0.50	0.50	0.50	0.50
复合微量元素 Compound microelement	0.50	0.50	0.50	0.50
合计 Total	100	100	100	100
营养成分含量 Nutrients				
干物质 Dry matter	93.47	93.39	93.53	93.85
粗蛋白 Crude protein	40.86	46.22	49.89	55.36
总磷 Total phosphorus	1.71	1.83	1.96	2.10
粗纤维 Crude fiber	0.3	0.4	0.4	0.4
粗脂肪 Crude lipid	12.88	12.92	12.93	13.12
粗灰分 Crude ash	8.69	9.91	10.77	11.75

注: 表中各营养成分均为实测值

Note: Values in the table were experimentally measured

测的方法, 每隔 3 h 取样 1 次, 每个处理 3 个重复, 每个重复分别取等量入水和出水。测定期间正常投喂, 以 07:00 为起点取样(喂前取样), 具体时间点为 07:00、10:00、13:00、16:00、19:00、22:00、01:00 和 04:00。总氨氮(Total ammonia nitrogen, TAN)测定采用纳氏试剂法。

#### 1.3.2 排泄率计算 氨氮排泄率根据下列公式推导:

$$QC_i dt + \alpha dt = QC_k dt + VdC_k \Rightarrow \left( C_i - C_k + \frac{\alpha}{Q} \right) dt = \frac{Q}{V} dC_k$$

取样间隔为 3 h

$$\int_t^{t+3} \frac{d \left( C_i + \frac{\alpha}{Q} - C_k \right)}{C_i + \frac{\alpha}{Q} - C_k} = \int_t^{t+3} -\frac{Q}{V} dt \Rightarrow$$

$$\alpha = \frac{Q}{1 - e^{-\frac{Qt}{V}}} \left[ C_{k+3} - C_{i+3} - (C_k - C_i) e^{-\frac{Qt}{V}} \right]$$

将公式细化

$$\Rightarrow \alpha = \frac{Q}{1 - e^{-\frac{Qt}{V}}} \left[ C_{k+3} - C_{i+3} - (C_k - C_i) e^{-\frac{Qt}{V}} \right] \times \frac{1}{BP}$$

式中,  $\alpha$  为氨氮排泄率( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  鱼重 $\cdot\text{g}^{-1}$  蛋白质摄入 $\cdot\text{h}^{-1}$ );  $Q$  为流速(L/h);  $t$  为 2 次取样时间间隔(此处为 3 h);  $V$  为养殖水体体积(L);  $C_k$ 、 $C_{k+3}$  为前后 2 次取样时出水口水氨氮浓度(mg/L);  $C_i$ 、 $C_{i+3}$  为前后 2 次取样时入口水氨氮浓度(mg/L);  $B$  为鱼体总重(kg);  $P$  为蛋白质摄入量(g)=饲料摄入量 $\times$ 饲料粗蛋白含量。此公式根据 Dosdat 等(1995a)中的公式结合循环水系统特点进行优化, 将蛋白质摄入量加入其中, 整个公式推导过程适合循环水养殖模式。

#### 1.4 鱼体肌肉氨基酸组成测定

**1.4.1 肌肉样品采集及前处理** 每个重复取 6 条体重相近的实验鱼, 冰盘处死, 在鱼体两面沿脊椎剥下等量无刺肉片, 去除鱼皮, 用绞肉机反复搅碎, 混合均匀, 60℃烘干至恒重, 干燥皿中冷却至室温后粉碎过 40 目筛。

**1.4.2 测定方法** 取 0.1 g 左右处理好的样品, 每处理 3 个重复, 按照国标 GB/T 18654.10-2008——养殖鱼类种质检验第 10 部分: “肌肉营养成分的测定”中的方法用氨基酸自动分析仪测定。

#### 1.5 统计分析

实验数据用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差

分析(One-way ANOVA), 当差异显著时( $P<0.05$ ), 进行 Duncan's 多重比较。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 生长性能

如表 2 所示, 实验鱼增重率随饲料蛋白水平升高而提高, 其中, III、IV 两组增重率分别极显著高于 I 组 61.25%和 65.95% ( $P<0.01$ ), 分别显著高于 II 组 18.48%和 21.93% ( $P<0.05$ ), III、IV 两组间无显著差异; 饲料系数则相反, III、IV 两组分别极显著低于 I 组 25.64%和 28.21% ( $P<0.01$ ), II、III、IV 三组间没有显著差异。

### 2.2 氨氮排泄结果及特征

结合表 3 单因素方差分析结果和图 1 变化特征可知, 大菱鲆氨氮排泄率呈现明显节律性, 即摄食后排泄率逐渐升高, 至 6(早)–8(晚)h 达排泄高峰, 后逐渐降低, 以此周期性循环。此外, 大菱鲆氨氮排泄率与饲料蛋白水平呈正相关, 早投喂 3 h 后, IV 组排泄率显著高于 II 组 44.78% ( $P<0.05$ ); 摄食 6 h 后, 各组排泄率达到峰值, 此时 IV 组排泄率极显著高于其他 3 组

表 2 饲料蛋白水平对实验鱼生长性能的影响

Tab.2 Effects of the dietary protein level on the growth performance of juvenile turbot

项目 Items	处理 Treatments			
	I	II	III	IV
增重率 Weight gain rate (%)	21.91 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	29.82 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>	35.33 $\pm$ 1.32 <sup>e</sup>	36.36 $\pm$ 1.13 <sup>e</sup>
特定增长率 Specific growth rate (%/d)	32.01 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	42.15 $\pm$ 0.52 <sup>c</sup>	48.76 $\pm$ 1.51 <sup>e</sup>	49.94 $\pm$ 1.32 <sup>e</sup>
饲料系数 Feed conversion rate	1.17 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	0.94 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.87 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

注: 上标相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 相邻字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 相隔字母表示差异极显著( $P<0.01$ ), 下同

Note: Data in the same row with same superscript were not significantly different ( $P>0.05$ ), adjacent letters and non-adjacent letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ) and highly significant difference ( $P<0.01$ ) respectively. The same as below

表 3 饲料蛋白水平对实验鱼 24 h 氨氮排泄率的影响

Tab.3 Effects of the dietary protein level on the ammonia excretion rate of juvenile turbot during 24 h continuous monitoring ( $\mu\text{g N}\cdot\text{kg}^{-1}$  Weight $\cdot\text{g}^{-1}$  Protein intake $\cdot\text{h}^{-1}$ )

项目 Items	处理 Treatments			
	I	II	III	IV
07:00	5.43 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	5.35 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	4.38 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	4.48 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
10:00	5.81 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	4.69 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	5.49 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	6.79 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
13:00	8.27 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	9.25 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>	9.47 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	11.17 $\pm$ 0.42 <sup>e</sup>
16:00	7.87 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	7.20 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	7.35 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	7.38 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>
19:00	5.01 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	6.64 $\pm$ 0.49 <sup>c</sup>	7.25 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>	7.54 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
22:00	3.69 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	4.91 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	5.01 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	5.92 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>
01:00	9.53 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	10.95 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	11.13 $\pm$ 0.31 <sup>bc</sup>	12.51 $\pm$ 0.53 <sup>e</sup>
04:00	5.64 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	5.44 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	5.78 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	5.42 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>
平均值 Mean	6.41	6.80	6.98	7.65

35.07%、20.76%及 17.95% ( $P<0.01$ ), III组排泄率显著高于 I 组 14.51% ( $P<0.05$ ); 晚投喂后 2 h, 后 3 组排泄率极显著高于 I 组( $P<0.01$ ), 至投喂后 8 h, 各组排泄率达第二次高峰, 此时IV组排泄率极显著高于 I 组 31.27% ( $P<0.01$ ), 显著高于 II 组 14.25% ( $P<0.05$ ), 与III组差异不显著; 待至投喂后 11 h, 各处理组实验鱼排泄率已无显著差异, 直至次日投喂前。将各处理组大菱鲂 24 h 平均氨氮排泄率对饲料蛋白水平作图, 由图 2 可见, 随饲料蛋白含量增加, 大菱鲂氨氮排泄率呈先缓增后趋于平稳趋势, 饲料蛋白含量超过 50% 时, 实验鱼氨氮排泄率急剧增加。

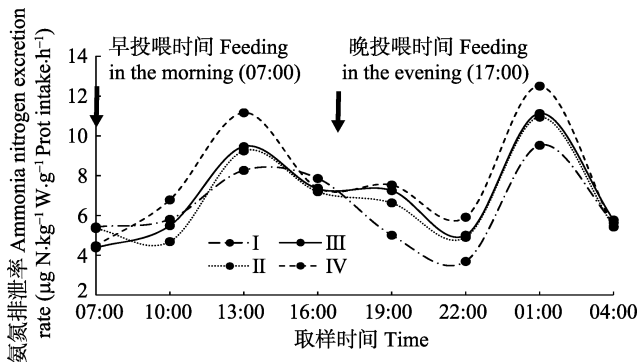


图 1 饲料蛋白水平对实验鱼 24 h 氨氮排泄率变化特征的影响

Fig.1 The change features of ammonia excretion rate with dietary protein levels day and night (24 h)

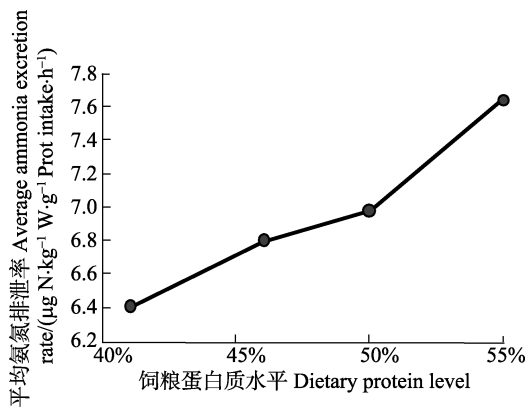


图 2 饲料蛋白水平对实验鱼氨氮排泄率的影响

Fig.2 Effects of the dietary protein level on the ammonia excretion rate of juvenile turbot

### 2.3 鱼体肌肉主要氨基酸积累

如表 4 所示, 可检测出的 17 种常见氨基酸, 在各处理组鱼肌肉内含量丰富, 总量均高于 65 mg/100 mg, 且随饲料蛋白质水平的升高呈逐渐增加趋势, 其中, III、IV 组无论在肌肉总氨基酸(TAA)、必需氨基酸(EAA), 还是鲜味氨基酸(Flavor amino acid, FAA)含

量, 均略高于 I、II 组, 而 III、IV 两组间差别较小, 但 4 组间各项指标差异并不显著( $P>0.05$ )。

图 3 比较直观地显示了不同处理组大菱鲂肌肉中 EAA、FAA 和其他 NEAA 占 TAA 的百分比。由图 3 可见, 在氨基酸组成比例方面不存在如含量一般的规律性, 说明饲料蛋白水平并不能对肌肉氨基酸构成比例产生显著影响。

## 3 讨论

### 3.1 饲料蛋白水平对大菱鲂幼鱼生长及氨氮排泄的影响

本课题组前期对海水鳎形目鱼的研究发现, 实验鱼增重率随饲料蛋白含量增加呈先升高后趋缓的趋势(李勇等, 2010a; Li *et al.*, 2011)。本研究结果中, 随饲料蛋白含量由 41% 增至 50%, 实验鱼的增重率和饲料系数均得到显著改善, 而 55% 组较 50% 组实验鱼在生长性能指标上并无显著变化, 此结果与本课题组前期研究结果完全一致。

饲料蛋白含量直接影响鱼类氨氮排泄率, 这点已在多种养殖鱼类研究中得以证实(Lee Gallagher *et al.*, 1987; Kaushik *et al.*, 1991; Ballestrazzi *et al.*, 1994; Chakraborty *et al.*, 1998)。本课题组在近年开展了工业化循环水养殖模式下鳎形目鱼类的研究, 如对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (李勇等, 2010a)、大菱鲂(Li *et al.*, 2011) 等生态营养需要量的研究。本研究在以往研究的基础上, 进一步考证饲料鱼粉蛋白营养变化对大菱鲂氨氮排泄的影响。结果显示, 实验鱼氨氮排泄率与饲料蛋白含量关系密切, 即随饲料蛋白含量的增加呈先升高后趋稳趋势, 而在蛋白含量超过 50% 后, 氨氮排泄率急剧升高, 基本符合前期重要研究结果“菱形特征”(Li *et al.*, 2011)。由此证实, 在工业化循环水养殖条件下, 饲料蛋白含量超过 50% 时, 大菱鲂幼鱼氨氮排泄对水环境污染程度显著加大, 而其增重率的提高并不显著, 不利于可持续健康养殖模式的建立。故该生长阶段饲料适宜粗蛋白含量为 45%–50%。

### 3.2 饲料蛋白水平对大菱鲂幼鱼氨氮昼夜排泄特征的影响

鱼类对食物的消化吸收导致其排氮量上升, 常在进食后 4–10 h 出现排泄峰值, 此后逐渐回落至内源性排泄水平, 其回落时间受氮摄入量、水温和食物成分等影响(Brett *et al.*, 1975; Engin *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 1999a、1999b)。该现象在前人很多研究中已发现: Dosdat 等(1996)选择大菱鲂、欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)、真鲷(*Sparus auratus*)、褐鳟(*Salmo trutta fario*)和虹鳟



表 4 饲料蛋白质水平对实验鱼肌肉氨基酸组成与含量的影响

Tab.4 Effects of different dietary protein level on the amino acid composition and contents in turbot's muscle (mg/100 mg)

蛋白质水平 Dietary protein level	处理 Treatments			
	I	II	III	IV
必需氨基酸 EAA				
苏氨酸 Thr	2.77	2.87	3.22	3.29
缬氨酸 Val	4.06	4.16	4.31	4.38
蛋氨酸 Met	3.82	3.53	4.01	3.80
异亮氨酸 Ile	3.20	3.24	3.52	3.57
亮氨酸 Leu	5.00	5.29	5.64	5.70
苯丙氨酸 Phe	1.99	2.10	2.32	2.44
赖氨酸 Lys	5.84	6.03	6.68	6.70
组氨酸 His	1.42	1.48	1.62	1.62
精氨酸 Arg	3.88	3.76	4.38	4.45
非必需氨基酸 NEAA				
*天冬氨酸 Asp	6.43	6.37	7.3215	7.60
*谷氨酸 Glu	9.88	9.54	11.36	11.60
*甘氨酸 Gly	2.97	3.03	3.03	3.28
*丙氨酸 Ala	3.68	3.62	4.07	4.22
丝氨酸 Ser	2.57	2.69	2.93	3.04
半胱氨酸 Cys	2.77	2.57	2.92	2.71
酪氨酸 Tyr	2.68	2.71	2.99	2.96
脯氨酸 Pro	2.14	2.25	2.25	2.45
必需氨基酸 EAA	31.98±3.39 <sup>a</sup>	32.46±1.78 <sup>a</sup>	35.68±1.44 <sup>a</sup>	35.94±2.04 <sup>a</sup>
鲜味氨基酸 FAA	22.96±1.37 <sup>a</sup>	22.56±3.36 <sup>a</sup>	25.77±1.40 <sup>a</sup>	26.70±1.28 <sup>a</sup>
氨基酸总量 TAA	65.11±7.77 <sup>a</sup>	65.24±1.30 <sup>a</sup>	72.54±1.99 <sup>a</sup>	73.80±3.70 <sup>a</sup>

\*: 鲜味氨基酸 \*: Flavor amino acids

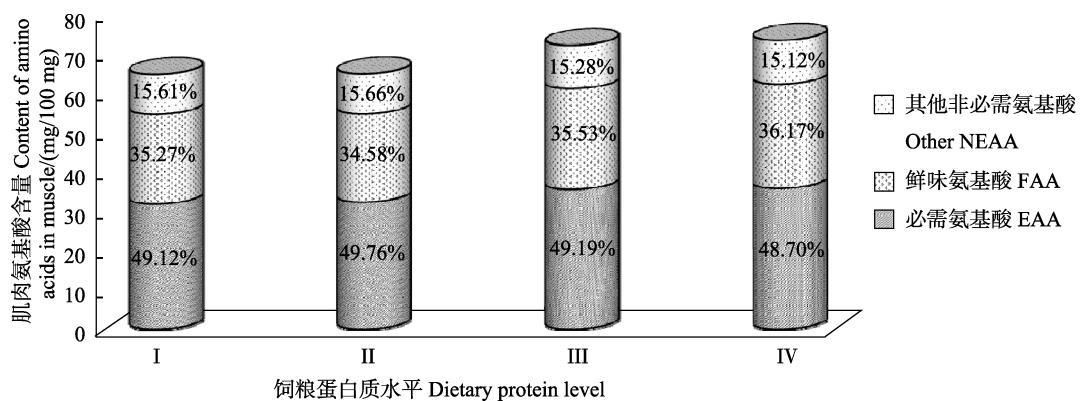


图 3 饲料蛋白质水平对实验鱼肌肉氨基酸含量及比例的影响

Fig.3 Contents and proportions of turbot's muscle amino acids in different treatments

图中百分比为各组分占 TAA 的比例

Percentages in the figure were proportions that accounted for TAA

(*Oncorhynchus mykiss*) 5 种鱼比较其氨氮排泄率异同, 发现这 5 种鱼氨氮排泄率均存在类似的节律性, 即 10 g 重的鱼摄食后 3-5 h 出现排泄高峰, 100 g 重的鱼排泄高峰则推迟到摄食后 5-8 h; Merino 等(2007)

和 Gelineau 等(1998)的研究也发现, 实验鱼在摄食后 6-10 h 会出现排泄高峰, 后排泄率逐渐回落, 11-15 h 后降至摄食前水平; 类似结果在 Kikuchi(1995)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、Engin 等(2001)对鳗鱼(*Anguilla*

*australis australis*), Porter 等(1987)对真鲷、Almedras (1994)对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的研究中被报道。

本研究在室内封闭循环水系统中进行, 养殖的大菱鲆氨氮排泄高峰出现在摄食后 6–8 h, 与 Dosdat 等(1995)在流水养殖模式下得出的大菱鲆排泄高峰期(摄食后 6 h)基本相同, 这可能与饲料营养素源组成或实验鱼体重不同有关。此外, 结果显示, 日投喂 2 次时, 氨氮排泄出现 2 次高峰, 第二峰较第一峰峰值高, 且出现时间晚, 此结果也与 Engin 等(2001)的研究结果一致, 这说明循环水养殖模式对鱼类排泄节律未产生显著影响。实验鱼晚间摄食量比早晨大, 因此, 晚间代谢量较大, 同时亦不排除第一次摄食的蛋白质在第二次投喂时尚未完全结束代谢, 才导致第二峰值高; 再者, 实验鱼晚间代谢较日间慢, 致使第二峰出现时间较晚。此结果给工业化封闭循环水养殖的水质净化管理提供有价值的指导和参考, 即在氨氮排泄高峰期可考虑适度加大养殖水循环量, 以减轻生物滤器净化负荷。

### 3.3 饲料蛋白水平对大菱鲆肌肉氨基酸积累的影响

鱼类肌肉氨基酸含量和组成主要受遗传因素影响, 饲料蛋白水平对其含量有影响, 但不显著(Ogata *et al*, 1994; 赵振山等, 1994)。研究发现, 当饲料蛋白水平低于鱼类营养需求时, 鱼体肌肉氨基酸含量随蛋白质水平升高而升高, 这可能由于大多数饲料蛋白质氨基酸用于维持鱼类正常的生理代谢, 仅有少部分积累, 故积累量受蛋白质水平影响; 而当饲料蛋白含量高于鱼类需求时, 鱼体肌肉氨基酸含量趋于稳定, 此时参与正常生理代谢的蛋白质已得到满足, 故氨基酸积累量不再受其影响(Gonzalez-Rodriguez *et al*, 2014; Ogata *et al*, 1994; 赵振山等, 1994)。本研究结果显示, 随饲料鱼粉蛋白水平增加, 实验鱼肌肉中 EAA、FAA、TAA 含量略有增加, 但差异不显著; 同时, 当饲料蛋白水平高于 50% 时, 增加趋缓。说明本实验饲料蛋白质营养供给已满足实验鱼蛋白质需要量, 故氨基酸含量随饲料蛋白水平提高虽有增加, 但增加量不显著, 积累渐缓。因此, 企图通过增加饲料鱼粉蛋白含量促进大菱鲆肌肉氨基酸积累难以实现。

此外, 本研究结果表明, 饲料鱼粉蛋白水平并不会影响大菱鲆幼鱼肌肉氨基酸的组成比例, 这一点与前人报道一致(李玉娟等, 2014; Gunasekera *et al*, 1995)。同时, 很多研究发现, 不仅肌肉组织, 鱼类其他组织氨基酸组成比例也不受饲料组成(彭士明等, 2012; Alam *et al*, 2002; Li *et al*, 2015; Harlioglu *et al*, 2012; Gunasekera *et al*, 1996)、投喂水平(Garcia-

garrido *et al*, 2013; Hussy *et al*, 2004)等的影响, 这说明饲料组成、投喂水平并不能对鱼体氨基酸组成比例造成显著影响。

## 4 小结

本实验在工业化封闭循环水养殖系统中进行, 通过饲料鱼粉蛋白含量变化对大菱鲆幼鱼生长、氨氮排泄、肌肉氨基酸积累的影响特征和规律探寻, 得出以下结论:

(1) 饲料蛋白水平超过 50%, 对大菱鲆幼鱼生长性能并无显著促进效应, 却会显著提高幼鱼氨氮排泄率, 证明了课题组前期重要研究成果“菱形特征”的正确性。综合生长和水质效应, 大菱鲆幼鱼饲料适宜蛋白质水平为 45%–50%。

(2) 工业化循环水养殖大菱鲆幼鱼氨氮排泄呈现明显的昼夜节律特征, 排泄高峰期出现在摄食后 6–8 h, 且晚间排泄量明显增加。故在氨氮排泄高峰期可考虑适度加大养殖水循环量, 以减轻生物滤器净化负荷。

(3) 在满足大菱鲆幼鱼蛋白质需要量的前提下, 增加饲料鱼粉蛋白含量, 对幼鱼肌肉氨基酸含量积累有渐缓增加效应, 但差异不显著; 对其氨基酸组成比例亦无显著影响。因此, 企图通过增加饲料鱼粉蛋白含量促进大菱鲆肌肉氨基酸积累或改变其组成比例难以实现。

## 参 考 文 献

- 马俊, 魏泽宏, 邢淑娟, 等. 饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 126–133
- 严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 南极磷虾粉作为鲷形目鱼饲料蛋白源的营养价值评价. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 74–82
- 李玉娟, 唐立, 颜顺, 等. 不同蛋白质与碳水化合物水平对黑鲷肌肉营养组成和质地的影响. *水产学报*, 2014, 38(9): 1476–1485
- 李勇, 王美琴, 高婷婷, 等. 封闭循环水养殖半滑舌鳎蛋白质的生态营养需要量. *水产学报*, 2010a, 34(11): 1719–1727
- 李勇, 王雷, 蒋克勇, 等. 水产动物营养的生态适宜与环保饲料. *海洋科学*, 2004, 28(3): 76–78
- 李勇, 夏苏东, 于学权, 等. 高密度养殖凡纳滨对虾的蛋白质生态营养需要量. *中国水产科学*, 2010b, 17(1): 78–87
- 李爱杰, 张道波, 魏万权, 等. 牙鲆幼鱼营养需要的研究. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2001, 20(S1): 6–10
- 陈四清, 马爱军, 雷霖霖, 等. 大菱鲆幼鱼的蛋白质与能量需求. *水产学报*, 2004, 28(4): 425–430
- 赵振山, 林可椒. 配合饲料的营养水平对鲤鱼生长性能及肌肉氨基酸含量的影响. *中国饲料*, 1994(5): 10–12
- 梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹蛋白替代鱼粉对大菱鲆

- (*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92
- 彭士明, 施兆鸿, 孙鹏, 等. 饲料组成对银鲟幼鱼生长率及肌肉氨基酸、脂肪酸组成的影响. 海洋渔业, 2012, 34(1): 51–56
- 蒋克勇, 李勇, 李军, 等. 大菱鲆幼鱼蛋白质的生态营养需要量研究. 海洋科学, 2005, 29(9): 65–70
- Alam MS, Teshima S, Yaniharto D, *et al.* Influence of different dietary amino acid patterns on growth and body composition of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 2002, 210(1–4): 359–369
- Almedras JME. Ammonia excretion rates of the sea bass, *Lates-calcarifer*, in fresh and seawater. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 1994, 46(2): 76–82
- Ballestrazzi R, Lanari D, Dagaró E, *et al.* The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 1994, 127(2–3): 197–206
- Brett JR, Zala CA. Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen-consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. J Fish Res Board Can, 1975, 32(12): 2479–2486
- Burford MA, Smith DM, Tabrett SJ, *et al.* The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks. Aquacult Nutr, 2004, 10(1): 15–23
- Chakraborty SC, Chakraborty S. Effect of dietary protein level on excretion of ammonia in Indian major carp, *Labeo rohita*, fingerlings. Aquacult Nutr, 1998, 4(1): 47–51
- Dosdat A, Gaumet F, Chartois H. Marine aquaculture effluent monitoring: Methodological approach to the evaluation of nitrogen and phosphorus excretion by fish. Aquacult Eng, 1995a, 14(1): 59–84
- Dosdat A, Metailler R, Tetu N, *et al.* Nitrogenous excretion in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), under controlled conditions. Aquac Res, 1995b, 26(9): 639–650
- Dosdat A, Servais F, Metailler R, *et al.* Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. Aquaculture, 1996, 141(1–2): 107–127
- Engin K, Carter CG. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian short-finned eel (*Anguilla australis australis*) as influenced by dietary protein level. Aquaculture, 2001, 194(1–2): 123–136
- Garcia-Garrido S, Hachero-Cruzado I, Rosas C, *et al.* Protein and amino acid composition from the mantle of juvenile *Octopus vulgaris* exposed to prolonged starvation. Aquac Res, 2013, 44(11): 1741–1751
- Gelineau A, Medale F, Boujard T. Effect of feeding time on postprandial nitrogen excretion and energy expenditure in rainbow trout. JFB, 1998, 52(4): 655–664
- Gonzalez-Rodriguez A, Celada JD, Carral JM, *et al.* Effects of varying protein level in practical diets on survival, growth, feed utilization and body composition of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). Aquacult Int, 2014, 22(5): 1723–1735
- Gunasekera RM, Shim KF, Lam TJ. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 1996, 146(1–2): 121–134
- Gunasekera RM, Shim KF, Lam TJ. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia, *Oreochromis niloticus*(L). Aquaculture, 1995, 134(1–2): 169–183
- Harlioglu AG. Effect of solvent extracted soybean meal and full-fat soya on the protein and amino acid digestibility and body amino acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran J Fish Sci, 2012, 11(3): 504–517
- Hussy K, Mosegaard H, Jessen F. Effect of age and temperature on amino acid composition and the content of different protein types of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. Can J Fish Aquat Sci, 2004, 61(6): 1012–1020
- Jobling M. Some effects of temperature, feeding and body-weight on nitrogenous excretion in young plaice *Pleuronectes platessa* L. J Fish Biol, 1981, 18(1): 87–96
- Kaushik SJ, Cowey CB. Dietary factors affecting nitrogen-excretion by fish. Nutritional Strategies & Aquaculture Waste, 1991, 3–19
- Kaushik SJ. Influence of nutritional-status on the daily patterns of nitrogen-excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L) and the rainbow-trout (*Salmo Gairdneri* R). Reprod Nutr Dev, 1980, 20(6): 1751–1765
- Kikuchi K, Takeda S, Honda H, *et al.* Effects of feeding on nitrogen-excretion of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakk, 1991, 57(11): 2059–2064
- Kikuchi K. Nitrogen excretion rate of Japanese flounder-A criterion for designing closed recirculating culture systems. Isr J Aquacult-Bamid, 1995, 47(3–4): 112–118
- Lee Gallagher M, Matthews AM. Oxygen consumption and ammonia excretion of the American eel *Anguilla rostrata* fed diets with varying protein energy ratios and protein levels. J World Aquacult Soc, 1987, 18(2): 107–112
- Leung KMY, Chu JCW, Wu RSS. Effects of body weight, water temperature and ration size on ammonia excretion by the areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*). Aquaculture, 1999a, 170(3–4): 215–227
- Leung KMY, Chu JCW, Wu RSS. Interacting effects of water temperature and dietary protein levels on post-prandial ammonia excretion by the areolated grouper *Epinephelus areolatus* (Forsk.) Aquac Res, 1999b, 30(10): 793–798
- Li J, Xu Q, Wang CA, *et al.* Effects of different dietary carbohydrates and carbohydrate levels on GH/IGF-1mRNA expression and the fish body composition of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(4): 489–495
- Li Y, Jiang KY, Sun GX, *et al.* The eco-nutrition requirements for dietary protein and its rhomb characteristics in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Chin J Oceanol Limnol, 2011, 29(5): 1002–1008
- Mathis N, Feidt C, Brun-Bellut J. Influence of protein/energy ratio on carcass quality during the growing period of

- Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture*, 2003, 217(1–4): 453–464
- Merino GE, Piedrahita RH, Conklin DE. Ammonia and urea excretion rates of California halibut (*Paralichthys californicus*, Ayres) under farm-like conditions. *Aquaculture*, 2007, 271(1–4): 227–243
- Ogata H, Murai T. White muscle of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*, smolts possesses a strong buffering capacity due to a high-level of anserine. *Fish Physiol Biochem*, 1994, 13(4): 285–293
- Porter CB, Krom MD, Robbins MG, *et al.* Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Spars aurata*) and its effect on water-quality conditions. *Aquaculture*, 1987, 66(3–4): 287–297

(编辑 冯小花)

## Effects of the Protein Level on the Growth, Ammonia-Nitrogen Excretion, and Amino Acid Accumulation in the Muscle of Industrially-Cultured Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, GAO Tingting<sup>1,2</sup>, LI Yong<sup>1,2</sup>①, ZHAO Ningning<sup>1,2</sup>, MA Jun<sup>1,2</sup>

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, National & Local Joint Engineering Laboratory for Ecological Mariculture, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract** A study was conducted to investigate the effects of the dietary protein level on the growth, ammonia-nitrogen excretion, and amino acid accumulation in the muscle of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in a recirculating aquaculture system. One hundred and forty-four healthy juveniles with initial body weight of (145.08±0.56) g were randomly divided into four groups each of which had three replicates of 12 fish. Groups I–IV were fed with diets containing 41%, 46%, 50%, and 55% protein respectively. The fishmeal content was the only variable in the diet. The results were shown as follows: (1) As the protein level went up, the weight gain rate (*WGR*) increased first rapidly and then slowly, while feed conversion rate (*FCR*) showed a reversed trend. The *WGRs* of Groups III and IV were significantly higher than that of Groups I and II by 18.48%–65.95%, and compared to Group I the *FCRs* of Groups III and IV were lower by 25.64% and 28.21% respectively ( $P<0.01$ ). (2) Ammonia excretion rate (*AER*) of juveniles cyclically varied between day and night, and there were two peaks appearing 6–8 h post feeding. There was a positive correlation between *AER* and the dietary protein level. The *AER* of Group IV was significantly higher than that of other groups by 17.95%–35.07% (6 h post feeding in the morning,  $P<0.01$ ) and 14.25%–31.27% (8 h post feeding in the evening,  $P<0.05$ ). The *AER* of juveniles increased sharply when the dietary protein level was above 50%. (3) The content of 17 amino acids in muscle was higher than 65 mg/100mg in each group, and it rose along with the increase in the dietary protein level ( $P>0.05$ ). The contents of total amino acids, essential amino acids, and flavor amino acids in the muscle of Groups III, IV were not significantly higher than those of other groups ( $P>0.05$ ). There was no difference in the amino acid composition between groups ( $P>0.05$ ). The results indicated that the growth performance of juveniles might not be improved when the dietary protein level was above 50% at which level the *AER* was markedly increased, and that the content and composition of amino acids in the muscle might not be altered by the dietary protein level. Therefore, the optimal protein level of juvenile turbot may be 45%–50%.

**Key words** Protein; Growth; Ammonia nitrogen excretion; Muscle amino acids; Turbot (*Scophthalmus maximus* L.); Recirculating aquaculture systems

① Corresponding author: LI Yong, E-mail: liyong@qdio.ac.cn

# 裂壶藻对津新鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian) 生长、血液非特异性免疫指标及抗病力的影响\*

刘宏超<sup>1#</sup> 程镇燕<sup>1#</sup> 翟胜利<sup>2</sup> 林城丽<sup>1</sup>  
王金娥<sup>3</sup> 乔秀亭<sup>1①</sup> 白东清<sup>1①</sup>



(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. 天津市晨辉饲料有限责任公司 天津 301811; 3. 天津农学院农业分析实验教学中心 天津 300384)

**摘要** 选用初始体重为(26.77±1.56) g 的津新鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian) 540 尾, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 分别投喂含 0、0.40%、0.80%、1.20%、1.60%和 2.00%裂壶藻的等氮等能饲料, 饲养 56 d, 探讨饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤生长、血液非特异性免疫指标及抗病力的影响。结果显示, 在 0.80%裂壶藻水平组中, 增重率和特定生长率均显著提高( $P<0.05$ ), 肥满度则在 1.20%水平组中达到最大值( $P<0.05$ ), 各组间成活率差异不显著( $P>0.05$ )。不同水平的裂壶藻均可以显著提高津新鲤的抗氧化能力, 其中过氧化氢酶、总超氧化物歧化酶和谷胱甘肽的含量均呈先上升后下降的趋势, 且分别在 1.20%、0.80%和 1.20%组中达到最高( $P<0.05$ ); 而丙二醛含量呈先下降后上升的趋势, 在 0.80%组中达最低( $P<0.05$ )。不同水平的裂壶藻均可以显著提高津新鲤的非特异性免疫力, 溶菌酶呈先上升后下降的趋势, 其中 1.20%组活性最高( $P<0.05$ )。一氧化氮含量随裂壶藻水平增加而增加, 各添加组含量均显著高于对照组( $P<0.05$ )。谷草转氨酶/谷丙转氨酶在 0.80%组中达到最小值( $P<0.05$ )。随着裂壶藻水平的增加, 津新鲤血细胞呼吸爆发活性和免疫保护率得到显著提高, 感染嗜水气单胞菌后的累计死亡率则显著降低( $P<0.05$ ), 其中, 以 0.80%组最佳。综合生长、血液非特异性免疫指标和抗病力来分析, 饲料中裂壶藻的适宜添加水平为 0.80%–1.20%。

**关键词** 裂壶藻; 津新鲤; 生长; 非特异性免疫指标; 抗病力

**中图分类号** S963.73 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0042-07

“津新鲤”是以建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)为亲本来源, 在天津换新水产良种场以抗寒能力、生长速度、繁殖力等为指标, 经过 17 年连续 6 代群体选育而获得的新品种。该鱼具有抗旱能力强、繁殖能力高、生长速度快、起捕率高等优点, 适宜在我国各地, 特别是“三北”(西北、华北和东北)低温地区池塘养殖。

裂壶藻 (*Schizochytrium*) 是一类海洋真菌 (Nakahara *et al.*, 1996), 富含油脂、色素、角鲨烯等有

益活性物质, 其中, 二十二碳六烯酸(DHA)含量高达 35%–40% (李美玉等, 2012), 近年来备受关注。与此同时, 裂壶藻及其制品作为新型饲料资源, 在海水鱼苗种繁育(陈家鑫, 2002)、中国对虾生长存活(冯伟, 2011)<sup>1)</sup>和刺参的生长和免疫(黄亮华等, 2014)等方面均发挥了积极作用。

鉴于此, 本研究以津新鲤为研究对象, 探究不同水平的裂壶藻对津新鲤生长、血液非特异性免疫指标和

\* 国家级星火项目“环保友好型优质鱼虾配合饲料的示范与推广”、天津市高校中青年骨干创新人才项目、天津市科委科技支撑项目(13ZCZDNC00900)和中央财政项目“渔用低氮环保配合饲料示范与推广”共同资助。

#共同第一作者: 刘宏超, E-mail: liuhc\_1@163.com; 程镇燕, E-mail: chengzhenyan2005@126.com

① 通讯作者: 白东清, 教授, E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn; 乔秀亭, 教授, E-mail: qxt65@163.com

收稿日期: 2015-12-27, 收修改稿日期: 2016-02-08



抗病力的影响,旨在为开发利用新型饲料资源提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料设计

本研究采用单因素梯度配方设计,以鱼粉、豆粕、花生粕、棉粕等为基础原料,配制 6 组等氮等能的半精制饲料,分别含有 0、0.40%、0.80%、1.20%、1.60% 和 2.00%裂壶藻,用 Diet 1–Diet 6 表示。裂壶藻购自青岛越洋进出口有限公司,其中,粗蛋白为 25.29%,粗脂肪为 52.15%,粗灰分为 5.31%,DHA 为 24.26%,二十碳五烯酸(EPA)为 2.17%。实验饲料配方和营养成分组成见表 1。各种原料经粉碎机粉碎后,过 60 目筛,混匀加水,用制粒机加工成粒径为 2 mm 的沉性颗粒饲料,置于室温通风处 48 h 阴干,保存于-20℃的冰箱中待用。

### 1.2 实验分组及饲养管理

津新鲤幼鱼购自天津换新水产良种场,在天津晨辉饲料有限公司室内循环水养殖系统进行养殖,养殖容器为 80 cm×60 cm×65 cm 的 PVC 周转箱。驯化 14 d 后,选择健康、体重、规格基本一致的 540 尾津新鲤幼鱼,初始体重为(26.77±1.56) g,初始体长为(10.75±1.07) cm。随机分为 6 个组,每组 3 个重复,每个重复 30 尾鱼。实验期间,水温为 22–27℃,pH 为 7.1±0.5,溶解氧>5.0 mg/L;日投饲 2 次(09:00 和 15:00),每次投喂持续 40 min,投饲率为 3%–5%,并根据水温、摄食情况作相应调整。养殖周期为 56 d。

### 1.3 样品采集及处理

养殖实验结束后,禁食 24 h 取样。分别从每箱随机取津新鲤 10 尾(每组 30 尾),先测量每条实验鱼

表 1 实验饲料配方和营养成分组成(风干基础)

Tab.1 Formulation and nutrient composition of test diets (Air-dry basis)(%)

原料 Ingredient	饲料组 Dietary groups					
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 6
鱼粉 Fish meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
豆粕 Soybean meal	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50	12.50
花生粕 Peanut meal	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00
棉粕 Cotton meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
菜籽粕 Canola meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
玉米酒糟粕 DDGS	4.50	4.30	4.10	3.80	3.60	3.40
豆油 Soybean oil	5.00	4.80	4.60	4.50	4.30	4.10
预混料 Premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
面粉 Flour	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
大米糠 Rice bran	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
麸皮 Bran	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00
麦饭石 Maifan stone	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i>	0	0.40	0.80	1.20	1.60	2.00
营养组成 Proximate composition						
粗蛋白 Crude protein	32.12	32.15	32.07	32.10	32.14	32.16
粗脂肪 Crude lipid	8.58	8.68	8.54	8.63	8.55	8.67
粗灰分 Crude ash	9.79	9.60	9.60	9.58	9.59	9.67
水分 Moisture	5.23	6.50	7.16	5.84	6.50	7.01
总能 Gross energy (MJ/kg)	10.21	10.25	10.28	10.35	10.34	10.40

注: 预混料为每千克饲料提供: Cu 5 mg, Fe 200 mg, Mn 15 mg, Zn 80 mg, I 0.4 mg, Se 0.5 mg, Co 0.1 mg, Mg 200 mg, V<sub>A</sub> 6000 IU, V<sub>D</sub> 2000 IU, V<sub>B1</sub> 20 mg, V<sub>B2</sub> 20 mg, V<sub>C</sub> 132 mg, V<sub>K</sub> 10 mg, 烟酸 100 mg, 泛酸 40 mg, 叶酸 5 mg, 肌醇 100 mg

Note: The premix provided the following per kg of diets: Cu 5 mg, Fe 200 mg, Mn 15 mg, Zn 80 mg, I 0.4 mg, Se 0.5 mg, Co 0.1mg, Mg 200 mg, Vitamin A 6000 IU, Vitamin D 2000 IU, Vitamin B<sub>1</sub> 20 mg, Vitamin B<sub>2</sub> 20 mg, Vitamin C 132 mg, Vitamin K 10 mg, niacin 100 mg, pantothenic acid 40 mg, folic acid 5 mg, and inositol 100 mg

的体重、体高、体长及全长,再自尾静脉取血。每5尾鱼的血液采集后,混合均匀,4℃静置1h,4℃ 4000 r/min离心15 min,制备血清,-80℃冻存待测。

#### 1.4 血液非特异性免疫指标测定

血液非特异性免疫指标测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,具体测定方法参照所附说明书进行。

#### 1.5 血细胞呼吸爆发活性测定

养殖实验结束后,分别从每个水箱中随机取5尾鱼(每组15尾),用一次性注射器(用肝素钠润湿)从尾静脉取血,每3尾鱼的血液采集后,混合均匀。将50 μl抗凝血与50 μl NBT(Nitroblue tetrazolium)应用液(0.2% NBT与1 mg/ml葡萄糖溶液等体积混合)混合,28℃水浴30 min,每10 min混匀1次。孵育结束后取75 μl加入到1.5 ml的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,混合均匀后,4℃离心(1000 r/min,15 min),取上清液,在紫外-可见分光光度计620 nm波长条件下(DMF调零),测定吸光度(OD)值(吴旋等,2011)。

#### 1.6 抗病力测定

养殖结束后,选择体重基本一致的津新鲤进行攻毒实验,每箱取10尾鱼,每个处理30尾鱼。病原菌采用天津水产研究所保存的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。将活化后的嗜水气单胞菌用无菌生理盐水稀释,使终浓度约为 $1 \times 10^9$  cell/ml,按每100 g鱼2 ml菌液的剂量腹腔注射,保持养殖条件不变,每天定时观察并记录鱼死亡情况,实验周期为10 d,统计各组鱼的累计死亡率和免疫保护率(Bai et al, 2012)。

#### 1.7 饲料常规成分测定

水分采用常压恒温烘干法,粗蛋白采用杜马斯燃烧法,粗脂肪采用索氏抽提法,粗灰分采用马弗炉550℃灼烧恒重法。

#### 1.8 相关指标计算公式

增重率(Weight gain rate, WGR, %) $= (W_t - W_0) / W_0 \times 100$

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d) $= 100 (\ln W_t - \ln W_0) / t$

肥满度(Condition factor, CF) $= W_t / B^3 \times 100$

成活率(Survival rate, SR, %) $= (N_2 / N_1) \times 100$

累计死亡率(Cumulative mortality, %) $= N_4 / N_3 \times 100$

免疫保护率(Immune protective rate, %) $= (1 - F_2 / F_1) \times 100$

式中, $W_t$ 为终末鱼体重(g); $W_0$ 为初始鱼体重(g);

$B$ 为终末鱼体长(cm); $t$ 为饲养时间; $N_1$ 为初始鱼尾数; $N_2$ 为终末鱼尾数; $N_3$ 为初受感染鱼尾数, $N_4$ 为死亡鱼尾数, $F_1$ 为对照组死亡率, $F_2$ 为实验组死亡率。

#### 1.9 数据统计与分析

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计和分析,实验数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示,显著性水平用 $P < 0.05$ 表示,先对数据作单因子方差分析(One-way ANOVA),若处理间有显著差异,再进行Duncan's多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤生长性能的影响

饲料中添加裂壶藻可显著影响津新鲤的生长性能。随着裂壶藻添加水平的上升,增重率、特定生长率和肥满度均呈先上升后下降的趋势,最大增重率和特定生长率均出现在Diet 3组( $P < 0.05$ );肥满度在Diet 4组达到最大值,显著高于其他组( $P < 0.05$ )。各组成活率差异不显著( $P > 0.05$ ) (表2)。从生长角度来分析,添加0.80%–1.20%裂壶藻可有效促进津新鲤的生长。

### 2.2 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤血清抗氧化指标的影响

在抗氧化指标方面,随着裂壶藻添加水平的逐渐上升,丙二醛含量呈先下降后上升的趋势,在Diet 3组达到最低值( $P < 0.05$ )。总超氧化物歧化酶和过氧化氢酶含量则整体呈先上升后下降的趋势,Diet 2组、Diet 3组、Diet 4组酶活性显著高于其他组( $P < 0.05$ )。血清中谷胱甘肽含量整体呈上升趋势,Diet 4组、Diet 6组显著高于其他组( $P < 0.05$ ) (表3)。从血清抗氧化指标来分析,裂壶藻适宜的添加水平为0.80%–1.20%。

### 2.3 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤血清非特异性免疫指标的影响

津新鲤的非特异性免疫水平受饲料中不同水平的裂壶藻影响显著。溶菌酶含量呈先上升后下降的趋势,在Diet 4组达到最大值( $P < 0.05$ )。一氧化氮含量呈上升趋势,各添加组均显著高于对照组Diet 1 ( $P < 0.05$ )。谷草转氨酶和谷丙转氨酶含量均呈先上升后下降的趋势,谷草转氨酶/谷丙转氨酶的变化趋势则相反,在Diet 3组达到最小值( $P < 0.05$ ) (表4)。从非特异性免疫指标角度来看,裂壶藻适宜添加水平为0.80%–1.20%。

表 2 不同水平的裂壶藻对津新鲤生长性能的影响

Tab.2 Effects of *Schizochytrium* at different levels on growth performance of *C. carpio* var. Jian (n=30; Mean±SD)

组别 Group	增重率 WGR(%)	特定增长率 SGR(%/d)	肥满度 CF	成活率 SR(%)
Diet 1	83.67±3.58 <sup>c</sup>	1.00±0.03 <sup>d</sup>	2.50±0.00 <sup>b</sup>	100.00±0.00
Diet 2	98.16±1.78 <sup>b</sup>	1.11±0.06 <sup>c</sup>	2.45±0.14 <sup>b</sup>	100.00±0.00
Diet 3	114.28±4.57 <sup>a</sup>	1.27±0.02 <sup>a</sup>	2.32±0.11 <sup>b</sup>	99.00±1.73
Diet 4	111.53±12.59 <sup>a</sup>	1.23±0.02 <sup>ab</sup>	2.68±0.08 <sup>a</sup>	100.00±0.00
Diet 5	100.81±8.10 <sup>b</sup>	1.16±0.03 <sup>bc</sup>	2.50±0.08 <sup>b</sup>	98.00±1.73
Diet 6	95.19±2.09 <sup>c</sup>	1.11±0.07 <sup>c</sup>	2.35±0.12 <sup>b</sup>	99.00±1.73

注: 同列数据上标字母不同者之间存在显著差异(P<0.05), 下同

Note: Within a column, values with different superscripts were significantly different (P<0.05), the same as below

表 3 不同水平的裂壶藻对津新鲤血清抗氧化指标的影响

Tab.3 Effects of *Schizochytrium* at different levels on serum antioxidant indices of *C. carpio* var. Jian (n=6; Mean±SD)

组别 Group	丙二醛 MDA(nmol/ml)	总超氧化物歧化酶 T-SOD(U/ml)	过氧化氢酶 CAT(U/ml)	谷胱甘肽 GSH(mg/L)
Diet 1	19.18±0.68 <sup>b</sup>	44.82±0.56 <sup>c</sup>	3.45±0.31 <sup>d</sup>	6.62±0.20 <sup>e</sup>
Diet 2	23.52±0.58 <sup>a</sup>	50.00±1.23 <sup>ab</sup>	6.01±0.12 <sup>b</sup>	7.53±0.46 <sup>d</sup>
Diet 3	14.16±0.40 <sup>d</sup>	52.75±3.01 <sup>a</sup>	6.64±0.20 <sup>b</sup>	8.14±0.20 <sup>c</sup>
Diet 4	17.81±0.68 <sup>c</sup>	49.19±1.93 <sup>b</sup>	9.17±0.05 <sup>a</sup>	10.45±0.00 <sup>a</sup>
Diet 5	19.86±0.74 <sup>b</sup>	41.75±1.76 <sup>cd</sup>	2.14±0.09 <sup>e</sup>	9.67±0.13 <sup>b</sup>
Diet 6	22.83±1.05 <sup>a</sup>	38.51±1.79 <sup>d</sup>	4.17±0.70 <sup>c</sup>	10.28±0.27 <sup>a</sup>

表 4 不同水平的裂壶藻对津新鲤血清非特异性免疫指标的影响

Tab.4 Effects of *Schizochytrium* at different levels on serum nonspecific immune indices of *C. carpio* var. Jian (n=6; Mean±SD)

组别 Group	溶菌酶 LZM(U/ml)	一氧化氮 NO(μmol/L)	谷草转氨酶 AST(IU/L)	谷丙转氨酶 ALT(IU/L)	谷草转氨酶/谷丙转氨酶 AST/ALT
Diet 1	50.37±1.70 <sup>d</sup>	1.23±0.05 <sup>f</sup>	141.93±5.61 <sup>bc</sup>	18.72±1.27 <sup>f</sup>	7.60±0.36 <sup>a</sup>
Diet 2	52.89±2.67 <sup>cd</sup>	3.50±0.07 <sup>e</sup>	197.77±6.74 <sup>a</sup>	33.70±0.84 <sup>b</sup>	5.88±0.29 <sup>b</sup>
Diet 3	64.63±5.12 <sup>b</sup>	5.97±0.26 <sup>d</sup>	144.83±2.62 <sup>b</sup>	37.57±1.12 <sup>a</sup>	3.87±0.33 <sup>d</sup>
Diet 4	70.00±1.56 <sup>a</sup>	11.40±0.38 <sup>c</sup>	134.96±2.74 <sup>c</sup>	27.15±2.05 <sup>c</sup>	5.09±0.50 <sup>c</sup>
Diet 5	53.56±0.38 <sup>cd</sup>	16.67±0.89 <sup>b</sup>	135.66±3.85 <sup>c</sup>	27.53±0.87 <sup>c</sup>	4.93±0.09 <sup>c</sup>
Diet 6	56.41±2.82 <sup>c</sup>	39.88±1.10 <sup>a</sup>	137.45±3.46 <sup>bc</sup>	23.50±1.21 <sup>d</sup>	5.76±0.49 <sup>b</sup>

#### 2.4 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤血细胞呼吸爆发活性的影响

由图 1 可知, 饲料中添加裂壶藻不同程度地提高了津新鲤血细胞的呼吸爆发活性, 整体呈先上升后下降的趋势。在 Diet 3 组, 血细胞呼吸爆发活性达到峰值, 显著高于其他组(P<0.05)。可见, 裂壶藻添加水平为 0.80%时, 能显著提高血细胞呼吸爆发活力。

#### 2.5 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤抗病力的影响

对津新鲤投饲含不同水平的裂壶藻的饲料 56 d 后, 用嗜水气单胞菌进行攻毒实验, 实验鱼均不同程度地出现了典型出血症状, 如腹部、鳍基部、鳃裂后部有充血或出血症状, 部分濒死状态的鱼腹部膨大、肛

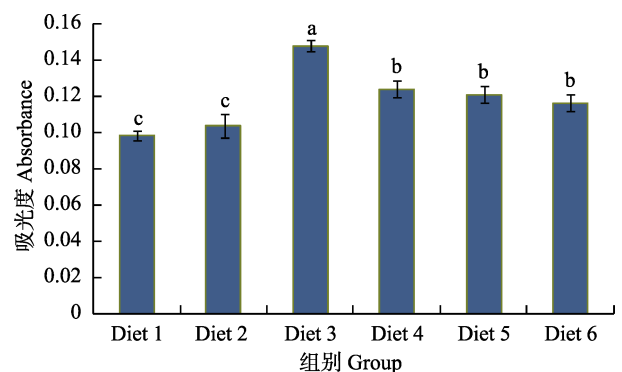


图 1 不同水平的裂壶藻对津新鲤血细胞呼吸爆发活性的影响

Fig.1 Effects of *Schizochytrium* at different levels on respiratory burst activities of blood cell of *C. carpio* var. Jian(n=5;  $\bar{x} \pm SD$ )

门红肿,解剖后发现肠部充血发炎,计算累计死亡率、免疫保护率(表 5)。经嗜水气单孢菌活菌攻毒 10 d 后,随着裂壶藻水平的增加,津新鲤累计死亡率整体呈现

先下降后上升的趋势,除 Diet 6 组外,其余各添加组累计死亡率均显著低于对照组 Diet 1 ( $P<0.05$ ),且 Diet 3 组的死亡率达到最小值(25%)( $P<0.05$ )。

表 5 不同水平的裂壶藻对津新鲤抗病力的影响

Tab.5 Effects of *Schizochytrium* at different levels on disease resistance of *C. carpio* var. Jian ( $n=3$ ; Mean $\pm$ SD) (%)

项目 Items	组别 Group					
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 6
累计死亡率 Cumulative mortality	45.00 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>	30.00 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	25.00 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	30.00 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	33.33 $\pm$ 3.33 <sup>b</sup>	45.00 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>
免疫保护率 Immune protective rate		33.33 $\pm$ 11.11 <sup>a</sup>	44.44 $\pm$ 11.11 <sup>a</sup>	33.33 $\pm$ 11.11 <sup>a</sup>	25.93 $\pm$ 12.83 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 11.11 <sup>b</sup>

通过计算免疫保护率可知,裂壶藻提高了津新鲤的免疫保护率,且随裂壶藻水平的增加呈现先上升后下降的趋势。裂壶藻添加水平为 0.40%–1.60%时,对津新鲤起到了免疫保护作用,其中, Diet 3 组的免疫保护率达到最大值(44.44%)( $P<0.05$ ),因此,选择 0.80%裂壶藻水平为津新鲤免疫保护作用的最佳添加水平。

### 3 讨论

#### 3.1 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤生长性能的影响

海洋微藻细胞中存在着丰富的初级或次级代谢产物,其化学成分非常复杂,且具有各种生理活性。近年来,随着我国饲料工业水平的不断提高,将海洋微藻作为一种功能性的饲料添加剂应用于水产养殖的相关研究日益成为热点。

本研究所选用的裂壶藻中富含大量的有益活性物质,如油脂、色素、角鲨烯等,其中,油脂占细胞干重的 70%以上,总脂中 DHA 含量高达 35%–40%(曾娟等, 2015)。DHA 是许多鱼类幼体、对虾幼体、双壳类幼虫的必需脂肪酸,它直接关系到幼虫和幼体的生长发育和存活(梁英等, 2000)。已有研究表明,在对虾基础饲料中,0.5%的裂殖壶藻发酵粉可明显降低饲料系数,促进其生长,同时提高了肌肉中蛋白及 DHA 的含量(焦建刚等, 2014)。在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)饲料中添加裂殖壶藻粉,可增加鱼的体重及饲料转化率,适宜的添加量可显著提高肌肉中 DHA 和长链多不饱和脂肪酸的水平(Li *et al.*, 2009)。在鲤鱼饲料中添加 0.5%–1.5%的 DHA,能显著促进生长性能(王桂芹等, 2010)。在鲤鱼饲料中添加不同脂肪源,显示富含不饱和脂肪酸的鱼油组生长性能最好(潘瑜等, 2012)。Ganuza 等(2008)指出,裂殖壶藻作为鱼油 DHA 替代资源,在金头海鲷养殖上具有巨大潜力。陈家鑫(2002)认为,裂壶藻在水产苗种生产中的应用已经引起广泛关注。本研究中,随着裂壶藻添加水平

的增加,津新鲤的各项生产性能指标与对照组相比均得到显著提高。本实验结果与上述研究成果基本一致。本研究结果显示,裂壶藻在津新鲤饲料中的适宜添加水平为 0.80%–1.20%,与 Steffens 等(2007)鲤鱼饲料添加较低水平的 DHA 显著促生长效应的结果相吻合。也有研究表明,淡水鱼类生长发育过程中需要 n-3 和 n-6 系列多不饱和脂肪酸适宜的配比(Visentainer *et al.*, 2007),但其相关研究尚需深入展开。

#### 3.2 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤血清抗氧化指标的影响

抗氧化酶系统存在于所有需氧生物的组织内,其功能是清除物质代谢过程中所产生的活性中间产物,尤其是清除氧自由基。其中,丙二醛作为脂质氧化的终产物,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。总超氧化物歧化酶是一类重要的清除氧自由基的抗氧化酶,它能催化超氧自由基发生歧化反应,生成氧气和过氧化氢;过氧化氢又在过氧化氢酶的作用下,生成无毒的水和氧气。谷胱甘肽能还原  $H_2O_2$ ,清除体内的自由基,对细胞有保护作用。本研究添加 0.80%–1.20%的裂壶藻,可显著降低血清中丙二醛的含量,显著提高总超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽的含量,显示出裂壶藻具有清除体内自由基、改善脂质代谢、减轻脂质过氧化反应的功效。这与 DHA、EPA 对耐力训练小鼠抗氧化能力的影响(于得庆等, 2005)、DHA 对鲤抗氧化能力的影响(吉红等, 2009)的结论一致。

#### 3.3 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤血清非特异性免疫指标的影响

溶菌酶是广泛存在于生物体液、血清和巨噬细胞中的一种水解酶,是吞噬细胞杀菌的物质基础和重要的非特异性免疫因子,能使吞噬细胞的吞噬活性增强(Amar *et al.*, 2004)。一氧化氮是巨噬细胞的效应分子,对 T 淋巴细胞和巨噬细胞的细胞因子分泌具有调节

功能(李万坤等, 2007)。本研究中, 0.80%–1.20%裂壶藻显著提高了津新鲤血清中溶菌酶活性, 这与黄亮华等(2014)在裂壶藻对刺参生长、免疫及消化酶的影响研究中的结论相吻合。杨鸢劫等(2008)在黄鳢(*Monopterus alba*)基础饲料中添加 DHA, 也表明实验组血清 LSZ 活性较对照组显著增大。与对照组相比, 各裂壶藻添加组的一氧化氮含量均高于对照组, 推测是由于裂壶藻内的有效活性物质能够与巨噬细胞表面受体结合, 从而刺激巨噬细胞表面一氧化氮合酶的表达, 诱导其产生大量一氧化氮。王媛等(2005)研究表明, 鱼类血液中的谷丙转氨酶和谷草转氨酶的含量变化可以作为反映鱼类肝功能的重要指标。本研究中, 津新鲤血清谷草转氨酶含量和谷草转氨酶/谷丙转氨酶分别在裂壶藻添加量为 1.20%和 0.80%时最小, 说明适宜的裂壶藻添加水平(0.80%–1.20%)可有效避免对肝的损伤, 减轻肝脏的应激反应。该结果与殷海成等(2014)研究鲤幼鱼饲料中 DHA 的适宜添加量的结果具有相同趋势。血清谷丙转氨酶含量在对照组最小, 各添加组均不同程度地高于对照组, 推测原因可能是摄入的裂壶藻导致体内脂肪酸不均衡, 从而引起脂类代谢紊乱。

### 3.4 饲料中不同水平的裂壶藻对津新鲤抗病力的影响

呼吸爆发活性的高低是反映机体杀菌能力的一个直观指标(Babior *et al.*, 1973)。实验结果显示, 随着裂壶藻添加水平的升高, 与对照组相比, 除 Diet 2 组外, 各添加组的呼吸爆发活力均显著提高, 且在添加量为 0.80%时效果最好。鱼体受到外源性细菌感染之后的死亡率能够非常直观地反映鱼体对疾病的抵抗力(廖英杰等, 2014)。本研究中, 除 Diet 6 组外, 其余各添加组累计死亡率和免疫保护率均显著优于对照组。该结果与王桂芹等(2010)得出的添加 DHA 可显著影响鲤鱼的攻毒存活率, 并提升鲤鱼的免疫保护力的结论以及投喂缺乏 n-3 系列多不饱和脂肪酸饲料的鱼更容易感染病菌的研究结果(Kiron *et al.*, 1995)相互印证。

## 4 结论

综上所述, 饲料中裂壶藻添加水平在 0.80%–1.20%时, 可显著提高津新鲤的生长性能、抗氧化能力、非特异性免疫力及鱼体的抗病力。本研究为裂壶藻作为功能性藻类饲料添加剂的开发和利用提供了理论依据。

## 参 考 文 献

于得庆, 焦玲霞, 张雪红, 等. DHA、EPA 对耐力训练小鼠抗

- 氧化能力影响的实验研究. 河北工业科技, 2005, 22(2): 64–68
- 王桂芹, 牛小天, 闫先春, 等. 饲料中添加维生素 E 和二十二碳六烯酸对鲤鱼生长和抗病力的影响. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(2): 124–128
- 王媛, 杨康健, 吴中, 等. 氯氰菊酯对鲫鱼血清中谷丙转氨酶及谷草转氨酶活力的影响. 水产科学, 2005, 24(9): 8–10
- 吉红, 周继术, 曹福余, 等. DHA 对鲤抗氧化能力影响的初步研究. 上海水产大学学报, 2009, 18(2): 142–149
- 李万坤, 闫鸿斌, 才学鹏, 等.  $\beta$ -葡聚糖的免疫增强作用机理研究进展. 中国畜牧兽医, 2007, 34(7): 151–155
- 李美玉, 李健, 陈萍, 等. 维生素 E 和裂壶藻对中国对虾生长及 TLR/NF- $\kappa$ B 表达水平的影响. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(2): 37–44
- 杨鸢劫, 邴旭文, 徐增洪. 不饱和脂肪酸对黄鳢部分非特异性免疫和代谢指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(4): 600–605
- 吴旋, 白东清, 朱国霞, 等. 长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响. 动物营养学报, 2011, 23(5): 887–892
- 陈家鑫. 裂壶藻及其制品在水产苗种培育中的应用. 科学养鱼, 2002(6): 53
- 殷海成, 管军军, 马芳芳. 鲤幼鱼饲料中 DHA 的适宜添加量研究. 饲料工业, 2014, 35(20): 69–73
- 黄亮华, 李浩洋, 李彬, 等. 裂壶藻对刺参生长、免疫及消化酶的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 91–97
- 梁英, 麦康森. 微藻 EPA 和 DHA 的研究现状及前景. 水产学报, 2000, 24(3): 289–296
- 焦建刚, Yuan K, Clémentine T, 等. 裂殖壶藻发酵粉对南美白对虾生长性能和肌肉营养成分的影响. 上海海洋大学学报, 2014, 23(4): 523–527
- 曾娟, 刘海燕, 顾继锐, 等. 裂殖壶藻在水产养殖中的应用. 中国饲料, 2015(13): 27–28
- 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
- 潘瑜, 毛述宏, 关勇, 等. 饲料中不同脂肪源对鲤鱼生长性能、脂质代谢和抗氧化能力的影响. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1368–1375
- Amar EC, Kiron V, Satoh S, *et al.* Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immun, 2004, 16(4): 527–537
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest, 1973, 52(3): 741–744
- Bai DQ, Wu X, Zhu GX, *et al.* Astragalus polysaccharides enhance cellular immune response and disease resistance in yellow catfish. Isr J Aquacult-Bamid, 2012, 64: 1–7
- Ganuja E, Benítez-Santana T, Atalah E, *et al.* Cryptocodium cohnii and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*)



- microdiets. *Aquaculture*, 2008, 277(1–2): 109–116
- Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, *et al.* Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mukiss*. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111(3): 361–367
- Li MH, Robinson EH, Tucker CS, *et al.* Effects of dried algae *Schizochytrium* sp. a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 2009, 292(3): 232–236
- Nakahara T, Yokochi T. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73(11): 1421–1426
- Steffens W, Wirth M. Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquacult Int*, 2007, 15(3): 313–319
- Visentainer JV, Noffs MD, de Oliveira Carvalho P, *et al.* Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the southeast coast of Brazil. *J Am Oil Chem Soc*, 2007, 84(6): 543–547

(编辑 冯小花)

## Effects of Dietary *Schizochytrium* on the Growth Performance, Serum Nonspecific Immunity Indices, and Disease Resistance of *Cyprinus carpio* var. Jian

LIU Hongchao<sup>1#</sup>, CHENG Zhenyan<sup>1#</sup>, ZHAI Shengli<sup>2</sup>, LIN Chengli<sup>1</sup>,  
WANG Jin'e<sup>3</sup>, QIAO Xiuting<sup>1①</sup>, BAI Dongqing<sup>1①</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384;  
2. Tianjin Chenhui Feed Limited Company, Tianjin 301811;  
3. Laboratory of Agricultural Analysis, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

**Abstract** Five hundred and forty *Cyprinus carpio* var. Jian with initial body weight of (26.77±1.56) g were randomly divided into 6 groups, and every group had three replicates each of which had 30 fish. Six diets were formulated with *Schizochytrium* at the concentrations of 0, 0.40%, 0.80%, 1.20%, 1.60% and 2.00%. An 8-week feeding trial was conducted to determine the effects of dietary *Schizochytrium* on growth performance, serum nonspecific immunity indices, and disease resistance of *C. carpio* Jian. The results showed that weight gain rate and specific growth rate significantly increased in the 0.80% group ( $P<0.05$ ). The highest condition factor was observed in the 1.20% group ( $P<0.05$ ). The survival rate showed no significant difference between the six groups ( $P>0.05$ ). The antioxidant and nonspecific immune activities were apparently altered by *Schizochytrium* ( $P<0.05$ ). As the concentration of *Schizochytrium* increased, the contents of catalase, total superoxide dismutase, and glutathione were first elevated and then reduced, and the maximum of each was observed in the 1.20%, 0.80%, and 1.20% groups respectively ( $P<0.05$ ). The malondialdehyde content dropped first and then increased with the lowest value observed in the 0.8% group. The nonspecific immune capacity in the 0.80% group was significantly higher than in other groups ( $P<0.05$ ). The activity of lysozyme was raised and then reduced along with the increase in the *Schizochytrium* level, and the maximum was observed in the 1.20% group ( $P<0.05$ ). The nitric oxide content rose along with the rise of *Schizochytrium* level, and was significantly higher than the control group ( $P<0.05$ ). The Aspartate aminotransferase/aspartate aminotransferase (GOT/GPT) ratio reached the minimum in the 0.80% group. Also in the 0.80% group, the respiratory burst activity of blood cells was elevated significantly and the accumulated mortality rate was the lowest ( $P<0.05$ ). In conclusion, we recommended that the optimal *Schizochytrium* level for *C. carpio* Jian should be 0.80%–1.20%.

**Key words** *Schizochytrium*; *Cyprinus carpio* var. Jian; Growth; Nonspecific immunity indices; Disease resistance

① Corresponding author: BAI Dongqing, E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn; QIAO Xiuting, E-mail: qxt65@163.com

# 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 雄性亲鱼繁殖性能 及抗氧化功能的影响\*



赵敏<sup>1,2</sup> 梁萌青<sup>1</sup> 郑珂珂<sup>1</sup> 徐后国<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 饲料中添加 0、10%、20% 的南极磷虾粉, 配制 3 组(对照组 K-0、K-10、K-20)等氮等脂的实验饲料, 在室内流水养殖系统进行为期 90 d 的养殖实验, 探讨南极磷虾粉对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 雄鱼繁殖性能和抗氧化能力的影响。结果显示, 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎雄鱼肝体比、性体比、精液浓度、睾酮含量均无显著性影响( $P>0.05$ ); K-10 组与 K-20 组精巢中超氧化物歧化酶(SOD)活性无显著性差异( $P>0.05$ ), 但均显著高于对照组( $P<0.05$ ), K-10 组与 K-20 组精巢、血清和肝脏中的丙二醛(MDA)含量无显著性差异( $P>0.05$ ), 但均显著低于对照组( $P<0.05$ )。在本实验条件下, 饲料中添加南极磷虾粉不能显著提高半滑舌鳎雄鱼的繁殖性能( $P>0.05$ ), 但能显著提高雄鱼的抗氧化功能( $P<0.05$ )。

**关键词** 南极磷虾粉; 半滑舌鳎; 雄性亲鱼; 繁殖性能; 抗氧化功能

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0049-07

南极磷虾(Antarctic krill)广泛分布于南极海域, 其生殖能力极强, 是全球单一物种蕴藏量最大的生物资源(Ross *et al.*, 1986)。南极磷虾直接干燥获得的南极磷虾粉是一种优质蛋白源, 富含不饱和脂肪酸、磷脂和虾青素。其中, 不饱和脂肪酸是海水鱼的必需脂肪酸(Li *et al.*, 2005), 磷脂是仔鱼生长发育过程中最先分解代谢的营养物质(Rainuzzo *et al.*, 1997), 虾青素的抗氧化活性远远超过现有的其他抗氧化剂(Britton *et al.*, 1995), 它能够保护大黄鱼(*Larimichthys crocea*)冷冻损伤的精细胞(陈海敏等, 2012), 从而提高精子活力(Lignell *et al.*, 2002), 并且能够显著提高鱼类繁殖性能(Vassallo-Agius *et al.*, 2001)。另外, 南极磷虾粉中的

牛磺酸和风味氨基酸能刺激鱼类摄食、促进鱼类生长, 是一种良好的诱食剂(赵红月等, 2010; 陈超等, 2012)。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)俗称牛舌头, 生长迅速, 出肉率高, 是我国北方传统的名贵鱼类(李思忠等, 1995)。在自然海域中, 半滑舌鳎雌雄个体差异大, 雄鱼数量少且性腺不发达, 所以自身繁殖能力很弱(庄志猛, 2006)<sup>1)</sup>。亲鱼饲料的营养质量不仅影响其繁殖性能, 还对卵子及仔稚鱼质量具有重要影响(Izquierdo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; 常青等, 2002), 而半滑舌鳎亲鱼营养需求的研究工作才刚刚起步(赵敏等, 2015; Liang *et al.*, 2014; 肖登元等, 2014; 吕庆凯等, 2013), 实际生产中仍然主要以冰鲜杂鱼或

\* 鲆鲽类产业技术体系研究专项(CARS-50-G08)和农业部“南极海洋生物资源开发利用”项目共同资助。赵敏, E-mail: zhaomin452@126.com

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

收稿日期: 2015-09-30, 收修改稿日期: 2015-11-23

1) 庄志猛. 半滑舌鳎早期发育生物学与种质资源研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006

养成阶段的配合饲料来投喂亲鱼, 还没有半滑舌鳎亲鱼的特制饵料。

本研究是在基础饲料中添加不同水平的南极磷虾粉, 探究南极磷虾粉对半滑舌鳎亲鱼繁殖性能及抗氧化功能的影响, 以期对半滑舌鳎亲鱼的人工配合饲料的研发积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

实验饲料配方及营养组成如表 1 所示, 以鱼粉、酪蛋白、南极磷虾粉和高筋粉为蛋白源, 以鱼油和豆油为脂肪源, 在基础饲料中添加 0%、10%、20% 的南极磷虾粉配置 3 种等氮、等脂的实验饲料(对照组 K-0、K-10、K-20), 调节鱼粉和高筋粉比例, 保证蛋白质含量一致, 调节鱼油比例, 保证脂肪含量一致, 低温烘干后冷冻保存备用。南极磷虾粉购自辽宁远洋渔业有限公司, 鱼粉购自七好生物科技有限公司。

### 1.2 实验动物与饲养管理

本实验在山东海阳市黄海水产有限公司进行, 实验鱼为人工养殖的半滑舌鳎亲鱼。从亲鱼池中随机挑选性腺未发育的 3 龄雌鱼(1.5 kg 左右)108 尾、雄鱼(0.4–0.5 kg) 153 尾, 随机分配到 3×3 个直径为 230 cm、高为 100 cm 的养殖桶中, 每桶 12 尾雌鱼、17 尾雄鱼, 实验从 2014 年 6 月 1 日–9 月 1 日, 持续 90 d。

参照柳学周等(2006)的方法, 采用流水培育, 水深为 50 cm, 日换水量为养殖水体的 4–5 倍, 溶氧含量保持在 6 mg/L 以上, 水温控制在 20–25℃。使用白炽灯调控光照强度, 光照时间由 8 h 逐渐延长至 12 h, 每周增加 0.5 h。用对照组饲料暂养 7 d, 观察亲鱼摄食情况, 并确定最终投喂量。实验开始后, 用上述 3 种实验饲料分别饲喂 3×3 组亲鱼, 每天 07:00 和 19:00 饱食投喂 2 次, 投喂 0.5 h 后排水以清除残饵。

### 1.3 样品收集

养殖周期结束后, 每桶随机选取 2 尾雄鱼, 称重后于尾静脉抽血, 将血液低温静置 4 h 后, 离心 10 min (3000 g/min), 取上清液保存于–20℃冰箱中, 取性腺、肝脏称重后保存, 用于生化分析; 将挤出的精液稀释 100 倍, 在显微镜下用血球计数板测定精液浓度, 每组 3 个重复; 取精液用戊二醛固定, 进行精子透射电镜分析。

### 1.4 分析方法

饲料在 105℃ 烘干至恒重, 采用凯氏定氮法

表 1 实验饲料配方及营养组成(%干物质)

Tab.1 Diet formulation and proximate composition (% in dry matter)

成分组成 Ingredients	实验组 Experimental groups		
	K-0	K-10	K-20
鱼粉 Fish meal	70.0	62.0	54.0
酪蛋白 Casein	5	5	5
南极磷虾粉 Antarctic krill meal	0	10	20
高筋粉 Wheat gluten meal	11.0	10.0	9.0
鱼油 Fish oil	7.0	6.0	5.0
大豆油 Soybean oil	1.0	1.0	1.0
大豆卵磷脂 Soybean phospholipid	2.0	2.0	2.0
胆碱 Choline	1.0	1.0	1.0
CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	1.5	1.5
维生素 C Vitamin C	0.5	0.5	0.5
<sup>1</sup> 维生素混合料 Vitamin mix	0.5	0.5	0.5
<sup>2</sup> 矿物质混合料 Mineral mix	0.5	0.5	0.5
营养成分 Proximate composition (% DM)			
粗蛋白 Crude protein	55.3	55.3	55.6
脂肪 Lipid	14.2	14.1	14.5
灰分 Ash	12.7	12.4	12.3
总虾青素 Total astaxanthin (mg/kg)	42.8	70.5	114.7

注: <sup>1</sup> 维生素混合料(mg/kg or g/kg 饲料): 维生素 A, 32 mg; 核黄素, 45 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.1 mg 生物素, 1.20 mg; 维生素 D, 5 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 10 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 E, 120 mg; 肌醇, 800 mg; 烟酸, 200 mg; 硫胺素, 25 mg; 叶酸, 20 mg; 泛酸, 60 mg; 次粉 18.67 g

<sup>2</sup> 矿物质混合料(mg/kg or g/kg 饲料): 氟化钠, 2 mg; 沸石粉, 15.51 g; 硫酸镁, 1200 mg; 硫酸锌, 50 mg; 氯化钴, 50 mg; 硫酸铜, 10 mg; 磷酸二氢钙, 3000 mg; 硫酸铁, 80 mg; 氯化钠, 100 mg; 碘化钾, 0.8 mg

Note: <sup>1</sup> Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): vitamin A 32 mg, riboflavin 45 mg, vitamin B<sub>12</sub> 0.1 mg, biotin 1.2 mg, vitamin D 5 mg, menadione 10 mg, pyridoxine 20 mg, vitamin E 120 mg, inositol 800 mg, tocopherol acetate 200 mg, thiamine 25 mg, folic acid 20 mg, pantothenate 60 mg, wheat flour 18.67 g

<sup>2</sup> Mineral premix (mg/kg or g/kg diet): NaF 2 mg; Mordenzeo 15.51 g; MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1200 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mg; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 80 g; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 3000 g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg; NaCl 100 g; KI 0.8 mg

(VELP, UDK142 automatic distillation unit, 意大利) 测定粗蛋白含量; 脂肪含量采用索氏抽提法测定(FOSS 脂肪测定仪 SOXTEC 2050, 瑞典); 样品在马福炉中灼烧 5 h (550℃), 失重法测定灰分含量; 参照国标测定方法(GB/T5009.124-2003), 用日立 L-8900 型氨基酸分析仪测定原料氨基酸组成; 血清中睾酮含量采用光化学方法检测(罗氏 Cobas-6000 全自动电化

学发光仪); 虾青素含量参照孙来娣等(2013)的研究方法进行测定。

### 1.5 数据统计

采用 SPSS 17.0 软件包对数据结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 差异显著后进行 Tukey's 多重比较, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示, 差异显著水平为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 南极磷虾粉与鱼粉营养分析对比

南极磷虾粉与鱼粉化学组成和氨基酸组成对比如表 2 所示, 其中, 南极磷虾粉的蛋白含量低于鱼粉, 而脂肪含量为鱼粉的 2 倍; 另外, 南极磷虾粉的灰分含量略低于鱼粉, 而虾青素含量为 290.40 mg/kg, 是鱼粉的 13 倍。南极磷虾粉中风味氨基酸含量占总氨基酸含量的 42.46%, 高于鱼粉中的比例。

### 2.2 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼繁殖性能的影响

南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼繁殖性能的影响如表 3 所示, 各实验组存活率、性体比、肝体比均无显著性差异( $P>0.05$ ); K-10 组精液浓度和血清中睾酮含量略高于对照组, 但无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼抗氧化功能的影响

南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼精巢中虾青素含量的影响见表 4, K-20 组精巢虾青素含量显著高于其他两组( $P<0.05$ ), K-10 组精巢虾青素含量略高于对照组, 但并无显著性差异( $P>0.05$ ); K-10 组与 K-20 组精巢 SOD 的活性无显著性差异( $P>0.05$ ), 但均显著高于对照组( $P<0.05$ ); 随着饲料中南极磷虾粉添加量的增加, 精巢中 MDA 的含量显著降低( $P<0.05$ )。南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼血清和肝脏中 SOD 活性和 MDA 含量的影响如表 5 所示, K-10 组与 K-20 组血清、肝脏中 MDA 的含量无显著性差异( $P>0.05$ ), 但均显著低于对照组( $P<0.05$ )。半滑舌鲷精子透射电镜观察(图 1)显示, K-10 组精子质膜和线粒体结构完整, 而对照组的精子质膜及线粒体溶解破碎。

## 3 讨论

### 3.1 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鲷雄鱼繁殖性能的影响

墨鱼粉、鲑鱼粉、南极磷虾粉是亲鱼饵料极具价

表 2 南极磷虾粉与鱼粉化学组成和氨基酸组成比较(%干物质)

Tab.2 Chemical composition and amino acid composition of krill and fish meal (% in dry matter)

项目 Items	南极磷虾粉 Antarctic krill meal	鱼粉 Fish meal
化学组成 Chemical composition		
蛋白质 Protein	54.88	68.99
脂肪 Lipid	16.60	7.81
灰分 Ash	12.55	14.62
虾青素 Astaxanthin (mg/kg)	290.40	22.08
氨基酸组成 Amino acid composition (g/100 g)		
天冬氨酸**Asp	7.42	5.57
苏氨酸*Thr	2.24	2.99
丝氨酸 Ser	2.33	2.70
谷氨酸**Glu	9.99	9.34
甘氨酸**Gly	3.42	4.23
丙氨酸**Ala	3.07	4.04
半胱氨酸 Cys	0.45	0.80
缬氨酸*Val	2.70	3.57
甲硫氨酸*Met	2.33	1.54
异亮氨酸*Ile	2.66	3.01
亮氨酸*Leu	4.12	5.24
酪氨酸 Tyr	2.01	2.31
苯丙氨酸*Phe	3.93	3.62
赖氨酸*Lys	4.64	5.64
组氨酸*His	1.12	2.31
精氨酸*Arg	3.54	4.07
牛磺酸 Tau	0.33	0.38
∑AA	56.30	61.36
∑DAA	23.91	23.18
∑DAA/∑AA	42.46	37.77

\*为必需氨基酸, \*\*为风味氨基酸, AA 为氨基酸总量, DAA 为风味氨基酸总量

\*: Essential amino acids; \*\*: Delicious amino acids; AA: Total amino acids; DAA: Total delicious amino acids

值的原料成分, 其中, 南极磷虾粉富含极性脂和非极性脂, 极性脂中的磷脂和非极性脂中的虾青素均能提高卵子质量(Watanabe *et al*, 1991)。Verakunpiriya 等(1996)研究发现, 用含有 10%南极磷虾粉的饲料饲养黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)亲鱼, 能提高黄尾鲷亲鱼的卵子质量, 推测可能是南极磷虾粉中的极性脂对卵子质量的提高起到促进作用。已有研究表明, 在饲料中添加虾青素能提高亲鱼的繁殖性能(Hansen *et al*, 2016; Ahmadi *et al*, 2006), Sawanboonchun 等(2008)研究发现, 在饲料中添加 73.7 mg/kg 虾青素, 可以提

表 3 南极磷虾粉对半滑舌鳎雄鱼繁殖性能的影响

Tab.3 Effects of dietary krill on the reproductive performance of male tongue sole

项目 Items	实验组 Experimental groups		
	K-0	K-10	K-20
存活率 Survival rate <sup>1</sup> (%)	87.90±5.71	87.10±6.00	87.37±10.71
性体比 Sex index <sup>2</sup> (%)	0.56±0.04	0.64±0.06	0.54±0.08
肝体比 Hepatosomatic index <sup>3</sup> (%)	1.24±0.07	1.11±0.35	0.99±0.13
精液浓度 Sperm concentration <sup>4</sup> (10 <sup>9</sup> ind/ml)	9.34±0.47	9.48±0.15	9.39±0.18
睾酮含量 Testosterone content (nmol/L)	0.20±0.11	0.21±0.06	0.19±0.10

注: <sup>1</sup>存活率(%)=成活鱼尾数/投放鱼尾数×100; <sup>2</sup>性体比(%)=精巢重量/雄鱼体重×100; <sup>3</sup>肝体比(HSI %)=肝脏重/雄鱼体重×100; <sup>4</sup>精液浓度(ind/ml)=80 个小方格细胞总数/80×400×10000×稀释倍数

Notes: <sup>1</sup>Survival rate (%) = survived fish/total fish; <sup>2</sup>Sex index (%) = semen weight/body weight×100; <sup>3</sup>Hepatosomatic index (%) = liver weight/body weight×100; <sup>4</sup>Sperm concentration (ind/ml) = cell number of 80 grid/80 × 400 × 10000 × dilution factor

高大西洋鳕鱼(*Gadus morhua* L.)的卵子和仔鱼质量,而在本研究中, K-10 组中虾青素含量为 70.5 mg/kg, 但对该组半滑舌鳎亲鱼的精液浓度和睾酮含量并无显著性影响( $P>0.05$ ), 其原因可能是虾青素只对雌鱼繁殖性能有促进作用, 而对雄鱼影响较小或者没有影响; 或是饲料中 42.8 mg/kg 的虾青素已经满足半滑舌

鳎雄鱼的需求, 过高的添加量对雄鱼繁殖性能没有显著性影响( $P>0.05$ )。

### 3.2 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎雄鱼抗氧化功能的影响

机体内过多的自由基能攻击各种生物大分子, 引起 DNA 损伤、脂质过氧化等一系列氧化损伤, 进而导致生物体病变(Jin *et al*, 2001)。孔凡华等(2012)研究发现, 以南极磷虾粉替代鱼粉饲养大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.), 能够促进机体内氧自由基的清除, 提高机体抗氧化功能。南极磷虾粉中富含虾青素, 其清除自由基的能力远超过现有的其他抗氧化剂, 它可以在性腺成熟过程中, 激发氧化应激效应来抑制机体氧化, 保护脂质、DNA 等生物关键因子(Liñán-Cabello *et al*, 2003)。已有研究表明, 饲料中添加虾青素可以显著降低血清中 MDA 含量, 提高机体的抗氧化能力(Li *et al*, 2014; Wang *et al*, 2006)。本研究发现, K-20 组精巢中 SOD 活性显著高于对照组( $P<0.05$ ), MDA 含量显著低于对照组( $P<0.05$ ), 而 SOD 是机体清除自由基的关键酶, MDA 是自由基引发的脂质过氧化反应的最终产物, 这两个指标可以综合反映机体的抗氧化能力。作者推测, 本研究中 K-20 组精巢中高含量的虾青素, 发挥了清除自由基的作用, 从而提高了精巢的抗氧化功能, 有效防止精子质膜氧化损伤, 保证 DNA 完整性。

陈海敏等(2012)研究发现, 在冷冻液中添加虾青素能够提高大黄鱼精子质量, 保护质膜和线粒体结构完整性, 而质膜是精子细胞的最外层结构, 是精子细

表 4 南极磷虾粉对半滑舌鳎雄鱼精巢虾青素含量、SOD 活性和 MDA 含量的影响

Tab.4 Effects of dietary krill on astaxanthin contents, SOD activities and MDA contents in semen of male tongue sole

项目 Items	实验组 Experimental groups		
	K-0	K-10	K-20
虾青素含量 Astaxanthin content (mg/kg DM)	35.14±4.00 <sup>a</sup>	38.56±3.68 <sup>a</sup>	54.54±4.41 <sup>b</sup>
SOD 活性 SOD activity (U/mg prot)	36.27±3.71 <sup>a</sup>	60.73±4.88 <sup>b</sup>	64.67±5.05 <sup>b</sup>
MDA 含量 MDA content (nmol/mg prot)	31.64±3.56 <sup>a</sup>	17.54±3.00 <sup>b</sup>	9.86±0.87 <sup>c</sup>

注: 同行数据中的不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

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

表 5 南极磷虾粉对半滑舌鳎雄鱼血清、肝脏中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

Tab.5 Effects of dietary krill on SOD activities and MDA contents in serum and liver of male tongue sole

项目 Items	实验组 Experimental groups		
	K-0	K-10	K-20
血清 SOD 活性 Activity of SOD in serum (U/ml)	127.65±20.43	200.00±29.37	184.68±44.03
肝脏 SOD 活性 Activity of SOD in liver (U/mg prot)	22.99±0.94	22.18±0.81	22.31±1.46
血清 MDA 含量 Content of MDA in serum (nmol/ml)	100.02±14.56 <sup>a</sup>	60.07±8.35 <sup>b</sup>	39.46±2.28 <sup>b</sup>
肝脏 MDA 含量 Content of MDA in liver (nmol/mg prot)	8.87±0.94 <sup>a</sup>	6.24±0.43 <sup>b</sup>	7.05±0.64 <sup>b</sup>



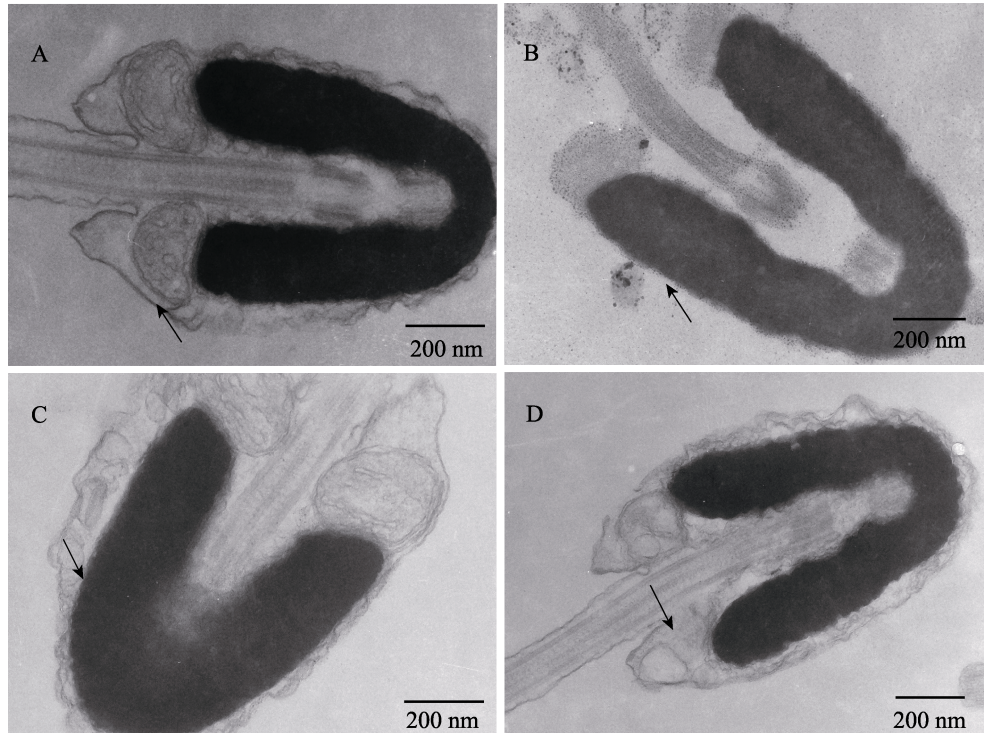


图 1 半滑舌鲷精子透射电镜观察( $\times 100000$ )

Fig.1 TEM image showing ultrastructure of spermatozoa of tongue sole( $\times 100000$ )

A: K-20 组精子质膜结构完整; B: 对照组精子质膜破碎溶解; C: K-20 组精子线粒体结构完整;

D: 对照组精子线粒体开始破碎溶解

A: Plasma membrane structural integrity of K-20 group; B: Plasma membrane in the process of dissolving of the control group;

C: Mitochondrion structural integrity of K-20 group; D: Mitochondrion in the process of dissolving of the control group

胞的生理屏障,其结构完整性是保障精子各项功能正常运行的基础。本研究发现,南极磷虾粉添加组的精子质膜结构完整(图 1-A),而对照组的精子质膜破碎溶解(图 1-B)。作者推测,这可能与虾青素在生物膜上特殊的定位定向及其保护线粒体的功能相关。

线粒体不仅是生成自由基的基础场所,它还是自由基损伤的主要靶子。因此,清除线粒体内的自由基,可以有效降低脂质过氧化反应。文佳等(2010)认为,维生素 E 可以有效清除线粒体中的氧化自由基,改善线粒体脂质过氧化反应。Kurashige 等(1990)研究表明,虾青素抑制线粒体脂质过氧化反应的性能优于维生素 E。本研究发现, K-20 组精子中线粒体结构完整(图 1-C),而对照组中有的线粒体已经部分破碎溶解(图 1-D),这也验证了 K-20 组精巢抗氧化活性高于对照组。K-10 组与 K-20 组受精卵中 SOD 活性高于对照组,可能正是饲料中添加南极磷虾粉,提高了雄鱼精巢的抗氧化功能,保护精子免受自由基损伤,提高精子抵御自由基损伤的能力,进而提高了受精卵 SOD 活性。

综上所述,在本实验条件下,饲料中添加 10%和

20%的南极磷虾粉均未能显著提高半滑舌鲷雄鱼的繁殖性能,但能显著提高雄鱼的抗氧化功能。

## 参 考 文 献

- 文佳,葛素云,罗海玲,等. 日粮维生素 E 水平对羊肌纤维细胞膜和线粒体抗氧化性的影响. 中国草食动物科学, 2010(s1): 286-289
- 孔凡华,梁萌青,吴立新,等. 南极磷虾粉对大菱鲆生长、非特异性免疫及氟残留的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 54-60
- 吕庆凯,梁萌青,郑珂珂,等. 饲料中添加不同脂肪源对半滑舌鲷亲鱼繁殖性能和仔鱼质量的影响. 渔业科学进展, 2013, 33(6): 44-52
- 孙来娣,高华,刘坤,等. 南极磷虾粉中虾青素的提取. 食品与发酵工业, 2013, 39(3): 196-201
- 陈超,陈京华. 牛磺酸、晶体氨基酸对大菱鲆摄食、生长和饲料利用率的影响. 中国农学通报, 2012, 28(23): 108-112
- 陈海敏,王峰,马建,等. 虾青素对超低温冷冻大黄鱼精子具有细胞膜保护作用. 生物物理学报, 2012, 28(8): 663-669
- 李思忠,王惠民. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲷形目. 北京: 科学出版社, 1995, 68-334

- 肖登元, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 维生素 C 对半滑舌鲷亲鱼繁殖性能及后代质量的影响. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2664-2676
- 赵红月, 薛敏, 韩冬, 等. 氨基酸等化学刺激物对异育银鲫摄食行为的影响. 水生生物学报, 2010, 34(5): 956-965
- 赵敏, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 牛磺酸对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)亲鱼繁殖性能及仔鱼质量的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 101-108
- 柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 25-32
- 常青, 梁萌青, 薛华, 等. 亲鱼营养的研究进展. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 65-71
- Ahmadi MR, Bazyar AA, Safi S, *et al.* Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Appl Ichthyol, 2006, 22(5): 388-394
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J, 1995, 9(15): 1551-1558
- Hansen ØJ, Puvanendran V, Bangera R. Broodstock diet with water and astaxanthin improve condition and egg output of brood fish and larval survival in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquac Res, 2016, 47(3): 819-829
- Izquierdo MS, Fernandez-Palacios H, Tacon AGJ, *et al.* Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 2001, 197(1-4): 25-42
- Jin LH, Bahn JH, Eum WS, *et al.* Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. Free Radical Bio Med, 2001, 31(11): 1509-1519
- Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, *et al.* Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Physiol Chem Phys Med NMR, 1990, 22(1): 27-38
- Liñán-Cabello MA, Paniagua-Michel J, Zenteno-Savín T. Carotenoids and retinal levels in captive and wild shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Nutr, 2003, 9(6): 383-389
- Li M, Wu W, Zhou PP, *et al.* Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture, 2014, 434: 227-232
- Li YY, Chen WZ, Sun ZW, *et al.* Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. Aquaculture, 2005, 245(1-4): 263-272
- Lignell A, Inborr J, Nicolin C. Method of increasing the production and improving the quality of semen. United States Patent, 2002, 6(25): 6, 410, 602B1
- Liang MQ, Lu QK, Qian C, *et al.* Effects of dietary n-3 to n-6 fatty acid ratios on spawning performance and larval quality in tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Aquacult Nutr, 2014, 20(1): 79-89
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. Aquaculture, 1997, 155(1-4): 103-115
- Ross RM, Quetin LB. How productive are Antarctic krill? BioScience, 1986, 36(4): 264-269
- Sawanboonchun J, Roy WJ, Robertson DA, *et al.* The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua* L.). Aquaculture, 2008, 283(1-4): 97-101
- Vassallo-Agius R, Watanabe T, Imaizumi H, *et al.* Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. Fisheries Sci, 2001, 67(4): 667-674
- Verakunpiriya V, Watanabe T, Mushiaki K, *et al.* Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. Fisheries Sci, 1996, 62(4): 610-619
- Watanabe T, Lee MJ, Mizutani J. Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red seabream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57(4): 694-698
- Wang YJ, Chien YH, Pan CH. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. Aquaculture, 2006, 261(2): 641-648

(编辑 冯小花)

## Effects of Dietary Antarctic Krill on the Reproductive Performance and Antioxidant Function in Male Broodstock Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

ZHAO Min<sup>1,2</sup>, LIANG Mengqing<sup>1①</sup>, ZHENG Keke<sup>1</sup>, XU Houguo<sup>1</sup>

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

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

**Abstract** The tongue sole *C. semilaevis* is a flatfish with high economic value and is extensively exploited in northern China. However, broodstock nutrition of this species is still based on a diet of fresh feeds, which has an important sanitary risk, and contributes to the deterioration of water quality. Therefore, a 90 days feeding trial was conducted to investigate the effect of dietary Antarctic krill meal in broodstock diets on reproductive performance and antioxidant function of male tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Three diets were formulated to contain respectively 0, 10%, 20% Antarctic krill meals. Three-year-old tongue sole *C. semilaevis* were stocked in concrete tanks (25 m<sup>3</sup>) and acclimated to laboratory conditions for 7 days. Then they were randomly divided into three groups, each group had three polyethylene tanks (diameter: 230 cm, high: 100 cm), and they were fed to apparent satiation twice per day for 12 weeks. Results showed that, the hepatosomatic index, sex index, sperm concentration and testosterone contents had no significant differences on each experimental groups ( $P>0.05$ ). The superoxide dismutase (SOD) activities in semen and eggs had no significant differences between K-10 and K-20 group ( $P>0.05$ ), but were significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ); The malondialdehyde (MDA) content in semen, serum and liver had no significant differences between K-10 and K-20 group ( $P>0.05$ ), but were significantly lower than that of the control group ( $P<0.05$ ). In conclusion, the present study suggested that dietary Antarctic krill meal had no significant effect on reproductive performance ( $P>0.05$ ), but can significant improve antioxidant function for male *C. semilaevis* ( $P<0.05$ ).

**Key words** Antarctic krill meal; *Cynoglossus semilaevis*; Male broodstock; Reproductive performance; Antioxidant function

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

# 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性\*

王津津 刘莹 于力 贾鹏 陈兵  
史秀杰 郑晓聪 兰文升 何俊强 刘荭<sup>①</sup>

(深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 深圳 518045)



**摘要** 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)是中国科学院水生生物研究所在 20 世纪 70 年代开展草鱼出血病研究时建立的一株细胞系,迄今已传至 300 多代,在中国鱼类病毒学研究领域发挥了重要作用。本研究采用形态学观察、细胞生长曲线测定、细胞周期测定、细胞核型分析、细胞凋亡检测、电镜观察等方法,对 GCO 的生长特性及鲤春病毒血症病毒(SVCV)在该细胞中的增殖特性等进行了研究。结果显示,GCO 细胞的最适生长温度为 25℃,在 M199 和 MEM 等细胞培养液中均能较好地生长,培养液中最适的胎牛血清浓度为 10%。测定了 GCO 细胞系对 SVCV 病毒的敏感性,发现与鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞系(EPC)、肥头鲤(*Pimephales promelas*)细胞系(FHM)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)胚胎细胞系(CHSE-214)等世界动物卫生组织(OIE)推荐和各检测实验室常用的鱼类细胞系相比,GCO 细胞系对 SVCV 表现出非常高的敏感性。生长曲线、电镜观察和凋亡实验显示,SVCV 能引起 GCO 细胞系出现明显而稳定的细胞病变,引起 GCO 细胞系出现凋亡,并在细胞质中大量增殖。结果表明,GCO 细胞系适用于 SVCV 病毒的分离、检测以及病毒致病性的有关研究。GCO 细胞的适宜生长温度为 15–28℃,这一特点将使它可以广泛地用于多种水生动物病毒的分离。

**关键词** 草鱼性腺细胞系;生物学特性;易感性;鲤春病毒血症病毒

**中图分类号** S852.23 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0056-06

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国重要的草食性淡水养殖鱼类,已经有 1700 多年的养殖历史,经过几十年的人工养殖,目前,草鱼的产量在世界淡水养殖鱼类中排名第一(沈玉帮等,2011)。

20 世纪 50 年代以后,在中国草鱼养殖中暴发了一种严重的传染性疾病——草鱼出血病(Hemorrhage disease of grass carp),引起草鱼大量死亡。在对该病原学、流行病学和防控技术进行的过程中,研究人员建立了多株草鱼细胞系,如草鱼吻端细胞系、草鱼肾细胞系和草鱼性腺细胞系(GCO)(张念慈等,

1981;左文功等,1986;陈燕桑,1978)等。其中,陈燕桑(1978)建立的 GCO 细胞系已稳定传至 300 多代,在淡水鱼类病毒,如草鱼出血病病毒、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)弹状病毒、淋巴囊肿病毒等(陈立祥等,1998;张奇亚,2002)的研究中发挥了重要作用。

在检测和诊断工作中,研究人员发现 GCO 细胞系对鲤春病毒血症病毒(SVCV)表现出非常稳定的敏感性,并在 SVCV 检测的国家标准和行业标准中使用,但一直未对 GCO 细胞系的特性及其对 SVCV 的敏感性进行系统的研究和比较。本研究对 GCO 的生长特

\* 国家质检总局科技计划项目(2014IK236)、国家质检总局公益性行业科研专项(201210055;20120214)和深圳检验检疫局科技计划项目(SZ2014202)共同资助。王津津, E-mail: w5213012@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者:刘荭,研究员, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn

收稿日期:2015-11-19,收修改稿日期:2016-03-30

性、SVCV 在该细胞中的增殖特性等进行了研究, 以期 GCO 细胞系的使用、维护和应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞、试剂和仪器

**1.1.1 细胞系** 本研究使用的 4 种鱼类细胞系: GCO 细胞系、鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞系(EPC)、肥头鲤(*Pimephales promelas*)细胞系(FHM)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)胚胎细胞系(CHSE-214), 均为中国科学院水生生物研究所赠。

**1.1.2 病毒** SVCV 10/3 株为英国环境、渔业及水产科学研究中心(The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, CEFAS)实验室赠送; 使用前测定病毒滴度, 并将病毒悬液稀释至  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 待用。

**1.1.3 试剂** CELL LAB ApoScreen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit 及 DNA Prep Reagent kit 购自美国 Beckman 公司。细胞培养液均购自 GIBCO (美国), 戊二醛、秋水仙素、卡诺固定液、四氧化锇、树脂包被购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 GCO 细胞系生物学特性

**1.2.1 GCO 细胞生长特性分析** 将初始浓度为  $10^4$  cell/ml 的 GCO 细胞悬液加入到 6 个 12 孔板中, 分别置于 15℃、20℃、25℃、30℃ 的培养箱中培养。在培养至第 1、2、3、4、5、6、7 天时, 每个温度培养的细胞分别取 3 孔进行消化, 测定细胞数量, 绘制细胞生长曲线。

**1.2.2 GCO 细胞周期分析** 对第 345 代 GCO 细胞系进行细胞周期研究。将细胞转至 6 孔板后, 约 35 h 后细胞处于指数生长期, 形成 70%–80% 的汇合层。用胰蛋白酶消化法收集细胞, 做成单细胞悬液, 室温下 1000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。先用 20–50  $\mu$ l/ml 的杜氏磷酸盐缓冲液(D-PBS)将细胞沉淀充分打散成单个细胞, 用 4℃ 预冷的 70% 冰乙醇 1 ml 重悬, 4℃ 过夜。采用流式细胞仪(Cytomics FC 500 Beckman Coulter)进行细胞周期检测。

**1.2.3 GCO 细胞核型分析** 采用 Ye 等(2006)的方法制备第 345 代 GCO 细胞染色体, 进行核型分析。待细胞贴壁稳定生长 36 h 后, 在培养基中加入 0.8  $\mu$ g/ml 秋水仙素, 孵育 4 h。吸去培养基, PBS 清洗, 用胰蛋白酶消化, 收集细胞, 1500 r/min 离心 5 min。去上清液, 加入 5 ml 0.075 mol/L 的 KCl, 低渗 25 min。缓慢加入 1 ml 新配的预冷卡诺固定液, 固定 15 min。1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复此步骤 3 次。

冷滴片法滴片(Freshney, 2010), 待载玻片干燥后, 用 5% 吉姆萨染液染色 25 min, 干燥镜检, 随机统计 100 个细胞分裂相的染色体数目(Levan *et al*, 1964)。

### 1.2.4 GCO 细胞系对 SVCV 的敏感性分析

**1.2.4.1 病毒生长曲线** 准备足够的 GCO 细胞, 用胰蛋白酶消化后, 加入新鲜的细胞培养液。测定细胞浓度, 稀释至  $10^5$  cell/ml。在 9 个 12.5 cm<sup>2</sup> 的细胞瓶中, 接入 3 ml GCO 细胞悬液。24 h 后接种 300  $\mu$ l 滴度为  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 的 SVCV 悬液, 置于 20℃ 下培养。每隔 24 h, 取 3 瓶, 反复冻融 3 次, 用细胞培养液进行 10 倍系列稀释, 待用。在 96 孔板中, 接种新鲜的 GCO 细胞, 测定每瓶细胞中 SVCV 的滴度。根据 Yan 等(2011)的方法, 绘制 20℃ 时 SVCV 在 GCO 细胞中的生长曲线。

**1.2.4.2 GCO 细胞系和其他常用鱼类细胞系对 SVCV 易感性的比较** SVCV 在不同细胞内滴度测定: 在 4 个 25 cm<sup>2</sup> 的细胞瓶中, 分别准备 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214 细胞系。在各细胞系最适培养温度下培养 24 h 后, 接种 500  $\mu$ l 滴度为  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 的 SVCV 悬液, 置于 20℃ 培养, 每天观察是否出现细胞病变效应(CPE)。待 CPE 完全后, 反复冻融 3 次。准备新鲜的 EPC 细胞用于病毒滴度的测定。

SVCV 诱导不同细胞凋亡情况分析: 根据 Riccardi 等(2006)的方法, 分别将 GCO、CHSE-214、EPC 和 FHM 细胞转至 6 孔板中。24 h 后, 每孔接种 100  $\mu$ l 滴度为  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 的 SVCV 悬液, 并设置空白对照, 置于 20℃ 培养箱中培养 48 h。用胰蛋白酶消化细胞, 制成细胞悬液, 用冰 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清液。用试剂盒中的 1 $\times$  结合缓冲液重悬细胞, 细胞浓度达到  $1 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$  cell/ml。每个实验管中加入 10  $\mu$ l Annexin V-FIT, 轻柔涡旋震荡, 避光冰置 15 min, 然后加入 380  $\mu$ l 冰冷的 1 $\times$  结合缓冲液, 再加入 10  $\mu$ l 碘化丙啶(PI), 用于之后仪器分析。

**1.2.4.3 电镜观察 SVCV 感染 GCO 细胞** 用 SVCV 病毒感染单层 GCO 细胞, 在 CPE 出现明显时, 收集细胞。1500 r/min 离心 10 min, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用含 2.5% 戊二醛的 PBS (0.1 mol/L, pH 为 7.2) 固定过夜。再用 PBS 洗涤细胞, 用 1% 四氧化锇固定 90 min 后, 最后用 PBS 洗涤 2 次。用梯度浓度的乙醇脱水, 树脂包被, 超微切片(Reichert-Jung)超薄切片, 用透射电镜(JEOL JEM-1000CX II, 日本)观察(100 kV)。

## 2 结果与分析

### 2.1 GCO 细胞系特性

**2.1.1 生长特性** GCO 细胞系是从草鱼性腺组织



分离建立的连续细胞系，呈上皮样形态，细胞间存在接触抑制，无重叠生长(图 1)。从 GCO 细胞的生长曲线(图 2)可以看出，25℃最适宜 GCO 的生长。GCO 在贴壁生长后，第 1 天生长较慢，第 2 天生长开始加快，进入对数生长期，持续 3 d 左右后进入平台期。

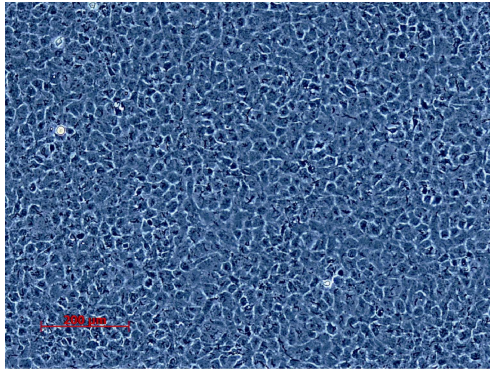


图 1 培养 3 d 的 GCO (100×)  
Fig.1 GCO cultured for three days (100×)

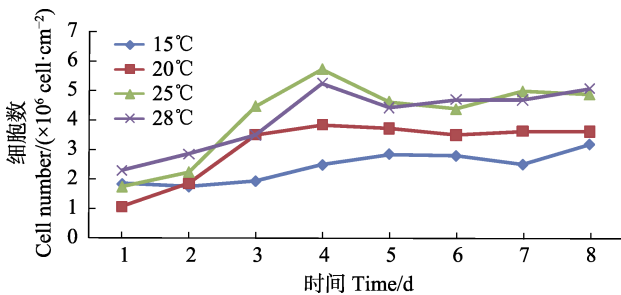


图 2 GCO 在不同温度下的生长曲线  
Fig.2 Growth curve of GCO at different temperatures

**2.1.2 细胞周期** 应用流式细胞仪对第 345 代的 GCO 细胞进行细胞周期检测，发现 GCO 核型正常，为二倍体(图 3)。GCO 在 G1 期的 DNA 含量占 88.03%，在 S 期的 DNA 含量占 1.78%，表明 GCO 增殖活力旺盛。

**2.1.3 细胞核型** 对 100 个分裂中期的细胞进行染色体数目统计分析。结果显示，在 GCO 细胞系染色体中，2n=48 的分裂相占(98%)(图 4)，二倍体染色体数目出现频率非常高，其他非整数倍体只占了很小的比例。

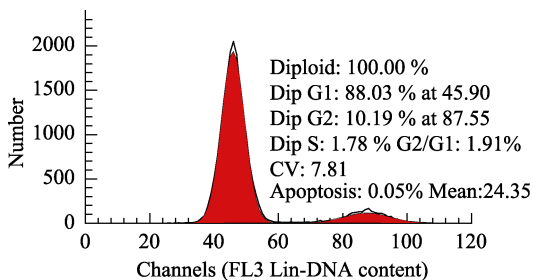


图 3 第 345 代 GCO 细胞生长周期  
Fig.3 Cell cycle of GCO of the 345th generation

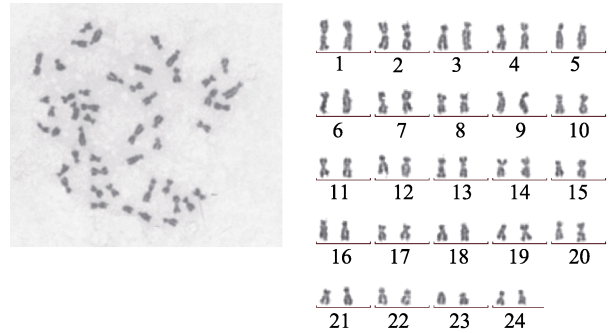


图 4 GCO 染色体核型  
Fig.4 Chromosome karyotype of GCO

**2.2 GCO 细胞系对 SVCV 的敏感性**

**2.2.1 病毒生长曲线** SVCV 接种 GCO 细胞出现典型 CPE(图 5)后，检测 SVCV 的滴度，并绘制病毒的生长曲线(图 6)。

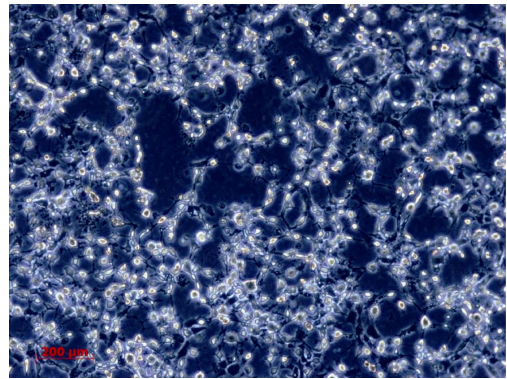


图 5 SVCV-10/3 在 GCO 中的 CPE  
Fig.5 The CPE of SVCV-10/3 in GCO cells

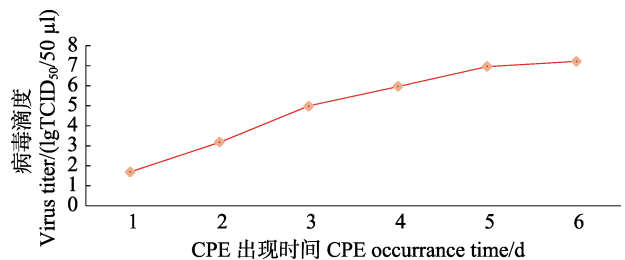


图 6 SVCV-10/3 在 GCO 中的生长曲线  
Fig.6 The growth curve of SVCV-10/3 in GCO cells

**2.2.2 GCO 和其他几种常用鱼类细胞系对 SVCV 易感性的比较** SVCV 分别接种 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214。出现 CPE 后，根据殷震等(1997)的方法测定 TCID<sub>50</sub>(表 1)。从表 1 可以看出，SVCV 在 GCO 和 EPC 的滴度明显高于 FHM 和 CHSE-214。

**2.2.3 SVCV 诱导不同细胞凋亡** 通过流式细胞仪检测 SVCV 诱导的 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214。发现 SVCV 引起 GCO 的凋亡率为 38.0%，EPC 为 30.7%，FHM 为 17.5%，CHSE-214 为 13.3%(图 7)。

表 1 不同细胞感染 SVCV 毒株的病变和病毒滴度  
Tab.1 CPE and titers of SVCV in different cell lines

细胞株 Cell line	CPE 完全所用时间 Time to absolute CPE (d)	病毒滴度 Virus titer (TCID <sub>50</sub> /50 μl)
GCO	7	1.0×10 <sup>7.25</sup>
EPC	7	1.0×10 <sup>7</sup>
FHM	7	1.0×10 <sup>6</sup>
CHSE-214	7	1.0×10 <sup>4.75</sup>

2.2.4 电镜观察 SVCV 感染 GCO 细胞系 将 SVCV 接种 GCO 细胞后, 电镜观察可见, 在 GCO 细胞质内有典型弹状病毒颗粒(约为 140 nm, 图 8)。

### 3 讨论

本研究通过对 GCO 细胞生长曲线绘制和形态学观察等发现, GCO 细胞的适宜生长温度为 15–28℃, 最适生长温度为 25℃。一种细胞系的生长温度在一个宽泛的范围, 使该细胞系具备了可以分离淡水鱼病毒

和冷水鱼病毒的潜力(Nicholson *et al*, 1987)。GCO 细胞系的这一特点使得它未来可以广泛地用于水生动物病毒的分离。通过对 GCO 细胞系细胞周期、染色体核型的分析发现, GCO 细胞系呈典型的二倍体特征, 染色体数为 2n=48, 这与舒琥等(2014)和 Beck 等(1984)描述的草鱼的染色体特征相符, 说明 GCO 细胞系保持着稳定而正常的草鱼生理学特征, 未发生变异, 是可靠的病毒分离与检测的工具。

目前, SVCV 病毒已经在世界范围内广泛存在, 可以感染鲤鱼(肖克宇等, 2004)、鲫鱼(*Carassius auratus*) (Rougée *et al*, 2007)等多种鲤科鱼类, 造成鱼类多器官感染。SVCV 存在多种分离株, 如欧洲株、亚洲株等。世界动物卫生组织(OIE)推荐使用 EPC 分离 SVCV 病毒, 但就目前的现状, EPC 不足以全面地对进出口鲤科鱼类 SVCV 感染情况进行监测, 这就需要寻找更多的 SVCV 敏感细胞。

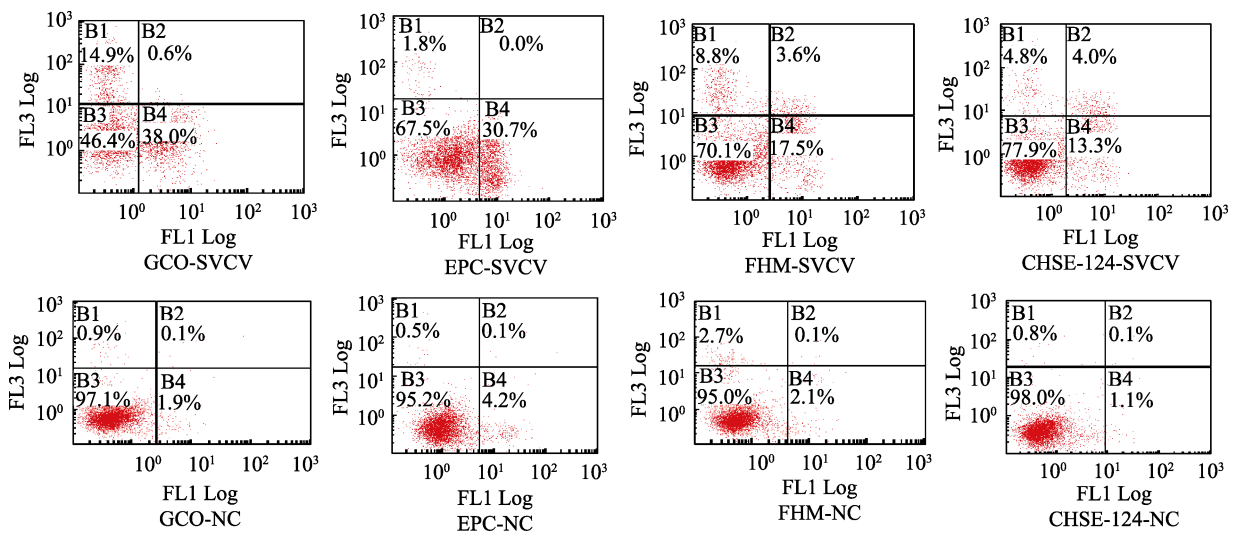


图 7 流式细胞仪检测 SVCV 诱导不同细胞凋亡

Fig.7 Apoptosis in different cell lines caused by SVCV by using flow cytometry

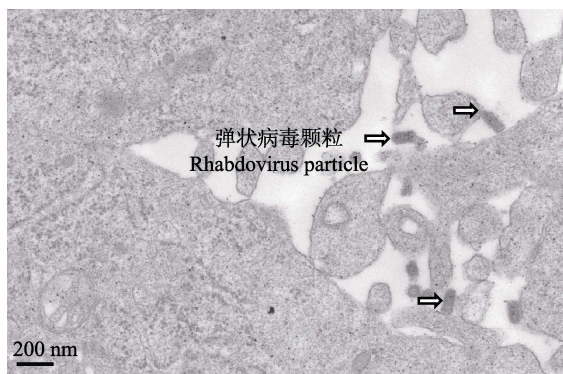


图 8 GCO 感染 SVCV 后电镜照片

Fig.8 Electron micrograph of GCO cells infected with SVCV

本研究通过接种 SVCV 病毒, 检测细胞凋亡、CPE 观察、病毒粒子观察, 发现 SVCV 能够很好地在 GCO 细胞内增殖, 出现明显的病变。与其他已知的 SVCV 易感细胞相比, GCO 细胞对 SVCV 更加易感, 可以快速出现 CPE, 病毒滴度更高。研究结果显示, GCO 细胞可以作为分离 SVCV 病毒的可靠实验工具。

研究表明, GCO 对多种水生动物病毒有敏感性。张奇亚等(2012)用草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV, 也称为草鱼出血病病毒 Grass carp hemorrhage virus, GCHV)感染 GCO 细胞, 通过电镜在 GCO 细胞内观察到病毒粒子, 诱导 GCO 细胞形成含多个细胞核的合胞体, 细胞变大并发生崩解。这一

现象说明, GCO 细胞可以用来分离 GCHV 病毒, 但敏感性不如草鱼肾脏细胞(CIK)(肖雪, 2007)<sup>1)</sup>。江育林等(1999)用 GCO 细胞从甲鱼(*Amyda sinensis*)中分离到甲鱼虹彩病毒(STIV), 孙颖杰等(2009)用 GCO 细胞从石鲮鱼(*Platichthys bicoloratus*)中分离到牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)弹状病毒。GCO 细胞具有生长活力强、细胞纯度高、细胞形态典型以及对病毒的特异性高等优点, 是一个具有广阔应用前景的生物模型。

## 参 考 文 献

- 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性. 水产学报, 1986, 10(1): 11-17
- 江育林, 陈在贤, 郑坚川. 甲鱼虹彩病毒的分离和鉴定. 深圳特区科技, 1999(5): 62
- 孙颖杰, 江育林, 刘荃, 等. 石鲮鱼鱼苗中一种弹状病毒的分离与鉴定. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 277-282
- 肖克宇, 陈昌福. 水产微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2004, 256-257
- 沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373
- 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒及病毒病图鉴. 北京: 科学出版社, 2012, 317-322
- 张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况. 水生动物学报, 2002, 26(1): 89-101
- 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S<sub>1</sub> 的建立和特性观察. 水产学报, 1981, 5(2): 111-120
- 陈立祥, 符少辉, 汪冬庚, 等. 草鱼出血病毒 H962 毒株的生物学特性研究. 湖南农业大学学报, 1998, 24(6): 468-470
- 陈燕桑. 草鱼出血病病原的研究. 水生生物学集刊, 1978, 6(3): 321-330
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997, 239-241
- 舒璇, 刘远波, 魏秋兰, 等. 珠江野生草鱼、赤眼鳟的核型、银染和 C 带比较研究. 广州大学学报(自然科学版), 2014, 13(2): 53-59
- Beck ML, Biggers CJ, Barker CJ. Chromosomal and electrophoretic analyses of hybrids between grass carp and bighead carp (Pisces: Cyprinidae). Copeia, 1984(2): 337-342
- Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New York: Wiley Blackwell, 2010, 387-389
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220
- Nicholson BL, Danner DJ, Wu JL. Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. In Vitro Cell Dev Biol, 1987, 23(3): 199-204
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1458-1461
- Rougée L, Ostrander GK, Richmond RH, et al. Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish (*Carassius auratus*) muscle and swim bladder. Dis Aquat Organ, 2007, 77(2): 127-135
- Yan W, Nie P, Lu Y. Establishment characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from gold fish, *Carassius auratus* (L.), tail fin. J Fish Dis, 2011, 34(10): 757-768
- Ye HQ, Chen SL, Sha ZX, et al. Development and characterization of cell lines from heart, liver, spleen and head kidney of sea perch *Lateolabrax japonicus*. J Fish Dis, 2006, 29(SA): 115-126

(编辑 马瑾艳)

1) 肖雪. 草鱼呼肠孤病毒人工感草鱼的条件筛选和病理学研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2007, 2-3

## Characterization of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus

WANG Jinjin, LIU Ying, YU Li, JIA Peng, CHEN Bing, SHI Xiujie, ZHENG Xiaocong,  
LAN Wensheng, HE Junqiang, LIU Hong<sup>①</sup>

(Animal & Plant Inspection and Quarantine Technology Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection  
and Quarantine Bureau of P.R. China, Shenzhen 518045)

**Abstract** Grass carp ovary cell lines (GCO) was used in the study of Grass Carp Hemorrhage and has been established by Chinese Academy of Sciences Institute of Aquatic Animal in 1970s. GCO has been cultured for more than 300 generations and plays an important role in fish virology research in China. In this study, we performed morphological observation, drawing of the growth curves, cell cycle analysis, chromosomal analysis, cytopathic effect assay (CPE), TCID<sub>50</sub> assay, cell apoptosis detection, and electron microscopic observation to demonstrate the characteristics of GCO and the cell proliferation of spring viremia of carp virus (SVCV). It was observed that GCO cell line mainly consisted of epithelial-like cells. GCO grew at temperatures between 15°C and 28°C, and the optimum was 25°C. The growth rate of GCO cells increased proportionally with the foetal bovine serum (FBS) concentration (5% to 20%), and the optimum concentration of FBS was 10%. There were 48 chromosomes in GCO cells. Four known fish cell lines were tested to determine the susceptibility of SVCV, and the results demonstrated that GCO was susceptible to SVCV. Moreover, GCO displayed higher sensitivity to SVCV and increased viral production than the control cell line, epithelioma papulosum cyprini (EPC), fathead minnow (FHM), and chinook salmon embryo (CHSE-214) cell lines. These results suggested that GCO cell line could be a useful diagnostic tool in SVCV isolation and diagnosis, and could serve as a suitable biological system in the pathogenicity study of SVCV. One advantage of this cell line is that it grows in a wide temperature range (15°C to 28°C), and thus can be used in isolating both warm-water and cold-water fish viruses. These characteristics of the GCO make it a potential tool in the future study of other fish viruses.

**Key words** Grass carp ovary cell lines (GCO); Biological characteristics; Susceptibility; Spring viraemia of carp virus (SVCV)

① Corresponding author: LIU Hong, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn



# 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、黑石斑鱼(*Centropristis striata*)的营养成分及加工品质比较\*



赵睿<sup>2</sup> 娄方瑞<sup>3</sup> 丁福红<sup>1</sup> 马爱军<sup>1,4①</sup> 王婷<sup>1,4</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 北京市水产技术推广站 北京 100075; 3. 广西大学 南宁 530001; 4. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究对不同养殖环境和食性的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、黑石斑鱼(*Centropristis striata*)的营养成分和加工品质进行了分析比较。对鱼体的解剖测量结果显示,梭鱼头重占体重的比例为 17.09%, 低于黑石斑鱼和草鱼。对 3 种鱼的胶原蛋白和氨基酸成分分析结果显示,黑石斑鱼肌肉可溶性与不可溶性胶原蛋白含量均为最高,分别为 0.22 mg/ml 和 2.12 mg/ml,梭鱼含量次之,分别为 0.05 mg/ml 和 0.82 mg/ml。黑石斑鱼的鲜味氨基酸含量最高(44.37%),梭鱼为 32.80%,均显著高于草鱼(24.50%)。6 种必需氨基酸总含量:草鱼最低,为 53.31%,梭鱼为 57.14%,黑石斑鱼最高,为 62.64%,三者之间差异显著。肌肉脂肪酸检测显示,梭鱼饱和脂肪酸(SFA)含量最高,为 41.26%( $P<0.05$ );黑石斑鱼多不饱和脂肪酸含量(PUFA)最高,为 34.58%( $P<0.05$ )。梭鱼二十碳五烯酸(EPA)的含量为 8.27%,与黑石斑鱼(7.85%)无显著差异。黑石斑鱼的二十二碳六烯酸(DHA)含量最高,为 13.51%,显著高于草鱼(3.84%)和梭鱼(3.02%)。3 种鱼肌肉中超氧化物歧化酶(SOD)活力有显著差异,梭鱼最强,黑石斑鱼最弱。丙二醛(MDA)含量检测结果显示,黑石斑鱼的 MDA 含量为 19.98 nmol/mg,显著高于草鱼和梭鱼,草鱼和梭鱼差异不显著,可见梭鱼肌肉抗氧化能力较强,有利于进行长期保存、加工。

**关键词** 草鱼;梭鱼;黑石斑鱼;营养成分

**中图分类号** S948 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0062-06

随着养殖业的迅速发展和生活水平的不断提高,鱼肉在人们的饮食中已经不可或缺,人们对所食鱼肉的肉质和口感度越来越重视,对养殖鱼类的安全性和营养成分等也更加关注(林洪等, 2012; 刘长琳等, 2015; 曹栋正等, 2016)。而发展生态系统水平的水产养殖是保证规模化生产和实现可持续产出的必由之路(唐启升等, 2009)。因而,在养殖品种选择方面,

既要考虑其对养殖生态环境的要求,也要考虑其营养加工品质。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为典型的草食性鱼类,其生长迅速、饲料来源广,是我国主要的淡水养殖品种之一(余永生等, 2006)。据 2008 年统计,我国大宗淡水鱼类中,草鱼总产量最高,为 370.71 万 t,约占我国淡水养殖总产量的 17.89% (戈贤平, 2010)。

\* 山东省自然科学基金项目(ZR2011CQ004)、黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022013008)和 2013 年国家留学人员科技项目共同资助。赵睿, E-mail: zrdlsc@163.com

① 通讯作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-08-08, 收修改稿日期: 2015-11-26



梭鱼(*Liza haematocheila*)为我国黄渤海区域重要近海鱼类,属于以植物饲料为主的半咸水鱼类,基于突出的生态优势、营养品质特征及养殖成本等优势,其养殖产业发展具有良好前景(丁福红等,2014)。黑石斑鱼(*Centropristis striata*)属海洋暖温性、底栖、肉食性鱼类,原产于美国、墨西哥沿岸,2003年引入我国进行饲养(雷霖霖等,2007),2006年突破了繁育技术,在我国南北方均实现了规模化养殖(黄家琳等,2006)。草鱼、梭鱼、黑石斑鱼在我国均具有一定的产业基础,但由于养殖环境要求不同,摄食习性不同,产业发展的侧重也有所不同。尤其是以梭鱼为代表的植物食性的半咸水鱼类养殖,长期以来,其养殖产业处在较为缓慢的发展态势,较之传统淡水鱼类和名贵海水鱼类养殖,养殖规模和发展动力明显不足。

目前,关于梭鱼与其他淡水鱼类、肉食性海水鱼类营养品质、加工品质的比较研究还相对较少。本研究选取3种代表性鱼为研究对象,通过对影响鱼类肉质性状的营养成分如脂肪酸、氨基酸进行综合分析,对胶原蛋白含量、肌肉抗氧化性、内脏比、头重比、出肉率等特性进行测定比较,以期明确不同养殖环境、不同食性鱼类的营养特质以及加工品质等特征,为养殖品种开发提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

挑选体重为500~750 g、体型完整、体色正常、体质健壮、觅食正常且运动活跃的养殖草鱼、梭鱼、黑石斑鱼成鱼各4尾,充氧运输至实验室,立即开展实验。

### 1.2 测量与解剖

用纱布将每尾鱼体表擦拭干净,对每尾鱼测量体长、体重并进行解剖。首先用解剖刀沿鳃盖后缘切除头部,测量鱼头重量,然后用解剖刀划破鱼腹腔,取出内脏,测量其内脏重量,最后取背部肌肉30 g,将所有取样放于-80℃保存以进行相关营养成分分析。在解剖过程中,应尽量快速取样,并在取样完成后尽快将样品冷冻处理,以防样品在空气中氧化。

### 1.3 胶原蛋白测定

称取4.00 g鲜鱼肉于匀浆器(FJ-200高速分离均质机)中,加10倍体积蒸馏水,充分匀浆2 min,离心机(Eppendorf 5804R)10000 r/min离心20 min,弃上清液。再加入20倍体积0.1 mol/L NaOH溶液,搅拌

过夜,10000 r/min离心20 min,弃上清液,如此重复2次。之后加入10倍体积0.5 mol/L冰醋酸,搅拌过夜,10000 r/min离心20 min,重复1次,此上清液即为可溶性胶原蛋白提取液。沉淀中加入5倍体积蒸馏水,加入高压灭菌锅中,120℃条件下加热1 h,然后10000 r/min离心20 min,上清液即为不可溶性胶原蛋白提取液。分离的可溶性和不可溶性胶原蛋白分别用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定其蛋白质含量(梁萌青等,2010)。

### 1.4 总超氧化物歧化酶测定

称取0.1 g样品并加入1 ml 0.9%的生理盐水,用匀浆器(FJ-200高速分离均质机)匀浆1 min,并在10000 r/min、4℃下离心20 min,取上清液,然后加入酶标板中,使用南京建成总SOD试剂盒(A001-1)通过酶标仪进行总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定。

### 1.5 丙二醛测定

称取0.1 g样品并加入1 ml 0.9%的生理盐水,用匀浆器(FJ-200高速分离均质机)匀浆1 min,获得匀浆液,采用南京建成生物工程研究所MDA A003-1试剂盒进行丙二醛(MDA)检测,检测波长为532 nm。

### 1.6 氨基酸、脂肪酸成分分析

**1.6.1 氨基酸测定** 称取样品,将样品经万能粉碎机打碎,设2次平行样。在样品中加入6 mol/L HCl 10 ml,并在110℃恒温箱中恒温处理22 h。冷却,用过滤膜过滤,进样;将加入样品的样品管充分振摇15 s,吸取10 μl左右此样品溶液注入色谱柱[Amino PA10 (2×250 mm)分析柱+Amino PA10(2×50 mm)保护]中,记录色谱图,并确定各氨基酸的出峰保留时间和峰面积,并测量内标物和各氨基酸的峰面积。氨基酸含量(μg/mg)=测定含量×10/1000×10/测定样品质量。

**1.6.2 脂肪酸测定** 采用GC-MS对样品进行脂肪酸含量的测定。色谱柱为HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)的弹性石英毛细管柱;平衡时间为0.25 min,载气为高纯度的氦气;进样量为1000 μl,后进样口的温度为280℃。

初始温度为50℃,保持5 min,以5℃/min的速率升至190℃,再以20℃/min的速率升到280℃(保持4 min)。分流比40:1,柱前压68 kPa,进样量1 μl。质谱离子源为EI;质谱扫描范围为50~500 amu。测试结果根据NIST谱库定性。

### 1.7 数据处理

用SPSS 11.0统计软件对数据进行方差分析、多重比较和相关性分析。数据用平均值±标准差(Mean±

SD)表示, 差异显著水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 体态特征测量数据

草鱼、黑石斑鱼、梭鱼的测量数据见表 1。3 种鱼的头重占体重的比例差异显著( $P<0.05$ ), 其中, 黑石斑鱼的比例最高, 为 23.64%; 梭鱼头重占体重比例最低, 为 17.09%。黑石斑鱼体高与体长的比值显著高于其他 2 种鱼( $P<0.05$ ), 为 37.31%, 而草鱼和梭鱼无显著差异( $P>0.05$ )。草鱼、黑石斑鱼和梭鱼的内脏与体重的比值基本相同, 无显著差异( $P>0.05$ )。黑石斑鱼头长占身体全长的比例也显著大于草鱼和梭鱼( $P<0.05$ ), 为 28.93%。3 种鱼体长与全长的比例较

为接近, 无显著差异( $P>0.05$ )。黑石斑鱼的内脏重与其去除头重后的体重的比值显著大于草鱼和梭鱼( $P<0.05$ ), 为 15.11%, 而梭鱼和草鱼则基本相同, 无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 胶原蛋白含量

3 种鱼的胶原蛋白含量如表 2 所示。3 种鱼的可溶性胶原蛋白含量有显著差异( $P<0.05$ )。其中, 黑石斑鱼肌肉可溶性胶原蛋白含量最高, 为 0.22 mg/ml; 梭鱼次之, 为 0.05 mg/ml。黑石斑鱼的不可溶性胶原蛋白含量为 2.12 mg/ml, 与草鱼和梭鱼差异显著( $P<0.05$ ), 而草鱼和梭鱼的不可溶性胶原蛋白含量无显著差异( $P>0.05$ )。总体来看, 梭鱼的可溶性胶原蛋白含量和不可溶性胶原蛋白含量比黑石斑鱼低, 但高于草鱼。

表 1 草鱼、黑石斑鱼、梭鱼的体态特征测量数据

Tab.1 Body characteristics measurement of *C. idellus*, *L. haematocheila* and *C. striata* (%)

项目 Items	草鱼 <i>C. idellus</i>	黑石斑鱼 <i>C. striata</i>	梭鱼 <i>L. haematocheila</i>
头重/体重 Head weight/Body weight	20.09±0.60 <sup>a</sup>	23.64±0.82 <sup>b</sup>	17.09±1.23 <sup>c</sup>
体高/体长 Body height/Body length	24.51±1.30 <sup>a</sup>	37.31±4.08 <sup>b</sup>	21.07±1.01 <sup>a</sup>
内脏重/体重 Viscera weight/Body weight	10.24±1.45 <sup>a</sup>	11.54±1.10 <sup>a</sup>	10.77±0.11 <sup>a</sup>
头长/全长 Head length/Body length	17.81±1.33 <sup>a</sup>	28.93±0.92 <sup>b</sup>	19.60±1.17 <sup>a</sup>
体长/全长 Body length/Total length	84.44±1.66 <sup>a</sup>	83.18±2.42 <sup>a</sup>	83.09±2.11 <sup>a</sup>
内脏重/(体重-头重) Viscera weight/(Body weight-Head weight)	12.82±1.91 <sup>a</sup>	15.11±1.33 <sup>b</sup>	12.80±2.88 <sup>a</sup>

注: 同一行上标不同字母为差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Note: Different subscripts in the same row indicated significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

表 2 草鱼、梭鱼、黑石斑鱼肌肉胶原蛋白含量比较

Tab.2 Contents of collagen in the muscles of *C. idellus*, *L. haematocheila* and *C. striata* (mg/ml)

项目 Items	草鱼 <i>C. idellus</i>	梭鱼 <i>L. haematocheila</i>	黑石斑鱼 <i>C. striata</i>
可溶性胶原蛋白 Soluble collagen	0.02±0.03 <sup>a</sup>	0.05±0.02 <sup>b</sup>	0.22±0.05 <sup>c</sup>
不可溶性胶原蛋白 Insoluble collagen	0.78±0.52 <sup>a</sup>	0.82±0.11 <sup>a</sup>	2.12±0.47 <sup>b</sup>

### 2.3 氨基酸含量

表 3 是 3 种鱼的肌肉中 13 种氨基酸含量的测定结果。其中, 黑石斑鱼的鲜味氨基酸含量最高, 为 44.37%, 梭鱼的含量为 32.80%, 均显著高于草鱼 (24.50%) ( $P<0.05$ )。草鱼肌肉中主要是鲜味氨基酸中的天冬氨酸缺乏。可见, 3 种鱼中, 鲜味最好的为黑石斑鱼, 而草鱼的鲜味较差。本实验测定的 6 种必需氨基酸包括赖氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸, 草鱼的必需氨基酸总含量最低, 为 53.31%, 梭鱼为 57.14%, 黑石斑鱼的最高, 为 62.64%, 三者之间差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.4 脂肪酸含量

表 4 为 3 种鱼的肌肉中脂肪酸含量的测定结果。草鱼、梭鱼、黑石斑鱼背部肌肉中测得的饱和脂肪酸(SFA)总量分别为 34.49%、41.26%、34.24%, 梭鱼含量最高, 显著高于草鱼和黑石斑鱼( $P<0.05$ )。多不饱和脂肪酸总含量(PUFA)检测结果显示, 黑石斑鱼 PUFA 为 34.58%, 显著高于梭鱼(29.50%)和草鱼(23.37%) ( $P<0.05$ )。梭鱼二十碳五烯酸(EPA)的含量最高, 为 8.27%, 黑石斑鱼次之, 为 7.85%, 二者无显著差异( $P>0.05$ ), 但均显著高于草鱼(2.77%) ( $P<0.05$ )。而黑石斑鱼的二十二碳六烯酸(DHA)含量为 13.51%,

表 3 草鱼、梭鱼、黑石斑鱼肌肉中氨基酸的组成和含量(干样)

Tab.3 Compositions of the amino acids in the muscles of *C. idellus*, *L. haematocheila* and *C. striata* (Dry matter, %)

氨基酸 Amino acids	草鱼 <i>C. idellus</i>	梭鱼 <i>L. haematocheila</i>	黑石斑鱼 <i>C. striata</i>
天冬氨酸 Aspartic acid	8.83±0.22 <sup>a</sup>	16.74±0.17 <sup>b</sup>	22.81±0.10 <sup>c</sup>
苏氨酸 Threonine	12.75±0.10 <sup>a</sup>	13.14±0.68 <sup>b</sup>	11.74±3.30 <sup>c</sup>
丝氨酸 Serine	—	—	—
谷氨酸 Glutamic acid	15.67±1.62 <sup>a</sup>	16.06±0.57 <sup>a</sup>	21.65±5.29 <sup>b</sup>
甘氨酸 Glycine	11.87±0.01 <sup>b</sup>	10.50±0.52 <sup>a</sup>	9.09±1.87 <sup>a</sup>
丙氨酸 Alanine	15.78±0.40 <sup>b</sup>	14.86±0.72 <sup>a</sup>	14.76±1.89 <sup>a</sup>
胱氨酸 Cystine	—	—	—
缬氨酸 Valine	14.24±0.72 <sup>a</sup>	12.90±0.57 <sup>b</sup>	15.80±1.62 <sup>c</sup>
蛋氨酸 Methionine	—	—	—
异亮氨酸 Isoleucine	15.65±0.28 <sup>a</sup>	15.67±1.10 <sup>a</sup>	16.86±0.70 <sup>b</sup>
亮氨酸 Leucine	2.08±0.98 <sup>a</sup>	7.09±3.36 <sup>b</sup>	7.65±4.47 <sup>b</sup>
酪氨酸 Tyrosine	2.66±0.50 <sup>a</sup>	3.28±0.76 <sup>b</sup>	1.63±1.96 <sup>c</sup>
苯丙氨酸 Phenylalanine	6.79±0.62 <sup>a</sup>	6.26±0.57 <sup>a</sup>	6.63±0.81 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lysine	1.80±0.17 <sup>a</sup>	2.08±0.06 <sup>b</sup>	3.96±2.29 <sup>c</sup>
组氨酸 Histidine	5.22±0.23 <sup>a</sup>	4.84±0.34 <sup>ab</sup>	4.05±0.46 <sup>b</sup>
精氨酸 Arginine	7.91±1.59 <sup>a</sup>	5.62±0.47 <sup>b</sup>	6.66±1.00 <sup>ab</sup>
脯氨酸 Proline	—	—	—
鲜味氨基酸 Flavor amino acids	24.50±2.60 <sup>a</sup>	32.80±1.05 <sup>b</sup>	44.37±3.53 <sup>c</sup>

“—” 为未检出 —: Not detected

显著高于草鱼(3.84%)和梭鱼(3.02%) ( $P<0.05$ )。

## 2.5 超氧化物歧化酶的活力

超氧化物歧化酶(SOD)检测结果显示(表 5), 3 种鱼的 SOD 活力有显著差异( $P<0.05$ ), 梭鱼的 SOD 活力最强, 为 34.07 U/mg; 黑石斑鱼最低, 为 21.95 U/mg。

## 2.6 丙二醛含量

丙二醛检测结果显示(表 5), 草鱼(12.92 nmol/mg)和梭鱼(10.10 nmol/mg)的丙二醛含量差异不显著( $P>0.05$ ), 而黑石斑鱼的丙二醛含量显著高于草鱼和梭鱼( $P<0.05$ )。3 种鱼的丙二醛含量为梭鱼<草鱼<黑石斑鱼, 而 SOD 活力为梭鱼>草鱼>黑石斑鱼, MDA 的含量与 SOD 活力呈负相关关系( $r^2=0.9997$ )。

## 3 讨论

3 种鱼的解剖和形态测定显示, 梭鱼体型较为细长, 头部骨骼较小, 头重占体重比例最低。草鱼、黑石斑鱼和梭鱼的内脏与体重的比值基本相同, 在易于加工和提高出肉率方面, 梭鱼具有较好优势。

胶原蛋白是水产动物肉质口感及营养价值的重要影响因素。同时, 鱼类的胶原蛋白相对于哺乳动物有点特殊, 水解性强, 鱼肉冷冻处理后, 胶原蛋白结

构的变化将影响到鱼肉的质地(孙丰梅等, 2002)。本研究发现, 黑石斑鱼的胶原蛋白含量高于梭鱼、草鱼, 其鲜品营养价值和肉质口感较好, 但冻存后黑石斑鱼肉存在易于软化的问题, 需要在加工过程中关注。

本研究通过对 3 种鱼肌肉中氨基酸的分析发现, 黑石斑鱼的鲜味氨基酸和必需氨基酸含量要高于梭鱼和草鱼, 梭鱼的这 2 项指标的含量居中。鱼肉味道的鲜美程度往往取决于肌肉中鲜味氨基酸占氨基酸总量的百分比, 而必需氨基酸则主要用于能量的贮存和产生, 合成前列腺素、激活酶系统以及作为生物膜的重要成分(黄海等, 2012)。3 种实验鱼类中, 黑石斑鱼肉最为鲜美, 且营养价值较高, 其次为梭鱼。其他学者研究结果表明, 草鱼、梭鱼、黑石斑鱼的必需氨基酸总量/氨基酸总量和非半必需氨基酸总量/氨基酸总量分别为 27.52%和 37.97%(黄春红等, 2008)、40.17%和 78.35%(王建新等, 2010)、40.81%和 81.43%(党冉等, 2010), 即梭鱼、黑石斑鱼的肌肉中氨基酸含量指标均在 FAO/WHO 的理想模式(Pellett *et al*, 1980)指标以上。

本研究通过对 3 种鱼的肌肉中脂肪酸的分析发现, 梭鱼的 SFA 含量高于草鱼和黑石斑鱼, 而黑石斑鱼的 PUFA 含量显著高于梭鱼和草鱼。SFA 的含量过高可能会引起血清总胆固醇升高, 从而引发心血管

表4 草鱼、梭鱼、黑石斑鱼肌肉脂肪酸成分  
Tab.4 Compositions of fatty acids in the muscles of  
*C. idellus*, *L. haematocheila* and *C. striata* (%)

项目 Items	草鱼 <i>C.idellus</i>	梭鱼 <i>L.haematocheila</i>	黑石斑鱼 <i>C.striata</i>
SFA	34.49	41.26	34.24
C15 : 0	3.84±0.24 <sup>a</sup>	0.80±0.17 <sup>b</sup>	4.27±0.07 <sup>a</sup>
C16 : 0	0.42±0.12 <sup>a</sup>	—	0.67±0.00 <sup>b</sup>
C17 : 0	24.71±0.97 <sup>a</sup>	24.65±0.82 <sup>a</sup>	21.87±1.56 <sup>b</sup>
C18 : 0	0.49±0.13 <sup>a</sup>	—	0.64±0.07 <sup>b</sup>
C19 : 0	4.61±0.89 <sup>a</sup>	14.94±1.85 <sup>b</sup>	6.34±1.16 <sup>a</sup>
C20 : 0	0.20±0.13 <sup>a</sup>	0.87±0.35 <sup>b</sup>	0.20±1.21 <sup>a</sup>
C21 : 0	0.22±0.22 <sup>a</sup>	—	0.25±0.01 <sup>a</sup>
MUFA	35.27	26.01	43.78
C15 : 1	0.15±0.02	—	—
C16 : 1	—	—	0.14±0.01
C17 : 1	15.77±1.01 <sup>a</sup>	4.08±0.87 <sup>b</sup>	9.38±0.42 <sup>c</sup>
C18 : 1	0.29±0.02 <sup>a</sup>	—	9.78±0.84 <sup>b</sup>
C19 : 1	17.65±5.78 <sup>a</sup>	21.93±5.64 <sup>b</sup>	22.44±0.88 <sup>b</sup>
C22 : 1	0.48±0.23	—	—
C23 : 1	0.93±0.27 <sup>a</sup>	—	1.58±0.66 <sup>b</sup>
C25 : 1	—	—	0.46±0.04
PUFA	23.37	29.50	34.58
C18 : 2	8.09±1.76	—	—
C19 : 2	0.40±0.01 <sup>a</sup>	12.47±1.39 <sup>b</sup>	2.32±0.06 <sup>c</sup>
C20 : 3	6.31±2.37 <sup>a</sup>	1.39±0.92 <sup>b</sup>	0.63±0.32 <sup>c</sup>
C20 : 4	—	3.10±1.32 <sup>a</sup>	0.77±0.29 <sup>b</sup>
C20 : 5	2.77±0.77 <sup>a</sup>	8.27±3.26 <sup>b</sup>	7.85±2.15 <sup>b</sup>
C21 : 4	0.82±0.00 <sup>a</sup>	1.25±0.95 <sup>a</sup>	—
C22 : 5	1.14±0.25 <sup>a</sup>	—	7.48±3.44 <sup>b</sup>
C22 : 6	3.84±1.54 <sup>a</sup>	3.02±0.38 <sup>a</sup>	13.51±1.32 <sup>b</sup>

注：SFA 为饱和脂肪酸，MUFA 为单不饱和脂肪酸，PUFA 为多不饱和脂肪酸，“—”为未检出

Note: SFA: Saturated fatty acid; MUFA: Mono-unsaturated fat; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; -: Not detected

表5 草鱼、梭鱼、黑石斑鱼肌肉 SOD 活力及 MDA 含量  
Tab.5 SOD activity and contents of MDA in the muscles of  
*C. idellus*, *L. haematocheila* and *C. striata* (%)

项目 Items	草鱼 <i>C.idellus</i>	梭鱼 <i>L.haematocheila</i>	黑石斑鱼 <i>C.striata</i>
样本蛋白浓度 Sample protein con- centration (μg/ml)	1.76±0.03	1.83±0.01	1.84±0.03
SOD 活力 SOD activity(U/mg)	30.41±5.28 <sup>a</sup>	34.07±3.24 <sup>b</sup>	21.95±5.67 <sup>c</sup>
MDA 含量 MDA content (nmol/mg)	12.92±5.47 <sup>a</sup>	10.10±1.77 <sup>a</sup>	19.98±3.76 <sup>b</sup>

疾病。而 PUFA 可以保护心脏，降低血糖浓度，有利于抗癌、调节人类脂质代谢和预防治疗心血管疾病。同时，研究表明，梭鱼具有较为丰富的 EPA，而黑石斑鱼的 DHA 则较高。PUFA、EPA、DHA 的鱼类生理及对人类的营养保健方面的重要作用已得到人们广泛认可(Browning *et al*, 2012; Block *et al*, 2012)。可见，黑石斑鱼的高品质脂肪酸含量具有显著优势。

SOD 是一种源于生命体的活性物质，能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质。而 MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化程度，间接反映出细胞损伤的程度，其与 SOD 的活力配合检测，可用来显示肉质在加工及保存中的抗氧化能力(李华等, 2010)。本研究对 3 种鱼的 SOD 活力及 MDA 含量测定表明，相对于草鱼和黑石斑鱼，梭鱼在食品加工中能保存更长时间而不腐败变质，具有更强的抗氧化能力，拥有更好的加工品质。作为食物，梭鱼可以更好地为人体补充 SOD，具有更好的抗衰老效果。本研究发现，3 种鱼的 MDA 含量与 SOD 活力呈负相关关系，体现了二者功能的关联性。

综合本研究的各项结果表明，草鱼、梭鱼、黑石斑鱼在营养成分、加工品质方面体现出了不同特征，结合养殖成本、养殖生态效益等多方面因素，应因地制宜开展养殖，以促进产业发展。梭鱼出肉率较高，胶原蛋白含量丰富，氨基酸含量指标满足 FAO/WHO 的理想模式，并含有相对较为丰富的不饱和脂肪酸(EPA 和 DHA)，且梭鱼保护性酶活性在 3 种鱼中最强，可在外界环境因子变动时减少鱼类应激反应以保持较好的营养成分完整性，具有更好的抗衰老作用。如具备适宜的养殖条件，开展梭鱼养殖具有较好前景。

致谢：烟台天源水产有限公司、青岛宝荣水产科技有限公司为本研究提供实验材料，特此致谢。

## 参 考 文 献

- 丁福红, 雷霖霖, 毛守康, 等. 我国以植物食性为主的海水鱼类养殖发展前景. 海洋科学, 2014, 38(11): 131-137
- 王建新, 邴旭文, 张成锋, 等. 梭鱼肌肉营养成分与品质的评价. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 61-66
- 戈贤平. 我国大宗淡水鱼养殖现状及产业技术体系建设. 中国水产, 2010(5): 5-9
- 刘长琳, 陈四清, 王有廷, 等. 裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)肌肉的营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 133-139
- 孙丰梅, 刘安军. 胶原蛋白与肉品品质. 食品工业科技, 2002(1): 14-17
- 李华, 曾勇庆, 魏述东, 等. 猪宰后肌肉中 SOD 与 MDA 含量的变化及其对肉质特性的影响. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3): 257-261
- 余永生, 杨燕, 邵仁岳. 草鱼亲鱼培育与繁殖技术. 科学养鱼,

- 2006(2): 13
- 林洪, 李萌, 曹立民. 我国水产食品安全与质量控制研究现状和发展趋势. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(1): 1-5
- 党冉, 竺俊全, 邱新志. 美洲黑石斑鱼含肉率及肌肉营养成分分析. 海洋学研究, 2010, 28(2): 60-66
- 唐启升, 王清印, 庄志猛. “生态系统水平养殖”新理念. 中国渔业报, 2009(4): 1-2
- 黄春红, 曾伯平, 董建波. 青鱼、草鱼、鲢鱼和鳙鱼鱼头营养成分比较. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2008, 20(3): 46-57
- 黄海, 杨宁, 张希. 淡水石斑鱼含肉率和肌肉营养成分分析. 水产科技情报, 2012, 39(2): 87-91
- 黄家琳, 卢飞龙. 石斑鱼人工育苗技术研究. 齐鲁渔业, 2006, 23(2): 3-5
- 曹栋正, 张小忠, 陈四清, 等. 星突江鲮(*Platichthys stellatus*)、石鲮(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种肌肉的营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 34-41
- 梁萌青, 雷霖霖, 吴新颖, 等. 3种主养鲆鲽类的营养成分分析及品质比较研究. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 113-119
- 雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 110-115
- Block RC, Dier U, Calderonartero P, et al. The effects of EPA+DHA and aspirin on inflammatory cytokines and angiogenesis factors. World J Cardiovasc Dis, 2012, 2(1): 14-19
- Browning LM, Walker CG, Mander AP, et al. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. Am J Clin Nutr, 2012, 96(4): 748-758
- Pellett PL, Yong VR. Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo: The United National University Publishing Company: 1980, 26-29

(编辑 冯小花)

## The Nutritional Value and Processing Quality of *Ctenopharyngodon idellus*, *Liza haematocheila*, and *Centropristis striata*

ZHAO Rui<sup>2</sup>, LOU Fangrui<sup>3</sup>, DING Fuhong<sup>1</sup>, MA Aijun<sup>1,4①</sup>, WANG Ting<sup>1,4</sup>

(1. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Beijing Aquatic Product Promotion Technology Department, Beijing 100021; 3. Guangxi University, Nanning 530001; 4. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study, the nutritional components and meat qualities of *Ctenopharyngodon idellus*, *Liza haematocheila*, and *Centropristis striata* were analyzed and compared. The results showed that the weight ratio of head to body of *L. haematocheila* was 17.09%, which was significantly higher than that of *C. striata* and *C. idellus*. The content of soluble and insoluble collagen in *C. striata* muscle was higher than that of the two other species, which were 0.22 mg/ml and 2.12 mg/ml respectively. The contents of flavor amino acid in *C. striata*, *L. haematocheila*, and *C. idellus* were 44.37%, 32.80%, and 24.50% respectively. As for the total content of six essential amino acids, *C. idellus* showed the lowest value of 53.31%, the value for *L. haematocheila* was 57.14%, and *C. striata* showed the highest value of 62.64%. The fatty acid analysis indicated that the saturated fatty acid (SFA) of *L. haematocheila* was up to 41.26%, which was significantly higher than that of the other two ( $P<0.05$ ). The level of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) in the muscle of *C. striata* was the highest (34.58%,  $P<0.05$ ). The EPA concentration in the muscle of *L. haematocheila* was 8.27%, and it was not significantly different from that of *C. striata*. The DHA concentration in the muscle of *C. striata* was 13.51%, which was significantly higher than that of *C. idellus* (3.84%) and *L. haematocheila* (3.02%). The activity of SOD in the muscles of the three species was significantly different, and it was the highest in *L. haematocheila* and the lowest in *C. striata*. The content of MDA in the muscle of *C. striata* was 19.98 nmol/mg that was higher than that in *C. idellus* and *L. haematocheila* ( $P<0.05$ ). In conclusion, the muscle of *L. haematocheila* had strong antioxidant capability, and this characteristic may contribute to the long-term preservation and food processing quality.

**Key words** *Ctenopharyngodon idellus*, *Liza haematocheila*, *Centropristis striata*, Nutrient component

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn



# 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)外部性征的分化及发育\*



冯政夫<sup>1</sup> 林晓菲<sup>1</sup> 葛蕾蕾<sup>2</sup> 朱 伟<sup>1①</sup>

(1. 青岛农业大学生命科学学院 青岛 266109; 2. 青岛蔚蓝生物集团有限公司 青岛 266001)

**摘要** 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的性别分化和生殖器官发育是其繁殖生物学的重要部分,也是进行性别调控的基础。经过 2 年的取样观察,研究了中国明对虾雌性纳精囊和雄性交接器的分化与发育过程。结果显示,早在仔虾后 16 d (16 days post-larva, PL16)即开始雌雄分化,此时,雌虾第 4 与第 5 对步足间腹甲处的锥突出现明显下陷,而雄虾的没有下陷。PL54 时,雌虾纳精囊瓣膜出现,然后继续发育,到 PL124 时形成纳精囊锥形;雄虾交接器发育较晚,到 PL54 时,雄虾第 1 泳足的内肢才出现分化,在 PL106 基本形成雄性交接器。

**关键词** 中国明对虾; 性别分化; 发育; 纳精囊; 交接器

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0068-06

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的海水养殖虾类,属广温、广盐性、一年生暖水性大型洄游虾类。在自然海域条件下,成体雄虾体长 15–18 cm,体重为 30–40 g;雌虾体长为 18–23 cm,体重为 60–80 g,是雄虾体重的 1.5 倍。选育成体个头大、生长速度快的雌虾,可有效缩短养殖周期,提高养殖效益。

对虾外部性征主要有雄性交接器和雌性纳精囊,其形态特征的差异成为对虾属的分类特征和雌雄性别鉴定的主要依据(杨筱珍等, 2010)。雌性纳精囊位于第 4 和第 5 对步足基部之间的腹甲上,分为封闭型和开放型。大多数虾类具有封闭型纳精囊,有 1 个或 2 个囊状结构,用以储藏精子,如中国明对虾、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)等属于此类;开放型纳精囊无囊状结构,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属此类。雄性交接器由第 1 泳足的内肢通过钩状刚毛相连而构成,中部向上纵行隆起,呈半管形。

20 世纪 80 年代初,我国学者对中国明对虾雌雄分化的外部形态特征进行了研究。李富花等(2002)发

现,中国明对虾外部性征分化发生在仔虾后第 35 天 (35 days post-larva, PL35)的幼虾,而尹左芬等(1986)在解剖镜下观察到中国明对虾在进入幼虾时(体长为 34 mm)出现了外部性征的分化。Campos-Ramos 等(2006)观察到凡纳滨对虾 PL50 左右(体重为 150 mg,体长为 20 mm)出现了雌雄外部性征的分化,其外部性征的分化主要与生长龄有关,不受其体长、体重的影响。Sagi 等(1990)在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究中也得出相同的结论。

迄今为止,有关中国明对虾外部性征发育过程的研究还很少。为此,本研究借助光学显微镜对中国明对虾幼虾的纳精囊和交接器的发育过程进行观察,为完善中国明对虾繁殖生物学、掌握其繁殖规律进而进行性别调控和单性养殖奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

连续 2 年(2012 年 4 月和 2013 年 4 月)从中国水产科学研究院黄海水产研究所育苗场取回 PL5 幼虾(体长

\* 青岛农业大学高层次人才启动基金(631109)和山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-15-011-10)共同资助。冯政夫, E-mail: zhffeng@163.com

① 通讯作者: 朱 伟, 教授, E-mail: zhuweiqd@163.com

收稿日期: 2015-11-01, 收修改稿日期: 2015-11-30

为 7 mm)。取回的幼虾在 80 L 的玻璃缸循环水系统中充气培养,海水温度为 22–28℃,每天换水 1/3。饲养前期以投喂卤虫(*Artemia* sp.)无节幼体和虾片为主,每日投喂 4 次;虾片过 120 目筛后投喂。饲养后期投喂人工配合饲料。中国明对虾成体于 2012 年 12 月和 2013 年 1 月购于山东省青岛市城阳新宜家海鲜市场,用于成体外生殖器结构的观察。

PL7–PL56, 每 2 d 随机取 30 尾幼虾; PL58–PL124, 每 6 d 随机取 20 尾幼虾并测量体长。将活虾放入含有饱和  $MgSO_4$  的海水中麻醉后,放入 Bouin's 液(苦味酸饱和液:福尔马林:冰醋酸=15:5:1)中固定 16–24 h 后,转入 70%的乙醇中(4℃)保存备用,用于外生殖器结构观察。

## 1.2 观察及制片方法

将 Bouin's 液固定后的幼虾在系列乙醇中逐级复水。将复水后的幼虾附肢伸展,腹面向上放到干净的载玻片上,用解剖针将两侧的步足、泳足和尾肢固定,在显微镜下观察第 4 和第 5 对步足之间腹甲上的锥突形态变化和第 1 泳足内肢的发育过程。每次随机取 PL7–PL30 幼虾 30 尾,取 PL32–PL124 幼虾 20 尾,在 Olympus 显微镜下观察并拍照。

## 2 结果

雌性纳精囊和雄性交接器是中国明对虾的主要外生殖器,它们的形态和着生部位有很大的不同,是性别鉴定的主要依据。

### 2.1 雌性纳精囊的发育

中国明对虾雌性纳精囊是贮存精荚的器官,由第 4 和第 5 对步足之间腹甲的锥突下陷形成囊腔,第 5 对步足基部的前缘特化为 2 个半圆形甲壳质瓣膜覆盖囊腔,形成封闭式纳精囊,第 4 对步足基部的后缘演变为“山”字形突起,斜插在囊腔内,有固定精荚的作用(图 1)。

**2.1.1 前后锥突开始发育** PL15 (平均体长为 11.3 mm)幼虾,第 4 与第 5 对步足基部的腹甲上有 2 个锥形突起,位于第 4 对步足腹甲上的锥突(前锥突)比第 5 对步足的(后锥突)略显钝圆和宽大,个体间锥突形状未观察到明显差异(图 1-A)。

**2.1.2 雌性纳精囊的出现** PL16 (平均体长为 11.5 mm)幼虾,雌性与雄性的第 4 与第 5 对步足腹甲间的锥突形态出现分化。雌虾的前锥突和后锥突出现不同程度的下陷,基部着生面积进一步加大(图 1-B)。此时,雄虾的前、后锥突形状相似,没有明显的形态改变和下陷(图 1-A)。随着幼虾发育,雌性幼虾的前锥突与后锥突继续下陷,锥突顶端逐渐变钝,基部面积继

续增大,PL38 雌虾的前锥突顶端面积与基部的近乎相等(图 1-C)。

**2.1.3 雌性纳精囊的生长** PL54 雌性幼虾(平均体长为 51.1 mm)的第 4 与第 5 对步足之间腹甲面积继续变宽,第 4 对步足基部的后缘和第 5 对步足基部前缘分别发育为一个三角形瓣膜(前瓣膜和后瓣膜),前瓣膜的左右甲壳质瓣膜连接在一起,后瓣膜的左右甲壳质瓣膜相互分离;后锥突基部着生面积加大,锥突顶部面积进一步减少,下陷明显(图 1-D)。此时,雄虾第 4 与第 5 对步足之间腹甲上锥突的着生面积也增大,但锥突的形状与 PL15 幼虾相比没有明显变化(图 2-A)。随着幼虾的发育,雌虾的后锥突下陷明显,前瓣膜继续生长并向后延伸,后瓣膜继续向前生长并向中央靠近(图 1-E)。

**2.1.4 纳精囊的形成** PL86 雌虾(平均体长为 82.2 mm)纳精囊的后瓣膜继续向前生长,并逐渐向中央靠近,前瓣膜后缘中央凹陷明显(图 1-F)。PL112 雌虾(平均体长为 91.6 mm)后瓣膜的前缘已延伸至第 4 对步足基部,后瓣膜的左右甲壳质瓣膜继续向中央靠近;前瓣膜的前缘下陷明显,后缘形成的“山”字形突起更为明显并向上微微翘起,在以后的发育中逐渐下陷并斜插在纳精囊的囊腔内(图 1-G)。PL124 雌虾(平均体长为 97.7 mm)前瓣膜后缘的 3 个舌状突起更加明显,后瓣膜继续生长并向中央靠近,已覆盖第 5 对步足之间腹甲的 1/2,逐渐形成封闭式纳精囊。此外,在纳精囊的发育过程中,没有观察到囊腔内部有分隔膜的出现,推测其为单囊腔的纳精囊(图 1-H)。成体雌虾(平均体长为 123.5 mm)的纳精囊呈圆盘状,中央有一个纵向开口,左右两侧对称,开口的两边外缘稍突起,有如唇状闭合,内部为一个空囊,囊腔的前端有 3 个舌状小突起,斜插在囊腔内,有固定精荚的作用(图 1-I)。在整个发育过程中,雄虾的腹甲面积随着发育进行而增大,但前锥突和后锥突的形态以及腹甲形状与 PL15 幼虾的相比没有明显变化(图 1-A,图 2-C)。

### 2.2 雄性交接器的发育

中国明对虾雄性交接器是由第 1 泳足的内肢特化而来。雄虾的第 1 对泳足内肢分别发育为“靴”状结构的生殖肢,左右生殖肢的内缘着生浓密的、呈带状分布的钩状刚毛,巧妙地将左右生殖肢联合在一起形成完整的雄虾交接器(图 2)。对虾交配时,精荚从第 5 对步足基部内侧的裂缝状生殖孔排出,交接器将充满精子的精荚运送到雌性纳精囊中,履行繁育后代的任务。

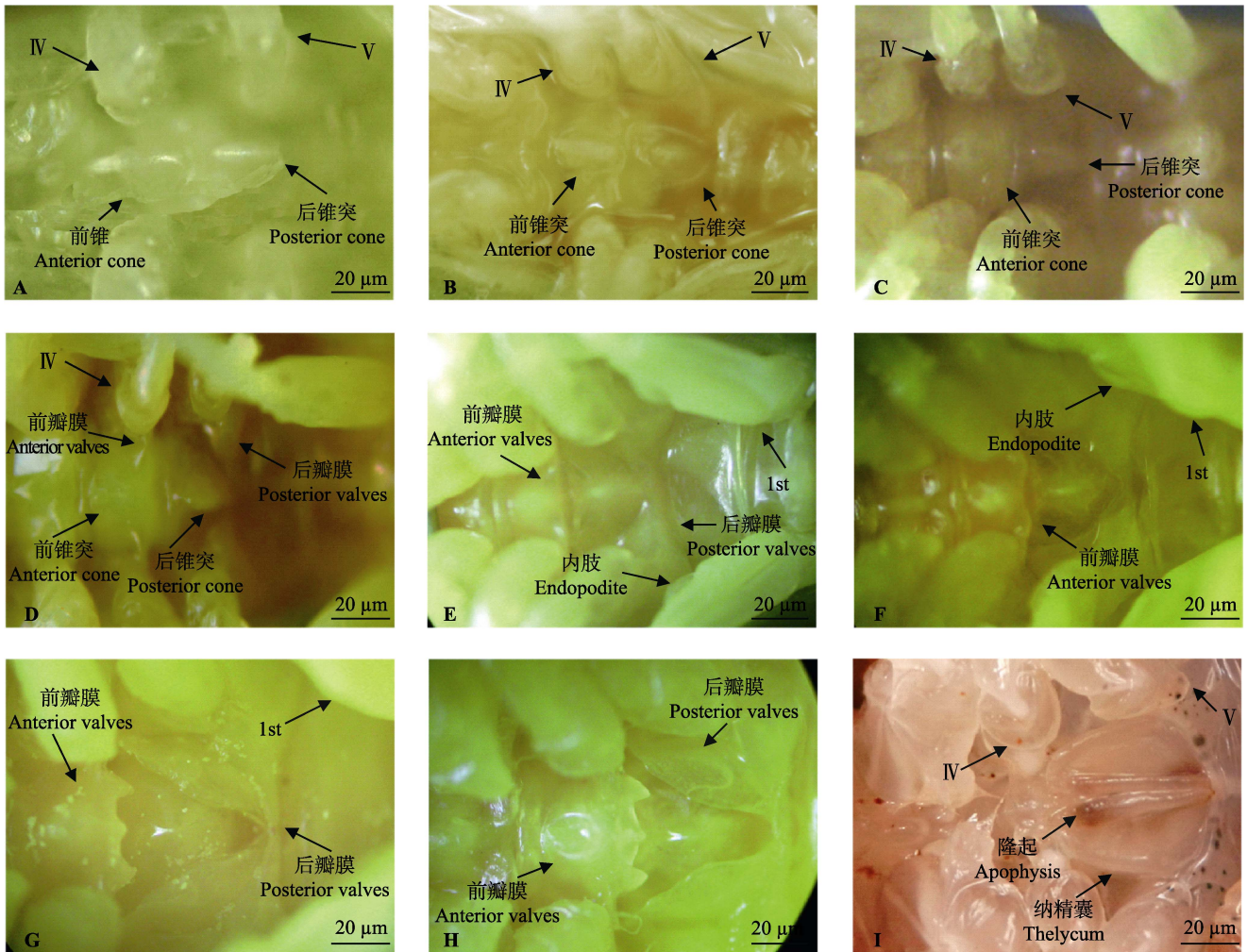


图 1 中国明对虾雌虾纳精囊发育

Fig.1 Thelycum development of female *F. chinensis*

A: PL15 幼虾(锥突形状未分化); B: PL16 雌虾(锥突下陷); C: PL38 雌虾; D: PL54 雌虾(前、后瓣膜出现); E: PL74 雌虾; F: PL86 雌虾(前瓣膜后缘凹陷); G: PL112 雌虾(“山”字形突起形成); H: PL124 雌虾(“山”字形突起后缘下陷); I: 成体雌虾; IV: 第 4 步足; V: 第 5 步足; 1st: 第 1 泳足

A: Juvenile shrimp at 15 days post-larva (conuli has not developed); B: Female shrimp at 16 days post-larva (sunken conuli); C: Female shrimp at 38 days post-larva; D: Female shrimp at 54 days post-larva (anterior and posterior valves appeared); E: Female shrimp at 74 days post-larva; F: Female shrimp at 86 days post-larva (sunken posterior margin of anterior valves); G: Female shrimp at 112 days post-larva (“ε” shaped anterior valve appeared); H: Female shrimp at 124 days post-larva (sunken posterior margin of “ε” shaped anterior valves); I: Adult female shrimp; IV: the fourth pereopod; V: The fifth pereopod; 1st: The first pleopod

PL45 幼虾(平均体长为 41.4 mm)第 1 对泳足的内肢刚出现,为乳突状,个体间第 1 泳足内肢的形态没有明显差异。随着幼虾的发育,幼虾 PL54 第 1 泳足的内肢形态出现分化。雌性幼虾第 1 泳足内肢顶端锐尖,其第 4 对与第 5 对步足之间腹甲的锥突下陷明显,这是雌虾外生殖器的主要特征。而雄性幼虾的第 1 泳足的内肢顶端钝圆,且第 4 对与第 5 对步足之间腹甲的锥突非常明显,由此可以推断,其第 1 泳足内肢将发育为雄性生殖肢(图 2-A)。

随着幼虾的发育,雄虾交接器逐步形成。PL74

雄虾生殖肢的基部变宽,顶部向外侧伸长并与基部成 90°角(图 2-B)。PL86 雄虾的生殖肢继续生长,顶部明显变宽,出现交接器的雏形(图 2-C),此时,雌虾的第 1 泳足内肢基部没有明显的变宽,仍为柳叶状(图 1-F)。PL106 雄虾的生殖肢表面出现明显的双沟回,沟回前端出现弯曲(图 2-D)。PL124 雄虾的交接器外缘沟回加深,外缘开始翻卷,交接器基本形成(图 2-E)。随着发育进行,雄虾生殖肢联合处出现许多小刚毛,并将左右生殖肢巧妙地联合在一起形成交接器。交接器呈半管形,边缘纵行向上卷曲,前端



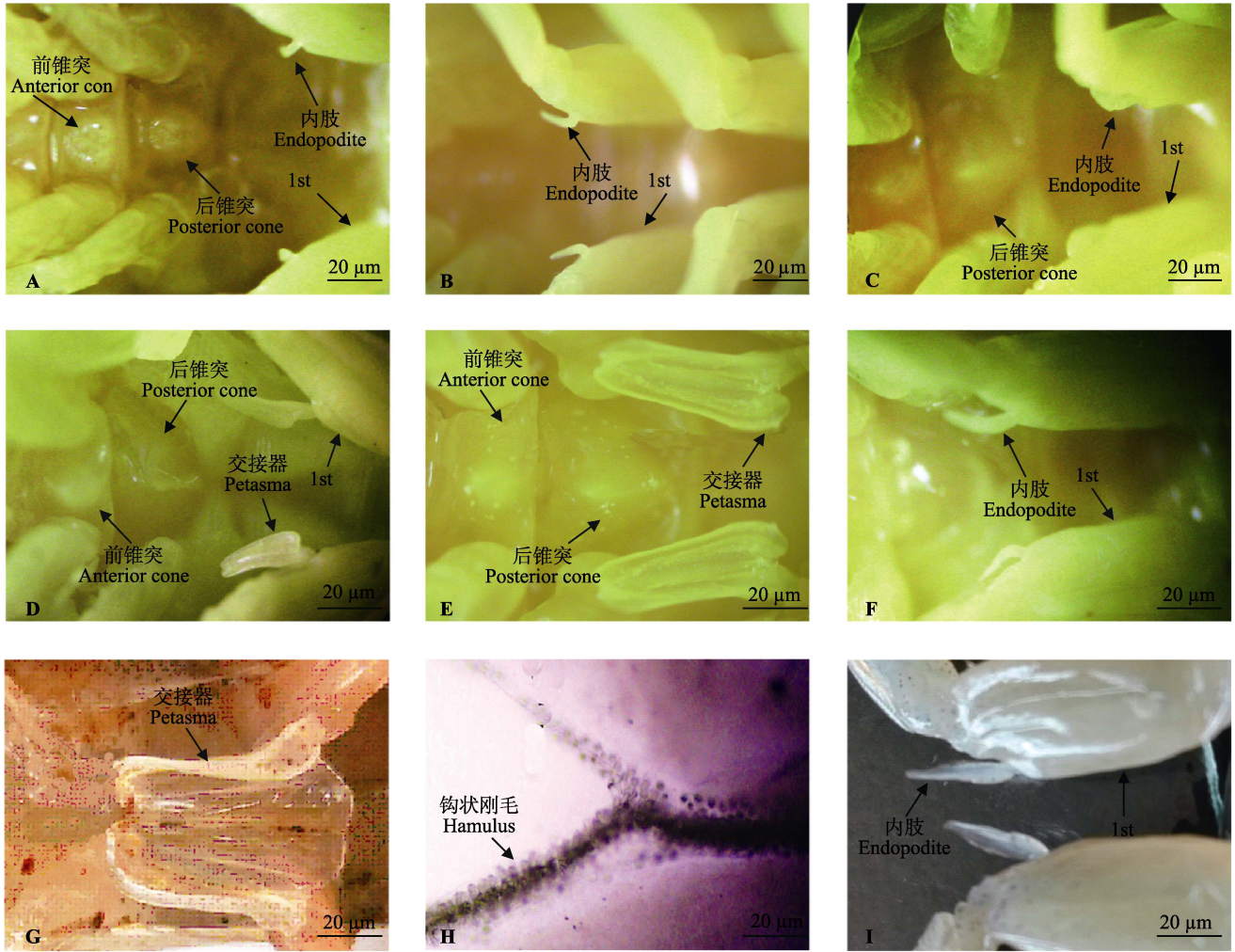


图 2 中国明对虾第 1 泳足内肢的发育  
Fig.2 Development of endopodite of the first pleopod of *F. chinensis*

A: PL54 雄虾(生殖肢基部变宽); B: PL74 雄虾(生殖肢的顶部与基部成 90°); C: PL86 雄虾; D: PL106 雄虾; E: PL124 雄虾; F: PL106 雌虾(对照, 柳叶状的第 1 泳足内肢); G: 成体雄虾(交接器); H: 成体雄虾(交接器钩状毛); I: 成体雌虾(对照, 柳叶状的第 1 泳足内肢); 1st: 第 1 泳足

A: Male shrimp at 54 days post-larva (broadening on the base of endopodite of the first pleopod); B: Male shrimp at 74 days post-larva (the top and base of endopodite of the first pleopod forming an angle of ninety degree); C: Male shrimp at 86 days post-larva; D: Male shrimp at 106 days post-larva; E: Male shrimp at 124 days post-larva; F: Female shrimp at 106 days post-larva (control, willow-leaf shaped endopodite of the first pleopod); G: Petasma of adult male shrimp; H: Adult male shrimp (hamulus of petasma); I: Adult female shrimp (control, willow-leaf shaped endopodite of the first pleopod); 1st: The first pleopod

稍尖(图 2-G)。生殖肢边缘的刚毛带状分布, 十分浓密, 类似“尼龙拉链”。当遇到左右方向的外力时, 可将联合在一起的生殖肢上的小钩相互脱钩, 当将它们重新相互靠拢时, 小钩可借助自身弹性重新嵌合(图 2-H)。在幼虾发育过程中, 雌虾第 1 泳足内肢也在不断生长, 前端锐尖, 形状仍为柳叶状(图 2-F, 图 2-I)。

### 3 讨论

大多数十足目(Decapoda)雄性动物的第 1 泳足的

内肢都会发生特化, 雌雄在其形状、大小和刚毛着生等方面存在明显差异, 这些特征是十足目种属鉴别的主要依据。粗糙沼虾(*Macrobrachium superbum*), 秀丽白虾(*Macrobrachium asperulum*)和中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)的雄虾第 1 泳足内肢较长, 前缘钝圆, 中间微凹; 其雌虾第 1 泳足内肢比雄的短, 细长, 前缘锐尖(谈奇坤等, 1984)。中华锯齿米虾(*Neocaridina denticulata sinensis*)雄虾第 1 泳足内肢呈叶状, 卵圆形, 无刚毛; 雌虾第 1 泳足内肢呈尖叶状, 微微弯曲(甄胜涛等, 2012)。中国明对虾雄虾第 1 泳

足内肢基部粗壮,顶部片状,向上卷曲,表面有沟槽,边缘有刚毛,左右生殖肢联合形成筒状交接器;雌虾第 1 泳足内肢狭长,前端锐尖,似柳叶状。

观察显示中国明对虾外部性征的发育主要与其生长龄有关,这与沼虾(Sagi *et al*, 1990)和凡纳滨对虾(Campos-Ramos *et al*, 2006)的研究结果一致。幼虾经过多次蜕皮完成其外部性征的分化与发育。在适宜对虾生长的环境条件下,同龄对虾个体间的外部性征分化时间基本相同,不受其体长和体重的影响。当养殖环境条件不适宜对虾生长时,其外部性征分化时间将向后拖延,但个体间没有明显差异。中国明对虾 PL16 幼虾的纳精囊形成部位腹甲上的锥突形态出现了分化,随着发育的进行,PL54 雌虾出现了甲壳质前瓣膜和后瓣膜,PL112 雌虾的前瓣膜后缘形成 3 个舌状突起。本研究观察到的雌雄外生殖器出现分化的时间比前人的研究有所提前。如李富花等(2002)观察到中国明对虾雌雄外部性征分化发生在 PL35 的幼虾上;凡纳滨对虾的 PL44 雌虾(0.5–0.6 g, 45–50 mm)腹甲的形状发生明显变化(Garza-Torres *et al*, 2009);日本对虾(*Penaeus japonicus*)的雌雄外部性征分化发生在仔虾后的第 2 个月(Charniaux-Cotton *et al*, 1985; Nakamura *et al*, 1992)。中国明对虾雄性外部性征主要出现在第 4 与第 5 对步足间腹甲上锥突形态、腹甲形状和第 1 泳足内肢形态。PL16 雄虾腹甲上的锥突形态与雌虾明显不同,在整个发育中,雄虾腹甲上的锥突形态和腹甲形状变化不明显。中国明对虾 PL54 幼虾的第 1 泳足内肢出现分化,与雌虾相比,雄性幼虾第 1 泳足内肢的顶端钝圆,然后渐渐变宽,最终发育为“靴”状的生殖肢。凡纳滨对虾和日本对虾的 PL50 幼虾,其第 1 泳足内肢开始出现形态分化,PL70 雄虾的交接器锥形形成(Garza-Torres *et al*, 2009; Campos-Ramos *et al*, 2006; Nakamura *et al*, 1992)。

对虾具有开放型和封闭型两种纳精囊,其发育过程中的形态变化也迥然不同。凡纳滨对虾为开放型纳精囊,发育初期雌虾腹甲的形状变化明显,发育后期,第 4 与第 5 对步足之间腹甲的形态变化不大(Garza-Torres *et al*, 2009)。中国明对虾纳精囊为单一囊腔的封闭型纳精囊。对虾交配后,纳精囊外观饱满,向外

突出(王清印等, 1998)。其纳精囊形成部位腹甲上的锥突下陷形成囊腔,第 4 和第 5 对步足基部出现了甲壳质前瓣膜和后瓣膜。前瓣膜后缘形成 3 个舌状突起,前缘下陷,斜插在囊腔内起固定精荚的作用,后瓣膜生长覆盖在囊腔的外面形成封闭型纳精囊,这些结论与吴长功等(1999)的结论一致。

## 参 考 文 献

- 王清印, 李健, 孙修涛, 等. 中国对虾雄对虾交配能力和精荚再生的研究. 海洋与湖沼, 1998, 29(1): 22–28
- 尹左芬, 宋微波, 马琳, 等. 对虾(*Penaeus orientalis*)外生殖器官的发育与分化. 海洋湖沼通报, 1986(4): 56–61
- 李富花, 相建海. 中国对虾早期性别分化研究. 海洋科学集刊, 2002, 44: 101–105
- 杨筱珍, 杨丽丽, 杨丽娜, 等. 日本新糠虾雄性生殖系统发育的组织学研究. 中国水产科学, 2010, 17(5): 941–945
- 吴长功, 周令华, 相建海, 等. 鹰爪虾与中国对虾雌虾纳精囊的形态结构. 水产学报, 1999, 23(3): 223–228
- 谈奇坤, 董秀英, 蒋玉玲. 长江中下游地区四种习见的淡水虾第二性征研究. 安徽师大学报(自然科学版), 1984(1): 39–44
- 甄胜涛, 穆淑梅, 刘涛, 等. 中华锯齿米虾内外性征分化时间与特征. 淡水渔业, 2012, 42(2): 72–75
- Campos-Ramos R, Garza-Torres R, Guerrero-Tortolero DA, *et al*. Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac Res, 2006, 37(15): 1583–1593
- Charniaux-Cotton H, Payen G. Sexual differentiation. In: Bliss DE, Mantel LH (eds). The biology of crustacea, integuments, pigments, and hormonal processes. New York: Academic Press, 1985, 9: 217–299
- Garza-Torres R, Campos-Ramos R, Maeda-Martinez AM, *et al*. Organogenesis and subsequent development of the genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture, 2009, 296: 136–142
- Nakamura K, Matsuzaki N, Yonekura KI. Organogenesis of genital organs and androgenic gland in the kuruma prawn. Nippon Suisan Gakk, 1992, 58(12): 2261–2267
- Sagi A, Cohen D, Milner Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Gen Comp Endocrinol, 1990, 77(1): 15–22

(编辑 马瑾艳)



## Differentiation and Development of External Sex Characteristics of Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

FENG Zhengfu<sup>1</sup>, LIN Xiaofei<sup>1</sup>, GE Leilei<sup>2</sup>, ZHU Wei<sup>1</sup>①

(1. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109;

2. Qingdao Vland Biotech Group Co., Ltd., Qingdao 266001)

**Abstract** *Fenneropenaeus chinensis* is one of the prominent aquaculture shrimp species in China. To better understand its reproductive biology, here we investigated the sexual differentiation and development of the shrimp. The morphological changes of the female thelycum and the male petasma were observed. The larvae of *F. chinensis* collected from Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI) in Aprils of 2012 and 2013 were cultured in a circulating water system. The adult *F. chinensis* were purchased from aquatic produce market. The samples were fixed in Bouin's solution for 16–24 h after being anesthetized with seawater saturated with Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then stored in 70% ethanol at 4°C for observation of external sexual development. The images were taken by Olympus CX22 LEDRFS1 microscope. It was found that the sexual differentiation of female shrimp started at 16 days post-larva (PL16). A subsidence appeared in the conuli on the ventral plate between the fourth and fifth pairs of pereopods in female shrimp, but no subsidence in the conuli was found in male shrimp. The valves that were components of thelycum appeared at the base of the fourth (anterior valve) and fifth pairs of pereopods (posterior valve) at PL54. At PL112, the form of anterior valve appeared to be similar to “epsilon type”. At PL124, the thelycum began to develop. Compared to the development of thelycum, the growth of petasma of male shrimps was late. The initial differentiation of endopodite on the first pair of pleopods was found at PL54, indicating the formation of male external genitalia. At PL106, petasma appeared to be similar to that of adults. The cannellure became obvious and periphery up folded, but the endopodite on the first pair of pleopods in female remained a willow-leaf shape.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Sexual differentiation; Development; Thelycum; Petasma

① Corresponding author: ZHU Wei, E-mail: zhuweiqd@163.com

# 分段养殖模式在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖过程中的应用\*

李俊伟<sup>1</sup> 颀晓勇<sup>1</sup> 郭永坚<sup>1</sup> 朱长波<sup>1①</sup>  
常 华<sup>2</sup> 王豪杰<sup>2</sup> 陈素文<sup>1</sup>



(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;  
2. 海大集团股份有限公司 广州 511400)

**摘要** 通过测定凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长性能和监测池塘水质变化,研究分段养殖模式在对虾养殖过程中的应用价值。养殖实验在 6 口池塘内(0.267 hm<sup>2</sup>/口)进行,首先在其中 2 口池塘内进行对虾的中间培育,养殖密度为 300×10<sup>4</sup>尾/hm<sup>2</sup>。经过 36 d 和 48 d 的中间培育后,将对虾先后转移到其他 4 口池塘内,养殖密度为 60×10<sup>4</sup>尾/hm<sup>2</sup>,分别记为 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组。剩余的对虾继续养殖在中间培育池塘内,记为 C 组。结果显示,经过分段养殖的 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组对虾,在分池养殖阶段 7 d 内,生长速度均明显增加,其特定生长率(SGR)分别达到 9.36 %/d 和 6.76 %/d;养殖期间,T<sub>1</sub> 组具有最大的 SGR (9.36 %/d)和饲料投喂量,然而其饲料系数(FCR) (1.053)高于 T<sub>2</sub> 组(0.822);经过分段养殖的对虾 FCR 均低于 C 组(1.082)。在分池养殖阶段的大部分时间,T<sub>2</sub> 组对虾的 SGR 高于 T<sub>1</sub> 组;C 组 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 Chl-*a* 浓度低于 T<sub>1</sub> 组和 T<sub>2</sub> 组,而颗粒物含量(TPM)和总磷(TP)高于 T<sub>1</sub> 组和 T<sub>2</sub> 组;T<sub>2</sub> 组 Chl-*a* 含量明显高于 T<sub>1</sub> 组和 C 组。结果显示,经过 48 d 中间培育后,即对虾体重约为 2 g 时进行分池养殖仍可保证对虾在较长时间内保持较大的生长速度,对于饲料的节约具有重要意义。由于分池养殖阶段具有较多的饲料投喂,经过 36 d 中间培育后的对虾具有最大产量。分池养殖池塘内饲料投喂少于全期养殖,有利于养殖系统的稳定,然而单位时间内投喂量增加则会影响水质。分段养殖模式在提高分池养殖阶段对虾的生长速度和保持水质稳定方面具有重要的应用价值。

**关键词** 凡纳滨对虾;生长性能;分段养殖;中间培育阶段;分池养殖阶段

**中图分类号** Q967.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0074-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的对虾养殖品种之一,2014 年其淡水养殖和海水养殖总产量接近 158 万 t,占国内对虾类总产量的 53.9% (渔业统计年鉴,2015)。近年来,凡纳滨对虾养殖规模不断扩大,但是平均产量和养殖成功率仍处于较低水平,主要体现在对虾养殖早期的排塘率较高和养殖后期水质不稳定,成为对虾养殖产业的主要风险来

源。由于幼虾摄食和活动能力较弱,在养殖过程中先将幼虾集中于池塘内进行中间培育(标粗培育),待其摄食和活动能力提高后,再将其分池以降低密度进行养殖,即为分段养殖模式(李金亮等,2010;李卓佳,2012)。分段养殖模式有利于集中管理对虾的早期养殖阶段,有利于提高成活率(麦贤杰等,2009a);可以缩短养殖周期,有效地增加养殖频次,从而提高养殖

\* 广东省海洋渔业科技推广项目(B201500B04; B201601-01)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所) (2014ZD01; 2013ZD01)和广东省省级科技计划项目(2013B090500081; 2013B040500020)共同资助。李俊伟, E-mail: lijunwei303@163.com

① 通讯作者: 朱长波, 副研究员, E-mail: changbo@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2015-08-18, 收修改稿日期: 2015-11-09

效益(麦贤杰等, 2009a; 李金亮等, 2010)。同时, 经过中间培育阶段后, 分养池塘中的残饵、粪便等有机质积累减少, 有利于后期池塘水质的稳定。然而, 目前有关分段养殖模式对于对虾生长和池塘水质影响的研究鲜有报道(曾祥高等, 2006; 李金亮等, 2010)。

本研究在土塘开展凡纳滨对虾的养殖, 通过监测早期中间培育阶段(标粗阶段)和分池养殖阶段凡纳滨对虾的生长速率和水质指标, 研究分段养殖模式在凡纳滨对虾养殖过程中的作用和影响, 在当前对虾养殖生产风险巨大的背景下, 可为凡纳滨对虾养殖管理和养殖模式的改进提供具有重要应用价值的参考数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

养殖实验所用池塘位于广州市番禺海鸥岛养殖场, 共 6 口池塘, 每口水面积为 0.267 hm<sup>2</sup>。凡纳滨对虾购自广东省海兴农海洋生物科技有限公司, 其平均规格为(0.94±0.12) cm (31 日龄; 体重约为 0.01 g)。采用其中 2 口池塘进行对虾的中间培育, 养殖密度为 300×10<sup>4</sup> 尾/hm<sup>2</sup>。

### 1.2 实验设计

养殖实验分为中间培育阶段和分池养殖阶段, 实验时间共 83 d。在中间培育阶段第 36 天时, 采用网捕方式将第 1 批对虾转移到 1 号、2 号养成池塘中, 此时, 对虾规格为(1.12±0.13) g, 记为 T<sub>1</sub> 组。在中间培育第 48 天时, 将第 2 批对虾转移到 3 号、4 号养成池塘中, 此时对虾规格为(2.13±0.25) g, 记为 T<sub>2</sub> 组。T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 两个处理组池塘中的对虾放养密度均为 60×10<sup>4</sup> 尾/hm<sup>2</sup>。从初始至结束一直处于中间培育池塘中的对虾为 C 组, 其养殖密度由 300×10<sup>4</sup> 尾/hm<sup>2</sup> 减少到 124×10<sup>4</sup> 尾/hm<sup>2</sup>。

### 1.3 日常管理

养殖期间, 池塘水体中溶解氧、温度和 pH 采用 YSI 进行现场测定; 池塘水体的透明度采用萨式透明度盘测定。中间培育池塘饲料日投喂量按照对虾存塘量的 5% 投喂, 分池养殖阶段按照对虾存塘量的 5%–7% 进行投喂。每天按一定比例将对虾饲料与乳酸杆菌等复合菌液(海贝生物公司)发酵 24 h 后再进行投喂。

### 1.4 测定方法和数据计算

**1.4.1 水质测定和生物测定** 实验期间, 每 7 d 采取水样和生物样品。每个池塘设 3 个取样点, 将 3 个

取样点处的水样进行混合, 所采水样进行氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、亚硝态氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)、叶绿素 *a* (Chl-*a*) 及颗粒物质的测定。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量采用靛酚蓝法测定(雷衍之, 2006), NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量采用重氮-偶氮光度法测定(雷衍之, 2006), Chl-*a* 浓度参照海洋监测规范(2007); 取一定体积的水样过滤到 Whatman 膜上(孔径 0.7 μm, 直径 50 mm), 通过滤膜上的物质重量可得池塘水体中的总颗粒物质质量(TPM)。每 7 d 采集对虾样品, 每口池塘的采捕量为 50 尾, 分别进行体长和体重的测定。

**1.4.2 指标计算** 实验期间, 对虾的存活率(SR)、特定生长率(SGR)、饲料系数(FCR)分别按照以下公式计算:

$$SR (\%) = 100 \times N_2 / N_1$$

$$SGR (\%/d) = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / T$$

$$FCR = F / (W_2 - W_1)$$

体重瞬时生长加速度=(SGR<sub>2</sub>-SGR<sub>1</sub>)/*t* (张乃禹, 1985)

式中, N<sub>1</sub> 和 N<sub>2</sub> 为实验前后各组池塘中对虾的数量; W<sub>1</sub> 和 W<sub>2</sub> 分别为实验初期和末期对虾湿重(g); T 为实验时间(d); F 为实验期间投喂饲料总量(g); SGR<sub>1</sub>、SGR<sub>2</sub> 分别为采样阶段前后的特定生长率, *t* 为采样间隔天数(d)。

**1.4.3 数据统计** 采用 Excel 和 SPSS 17.0 进行数据统计和分析。数据均表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

## 2 结果

### 2.1 实验期间不同阶段内对虾的生长性能

在分池养殖阶段, T<sub>1</sub> 组对虾具有最大的平均重量(均重); T<sub>2</sub> 组对虾均重比同期 T<sub>1</sub> 组较小(图 1-a)。3 个处理组对虾体长表现出与体重相近的变化趋势(图 1-b)。

在中间培育阶段, 对虾的 SGR 均处于较高水平; 随着体重增加, 其 SGR 值表现出降低的趋势。在分池养殖阶段第 1 个采样期内, T<sub>1</sub> 组对虾 SGR 具有明显的增加趋势, 随后降低; T<sub>2</sub> 组对虾 SGR 也明显增加, 但其 SGR 值增加量小于 T<sub>1</sub> 组。在分池养殖阶段的大部分时间内, T<sub>2</sub> 组对虾 SGR 大于 T<sub>1</sub> 组, 且 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组均高于 C 组(图 2-a)。

整个实验期间, 对虾体重瞬时生长加速度曲线最高点出现在养殖第 14 天(45 日龄), 负加速最大绝对值出现在第 23 天(54 日龄)。在对虾进入到池塘环境第 1–14 天和第 23–30 天时, 体重瞬时生长加速度增加明显。此后各处理组对虾表现出加速生长和减速生长相互交替的现象。T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组对虾均在分池养殖阶段的第 1–7 天内, 体重生长加速度高于 C 组(图 2-b)。

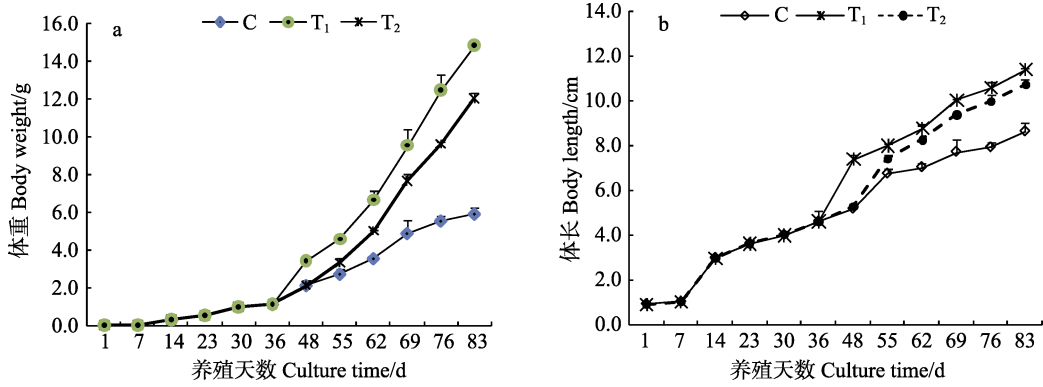


图 1 对虾的体重(a)和体长(b)变化(平均值±标准差)

Fig.1 The variation of body weight (a) and length (b) of shrimp during the experiment (Mean±SD)

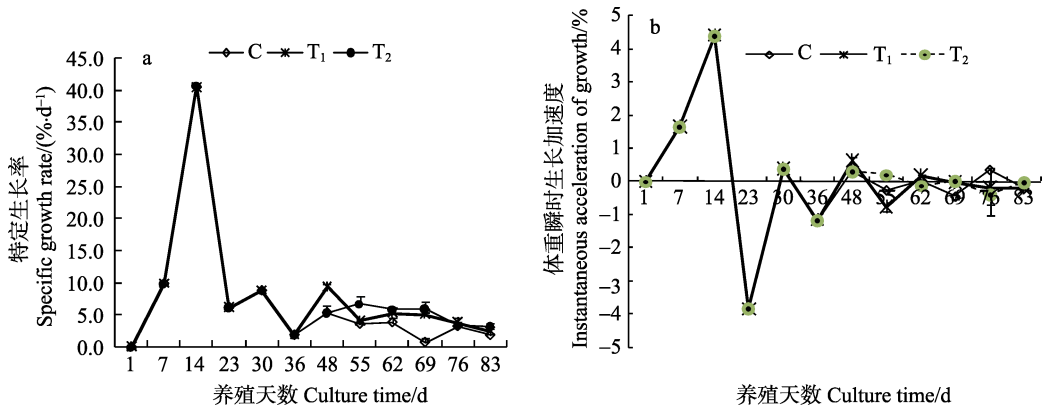


图 2 实验期间不同采样阶段内对虾的特定生长率(a)和瞬时生长加速度(b) (平均值±标准差)

Fig.2 The variation of the SGR (a) and instantaneous growth acceleration (b) during the experiment (Mean±SD)

### 2.2 实验期间对虾的存活和生长

在中间培育阶段，对虾的成活率为 81.25%。在分池养殖阶段，T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 和 C 组对虾的成活率分别为 96%、98%和 86%。实验结束时，T<sub>1</sub> 组对虾增重最明显，其 SGR 为 8.80 %/d，明显高于 C 组；T<sub>2</sub> 与 T<sub>1</sub> 组对虾 SGR 相差较小。整个实验期间，T<sub>2</sub> 组的 FCR 小于 T<sub>1</sub> 和 C 组，且 C 组对虾的 FCR 为最高(表 1)。

表 1 实验期间不同处理组对虾的生长和饲料利用性能

Tab.1 The growth performance and feed utilization of shrimp in different groups during the experiment (Mean±SD)

组别 Groups	初重 Initial weight (g)	末重 Final weight (g)	特定生长率 Specific growth rate (%/d)	饲料系数 Feed conversion ratio
C	0.010±0.001	5.58±0.23	7.62±0.05	1.08±0.03
T <sub>1</sub>	0.010±0.001	14.88±2.69	8.80±0.02	1.05±0.02
T <sub>2</sub>	0.010±0.001	12.06±0.06	8.55±0.01	0.82±0.01

### 2.3 不同阶段各处理组池塘内的饲料投喂量

整个实验期间，随着对虾体重的增加，各处理组

池塘中饲料投喂量逐渐增加。分池养殖阶段，T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组池塘中的饲料投入增加量均高于 C 组。实验结束时，C、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组池塘内的投喂量分别接近 6.11、8.69 和 5.13 t/hm<sup>2</sup>。分池养殖阶段，由于 T<sub>2</sub> 组对虾分池较晚，该组池塘内的饲料投喂量一直低于其他 2 组(图 3)。

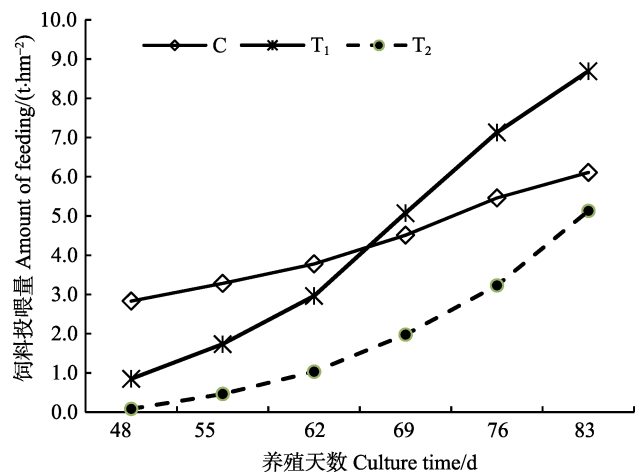


图 3 分池养殖阶段不同采样时间的饲料投喂量

Fig.3 Amounts of feeding in different ponds during the experiment

整个实验期间, T<sub>1</sub> 组的饲料投喂量最大, 而 T<sub>2</sub> 和 C 组投喂量相近; 实验结束时, T<sub>1</sub> 组具有最大的对虾存塘生物量, 明显高于 C 和 T<sub>2</sub> 组, C 组具有最小存塘生物量; C、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组对虾存塘生物量分别为 5045、8571 和 6647 kg/hm<sup>2</sup>(表 2)。

表 2 不同处理组生物量和投喂量分析  
Tab.2 The biomass and economic analysis in different groups

组别 Group	投喂量 Feed (kg/hm <sup>2</sup> )	生物量 Biomass(kg/hm <sup>2</sup> )
C	6111	5045
T <sub>1</sub>	8695	8571
T <sub>2</sub>	5132	6647

## 2.4 实验期间水质变化

整个实验期间, 3 个处理组池塘水体温度变化趋势一致, 其变化范围为 24.5–35.5℃, 盐度为 3–5。C、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组溶解氧变化范围分别为 4.5–11.8、5.28–12.6

和 5.3–11.7 mg/L; pH 变化范围分别为 7.7–8.7、7.9–8.9 和 7.5–9.0。C 组池塘水体透明度在放苗后 7 d 内变化范围为 28.0–71.0 cm, 后期透明度较低, 其变化范围为 7.3–18.5 cm; 而 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组池塘透明度的变化范围分别为 15.9–27.5 cm 和 8.5–25.3 cm。

在中间培育阶段, 池塘水体中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量在中期出现最大值, 随后表现出下降的趋势(图 4-a); 而 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量表现出逐渐增加的趋势, 在养殖第 36 天出现最高值(图 4-b)。分池养殖阶段的大部分时间内, C 组 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量处于较低水平; 在实验后期, T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度高于 C 组, 并且 T<sub>1</sub> 组高于 T<sub>2</sub> 组。在分池养殖阶段, T<sub>1</sub> 组池塘水体具有最大的总氮(TN)浓度; C 组池塘中总磷(TP)浓度明显高于其他 2 组(图 4c–d)。

分池养殖阶段内, C 组池塘水体 TPM 一直处于较高水平(图 5-a), 而该组池塘水体中 Chl-*a* 含量处于较低水平(图 5-b)。T<sub>2</sub> 组池塘水体具有最低的 TPM 含量(图 5-a)和最高的 Chl-*a* 含量(图 5-b)。

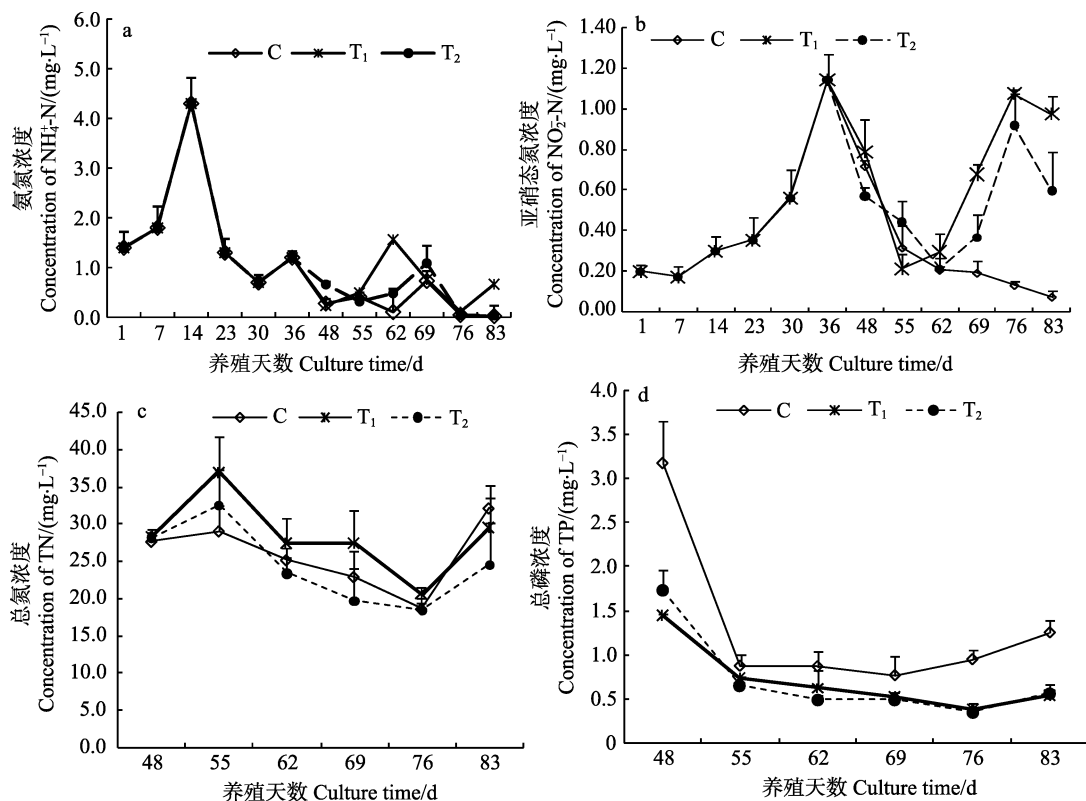


图 4 实验期间不同处理组水体 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N(a)、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N(b)、TN(c) 和 TP(d) 浓度变化(平均值±标准差)

Fig.4 The variation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, TN and TP in the water in different groups during the experiment (Mean±SD)

## 3 讨论

### 3.1 中间培育在对虾养殖过程中的效果

在养殖实践中, 将对虾暂养于水质稳定、饵料充

足和管理良好的养殖水体中, 可以提高对虾的适应能力, 从而提高其成活率(文国樑等, 2007; 麦贤杰等, 2009a)。曾祥高等(2006)研究表明, 凡纳滨对虾经过中间培育后分池养殖可以取得较好的养殖效果。采用



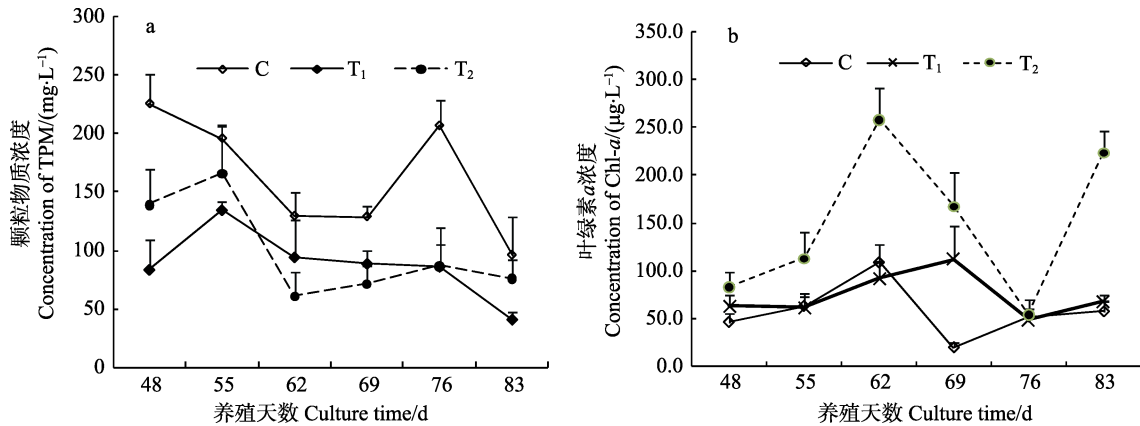


图5 实验期间不同处理组池塘水体中总颗粒物(a)和叶绿素 *a* 浓度(b)变化(平均值±标准差)

Fig.5 The variation of TPM and Chl-*a* in the water in different groups during the experiment (Mean±SD)

中间培育阶段和分池养殖阶段相结合的分段养殖模式, 可以提高对虾的成活率和养殖频次(李金亮等, 2010)。对虾养殖过程中的中间培育阶段一般在 20–30 d (麦贤杰等, 2009b)。该养殖实验的中间培育阶段为 36 d 和 48 d, 两组池塘的对虾成活率均超过 80%, 表明凡纳滨对虾经过较长阶段的中间培育仍然有利于保持较高的成活率。对虾早期对饵料、空间的需求较小, 并且相互捕食能力较弱, 因此可以进行高密度养殖。养殖密度是影响对虾生长的重要因素之一(张许光等, 2013), 密度胁迫会造成对虾生长速度的降低(侯文杰等, 2010; 衣萌萌等, 2012)。由于 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组的对虾进行分池养殖, C 组对虾的养殖密度由  $300 \times 10^4$  尾/hm<sup>2</sup> 降至  $124 \times 10^4$  尾/hm<sup>2</sup>, 其生长性能明显低于 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组, 说明 C 组养殖密度仍高于生长适宜密度。该研究表明, 适宜阶段的中间培育有利于提高早期对虾的成活率, 在对虾生长到一定规格及时进行分池养殖有利于对虾养殖后期的生长和存活。

### 3.2 分池养殖阶段对虾的生长性能

分池养殖阶段, T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组对虾的生长数据表明, 经过中间培育后, 对虾表现出较快的生长速度, 尤其在分池养殖阶段第 1 周内生长加速较为明显(图 2)。该实验分池养殖后对虾的生长速度大于其他研究中沙质池塘和铺膜池塘内高密度养殖的对虾生长性能(李卓佳等, 2005)。在分池养殖阶段, 由于养殖密度、饵料和水质等处于更为适宜的状态, 对虾在中间培育阶段由于空间和食物竞争形成的摄食和生长特性可能在一定程度上促进了对虾补偿生长现象的发生。目前, 有关对虾的补偿生长实验多在实验室内进行, 主要通过食物、营养等限制和再补充的方式引起对虾不同程度的补偿生长现象(吴立新等, 2001; 林小涛等, 2004、2008; 杨其彬等, 2013)。本养殖实验中, 由于对

虾在中间培育池塘中存在空间和饵料的竞争, 对虾对该环境产生了摄食和生理方面的适应, 因此, 获得较优环境后可能出现一定程度的补偿生长现象。分池养殖阶段 T<sub>1</sub> 组在分池后第 1 周内较为明显的生长加速, 而 T<sub>2</sub> 组对虾在养殖后期保持着生长优势(图 2-a), 该结果表明, 经过较长时间的中间培育(48 d), 可能更有利于对虾在后期的生长。本实验中经过中间培育阶段的对虾在 107 日龄时, 平均体重和体长分别接近 13 g 和 11 cm, 其生长速度快于其他研究中的 140 日龄(李玉虎等, 2015), 这可能与对虾经过高密度的中间培育或其他养殖条件有一定关系。

以往研究表明, 中间培育可提高对虾的成活率, 但高密度养殖会造成对虾失去在早期高速生长的时机, 不利于养殖后期对虾规格和产量的提高(张乃禹, 1985)。该研究通过监测对虾的体重和体长生长数据, 发现中间培育阶段的凡纳滨对虾仍然具有较高的生长速度, 且在分池养殖阶段其体重和体长均表现出较大的增长速度。该实验中体长快速生长阶段为 1–14 d 和 36–55 d, 与查广才等(2006)研究中表明的 40–60 d 具有较为接近的范围。本研究中, 经过 48 d 中间培育的对虾在分池养殖阶段内的大部分时间内, 其特定生长率大于 T<sub>1</sub> 组, 表明经过较长阶段的中间培育可能更能够激发对虾在后期的生长速度。

### 3.3 分段养殖的经济效益分析

养殖实验结束时(83 d), T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组对虾体重均生长至商品规格。同时, C、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组池塘内的饲料投喂量分别为 6111、8695 和 5132 kg/hm<sup>2</sup> (图 3), 各组池塘中的对虾生物量分别为 5045、8571 和 6647 kg/hm<sup>2</sup>。T<sub>2</sub> 组对虾具有最低的饲料系数(表 1), 表明经过 48 d 中间培育的对虾具有最高的饲料利用率, 对于节省饲料成本具有重要意义。通过经济效益分析, 由于养殖

产量的增加带来的收益高于养殖成本, T<sub>1</sub> 组具有最大的平均生物量, 与 C、T<sub>2</sub> 组相比, 分别具有 70650 和 38475 元/hm<sup>2</sup> 的增收效益(按 40 元/kg)。因此, 经过 36 d 中间培育后饲料投喂量较大的处理组具有最大净收益(表 2)。

### 3.4 分池养殖阶段池塘水质的变化

由于经过中间培育阶段, 分池养殖阶段的池塘内残饵和排泄物质积累量减少, 有利于养殖水体的稳定。在分池养殖阶段, C 组池塘水体中 TPM 含量高于 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组, 而 Chl-*a* 含量低于 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组(图 4-a, b), 原因可能是对虾生物量较大, 并且其生物扰动效应明显(Zhong *et al.*, 2015), 可能在一定程度上促进了底质表层颗粒物质的上浮, 导致水体透明度降低, 从而限制了水体中浮游植物的生长。

实验后期, C 组 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量低于 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组(图 3), 且 T<sub>1</sub> 组最高, 这与池塘单位时间内饲料投喂量具有一定关系。实验结束时, C、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 组池塘中日平均饲料投喂量分别为 73.5、184.95 和 146.55 kg/d·hm<sup>2</sup>, 该数据也表明池塘单位时间内投喂量增加会造成养殖系统内反硝化速率一定程度的升高(张立通等, 2011)。一般情况下, 磷是凡纳滨对虾池塘内初级生产力的限制性因子(江敏等, 2010; 韦璐等, 2012), 本实验也表明, 养殖后期水体中 TP 含量具有下降趋势, 并且 Chl-*a* 含量也表现出随 TP 浓度下降而在一定阶段内降低的现象, 表明对虾养殖池塘中后期可利用磷的补充可能会有利于维持池塘内生态系统的稳定。

实际养殖过程中, 由于养殖后期大幅度增加饲料投喂量, 从而导致养殖水体中有机碳的积累以及氮、磷元素的不平衡, 易造成养殖系统的不稳定, 而影响收获时间和产量, 因此, 有关养殖后期饲料投喂量对池塘水质和氮、磷元素影响的定量研究还需要进一步深入开展。

## 4 结论

与经过 36 d 中间培育阶段的对虾相比, 经过 48 d 中间培育的对虾更易在分池养殖阶段维持较长时间的快速生长, 即在对虾约 2 g 时再进行分池养殖仍可以保证对虾较大的生长速率。经过 48 d 中间培育阶段, 由于投喂量减少, 养殖后期 T<sub>2</sub> 组具有较优的水质指标。本研究中, 分池养殖阶段的养殖密度为 60×10<sup>4</sup> 尾/hm<sup>2</sup>, 对虾生长和池塘水质均具有较优表现。因此, 在养殖过程中适度延长中间培育阶段再分

池养殖, 可以提高对虾的生长性能和水质稳定。然而, 分池养殖阶段更加适宜的养殖密度、投饵量等仍需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- 韦璐, 江敏, 余根鼎, 等. 凡纳滨对虾养殖塘叶绿素 *a* 与水质因子主成分多元线性回归分析. 中国水产科学, 2012, 19(4): 620-625
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB12763.6-2007 海洋监测规范. 北京: 中国标准出版社, 2008, 3-10
- 文国樑, 曹煜成, 李卓佳, 等. 广东汕尾 1 年 3 茬池塘凡纳滨对虾健康养殖技术. 浙江海洋学院学报, 2007, 26(2): 173-178
- 衣萌萌, 于赫男, 林小涛, 等. 密度胁迫下凡纳滨对虾的行为与生理变化. 暨南大学学报, 2012, 33(1): 81-86
- 江敏, 余根鼎, 戴习林, 等. 凡纳滨对虾养殖塘叶绿素 *a* 与水质因子的多元回归分析. 水产学报, 2010, 34(11): 1712-1718.
- 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2014
- 麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 对虾健康养殖学. 北京: 海洋出版社, 2009a, 265
- 麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 对虾健康养殖学. 北京: 海洋出版社, 2009b, 276
- 李玉虎, 宋芹芹, 张志怀, 等. 凡纳滨对虾生长发育规律及生长曲线拟合研究. 南方水产科学, 2015, 11(1): 89-95
- 李卓佳, 曹煜成, 文国樑, 等. 集约式养殖凡纳滨对虾体长与体重的关系. 热带海洋学报, 2005, 24(6): 67-71
- 李卓佳. 南美白对虾高效生态养殖新技术. 北京: 海洋出版社, 2012, 84
- 李金亮, 陈雪芬, 赖秋明, 等. 凡纳滨对虾高位池养殖氮、磷收支研究及养殖效果分析. 南方水产, 2010, 6(5): 13-20
- 杨其彬, 姜松, 黄建华, 等. 斑节对虾的饥饿试验和补偿生长. 南方水产科学, 2013, 9(5): 25-31
- 吴立新, 董双林, 田相利. 中国对虾继饥饿后的补偿生长研究. 生态学报, 2001, 21(3): 452-457
- 张乃禹. 中国对虾生长的数理分析. 海洋科学, 1985, 9(4): 1-6
- 张立通, 孙耀, 陈爱玲, 等. 对虾养殖中后期虾塘沉积物的硝化与反硝化作用. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 67-74
- 张许光, 赵培, 王国成, 等. 不同放苗密度凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 111-119
- 林小涛, 周小壮, 于赫男, 等. 饥饿对南美白对虾生化组成及补偿生长的影响. 水产学报, 2004, 28(1): 47-53
- 林小涛, 潘剑雄, 许忠能, 等. 周期性断食对凡纳滨对虾摄食、生长和排粪的影响. 水生生物学报, 2008, 32(3): 403-407
- 查广才, 周昌清, 黄建荣, 等. 低盐度养殖的凡纳滨对虾体长

- 和体重的增长规律. 水产学报, 2006, 30(4): 489-494
- 侯文杰, 臧维玲, 刘永士, 等. 室内凡纳滨对虾养殖密度对水质与生长的影响. 安徽农业大学学报, 2010, 37(2): 284-289
- 曾祥高, 张东霞, 刘宗理. 南美白对虾虾苗暂养技术. 齐鲁渔业, 2006, 25(7): 40
- 雷衍之. 养殖水环境化学实验. 北京: 中国农业出版社, 2006, 80-85
- Zhong DS, Wang F, Dong SL, *et al.* Impact of *Litopenaeus vannamei* bioturbation on nitrogen dynamics and benthic fluxes at the sediment-water interface in pond aquaculture. *Aquacult Int*, 2015, 23(4): 967-980

(编辑 冯小花)

## Application of Culturing in Stages in the Shrimp Culturing Pond

LI Junwei<sup>1</sup>, XIE Xiaoyong<sup>1</sup>, GUO Yongjian<sup>1</sup>, ZHU Changbo<sup>1①</sup>,  
CHANG Hua<sup>2</sup>, WANG Haojie<sup>2</sup>, CHEN Suwen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;  
2. Haida Group Co., Ltd, Guangzhou 511400)

**Abstract** The effects of culturing in stages on the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* and the water quality were investigated from April to July in 2015. Experiments were conducted in 6 shrimp culturing ponds (2650 m<sup>2</sup>, 53 m × 50 m each). The shrimp was first cultured in 2 ponds with a density of about 300 × 10<sup>4</sup> ind/hm<sup>2</sup> for early cultivation. The subjects were stocked at 3 culturing time points, 36, 48 and 83 days, and were referred to as T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, and C groups respectively. After early cultivation, the shrimp in the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> groups were divided into two ponds with a suitable density (60 × 10<sup>4</sup> ind/hm<sup>2</sup>). The survival rate, the growth of shrimp, and the water quality were evaluated during the experimental period. The growth increment of weight and length during the first week was significantly boosted and the specific growth rate (SGR) for T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> reached 9.36 %/d and 6.36 %/d respectively. The T<sub>1</sub> group showed the highest SGR and food consumption during the experiment, and the feed conversion ratio (FCR) was higher in T<sub>1</sub> (1.053) than in T<sub>2</sub> (0.822). In most of the divided culturing periods, the T<sub>2</sub> group maintained a higher SGR. Compared to the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> groups, the C group had lower concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, a higher level of total particle matter (TPM), and a lower content of Chl-*a*. The T<sub>2</sub> group had the highest Chl-*a* content. These results indicated that the shrimp might achieve rapid growth later if divided into different ponds after a proper cultivation period (48 days). The organic matter accumulation in the pond decreased in the early cultivation, which helped improve the water quality of the pond. However, the water quality may worsen when the feed consumption in the pond reached a certain level in unit time. In conclusion, divided culturing in the different ponds could improve both the growth of shrimp and the water quality.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Growth performance; Culturing in stages; Early-high density culturing; Later-low density culturing

① Corresponding author: ZHU Changbo, E-mail: changbo@scsfri.ac.cn

# 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体与韩国群体杂交子一代的生长和存活比较\*

蔡忠强<sup>1#</sup> 郑言鑫<sup>1#</sup> 任利群<sup>1</sup> 赵春暖<sup>1</sup> 吴彪<sup>2</sup>  
王肖君<sup>3</sup> 于涛<sup>1①</sup> 杨爱国<sup>2</sup> 林建国<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 烟台 265800;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 招远市海洋环境监测站 烟台 265400)

**摘要** 以魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体(C)和韩国群体(K)为材料,进行了4个组合的杂交和自交实验,分析了各实验组的受精率、孵化率、幼虫和稚贝的生长、存活以及杂交子一代的杂种优势。结果显示,4个组的受精率和孵化率均较高(80%以上);自交组的受精率略高于杂交组,但孵化率无显著差异。在幼虫期,KK组和KC组的壳长平均值大于CK组和CC组,但存活率和变态率无显著差异;在稚贝期,KK组和KC组的壳长平均值也均大于CK组和CC组,但CC组和CK组的保苗率比KC组和KK组高。综合分析比较表明,杂交KC组的杂种优势率在幼虫期和稚贝期的壳长生长上均表现为正值,在稚贝期的存活率方面也表现为正值,杂交KC组结合了两群体的部分优良性状,是理想的育种材料。

**关键词** 魁蚶; 杂交; 生长; 存活; 杂种优势

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0081-06

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、大毛蛤、血贝,是一种大型冷水性蚶类,在我国主要分布在黄渤海地区,尤以黄海北部的魁蚶资源集中、品质极佳(刘世禄等,2005)。魁蚶肉质鲜美、营养丰富,经济价值很高,在国际市场特别在日本深受消费者欢迎(王如才等,2008)。但由于国内外市场对魁蚶的大量需求,人们对其捕捞力度过大,导致我国魁蚶资源量大幅减少、种质质量严重下降(吴彪等,2013)。20世纪80年代,我国开始了魁蚶生态习性、繁殖生物学、人工育苗、海上养成等方面的研究,并取得了人工繁育技术的突破(唐启升等,1994;郭学武,1994;王俊,1994),但有关魁蚶种质资源方面的研究较少。目前,

在我国的山东、河北、辽宁等海域,魁蚶笼养技术已获得初步成功(马述法等,1996;王兴林,1997;张丽敏等,2013),且养殖面积逐年增加,对优良品种的需求不断增加,迫切需要进行魁蚶育种的研究。

杂交育种是动植物改良遗传性状、培育优良品种的重要手段之一,在水生生物的品种改良和生产中发挥了重大作用(范兆廷,2005;吴仲庆,2000;谭杰等,2015;范超晶等,2016)。目前,有关海洋贝类杂交的相关研究已有很多报道,如虾夷扇贝(*Patinopecten yesoensis*)(于涛,2011)<sup>1)</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(常亚青等,2002、2006;刘小林等,2003a、b、2005)、海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians*)(郑怀平等,

\* 山东省科技发展计划(2014GHY115031)、烟台市科技发展计划(2014BF147-1)、中国水产科学研究院级基本科研业务费专项资金资助项目(2013A0507)和国家贝类产业技术体系建设专项资金(CARS-48)共同资助。#共同第一作者。蔡忠强, E-mail: cd-zzz@126.com; 郑言鑫, E-mail: zhengyanxin1989@163.com

① 通讯作者: 于涛, 工程师, E-mail: cdyutao@126.com

收稿日期: 2015-09-29, 收修改稿日期: 2015-11-08

1) 于涛. 栉孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)杂种优势遗传机理的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011

2004)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (孔令锋等, 2013)、珠母贝(*Pinctada martensii*、*Pinctada chemnitzii*、*Pinctada maxima*) (姜卫国等, 1983)、皱纹盘鲍(*Haliotis diversicolor*)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) (张国范等, 2002; 蔡明夷等, 2007)等, 表明多数贝类的杂交子一代在生长、存活及生产性能等方面优于其亲本的自繁群体, 目前已有多个研究成果得到大规模的推广养殖, 并且取得了良好的效果。中国魁蚶与韩国魁蚶在外部形态、生长速度及性状的相关性等方面存在差异, 吴彪等(2010)对韩国统营和中国江苏的两个魁蚶群体进行了形态性状对体重的影响等方面的研究, 发现两群体魁蚶各形态性状对体重的影响效果明显不同。梁超等(2010、2011)对1个韩国魁蚶群体和3个中国魁蚶群体的遗传特性及形态差异进行了分析, 发现韩国魁蚶与中国魁蚶遗传距离相对于国内群体之间的遗传距离要大, 预测将这两个群体的魁蚶杂交可能会产生可供利用的杂种优势。

本研究选用魁蚶中国群体和韩国群体进行杂交, 比较不同杂交组与对照组在幼虫期与稚贝期的生长、存活状况, 探究杂交组是否存在杂种优势, 进而为魁蚶的杂交育种的生产实践提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

魁蚶中国群体为山东省长岛县采集的野生群体, 韩国群体为韩国仁川海区野生群体。为保证实验的真实性与可行性, 实验与车间生产同步进行, 采用大水育苗, 每个群体采集1000个野生个体作亲贝, 实验在中国水产科学研究院长岛增殖实验站内进行。

### 1.2 实验设计

设立4个组合, 分别为韩国群体♀×中国群体♂(KC)、韩国群体♀×韩国群体♂(KK)、中国群体♀×韩国群体♂(CK)、中国群体♀×中国群体♂(CC)。实验设2个重复。

### 1.3 室内育苗

选择自然海区3龄、壳长7 cm以上、体格健壮的魁蚶作为亲体促熟, 2~3只/m<sup>3</sup>室内暂养。为保证两个地理群体亲本性腺发育的同步性, 水温6℃以下时, 同时入池升温促熟。正常换水、投饵和倒池, 每天升温1℃, 至21℃恒温待产。投喂小新月菱形藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*), 投喂量为 $2 \times 10^5$ ~ $5 \times 10^5$  cell/ml。自然排放精卵后进行人工授精, 21℃下孵化。

D型幼虫密度培养为10个/ml, 每天换水2次, 换水后投喂叉鞭金藻(*Dicrateria sp.*), 投饵量为 $2 \times 10^4$ ~ $3 \times 10^4$  cell/ml, 每5 d倒池1次。壳长250~270 μm出现黑色眼点时, 投放附着基。

### 1.4 稚贝中间培育

选择条件好的海区保苗, 装苗袋为双层, 内袋30目, 外袋60目, 规格为25 cm×40 cm, 每袋装2万粒左右, 每20袋为单串附坠石, 垂挂于海区的浮纜上, 定期清理网带上淤泥及杂物。壳长达0.5 cm时, 分入20目网袋中, 每袋1000粒。稚贝规格达1 cm时完成海区中间培育。

### 1.5 性状分析、取样及测量

分析的性状包括受精率、孵化率、幼虫期壳长与存活率、稚贝与养成期的壳长和存活率。

受精率(%) = 出现第一极体的卵子/所有卵子×100

孵化率(%) = 孵化出的D形幼虫/受精卵×100

幼虫期存活率(%) = 测量日存活的幼虫/第1天的幼虫×100

变态率(%) = 变态前幼虫数/变态后幼虫数×100

稚贝期最终存活率(%) = 第150天存活的稚贝数/挂入海区的稚贝总数×100

幼虫期, 在第1、5、10、18、22、27、35天取样, 每组每次取50个个体, 用卢戈氏液杀死固定, 在160×的显微镜下用目微尺测量壳长, 并统计存活率。

稚贝和养成期, 在第60、100、125、150天, 各实验组取样50个, 用游标卡尺(精度0.02 mm)测量壳长, 并统计存活率。

### 1.6 数据分析

用Excel对各实验数据进行整理, 采用SPSS 19.0统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及Duncan's多重比较,  $P < 0.05$ 为差异显著, 结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

参照孔令锋等(2013)的计算方法, 计算杂交子一代各性状的杂种优势率( $H$ , Heterosis), 公式为:

$$H(\%) = (F_1 - P) / P \times 100$$

式中,  $F_1$ 为杂交子一代性状的平均值,  $P$ 为两自交组性状的平均值。

## 2 结果

### 2.1 受精率、孵化率的比较

各实验组的受精率、孵化率如表1所示。4个实验组的受精率范围为82.65%~92.17%, 其中, KC组的受精率最低, 为82.65%, KK组的受精率最高, 为



92.17%, 方差分析显示, 自交组和杂交组之间的受精率存在显著差异, 自交组较高, 杂交组较低。4 个实验组的孵化率变化范围为 89.44%–91.32%, 其中, KC 组的孵化率最高, 为 91.32%, CC 组的孵化率最低, 为 89.44%, 方差分析表明, 杂交组和自交组之间的孵化率无显著差异。

### 2.2 幼虫期生长比较

幼虫期各实验组幼虫的壳长和存活率如表 2 所示。幼虫期为从 D 形幼虫 1 d 起到投附着基, KC 组和 KK 组的壳长始终大于 CK 组和 CC 组, 即卵子来源于韩

国群体的幼虫生长较快, 但二者间差异不大。到 35 d 时, KK 组的壳长最大, 达到 571.6 μm, CC 组的壳长最低, 为 498.6 μm。4 个实验组中, CC 组的存活率最高, 为 29.54%, KK 组的存活率最低, 为 27.52%, 但 4 个组之间无显著差异。

幼虫阶段杂交组生长和存活的杂种优势率如表 3 所示。同自交组相比, 杂交组 KC 组在壳长方面具有明显的杂种优势, 并且在幼虫生长阶段, 杂交组 KC 壳长的杂种优势率随着生长有逐渐增加的趋势。CK 组则无明显的杂种优势率, 在存活率和生长方面, 杂种优势不明显。

表 1 各实验组的受精率、孵化率

Tab.1 Comparison of fertilization rate and hatching rate of the four groups (%)

项目 Items	组别 Groups			
	CK	KC	KK	CC
受精率 Fertilization rate	83.56±13.45 <sup>a</sup>	82.65±14.18 <sup>a</sup>	92.17±8.27 <sup>b</sup>	91.84±9.42 <sup>b</sup>
孵化率 Hatching rate	89.66±8.29 <sup>a</sup>	91.32±6.54 <sup>a</sup>	90.81±11.23 <sup>a</sup>	89.44±10.56 <sup>a</sup>

注: 同行数据中的不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

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

表 2 幼虫期各实验组幼虫的壳长和存活率

Tab.2 The shell length and survival rate of the four groups at the larvae stage

项目 Items	CK		KK		KC		CC	
	壳长 Shell length (μm)	存活率 Survival rate (%)	壳长 Shell length (μm)	存活率 Survival rate (%)	壳长 Shell length (μm)	存活率 Survival rate (%)	壳长 Shell length (μm)	存活率 Survival rate (%)
受精卵 Fertilized egg	61.1±1.5 <sup>a</sup>	/	60.8±2.2 <sup>a</sup>	/	61.6±0.5 <sup>a</sup>	/	60.2±1.8 <sup>a</sup>	/
D 形幼虫 D-shaped larva	81.5±2.6 <sup>a</sup>	100	85.4±3.6	100	87.7±2.9	100	82.9±3.5 <sup>a</sup>	100
5 d	102.3±3.5 <sup>a</sup>	96.52±2.14 <sup>a</sup>	103.2±2.8 <sup>a</sup>	95.66±3.66 <sup>a</sup>	114.6±3.9 <sup>b</sup>	95.88±2.11 <sup>a</sup>	101.6±4.1 <sup>a</sup>	95.56±1.39 <sup>a</sup>
10 d	118.6±6.5 <sup>a</sup>	88.63±3.65 <sup>a</sup>	121.3±4.6 <sup>a</sup>	91.32±2.42 <sup>b</sup>	131.3±5.6 <sup>b</sup>	87.56±2.56 <sup>a</sup>	116.3±9.6 <sup>a</sup>	88.27±6.52 <sup>a</sup>
18 d	169.5±11.2 <sup>a</sup>	69.43±2.88 <sup>a</sup>	192.4±8.2 <sup>b</sup>	71.33±3.62 <sup>a</sup>	187.5±8.9 <sup>b</sup>	77.23±3.28 <sup>b</sup>	172.4±12.6 <sup>a</sup>	75.33±3.88 <sup>b</sup>
22 d	251.4±13.5 <sup>a</sup>	58.39±3.54 <sup>a</sup>	256.8±10.6 <sup>a</sup>	58.57±1.99 <sup>a</sup>	281.2±11.2 <sup>b</sup>	61.37±1.65 <sup>a</sup>	243.2±6.9 <sup>c</sup>	54.45±2.91 <sup>a</sup>
27 d	317.2±10.8 <sup>a</sup>	33.86±5.32 <sup>a</sup>	368.5±11.5 <sup>b</sup>	42.71±5.32 <sup>b</sup>	373.3±15.6 <sup>b</sup>	42.48±4.62 <sup>b</sup>	325.5±25.6 <sup>a</sup>	51.36±3.84 <sup>c</sup>
35 d	507.8±22.4 <sup>a</sup>	28.46±2.86 <sup>a</sup>	571.6±14.6 <sup>b</sup>	27.52±4.11 <sup>a</sup>	569.2±23.9 <sup>b</sup>	28.72±3.88 <sup>a</sup>	498.6±31.2 <sup>a</sup>	29.54±2.86 <sup>a</sup>
变态率 Metamorphosis rate (%)	81.25±1.28 <sup>a</sup>		83.36±3.65 <sup>a</sup>		82.14±2.89 <sup>a</sup>		81.86±4.65 <sup>a</sup>	

表 3 幼虫期各杂交组壳长和存活率的杂种优势率

Tab.3 Heterosis in shell length and survival rate of the four groups at the larvae stage (%)

组别 Groups	项目 Items	D 型幼虫 D-shaped larva	5 d	10 d	18 d	22 d	27 d	35 d
CK	壳长 Shell length	-2.99	0.00	-0.42	-7.14	0.60	-8.51	-0.49
	存活率 Survival rate	0.00	1.05	0.57	-9.21	0.87	-29.03	-1.75
KC	壳长 Shell length	4.19	1.96	10.55	2.75	12.63	7.65	16.00
	存活率 Survival rate	0.00	0.00	4.00	-6.58	0.87	-9.68	-5.26

### 2.3 稚贝期生长比较

稚贝期各实验组稚贝的生长如表 4 所示。自下海

暂养到结束暂养, KC 组和 KK 组的壳长始终大于 CK 组和 CC 组, 即卵子来源于韩国群体的稚贝生长比较快, 100 d 时, 各组间壳长差异不显著; 125–150 d,

表 4 稚贝期各实验组稚贝的壳长和最终存活率  
Tab.4 The shell length and final survival rate of the four groups at the spat stage

项目 Items	组别 Groups			
	CK	KC	KK	CC
60 d (mm)	2.5±0.4 <sup>a</sup>	2.6±0.3 <sup>a</sup>	2.2±0.5 <sup>b</sup>	2.0±0.2 <sup>b</sup>
100 d (cm)	1.0±0.3 <sup>a</sup>	1.1±0.3 <sup>a</sup>	0.9±0.2 <sup>a</sup>	0.9±0.2 <sup>a</sup>
125 d (cm)	1.2±0.2 <sup>a</sup>	1.5±0.2 <sup>b</sup>	1.1±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>
150 d (cm)	1.3±0.3 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>b</sup>	1.7±0.4 <sup>a</sup>	1.4±0.3 <sup>a</sup>
最终存活率 Final survival rate (%)	56.56±2.56 <sup>b</sup>	50.37±3.96 <sup>c</sup>	42.19±3.87 <sup>a</sup>	57.76±8.29 <sup>b</sup>

KC 组壳长显著大于其他 3 组；到 150 d, KK 组的壳长最大, 达到 1.7 cm, KC 组的壳长次之, 达到 1.6 cm, CK 组的壳长最低, 为 1.3 cm。4 个实验组中, 在保苗率(即稚贝期最终存活率)方面, CC 组及 CK 组大于 KC 组, 而 KC 组又大于 KK 组, 即卵子来源于长岛群体的稚贝保苗率较高; CC 组的保苗率最高, 为 57.76%, KK

组的保苗率最低, 为 42.19%。

稚贝期杂交组的杂种优势率如表 5 所示, 稚贝期的杂种优势率与幼虫期类似, 与自交组相比, 杂交组 KC 在壳长方面具有明显的杂种优势, 并且在幼虫生长阶段, 杂交组 KC 的壳长杂种优势率随着生长有逐渐增加的趋势, 而 CK 组则无明显的杂种优势率。

表 5 稚贝期各杂交组壳长和最终存活率的杂种优势率  
Tab.5 Heterosis in shell length and final survival of the four groups at the spat stage (%)

天数 Days (d)	CK		KC	
	壳长 Shell length	最终存活 Final survival rate	壳长 Shell length	最终存活率 Final survival rate
60	-14.89	/	10.64	/
100	11.11	/	22.22	/
125	4.35	/	30.43	/
150	-7.14	6.78	14.29	0.25

### 3 讨论

杂交是进行动植物种质改良的重要有效手段之一, 主要是通过杂交使后代获得杂种优势。杂种优势是指杂种子一代在生长力、繁殖力、产量、品质等性状上优于双亲的一种复杂的生物学现象, 且双亲的差异越大, 往往杂种优势越强, 反之, 越弱(孔令锋等, 2013)。本研究采用来自不同区域的中国与韩国两个魁蚶群体, 韩国魁蚶与中国魁蚶不仅在外形上存在差异, 比国内群体之间的遗传距离要大(梁超等, 2010), 利用这两个群体进行杂交可能产生较大的杂种优势。吴彪等(2013)运用 Hoechst 33258 染色、荧光显微观察方法研究了中群体魁蚶和韩群体魁蚶杂交的受精过程及早期胚胎发育过程, 结果发现, 中国魁蚶精子能够进入韩国魁蚶卵子, 可以顺利完成受精过程及早期胚胎发育, 胚胎能够顺利发育至 D 形幼虫, 证明了二者进行杂交的可行性。

本研究 4 个实验组的受精率和孵化率均在 80% 以上, 表明魁蚶中国群体和韩国群体未形成生殖隔

离, 双亲异性配子之间的亲和力高。但自交组的受精率均在 90% 以上, 而杂交组的受精率为 83.56% 和 82.65%, 自交组显著高于杂交组, 表明二者的精卵表面存在一定的差别, 在精卵识别方面有一定的阻隔或困难。

生长速度及存活率是判断贝类种质质量和养殖效果的重要标准之一。韩国魁蚶相对中国魁蚶有两个明显的特点: 一是其贝壳较薄, 出肉率更高; 二是其贝肉更加细腻鲜美, 且在生长速度上有一定的优势(王廷贵, 2012)。中国魁蚶虽然壳厚, 但存活率比韩国群体高。中国魁蚶和韩国魁蚶杂交, 结果显示, 卵子来源于韩国群体的后代, 生长速度比较快, 而 KC 组杂交后代在幼虫期及稚贝期生长均表现出明显的杂种优势, 杂种优势率分别为 16.00% 和 14.29%。在其他水产动物的杂交实验中, 如长牡蛎不同地理群体杂交后代在生长性状表现出一定的杂种优势(孔令锋等, 2013); 不同群体海湾扇贝(墨西哥海湾扇贝 M 和海湾扇贝 C)进行杂交, 结果发现杂交后代在生长速度上表现出明显的杂种优势(Zhang *et al.*, 2007); 海胆杂交组 12 月龄的平均体重也表现出明显的杂种优势

(Rahman *et al*, 2000)。KC 组杂交后代的存活率在幼虫阶段没有明显的优势,在稚贝期表现出了明显的杂种优势,而 CK 组杂交后代在壳长和存活率上均没表现出杂种优势。杂交后代杂种优势的表现受环境和遗传因素的共同影响。在幼虫期,室内培育环境条件是可控的,水质、水温、饵料等因素维持在较适水平,水中敌害生物较少,因此,即使自身的遗传特性存在差异,也不会表现出明显的存活差异。相反,到了稚贝期,海上养殖的环境条件不可控,水质、水温、饵料、敌害等环境因素随着季节不断变化,使得环境条件对魁蚶存活的影响非常大,自身遗传特性表现出来,抗病、抗逆等存活性状好的个体或群体得以存活下来,表现出较高的存活率。

近交暴露了个体的一些隐性有害基因,同时也使群体对环境的敏感性增加,极易造成近交衰退(王好锋等, 2014),而杂种优势是一种对近交衰退的一种有效补偿(马大勇等, 2005)。在我国已经通过杂交获得了许多杂交新品种,特别是鱼类远缘杂交,不仅在杂种优势方面,而且在三倍体、四倍体、雌核发育及雄核发育等方面也取得了显著成果(吴清江等, 1999; 李炎璐等, 2012)。杂交在育种中发挥了重要作用,可使品种基因得到有效充分的利用,充分发挥物种的潜力。

本研究通过对魁蚶群体杂交的受精情况和杂种优势分析,发现魁蚶韩国群体(♀)×中国群体(♂)的杂交子代在生长及存活方面具有明显的杂种优势。因此,这两个群体杂交可能是改良现有养殖群体的有效途径之一。本研究为优良魁蚶苗种的培育、杂交育种和选择育种提供了十分重要的基础资料和理论依据,也为魁蚶种质的改良和新品种培育奠定了重要基础。

## 参 考 文 献

- 马大勇, 胡红浪, 孔杰. 近交及其对水产养殖的影响. 水产学报, 2005, 29(6): 849-856
- 马述法, 柳钟景, 王仁先, 等. 魁蚶筏式养殖技术试验报告. 齐鲁渔业, 1996, 13(6): 8-9
- 王廷贵. 韩国魁蚶育苗新技术. 河北渔业, 2012(5): 27-28
- 王兴林. 魁蚶筏式养殖技术. 中国水产, 1997(3): 31-32
- 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, 362
- 王好锋, 韩晓琳, 段亚飞, 等. 三疣梭子蟹自交与杂交家系子一代生长和存活的比较. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 74-81
- 王俊. 魁蚶食性及摄食季节变化的初步研究. 海洋水产研究, 1994(15): 65-70
- 孔令锋, 滕爽爽, 李琪. 长牡蛎中国群体与日本群体杂交子一代的生长和存活比较. 海洋科学, 2013, 37(8): 78-84
- 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究. I: 中国种群与俄罗斯种群的杂交. 海洋学报, 2003a, 25(1): 93-99
- 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的研究. II: 中国种群和俄罗斯种群及其杂种 F<sub>1</sub> 中期生长发育. 海洋学报, 2005, 27(2): 135-140
- 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的中期生长发育. 水产学报, 2003b, 27(3): 193-199
- 刘世禄, 杨爱国. 中国主要海产贝类健康养殖技术. 北京: 海洋出版社, 2005, 176
- 李炎璐, 陈超, 翟介明, 等. 鱼类杂交育种技术及其在石斑鱼类中的应用. 海洋渔业, 2012, 34(1): 102-109
- 吴仲庆. 水产生物遗传育种学(第三版). 厦门: 厦门大学出版社, 2000
- 吴彪, 于涛, 杨爱国, 等. 不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 64-68
- 吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. 渔业科学进展, 2010, 31(6): 54-59
- 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社, 1999, 73-94
- 张丽敏, 曹春梅. 魁蚶浅海吊笼养殖试验. 河北渔业, 2013(8): 48-50
- 张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F<sub>1</sub> 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484-491
- 范兆廷. 水产动物育种学. 北京: 中国农业出版社, 2005, 87-88
- 范超晶, 陈爱华, 谭杰, 等. 中韩刺参(*Apostichopus japonicus*)杂交子一代高温与盐度耐受性比较. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 146-152
- 郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活的比较. 水产学报, 2004, 28(3): 267-272
- 姜卫国, 魏贻尧, 李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究——II. 受精过程和杂交后代的染色体观察. 热带海洋学报, 1983, 2(4): 316-323
- 郭学武. 魁蚶生殖生物学初步研究. 海洋水产研究, 1994(15): 55-63
- 唐启升, 邱显寅, 王俊, 等. 山东近海魁蚶资源增殖的研究. 应用生态学报, 1994, 5(4): 396-402
- 常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果. III: 中国种群与俄罗斯种群及其杂种 1~2 龄的生长发育. 海洋学报, 2006, 28(2): 114-120
- 常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝中国种群与日本种群杂交一代的早期生长发育. 水产学报, 2002, 26(5): 385-390
- 梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 4 个地理群体魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的形态差异与判别分析. 海洋科学, 2011, 35(11): 108-113
- 梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 59-64
- 蔡明夷, 柯才焕, 游伟伟, 等. 杂色鲍♀×盘鲍♂杂交受精的细胞学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(2): 239-244
- 谭杰, 王亮, 高菲, 等. 中国刺参(*Apostichopus japonicus*)与韩

- 国刺参杂交子一代生长和抗病力比较. 渔业科学进展, 2015, 36(4): 109–115
- Rahman MA, Uehara T, Aslan LM. Comparative viability and growth of hybrids between two sympatric species of sea urchins (*Genus echinometra*) in Okinawa. Aquaculture, 2000, 183(1–2): 45–56
- Zhang HB, Liu X, Zhang GF, *et al.* Growth and survival of reciprocal between two bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck. Aquaculture, 2007, 272(S1): S88–S93

(编辑 冯小花)

## Growth and Survival of the First Hybrid Generation of Chinese and Korean Populations of *Scapharca broughtonii*

CAI Zhongqiang<sup>1#</sup>, ZHENG Yanxin<sup>1#</sup>, REN Liqun<sup>1</sup>, ZHAO Chunnuan<sup>1</sup>, WU Biao<sup>2</sup>,  
WANG Xiaojun<sup>3</sup>, YU Tao<sup>1①</sup>, YANG Aiguo<sup>2</sup>, LIN Jianguo<sup>1</sup>

(1. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Changdao 265800;  
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries  
Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Zhaoyuan Marine  
Environmental Monitoring Station, Yantai 265400)

**Abstract** Intraspecific hybridization was investigated using two stocks of the *Scapharca broughtonii*, China population (C) and Korea population (K). The fertilization rate, larval survival rate, growth, and heterosis were compared between two reciprocal hybrid crosses  $C♀ \times K♂$  (CK) and  $K♀ \times C♂$  (KC) and two parental groups  $C♀ \times C♂$  (CC) and  $K♀ \times K♂$  (KK). The fertilization rate of the parental groups was higher than that of the reciprocal hybrid crosses, but the hatchability results indicated that there was no significant difference between the two reciprocal hybrid crosses and the two parental groups. The shell lengths of the KK and KC groups were larger than those of the CC and CK groups in larval, juvenile, and adult stages. The CC and CK groups, however, showed higher survival rate in juvenile and adult stages. The heterosis of the KC cross in terms of the shell length and the survival rate was obvious, but the CK cross did not show positive heterosis in any aspect during the entire experiment. The difference in heterosis between the two reciprocal hybrid crosses might be related to the maternal effects, heredity, and environment.

**Key words** *Scapharca broughtonii*; Hybridization; Growth; Survival; Heterosis

① Corresponding author: YU Tao, E-mail: cdyutao@126.com

# 盐度、pH 对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率 和摄食率的影响



杨杰青<sup>1,2</sup> 蒋 玫<sup>1</sup> 李 磊<sup>1</sup> 董 冉<sup>1,2</sup> 许高鹏<sup>1,2</sup> 沈新强<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090; 2. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

**摘要** 采用静态法,以文蛤(*Meretrix meretrix*)为受试生物,研究了不同盐度(16、18、20、22 和 24)和 pH(6.7、7.7、8.7、9.7 和 10.7)对文蛤滤水率和摄食率的影响。结果显示,在 16–24 盐度范围内,文蛤滤水率和摄食率随盐度增加均呈先升后降的变化趋势,盐度为 20 组(对照组)文蛤的滤水率和摄食率均为最大值,分别为 1.51 L/g·h、6.65 mgPOM/g·h,显著高于盐度为 16、18、22、24 实验组( $P<0.05$ ),推测文蛤最适生长盐度范围为 20 左右。pH 在 6.7–10.7 范围内,文蛤滤水率和摄食率均随 pH 增加呈先升后降的变化趋势,pH=8.7(对照组)文蛤的滤水率和摄食率均为最大值,分别为 1.04 L/g·h、11.91 mgPOM/g·h,显著高于 6.7、9.7、10.7 实验组( $P<0.05$ ),而与 pH=7.7 实验组差异并不显著( $P>0.05$ ),推测文蛤最适生长 pH 范围为 7.7–8.7。研究结果可为文蛤池塘健康养殖提供参考。

**关键词** 文蛤; 盐度; pH; 滤水率; 摄食率

**中图分类号** S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0087-07

文蛤(*Meretrix meretrix*)广泛分布于我国沿海地带,是一种重要的经济型贝类,隶属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、帘蛤科(Verberidae)、文蛤属(*Meretrix*)(王如才等,2008;赵莎莎等,2014)。盐度、pH 作为生态系统中重要的环境因子,决定滤食性贝类的生存与分布(栗志民等,2011)。随着贝类养殖的不断发展,渔民一味追求高产量,向池塘大量投加饵料、抗生素、消毒剂等,且连年的养殖忽略了对池塘残饵、药物及排泄物的清理,出现了底质和水体的退化现象(谢骏等,2005;邓来福等,2013)。再加上池塘养殖过程中,进行底质消毒而投入大量漂白粉,池塘间隙性的进出水或连续暴雨灾害天气的发生,造成了池塘水体盐度偏低、pH 过高等异常现象。

滤水率(Filtration rate)作为单位时间内滤食性贝类所过滤水的总体积,是反映贝类生理状态的一项重要指标,在贝类摄食行为和能量学研究中具有十分重

要的作用,可作为评估海区养殖容量的重要参数,对指导养殖生产具有重要意义(董波等,1999)。滤水率受生物因素(贝类规格、饵料浓度等)和环境因素(温度、盐度、pH 等)影响较大,其中,温度、盐度、pH 等是影响贝类滤水率的最重要因素。目前,国内外有关温度、盐度、pH 对滤食性贝类摄食生理的研究主要集中在贻贝(*Mytilus edulis*)(Schulte, 1975; Newell et al, 2001)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(王俊等,2001;杜美荣等,2009)、牡蛎(*Ostrea gigas*)(王芳等,2000; Barillé et al, 1993; Bougrier et al, 1995)等,而有关盐度和 pH 对文蛤摄食生理的研究则鲜有报道。

本实验采用静态法研究了盐度、pH 对文蛤滤水率和摄食率的影响,通过探讨文蛤摄食生理活动的变化特点,旨在探明不同盐度和 pH 条件下文蛤的代谢状况、文蛤生长的最适盐度和 pH 范围,为环境因子突变状况下文蛤池塘健康养殖提供科学参考,同时为贝类养殖容量、生态生理学和能量学积累基础数据。

\* 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-48)资助。杨杰青, E-mail: 513118751@qq.com

① 通讯作者: 沈新强, 研究员, E-mail: xinjiang\_shen@hotmail.com

收稿日期: 2015-08-13, 收修改稿日期: 2015-09-14



## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源及驯养

实验所用文蛤取自江苏省南通市启东某池塘,选择个体大小相近、外表完好、健康活泼的文蛤 100 只,所取文蛤的平均规格为:壳长(3.0±0.7) cm、壳宽(3.0±0.5) cm、全重(8.00±1.70) g、鲜肉重(3.50±1.00) g。实验前逐一清除文蛤表面附着的生物以及污物,然后将文蛤放养至经消毒后的水泥池(长 2 m,宽 2 m,高 1.5 m)内驯养 7 d,驯养期间,所用海水均为经沉淀、砂滤、筛绢网过滤后的池塘海水,海水 pH 为 8.7、盐度为 20、温度控制在 18–19℃ 范围内,每日喂食小球藻(*Chlorella vulgaris*)且 100%换水 1 次。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 盐度实验** 针对池塘养殖过程中可能出现的雨水天气导致盐度偏低的突发状况,依据曹伏君等(2009)、范建勋(2010)<sup>1)</sup>研究结果,盐度实验依次设置 16、18、20、22 和 24 共 5 个盐度梯度。盐度实验于 5 个 10 L 玻璃缸内分别采用经曝气的自来水和粗盐调节天然海水得到所需的盐度值,每天升降盐度不超过 1,达到设定盐度后,各玻璃缸内放入 20 只文蛤稳定 3 d 后开始实验。每一盐度实验组设置 3 个平行组,其中,对照组盐度为 20,实验容器为 2 L 的龙头瓶,每个平行组各放 2 只文蛤,盐度组实验所用海水保持原有 pH 为 8.7,海水温度保持在 18–19℃ 范围内,实验在室内自然光照条件下进行。

**1.2.2 pH 实验** 针对池塘养殖过程中,底质消毒投放大量漂白粉导致 pH 过高的突发状况,同时依据曹伏君等(2009)、谭学群等(2005)研究结果,pH 实验组设置 6.7、7.7、8.7、9.7 和 10.7 共 5 个浓度梯度。pH 实验于 5 个 10 L 玻璃缸内,分别采用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节过滤后天然海水的 pH 值,并用 pH 计(HANNA HI98127 型)进行校准。各梯度 pH 变化幅度为±0.2,每天升降 pH 不超过 1,达到设定 pH 后,各玻璃缸内放入 20 只文蛤稳定 3 d 后开始实验,每一个 pH 实验组设置 3 个平行组,其中对照组 pH 为 8.7,实验容器为 2 L 的龙头瓶,每个平行组各放 2 只文蛤,pH 实验组所用海水保持原有盐度为 20,海水温度保持在 18–19℃ 范围内,实验在室内自然光照条件下进行。

**1.2.3 测定方法** 滤水率和摄食率实验时间为 2 h,

实验开始前,各平行组分别取 1 L 海水用玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C,孔径 0.45 μm)进行抽滤,并计算悬浮颗粒物 TPM(Total Particulate Matter)和颗粒有机物 POM(Particulate Organic Matter)浓度。实验于龙头瓶中进行,每小组实验用水为 2 L,各放置 2 只文蛤,迅速用封口膜封住瓶口与龙头嘴。实验结束后再次取 1 L 海水进行抽滤,并计算 TPM 和 POM,取出文蛤测定全重、鲜肉重,然后取其软组织部和贝壳放入 65℃ 烘箱内烘干并称其干重。称重采用梅特勒 AR2140 的电子天平进行(精确到 0.01 g)。

滤水率(CR)测定:双壳贝类的滤水率是指单位时间内贝体对水的过滤量,本实验采用静水系统法(Coughlan *et al.*, 1964)方法,计算公式为:

$$CR = [V/(W \times t)] \times \ln(C_0/C_t)$$

式中,  $V$  为实验所用水体积(L),  $W$  为实验材料的组织干重(g),  $t$  为实验持续时间(h),  $C_0$ 、 $C_t$  分别代表实验开始和实验结束时的饵料浓度  $C_{POM}$  (mol/L)。

摄食率(IR)的测定:用 Jorgensen 等(1990)提出的公式计算文蛤的摄食率:

$$IR = V \times (C_0 - C_t) / (W \times t)$$

式中,  $V$  为实验所用水体积(L),  $W$  为实验材料的组织干重(g),  $t$  为实验持续时间(h),  $C_0$ 、 $C_t$  分别代表实验开始和实验结束时的饵料浓度  $C_{POM}$  (mol/L)。

TPM 和 POM 测定(栗志民等, 2011; 唐保军, 2005<sup>2)</sup>): 首先把玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C,孔径 0.45 μm)用蒸馏水清洗后在 450℃ 马弗炉内灼烧 6 h,称重( $W_0$ ),再用此玻璃纤维滤膜抽滤 1 L 水样,用甲酸氨溶液(0.5 mol/L)充分漂洗,去除滤膜上遗留的海水盐分,然后在 65℃ 烘箱内烘干 48 h,称重( $W_1$ )后再在 450℃ 的马弗炉内灼烧 6 h,再称重( $W_2$ )。单位水体中悬浮颗粒物浓度  $C_{TPM}$ 、有机物浓度  $C_{POM}$  分别为:

$$C_{TPM} (\text{mg/L}) = W_1 - W_0$$

$$C_{POM} (\text{mg/L}) = W_1 - W_2$$

### 1.3 数据处理

所得数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用  $t$  检验法统计分析,显著水平设为 0.05,利用 Excel 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐度对文蛤滤水率和摄食率的影响

实验结束时,文蛤生物质量数据见表 1,其中,

1) 范建勋. 文蛤能量代谢的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–26

2) 唐保军. 环境因子和饵料对文蛤能量收支与幼虫生长发育的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2005, 29–33

表 1 盐度实验结束时文蛤生物质量数据  
Tab.1 Biological data of *M. meretrix* after salinity experiment

盐度 Salinity	组别 Groups	全重(1 只, g) Total weight	干壳重(1 只, g) Dry shell weight	干肉重(2 只, g) Dry meat weight
16	1	9.60	8.15	0.51
		8.99	7.55	
	2	8.38	5.61	
		7.53	5.01	
	3	7.12	4.56	
		8.58	5.85	
18	1	8.55	5.04	0.52
		8.07	4.99	
	2	7.99	5.02	
		8.86	5.47	
	3	7.85	5.57	
		7.44	4.91	
20	1	8.10	5.75	0.40
		7.43	5.61	
	2	7.52	5.45	
		8.26	6.17	
	3	7.35	4.88	
		8.26	5.94	
22	1	8.58	5.42	0.66
		9.67	5.83	
	2	8.11	5.29	
		7.84	5.67	
	3	8.84	5.63	
		10.45	6.82	
24	1	9.29	6.15	0.49
		7.56	5.66	
	2	8.09	5.25	
		8.24	5.59	
	3	10.66	7.34	
		10.09	7.26	

全重(1 只)为(8.44±2.22) g,干壳重(1 只)为(5.78±2.37) g,干肉重(2 只)为(0.51±0.19) g。

文蛤滤水率随盐度增加呈先升后降的变化趋势(图 1), 盐度为 20 的对照组滤水率显著高于盐度 16、18、22 和 24 浓度组( $P<0.05$ )。当盐度为 16 时, 滤水率具有最小值, 为 0.26 L/g·h; 盐度在 16-20 之间, 滤水率随盐度增加持续上升; 盐度 20 的对照组具有最大值, 为 1.51 L/g·h; 当盐度大于 20 时, 滤水率开始下降; 盐度为 22 时, 小幅下降。

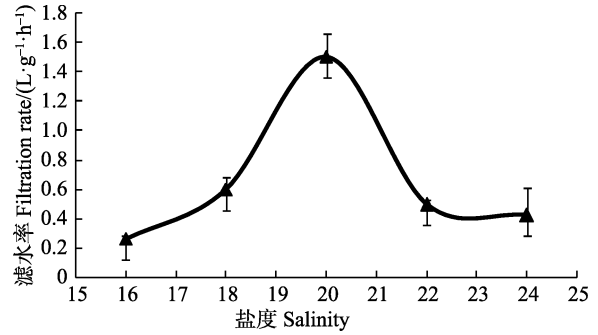


图 1 盐度对文蛤滤水率的影响  
Fig.1 Effects of salinity on the filtration rate of *M. meretrix*

文蛤摄食率随盐度增加呈先上升后下降的变化趋势(图 2), 且盐度为 20 的对照组摄食率显著高于盐度 16、18、22 和 24 浓度组( $P<0.05$ )。当盐度为 16 时, 摄食率具有最小值, 为 2.56 mgPOM/g·h; 盐度在 16-20 之间, 随盐度增加摄食率持续上升; 盐度为 20 的对照组具有最大值, 为 6.65 mgPOM/g·h; 盐度大于 20 时, 摄食率呈下降趋势。

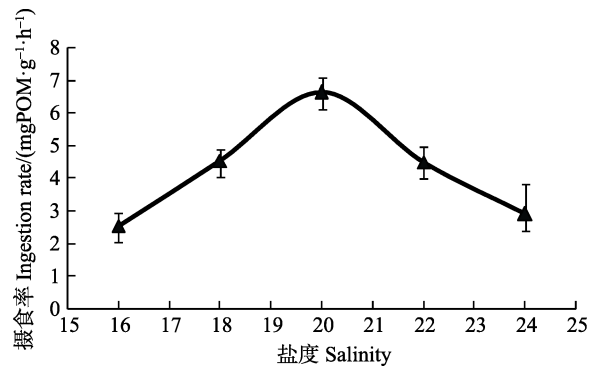


图 2 盐度对文蛤摄食率的影响  
Fig.2 Effects of salinity on the ingestion rate of *M. meretrix*

## 2.2 pH 对文蛤滤水率和摄食率的影响

pH 实验组结束时, 文蛤的生物质量数据见表 2, 其中, 全重(1 只)为(7.76±4.35) g, 干壳重(1 只)为(5.14±2.90) g, 干肉重(2 只)为(0.44±0.12) g。

实验设定 pH 范围内, 文蛤滤水率随 pH 增加呈先升后降的变化趋势(图 3), pH 为 8.7 的对照组与 7.7 浓度组差异不显著( $P>0.05$ ), 而 pH 为 8.7 的对照组与 6.7、9.7 和 10.7 浓度组差异显著( $P<0.05$ )。pH 为 6.7 时, 滤水率具有最小值, 为 0.44 L/g·h; pH 在 6.7-8.7 之间, 随着 pH 增加滤水率持续上升; pH 为 8.7 的对照度具有最大值, 为 1.0 L/g·h; pH 在 8.7-10.7 之间, 滤水率随 pH 增加呈下降趋势。

文蛤摄食率在实验 pH 范围内变化趋势如图 4 所示, 随着 pH 的增加摄食率呈先升后降的变化趋势, pH 为 8.7 的对照组与 7.7 浓度组差异不显著( $P>0.05$ ),

表 2 pH 实验结束时文蛤生物质量数据

Tab.2 Biological data of *M. meretrix* after pH experiment

pH	组别 Group	全重(1只, g) Total weight	干壳重(1只, g) Dry shell weight	干肉重(2只, g) Dry meat weight
6.7	1	8.39	5.42	0.44
		7.97	4.99	
	2	9.34	6.19	0.41
		6.42	4.50	
	3	7.49	4.71	0.38
		7.00	5.27	
7.7	1	7.57	5.11	0.47
		7.39	4.76	
	2	8.19	5.18	0.44
		6.70	4.54	
	3	7.93	5.16	0.48
		7.17	4.98	
8.7	1	8.10	5.74	0.40
		7.43	5.61	
	2	7.52	5.45	0.40
		8.26	6.17	
	3	7.35	4.87	0.38
		8.19	5.94	
9.7	1	8.27	5.09	0.46
		6.47	4.38	
	2	8.10	5.32	0.41
		7.12	4.86	
	3	7.90	5.08	0.47
		5.70	3.80	
10.7	1	12.11	8.04	0.56
		8.06	5.53	
	2	7.21	4.78	0.40
		7.25	4.78	
	3	9.09	3.24	0.49
		7.08	4.69	

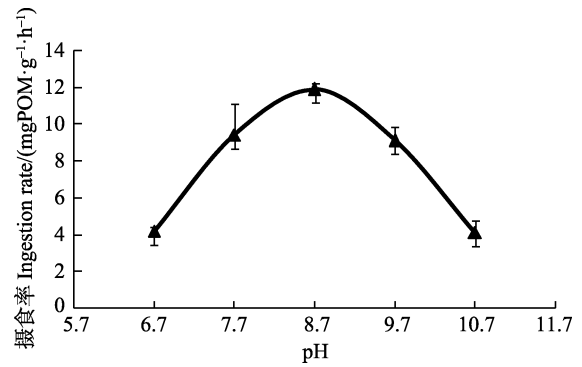


图 4 pH 对文蛤摄食率的影响

Fig.4 Effects of pH on the ingestion rate of *M. meretrix*

而 pH 为 8.7 的对照组与 6.7、9.7、10.7 浓度组差异显著( $P < 0.05$ )。pH 在 6.7–8.7 之间, 随 pH 的增加摄食率持续上升; pH 为 8.7 的对照组摄食率具有最大值, 为 11.91 mgPOM/g·h; pH 在 8.7–10.7 范围内, 随 pH 的增加摄食率持续下降。

### 3 讨论

#### 3.1 盐度对文蛤滤水率和摄食率的影响

盐度是海洋生态系统中重要的环境因子之一, 它不仅影响贝类的生存与分布、呼吸与排泄(王如才等, 2008), 而且对其摄食生理活动的影响也尤为显著。本研究结果显示, 在盐度为 16–24 范围内, 文蛤滤水率和摄食率均随盐度增加呈先升后降的变化趋势, 其中, 滤水率和摄食率随盐度增加呈先升后降的变化特点在贻贝(Schulte, 1975; Newell *et al*, 2001)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)(潘鲁青等, 2002)、栉孔扇贝(王俊等, 2001; 杜美荣等, 2009)、牡蛎(王芳等, 2000; Barillé *et al*, 1993; Bougrier *et al*, 1995)等研究中也取得了一致结果。盐度为 20(对照组)的滤水率和摄食率同为最大值, 且显著高于盐度 16、18、22 和 24 实验组( $P < 0.05$ )。这主要因为文蛤属于变渗透压生物, 不同盐度环境下, 其渗透压有所不同, 维持机体渗透压平衡机制需要消耗大量的能量(郭华阳等, 2013)。适宜盐度条件下, 文蛤体内外渗透压处于平衡状态, 消耗较少的能量便可维持机体稳定, 更多的能量用于摄食。有利于文蛤体内能量的积累, 若饵料充足将有助于文蛤的快速生长。研究表明, 低于或高于贝类摄食活动的最适盐度范围, 贝类通过关闭进出水管或贝壳的方式把自身与外界环境分开(杜美荣等, 2009)。这种生理性保护反应将保护机体免受伤害, 文蛤关闭进

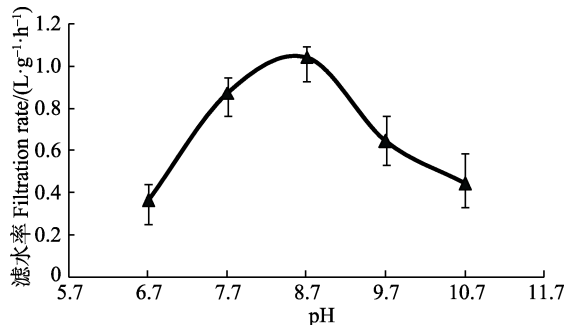


图 3 pH 对文蛤滤水率的影响

Fig.3 Effects of pH on the filtration rate of *M. meretrix*

出水管或贝壳后, 进出水管上侧纤毛摆动将停止(Jorgensen *et al*, 1986; 李金碧, 2009<sup>1)</sup>), 腔海水的体积减少, 与外界水体交换量便明显下降, 导致进入外套摄取的颗粒物也就相应降低。本实验进行中发现, 盐度为 24 和 16 两组文蛤在各自驯养浓度整个过程中, 其进出水管和贝壳 80% 以上时间处于关闭状态, 盐度为 18 和 22 两组文蛤在各自驯养浓度整个过程中其进出水管和贝壳约 50% 时间处于关闭状态, 且原地不动, 因此, 造成盐度为 16、18、22 和 24 实验组文蛤滤水率和摄食率显著低于对照组。综上所述表明, 本实验条件下, 文蛤最适生长盐度为 20 左右, 与范建勋(2010)<sup>1)</sup>研究文蛤的最适生长盐度为 21 基本一致。

此外, 高盐度 22–24 文蛤的滤水率下降幅度较盐度 20–22 段小, 在低盐度 16–18 范围内, 文蛤的滤水率上升幅度较盐度 18–20 小, 说明盐度在 18–22 时文蛤反应较为灵敏。过高或过低的盐度均不利于文蛤的健康养殖, 自身池塘间隙放水、连续暴雨极端天气会导致池塘水体盐度偏低, 在池塘养殖过程中应注意控制盐度。整体上看, 摄食率在盐度 18–22 也较盐度 16–18 和 22–24 变化幅度大, 且滤水率和摄食率在盐度 16–20 和 20–24 具有相同的变化趋势, 这表明滤水率和摄食率的变化呈正相关。

### 3.2 pH 对文蛤滤水率和摄食率的影响

多种因素可影响池塘水体 pH 的变化, 例如降雨、繁殖饵料生物、池塘底质消毒及不正确的投喂饵料和药物等。pH 是影响贝类生理代谢的重要环境因子之一, 研究表明, 在最适 pH 范围内, 贝类表现出较高的滤水率和摄食率, 超出该范围滤水率和摄食率均降低并表现出一定的不适应性(左骁等, 2009)。

本研究结果显示, pH 为 6.7、9.7 和 10.7 实验组文蛤滤水率和摄食率与 pH=8.7 的对照组差异显著( $P<0.05$ ), 而 pH=7.7 组和对照组差异并不显著( $P>0.05$ ), 且对照组滤水率和摄食率均为最大值。大量研究表明, 适宜 pH 下, 贝类机体处于标准代谢状态, 超出贝类适宜 pH 范围, 其滤水率和摄食率明显下降。本研究中, pH=8.7 的对照组滤水率和摄食率均为最大值, 与潘鲁青等(2002)、王冬梅等(2009)分别研究当 pH=8 时缢蛏、波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)滤水率达最大值具有一定相似性。Bamber(1990)、Harris 等(1999)分别在研究食用牡蛎、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、贻贝和黑唇鲍(*Haliotis rubra*)摄食率时发现, 当贝类长期处于 pH 低于 7 的环境时,

贝类机体处于一种近乎麻痹状态且摄食活力明显下降。pH 过高会抑制三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)(徐在宽, 1998)、尖紫蛤(*Hiatula acuta*)(黄洋等, 2014)鳃毛活力, 生理活动降低且没有粪便产生。本实验过程中也发现, pH 为 6.7 的弱酸性实验组与 pH 为 9.7 和 10.7 碱性实验组, 文蛤贝壳紧闭、保持原地不动且无粪便产生。贝壳的紧闭导致文蛤滤水量的大大降低, 其滤水率和摄食率显著低于对照组, 因此, 文蛤长期处于此环境下将不利于机体的正常运行和体内能量的积累。而 pH 为 7.7 和 8.7 两组的文蛤相对较为活泼, 实验过程中发现有明显移动, 能清晰看到粪便颗粒, 表明这两组文蛤机体处于较为适宜状态, 摄食活力较强。因此, 过低或过高 pH 环境下(6.7、9.7 和 10.7)都不利于文蛤的摄食生理代谢, 文蛤滤水率和摄食率都相应较低, 而相对适宜 pH(7.7 和 8.7)环境下文蛤滤水率和摄食率均较大。综上所述可推测, 本实验条件下, 文蛤最适生长 pH 范围为 7.7–8.7, 与栗志民等(2011)研究文蛤最适 pH 在 8 左右基本相一致。

此外, 本研究结果显示, pH 在 6.7–7.7 范围内较 7.7–8.7 范围内滤水率和摄食率上升幅度大, pH 在 8.7–9.7 范围内较 9.7–10.7 范围内滤水率和摄食率下降幅度小, 说明高 pH 或低 pH 文蛤的反应较敏感。因此, 对受底质消毒、连续暴雨极端天气导致池塘水体 pH 过高或过低的情况, 养殖过程中应注意采取相应的补救措施, 避免文蛤大面积死亡而遭受的巨大经济损失。整体上看, 滤水率和摄食率在 pH 6.7–8.7 和 pH 8.7–10.7 具有相同的变化趋势, 表明滤水率和摄食率呈正相关。

## 4 结论

在 pH=8.7 条件下, 盐度为 20 的对照组文蛤滤水率和摄食率均显著高于盐度为 16、18、22 和 24 实验组( $P<0.5$ ), 且滤水率和摄食率均为最大值, 文蛤最适生长盐度为 20 左右。

在盐度为 20 条件下, pH=8.7 的对照组与 pH=7.7 实验组差异不显著( $P>0.05$ ), 而 pH=8.7 的对照组与 pH 为 6.7、9.7、10.7 实验组差异显著( $P<0.05$ ), 对照组滤水率和摄食率均为最大值, 文蛤最适生长 pH 范围在 7.7–8.7 之间。

致谢: 中国水产科学研究院东海水产研究所蒋玫研究员、李磊助理研究员对实验的设计及文稿修改提供诸多帮助, 谨致谢忱。

1) 范建勋. 文蛤能量代谢的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–26

## 参 考 文 献

- 王冬梅, 李春强, 彭明, 等. 盐度、pH 对波纹巴非蛤滤水率的影响. 海洋通报, 2009, 28(2): 23–27
- 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, 410–419
- 王芳, 董双林, 张硕, 等. 海湾扇贝和太平洋牡蛎的食物选择性及滤除率的实验研究. 海洋与湖沼, 2000, 31(2): 139–144
- 王俊, 姜祖辉, 唐启升. 栉孔扇贝的滤食率与同化率. 中国水产科学, 2001, 8(4): 27–31
- 邓来福, 江兴龙. 池塘养殖生物修复技术研究进展. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1270–1272
- 左骁, 曹善茂, 刘鹏亮. 饵料种类、盐度、pH 和规格对曼氏皮海鞘摄食率的影响. 大连水产学院学报, 2009, 24(S1): 113–117
- 杜美荣, 方建光, 葛长宇, 等. 盐度和饵料密度对栉孔扇贝稚贝滤水率的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 74–78
- 赵莎莎, 刘晨晨, 杨最素, 等. 文蛤的研究进展. 安徽农业科学, 2014, 42(9): 2617–2618
- 栗志民, 刘志刚, 徐法军, 等. 温度、盐度、pH 和饵料密度对皱肋文蛤清滤率的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 55–61
- 栗志民, 刘志刚, 邓海东. 温度和盐度对企鹅珍珠贝清滤率、滤食率、吸收率的影响. 水产学报, 2011, 35(1): 96–103
- 徐在宽. 三角帆蚌鳃瓣活力的研究. 水产养殖, 1998(3): 17–19
- 郭华阳, 王雨, 张殿昌, 等. 饵料密度、体重和盐度对黄边糙鸟蛤滤水率的影响. 海洋渔业, 2013, 35(2): 189–194
- 黄洋, 黄海立, 邓乐平, 等. 盐度、pH 和规格对尖紫蛤滤水率、摄食率、吸收率的影响. 广东海洋大学学报, 2014, 34(1): 42–47
- 曹伏君, 刘志刚, 罗正杰. 海水盐度、温度对文蛤稚贝生长及存活的影响. 应用生态学报, 2009, 20(10): 2545–2550
- 董波, 薛钦昭, 李军. 海洋滤食性贝类摄食率的研究现状. 海洋科学, 1999(3): 26–29
- 谢骏, 刘军, 刘斌. 生物修复技术在水产养殖中的应用. 水利渔业, 2005, 25(1): 63–64
- 谭学群, 英乔, 张明, 等. 文蛤池塘养殖技术. 水产科学, 2005, 24(3): 22–23
- 潘鲁青, 范德朋, 马甦, 等. 环境因子对缢蛏滤水率的影响. 水产学报, 2002, 26(3): 226–230
- Bamber RN. The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. J Exp Mar Biol Ecol, 1990, 143(3): 181–191
- Barillé L, Proua J, Hérala M, *et al.* No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 171(1): 91–106
- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, *et al.* Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 1995, 134(1–2): 143–154
- Coughlan J, Ansell AD. A direct method for determining the pumping rate of siphonate bivalves. J Mar Sci, 1964, 29(2): 205–213
- Harris JO, Maguire GB, Edwards SJ, *et al.* Effect of pH on growth rate, oxygen consumption rate, and histopathology of gill and kidney tissue for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* donovan and blacklip abalone, *Haliotis rubra* leach. Aquaculture, 1999, 160(3–4): 259–272
- Jorgensen CB, Fanlnle P, Kristensen HS, *et al.* The bivalve pump. Mar Ecol Prog Ser, 1986, 34(1–2): 69–77
- Jorgensen CB, Larsen PS, Riisgard HU. Effects of temperature on the mussel pump. Mar Ecol Prog Ser, 1990, 64(1): 89–97
- Newell CR, Wildishb DJ, MacDonaldc BA. The effects of velocity and seston concentration on the exhalant siphon area, valve gape and filtration rate of the mussel *Mytilus edulis*. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 262(1): 91–111
- Schulte EH. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. Mar Biol, 1975, 30(4): 331–341

(编辑 冯小花)



## Effects of Salinity and pH on the Filtration Rate and Ingestion Rate of *Meretrix meretrix*

YANG Jieqing<sup>1,2</sup>, JIANG Mei<sup>1</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, DONG Ran<sup>1,2</sup>, XU Gaopeng<sup>1,2</sup>, SHEN Xinqiang<sup>1①</sup>

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090;

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

**Abstract** *Meretrix meretrix* is of high commercial value and widely distributed in the coastal area of China. Deterioration of pond environment has caused huge economic loss in pond aquaculture of *M. meretrix* in recent years. To better understand this process, here we explored the physiological metabolisms of *M. meretrix* under different salinities and pH. Effects of different salinities (16, 18, 20, 22, and 24) and pH (6.7, 7.7, 8.7, 9.7, and 10.7) on the filtration rate and ingestion rate of *M. meretrix* were tested under static conditions. Both the filtration rate and the ingestion rate rose as the salinity increased from 16 to 20, and they dropped in the range of 20 to 24. The control group with salinity 20 had the highest filtration rate (1.51 L/g·h) and ingestion rate (6.65 mgPOM/g·h), which were significantly higher than the groups with salinity 16, 18, 22, and 24 ( $P < 0.05$ ). Therefore, salinity 20 was most likely the optimum for the growth of *M. meretrix*. The filtration rate and ingestion rate increased along with the pH rising from 6.7 to 8.7, but then decreased in the range of 8.7–10.7. Both the filtration rate and the ingestion rate reached the maximum at pH 8.7, which were 1.04 L/g·h and 11.91 mgPOM/g·h respectively, and these values were significantly higher than those in the groups with pH 6.7, 9.7, and 10.7 ( $P < 0.05$ ). Noticeably, there was no difference in the two groups between pH 7.7 and pH 8.7 ( $P > 0.05$ ). So we deduced that the optimum range of pH was 7.7 to 8.7. Our study may provide important information that can help improve the pond aquaculture of *M. meretrix*.

**Key words** *Meretrix meretrix*; Salinity; pH; Filtration rate; Ingestion rate

① Corresponding author: SHEN Xinqiang, E-mail: xinqiang\_shen@hotmail.com

# 体外仿生消化在华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*) 体内镉的生物可给性中的应用



杨妙峰<sup>1,2</sup>①

1. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 厦门 361013;
2. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心 厦门 361013)

**摘要** 体外仿生消化是目前研究食品中污染物生物可利用性的有效手段之一。将体外仿生消化法应用于华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*, 以下简称扇贝)中镉(Cd)生物可给性分析的前处理工序(Cd 暴露水平较高), 即模拟人体消化环境, 加入消化液所含有机物和无机物(含消化酶), 探讨扇贝体内 Cd 在胃肠中的释放机制。结果显示, 各体外仿生消化液单独作用于扇贝时, Cd 溶出平衡时间顺序依次为: 仿生唾液>胃液>胆汁>十二指肠液, 而溶出量大小顺序为: 胃液>胆汁≈十二指肠液>唾液, 仅十二指肠液和胆汁中 Cd 溶出时的  $\ln C-t$  呈线性相关( $R^2=0.9530$  和  $R^2=0.8891$ )。因此, Cd 在唾液或胃液中溶出时的关键因子是 pH, 但在十二指肠液、胆汁和全过程仿生消化液中, 消化酶起决定作用。样-液比在 1:10-1:120 (g/ml)之间时, 扇贝体内 Cd 溶出率没有显著差异, 即样-液比对 Cd 的生物可给率影响不大。体外全仿生消化结果显示, 扇贝内约有 70%的 Cd 释放溶出, 即扇贝消化糜中 Cd 的最大生物可给率为 70%。

**关键词** 镉; 体外仿生消化; 生物可给性

**中图分类号** X820.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0094-06

镉(Cd)作为当今世界三大重点研究的毒素之一, 位列联合国环境规划署(UNEP)提出的 12 种具有全球性意义的化学有害物质之首以及美国毒物管理委员会(ATSDR)提出的危害人体健康的有毒物质第 6 位(王丽娟等, 2014)。营滤食性底栖双壳类的华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*, 以下简称扇贝), 对 Cd 累积富集能力较强, 超标现象严重, 正常膳食暴露水平下, 产生的健康风险虽然尚在可接受范围内, 但基于日容许摄入量的靶标危害系数(THQs)相对较高, 即外暴露水平较高, 其食用安全应引起一定的重视(姜元欣等, 2013; 陈红英等, 2015)。

另一方面, 李凤琴等(2011)指出, 食品中的污染物被机体摄入后只有从基质中释放出来的部分可对

机体产生毒性作用, 动物模型或体外方法模型都是探究污染物生物可给性的有效方法, 而后者以其程序简单、稳定、可重复等特性, 已成为评估食品安全风险的重要技术手段之一。本研究采用“全仿生消化法”模拟人体胃肠道的消化环境, 对扇贝体内 Cd 的生物可给性进行探讨, 并分析了消化液组成(酸度、无机物和有机物、消化酶)、样-液比等对 Cd 溶出的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器设备与试剂

仪器设备: 原子吸收光谱仪(iCE 3500, ThermoFisher), 水浴恒温振荡器(THZ-82, 常州国华电器有限公司),

\* 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(闽海渔科 2013R001-4; 闽海渔科 2013R001-5)、福建省海洋高新技术产业发展专项项目(闽海洋高新[2014] 18 号)、闽台重要海洋生物资源高值化开发技术公共服务平台(2014FJPT01)和福建重要海洋经济生物种质库与资源高效开发技术公共服务平台(14PZY017NF17)共同资助。

① 通讯作者: 杨妙峰, 助理研究员, E-mail: miaofenf@sina.com

收稿日期: 2015-11-02, 收修改稿日期: 2015-11-27

高速离心机(5810R, Eppendorf), 微波消解仪(Mars 5, CEM), pH/ISE 测试仪(828 型, Orion), 超纯水系统(Milli-Q element A10, Millipore)。

胰液素(效价 1 : 4000)、胆汁、牛血清白蛋白、 $\alpha$ -淀粉酶(活力 4000 U/g)、脂肪酶(活力 30000 U/g)、黏液素、尿酸、胃蛋白酶(效价 1 : 30000)等生化试剂均购于上海一基实业有限公司; 氢氧化钠、浓盐酸、浓硝酸为优级纯; 其余试剂均为分析纯。

实验用华贵栉孔扇贝购于厦门市第八市场, 用超纯水冲洗 3 遍后去壳匀浆。

GBW10024(GSB-15)扇贝成分分析标准物质购于北京标新方圆技术咨询有限公司。

## 1.2 仿生消化液制备

参照 Oomen 等(2003)和林路秀等(2014)体外全仿生消化液的配制方案, 分别加入胃和肠中所含的有机物和无机物, 调节 pH 至各消化液相应的 pH 值, 制备半仿生消化液; 在半仿生消化液基础上, 分别加入对应的消化酶, 制备全仿生消化液, 全仿生消化液在 4℃ 下保存备用。具体配制方法见表 1。

## 1.3 实验设计

**1.3.1 溶出平衡时间** 设置 4 个实验组, 称取扇贝样品约 2 g (精确至 0.001 g, 平行 2 份), 分别加入全仿生唾液、胃液、十二指肠液和胆汁各 40 ml, 在 37℃ 恒温振荡(设置不同浸提时间)后, 8000 r/min 离

心 10 min (4℃), 取上清液用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 滤液(仿生消化食糜)在 4℃ 下保存待用。

**1.3.2 影响因素** (1)消化液组成: 设置仿生唾液、胃液、十二指肠液、胆汁和全过程仿生消化液 5 个实验组, 分别测试 pH、无机/有机物以及消化酶对仿消化的影响。浸提液分别为纯水(调至相应 pH)、半仿生消化液(无消化酶)和仿生消化液, 样-液比约为 1 : 20 (g/ml)。所有实验平行 2 份, 取平均值。

(2)样-液比 按样-液比 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 60 和 1 : 120 (g/ml)分别称取一定量的扇贝样品进行全过程仿生消化: 先加入全仿生唾液 2.5 ml, 37℃ 恒温振荡 5 min; 加全仿生胃液 15 ml, 37℃ 恒温振荡 2 h; 再加入 30 ml 十二指肠液和 10 ml 胆汁, 37℃ 恒温振荡 7 h 后, 8000 r/min 离心 10 min (4℃), 取上清液, 用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 滤液(仿生消化食糜)在 4℃ 下保存待用。所有实验平行 2 份, 取平均值。

**1.3.3 微波消解及 Cd 含量测定** 称取 0.5 g 扇贝成分分析标准物质或 2 g 扇贝样品(精确至 0.001 g), 加入 10 ml 浓 HNO<sub>3</sub>, 微波消解测定扇贝样品总 Cd 量; 移取 5.00 ml 仿生消化滤液(消化食糜), 加入 5 ml 浓 HNO<sub>3</sub>, 微波消解后测定扇贝 Cd 溶出量; 将仿生消化残渣全量转移至消解罐, 加入 10 ml 浓 HNO<sub>3</sub> 消解测定残渣态 Cd 含量; 同时进行试剂空白对照。采用石墨炉原子吸收光谱仪(iCE 3500)测定扇贝样品、仿生消化食糜和残渣中 Cd 的含量。

表 1 各体外仿生消化液的组成成分

Tab.1 Concentrations of the synthetic juices composing the *in vitro* bionic digestion

项目 Items	唾液 Saliva	胃液 Gastric juice	十二指肠液 Duodenal juice	胆汁 Bile
无机物 Inorganic solution	10 ml 89.6 g/L KCl 10 ml 20 g/L KSCN 10 ml 88.8 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 ml 57 g/L Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1.7 ml 175.3 g/L NaCl 1.8 ml 40 g/L NaOH	15.7 ml 175.3 g/L NaCl 3.0 ml 88.8 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 9.2 ml 89.6 g/L KCl 18 ml 22.2 g/L CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 10 ml 30.6 g/L NH <sub>4</sub> Cl 8.3 ml 37% g/g HCl	40 ml 175.3 g/L NaCl 40 ml 84.7 g/L NaHCO <sub>3</sub> 10 ml 8 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6.3 ml 89.6 g/L KCl 10 ml 5 g/L MgCl <sub>2</sub> 0.18 ml 37% g/g HCl 9 ml 22.2 g/L CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 ml 175.3 g/L NaCl 68.3 ml 84.7 g/L NaHCO <sub>3</sub> 4.2 ml 89.6 g/L KCl 0.20 ml 37% g/L HCl 10 ml 22.2 g/L CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
有机物 Organic solution	8 ml 25 g/L 尿素 Urea	10 ml 65 g/L 葡萄糖 Glucose 10 ml 2 g/L 葡萄糖醛酸 Glucuronic acid 3.4 ml 25 g/L 尿素 Urea 10 ml 33 g/L 氨基葡萄糖盐酸盐 Glucoseamine hydrochloride	4 ml 25 g/L 尿素 Urea	
消化酶 Digestive enzyme	145 mg $\alpha$ -淀粉酶 $\alpha$ -amylase 15 mg 尿酸 Uric acid 50 mg 黏液素 Mucin	1 g 牛血清蛋白 BSA 1 g 胃蛋白酶 Pepsin 3 g 黏液素 Mucin	1 g 牛血清蛋白 BSA 3 g 胰液素 Pancreatin 0.5 g 脂肪酶 Lipase	1.8 g 牛血清蛋白 BSA 6 g 胆汁 Bile
pH	6.5±0.2	1.07±0.07	7.8±0.2	8.0±0.2

注: HCl 或 NaHCO<sub>3</sub> 溶液调节 pH 后, 用超纯水定容至 500 ml, 4℃ 保存

Note: If necessary, the pH of each juice is adjusted to the appropriate interval by HCl or NaHCO<sub>3</sub> solution and diluted to 500 ml with ultrapure water before storage at 4℃

1.4 数据处理与分析

Cd 的溶出率为消化食糜中 Cd 含量与扇贝样品中 Cd 总量的比值, 即:

$$\text{溶出率} = (C \times V) / (\omega \times m) \times 100\%$$

式中,  $C$  为消化食糜中溶解态 Cd 含量( $\mu\text{g/L}$ );  $V$  为消化液体积( $\text{ml}$ );  $\omega$  为扇贝样品 Cd 含量( $\mu\text{g/g}$ );  $m$  为称样量( $\text{g}$ )。

扇贝体内 Cd 的生物可给率是指扇贝样品经胃肠道消化后 Cd 的最大释放量, 以全过程仿生消化后 Cd 的溶出率进行表征。

使用 Excel 2007 进行数据处理和图形制作。设定差异显著性水平  $P$  为 0.05, 当  $P < 0.05$  时为差异显著, 反之差异不显著。

2 结果与讨论

2.1 扇贝样品中总镉含量

扇贝标准物质 Cd 含量测定结果为  $(1.12 \pm 0.03) \mu\text{g/g}$ , 与参考值  $(1.06 \pm 0.10) \mu\text{g/g}$  相吻合, 表明微波消解-原子吸收光谱法测定试样中 Cd 含量准确可靠。

实验用扇贝 Cd 含量较高, 测定值为  $2.98 \mu\text{g/g}$ , 这可能是因为扇贝本身对 Cd 的同化率较高, 且 Cd

在扇贝体内的生物半衰期较长, 在正常海区也能在体内快速累积 Cd 至较高浓度(赵艳芳等, 2014), 因此, 其食用安全风险需要引起一定的重视。

2.2 溶出平衡时间

不同振荡时间下, 仿生唾液、胃液、十二指肠液和胆汁中实验用扇贝 Cd 的溶出平衡见图 1, 仿生唾液中 Cd 的溶出, 在 20 min 时达到最大值, 然后趋于稳定, 平衡时间最短。仿生胃液中 Cd 的溶出, 则在 2 h 达到最大值, 然后趋于稳定, 平衡时间次之; 仿生十二指肠液中 Cd 的溶出在 7 h 内逐步增长, 7 h 后出现明显下降现象。仿生胆汁中 Cd 的溶出在 3 h 达到最高值, 然后趋于稳定。总体而言, 各仿生消化液中 Cd 的溶出平衡时间顺序依次为: 仿生唾液 > 胃液 > 胆汁 > 十二指肠液。

王秀丽等(2013)指出, 酶解时间影响酶的催化反应, 随着反应时间的延长, 酶解程度逐渐增大, 当胃蛋白酶酶解时间大于 2 h, 酶解反应已充分, 与本实验的结果相吻合。仅仿生十二指肠液出现酶解完全后 Cd 溶出率明显下降的现象, 这可能是由于扇贝体内最主要的营养成分是蛋白质, 占干品总重 60% 以上(李薇薇, 2011), 而蛋白质主要的消化酶在肠液中(胃蛋白酶仅针对水溶性蛋白质), 当蛋白质酶解程度过

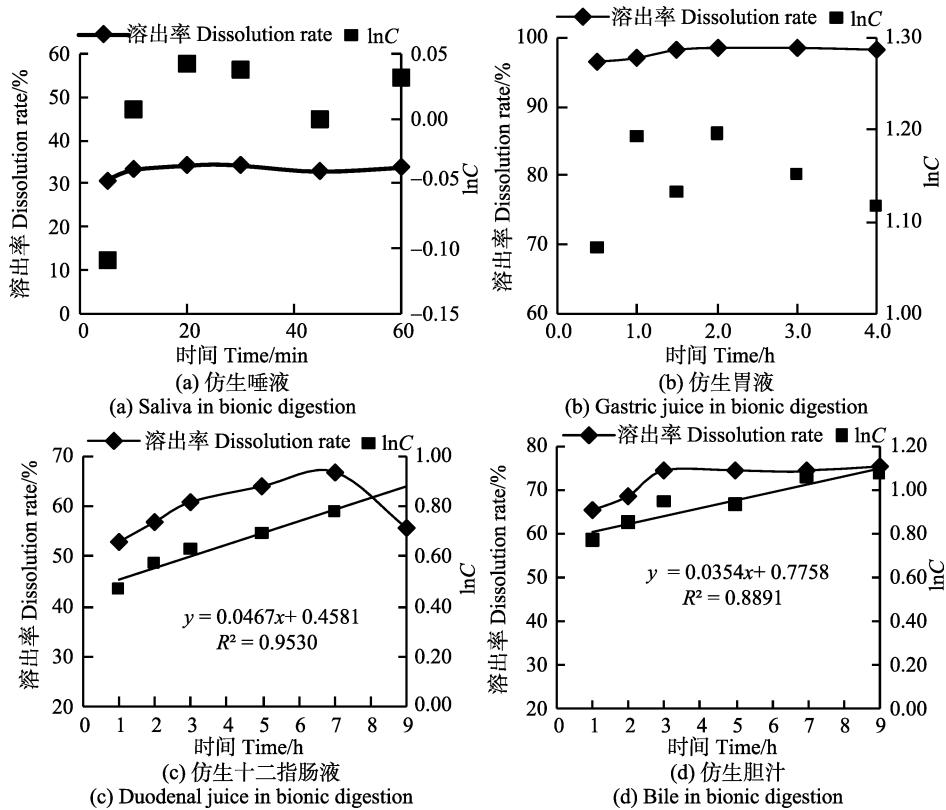


图 1 体外全仿生消化液中 Cd 的溶出率和时间关系

Fig.1 The relationship between Cd dissolution rate and time during *in vitro* whole-bionic digestion

大时,降低了产物中小肽的含量,若进一步延长酶解时间,反而会降低酶解产物得率(王秀丽等, 2013)。

此外,将仿生消化液 Cd 溶出量的对数值( $\ln C$ )与溶出时间( $t$ )作图,仅仿生十二指肠液和仿生胆汁  $\ln C-t$  呈明显线性关系,具有一级反应的特点,线性方程分别为  $\ln C=0.0467t+0.4581$  ( $R^2=0.9530$ )和  $\ln C=0.0354t+0.7758$  ( $R^2=0.8891$ )。

### 2.3 溶出量

用仿生唾液、胃液、十二指肠液和胆汁分别提取扇贝样品 20 min、2 h、7 h 和 3 h,胃液中 Cd 溶出量最高(2.93  $\mu\text{g/g}$ ),溶出率高达 98%;唾液中最低(1.03  $\mu\text{g/g}$ ),溶出率约 34%;肠液和胆汁中 Cd 溶出量相差不大(分别为 1.99  $\mu\text{g/g}$  和 2.22  $\mu\text{g/g}$ ),溶出率约 70%。

Cd 溶出量高低与消化液组成和扇贝营养成分有很大关系,唾液中仅含微量淀粉酶,只能对糖类进行初步消化,而扇贝干品中糖类仅占 15%左右(李薇薇, 2011),唾液对其消化能力有限。胃液能对蛋白质进行初步消化,但 Cd 高溶出量可能与其极低的 pH 值(1.07 $\pm$ 0.07)有关。十二指肠液所含的胰液素和脂肪酶能对糖类、蛋白质和脂肪进行消化;胆汁不含消化酶,但能乳化脂肪,属于物理性的消化,对 Cd 溶出有促进作用;另一方面,肠液和胆汁的 pH 偏弱碱性,Cd 溶出受到一定的制约。

### 2.4 影响因素

**2.4.1 消化液组成** 在人体消化系统中,酸度、无机/有机物、消化酶和肠道微生物均对膳食摄入 Cd 的形态和生物可给性方面起重要作用(Oomen *et al.*, 2003; 陈丽惠等, 2013),本研究以扇贝体内 Cd 在纯水(调至相应 pH)、半仿生消化液(无消化酶)和仿生消

化液中的溶出率变化对前三者在消化体系中所起的作用进行初步探讨。

如图 2 所示,pH 对唾液中扇贝样品 Cd 溶出的贡献率高达 63%,这与唾液仅含微量内容物以及唾液本身对富含蛋白的扇贝样品消化能力有限有关。胃液中 Cd 极高的溶出率(>95%)与胃液中的盐酸介质对无机镉和有机镉的浸提作用有关,如 Cd 金属硫蛋白在 pH 为 2.5–3.5 时,有 50%的金属离子发生解离(李敏, 2008)<sup>1)</sup>。当 pH 由 6.5 降至 1.07 时,Cd 溶出率提高了 3.5 倍,同时,极低的 pH 掩盖了胃液中无机/有机物和消化酶对 Cd 溶出率的影响。

无机/有机物的引入使十二指肠液、胆汁和全过程仿生消化液中 Cd 溶出量较单纯酸度影响增长了 76%、111%和 54%,这可能是因为无机盐阳离子(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 等)的竞争吸附效应以及  $\text{Cl}^{-}$ 等无机阴离子与  $\text{Cd}^{2+}$ 形成可溶性配合物均可促进消化食糜中 Cd 的溶解平衡(王祖伟等, 2012、2008)。

十二指肠液和胆汁中消化酶对 Cd 溶出的贡献显著,约占总溶出量的 40%,远大于 pH 和无机/有机物的影响,因此,肠液和胆汁中 Cd 溶出时  $\ln C-t$  呈线性关系的主因可能是受酶反应所控制,消化酶能促进食物中糖、脂肪、蛋白质水解生成小分子物质,从而通过影响 Cd 配合物的配体组成提高 Cd 的溶出率(林路秀等, 2010)。酶效应对于全过程仿生消化液中 Cd 溶出效果的影响更明显,约占总溶出量的 51%,胆汁的乳化作用可能会促进十二指肠液中酶反应的进行。

**2.4.2 样-液比** 在消化液配比为 0.25 : 1.5 : 3 : 1 的体系中,扇贝样品与消化液比例在 1 : 10–1 : 120 时,Cd 溶出率在 62%–69%之间,没有显著差异,但 1 : 20 和 1 : 30 处理时溶出量略高于其他比例。体外

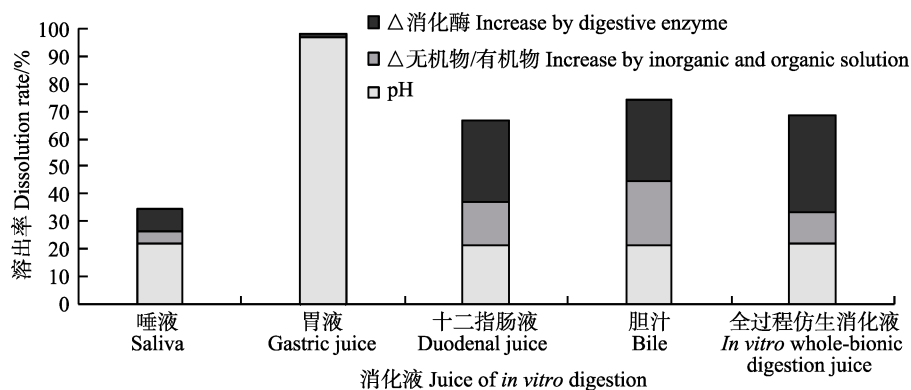


图 2 不同消化液组成对扇贝样品 Cd 溶出率的影响

Fig.2 The effects of different digestion juice on Cd dissolution rate in *C. nobilis*

1) 李敏. 水产品中镉污染的安全评价及其不同形态的影响研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008, 48–66



仿生消化在土壤中污染物的研究中应用更为广泛, Oomen 等(2003)总结了仿生消化在土壤中污染物生物可利用率中的应用发展过程时指出, 土-液比变化对土壤中污染物生物可利用率的影响可能主要来自扩散限制溶解动力学, 土-液比变化对生物可利用率的影响不大, 称样过多可能会降低其生物可利用率, 但扩散本身不是其限制因素。虽然扇贝与土壤的基质不同, 但仿生消化的作用机理相似, 样-液比同样对扇贝体内 Cd 溶出率影响不大。

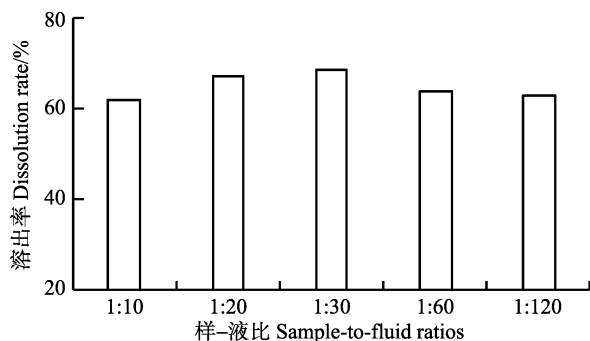


图 3 不同消化液中扇贝样品 Cd 的溶出率  
Fig.3 The dissolution rate of Cd in *C. nobilis* with different digestion

## 2.5 扇贝样品 Cd 生物可给性分析

饮食摄入是人体污染物暴露的主要途径之一, 体外仿生消化研究污染物经口生物利用率也成为评估食品安全风险评估的重要手段。污染物经口生物利用率(Bioavailability)是描述污染物在胃肠道释放(生物可给性, Bioaccessibility)、吸收(穿过小肠上皮细胞的部分)、在肠道或肝脏中代谢(首过效应), 最终到达机体循环系统的过程(李凤琴等, 2011; Oomen *et al.*, 2003), 而全过程仿生消化食糜中 Cd 含量即代表 Cd 在胃肠道的最大释放量, 即扇贝体内 Cd 的最大生物可给率约为 70%。

由图 2 可知, 在胃液强酸条件下, 扇贝体内 Cd 溶出率一度高达 95%以上, 但胃却不是 Cd 的主要吸收器官, 人体吸收膳食中 Cd 的主要部位在十二指肠, 十二指肠对 Cd 的吸收率是空肠和回肠的 2 倍(徐敏, 2009)<sup>1)</sup>, 胃粘膜的阻隔作用和上皮细胞的不断代谢更新可能是 Cd 在胃中不易被吸收的原因, 而肠道内 Cd 溶出率低于胃则应归因于 pH 骤升后 Cd 的沉淀和再吸附(付瑾等, 2012)。

人体对膳食中 Cd 的吸收率一般在 10%以下(吴大伟等, 2010), 基于消化管和血管间的生物膜是

类脂质膜(林路秀等, 2010), 后续可进一步通过脂质体模拟生物膜确认 Cd 的生物可利用性并进行食品安全评价。

## 3 结论

(1) 不同仿生消化液对扇贝体内 Cd 溶出平衡时间不同, 依次为: 仿生唾液>胃液>胆汁>十二指肠液, 仅后 2 种仿生消化液中 Cd 溶出量  $\ln C$  与时间  $t$  呈线性关系, 具有一级反应的特点。

(2) 扇贝体内 Cd 在不同仿生消化液的溶出量顺序为: 胃液>胆汁≈十二指肠液>唾液。消化液 pH 是影响 Cd 溶出量的重要因素, 而在近中性条件下(pH 6-8), 酶解反应对 Cd 溶出量影响显著。

(3) 样-液比在 1:10-1:120 之间, 扇贝体内 Cd 溶出率没有显著差异, 表明样-液比对 Cd 的生物可给率影响不大。

(4) 全过程仿生消化液作用下, 扇贝体内约有 70% Cd 释放溶出, 即最大生物可给率为 70%。

致谢: 福建省水产研究所郑盛华、席英玉和罗冬莲等参与本研究的分析和讨论, 谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- 王丽娟, 吴成业. 水产品中镉的形态分析及其危害. 福建水产, 2014, 36(1): 78-84
- 王秀丽, 王玉蓉, 赵韶华, 等. 仿生酶解法在通心络虫类药物提取中的应用. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1508-1511
- 王祖伟, 吉卫星, 张辉. 土壤盐化过程中阳离子对镉的形态分布影响. 生态环境学报, 2012, 21(6): 1121-1124
- 王祖伟, 刘欣, 么相姝, 等. 可溶性无机盐对土壤中镉形态分布及生物可利用性的影响. 农业环境科学学报, 2008, 27(3): 884-888
- 付瑾, 崔岩山. *In vitro* 系统评价胃液 pH 及土液比对铅、镉、砷生物可给性的影响. 农业环境科学学报, 2012, 31(2): 245-251
- 李凤琴, 徐娇, 刘飒娜. 生物利用率在食品污染物风险评估中的应用. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(1): 17-22
- 李薇薇. 扇贝的综合利用. 农产品加工, 2011(6): 20-21
- 吴大伟, 王龙昌, 周岩民. 铅和镉对动物消化功能的影响及其作用机理. 粮食与饲料工业, 2010(12): 59-61
- 陈红英, 陈旭凌, 陈笑霞, 等. 华贵栉孔扇贝体内重金属含量及评价. 微量元素与健康研究, 2015, 32(1): 33-34, 36
- 陈丽惠, 李顺兴, 牟洋, 等. 仿生技术在转基因大豆中镍形态分析和生物可给性评价中的应用. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(11): 3075-3078

1) 徐敏. 小鼠镉的蓄积性毒性试验及残留分析研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 1-3

林路秀, 李顺兴, 郑凤英. 体外仿生消化-单层脂质体萃取分析莲花清瘟胶囊中微量金属形态、生物可给性和毒性. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2330-2335

林路秀, 李顺兴, 郑凤英. 应用体外仿生模型分析海藻水煎液中微量金属的形态和生物可给性. 分析化学, 2010, 38(6): 823-827

姜元欣, 王伟涛, 陈德慰, 等. 广西北部湾水域贝类重金属污染分析与南宁市民贝类食用风险分析. 食品工业科技, 2013, 34(8): 52-55

赵艳芳, 吴继法, 翟毓秀, 等. 镉胁迫对不同镉富集能力海水养殖贝类抗氧化能力的影响——以扇贝和菲律宾蛤仔为例. 生态毒理学报, 2014, 9(2): 224-232

Oomen AG, Rempelberg CJM, Bruil MA, *et al.* Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Arch Environ Contam Toxicol, 2003, 44(3): 281-287

(编辑 冯小花)

## Preliminary Application of *in vitro* Bionics Digestion Model for Bioaccessibility of Cd in *Chlamys nobilis*

YANG Miaofeng<sup>1,2</sup>①

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-Value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013; 2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361013)

**Abstract** *In vitro* whole-bionic digestion model has been an effective approach to study the bioaccessibility of contaminants in food. Due to the high exposure of cadmium (Cd), samples of *Chlamys nobilis* were pretreated with *in vitro* bionic digestion for the bioaccessibility of Cd. The releasing mechanism of Cd in *C. nobilis* was investigated in a simulated gastrointestinal tract environment where the chyme was obtained at 37°C through digestion with enzymes and inorganic substances in saliva, stomach, and intestine. The samples of *C. nobilis* were treated with four digestion juices separately, including saliva, gastric juice, duodenal juice, and bile. It was found that the dissolution equilibrium time of Cd in the digestion juices followed the order: saliva < gastric juice < bile < duodenal juice. In the bionic experiments, Cd dissolution quantity showed the pattern: gastric juice > bile ≈ duodenal juice > saliva. There was a linear correlation between the logarithm of concentration (lnC) and its corresponding dissolved time (*t*) in duodenal juice ( $R^2=0.9530$ ) and in bile ( $R^2=0.8891$ ), however, no correlation was found in saliva or gastric juice. pH may be the key factor of Cd dissolution in the bionic digestion with saliva and gastric juice, and digestive enzymes played the essential role in the digestion with duodenal juice, bile, and *in vitro* whole-bionic digestion. There was no significant difference when the sample-to-fluid ratio changed from 1:10 to 1:120 (g/ml), implying that this ratio might only slightly affect the bioaccessibility. The releasing ratio of Cd in *C. nobilis* was 70% and the maximum bioaccessibility in *C. nobilis* chyme was also 70%.

**Key words** Cadmium; *in vitro* bionics digestion model; Bioaccessibility

① Corresponding author: YANG Miaofeng, E-mail: miaofenf@sina.com

# 人工鱼礁材料添加物碳封存能力及其对褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)固碳量的影响\*

李 娇 公丕海 关长涛<sup>①</sup> 刘 毅

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 碳汇渔业实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究将农渔废弃物(花生秸秆和海湾扇贝壳)作为鱼礁材料添加物,利用礁体自身碳封存增加人工鱼礁碳汇潜能的可行性,并通过研究礁体附着生物的变化特征,探讨礁体材料添加物对人工鱼礁生态系统生物固碳的影响。结果显示,实验海区礁体附着生物的优势种为褶牡蛎(*Ostrea plicatula* Gmelin),添加了花生秸秆和海湾扇贝壳的人工鱼礁并未显著增加褶牡蛎的附着量( $P>0.05$ )。通过对添加物礁体自身碳封存量的计算,海湾扇贝壳添加物单位实验礁的最小碳封存量为 104.13 kg,最大碳封存量为 260.32 kg;花生秸秆添加物单位实验礁的最小碳封存量为 296.28 kg,最大碳封存量为 740.70 kg;实验礁体添加物的总碳封存量达 2802.87 kg。以此估算,如将实验所在的 66.67 hm<sup>2</sup> 礁区已投放的圆管型混凝土礁材料加入添加物,以海湾扇贝壳替代率为 10% 计算,至少可完成 52040.00 kg 碳的封存,以花生秸秆替代率为 25% 计算,礁体自身的碳封存量可达 370350.00 kg。

**关键词** 人工鱼礁;碳封存;花生秸秆;海湾扇贝壳;附着生物

中图分类号 S953.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)06-0100-05

海洋作为一个巨大的碳汇、气-海界面的“溶解泵”和海洋生物的“生物泵”,影响全球碳循环并完成碳的传输和固定。每年海洋生物光合作用吸收的碳约占全球生物光合作用吸收碳的 55% (Falkowaki *et al.*, 2004; Arrigo *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2009; Bowler *et al.*, 2009), 渔业捕捞和水产增养殖则将大量碳以产品的形式捕获,为人类提供营养物质的同时实现碳移出。人工鱼礁增养殖业通过投放人工构造物为水生生物提供适宜的栖息地,礁区增养殖生物以海区自然饵料为食,无须人工投喂,既不会造成养殖污染又可逐步修复生态环境,增殖渔业资源,提高海洋生物的经济价值和海区的生物碳汇功能。人工鱼礁生态系统中的鱼礁材料可实现碳封存,生态系统环境的改善可提升礁

区的初级生产力,增加光合作用的固碳量,并为其他海洋生物提供丰富的饵料,使礁区渔业资源种类和生物量得到恢复,最终通过经济性渔业资源的捕获实现碳移出。但目前,国内外在人工鱼礁生态系统碳汇机理方面的研究非常匮乏。本研究利用在混凝土礁体材料中添加农渔生产中废弃物秸秆和贝壳,探讨增加礁体自身碳封存作用的可行性和潜能,并通过鱼礁海区投放、礁体生物取样和实验室生物元素检测、种类鉴定及生物量测量等实验手段,分析并对比材料添加物礁体和普通混凝土礁体对生物附着的影响。相关研究表明,2014 年全国秸秆资源的产量达 8 亿 t,秸秆资源目前主要的利用方式有能源、饲料、基料和肥料,但每年因过剩秸秆焚烧导致的环境污染仍影响着人

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016HY-ZD0103)资助。李 娇: E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn。

① 通讯作者: 关长涛, 研究员, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-25, 收修改稿日期: 2016-01-27

们的身体健康和日常生活(韩鲁佳等, 2002; 张强等, 2015; Cao *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2013); 作为贝类养殖大国, 我国每年的贝类产量约占全球总产量的 50%, 而贝壳的利用率却非常低, 由此造成的土地占用和环境污染已成为养殖沿岸面临的主要环境问题(李金志等, 2011; 王金华等, 2003; 姜少杰等, 2001)。本研究选取花生秸秆和海湾扇贝壳作为礁体材料添加物并进行再利用, 不仅可以节约制作成本, 降低秸秆燃烧造成的碳排放, 还可在一定时期内实现碳封存的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 鱼礁制作与投放

实验礁选用山东沿海常用的增殖型圆管礁(图 1), 礁体主尺度直径为 48 mm, 高为 90 mm, 厚度为 4 mm, 空方量为 0.16 m<sup>3</sup>/ind。常规圆管型增殖礁的制作材料是水泥、砂子、石子和石粉, 实验礁以海湾扇贝壳粉和花生秸秆粉为材料添加物, 按一定比例取代石粉(刘殿忠等, 2010; Yang *et al.*, 2009)。添加物混凝土预制件的制备符合相关规范和标准(中华人民共和国住房和城乡建设部, 2011、2008; 国家能源局, 2002; 中华人民共和国建设部国家质量监督检验检疫总局, 2010), 强度不低于 C20, 制作材料配合比例见表 1。从表 1 可以看出, 材料配比完成后, 利用特制的圆管礁模具完成礁体的浇筑, 成型后的礁体经过洒水、晾晒, 待完全凝固后开始在海区投放。每种添加物礁体各制作 250 个, 并由材料相同的 250 个礁体组成一个单位礁, 单位礁体积为 40 空/m<sup>3</sup>, 间距为 30 m。2012 年 4 月完成全部鱼礁的海区投放, 投放站位见表 2。



图 1 增殖型圆管礁

Fig.1 Stock enhancement type of tubular artificial reef

### 1.2 样品处理

分别于 2012 年 6 月、2013 年 4 月、8 月和 2014 年 4 月、8 月, 在山东莱州金城海区投放实验鱼礁, 对 9 种鱼礁附着生物进行调查取样, 其中, 2012 年 6 月取样时未见附着生物。每种添加物鱼礁均随机起吊 3 个进行礁体取样, 取样框尺寸为 20 cm×20 cm, 将取样框内鱼礁表面的礁体附着生物完全采集, 然后封装、标记, 放入保鲜箱中暂存。样品带回实验室后需进行分类、清洗, 贝壳和软体分离、烘干、测定干重、研磨, 最后采用元素分析仪分别测定软体部和贝壳 C、N 元素的含量。

### 1.3 固碳潜能估算方法

人工鱼礁生态系统的碳汇机理是一个复杂的生物地球化学过程, 李娇等(2013) 根据海区实验结果,

表 1 礁体材料和添加物比例  
Tab.1 Reef material and proportion of additives

添加物种类 Category of additive	编号 Number of reef	水泥 Cement (kg)	砂 Sand (kg)	石 Stone (kg)	石粉 Powder of stone (kg)	添加物替代率 Substitution rate of additive (%)	添加物重量 Mass of additive (kg)
海湾扇贝壳 <i>Argopecten irradians</i> shell	B1	17	36	36	32.4	10	3.6
	B2	17	36	36	30.6	15	5.4
	B3	17	36	36	28.8	20	7.2
	B4	17	36	36	27.0	25	9.0
花生秸秆 Peanut straw	J1	17	36	36	32.4	10	3.6
	J2	17	36	36	30.6	15	5.4
	J3	17	36	36	28.8	20	7.2
	J4	17	36	36	27.0	25	9.0
无 None	SN	17	36	36	36.0	0	0

表2 实验礁体投放站位地理坐标

Tab.2 Geographic coordinate of experimental reefs deployed

礁体类型 Type of reef	试验礁编号 Number of reef	东经(E) Longitude(E)	北纬(N) Latitude(N)
海湾扇贝壳礁体 <i>A. irradians</i> shell reef	B1	120°03'48.24"	37°26'32.88"
	B2	120°03'46.98"	37°26'32.70"
	B3	120°03'45.78"	37°26'32.58"
	B4	120°03'48.42"	37°26'31.86"
花生秸秆礁体 Peanut straw reef	J1	120°03'47.22"	37°26'31.74"
	J2	120°03'45.96"	37°26'31.56"
	J3	120°03'44.76"	37°26'31.44"
	J4	120°03'43.56"	37°26'31.32"
常规礁体 Regular reef	SN	120°03'42.30"	37°26'31.14"

对礁体附着生物和礁体材料添加的固碳量进行估算, 计算公式如下:

$$C_B = C_S \times E_S + C_O \times E_O \quad (1)$$

$$C_T = \rho \times V \times C_R \quad (2)$$

式中,  $C_B$  为附着褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)的总固碳量,  $C_S$  为褶牡蛎的壳体碳含量,  $E_S$  为褶牡蛎的壳体总重,  $C_O$  为褶牡蛎软体部碳含量,  $E_O$  为附着褶牡蛎的软体部总重。  $C_T$  为礁体总固碳量,  $C_R$  为礁体添加物碳含量,  $V$  为添加物体积,  $\rho$  为添加物密度。

## 2 结果与分析

### 2.1 礁体附着生物的分类和鉴定

通过礁体起吊观测和附着生物取样, 共鉴定出30种附着生物, 包括16种多毛类, 占53.3%; 软体类7种, 占23.3%; 甲壳类6种, 占20%; 附着植物1种, 占3.3%。多毛类中优势种是管栖性的盘管虫属(*Hydroides*), 甲壳类没有明显的优势种类, 附着植物以江篱(*Gracilaria confervoides*)为主, 褶牡蛎是软体类中的优势种, 同时是所有附着生物中的绝对优势种, 占礁体附着生物总生物量的99.7%。礁体附着生物观测显示, 绝大多数褶牡蛎的软体部脱落, 少量附着褶牡蛎含有非常小的软体部, 因此, 通过研究褶牡蛎壳

体的变化、分布, 分析材料添加物对礁体褶牡蛎附着的影响。

### 2.2 材料添加物礁体的附着褶牡蛎壳体碳含量测定及其变化

利用元素分析仪测得海湾扇贝壳体碳含量平均值为(11.57±0.04)%, 花生秸秆碳含量平均值为(32.92±0.62)%。表3为不同添加物和配合比礁体附着褶牡蛎的壳体平均碳含量。SPSS17.0 差异显著性检验及相关分析结果显示, 不同材料添加物和配合比礁体附着褶牡蛎壳的碳含量差异不显著( $P>0.05$ )。不同添加物和配合比礁体附着褶牡蛎壳体干重变化统计显示(图2、表4), 褶牡蛎壳干重在同一取样时间也没有显著差异( $P>0.05$ ), 说明礁体材料添加物对附着褶牡蛎的生长没有明显的影响; 相同添加物和配合比礁体的附着褶牡蛎壳干重有显著的季节变化( $P<0.01$ ), 并随着投放时间的积累呈现增加的趋势。其中, 2014年4月的褶牡蛎壳干重略低于2013年12月, 这与公丕海等(2014)研究的每年4月取样褶牡蛎壳干重低于上一年12月相一致, 并符合范昌福等(2012)提出的渤海湾西岸牡蛎(*Ostrea gigas*)停止分泌壳体的最低平均水温为5.5℃的生长特性。根据2011–2014年对实验海区生态环境跟踪监测的数据, 4个年度12月底和3月下旬的底层海水温度均低于5℃, 因此, 壳体停止分泌, 褶牡蛎死亡和环境外力引起的壳体脱落等原因造成壳体干重在4月略低于上一年的12月。

### 2.3 添加物礁体碳封存量和潜能估算

添加物礁体碳封存量及实验礁总碳封存量见表5。从表5可以看出, 实验用海湾扇贝壳体碳含量平均值为11.57%, 花生秸秆碳含量平均值为32.92%, 单个贝壳添加物礁体的最小碳封存量为0.41652 kg, 最大碳封存量为1.0413 kg。单个花生秸秆添加物礁体的最小碳封存量为1.18512 kg, 最大碳封存量为2.96280 kg。本研究中单位鱼礁由250个单体鱼礁组成, 贝壳添加物

表3 不同添加物和配合比礁体附着褶牡蛎的壳体平均碳含量

Tab.3 Average carbon content of *O. plicatula* shell adhering to reefs with different additive types and proportions (%)

礁体编号 Number of reef	B1	B2	B3	B4	J1	J2	J3	J4	SN
碳含量分布 Range of carbon content	10.56–11.03	10.41–11.20	10.75–11.16	10.45–11.12	10.70–11.48	10.26–11.48	10.51–11.29	10.30–11.14	10.37–11.18
平均碳含量 Average carbon content	10.79±0.19	10.78±0.32	10.92±0.18	10.87±0.30	11.09±0.32	11.11±0.40	11.00±0.35	10.81±0.36	10.82±0.34



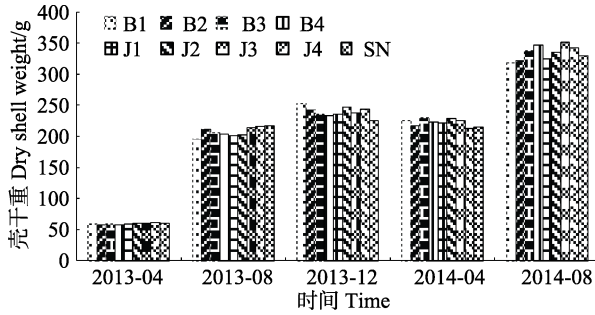


图 2 附着褶牡蛎壳干重的年季变化

Fig.2 Seasonal and annual weight variation of *O. plicatula* shell adhering to reefs

单位礁体的最小碳封存量为 104.13 kg、2.60 kg/空·m<sup>3</sup>、最大碳封存量为 260.33 kg、6.51 kg/空·m<sup>3</sup>；花生秸秆添加物单位礁体的最小碳封存量为 296.28 kg、7.41 kg/空·m<sup>3</sup>，最大碳封存量为 740.70 kg、18.52 kg/空·m<sup>3</sup>；实验礁体添加物的总碳封存量达 2802.87 kg，平均碳封存量为 8.76 kg/空·m<sup>3</sup>。

本研究选择的海区截至 2011 年已完成 66.67 hm<sup>2</sup> 海洋牧场的投建，共投放圆管型单位鱼礁 500 座，每个单位礁由 250 个单体鱼礁组成，圆管礁均采用普通

混凝土构件制作材料，如果在礁体材料中加入添加物，以海湾扇贝壳替代率 10%计算，可完成 52040.00 kg 碳的封存，以花生秸秆替代率 25%计算，66.67 hm<sup>2</sup> 海洋牧场礁体自身的碳封存量可达 370350.00 kg。

### 3 结论

研究结果显示，花生秸秆和海湾扇贝壳的添加物在扩增礁体附着褶牡蛎生物固碳方面没有明显优势 ( $P>0.05$ )；但添加物可有效提高礁体自身的碳封存能力，贝壳添加物单位实验礁的最小碳封存量为 104.13 kg，最大碳封存量为 260.33 kg；花生秸秆添加物单位实验礁的最小碳封存量为 296.28 kg，最大碳封存量为 740.70 kg；实验礁体添加物的总碳封存量达 2802.87 kg。通过对材料添加物混凝土礁体的试制和海区实测，本研究验证了以花生秸秆和海湾扇贝壳作为添加物制作礁体的可行性，为利用人工鱼礁的制作和投放来实现对废弃物资源中碳的封存提供了有效方法，而材料添加物的使用不仅可以通过礁体的海底投放来完成碳封存，同时节约鱼礁成本，实现废弃资源的循环再利用，为生态型鱼礁材料的开发利用提供了依据。

表 4 不同添加物和配合比礁体附着褶牡蛎壳体干重分布

Tab.4 Dry weight of *O. plicatula* shell adhering to reefs with different additive types and proportions

编号 Number	采样时间 Sampling time				
	2013-04	2013-08	2013-12	2014-04	2014-08
B1	58.90±1.53	196.30±22.86	253.30±12.19	225.40±11.62	319.00±15.19
B2	58.40±3.08	212.00±13.20	243.20±6.26	218.00±18.46	323.00±5.71
B3	59.60±2.32	206.60±12.57	236.60±31.94	230.00±7.53	339.00±25.91
B4	58.00±1.69	204.10±7.96	234.50±18.35	223.20±7.91	347.50±27.30
J1	59.80±1.74	201.40±17.23	235.90±18.17	222.50±6.85	325.70±17.97
J2	60.30±3.20	203.30±7.32	248.20±19.40	229.90±15.18	335.80±21.20
J3	61.00±1.27	214.90±5.99	239.00±37.96	226.50±19.27	352.20±16.30
J4	61.60±1.17	217.30±17.80	244.30±22.55	213.00±6.53	343.70±27.35
SN	60.90±3.09	217.70±14.35	225.90±28.10	215.40±14.29	331.00±27.14

表 5 礁体添加物固碳量及实验礁体总固碳量

Tab.5 Carbon fixed by additives and its total amount fixed by experimental reefs

编号 Number	添加物种类及碳含量 Category and carbon content of additive	添加物重量 Mass of additive (kg)	单个礁体固碳量 Carbon fixed by single reef (kg)	单位礁体固碳量 Carbon fixed by unit reef (kg)	总固碳量 Total carbon fixed (kg)
B1	海湾扇贝壳 11.57%	3.6	0.42	104.1	2802.9
B2	<i>A. irradians</i> shell 11.57%	5.4	0.63	156.2	
B3		7.2	0.83	208.3	
B4		9.0	1.04	260.3	
J1	花生秸秆 32.92%	3.6	1.19	296.3	
J2	Peanut straw 32.92%	5.4	1.11	444.4	
J3		7.2	2.37	592.6	
J4		9.0	2.96	740.7	
SN	无 None	0	0	0	0

## 参 考 文 献

- 中华人民共和国住房和城乡建设部. 普通混凝土混合比设计规程(JGJ55-2011). 北京: 中国建筑工业出版社, 2011
- 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国建设部国家质量监督检验检疫总局. 混凝土结构耐久性设计规范(GB/T50476-2007). 北京: 中国建筑工业出版社, 2008
- 中华人民共和国建设部国家质量监督检验检疫总局. 混凝土强度检验评定标准(GB50107-2010). 北京: 中国建筑工业出版社, 2010
- 公丕海, 李娇, 关长涛, 等. 莱州湾增殖礁附着牡蛎的固碳量试验与估算. 应用生态学报, 2014, 25(10): 3032-3038
- 王金华, 胡宗玢. 一种以贝壳为骨料的混凝土. 专利号: CNB88081A, 2003
- 李娇, 关长涛, 公丕海, 等. 人工鱼礁生态系统碳汇机理及潜能分析. 渔业科学进展, 2013, 24(1): 65-69
- 李金志. 贝壳的综合利用. 淮海工学院学报, 2001, 10(s1): 22-23
- 刘殿忠, 于莹, 夏法磊, 等. 秸秆混凝土配合比设计. 吉林建筑工程学院学报, 2010, 27(1): 19-21
- 张强, 李耀庄, 刘保华. 秸秆资源在混凝土中应用的研究进展. 硅酸盐通报, 2015, 34(4): 1000-1003
- 国家能源局. 水下混凝土施工规范(DL/T5144-2001). 北京: 中国电力出版社, 2002
- 范昌福, 王宏, 裴艳东, 等. 渤海湾太平洋牡蛎壳体记录的冬季停止分泌/春季恢复生长的最低水温. 地球学报, 2012, 33(6): 953-960
- 姜少杰, 王伟定, 胡庆松, 等. 一种贝壳方礁的制备方法. 专利号: CN102217565A, 2011, 10, 19
- 韩鲁佳, 闰巧娟, 刘向阳, 等. 中国农作物秸秆资源及其利用现状. 农业工程学报, 2002, 18(3): 87-91
- Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles. Nature, 2005, 437 (7057): 349-355
- Bowler C, Karl DM, Colwell RR. Microbial oceanography in a sea of opportunity. Nature, 2009, 459(7244): 180-184
- Cao GL, Zhang XY, Wang YQ, et al. Estimation of emissions from field burning of crop straw in China. Chinese Sci Bul, 2008, 53(5): 784-790
- Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, et al. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. Science, 2004, 305(5682): 354-360.
- Simon N, Cras AL, Foulon E, et al. Diversity and evolution of marine phytoplankton. Comp Rendus Biol, 2009, 332(2-3): 159-170
- Wei SY, Shen GF, Zhang YY, et al. Field measurement on the emissions of PM, OC, EC and PAHs from indoor crop straw burning in rural China. Environ Pollut, 2013, 184(1): 18-24
- Yang EI, Kim MY, Park HG, et al. Effect of partial replacement of sand with dry oyster shell on the long-term performance of concrete. Cons Build Mater, 2009, 24(5): 758-765

(编辑 陈严)

## Carbon Sequestration of Additives of Artificial Reefs and Its Effect on Carbon Fixation of *Ostrea Plicatula* Gmelin

LI Jiao, GONG Pihai, GUAN Changtao<sup>①</sup>, LIU Yi

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Carbon-Sink Fisheries Laboratory, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study we investigated the potential alteration of carbon sequestration capability of artificial reef eco-system caused by the additives peanut straw and *Argopecten irradians* shell. After the intensity test four types of reefs with different proportions of additives were selected for experiments, and the effects of additives on carbon fixation by various fouling organisms adhering to the reefs were analyzed. It was found that *Ostrea plicatula* Gmelin was the dominant species of fouling organisms, and that additives did not apparently affect the fouling organisms. Peanut straw and *A. irradians* shell did not improve the carbon sequestration of *O. plicatula* Gmelin ( $P>0.05$ ). The calculation of carbon sequestration in the reefs with addition of shell showed that the minimum carbon content per unit reef was 104.13 kg and 2.60 kg per hollow stere, and that the maximum content per unit reef was 260.32 kg and 6.51 kg per hollow stere. As for reefs with straw, the minimum content per unit reef was 296.28 kg and 7.41 kg per hollow stere; the maximum content per unit reef was 740.70 kg and 18.52 kg per hollow stere. The total carbon fixed by experimental reefs was up to 2802.87 kg. In this experiment each unit included 250 reefs. Assuming all the reefs within the marine area of about 66.67 hm<sup>2</sup> contain additives, we calculated that reefs with 10% substitution of *A. irradians* shell could fix 52040.00 kg carbon, and that reefs with 25% substitution of peanut straw could fix 370350.00 kg carbon. Our results suggested that sequestration of reefs could be an effective method to improve carbon sinking. The effects of crop straws and shell as additives of artificial reefs need to be further investigated in the future.

**Key words** Artificial reefs; Carbon sequestration; Peanut straw; *Argopecten irradians* shell; Fouling organism

① Corresponding author: GUAN Changtao, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

# 金乌贼(*Sepia esculenta*)早期发育阶段 相关酶活性的变化\*



刘长琳 刘思玮 赵法箴 陈四清<sup>①</sup> 刘春胜 燕敬平

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用生化方法测定了金乌贼(*Sepia esculenta*)不同发育阶段的受精卵以及 0–10 日龄幼体的胰蛋白酶、胃蛋白酶、碱性磷酸酶、脂肪酶和谷丙转氨酶 5 种酶比活力的变化。结果显示,可溶性蛋白浓度总体呈先上升后下降再上升的变化趋势,其中,在囊胚和原肠期(II)最高,在初孵幼体(VII)中最低,含量分别为 81.50 mg/g 和 4.24 mg/g。胰蛋白酶、胃蛋白酶和谷丙转氨酶比活力的变化趋势相近,总体呈先上升后下降再上升的变化趋势,其中,在胚胎发育阶段均能检测出这 3 种酶的活性,说明主要自母体获得,但活力相对较低;在初孵幼体中,这 3 种酶活性均显著升高,比活力分别为 0.51 U/g、1.68 U/mg 和 37.84 U/g;5 日龄幼体(VIII)中,3 种酶比活力均显著下降至出膜前水平;10 日龄幼体(IX)中,3 种酶比活力均有小幅度上升。碱性磷酸酶和脂肪酶比活力的变化趋势相近,总体呈上升趋势,其中,在胚胎发育阶段仅检测到这 2 种酶的极低活性,幼体孵出后 2 种酶的比活力才显著上升,标志着器官发育的逐步完善和消化能力的逐步增强。

**关键词** 金乌贼; 胚胎发育; 可溶性蛋白; 消化酶

**中图分类号** Q954.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0105-05

作为海水养殖新品种,金乌贼(*Sepia esculenta*)具有生命周期短(通常 1 年)、生长速度快、个体大(均重 700 g)、营养丰富、可食率高等特点,消费市场的需求旺盛,增养殖前景广阔。目前,我国已攻克了金乌贼苗种繁育技术,但苗种培育成活率相对较低,大规模苗种的缺乏成为产业化推广养殖的一大限制瓶颈。

消化酶是一种主要由消化腺和消化系统分泌的营消化作用的酶类,其活性的大小反映了动物的消化能力和营养需求(Lemieux *et al*, 1999),开展水产动物早期发育阶段消化酶活性变化的研究可用于幼体的营养需求分析,还可通过建立和优化投喂方式来提高

苗种的成活率(Diaz *et al*, 1997)。近年来,有关早期发育阶段消化酶活性变化的研究已经在甲壳类(田华梅等, 2003)、鱼类(何滔, 2011<sup>1)</sup>; 孙敏等, 2012; Ribeiro *et al*, 2008)和贝类(孙虎山等, 2008)中展开。在乌贼科种类消化酶研究方面,目前仅见少量报道(Perrin *et al*, 2004; 郝振林, 2010<sup>2)</sup>; 陆伟进, 2012<sup>3)</sup>),且局限在幼体和成体,未见早期发育阶段消化酶活力变化的报道。

本研究对金乌贼早期发育阶段消化酶及与消化相关的谷丙转氨酶的活力进行测定,以期解析消化酶活力的变化与营养物质利用及发育进程的关系,进而为提高初孵幼体的质量及优化开口饵料供给提供理论指导。

\* 国家科技支撑计划(2011BAD13B08)和中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022013021)共同资助。刘长琳, E-mail: liuchl@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2015-09-15, 收修改稿日期: 2015-11-09

1) 何滔. 条石鲷早期发育及相关酶活性的研究. 中国科学院研究生院博士研究生学位论文, 2011

2) 郝振林. 金乌贼繁殖、发育及荧光标志技术的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010

3) 陆伟进. 曼氏无针乌贼消化系统组织细胞学和酶化学的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2012

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用金乌贼受精卵和幼体于2014年6-7月取自青岛金沙滩水产开发有限公司。受精卵由野生金乌贼亲体自然产卵获得,孵化水温为18-25℃。仔金乌贼孵化后第2天开始投喂糠虾,每天投喂2次,投喂量为仔乌贼幼体体重的2%-3%。取样时,先在同一批次受精卵中随机取3-5粒,剥离三级卵膜后在解剖镜下观察,参考陈四清等(2010)的方法,确定胚胎发育时期。对金乌贼早期发育阶段卵裂期(I)、囊胚期和原肠期(II)、外部器官形成期(III)、红珠期和黑珠期(IV)、心跳期(V)、出膜期(VI)的受精卵及初孵幼体(VII)、5日龄幼体(VIII)、10日龄幼体(IX)进行取样,其中,仔乌贼孵化后,每天上午于投饵前随机取样。每个阶段取样20-30g(受精卵约20粒,幼体约100个),放入-80℃超低温冰箱中保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 酶液的制备** 金乌贼胚胎发育各时期及幼体各阶段分别取1-2g样品,加入4倍体积(W/V)预冷生理盐水,在电动匀浆机中匀浆,然后用TGL-16 G型冷冻离心机离心10 min(4℃、2500 r/min),取上清液,置于4℃冰箱保存备用。

**1.2.2 酶活性的测定** 胰蛋白酶(Trypsin)测定参照 Erlanger(1961),胃蛋白酶(Pepsin)、碱性磷酸酶(AKP)、脂肪酶(Lipase)和谷丙转氨酶(ALT)活性均采用南京建成生物工程公司生产的试剂盒测定。可溶性蛋白含量用考马斯亮蓝-蛋白测定试剂盒测定,用于计算消化酶的相对活性。酶的活力单位(U)除以相应酶液中可溶性蛋白含量即为酶的比活力。每组实验设3个平行样,结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 可溶性蛋白浓度的变化

由图1可知,在金乌贼胚胎发育阶段可溶性蛋白含量处于较高水平,且波动较大,呈现先升后降的趋势,其中,在囊胚和原肠期最高,达到(81.50±11.70) mg/g,后逐渐下降。仔金乌贼孵化出膜后,蛋白含量急剧下降至(4.24±2.73) mg/g。随后,其含量又逐渐上升,但到10日龄,蛋白浓度略有降低。

### 2.2 胰蛋白酶比活力的变化

由图2可知,在金乌贼胚胎发育阶段胰蛋白酶比

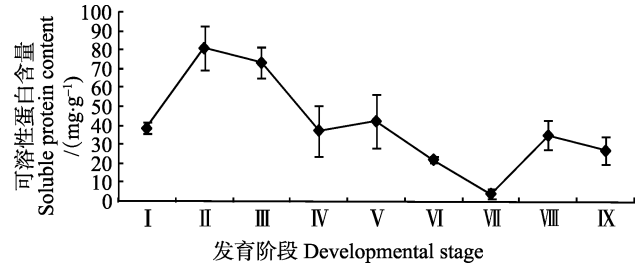


图1 金乌贼早期发育阶段可溶性蛋白含量变化  
Fig.1 Variation of soluble protein contents in early developmental stages of *S. esculenta*

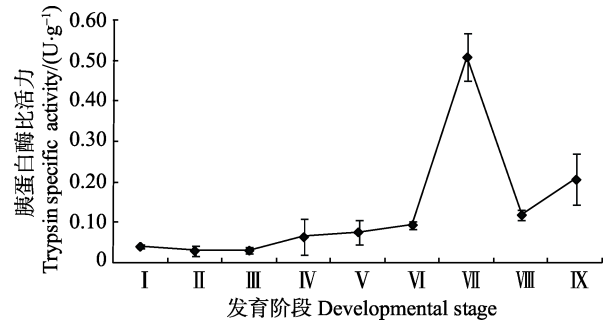


图2 金乌贼早期发育阶段胰蛋白酶比活力的变化  
Fig.2 Variation of the trypsin specific activity in early developmental stages of *S. esculenta*

活力处于较低水平,总体呈上升的趋势。仔金乌贼孵化出膜后,胰蛋白酶比活力急剧增加至(0.51±0.06) U/g。随后,其活性开始下降,5日龄幼体酶比活力降至(0.12±0.01) U/g,但仍高于胚胎发育期,10日龄幼体的酶比活力又逐渐上升。

### 2.3 胃蛋白酶比活力的变化

由图3可知,在金乌贼胚胎发育阶段,胃蛋白酶相对活性相对较低,且波动幅度不大,范围在0.2-0.5 U/mg,其中,外部器官形成期胚胎的比活力最高。仔金乌贼孵化出膜后胃蛋白酶比活力急剧上升至(1.68±0.30) U/mg,随后,其活力开始下降,5日龄幼体的酶比活力降至(0.28±0.21) U/mg,10日龄又上升至(0.69±0.27) U/mg。

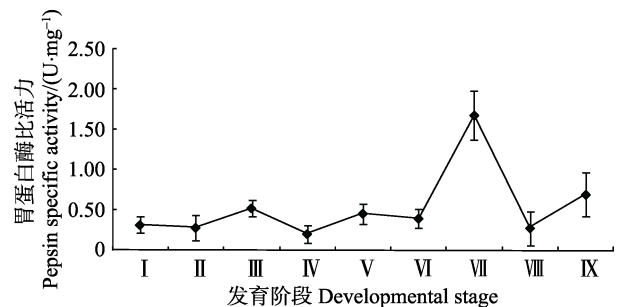


图3 金乌贼早期发育阶段胃蛋白酶比活力的变化  
Fig.3 Variation of the pepsin activity in early developmental stages of *S. esculenta*



## 2.4 碱性磷酸酶比活力的变化

由图 4 可知,在金乌贼早期发育阶段,碱性磷酸酶比活力总体呈上升趋势,且在胚胎发育阶段碱性磷酸酶比活力极低,至仔金乌贼孵化出膜后急剧上升,其中,初孵幼体的酶比活力为 $(0.02\pm 0.01)$  U/g, 10 日龄幼体为 $(0.03\pm 0.01)$  U/g。

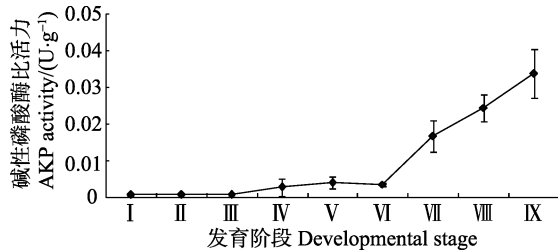


图 4 金乌贼早期发育阶段碱性磷酸酶比活力的变化  
Fig.4 Variation of the AKP activity in early developmental stages of *S. esculenta*

## 2.5 脂肪酶比活力的变化

由图 5 可知,在金乌贼早期发育阶段,脂肪酶比活力总体呈上升趋势。在胚胎发育阶段,脂肪酶比活力极低,上升趋势不明显。仔金乌贼孵化出膜后,脂肪酶比活力急剧上升至 $(34.39\pm 3.72)$  U/g, 5 日龄幼体略有上升, 10 日龄幼体迅速升高至 $(75.00\pm 8.40)$  U/g。

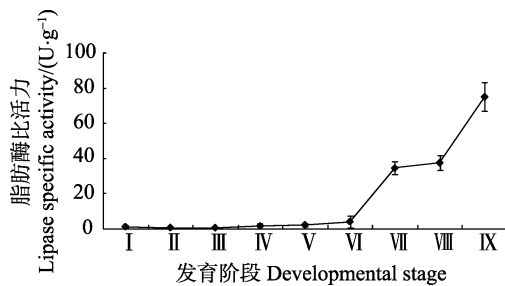


图 5 金乌贼早期发育阶段脂肪酶比活力的变化  
Fig.5 Variation of the lipase specific activity in early developmental stages of *S. esculenta*

## 2.6 谷丙转氨酶比活力的变化

由图 6 可知,在金乌贼胚胎发育阶段,谷丙转氨酶比活力呈上升趋势,但处于较低水平。仔金乌贼孵化出膜后,初孵幼体的谷丙转氨酶比活力急剧增加至 $(37.84\pm 6.79)$  U/g, 随后金乌贼幼体的谷丙转氨酶比活力急剧下降至低于出膜前水平。

## 3 讨论

### 3.1 可溶性蛋白浓度

可溶性蛋白是动物胚胎发育时期的主要营养来

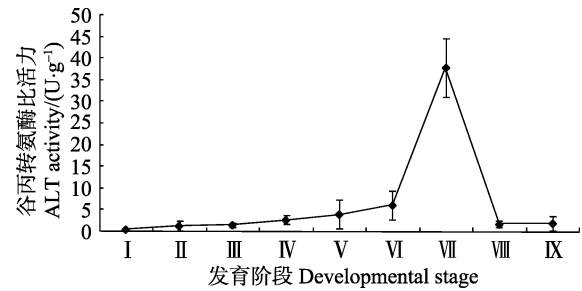


图 6 金乌贼早期发育阶段谷丙转氨酶比活力的变化  
Fig.6 Variation of the ALT activity in early developmental stages of *S. esculenta*

源,也以酶的形式存在,可以分解卵黄物质(Srivastava *et al*, 1995; Gunasekera *et al*, 1999)。金乌贼在胚胎发育阶段可溶性蛋白浓度处于较高水平,且波动较大,呈先升后降的趋势,其中,囊胚和原肠期最高,后逐渐下降,与长蛸(*Octopus variabilis*)胚胎发育过程中可溶性蛋白的变化趋势一致(詹萍萍等, 2010)。田华梅等(2003)认为,在胚胎发育早期自母体提供的相关酶类不断分解卵黄物质,以提供组织或器官构建所需的物质和能量,但由于头足类卵裂为不完全的盘状卵裂,盘状卵裂只发生在卵黄表面(詹萍萍等, 2010),利用和消耗的营养物质较少,可溶性蛋白浓度上升,为后期的胚胎发育积累能量。金乌贼胚胎发育进入器官形成期后,细胞分裂、组织分化及器官形成处于快速发展阶段(陈四清等, 2010),需要消耗大量的蛋白为胚胎的代谢提供营养,此时可溶性蛋白的消耗量大于酶水解量,其浓度开始逐渐降低,至幼体孵出后绝大部分卵黄蛋白被消耗,含量达到最低。金乌贼幼体孵出后,幼体主要消化器官的功能逐步完善,合成新蛋白质的速度高于蛋白质的消耗速度,使可溶性蛋白的浓度有所升高。

### 3.2 消化酶比活力

胰蛋白酶、胃蛋白酶和碱性磷酸酶是关系到仔鱼蛋白消化吸收最主要的消化酶,也是肝胰脏、胃、肠等主要消化器官开始功能化的标志性酶(Zambonino *et al*, 2001)。在金乌贼胚胎发育阶段就能检测到胰蛋白酶和胃蛋白酶,不仅说明这两种消化酶主要是由受精卵自母体获得,还说明金乌贼在胚胎发育阶段已经能够进行蛋白质消化利用,因此,蛋白质是胚胎期所需能量主要来源,这与头足类成体能量主要来源于蛋白质的研究结论一致(Lee, 1994; Garcia *et al*, 2002)。在金乌贼幼体孵出后,胰蛋白酶和胃蛋白酶比活力急剧升高,其原因主要表现在两个方面:第一,初孵幼体的能量主要由卵黄提供,仔金乌贼孵化出膜后更多的母源胰蛋白酶和胃蛋白酶被激活,用于更多卵黄蛋白的



消化,在条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)(何滔, 2011<sup>1)</sup>)和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)(Faulk *et al.*, 2007)中也有类似的情况;第二,可能与取样方式有关,在胚胎发育阶段采用的是受精卵整体匀浆,样品中包括厚厚的三级卵膜以及体积不断增加的卵周液(陈四清等, 2010),而幼体孵出后采用的仅是幼体整体匀浆,造成活性急剧升高。金乌贼幼体孵出后,残留卵黄逐渐被吸收掉,并开口摄食糠虾,此时,由于母源蛋白酶量的不断消耗以及内源性营养向外源性营养转换期间幼体对饵料转变的不适应(Ribeiro *et al.*, 1999),导致胰蛋白酶和胃蛋白酶相对活性逐渐下降,到 5 日龄降到最低,此后,随着胰腺和胃腺的逐渐发育完善,其活性开始上升,说明金乌贼开始摄食后已具有充分的消化饵料的能力。

碱性磷酸酶(AKP)主要存在于鱼类前肠上皮细胞的浅部和纹状缘上,是一种可帮助肠上皮细胞吸收的金属酶,与脂类、葡萄糖、钙和无机磷的吸收存在正相关性(Tengjaroenkul *et al.*, 2000; 冯晓燕等, 2003)。Zamani 等(2009)认为, AKP 活性的增加标志肠细胞的持续发育, Beedham(1958)认为可能与贝类幼虫变态及胚壳的形成有关。金乌贼胚胎发育至外部器官形成期时 AKP 比活力极低,发育至红珠和黑珠期时活力逐渐上升,由此推测,金乌贼在红珠和黑珠期时已经开始了肠细胞的增殖与分化,内壳也逐渐开始形成。金乌贼幼体孵出后, AKP 活性显著升高,说明肠的功能逐渐发育完善,且对脂类、葡萄糖、钙和无机磷的吸收能力逐渐增强。此外,孙虎山等(2008)认为,贝类原肠胚之前的各个发育阶段无吞噬细胞的分化,只能依靠分子防御系统抵抗外来生物侵蚀, AKP 可能在其早期发育阶段对抵抗病原生物感染发挥重要作用。金乌贼早期发育阶段 AKP 是否具有抵御病原生物感染作用,还需要结合免疫学研究进行进一步验证。

Oozeki 等(1995)认为,鱼类个体发育早期存在两种类型的脂肪酶,一种用于卵黄的吸收,而另一种用于外源性脂肪的消化。金乌贼胚胎发育阶段脂肪酶相对活性极低,说明内源性营养阶段用于卵黄吸收的脂肪酶含量极低,表明脂肪不是胚胎发育能量的主要来源,这与欧洲乌贼(*Sepia officinalis*)的研究结果一致(Sykes *et al.*, 2009)。由于能量主要来源于脂类的海洋鱼类都具有富含脂类的油球(Love, 1980),而乌贼类受精卵不含油球,推测脂肪不是其胚胎发育能量的主要来源的原因可能与受精卵不含油球有关。金乌贼孵化出膜后,脂肪酶相对活性逐渐上升,直至 50 日龄活力才

趋于平缓(郝振林, 2010<sup>2)</sup>),推测金乌贼孵化后脂肪酶活性上升主要是用于外源性脂肪的消化,其相对活性的增加反映出仔金乌贼胰腺的发育、脂肪代谢系统的完善和对食物脂质利用能力的增加,以利于仔金乌贼开口摄食后外源性脂肪的消化。

谷丙转氨酶(ALT)是氨基酸代谢过程中重要的氨基转移酶,主要在催化  $\alpha$ -酮戊二酸与天冬氨酸生成谷氨酸与草酰乙酸的过程中起氨基转移作用,通常根据血清中转氨酶活性的变化判断肝脏等组织器官的功能状况(陈晨等, 2010)。目前,关于水产动物 ALT 活性研究主要集中在化学物质对其活性的影响(陈晨等, 2010; 王媛等, 2005; 谭娟等, 2001),迄今为止,未见关于早期发育阶段 ALT 活力变化的研究报道。在金乌贼胚胎发育阶段 ALT 就具有一定的活性,说明 ALT 主要从母体获得。初孵幼体的 ALT 相对活性急剧增加,其原因可能是由于幼体孵出后失去了卵膜的保护,受环境突变胁迫所致,此后,随着幼体对环境的适应性增强,环境胁迫的影响逐渐消失,使得 ALT 活性逐渐降低至出膜前水平且逐步趋于稳定。

## 参 考 文 献

- 王媛, 杨康健, 吴中, 等. 氯氰菊酯对鲫鱼血清中谷丙转氨酶及谷草转氨酶活力的影响. 水产科学, 2005, 24(9): 8-10
- 田华梅, 王群, 赵云龙, 等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中的消化酶活力及氨基酸组成. 中国水产科学, 2003, 10(5): 404-408
- 冯晓燕, 郑家声, 王梅林. 许氏平鲈消化道的组织化学研究. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(3): 399-404
- 孙虎山, 王宜艳, 梁建光, 等. 贻贝(*Mytilus edulis*)发育早期酸性和碱性磷酸酶活性. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 42-48
- 孙敏, 柴学军, 许源剑, 等. 日本黄姑鱼早期发育过程中消化酶活性变化研究. 上海海洋大学学报, 2012, 21(6): 965-970
- 陈四清, 刘长琳, 庄志猛, 等. 金乌贼(*Sepia esculenta*)胚胎发育的研究. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 1-7
- 陈晨, 黄峰, 舒秋艳, 等. 共轭亚油酸对草鱼生长、肌肉成分、谷草转氨酶及谷丙转氨酶活性的影响. 水生生物学报, 2010, 34(3): 647-651
- 詹萍萍, 王春琳, 张晓梅, 等. 长蛸胚胎发育过程中可溶性蛋白含量及组成变化. 海洋学研究, 2010, 28(4): 65-69
- 谭娟, 尚蕾, 肖雅元. 甲氰菊酯对尼罗罗非鱼组织乙酰胆碱酯酶、谷丙转氨酶和谷胱甘肽活性的影响. 淡水渔业, 2001, 41(3): 39-42 转 21
- Beedham GE. Observation on the mantle of the lamellibranchia. Quart J Microscop Sci, 1958, 99(2): 181-197
- Diaz M, Moyano FJ, Garcia-Carreno FL, *et al.* Substrate-SDS determination of protease activity through larval development in sea bream. Aquacult Int, 1997, 5(5): 461-471
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys, 1961, 95(2): 271-278

1) 何滔. 条石鲷早期发育及相关酶活性的研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011

2) 郝振林. 金乌贼繁殖、发育及荧光标志技术的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010

- Faulk CK, Benninghoff AD, Holt GJ. Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *J Fish Biol*, 2007, 70(2): 567–583
- García BG, Giménez FA. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 2002, 211(1–4): 171–182
- Gunasekera RM, Silva SSD, Ingram BA. The amino acid profiles in developing eggs and larvae of the freshwater Percichthyid fishes, trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquat Living Res*, 1999, 12(4): 255–261
- Lee PG. Nutrition of cephalopods: fueling the system. *Mar Freshwater Behav Physiol*, 1994, 25(1): 35–51
- Lemieux H, Blier P, Dutil JD. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiol Biochem*, 1999, 20(4): 293–303
- Love RM. *Chemical Biology of Fishes*. London: Academic Press, 1980, 1968–1977
- Oozeki Y, Bailey KM. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Mar Biol*, 1995, 122(2): 177–186
- Perrin A, Bihan EL, Koueta N. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 311(2): 267–285
- Ribeiro L, Couto A, Olmedo M, *et al.* Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Aquacult Res*, 2008, 39(4): 339–346
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu CL, *et al.* Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 1999, 179(1): 465–473
- Srivastava RK, Brown JA, Shahidi F. Changes in the amino acid pool during embryonic development of cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 1995, 131(1): 115–124
- Sykes AV, Almansa E, Lorenzo A, *et al.* Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. *Aquacult Nutr*, 2009, 15(1): 38–53
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Caceci T, *et al.* Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 2000, 182(3): 317–327
- Zamani A, Hajimoradloo A, Madani R, *et al.* Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. *J Fish Biol*, 2009, 75(4): 932–937
- Zambonino IJL, Cahu CL. Ontogeny of the digestive tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 130(4): 477–487

(编辑 冯小花)

## Changes in Activities of Related Enzymes in Early Developmental Stages of *Sepia esculenta*

LIU Changlin, LIU Siwei, ZHAO Fazhen, CHEN Siqing<sup>①</sup>, LIU Chunsheng, YAN Jingping

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** Chemical and biological methods were employed to determine specific activities of several enzymes including trypsin, pepsin, alkaline phosphatase (AKP), lipase, and alanine aminotransferase (ALT) at different stages of fertilized eggs and 0–10 days old larvae of golden cuttlefish *Sepia esculenta*. The results showed that the soluble protein content was elevated in the early embryonic and larval stages, but was depressed from the mid to late embryonic stages. The protein content was the highest in the blastula and gastrulae stage (II) (81.50 mg/g), and the lowest in the newly-hatched larvae (VII) (4.24 mg/g). During the development, the specific activities of trypsin, pepsin, and ALT in five enzymes all followed the up-down-up pattern. Activities of all three enzymes were detectable but very low in embryonic developmental stages, suggesting their maternal originality. Moreover, the enzymatic activities were significantly increased in newly-hatched larvae, which were 0.51 U/g, 1.68 U/mg and 37.84 U/g respectively. The enzymatic activities in 5 days old larvae (VIII) dropped significantly compared to the level before hatching, and rose slowly in 10 days old larvae (IX). The activities of both AKP and lipase were generally elevated, starting from very low during the embryonic stages to significantly higher after hatching. These results implied the gradual maturation of organs and the improvement of digestion capability.

**Key words** Golden cuttlefish *Sepia esculenta*; Embryonic development; Soluble proteins; Digestive enzyme

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

# 不同卵色皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*) 幼鲍的生长与免疫比较\*

赵海峰<sup>1,2</sup> 冯艳微<sup>2①</sup> 刘相全<sup>2①</sup> 姜 绪<sup>2</sup>  
韦秀梅<sup>2</sup> 刘佳乐<sup>1,2</sup> 江海林<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 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 烟台 264006)

**摘要** 随机选取 100 只经过 480 d 养殖的 3♀×10♂ 绿卵全同胞家系子一代(F<sub>1</sub>)的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)幼鲍为实验材料,进行雌雄、卵色分类后,测量所有样本总重、壳长、壳宽等生长指标,并测定不同卵色幼鲍的超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化氢酶(CAT)和溶菌酶(LZM)的活性,进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。结果显示,在生长方面,不同卵色幼鲍的各生长指标无显著差异( $P > 0.05$ ),但绿卵幼鲍的各生长指标均高于其他 3 种卵色;在免疫酶活性方面,4 种卵色幼鲍在 SOD 和 CAT 活性上无显著差异( $P > 0.05$ ),绿卵幼鲍的 AKP、ACP 和 LZM 3 种酶的活性与棕色和棕红色卵幼鲍存在显著差异( $P < 0.05$ ),而与棕绿色卵幼鲍无显著差异,其酶活性从高到低按卵色排列依次为绿色、棕绿色、棕色和棕红色。上述研究结果可为利用卵色选育皱纹盘鲍高产抗逆新品系提供依据。

**关键词** 皱纹盘鲍; 卵色; 生长; 免疫酶

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0110-05

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)隶属于腹足纲、原始腹足目、鲍科、鲍属,主要分布在我国辽宁、山东北部沿海以及日本、朝鲜半岛沿海,是我国最具经济价值的鲍品种之一,也是我国鲍养殖的主要种类(齐钟彦, 1998)。在皱纹盘鲍养殖业迅速发展的过程中,大规模死亡事件不断发生,给养殖产业造成了巨大损失,不利于该产业的可持续发展(徐艳虹, 2007)<sup>1)</sup>。加强皱纹盘鲍的免疫学研究,深入分析其死亡原因,寻找疾病防治的有效方法成为亟待解决的问题。鲍主要依靠非特异性免疫来抵御病原微生物的入侵,免疫能力相对较弱(Zhang *et al.*, 2004)。关于鲍的免疫能力及其机制的研究已有一些报道,如万敏(2003)<sup>2)</sup>研究

了维生素 A、维生素 D、维生素 E 和 Se 对皱纹盘鲍免疫能力的影响;Chen 等(2005)研究了不同摄入量的吡哆醇对皱纹盘鲍免疫应答的影响;Wu 等(2011)、Park 等(2015)分别研究了不同浓度 Zn 与持续热激条件下,皱纹盘鲍体内热激蛋白和抗氧化酶基因表达的变化等,但对鲍的免疫机制尚需深入了解。

卵色研究一直是国内外学者关注的焦点。Pellew (1925)就对家蚕(*Bombyx mori* L.)卵色的母性遗传进行了论述,并纠正了其他学者在家蚕卵色母性遗传研究中存在的问题。近年来,家蚕限性卵色基因定位及克隆方面的研究也相继开展(张静静, 2012)<sup>3)</sup>。Castilla 等(2007)通过对白色、白色斑点、棕色、棕色斑点 4 种

\* 山东省农业良种工程项目(鲁农良种【2014】1号)资助。赵海峰, E-mail: zhfeng\_1988@163.com

① 通讯作者: 冯艳微, 助理研究员, E-mail: fywzxm1228@163.com; 刘相全, 副研究员, E-mail: lxq6808@163.com

收稿日期: 2015-08-10, 收修改稿日期: 2015-09-25

1) 徐艳虹. 皱纹盘鲍遗传多样性的研究及遗传图谱构建. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 1-54

2) 万敏. 皱纹盘鲍营养免疫学初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2003, 15-23

3) 张静静. 家蚕限性卵色系卵色基因的定位与克隆及突变位点分析. 浙江师范大学硕士研究生学位论文, 2012, 45-50

颜色的红腿鹌鹑(*Alectoris chukar*)卵进行比较,发现颜色鲜艳的卵更易遭受敌害。钟明超等(1993)对鲶鱼(*Silurus asptis*)绿黄色卵和草绿色卵进行观察比较,发现绿黄色卵与草绿色卵具有完全相同的发育潜能。孙莉等(2009)对大猿叶虫(*Colaphellus bozoringi* Baly)浅黄色和深红色 2 种卵色个体后代滞育率进行了比较,发现在光照周期为 L14 h : D10 h 时,浅黄色卵的后代滞育率显著高于深色卵的后代。关于皱纹盘鲍卵色方面的研究迄今尚未见报道。

本研究对不同卵色皱纹盘鲍幼鲍体液中 5 种重要免疫酶超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、过氧化氢酶(Catalase from *Micrococcus lysodeikticus*, CAT)和溶菌酶(Lysozyme, LZM)的活力进行了测定,并与其生长性状进行了比较分析,旨在探讨不同卵色幼鲍在非特异性免疫方面的差异,为皱纹盘鲍新品系选育提供一定参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2013 年 4 月在山东寻山渔业集团养殖场按常规工艺进行亲鲍促熟、催产,以 3 个产绿色卵子的皱纹盘鲍为母本,分别与 10 个父本两两交配,构建了 30 个绿卵全同胞家系。受精期间,所有操作注意隔离,避免交叉混杂。为保持相同养殖环境,养殖过程采用家系混养的方式。养成阶段稚鲍挂养于山东省荣成桑沟湾养殖浮筏上,定期清理养殖笼并投喂海带(*Saccharina japonica*)、江蓠(*Gracilaria* sp.)等饵料。

### 1.2 样品采集与处理

**1.2.1 样品采集与指标测量** 从采苗后经过 480 d 养殖的 30 个绿卵全同胞家系中随机抽取幼鲍 100 只,用干净纱布吸干表面水分后逐个称重。用游标卡尺测量并记录幼鲍的壳长、壳宽等参数,然后解剖性腺,分辨雌、雄,与标准色图进行对比,观察并记录雌性幼鲍的卵色。

**1.2.2 生化样品采集与处理** 将所取样品分别置于培养皿中,用解剖刀在腹足上划“井”字,待血液流出,用注射器吸取置于 1.5 ml 离心管中,加入 0.175 倍体积的 1.32% 柠檬酸钠抗凝剂,放入液氮速冻后置于 -80℃ 超低温冰箱中保存待测。

用一次性无菌注射器抽取 1 ml 皱纹盘鲍血液样本,4℃ 下 5000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液用于测定 SOD、AKP、ACP、CAT 和 LZM 的活

力。测定中,每个样品设立 3 个平行组。

### 1.3 酶活性测定

皱纹盘鲍血液上清液中 SOD、AKP、ACP、CAT 和 LZM 的活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

SOD 酶活性单位定义:每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量。

AKP、ACP 酶活性单位定义:以 100 ml 体液在 37℃ 与底物作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个单位。

CAT 酶活性单位定义:以每分钟内 A<sub>240 nm</sub> 减少 0.1 为 1 个酶量单位。

LZM 酶活性单位定义:在 25℃、pH 为 6.2 条件下,于 450 nm 处每分钟使吸光度值降低 0.001 为 1 个酶活力单位。

### 1.4 数据处理

实验所得数据采用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。统计数据以平均值±标准差(Mean ± SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 雌雄及不同卵色比例

通过对皱纹盘鲍样品的性腺进行观察,结果显示,在随机取的 100 只幼鲍中,雌鲍占 94%,雄鲍占 6%,雌雄比例为 15.7 : 1。在雌鲍中,棕卵个体占 61.71%,绿卵个体占 28.72%,棕绿卵个体占 6.38%,棕红卵个体占 3.19%。

### 2.2 不同卵色幼鲍的生长差异

4 种不同卵色皱纹盘鲍总重、壳长、壳宽等生长指标见表 1。从表 1 可以看出,在 3 个不同的生长指标中,

表 1 不同卵色皱纹盘鲍生长指标分析

Tab.1 Growth performance of *H. discus hannai* with different egg color

生长指标 Growth indices	卵色 Egg color			
	棕色 Brown	绿色 Green	棕绿色 Breen	棕红色 Brownish red
总重 BW(g)	11.27±3.84	11.74±4.75	11.32±4.40	11.07±0.71
壳长 SL(mm)	47.26±4.91	48.57±8.36	47.28±7.37	47.16±0.87
壳宽 SW(mm)	30.15±3.53	31.55±3.24	30.19±6.88	27.80±5.69

注:各组间不存在显著性差异( $P > 0.05$ )

Note: There was no significant differences between different groups ( $P > 0.05$ )

4 种不同卵色的皱纹盘鲍并无显著差异( $P > 0.05$ )。但在各个指标的比较中,绿卵皱纹盘鲍的平均值都高于其他 3 种卵色;棕红卵皱纹盘鲍均值都略低于其他 3 种卵色。

### 2.3 不同卵色幼鲍血液上清液的 SOD 活性

4 种不同卵色皱纹盘鲍个体 SOD 活性差异见图 1。从图 1 可以看出,棕色、绿色、棕绿色和棕红色皱纹盘鲍 SOD 活性均稳定在正常值,4 种卵色间无显著差异( $P > 0.05$ )。

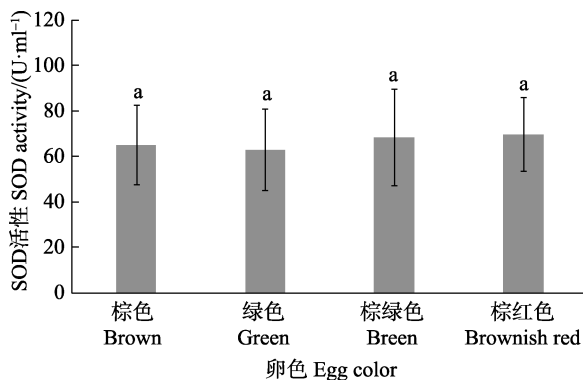


图 1 不同卵色皱纹盘鲍 SOD 活性比较

Fig.1 Comparison of SOD activities in *H. discus hannai* with different egg colors

注: 标有相同字母表示各组间无显著性差异( $P > 0.05$ )

Note: Values marked with the same letter were not significant different ( $P > 0.05$ ) the same as below

### 2.4 不同卵色幼鲍血液上清液的 AKP 活性

从图 2 可以看出,绿卵皱纹盘鲍 AKP 活性维持在较高水平,且与棕色和棕红色卵皱纹盘鲍存在显著差异( $P < 0.05$ )。棕色和棕红色卵皱纹盘鲍之间无显著差异( $P > 0.05$ )。棕绿色卵皱纹盘鲍与其他 3 种卵色皱纹盘鲍均无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.5 不同卵色幼鲍血液上清液的 ACP 活性

4 种不同卵色皱纹盘鲍 ACP 活性差异见图 3。从图 3 可以看出,此结果与 AKP 活性类似,绿卵皱纹盘鲍 ACP 活性维持在较高水平,且与棕色和棕红色卵皱纹盘鲍存在显著差异( $P < 0.05$ )。棕色和棕红色卵皱纹盘鲍之间无显著差异( $P > 0.05$ )。棕绿色卵皱纹盘鲍与其他 3 种卵色皱纹盘鲍均无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.6 不同卵色幼鲍血液上清液的 CAT 活性

4 种不同卵色皱纹盘鲍 CAT 活性差异见图 4。从图 4 可以看出,4 种卵色皱纹盘鲍 CAT 活性均维持在

正常水平, 4 者之间无显著差异。

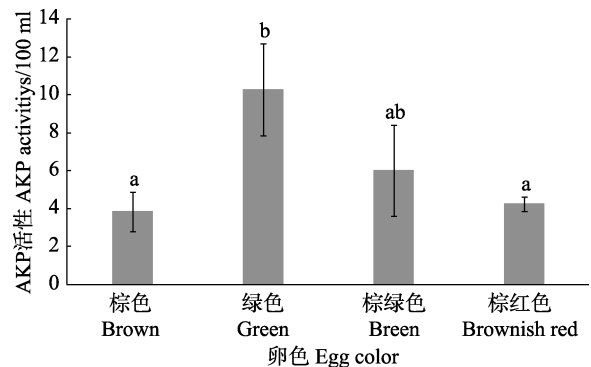


图 2 不同卵色皱纹盘鲍 AKP 活性比较

Fig.2 Comparison of AKP activities *H. discus hannai* with in different egg colors

注: 标有不同字母各组间存在显著性差异( $P < 0.05$ )

Note: Values marked with different letters were significantly, different in different groups ( $P < 0.05$ ) the same as below

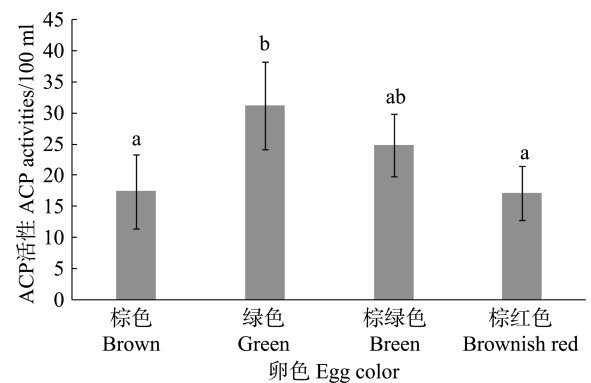


图 3 不同卵色皱纹盘鲍 ACP 活性比较

Fig.3 Comparison of ACP activities in *H. discus hannai* with different egg colors

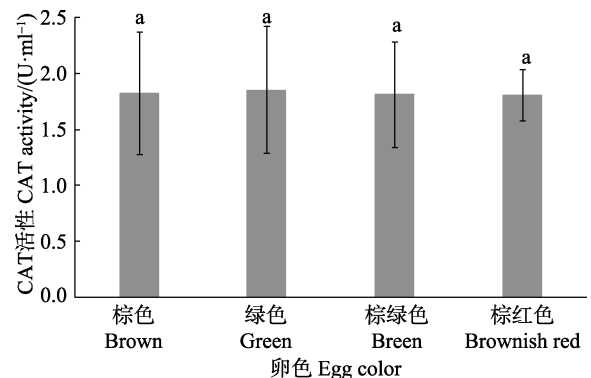


图 4 不同卵色皱纹盘鲍 CAT 活性比较

Fig.4 Comparison of CAT activities in *H. discus hannai* with different egg colors

### 2.7 不同卵色幼鲍血液上清液的 LZM 活性

从图 5 可以看出,不同卵色皱纹盘鲍 LZM 活性



差异结果与 AKP、ACP 活性类似, 绿卵皱纹盘鲍酶活性维持在较高水平, 且与棕色和棕红色卵皱纹盘鲍存在显著差异( $P < 0.05$ )。棕绿色卵皱纹盘鲍与其他 3 种卵色皱纹盘鲍均无显著差异( $P > 0.05$ )。

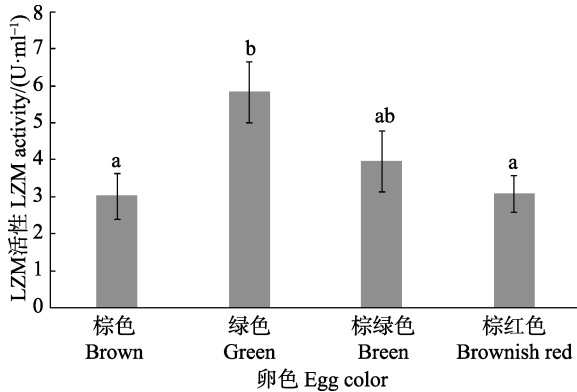


图 5 不同卵色皱纹盘鲍 LZM 活性比较

Fig.5 Comparison of LZM activities in *H. discus hannai* with different egg colors

### 3 讨论

#### 3.1 不同卵色皱纹盘鲍生长与免疫差异性分析

皱纹盘鲍的免疫防御机制主要是非特异性免疫, 体内分布的大量免疫相关酶发挥着十分重要的作用(丁鉴锋, 2011)<sup>1)</sup>。免疫相关酶主要分为氧化酶、抗氧化酶类和水解酶类 2 种。氧化酶和抗氧化酶类主要包括 SOD 和 CAT, 二者都能够清除机体内氧自由基来防止生物分子对机体造成损伤(Cheng *et al.*, 2004; 张璐等, 2008)。水解酶类主要包括 ACP、AKP 和 LZM, 主要在清除异物及病原过程中发挥着重要的作用, 水解酶活性是衡量鲍免疫能力的重要指标(Chen *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2009)。本研究测定 SOD、CAT、ACP、ATP、LZM 5 种酶的活力, 有助于深入了解皱纹盘鲍的免疫防御能力。

在检测的 5 种酶活性中, ACP、ATP、LZM 在部分卵色个体间存在显著差异( $P < 0.05$ ), SOD 和 CAT 活性在 4 种卵色个体间无显著差异( $P > 0.05$ )。存在显著差异的 3 种酶中, 酶活性高低根据卵色排序依次是绿色、棕绿色、棕色和棕红色。绿卵皱纹盘鲍在这 3 种酶的活性上存在显著优势, 维持较高水平, 具有较高的非特异性免疫能力。分析这 4 种卵色皱纹盘鲍生长

指标发现, 4 种卵色各生长指标均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但绿卵个体的总重、壳长和壳宽均值都高于其他卵色个体, 与免疫酶活性检测结果相符。总之, 绿卵幼鲍相比于其他卵色在免疫酶活性与生长上存在一定优势。关于绿卵幼鲍在群体中比例低(28.72%)的原因可能是由于绿卵性状是由隐性基因决定的, 卵色的遗传模式有待进一步研究。本研究结果为皱纹盘鲍的选育提供了新的思路, 但尚需深入探讨不同卵色皱纹盘鲍的繁殖能力及其后代的特性。

#### 3.2 皱纹盘鲍性比失调原因分析

本研究对随机抽取的皱纹盘鲍样品进行分类统计后, 得出雌雄比为 15.7 : 1, 性比例明显失调。Fisher 法则认为, 雌雄异体生物理论性比为 1 : 1, 但大量研究表明, 自然界雌雄异体生物性比常常偏离 1 : 1, 呈现偏雌或偏雄的现象(费世民等, 2011)。

导致性比例失调的因素主要有遗传因素和环境因素, 2 种因素相互或是单独作用导致了性比的异质性或者变异性 (Schmidt, 2008)。生物在减数分裂过程中发生基因重组, 此过程的差异最终导致遗传性比的差异(徐艳虹, 2007)<sup>2)</sup>。Hamilton(1933)认为, 近亲交配将会导致物种的偏雌性演化。尹春英等(2007)认为, 雌雄异体生物的性别比例会随温度、光照和干扰水平等环境因素的不同呈现出性比失调的环境调控现象。基于环境的影响, 不同性别的生物体往往在胚胎死亡率、幼体死亡率以及成体死亡率上有所不同, 从而导致性比失调现象的发生。

本研究中, 3♀×10♂绿卵全同胞家系亲本并未进行亲缘关系鉴定, 要确定近亲交配是否会造成性比失调, 需利用多种分子标记对亲本进行亲缘关系鉴定, 这将是下一步要开展的工作。关于皱纹盘鲍性比失调的确切原因, 还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 尹春英, 李春阳. 雌雄异株植物与性别比例有关的性别差异研究现状与展望. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 419-425
- 孙莉, 肖海军, 赖锡婷, 等. 大猿叶虫卵的颜色与其后代滞育率和繁殖力的关系. 昆虫知识, 2009, 46(2): 304-306
- 齐钟彦. 中国经济软体动物. 北京: 中国农业出版社, 1998, 110-123

1) 丁鉴锋. 皱纹盘鲍溶菌酶及两种蛋白酶抑制因子的克隆与表达. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011, 1-32

2) 徐艳虹. 皱纹盘鲍遗传多样性的研究及遗传图谱构建. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 1-54

- 张璐, 艾庆辉, 麦康森, 等. 肽聚糖对鲈鱼生长和非特异性免疫力的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(4): 551–554
- 钟明超, 黄浙. 关于鲈的卵色. 水产学报, 1993, 17(3): 262–263
- 费世民, 何亚平, 何飞, 等. 雌雄异体生物种群的性比失调及其调控研究现状. 四川林业科技, 2011, 32(2): 23–37
- Castilla AM, Dhondt AA, Diza-Uriarte R, *et al.* Predation in ground-nesting birds: an experimental study using natural egg-color variation. *Avian Conserv Ecol*, 2007, 2(1): 145–153
- Chen H, Mai KS, Zhang WB, *et al.* Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish Shellfish Immun*, 2005, 19(3): 241–252
- Cheng WT, Hsiao IS, Hsu CH, *et al.* Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immun*, 2004, 17(3): 235–243
- Hamilton WJ. The weasels of New York. *Am Midl Nat*, 1933, 14(4): 289–344
- Jia XW, Zhang ZP, Wang SH, *et al.* Effects of tributyltin (TBT) on enzyme activity and oxidative stress in hepatopancreas and hemolymph of small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Chin J Oceanol Limnol*, 2009, 27(4): 816–824
- Park KY, Lee JS, Kang JC, *et al.* Cascading effects from survival to physiological activities and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. *Fish Shellfish Immun*, 2015, 42(3): 233–240
- Pelleg C. A note on the inheritance of egg-color in the silkworm. *J Genet*, 1925, 15(2): 233–235
- Schmidt JP. Sex ratio and spatial pattern of males and females in the dioecious sandhill shrub, *Ceratiola ericoides ericoides* (Empetraceae) Michx. *Plant Ecol*, 2008, 196(2): 281–288
- Wu CL, Zhang WB, Mai KS, *et al.* Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp Biochem Phys C: Toxicol pharmacol*, 2011, 154(1): 1–6
- Zhang WB, Mai KS, Xu W, *et al.* Effects of vitamins A and D on shell biomineralization of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *J Shellfish Res*, 2004, 23(4): 1065–1072

(编辑 陈严)

## Growth and Immune Diversity of *Haliotis discus hannai* Juvenile Abalone with Different Egg Colors

ZHAO Haifeng<sup>1,2</sup>, FENG Yanwei<sup>2①</sup>, LIU Xiangquan<sup>2①</sup>, JIANG Xu<sup>2</sup>,  
WEI Xiumei<sup>2</sup>, LIU Jiale<sup>1,2</sup>, JIANG Hailin<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;  
2. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

**Abstract** The rapid development of abalone aquaculture has been accompanied by serious problems such as massive mortality that has caused huge economic losses. Therefore, it is an urgent mission to perform the immunological studies, to analyze the causes of death, and to find an effective disease prevention method. In this study, 100 16-month old abalone were randomly sampled as experimental materials, all of which were from green egg full-sib family 3♀ × 10♂ of *Haliotis discus hannai*. We divided the samples according to their sexes and egg colors, and then measured their growth traits (the total weight, the shell length, and the shell width) and activities of five enzymes including superoxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), catalase from *Micrococcus lysodeikticus* (CAT), and lysozyme (LZM). The single-factor analysis of variance was performed in this study. We found that there was no significant difference in the growth between individuals with different egg colors ( $P > 0.05$ ), and that green egg samples displayed a better growth performance. As for immune enzyme activities, there was no difference in SOD and CAT between the four egg color groups. The activities of AKP, ACP, and LZM in the green egg samples were significantly different from those in the brown and brownish red egg samples ( $P < 0.05$ ), but they were not different from those of green egg samples. The enzyme activities in different egg color samples followed the order green > green > brown > brownish red. Our results will provide guidelines for the egg color breeding of highly productive and resistant strain of *H. discus hannai*.

**Key words** *Haliotis discus hannai*; Egg color; Growth; Immunoenzyme

① Corresponding author: FENG Yanwei, E-mail: fywzxm1228@163.com; LIU Xiangquan, E-mail: lxq6808@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20150811001

http://www.yykxjz.cn/

# 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长、体组成及免疫指标的影响\*

张德瑞<sup>1</sup> 张利民<sup>2</sup> 马晶晶<sup>2</sup> 李宝山<sup>2</sup> 夏斌<sup>2</sup> 谭清<sup>3</sup> 王际英<sup>2①</sup>

(1. 山东升索渔用饲料研究中心 烟台 265500; 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 烟台 264006; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 在基础饲料中分别添加 0、10%、20%、30%、40% 的玉米干酒精糟及其可溶物(Dried distiller's grains with solubles, DDGS), 配制成 5 种等氮等能的实验饲料(DDGS0、DDGS10、DDGS20、DDGS30 和 DDGS40), 饲喂初始体重为(9.69±0.28) g 的刺参 56 d, 研究玉米 DDGS 作为替代蛋白源对其生长、体成分及免疫指标的影响。结果显示, 随着玉米 DDGS 添加水平的升高, 刺参增重率和特定生长率略有下降, 但各组间差异不显著( $P>0.05$ )。各实验组刺参体壁指数、肠道指数、肠长比以及体壁水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量均不受玉米 DDGS 添加的影响( $P>0.05$ )。体腔液中溶菌酶的活性呈先上升后稳定的趋势, 其中, DDGS20 和 DDGS40 组显著高于 DDGS0 和 DDGS10 组( $P<0.05$ ), DDGS30 组与其他各组无显著差异( $P>0.05$ )。酸性磷酸酶的活性呈先上升后下降的趋势, 在 DDGS20 组达到最大值, 其中, DDGS20 组显著高于其他各组( $P<0.05$ ), DDGS40 组显著高于 DDGS0 组( $P<0.05$ ), 其他各组间无显著差异( $P>0.05$ )。酚氧化酶的活性随着 DDGS 添加量的增加呈上升趋势, 各添加组均显著高于 DDGS0 组( $P<0.05$ ), DDGS40 组显著高于 DDGS10 组( $P<0.05$ ), 其他各组间无显著差异( $P>0.05$ )。饲料中添加玉米 DDGS 对体腔液中碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶的活性无显著影响( $P>0.05$ )。本研究表明, 饲料中添加 0–40% 的玉米 DDGS 均不影响刺参的生长和体壁成分, 且添加 20%–40% 的玉米 DDGS 能提高刺参体腔液中免疫酶的活性。

**关键词** 刺参; DDGS; 生长性能; 体组成; 免疫

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0115-08

刺参(*Apostichopus japonicus*)自然分布在我国渤海和黄海等水域, 是我国 20 多种食用海参中质量最好的一种, 具有极高的食用及药用价值, 刺参养殖业是中国北方沿海水产养殖的新兴支柱产业之一(李成林等, 2010)。随着刺参养殖业的蓬勃发展, 作为刺参饲料中最重要的原料——鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*), 由于其规模和产量的限制, 价格日益升高, 限制了刺参配合饲料的推广与应用。因此, 开发来源稳定、环境友好的陆生植物蛋白替代藻粉, 是目

前刺参养殖中亟待解决的问题之一。

玉米干酒精糟及其可溶物(Dried distiller's grains with solubles, DDGS)是玉米用于乙醇工业和饮料工业中产生的副产品, 是干酒精糟(DDG, Distillers Dried Grains)和可溶干酒糟(DDS, Distillers Dried Solubles)的混合物(Jie *et al*, 2014), 它保留并浓缩了玉米中除了淀粉以外的其他营养成分, 蛋白质、脂肪含量较高, 氨基酸、维生素和矿物质元素丰富。Ingledeew(1999)认为, DDGS 中酵母的生物量至少占总重的 3.9%,

\* 国家海洋生物产业水生动物营养与饲料研发创新平台(201502002)和山东省现代农业产业体系——刺参创新团队建设(SDAIT-22-06)共同资助。张德瑞, E-mail: zhangdr1987@163.com

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

收稿日期: 2015-08-11, 收修改稿日期: 2015-10-09

酵母蛋白的含量至少占 DDGS 总蛋白的 5.3%。酿酒酵母被认为是一种良好的水生动植物蛋白源,富含核苷酸、甘露寡糖和葡聚糖,在水产饲料中可作为免疫刺激剂(Refstie *et al*, 2010)。同时,由于生产过程中的发酵及水热处理,使玉米 DDGS 几乎不含抗营养因子,可作为一种优质的植物蛋白饲料,其应用对于扩大蛋白饲料的来源,缓解鱼粉、豆粕、藻粉等常规蛋白原料的紧张局面有着十分重要的意义(Refstie *et al*, 2010)。目前,国外有关玉米 DDGS 的研究已经对美国鲶鱼(*Clarias fuscus*)(Webster *et al*, 1992)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Øverland *et al*, 2013)、罗非鱼 [*Oreochromis niloticus* (♀) × *Oreochromis aureus* (♂)](Welker *et al*, 2014)进行了大量实验,国内相关研究才刚刚开始,在刺参配合饲料中的应用尚未见报道。因此,本实验旨在研究玉米 DDGS 对刺参生长性能、

形体指标和免疫功能的影响,探求玉米 DDGS 在刺参配合饲料中的适宜添加量,对玉米 DDGS 在刺参配合饲料中的应用进行科学评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

实验以鱼粉、发酵豆粕和藻粉为主要蛋白源配制基础饲料并作为对照组(DDGS0),采用等蛋白替代方式,在饲料中分别添加 10%、20%、30%、40%的玉米 DDGS 等蛋白替代基础饲料中的藻粉和发酵豆粕,玉米油调节脂肪平衡,配制 5 种等氮等能饲料(分别命名为 DDGS10、DDGS20、DDGS30 和 DDGS40)。实验饲料配方及其基本成分见表 1。所有原料经超微粉碎过 200 目标标准筛,按配比称重,加入玉米油及适量

表 1 实验饲料配方及其基本成分

Tab.1 Formula and proximate composition of the experimental diets (%)

项目 Items	替代水平 Replacement level				
	DDGS0	DDGS10	DDGS20	DDGS30	DDGS40
鱼粉 Fish meal	5	5	5	5	5
发酵豆粕 FSBM <sup>1</sup>	11.2	8.4	5.6	2.8	0
藻粉 Algae powder <sup>2</sup>	40	30	20	10	0
玉米干酒精糟及其可溶物 DDGS <sup>3</sup>	0	10	20	30	40
海泥 Sea mud	22	22	22	22	22
微晶纤维素 CMCC	0	3.7	7.4	11.1	14.8
虾粉 Shrimp powder	5	5	5	5	5
α-淀粉 α-starch	10	10	10	10	10
玉米油 Corn oil	3.6	2.7	1.8	0.9	0
多维 Vitamin premix <sup>4</sup>	2	2	2	2	2
多矿 Mineral premix <sup>5</sup>	1	1	1	1	1
抗氧化剂 Antioxidant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
三氧化二铬 Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
合计 Total	100	100	100	100	100
基本成分(干重)Proximate composition (DM)					
粗蛋白 Crude protein	21.63	21.46	21.74	21.10	21.57
粗脂肪 Crude lipid	5.34	5.34	5.49	5.24	5.33
粗灰分 Crude ash	35.22	32.81	29.97	25.84	22.82
总能 Gross energy(MJ/kg)	12.24	12.35	12.64	12.51	12.78

注: 1. 购自山东日照东维饲料有限公司, 粗蛋白为 50.56%(干重)

2. 由山东升索渔业饲料研究中心提供, 脱胶海带粉与马尾藻粉等量混合, 粗蛋白含量为 17.1%(干重)

3. 购自 Adkins Energy LLC-Lena, Illinois, 美国, 粗蛋白为 31.27%, 粗脂肪为 12.37%(干重)

4、5. 维生素预混料及矿物质预混料组成见文献(王际英等, 2014)

Notes: 1. Purchased from Shandong Rizhao Dongwei Co., Ltd. China, containing 50.56% crude proteins (DM basis)

2. Provided by Shengsuo Fishery Feed Research Centre of Shandong Province, China, the mixture of degumming kelp powder and sargassum powder with equal quantity, containing 17.1% crude proteins (DM basis)

3. Purchased from Adkins Energy LLC-Lena, Illinois, USA, containing 31.27% crude proteins and 12.37% crude lipids (DM basis).

4, 5. Same contents of vitamin and mineral premix as reference Wang *et al* (2014)

蒸馏水混匀,用小型颗粒饲料挤压机制成颗粒,60℃烘干后小型粉碎机破碎,筛选粒度在80–100目之间的颗粒备用。饲料于–20℃冰箱保存。

## 1.2 实验动物与饲养管理

实验用刺参取自山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地当年繁育的同一批参苗,饲养实验在该基地循环水养殖系统中进行。实验开始前,实验用刺参在循环水系统中暂养14 d,期间饲喂基础饲料。暂养结束后,挑选体质健康、初始体重为(9.69±0.28)g的刺参450头,平均放养于15个深蓝色圆柱形养殖水桶(直径75 cm,水深80 cm)中,内放置海参养殖筐1个,内嵌波纹板20张,控制水深为50 cm,随机分为5组,每组3个重复。实验在微流水环境中进行,采用充气增氧,保证溶氧>7 mg/L,水温控制在18–20℃之间,pH为7.8–8.2,盐度为24–26,亚硝酸氮、氨氮均<0.05 mg/L。养殖实验持续56 d,每天投喂2次(08:00和16:30),日投喂量为刺参体重的2%,根据实验刺参摄食情况及时调整投喂量。每隔2 d换水1次,换水时用虹吸法将残饵及粪便吸出。

## 1.3 样品采集与计算

养殖实验结束后,禁食48 h,统计各桶刺参的数量并称重。每桶随机取10头刺参置于托盘中,待其自然舒展后测量体长,滤纸轻轻吸干体表水分后分别称重。采集体腔液后,置冰盘上分离体壁与肠道,分别称重,并测量肠道长度。体腔液离心(3000 r/min,4℃,15 min)后取上清液分装于2 ml的离心管中,–80℃保存。

存活率(Survival rate, SR, %)=实验末刺参总数/实验初刺参总数×100

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(实验末刺参总重–实验初刺参总重)/实验初刺参总重×100

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(ln 实验末平均刺参重–ln 实验初平均刺参重)/实验天数×100

体壁指数(Body wall index, BI, %)=体壁重/体重×100

肠道指数(Intestine index, II, %)=肠重/体壁重×100

肠长比(Intestine length ratio, ILR)=肠长/体长

## 1.4 样品测定

**1.4.1 饲料及体壁营养成分的测定** 饲料及体壁营养成分含量采用常规方法测定:水分采用105℃烘干至恒重(GB/T6435–2006);粗蛋白质采用杜马斯燃烧法(Leco FP528);粗脂肪采用索氏抽提法(GB/

T6433–1994);粗灰分采用550℃马福炉灼烧法(GB/T6438–2007);能量采用燃烧法(PARR, 6100)。

**1.4.2 免疫酶活力的测定** 溶菌酶(LZM)活性采用空白对照比浊法测定,超氧化物歧化酶(SOD)采用羟胺法测定,碱性磷酸酶(AKP)活性采用磷酸苯二钠法测定,酸性磷酸酶(ACP)采用化学比色法,以上指标均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

酚氧化酶(PO)活性的测定参考 Hernández-López 等(1996)的方法,略有改动。在96孔酶标板中加入100 μl 体腔液上清液,再加入50 μl 左旋多巴(L-DOPA)溶液(3 mg/ml),立刻放入酶标仪(Biotek, Epoch)中,每隔5 min 测定波长为492 nm处的OD值,共测定10个点,实验设3个平行。以实验条件下每分钟每毫升样品吸光度值每增加0.001定义为1个酶活力单位(U/ml)。

## 1.5 数据统计

实验数据采用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),若差异显著( $P<0.05$ ),用Duncan's 检验进行多重比较分析,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参生长性能的影响

配合饲料中添加玉米DDGS对刺参生长性能的影响见表2。饲料中玉米DDGS的添加量对各组刺参的存活率无显著影响,且各组存活率均高于90%。随着玉米DDGS添加水平的升高,刺参增重率与对照组相比分别降低了10.53%、12.56%、11.06%和6.23%,但各组之间无显著差异( $P>0.05$ )。与增重率趋势相似,各实验组末体重、特定生长率、比肠重、比肠长和壁体比均与对照组无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参体壁营养成分的影响

配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参体壁营养成分的影响见表3。配合饲料中添加玉米 DDGS 后,刺参体壁中水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量各组之间均无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参免疫指标的影响

配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参免疫指标的



表 2 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参生长性能的影响  
Tab.2 Effects of dietary DDGS on the growth performance of sea cucumber *A. japonicus*

项目 Items	替代水平 Replacement level				
	DDGS0	DDGS10	DDGS20	DDGS30	DDGS40
初体重 Initial body weight (g)	9.67±0.05	9.69±0.10	9.78±0.03	9.66±0.07	9.65±0.12
末体重 Final body weight (g)	15.30±0.51	14.73±0.94	14.75±0.57	14.64±0.73	14.90±0.67
增重率 WGR (%)	58.11±5.02	51.99±8.13	50.81±5.79	51.68±8.36	54.49±8.50
特定生长率 SGR (%/d)	0.82±0.06	0.75±0.10	0.73±0.10	0.74±0.10	0.78±0.10
体壁指数 BI (%)	67.16±2.06	66.97±1.34	65.75±1.75	66.61±1.11	67.22±2.29
肠道指数 II (%)	4.28±0.30	4.52±0.17	4.61±0.40	4.26±0.14	4.22±0.30
肠长比 ILR	3.17±0.13	3.30±0.10	3.18±0.30	3.18±0.16	3.06±0.14
存活率 SR (%)	96.00±4.00	96.00±4.00	94.00±2.00	95.33±1.15	93.33±7.02

注：表中数据以平均值±标准差表示( $n=3$ )，下同

Note: Values were presented as Mean±SD ( $n=3$ ), the same as below

表 3 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参体壁营养组成的影响  
Tab.3 Effects of dietary DDGS on proximate composition of the body wall of sea cucumber *A. japonicus*

项目 Items	替代水平 Replacement level				
	DDGS0	DDGS10	DDGS20	DDGS30	DDGS40
水分 Moisture	90.99±0.29	91.31±0.36	91.06±0.45	91.19±0.39	90.85±0.25
粗蛋白 Crude protein	4.42±0.23	4.21±0.20	4.26±0.30	4.23±0.01	4.46±0.16
粗脂肪 Crude lipid	0.22±0.02	0.21±0.03	0.22±0.01	0.20±0.01	0.24±0.04
灰分 Ash	3.00±0.21	2.91±0.08	2.93±0.12	2.96±0.11	3.01±0.07

影响见表 4。随着饲料中 DDGS 替代水平的升高，刺参体腔液中 LZM 活性呈先升高后平稳的趋势，其中，DDGS20 和 DDGS40 组显著高于 DDGS0 和 DDGS10 组( $P<0.05$ )，DDGS30 组 LZM 活性与其他各组无显著差异( $P>0.05$ )。ACP 的活性呈先上升后下降的趋势，在 DDGS20 组达到最大值，其中，DDGS20 组显著高于其他各组( $P<0.05$ )，DDGS40 组显著高于 DDGS0 组( $P<0.05$ )，其他各组间无显著差异( $P>0.05$ )。PO 的活性随着 DDGS 添加量的增加呈上升趋势，DDGS0 组显著低于其他各组( $P<0.05$ )，DDGS40 组显著高于 DDGS10 组( $P<0.05$ )，其他各组间无显著差异( $P>0.05$ )。饲料中添加玉米 DDGS 对体腔液中 AKP

和 SOD 的活性无显著影响( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参生长性能的影响

玉米 DDGS 是在生产燃料乙醇的过程中，微生物对玉米进行发酵产生乙醇，蒸馏后，大量微生物连同玉米中的剩余成分经干燥形成的一种新型的饲料蛋白质原料。因此，玉米 DDGS 并不仅仅是玉米制酒精后剩余物的浓缩，还有发酵过程中产生的未知因子以及糖化曲、酵母成分(赵红霞, 2009)。研究表明，

表 4 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参免疫指标的影响  
Tab.4 Effects of dietary DDGS on immune enzyme indices of sea cucumber *A. japonicus*

项目 Items	替代水平 Replacement level				
	DDGS0	DDGS10	DDGS20	DDGS30	DDGS40
溶菌酶 LZM (U/ml)	41.23±3.69 <sup>a</sup>	44.98±3.18 <sup>a</sup>	54.09±4.84 <sup>b</sup>	48.95±5.11 <sup>ab</sup>	57.00±4.15 <sup>b</sup>
碱性磷酸酶 AKP (King unit/dL)	1.79±0.10	1.89±0.17	2.10±0.18	2.07±0.29	2.18±0.22
超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)	68.09±2.31	73.17±5.58	68.23±1.73	72.81±2.89	72.63±6.01
酸性磷酸酶 ACP (U/dL)	4.42±0.74 <sup>a</sup>	4.79±0.74 <sup>ab</sup>	10.31±0.52 <sup>c</sup>	5.65±0.77 <sup>ab</sup>	6.02±0.56 <sup>b</sup>
酚氧化酶 PO (U/ml)	62.5±4.01 <sup>a</sup>	79.26±7.12 <sup>b</sup>	89.86±7.09 <sup>bc</sup>	91.90±6.22 <sup>bc</sup>	98.07±10.72 <sup>c</sup>

注：同行数值后不同上标英文字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Values in the same row with different superscripts were significantly different ( $P<0.05$ )

水产养殖动物饲料中可以添加适量的 DDGS 作为蛋白源。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)饲料中使用 25% 玉米 DDGS 等蛋白替代由葵花籽粕、菜粕和全豌豆粉组成的混合蛋白源可以显著提高其增重率, 同时, 50% 添加组与对照组在增重率上无显著差异(Øverland *et al.*, 2013)。斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)饲料中使用豆粕和 DDGS 组合替代鱼粉, 对实验各组的增重率、特定生长率、饲料转化率及存活率均无显著影响(Webster *et al.*, 1992)。与上述研究结果相似, 在本研究中, 玉米 DDGS 部分替代藻粉后对各实验组刺参的增重率、特定生长率等生长指标均无显著影响, 表明刺参能够较好地利用发酵副产品玉米 DDGS 作为其蛋白源。研究表明, 发酵后植物原料可以作为水产养殖动物饲料中良好的蛋白源(Sun *et al.*, 2007; Mostafizur *et al.*, 2015; Molina-Poveda *et al.*, 2004)。Seo 等(2011)发现刺参能够较好地利用发酵豆粕和 DDG, 姜燕等(2012)在以海带粉和豆粕为主要原料的刺参饲料中加入水产诱食酵母进行发酵, 发酵饲料组刺参的增重率显著高于普通饲料组。玉米 DDGS 中氨基酸组成与发酵豆粕相近, 但赖氨酸相对缺乏(王晶等, 2009), 这可能影响其在刺参配合饲料中的应用效果。发酵过程中会产生大量的微生物包括有益的细菌和真菌, 这些微生物及其产生的酶能够降解原料中的部分营养物质, 使其更易被动物吸收和利用, 提高了发酵基底的营养质量(Jones, 1975), 进而提高水产饲料利用效率, 促进实验动物的生长。发酵过程中微生物的活性还可以部分或全部消除原料中的抗营养因子, 进而提高原料在动物饲料中的应用比例(Wee, 1991; Refstie *et al.*, 2005)。海参在自然条件下通常摄取植物或动物的碎屑以及有机物的沉积物为生, 谷物原料经发酵后的风味与自然食物相近, 刺激了刺参的食欲和摄食活动, 进而促进了刺参的生长性能(Seo *et al.*, 2011)。Seo 等(2011)研究发现, 在刺参饲料中使用 10% 大米 DDG 替代鼠尾藻藻粉可以显著提高其生长性能, 但 40% 替代组生长性能显著降低。在本研究中, 添加 40% 的玉米 DDGS 并未影响刺参的生长性能, 这可能是因为 DDGS 中含有 DDS, 而 DDS 中包含了玉米中一些可溶性营养物质及发酵过程产生的未知生长因子、糖化物、酵母等, 可以促进刺参对玉米 DDGS 的利用,

进而提高其生长性能。

### 3.2 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参体成分的影响

养殖动物的体成分随配合饲料组成的不同发生变化, 包括粗蛋白、粗脂肪、水分、灰分等, 因而被用作评定配合饲料优劣的一个指标。一般来说, 优质蛋白源中的蛋白质易被饲养动物消化吸收, 并及时用于机体的生长和组织的更新, 对机体成分, 尤其是粗蛋白和水分含量的影响不大(李二超等, 2009)。已有研究表明, 使用 HP-DDG 替代黄金鲈鱼(*Perca flavescens*)饲料中的鱼粉, 对其肌肉基本组成无显著影响(Eschen, 2014)<sup>1)</sup>。饲料中添加玉米 DDGS 对斑点叉尾鲷(Webster *et al.*, 1993)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (钟广贤, 2013)<sup>2)</sup> 体成分均无显著影响, 对草鱼幼鱼蛋白、脂肪和糖类代谢影响也不显著(黄文庆等, 2012)。在刺参饲料中添加不同水平(Seo *et al.*, 2011)及不同来源(Jin *et al.*, 2013)的大米 DDG 对刺参的体组成均无显著影响。与上述研究结果一致, 在本研究中刺参体壁的基本营养成分并未随饲料中玉米 DDGS 的增加发生显著性差异, 说明刺参能够较好地利用玉米 DDGS 进行营养物质的代谢与累积, 这可能是因为发酵过程中产生的大量微生物及产生的酶类能降解原料中的部分营养物质, 使其更易被刺参吸收和利用, 提高了发酵基底的营养质量(Wee, 1991)。

### 3.3 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参免疫指标的影响

刺参属于棘皮动物, 缺少获得性免疫体系, 因此, 其防御体系更多依赖天然免疫反应。刺参的非特异性免疫防御系统包括体壁防御和体内免疫, 在体内免疫中各种酶类包括 LZM、SOD、ACP、AKP 和 PO 等, 均为重要的免疫因子, 在机体中担负着防御的重要功能, 对刺参的抗病力和抗应激能力有不同程度的促进作用, 因此, 被作为评价刺参免疫功能的主要指标(孙永欣, 2008)<sup>3)</sup>。刺参吞噬细胞中具有溶酶体酶, 由 LZM、ACP 和 AKP 等组成, 其重要功能是在吞噬完成后对外源性物质进行降解(Canicatti, 1990; Cheng, 1992)。LZM 能够破坏溶解细菌细胞壁中的肽聚糖成分, 从而使细菌的细胞壁破损, 细胞崩解(刘晨光等,

1) Eschen AV. Evaluation of plant-based proteins as fish meal replacements in yellow perch diets. Natural Resource Management Department, South Dakota State University, 2014

2) 钟广贤. 玉米 DDGS 对草鱼、鲤鱼生长性能及体成分的影响. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2013

3) 孙永欣. 黄芪多糖促进刺参免疫力和生长性能的研究. 大连理工大学博士研究生学位论文, 2008

2000)。ACP 在刺参免疫系统中起着调理素作用,能诱导阿米巴细胞对外来物质进行吞噬和包囊(Bertheussen, 1982)。在本研究中,饲料中添加适量的玉米 DDGS 可以显著提高刺参体腔液中 LZM 和 ACP 的活性,推测是由于玉米 DDGS 中所富含  $\beta$ -葡聚糖,刺激了刺参体内的免疫系统。研究表明,饲料中添加  $\beta$ -葡聚糖可以提高刺参(Chang *et al*, 2010)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(Mai *et al*, 2007)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Zhao *et al*, 2012)体内 LZM 的活性,同时,  $\beta$ -葡聚糖还可提高奥尼罗非鱼(迟淑艳等, 2006)<sup>1)</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(孙虎山等, 2002)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(王雪良, 2008)<sup>2)</sup>体内 ACP 的活性。

SOD 是生物体内一种以自由基为底物的抗氧化酶,其活性可间接反映机体清除氧自由基的能力(孙虎山等, 2000)。研究发现,饲料中添加玉米 DDGS 对草鱼幼鱼(黄文庆等, 2012)和奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂)(何晓庆, 2010)<sup>3)</sup>血清中 SOD 均无显著影响。与上述研究结果一致,在本研究中,各组刺参体腔液中 SOD 的活性无显著差异,表明刺参饲料中添加玉米 DDGS 对其抗氧化性能无不利影响。

酚氧化酶(PO)和酚氧化酶原(proPO)激活系统在无脊椎动物先天免疫的识别和防御中发挥重要作用(Haug *et al*, 2002)。研究表明,饲料中添加葡聚糖能够显著提高刺参(张琴, 2010)<sup>4)</sup>和中国对虾(汪小锋等, 2005)体内 PO 的活性。与上述研究结果一致,在本研究中,饲料中添加玉米 DDGS 显著提高了刺参体腔液中 PO 的活性,这可能归因于 DDGS 富含  $\beta$ -葡聚糖等免疫调节剂。PO 一般以无活性的 proPO 形式存在,外界的刺激和信号,如  $\beta$ -葡聚糖、脂多糖和微生物多糖(Cárdenas *et al*, 1997)等,可程序性地激活 proPO 成为有活性的 PO(Söderhäll *et al*, 1998),激活后产生的黑色素及其中间产物醌可抑制病原体胞外蛋白和几丁质酶的活性,从而杀死微生物和寄生虫(Vargas-Albores *et al*, 2000)。

在本研究中,刺参饲料中添加玉米 DDGS 显著

提高了刺参体腔液中 LZM、ACP 和 PO 的活性,这可能是由于玉米 DDGS 不仅为刺参提供了蛋白质、脂肪等营养物质,同时在发酵过程中融入了大量酵母细胞和酵母细胞成分(李华磊, 2014)<sup>5)</sup>。酵母细胞富含的  $\beta$ -葡聚糖、甘露醇二酸和角质素有刺激巨噬细胞吞噬的作用;酵母细胞壁的甘露寡糖和 1,3/1,6- $\beta$ -葡聚糖等成分可调节免疫性能,促进肠道微生物菌群的发育和生长(Mehdi *et al*, 2012)。

在本实验条件下,配合饲料中添加 0–40%的玉米 DDGS 未对刺参的生长性能和体壁组成产生显著影响,同时,添加 20%–40%的玉米 DDGS 能提高刺参体腔液中相关免疫酶的活性。在本研究中,虽然刺参对玉米 DDGS 作为其主要蛋白源表现出良好的适应性,但不同生长阶段刺参对玉米 DDGS 的利用效果及长时间使用玉米 DDGS 是否会对刺参的生长性能产生影响,仍需进一步研究。

## 参 考 文 献

- 王际英, 宋志东, 李培玉, 等. 饲料添加半乳甘露寡糖对刺参幼参生长、体壁营养组成及免疫力的影响. 中国水产科学, 2014, 21(2): 310–319
- 王晶, 王加启, 卜登攀, 等. DDGS 的营养价值及在动物生产中的应用研究进展. 中国畜牧杂志, 2009, 45(23): 71–75
- 刘晨光, 刘成圣, 刘万顺, 等. 海洋生物酶的研究和应用. 海洋科学, 2000, 24(7): 24–26
- 孙虎山, 李光友. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响. 海洋与湖泊, 2002, 33(3): 245–249
- 李二超, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 水产饲料蛋白源营养价值的评价方法. 海洋科学, 2009, 33(7): 113–117
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 126–133
- 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响. 水产学报, 2005, 29(1): 66–73
- 赵红霞. 玉米 DDGS 的研究及在水产饲料中应用. 现代渔业信息, 2009(1): 12–14
- 姜燕, 王印庚, 薛太山, 等. 刺参池塘养殖系统中发酵饲料的制作与投喂. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 66–71
- 1) 迟淑艳, 周歧存, 周健斌, 等.  $\beta$ -葡聚糖对奥尼罗非鱼生长性能及抗嗜水气单胞菌感染的影响. 世界华人鱼虾营养学术研讨会, 2006: 767–774
- 2) 王雪良. 酵母  $\beta$ -葡聚糖对中华绒螯蟹免疫功能的影响. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2008
- 3) 何晓庆. 玉米 DDGS 在奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂)饲料中的应用研究. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2010
- 4) 张琴. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)高效免疫增强剂的筛选与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010
- 5) 李华磊. 玉米酒糟及其可溶物对免疫抑制肉鸡肉品质、抗氧化性能和免疫功能的影响. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2014

- 黄文庆, 王国霞, 罗志锋, 等. 玉米 DDGS 替代豆粕对草鱼生长性能血清化指标和免疫指标的影响. 饲料工业, 2012(16): 33–36
- Bertheussen K. Receptors for complement on echinoid phagocytes. II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. *Dev Comp Immunol*, 1982, 6(4): 635–642
- Canicatti C. Lysosomal enzyme pattern in Holothuria polii coelomocytes. *J Invert Pathol*, 1990, 56(1): 70–74
- Cárdenas W, Dankert JR. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immun*, 1997, 7(5): 283–295
- Chang J, Zhang WB, Mai KS, *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) challenged with *Vibrio splendidus*. *Journal of Ocean University of China*, 2010, 9(4): 389–394
- Cheng TC. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *J Invertebr Pathol*, 1992, 59(2): 197–200
- Haug T, Kjuul AK, Styrvoid OB, *et al.* Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invertebr Pathol*, 2002, 81(2): 94–102
- Hernández-López J, Gollas-Galván T, Vargas-Albores F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1996, 113(1): 61–66
- Ingledeu WM. Yeast-could you base a business on this bug? *Biotechnology in the feed industry*. Nottingham: Nottingham University Press, 1999, 27–47
- Jie YZ, Zhang JY, Zhao LH, *et al.* The correlation between the metabolizable energy content, chemical composition and color score in different sources of corn DDGS. *J Animal Sci Biotech*, 2014, 4(3): 1–8
- Jones ID. Effect of processing by fermentation of nutrients. In: *Nutritional Evaluation of Food Processing* (Harris RS & Karmas E eds), Avi Publishing Co. Inc, Westport, Connecticut, 1975, 324
- Jin C, Rahman MM, Lee SM. Distillers dried grain from makgeolli by-product is useful as a dietary ingredient for growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Aquat Sci*, 2013, 16(4): 279–283
- Mai KS, Zhang L, Tan B, *et al.* Effects of dietary beta-1, 3-glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immun*, 2007, 22(4): 394–402
- Mehdi A, Hasan G. Immune response of broiler chicks fed yeast derived mannanoligosaccharides and humate against new castle disease. *World Appl Sci J*, 2012, 18(6): 779–785
- Molina-Poveda C, Morales ME. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquacult Res*, 2004, 35(12): 1158–1165
- Mostafizur RM, Choi J, Lee SM. Influences of dietary distillers dried grain level on growth performance, body composition and biochemical parameters of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquacult Res*, 2015, 46(1): 39–48
- Øverland M, Krogdahl Å, Shurson G, *et al.* Evaluation of distiller's dried grains with solubles (DDGS) and high protein distiller's dried grains (HPDDG) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2013, 416–417: 201–208
- Refstie S, Baeverfjord G, Seim RR, Elvebø O. Effects of dietary yeast cell wall  $\beta$ -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*, 2010, 305(1): 109–116
- Refstie S, Sahlström S, Bråthen E, *et al.* Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2005, 246(1): 331–345
- Seo JY, Shin IS, Lee SM. Effect of dietary inclusion of various plant ingredients as an alternative for *Sargassum thunbergii* on growth and body composition of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquacult Nutr*, 2011, 17(5): 549–556
- Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(1): 23–28
- Sun M, Kim YC, Okorie OE, *et al.* Evaluation of fermented soybean curd residues as an energy source in diets for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J World Aquacult Soc*, 2007, 38(4): 536–542
- Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. Beta-glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 2000, 191(1–3): 13–21
- Webster CD, Tidwell JH, Goodgame LS, *et al.* Growth, body composition, and organoleptic evaluation of channel catfish fed diets containing different percentages of distillers' grains with solubles. *Progressive Fish-Culturist*, 1993, 55(2): 95–100
- Webster CD, Tidwell JH, Goodgame LS, *et al.* Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 1992, 106(3): 301–309
- Wee KL. Use of nonconventional feedstuffs of plant origin as fish feeds—is it practical and economically feasible? In: *Fish Nutrition Research in Asia. Proceedings of the Fourth Asian Fish Nutrition Workshop* (DeSilva SS ed), Asian Fish Soc, Manila, Philippines, 1991, 13–31
- Welker TL, Lim C, Klesius P, *et al.* Evaluation of distiller's dried grains with solubles from different grain sources as dietary protein for hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (♀)  $\times$  *Oreochromis aureus* (♂). *J World Aquacult Soc*, 2014, 45(6): 625–637
- Zhao HX, Cao JM, Wang AL, *et al.* Effect of long-term administration of dietary  $\beta$ -1, 3-glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquacult Int*, 2012, 20(1): 145–158

## Effect of Dietary Dried Distiller's Grains with Solubles (DDGS) on the Growth, Body Composition, and Immune Enzymes Activities of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

ZHANG Derui<sup>1</sup>, ZHANG Limin<sup>2</sup>, MA Jingjing<sup>2</sup>, LI Baoshan<sup>2</sup>, XIA Bin<sup>2</sup>, TAN Qing<sup>3</sup>, WANG Jiying<sup>2①</sup>

(1. Shengsuo Fishery Feed Research Centre of Shandong Province, Yantai 265500; 2. Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Dried distiller's grains with solubles (DDGS) is the primary corn co-product of dry-grind fuel ethanol plants. It consists of distiller's grains combined with condensed solubles from yeast fermentation, and typically contains about 27% crude proteins, 7% starch, 42% neutral detergent fibers, and 0.6% phosphorus. DDGS has gained increasing interest as a potential feed ingredient for aquaculture animals due to the low cost and enrichment in proteins, vitamins, and minerals. This research was carried out to investigate the effects of DDGS level on the growth performance, body composition, and immune enzyme activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Five isonitrogenous and isocaloric diets were formulated that contained 0, 10%, 20%, 30%, and 40% DDGS, designated as DDGS0 (control), DDGS10, DDGS20, DDGS30, and DDGS40 groups respectively. Three replicates of sea cucumber weighing ( $9.69 \pm 0.28$ ) g were fed in one dietary group till apparent satiety two times every day for 56 days. The weight gain (WG) and the specific growth rate (SGR) were decreased along with the increase in DDGS level but there was no significant difference between experimental groups ( $P > 0.05$ ). The body wall index (BI), the intestine index (II), the intestine length ratio (ILR), and the composition of body wall were not affected by the addition of dietary DDGS ( $P > 0.05$ ). The activities of lysozyme (LZM) and acid phosphatase (ACP) in coelomic fluid were higher in the DDGS20 and DDGS40 groups than in the control group ( $P < 0.05$ ). The activities of phenol oxidase (PO) in coelomic fluid were raised along with the increase in the level of DDGS, and were significantly higher than that of the DDGS0 group ( $P < 0.05$ ). The activity of alkaline phosphatase (AKP) was not affected by dietary DDGS ( $P > 0.05$ ). These results indicated that corn DDGS could be a potential dietary ingredient and could be used at a concentration of 20% to 40% to improve the growth and immunity of sea cucumbers.

**Key words** Sea cucumber *Apostichopus japonicus*; Dried distiller's grains with solubles; Growth performance; Body composition; Immunity

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



# 海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因的 cDNA、基因组克隆与表达分析\*



杨 洪<sup>1,2</sup> 朱 玲<sup>1,3①</sup> 骆晓蕊<sup>1,2</sup> 周春娅<sup>1,3</sup> 庄志猛<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究利用 RACE 和 RT-PCR 技术克隆了海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因 (Re-PLA<sub>2</sub>-1) 的 cDNA 及基因组序列, 并分析了其 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达。Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 全长为 824 bp, 包括了 48 bp 的 5'非编码区、504 bp 的开放阅读框及 272 bp 的 3'非翻译区。SMART 分析显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 为分泌蛋白, 包括了一个由 19 个氨基酸组成的信号肽和一个由 118 个氨基酸组成的磷脂酶 A<sub>2</sub> 结构域。多序列比对和系统进化分析显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因与来自星状海葵(*Nematostella vectensis*)、僧袍芋螺(*Conus magus*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)等磷脂酶 A<sub>2</sub> 的相似性较高, 共同聚类为 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> 分支, 均包含 pfam09056 家族成员酶活性所必需的 Ca<sup>2+</sup>结合位点、活性催化位点和 PLA<sub>2</sub> 结构域所必需形成二硫键的半胱氨酸。Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组全长为 2671 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成。RT-PCR 结果显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因在海蜇 4 个发育阶段均有表达, 其中, 横裂体阶段的表达量最高, 碟状体阶段最低。这些研究结果为进一步了解海蜇磷脂酶 A<sub>2</sub> 毒素的生物功能奠定了基础。

**关键词** 海蜇; 磷脂酶 A<sub>2</sub>; cDNA; 基因组; 表达分析

**中图分类号** Q346 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0123-08

水母毒素是目前已知的最毒的海洋生物毒素之一, 其毒性是海蛇(*Pelamis platurus*)毒素的 250 倍, 是河豚毒素的 450 倍(于华等, 2003)。水母毒素的研究始于 20 世纪 60 年代, 但因获取困难、稳定性差等因素导致对水母毒素的研究明显滞后于蜂毒、蛇毒、蝎毒。水母毒素成分复杂, 既含有能够溶解细胞、具有细胞毒性的多肽、酶类等, 又含有一些非蛋白类小分子物质, 具有广泛的生物学活性(Martins *et al.*, 2009)。磷脂酶 A<sub>2</sub>(Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>)是水母毒素中含量较为丰富的组分之一, 能催化甘油磷脂第 2 位脂酰键的水解生成溶血磷脂和脂肪酸, 参与磷脂的代谢(Glaser *et al.*, 1993; Nevalainen *et al.*, 2004a、b; Sher

*et al.*, 2005), 具有神经毒性、肌肉毒性、酶活性等多种生物活性。PLA<sub>2</sub> 最先发现于哺乳动物胰液中, 随后被发现广泛存在于昆虫、软体动物、蛇和海洋无脊椎动物的毒液中(Nevalainen *et al.*, 2004a、b; Razpotnik *et al.*, 2010)。根据生物来源、分子量、氨基酸序列同源性、Ca<sup>2+</sup>是否依赖性以及生理功能等特性的不同, PLA<sub>2</sub> 可以大致分为 4 类: 分泌型 PLA<sub>2</sub> (Secreted phospholipase A<sub>2</sub>; sPLA<sub>2</sub>)、胞质型 PLA<sub>2</sub> (Cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub>; cPLA<sub>2</sub>)、胞内型 PLA<sub>2</sub> (Intracellular phospholipase A<sub>2</sub>; iPLA<sub>2</sub>)和 PAF (血小板激活因子)-PLA<sub>2</sub> (Feng *et al.*, 2002)。

海蜇(*Rhopilema esculentum*)隶属于刺胞动物门、

\* 国家自然科学基金(31372507)、国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB403605)和上海海洋大学研究生科研基金(A1-0209-14-0900-57)共同资助。杨 洪, E-mail: yang\_hong0317@163.com

① 通讯作者: 朱 玲, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-21, 收修改稿日期: 2016-03-02

钵水母纲、根口水母目、海蜇属,作为一种大型的可食用经济水母,在我国海洋渔业中占有重要地位。海蜇基础生物学研究深入,人工繁育、增养殖技术成熟,是研究水母毒素组成、结构和功能的理想模式生物。本研究采用转录组 454 GS FLX 测序和 RACE 技术,首次解析了海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 和基因组结构,分析了其 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达,这些研究结果将为进一步了解海蜇磷脂酶 A<sub>2</sub> 毒素的生物功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 海蜇转录组 454 GS FLX 测序与 EST 分析

海蜇转录组的构建、454 GS FLX 测序与分析见周春娅等(2013)。利用生物信息学方法检索海蜇转录组文库,寻找与已知 PLA<sub>2</sub> 基因同源的 EST 序列。

### 1.2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长的克隆

生物信息学分析发现,海蜇 EST<sub>(isotig15581)</sub>与僧帽芋螺(*Conus magus*)的 PLA<sub>2</sub> 基因具有高度的相似性。根据 EST<sub>(isotig15581)</sub>序列,设计特异性引物 Re-PLA<sub>2</sub>-1 F1 和 Re-PLA<sub>2</sub>-1 R1 扩增海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长(表1)。3'-RACE 使用 pBluescript SK(+/-)载体上的通用引物 T7 与 Re-PLA<sub>2</sub>-1 F1, 5'-RACE 使用载体通用引物 T3 与 Re-PLA<sub>2</sub>-1 R1。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 33 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳检测后胶回收、连接、转化,

获得的阳性重组子经菌落 PCR 验证后送上海鼎安生物科技有限公司测序。

### 1.3 海蜇基因组 DNA 的提取及 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的基因组克隆

海蜇于 2015 年 8 月采自青岛沙子口。液氮保存返回实验室后,采用酚-氯仿法提取基因组 DNA: 取约 100 mg 海蜇伞径进行液氮研磨,然后加入 400 μl 的 DNA 提取液[其中, Tris-HCl (pH 为 8.0) 100 mmol/L, EDTA (pH 为 8.0) 100 mmol/L, 1% SDS 50 μl, 20 mg/ml 蛋白酶 K 8 μl],充分混匀, 55℃ 水浴 40 min。待裂解完全后,加入等体积的酚-氯仿试剂,静置 10 min, 12000 r/min 离心 15 min, 去除上清液。再加入 0.6 体积的异丙醇静置 7 min, 12000 r/min 离心 10 min, 除去上清液。然后加入 400 μl 预冷无水乙醇,沉淀 DNA 约 30 min 后,用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,自然干燥后,加入 20 μl 超纯水溶解。提取的 DNA 经 1.5%琼脂糖电泳进行检测。

根据 Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA 全长设计 5 对特异性引物进行基因组序列扩增(表 1)。

### 1.4 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 在不同发育阶段的表达

利用 Trizol 法分别提取海蜇 4 个不同发育阶段: 螵状体(Scyphistoma)、横裂体(Strobila)、碟状体(Ephyra)、水母体(Medusa)的总 RNA,然后反转录分别合成 cDNA,反应体系及反应条件按说明书要求操作(Invitrogen, 美国)。

表 1 引物序列

Tab.1 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 Name of primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Application
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F1	CAAGATGCAGACATACAAGGGAG	3' Race/genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R1	TCTAGTCCAGCCATAGCGATT	5' Race Race/genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F2	TAGGGTGTTCATTGGTGGTGT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R2	TCTGTTGTTGTATCTGTCCGGTGC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F3	TATGTGGAAATCGCTATGGCT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R3	TCTCCACGAATAAAAAGGCCAT	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F4	CTATTTGGAACGGCATAACGG	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R4	CTTTGCACCATTCTGGAGAGC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F5	AGTTACTTTGTTTCAAGCTCTCC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R5	GCTATATTTCTGTCGTCTTCTGTTC	Genome PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 F	ACTAACTCAAACCTACGAAAGCGAC	RT-PCR
Re-PLA <sub>2</sub> -1 R	ACGCACGGTTTGATAGTAGGC	RT-PCR
β-Actin F	AACTGGGACGATATGGAGAAGA	β-Actin PCR
β-Actin R	CGACCAGAGGCGTACAATGAG	β-Actin PCR
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	3' Race-PCR
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	5' Race-PCR

### 1.5 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的生物信息学分析

采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 Re-PLA<sub>2</sub>-1 在螅状体、横裂体、碟状体和水母体的表达, 相关引物见表 1。RT-PCR 反应在 ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems) 上进行。PCR 反应体系和流程参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒操作说明(TaKaRa)。样品和内参分别设 3 个重复。反应结束后, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法和 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析和统计。

用 EditSeq 和 DNASTar 软件对 DNA 序列和推测的氨基酸序列进行生物信息学分析; 用 Bioedit 软件对所获得的测序结果序列进行全长拼接; ORF Finder 在线程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测开放阅读框, 并获得编码的氨基酸序列; 用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 及 SignalP 4.1 信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件对海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 进行蛋白结构域分析及信号肽预测; 用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与其他物种 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列的多序列比对。根据多序列比对结果, 用 Mega 4.1 采用邻接法 (Neighbor-joining) 构建 PLA<sub>2</sub> 的系统进化树 (Tamura *et al.*, 2007)。

## 2 结果与分析

### 2.1 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的全长 cDNA 分析

将 3'-RACE 和 5'-RACE 获得的序列与 EST<sub>(isotig15581)</sub> 序列进行拼接, 获得海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因的 cDNA 全长序列。Re-PLA<sub>2</sub>-1 的 cDNA 全长序列为 824 bp, 包括 48 bp 的 5'非编码区(5'UTR)、504 bp 的开放阅读框(ORF)以及 272 bp 的 3'非翻译区(3'UTR), 其中, 3'UTR 包括一个多腺苷酸 Poly(A)尾和一个多腺苷酸化加尾信号 AATAAA (图 1)。Re-PLA<sub>2</sub>-1 为分泌蛋白, 信号肽由 19 个氨基酸组成, 酶切后的成熟肽预测的分子量和理论等电点分别为 18.93 kDa 和 7.79。

### 2.2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的相似性和系统进化分析

BLAST 分析发现, 预测的海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与僧帽芋螺的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列相似性为 41%, 与刺胞动物门星状海葵 (*Nematostella vectensis*) 的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列 Nv10-Nv12 的相似性在 32%–34% 之间。多序列比对发现, Ca<sup>2+</sup> 结合位点和组氨酸-天冬氨酸催化位点在所有 PLA<sub>2</sub> pfam09056 成员推测的保守结构域严格保守 (图 2)。

```

1 CAATGCCTAATGTGCATCTGTTGTGGTCAATTCTGAG|GTTGTCACAATGCAAGTTCTG
1
1 M Q V L
61 GTTCTCTCTTTTCCATCTCTCTGAACTTCATATTAAGTTGGATGCCCTCCGGATACA
5 V L L F S I S L N F I L T C G C P S D T
121 TTGACCAACGGTTGCAGTGTACCAATCAATAGCACATCGTTCCATACAAGGTTCTCTC
25 L T N G C S V P I N S T S F P Y K V F F
181 CATCCAGCTGCCAGAGACATGATGTTTGGCTATTCTTGC|GGTCAAATGCATAGCTGGTCA
45 H P A C Q R H D V C Y S C G Q M H S W S
241 AGAGCAAATGTGATTCTGGATTTTAAACGACATGATAGGCATATGTAGGACAACAAAC
65 R A N C D S G F L N D M I G I C R T T N
301 TCAAACCTACGAAAGCGACGCCATATTGAAGACTACATGCCGCTGCTTCGACACAAGCTG
85 S N L R K R R H I E D Y M P L L R H K L
361 AAACGTAGTATACGAGCCACCGGCTGACGATCTGGTCTATGATTGTGGGGTACAGTG
105 K R S I R A T E P D D L V Y A L W G T V
421 TGTGAATGGGCCCGG|GAGCCTACTATCAAAACCGTGCCTTTGTTGGAAACAAACACTAT
125 C E W A A G A Y Y Q T V R L F G T K H Y
481 GAGCAGCTTTCACCTGCCCATATGCATTCCAAATGTGCTATAGACAATGGTACCCCA
145 D D V S P A H I C I H Q C A I D N G T P
541 AACATCAGCTGAAGCTCAATGTATTATCACAACTAGAAGATAAAATAGCCACGCAA
165 N I S *
601 TTAAGTGAGCTCGATCTTGGTGACATTAGTGAAGAGCAGACCAAGAGGCTGAAGAGTTT
661 TTCAGCCAGAAAGCAAAGATTGGTGAG|AATAAA|GATGAGGATTTGAGACAATGAAGAT
721 TTAGGGGCTGGCAATGGAGGAAGGTGGGCAAAAGTCAGGCATAAGCCTCAAAAATTA
781 TAATGGCCAGAAAAAAGAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因全长 cDNA 及推测的氨基酸序列  
Fig.1 Full-length Re-PLA<sub>2</sub>-1 cDNA of *R. esculentum* and the deduced amino acid sequence

注: 下划实线表示信号肽; 终止密码子用\*标出; 方框表示多聚腺苷酸加尾信号; 3 个内含子插入位点用 Y 标出

Note: The putative signal peptide was underlined. The asterisk (\*) indicated the stop codon and the classical polyadenylation signal was enclosed in a box. The arrow (Y) marked the insertion site of three introns

选择来自不同物种的 pfam09056 家族的 PLA<sub>2</sub> 结构域, 应用 MEGA 4.1 程序, 采用邻接法构建系统进化树见图 3。从图 3 可以看出, Re-PLA<sub>2</sub>-1 与僧帽芋螺、星状海葵、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 毒素 PLA<sub>2</sub> 聚为 GIX PLA<sub>2</sub> 一支, 与 GX III、GX II PLA<sub>2</sub> 共聚为 pfam-collection, 而其他家族共聚为 cd-collection。

### 2.3 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组结构分析

利用 5 对特异性引物扩增获得了 5 段首尾重叠的 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组片段, 将这些片段拼接获得了全长为 2671 bp 的 RePLA<sub>2</sub> 基因组序列。利用 NCBI 上 Splign 内含子在线分析工具将 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的 cDNA 与基因组序列进行比对分析。结果显示, Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组包含 4 个外显子和 3 个内含子 (表 2、图 4)。4 个外显子大小在 39–388 bp 之间, 3 个内含子大小分别为 1003 bp、616 bp、494 bp。内含子的 A+T 含量在 62.15%–

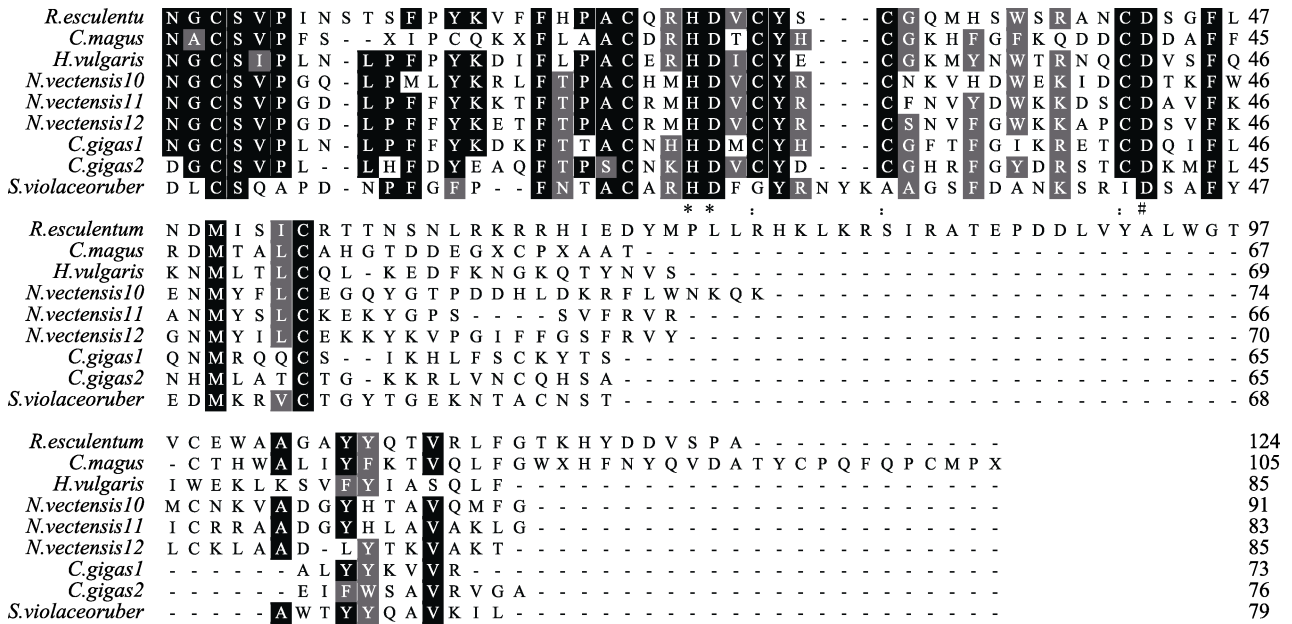


图 2 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与其他 pfam09056 家族 PLA<sub>2</sub>S 结构域氨基酸多序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment between *R. esculentum* Re-PLA<sub>2</sub>-1 and PLA<sub>2</sub>S from other species

注：黑色表示相同氨基酸，灰色表示相似氨基酸；\*和#分别表示 PLA<sub>2</sub> 结构域的 Ca<sup>2+</sup>结合位点和组氨酸-天冬氨酸催化位点  
 Note: The black shadowing showed identical amino acids and the gray shadowing indicated similar amino acids. The asterisk (\*) and pound sign (#) indicatd a calcium-binding site and the His-Asp catalytic active sites of a PLA<sub>2</sub> domain respectively

67.60%之间，而外显子的 A+T 含量在 53.46%–61.08% 之间，明显高于外显子。预测的 PLA<sub>2</sub> 结构域活性中心“组氨酸-天冬氨酸”(HD)二聚体和 Ca<sup>2+</sup>结合位点天冬氨酸(D)被第 2 个内含子分隔在第 2、3 外显子中。所有内含子-外显子边界均符合“AT-CG”剪切规则，按照内含子分型原则，内含子类型分别属于 0 型和 1 型(表 2)。

### 2.4 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术分析了 Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA 在海蜇不同发育阶段的表达见图 5。从图 5 可以看出，Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因在海蜇的螅状体、横裂体、碟状体和稚水母 4 个发育阶段均有表达，但存在着明显的表达差异。其中，横裂体阶段表达量最高，碟状体阶段表达量最低，横裂体、螅状体和水母体阶段的表达分别为碟状体阶段表达的 12.2、7.6 和 5.5 倍。

### 3 讨论

分泌型磷脂酶(sPLA<sub>2</sub>S)是一类分子量小(14–17 kDa)、由二硫键连接的分泌蛋白，其催化活性依赖于微摩尔的 Ca<sup>2+</sup>存在。根据分子结构的差异，sPLA<sub>2</sub>S 可以分成 15 个组(Groups, G)和许多亚组(Sub-Groups) (Six *et al.*, 2000)。近年来，Nevalainen 等(2012)、Punta 等(2011)根据保守结构域将 sPLA<sub>2</sub>S 分成 cd-collection 和 pfam-

collection 两大类群。sPLA<sub>2</sub>S 家族在进化上出现较早，从低等微生物到高等脊椎动物均有发现，尽管氨基酸序列差异较大，但 Ca<sup>2+</sup>结合环、催化活性位点在不同家族 sPLA<sub>2</sub>S 都严格保守，这说明 sPLA<sub>2</sub>S 在不同生物的生命过程中都起关键作用(Nevalainen *et al.*, 2012)。

海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 具有 sPLA<sub>2</sub>S 的典型特征：磷脂酶 Pfam09056 家族严格保守的 Ca<sup>2+</sup>结合位点和催化活性中心“HD”二聚体(图 3)。多序列比对和系统进化分析结果都表明，Re-PLA<sub>2</sub>-1 不但与僧袍芋螺 PLA<sub>2</sub> 具有较高的相似性(41%)，而且与僧袍芋螺、长牡蛎、水螅等聚类于 GIX 一簇，说明 Re-PLA<sub>2</sub>-1 也是 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> 家族成员之一。目前，在僧袍芋螺中发现的磷脂酶 A<sub>2</sub> 是唯一确定的 pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub>S 的成员，但其三维结构还未见报道(McIntosh *et al.*, 1995; Nevalainen *et al.*, 2013)。因此，GIX 家族磷脂酶 Ca<sup>2+</sup>结合及催化活性中心结构域均基于已知三维结构的紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*) pfam09056 GIV PLA<sub>2</sub>S 进行预测(Sugiyama *et al.*, 2002)。紫红链霉菌 PLA<sub>2</sub>S N 端天冬氨酸(Asp)和亮氨酸(Leu)共同参与 Ca<sup>2+</sup>的结合，而刺胞动物 PLA<sub>2</sub>S 则衍变为天冬酰胺(Asn)和甘氨酸(Gly)，这一变化的具体生物学意义目前还不清楚(Nevalainen *et al.*, 2012)。Re-PLA<sub>2</sub>-1 含有 11 个半胱氨酸(Cys)，能形成 5 对二硫键。在以“HD”二聚体为核心的催化位点具有 GIX

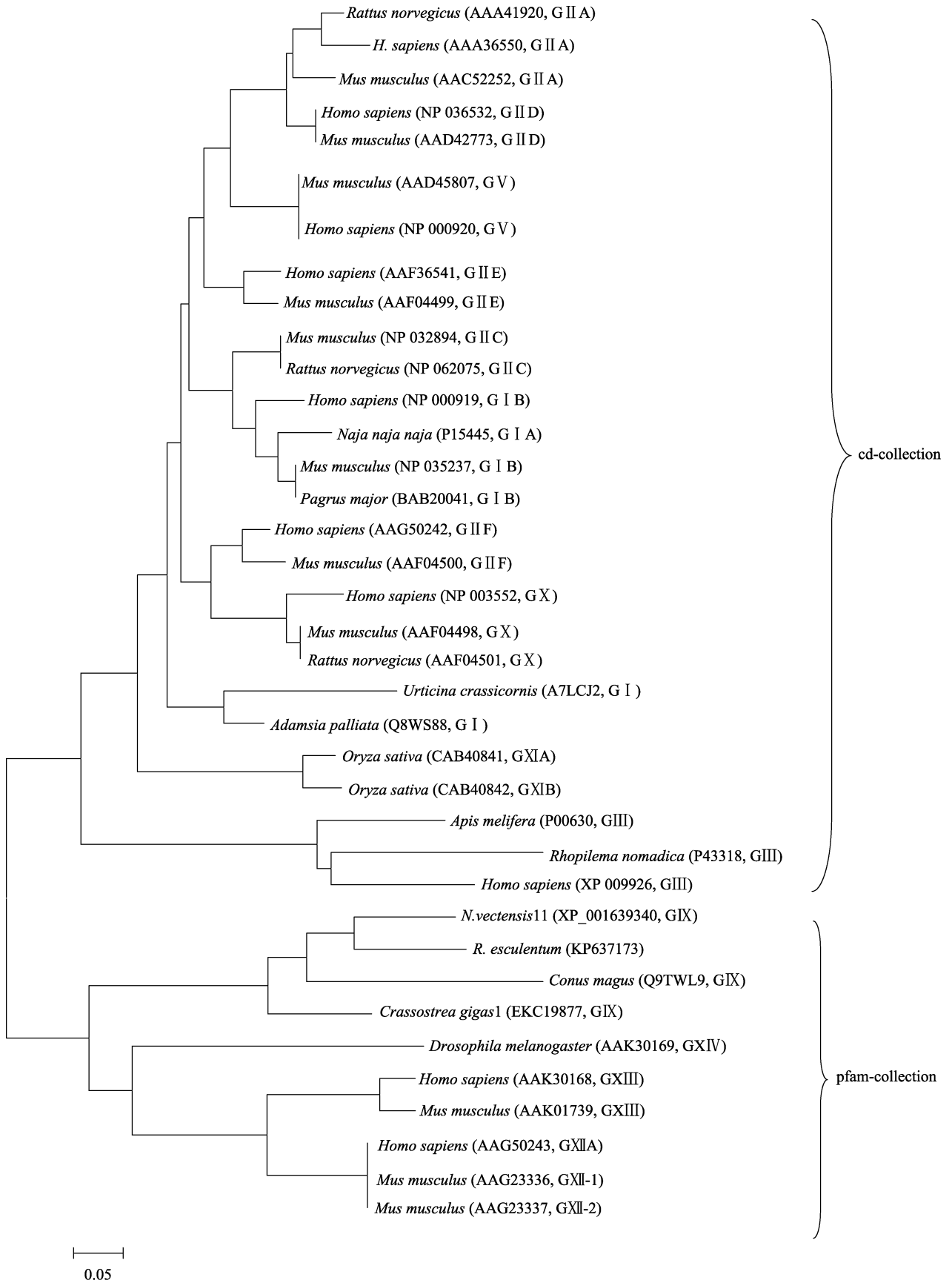


图 3 基于邻接法的 PLA<sub>2</sub> 氨基酸序列的系统进化树  
 Fig.3 Phylogenetic tree of PLA<sub>2</sub> based on neighbor-joining method



表 2 Re-PLA<sub>2</sub>-1 内含子/外显子长度、剪切位点及内含子类型  
Tab.2 Intron/exon lengths, splice junctions, and intron types of Re-PLA<sub>2</sub>-1

外显子 Exon	外显子长度 Length of exon (bp)	剪切位点 Splice junction		内含子长度 Length of intron (bp)	内含子类型 Type of intron
		3'	5'		
1	-39	-	GAGgtaagt	1003	-
2	180	ttgaagGTT	TGCgtacgt	616	0
3	217	ttttagGGT	CGGgtaggt	494	1
4	388	tttcagGAG	-	-	-

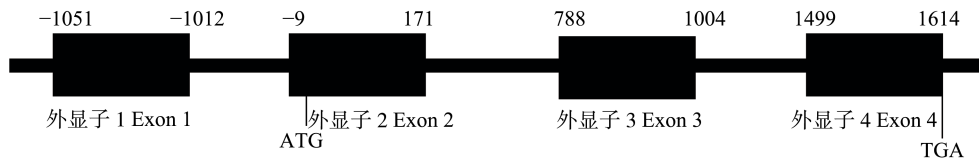


图 4 海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 基因组结构分布  
Fig.4 Genomic organization of *R. esculentum* Re-PLA<sub>2</sub>-1

注: 黑色方块代表外显子, 黑色粗线代表内含子; 数字代表外显子和内含子的位置和大小(bp)

Note: The black block showed exon and the black thick line indicatd intron. The number marked the site and size of of the exon and intron

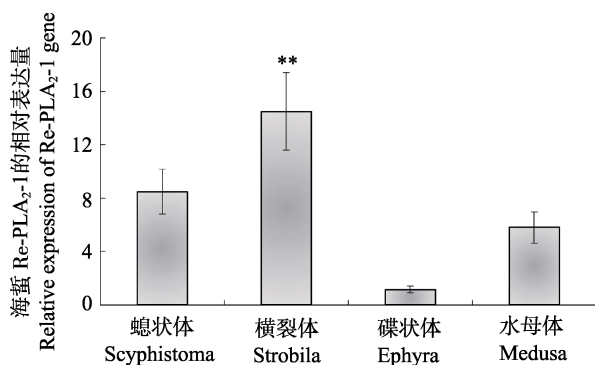


图 5 Re-PLA<sub>2</sub>-1 在海蜇不同发育阶段的表达  
Fig.5 The expression of Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA in different developmental stages of *R. esculentum*

\*\* 为差异极显著

\*\* were considered to be extremely significant differences

PLA<sub>2</sub> pfam09056 家族成员保守氨基酸序列 (Ala/Ser-Cys-X-X-His-Asp-X-Cys-Tyr-X-Cys) 的特征, 其中, Ca<sup>2+</sup>结合结构域缺失, Ca<sup>2+</sup>的结合可能也是由 N 端的 Asn 和 Gly 共同介导完成的 (Nevalainen *et al.*, 2012)

sPLA<sub>2</sub> 在动物中广泛存在, 但不同种类的 sPLA<sub>2</sub> 基因组结构差异明显。人的 G II A 磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因组中均含 5 个外显子 4 个内含子 (Seilhamer *et al.*, 1989), 而 G I B 磷脂酶的基因组中却含有 4 个外显子和 3 个内含子 (Jeyaseelan *et al.*, 2000)。同时, 同一家族的 sPLA<sub>2</sub> 在不同物种中其基因组结构也不相同。蜜蜂 (*Apis mellifera*) 和蝎子 (*Anuroctonus phaiodactylus*) 的

G III 磷脂酶的基因组均含有 4 个外显子, 人的则有 7 个外显子, 而果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 G III 磷脂酶 A<sub>2</sub> 具有 2-6 个不等的外显子个数 (Valdez-Cruz *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2009)。海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 与 G I B 磷脂酶基因组结构相似, 均具有 4 个外显子和 3 个内含子, 说明海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 可能具有某些与 G I 磷脂酶相似的基因组进化方式 (Jeyaseelan *et al.*, 2000)。

PLA<sub>2</sub>s 种类繁多, 其表达模式和分布随着发育过程发生改变。小鼠 (*Muroidea* sp.) 的 G I B、G II A、G II D、G II E、G II F、G V 和 G X sPLA<sub>2</sub>s 在其胃肠道中均有表达, 但在其他组织中分布不同 (Eerola *et al.*, 2006)。意大利蜂毒 PLA<sub>2</sub> 的表达随其日龄和季节发生变化, 如其羽化早期毒囊内表达量很低, 羽化后的 8-10 d 表达量急剧增加, 并在随后的成年期保持不变 (Owen *et al.*, 1990)。本研究发现, Re-PLA<sub>2</sub>-1 在海蜇生活史各时期均有表达, 其中, 横裂体阶段表达量最高, 碟状体表达量最低, 2 个阶段的表达量相差高达 12 倍。不同发育阶段 Re-PLA<sub>2</sub>-1 的表达差异可能与海蜇在不同发育阶段的摄食方式有关。研究表明, 海蜇不同发育阶段具有不同的摄食方式, 海蜇状体依靠触手捕获食物, 碟状体依靠缘瓣捕获食物, 而水母体则依靠口腕和肩板表面上的吸口完成 (刘春洋等, 2011)。而利用免疫组化的方法定位地中海水母磷脂酶毒素的分泌部位发现, 其磷脂酶毒素是由刺丝囊分泌的 (Sher *et al.*, 2005), 而刺丝囊素作为水母的捕食和防御的重要武器, 在其生活史的不同发育阶段均具有重要作

用。因此,海蜇 Re-PLA<sub>2</sub>-1 尽管在不同发育阶段的表达模式不同,但均在海蜇捕食、防御和食物消化中具有重要作用。

### 参 考 文 献

- 于华华,刘希光,刘松,等.水母毒素的研究现状.海洋科学,2003,27(11):27-29
- 刘春洋,王彬,李轶平,等.海蜇不同生长阶段的摄食方式和摄食习性.水产科学,2011,30(8):491-494
- 周春娅,朱玲,潘滢,等.海蜇(*Rhopilema esculentum*)Wnt5基因:cDNA克隆、基因组结构与表达.海洋与湖沼,2013,44(4):1115-1122
- Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, et al. Analysis of expression of secreted phospholipases A<sub>2</sub> in mouse tissues at protein and mRNA levels. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(7): 745-756
- Feng L, Manabe K, Shope JC, et al. A real-time fluorogenic phospholipase A<sub>2</sub> assay for biochemical and cellular activity measurements. Chem Biol, 2002, 9(7): 795-803
- Glaser KB, Mobilio D, Chang JY, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Regulation and inhibition. Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(3): 92-98
- Jeyaseelan K, Armugam A, Donghui M, et al. Structure and phylogeny of the venom group I phospholipase A<sub>2</sub> gene. Mol Biol Evol, 2000, 17(7): 1010-1021
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- Martins RD, Alves RS, Martins AMC, et al. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A<sub>2</sub> from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Toxicon, 2009, 54(4): 413-420
- McIntosh JM, Ghomashchi F, Gelb MH, et al. Conodipine-M, a novel phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. J Biol Chem, 1995, 270(8): 3518-3526
- Nevalainen TJ, Cardoso JCR. Conservation of group XII phospholipase A<sub>2</sub> from bacteria to human. Comp Biochem Phys D: Genomics Proteomics, 2012, 7(4): 340-350
- Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> in cnidaria. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2004a, 139(4): 731-735
- Nevalainen TJ, Quinn RJ, Hooper JNA. Phospholipase A<sub>2</sub> in porifera. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2004b, 137(3): 413-420
- Nevalainen TJ, Morgado I, Cardoso JCR. Identification of novel phospholipase A<sub>2</sub> group IX members in metazoans. Biochimie, 2013, 95(8): 1534-1543
- Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. Toxicon, 1990, 28(7): 813-20
- Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res, 2011, 40(D1): 290-301
- Razpotnik A, Krizaj I, Sribar J, et al. A new phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis* - its primary structure and phylogenetic classification. FEBS J, 2010, 277(12): 2641-2653
- Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, et al. Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. J Biol Chem, 1989, 264(10): 5335-5338
- Sher D, Knebel A, Bsor T, et al. Toxic polypeptides of the hydra—a bioinformatic approach to cnidarian allomones. Toxicon, 2005, 45(7): 865-879
- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Classification and characterization. Biochim Biophys Acta, 2000, 1488(1-2): 1-19
- Sugiyama M, Ohtani K, Izuhara M, et al. A novel prokaryotic phospholipase A<sub>2</sub>: Characterization, gene cloning, and solution structure. J Biol Chem, 2002, 277(22): 20051-20058
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599
- Valdez-Cruz NA, Segovia L, Corona M, et al. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. Gene, 2007, 396(1): 149-158
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 2002, 3(7): 1-11
- Xin Y, Choo YM, Hu ZG, et al. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A<sub>2</sub> from the bumblebee *Bombus ignitus*. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2009, 154(2): 195-202

## cDNA, Genome Cloning, and mRNA Expression of Phospholipase A<sub>2</sub> Gene from the *Rhopilema Esculentum*

YANG Hong<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1,3</sup>①, LUO Xiaorui<sup>1,2</sup>, ZHOU Chunya<sup>1,3</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1,3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** The cDNA and gene of phospholipase A<sub>2</sub> (Re-PLA<sub>2</sub>-1) of *Rhopilema esculentum* were cloned using RACE, and the mRNA expression was monitored at different developmental stages with quantitative real-time PCR analysis. The full-length cDNA of Re-PLA<sub>2</sub>-1 was 824 bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 48 bp, an open reading frame (ORF) of 504 bp, and a 3'-untranslated region (3'-UTR) of 272 bp. SMART analysis showed that Re-PLA<sub>2</sub>-1 was a secreted protein, including a putative signal peptide consisting of 19 amino acid residues and a domain of phospholipase A<sub>2</sub>. The deduced amino acid sequence of Re-PLA<sub>2</sub>-1 was highly similar to those of PLA<sub>2</sub>s from *Conus magus*, *Nematostella vectensis*, *Crassostrea gigas* and so on, and they could form a cluster of pfam09056 GIX PLA<sub>2</sub> revealed by the multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. They shared the essential features of pfam09056 PLA<sub>2</sub>s family, including a calcium-binding site, the catalytic active sites, and a PLA<sub>2</sub> domain, which perfectly corresponds to the conserved disulfide-bonded cysteine residues involved in the formation of the internal disulfide. The size of Re-PLA<sub>2</sub>-1 gene was 2671 bp that included four exons and three introns. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of Re-PLA<sub>2</sub>-1 mRNA occurred in all four developmental stages. The expression was the highest in strobila and the lowest in ephyra. These results contributed to further understanding the biological function of PLA<sub>2</sub> in *R. esculentum*.

**Key words** *Rhopilema esculentum*; Phospholipases A<sub>2</sub>; cDNA; Genome; Expression analysis

① Corresponding author: ZHU Ling, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

# 长江野生和池塘养殖河蟹(*Eriocheir sinensis*) 蟹种早期养殖性能、抗病力和 非特异性免疫性能的比较\*



姜晓东<sup>1</sup> 吴旭干<sup>1,2①</sup> 刘青<sup>1,3</sup> 何杰<sup>1</sup>  
张庆华<sup>1</sup> 王幼鹏<sup>2</sup> 成永旭<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;

2. 江苏省宿迁旭邦水产科技有限公司 泗洪 223900;

3. 上海海洋大学 上海市教委水产动物遗传育种协同创新中心 上海 201306)

**摘要** 本研究采用养殖性能评价、攻毒实验和非特异性免疫指标分析方法,比较了 2 个种群河蟹(*Eriocheir sinensis*)扣蟹在成蟹阶段的早期养殖性能[第 1 次蜕壳间隔时间、成活率(SR)和增重率(WGR)、特定生长率(SGR)]、攻毒后的死亡率和免疫性能。结果显示,(1)池塘养殖扣蟹第 1 次蜕壳间隔时间和 SGR 显著短于野生扣蟹( $P<0.05$ ),而 2 种来源扣蟹的 SR 和 WGR 均无显著差异( $P>0.05$ );(2)野生扣蟹攻毒后的累计死亡率一直低于池塘养殖扣蟹,攻毒 96 h 后,野生扣蟹累计死亡率(28.3%)明显低于养殖扣蟹(50.0%);(3)比较肝胰腺组织非特异性免疫指标发现,无论雌蟹还是雄蟹,野生扣蟹碱性磷酸酶(ALP)活性显著低于养殖扣蟹,野生雄蟹的总抗氧化能力(T-AOC)活性和 NO 含量显著高于养殖雄蟹,而野生雌蟹的丙二醛(MDA)含量显著低于养殖雌蟹;(4)比较血清中非特异性免疫指标发现,野生扣蟹 NO 含量显著高于养殖扣蟹,而养殖扣蟹酸性磷酸酶(ACP)活性显著高于野生扣蟹。此外,野生雌蟹血清中的血蓝蛋白(Hc)含量、T-AOC 及谷胱甘肽还原酶(GR)等活性显著高于养殖雌蟹,而 ALP、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶( $\gamma$ -GT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等活性显著低于养殖雌蟹。综上所述,2 种来源蟹种各有优势,池塘养殖扣蟹具有较好的早期养殖性能,野生蟹种具有较强的免疫性能,有关其质量差异形成原因有待进一步深入研究。

**关键词** 中华绒螯蟹;扣蟹;野生群体;养殖性能;免疫性能

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)06-0131-07

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),简称河蟹,是我国最重要的养殖蟹类之一。2014 年,我国成蟹养殖产量高达 79.65 万 t(农业部渔业渔政管理局,2015)。尽管河蟹池塘养殖遍及我国绝大多数省份,但长江流域蟹养殖产量占全国总产量的 90%以上(王武等,

2013)。由于在人工育苗过程中采用小规格亲本近亲繁殖和不同水系间的盲目引种,长江水系主要池塘养殖群体种质退化严重,表现为早熟率越来越高,商品蟹的规格越来越小(He *et al.*, 2014; 何杰等, 2015b、c)。目前,我国已经开始对河蟹进行遗传选育,选育了多

\* 国家 863 高技术研究发展计划项目(2012AA10A409-5)、科技部科技型中小企业技术创新项目(14C26213201214)、上海市科委科研计划项目(13231203504)和上海高校水产学一流学科建设(2012-62-0908)共同资助。姜晓东, E-mail: 310410555@qq.com

① 通讯作者: 吴旭干, 副教授, E-mail: xgwu@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-11-08, 收修改稿日期: 2015-11-27

个良种(邓燕飞等, 2013; 全国水产技术推广总站, 2014)。He 等(2014)研究表明, 与长江水系养殖群体相比, 在池塘养殖条件下, 长江野生扣蟹蟹种具有成蟹规格大、性腺成熟晚等更为优良的养殖性能。但野生扣蟹数量较少、捕捞难度较大, 价格较高。

养殖性能和抗病力是评价水产动物苗种质量的重要指标(Racotta *et al*, 2003), 成活率、增重率和蜕壳间隔时间则是评价蟹类养殖性能的重要指标(Wu *et al*, 2010; 何杰等, 2015a)。He 等(2014)研究表明, 野生扣蟹在成蟹养殖阶段具有一定的生长优势, 但不清楚野生和养殖群体在扣蟹阶段的养殖性能和免疫性能, 这非常不利于野生扣蟹的种质资源评价和优势种质发掘利用。本研究较为系统地比较了长江野生和池塘养殖河蟹扣蟹的早期养殖性能、攻毒成活率和非特异性免疫指标, 旨在较全面评价长江野生扣蟹的蟹种质量, 为长江水系河蟹优良性状的发掘利用、良种培育及野生扣蟹资源的合理利用提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 蟹种来源和养殖管理

本研究所用河蟹野生扣蟹于 2015 年 1 月下旬捕自江苏镇江江段(32°11'N, 119°27'E), 渔民通过小型拖网捕捞而得; 养殖群体扣蟹同期采自上海海洋大学崇明河蟹养殖基地的养殖池塘, 养殖过程中全程投喂 0-3#扣蟹配合饲料(蛋白含量分别为 41%、38%、35% 和 32%), 养殖群体大眼幼体于 2014 年 5 月中旬购自光合蟹业公司如东土池育苗基地, 为露天土池培育。2 个种群扣蟹在室内暂养 7 d 后, 分别随机选取规格相近、肢体健全的个体进行实验。实验用野生群体扣蟹雌雄平均体重分别为(7.23±1.62) g 和(8.70±0.58) g, 养殖群体扣蟹雌雄平均体重分别为(6.89±1.15) g 和(7.81±1.07) g, 两种来源扣蟹的初始体重无显著差异。

### 1.2 攻毒实验

2015 年 1 月底, 分别取附肢健全、活力较好的野生和池塘养殖扣蟹各 240 只用于攻毒实验, 体重均为 6-10 g。每种来源的扣蟹攻毒实验各设 3 个平行组, 每个重复有 40 只扣蟹(雌雄各半), 养殖于体积为 150 L (75 cm×45 cm×55 cm)的循环水族箱中。攻毒菌株为毒力较强的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)Y-2-L-1 株, 由上海海洋大学水产动物医学系张庆华副教授提供。攻毒前, 所有实验用蟹在循环系统中暂养 7 d, 暂养期间如有死亡则补充对应性别和体重的个体。养殖

环境条件为: 日光灯光照, 光照强度约为 800 lx, 光照: 黑暗=12 h: 12 h, 循环水养殖, 水温为(28±1)℃, pH 值为 7.5-8.5、DO>5 mg/L、NH<sub>3</sub>-N<0.5 mg/L、亚硝酸盐<0.05 mg/L, 投喂扣蟹 3#配合饲料。根据预实验结果确定嗜水气单胞菌注射量为 2.5×10<sup>6</sup> CFU/g 蟹体重, 合适的注射剂量为 2.0 μl/g。采用微量注射器从扣蟹第三步足基部进行注射; 采用相等数量的扣蟹注射等剂量生理盐水作为阴性对照, 同时设未注射组为空白对照组。注射后每日正常投喂, 观察和记录各组扣蟹死亡情况, 及时取出死亡个体。在无菌条件下, 分离并辨别死亡个体肝胰腺和头胸部肌肉中感染的病原菌是否为本实验注射的嗜水气单胞菌。持续观察 7 d, 直到连续 3 d 内基本无死亡个体便停止实验(陈彦良等, 2014; Wang *et al*, 2014)。攻毒实验结束后, 分别统计每个水族箱各个时间段的累计死亡率。

### 1.3 非特异性免疫指标测定

每组分别取雌雄扣蟹各 10 只, 采集血淋巴和肝胰腺, 用于非特异性免疫指标测定。扣蟹的选择要求同 1.2。采用 1 ml 无菌注射器, 从第三步足基部抽取 0.4 ml 血淋巴样品于 1.5 ml 离心管中。解剖扣蟹, 取出整个肝胰腺, 装在冻存管中。肝胰腺和血淋巴样品于-80℃超低温冰箱中保存备用。称取 0.2 g 肝胰腺, 加入 1 ml (W/V=1:5)预冷的生理盐水, 用微型匀浆器(T10B, 德国 IKA)匀浆 30 s, 在 4℃, 12000 r/min 条件下离心 20 min。取中间清液, 再次离心, 取中间清液用于后续分析。血淋巴解冻后用微型匀浆器匀浆 30 s 后, 在 4℃、12000 r/min 条件下离心 20 min, 取出上清液(血清)待测。采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化物酶(POD)、丙二醛(MDA)、酸性磷酸酶(ACP)活性; 使用迈瑞全自动生化分析仪及其配套试剂盒测定碱性磷酸酶(ALP)活性; 采用苏州科铭生物科技有限公司生产的试剂盒测定 γ-谷氨酰转氨酶(γ-GT)活性; 血蓝蛋白(Hc)测定参考 Nickerson 等(1971)的方法, 用 Tris-Ca 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl + 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH=8.0)将血清稀释 70 倍后, 在 335 nm 波长下比色测定 OD 值, Hc 含量(mg/ml)=3.717×OD<sub>335nm</sub>×稀释倍数。

### 1.4 早期养殖性能比较

2015 年 3 月底, 分别取越冬后的扣蟹各 60 只(雌雄各半)进行养殖性能比较实验。每种来源的扣蟹雌雄各设 3 个重复, 每个重复 10 只。为防止河蟹蜕壳



过程中相互蚕食, 本实验采用单个体养殖方法评价其早期养殖性能(赵亚婷等, 2013)。所有实验用蟹分别单独养殖于小型循环水族箱中(水体体积 18.4 L, 48 cm×32 cm×27 cm, 水深 12 cm), 每箱放置 1 段 PVC 管作为隐蔽物。实验期间光暗周期为 12 h : 12 h, 光照强度约为 800 lx, 日光灯光源; 养殖用水为过滤、沉淀和消毒曝气后的河道淡水。每天 16:00 投喂, 按照蟹体重的 1%–5% 投喂成蟹 1# 配合饲料(浙江欣欣饲料有限公司生产, 蛋白含量为 40%, 脂肪为 10%), 具体根据水温和摄食情况确定。正式实验后, 每日 08:00 开始, 观察和记录每个水族箱中的蜕壳和死亡情况, 同时采用虹吸法去除残饵和粪便; 扣蟹蜕壳后 5–6 d, 用游标卡尺测定甲壳长和甲壳宽, 用电子天平测量体重(精确到 0.01 g); 采用温度自动记录仪记录每日平均水温, 实验期间水温为 13–19℃; 每日测定水体溶氧和 pH 值, 每 3 d 测定、记录 1 次亚硝酸和氨氮, 根据水质情况每 3–5 d 换水 20%–30%。实验期间水质指标要求: pH 为 7.5–9.0、溶氧>5 mg/L、氨氮< 0.3 mg/L、亚硝酸盐<0.10 mg/L。正式实验共持续 70 d 左右, 待所有实验用蟹完成第 1 次蜕壳或者死亡后便结束养殖实验, 统计各实验组的成活率、增重率、特定生长率和第 1 次蜕壳间隔时间, 计算公式为:

成活率(Survival rate, SR, %)=100×终末实验蟹数量/初始实验蟹数量;

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100×(终末体重–初始体重)/初始体重;

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=100×(ln 终末体重–ln 初始体重)/实验天数。

### 1.5 数据处理

所有数据采用平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析。用

Levene 法进行方差齐性检验。当数据不满足齐性方差时, 对百分比数据进行反正弦或平方根处理。采用双尾 *t*-test (Independent samples *t*-test) 分析野生和池塘养殖扣蟹各个指标的差异。当数据转换后仍不满足齐性方差时, 采用 Mann-Whitney U-test 进行非参数检验。 $P<0.05$  为差异显著, 利用 Excel 和 Sigma plot 软件绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 早期养殖性能比较

长江野生和池塘养殖扣蟹的早期养殖性能参数见表 1。由表 1 可以看出, 野生扣蟹 SR 整体高于养殖扣蟹, 但各组 SR 差异不显著( $P>0.05$ ); 无论雌蟹还是雄蟹, 养殖扣蟹的蜕壳间隔时间均显著短于野生扣蟹( $P<0.05$ ); 野生和养殖扣蟹的第 1 次蜕壳 WGR 差异较小。其中, 雄性野生扣蟹 WGR 略高于养殖扣蟹, 而雌性野生扣蟹 WGR 高于养殖扣蟹, 但差异不显著; 不同种群对扣蟹体重 SGR 的影响较明显, 养殖扣蟹雄体和雌体体重 SGR 分别比野生扣蟹高 70.13%和 69.23%, 并显著高于野生扣蟹。

### 2.2 攻毒后的累计死亡率比较

开始攻毒实验后, 各实验组的阴性对照组和空白对照组均无死亡个体。无论雌雄, 扣蟹攻毒后的死亡主要发生在 12–48 h, 96 h 后基本无死亡发生。2 组扣蟹攻毒后 12–96 h 的累计死亡率变化情况见图 1。由图 1 可以看出, 野生扣蟹在攻毒后的累计死亡率一直低于养殖扣蟹。攻毒 24 h 后, 野生扣蟹的死亡率低于 20%, 而养殖扣蟹的死亡率高达 33–43%; 攻毒 96 h 后, 野生扣蟹累计死亡率为 28.3%, 明显低于养殖扣蟹(50%), 此后 2 组扣蟹均无发现死亡个体。

表 1 长江野生和池塘养殖扣蟹的早期养殖性能比较

Tab.1 Comparison of early culture performance between wild-caught and pond-reared juvenile *E. sinensis*

项目 Items	野生扣蟹 Wild-caught <i>E. sinensis</i>			养殖扣蟹 Pond-reared <i>E. sinensis</i>		
	雄体 Male	雌体 Female	平均 Mean	雄体 Male	雌体 Female	平均 Mean
成活率 Survival rate (%)	80.00±0.00	85.00±7.07	82.50±5.00	80.00±14.14	80.00±0.00	80.00±8.16
第 1 次蜕壳间隔时间 First molt interval (d)	61.43±15.90*	54.13±16.95*	57.53±16.32*	35.14±10.93	32.60±6.45	33.83±8.82
增重率 Weight gain rate (%)	52.64±15.10	54.97±19.06	53.90±16.68	52.68±10.11	51.98±11.80	52.01±10.81
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	0.77±0.22*	0.78±0.21*	0.77±0.23*	1.31±0.30	1.32±0.17	1.32±0.24

\*表示两群体间差异显著( $P<0.05$ )。下同

\*indicated significant difference between two populations ( $P<0.05$ ). The same as below

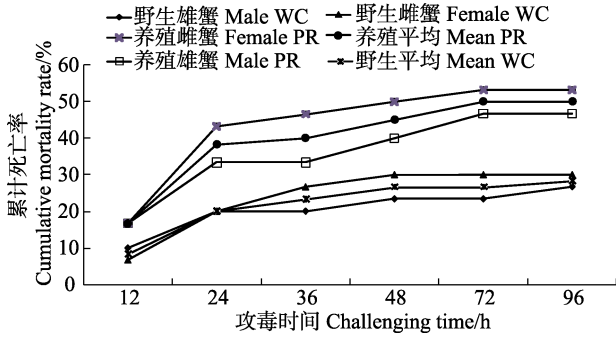


图 1 长江野生和池塘养殖扣蟹攻毒后的累计死亡率比较  
Fig.1 Comparison of mortality rate during the pathogen challenge test between wild-caught and pond-reared juvenile *E. sinensis*

2.3 非特异性免疫指标比较

2.3.1 肝胰腺中的非特异性免疫指标 长江野生和池塘养殖扣蟹肝胰腺中的非特异性免疫指标和抗氧化能力差异如表 2 所示。就雄体而言，养殖扣蟹的 ALP 活性显著高于野生扣蟹，而野生扣蟹的  $\gamma$ -GT、T-AOC、POD、NO 等指标均高于养殖扣蟹( $P<0.05$ )；

野生扣蟹的 ACP 活性高于养殖扣蟹，而养殖扣蟹的 SOD、MDA、GSH-Px 等活性低于野生扣蟹，但差异不显著( $P>0.05$ )。

就雌蟹而言，野生扣蟹的  $\gamma$ -GT、T-AOC、POD、ACP、NO 等指标均高于养殖扣蟹，而养殖扣蟹的 SOD、GSH-Px 活性均高于野生扣蟹，但差异不显著( $P>0.05$ )。2 个群体扣蟹之间的 ALP 和 MDA 含量差异明显，表现为野生扣蟹的 ALP 活性显著高于养殖扣蟹，养殖扣蟹的 MDA 含量显著高于野生扣蟹( $P<0.05$ )。

2.3.2 血清中的非特异性免疫指标 长江野生和池塘养殖扣蟹血清中的非特异性免疫指标和抗氧化能力差异如表 3 所示。就雄蟹而言，野生扣蟹的 T-AOC、Hc、PO 等指标高于养殖扣蟹，而养殖扣蟹的 ALP、 $\gamma$ -GT、SOD、MDA、GSH-Px、GR 等指标均高于野生扣蟹，但差异不显著( $P>0.05$ )。野生扣蟹的 NO 含量高于养殖扣蟹，而养殖扣蟹的 ACP 活性高于野生扣蟹，且差异显著( $P<0.05$ )。

表 2 长江野生和池塘养殖扣蟹肝胰腺中的非特异性免疫指标和抗氧化能力比较

Tab.2 Comparison of immune indices and antioxidant ability in the hepatopancreas of wild-caught and pond-reared juvenile *E. sinensis*

指标 Indices	雄体扣蟹 Male <i>E. sinensis</i>		雌体扣蟹 Female <i>E. sinensis</i>	
	野生 Wild-caught	养殖 Pond-reared	野生 Wild-caught	养殖 Pond-reared
ALP (U/g prot)	61.26±7.12	98.11±15.10*	44.01±8.24	90.86±15.55*
$\gamma$ -GT (U/g prot)	30.78±7.75	8.86±0.23	35.09±9.60	19.65±8.86
T-AOC (U/mg prot)	1.53±0.27*	0.69±0.22	0.69±0.21	0.42±0.14
SOD (U/mg prot)	7.24±2.31	7.79±1.99	5.32±0.78	7.20±1.75
POD (U/mg prot)	25.40±4.21	10.21±1.91	17.70±1.04	14.67±3.52
ACP (U/mg prot)	8.10±1.07	6.94±2.52	7.75±1.76	7.43±0.64
MDA (nmol/g)	2.54±0.52	3.17±0.82	2.89±0.67	5.30±0.49*
NO ( $\mu$ mol/g prot)	32.18±12.98*	11.56±3.20	20.30±3.99	15.73±3.97
GSH-Px (U/mg prot)	52.38±11.91	54.84±9.72	44.53±8.23	53.82±13.53

表 3 长江野生和池塘养殖扣蟹血淋巴中非特异性免疫指标和抗氧化能力比较

Tab.3 Comparison of immune indices and antioxidant ability in the hemolymph of wild-caught and pond-reared juvenile *E. Sinensis*

指标 Indices	雄体扣蟹 Male <i>E. Sinensis</i>		雌体扣蟹 Female <i>E. Sinensis</i>	
	野生 Wild-caught	养殖 Pond-reared	野生 Wild-caught	养殖 Pond-reared
ALP (U/g prot)	1.29±0.27	1.42±0.31	1.15±0.08	1.58±0.29*
$\gamma$ -GT (U/g prot)	12.15±5.10	20.23±4.92	13.49±4.28	74.11±25.02*
T-AOC (U/mg prot)	8.94±2.78	5.83±0.98	11.47±1.26*	6.09±1.53
SOD (U/mg prot)	34.39±2.11	35.42±2.57	34.10±2.89	35.91±2.63
Hc (mg/ml)	63.92±7.30	52.24±9.72	75.87±8.89*	55.44±7.34
ACP (U/100 ml)	2.04±0.51	2.99±0.48*	1.96±0.36	3.84±0.45*
MDA (nmol/ml)	6.58±1.37	8.08±1.51	7.58±0.08	6.81±0.99
NO ( $\mu$ mol/ml)	2.82±0.48*	1.04±0.11	3.86±1.19*	1.08±0.10
GSH-Px (U)	594.83±89.74	653.79±70.12	540.00±80.10	710.69±59.04*
GR (U/g prot)	80.39±11.14	82.32±12.37	94.86±3.22*	73.31±7.33
PO (U/mg prot)	7.73±0.80	7.24±1.80	6.95±1.44	7.90±1.72

就雌蟹而言,野生扣蟹血清内的MDA含量高于养殖扣蟹,而养殖扣蟹的ACP活性高于野生扣蟹,但各组之间差异不显著( $P>0.05$ )。野生扣蟹的T-AOC、Hc、NO、Gr等活性显著高于养殖扣蟹,而养殖扣蟹的ACP、T-AOC、ACP、GSH-Px等活性显著高于野生扣蟹( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 早期生长性能差异

本研究表明,在相同的养殖条件下(饵料和养殖环境一致),长江野生和池塘养殖扣蟹在成蟹阶段早期养殖性能差异较大,主要表现为养殖扣蟹蜕壳周期短和生长速度快等特点,这可能与2个群体蟹种在扣蟹阶段的生长环境差异较大有关。水体积温是影响甲壳动物蜕壳的重要因素之一,通常积温越高,蜕壳周期越短(陈再忠, 2002<sup>1)</sup>; Verhoef *et al.*, 1998; Daoud *et al.*, 2010)。野生蟹种在扣蟹阶段的水体积温低于养殖扣蟹,主要因为:一方面,长江水体5–12月的平均水温要低于长江流域的养殖池塘水体温度(何杰等, 2015b);另一方面,长江水系野生大眼幼体出现时间通常晚于池塘养殖群体的土池培育大眼幼体近1个月,野生大眼幼体出现时间为6月初,池塘培育大眼幼体在5月上中旬出现(张列士等, 2002)。这可能是造成野生扣蟹蜕皮周期较长的重要原因之一。其次,由于长江野生扣蟹的活动空间较大、食性较杂,而池塘养殖群体扣蟹经过多代人工繁殖和养殖,已经适应人工养殖环境和配合饲料,长江野生扣蟹对人工养殖环境和配合饲料不适应可能也是其蜕壳周期较长的重要原因。有关2种来源扣蟹的活动规律和摄食行为差异有待今后进一步深入研究。

此外,由于长江水体深度(6–11 m)远大于池塘(0.6–1.2 m),且水体体积也远大于养殖池塘,故每年1–3月初长江底部平均水温应高于池塘水温(何杰等, 2015b)。将野生和养殖扣蟹同时转移到水温为13–19℃的室内养殖系统,池塘养殖群体的升温幅度远大于野生群体。短期内较高幅度的升温可以提高甲壳动物体内酶活力,加快新陈代谢,从而促进其蜕壳频率(Hartnoll, 1982)。因此,养殖群体扣蟹升温幅度较大,也可能是其蜕皮较快的原因之一。养殖群体扣蟹的SGR显著高于野生扣蟹,这是其蜕皮周期较短造成的。

#### 3.2 非特异性免疫指标和攻毒成活率差异

研究结果显示,长江野生扣蟹攻毒死亡率明显低于池塘养殖扣蟹,表明长江野生扣蟹具有较强的免疫性能和抗病力。非特异性免疫指标分析也表明,无论雌雄,野生扣蟹肝胰腺和血淋巴中的T-AOC、NO显著高于养殖群体。此外,野生扣蟹血淋巴中的Hc含量也显著高于养殖扣蟹,这也暗示野生扣蟹具有较强的免疫性能和抗氧化能力。Hc是甲壳动物血淋巴的主要蛋白,具有载氧、转运金属离子、储存蛋白质、调节渗透压、参与蜕壳后新表皮组织的形成和固化、抗细菌和抗病毒等多种生理功能(潘鲁青等, 2008)。张秀丽等(2008)研究表明,Hc免疫裂解后形成的多肽具有较强的抗菌作用。血淋巴中的Hc含量及其基因表达水平与甲壳动物免疫性能有关,通常Hc含量越高,其免疫性能越强(Qiu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013)。长江野生和池塘养殖扣蟹免疫性能及抗病力差异的形成原因较为复杂,可能与如下几个因素有关:(1)野生扣蟹冬季的营养状况优于池塘养殖扣蟹。由于长江流域的池塘养殖扣蟹在越冬期间(12月–翌年3月)水温较低,扣蟹很少摄食(张列士等, 2002),而长江底部的冬季水温相对较高,长江中的野生扣蟹在越冬期间可能仍然有摄食活动。因此,野生扣蟹的肝胰腺指数和总脂含量高于池塘养殖扣蟹(何杰等, 2015b),二者的脂肪酸组成存在较大差异,生化组成差异可能会影响其免疫性能(赵亚婷等, 2013)。(2)野生扣蟹的种质状况优于池塘养殖扣蟹。最近的研究表明,长江野生扣蟹仍具有较好的养殖性能和较高的遗传多样性(何杰等, 2015a; 刘青等, 2015),而养殖群体扣蟹经过多代人工繁育,由于小规格亲本、近亲繁殖和种质混杂等原因,种质退化严重,免疫性能和养殖性能下降严重(He *et al.*, 2014)。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)经过多代近交后,养殖性能和抗病力显著下降(刘萍等, 2004; Luo *et al.*, 2014),类似现象可能也存在于河蟹养殖群体中。(3)长江及长江口区水体中含有大量细菌等病原生物(刘子琳等, 2001),野生扣蟹长期生活在这种环境中,其机体抗菌能力也得到相应提升。而扣蟹养殖的池塘水体由于定期消毒和种植水草等措施(何杰等, 2015a、b),水体中含有的病原菌相对较少,故其免疫抗病力相对较差。(4)野生扣蟹的生长速度慢于养殖群体。生长和免疫抗病通常是两个相互矛盾的生理过程,通常生长较快的水生动物,其抗病力和免疫性能低于生长较慢的个体(Moss *et al.*, 2005)。

1) 陈再忠. 中华绒螯蟹性早熟及其机理的研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2002

综上所述,池塘养殖扣蟹在成蟹养殖早期的养殖性能优于长江野生扣蟹,这可能与其蟹种阶段的积温和环境适应性有关;长江野生扣蟹比池塘养殖扣蟹具有更强的抗氧化能力、免疫性能及抗病能力,可能与其遗传特性、越冬期的营养状况和生长较慢有关。野生和池塘养殖河蟹扣蟹 2 种蟹种各有优缺点,本研究可为河蟹蟹种质量评价和来源辨别提供基础资料。

**致谢:** 上海海洋大学水产与生命学院季策、黄根勇等同学参与攻毒实验,潘杰同学参与部分免疫指标的测定,在此表示感谢。

## 参 考 文 献

- 王武,王成辉,马旭洲. 河蟹生态养殖. 北京: 中国农业出版社, 2013: 59-84
- 邓燕飞,夏爱军,潘建林,等. 中华绒螯蟹“长江 1 号”的选育. 水产养殖, 2013, 34(4): 43-47
- 全国水产技术推广总站. 水产新品种推广指南. 北京: 中国农业出版社, 2014
- 刘子琳,越川海,宁修仁,等. 长江冲淡水区细菌生产力研究. 海洋学报, 2001, 23(4): 93-99
- 刘青,刘皓,吴旭干,等. 长江、黄河和辽河水系中华绒螯蟹野生和养殖群体遗传变异的微卫星分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 958-968
- 刘萍,李健,何玉英,等. 中国明对虾种质资源研究现状与保护策略. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 80-85
- 农业部渔业渔政管理局. 2015 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2015
- 何杰,吴旭干,龙晓文,等. 长江水系中华绒螯蟹野生和养殖群体选育子一代养殖性能和性腺发育的比较. 海洋与湖沼, 2015a, 46(4): 808-818
- 何杰,吴旭干,龙晓文,等. 池塘养殖和野生长江水系中华绒螯蟹扣蟹形态学及生化组成的比较研究. 水产学报, 2015b, 39(11): 1665-1678
- 何杰,吴旭干,姜晓东,等. 野生和人工繁育大眼幼体在成蟹阶段的养殖性能比较. 上海海洋大学学报, 2015c, 24(1): 66-67
- 张列士,李军. 河蟹增养殖技术. 北京: 金盾出版社, 2002, 5-248
- 张秀丽,刘庆慧,程江峰,等. 血蓝蛋白研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(7): 86-89
- 陈彦良,李二超,禹娜,等. 豆油替代鱼油对中华绒螯蟹幼蟹生长、非特异性免疫和抗病力的影响. 中国水产科学, 2014, 21(3): 511-521
- 赵亚婷,吴旭干,常国亮,等. 饲料中 DHA 含量对中华绒螯蟹幼蟹生长、脂类组成和低氧胁迫的影响. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1133-1144
- 潘鲁青,金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展. 水产学报, 2008, 32(3): 484-491
- Daoud D, Lambert Y, Audet C, *et al.* Size and temperature-dependent variations in intermolt duration and size increment at molt of Northern Shrimp, *Pandalus borealis*. Mar Biol, 2010, 157(12): 2655-2666
- Hartnoll RG. Growth. In: Abele LG (ed). The Biology of Crustacea. New York: Academic Press, 1982, 2: 11-96
- He J, Wu X, Li J, *et al.* Comparison of the culture performance and profitability of wild-caught and captive pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles reared in grow-out ponds: Implications for seed selection and genetic selection programs. Aquaculture, 2014, 434: 48-56
- Luo K, Kong J, Luan S, *et al.* Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2014, 420-421: 32-37
- Moss SM, Doyle RW, Lightner DV. Breeding shrimp for disease resistance: challenges and opportunities for improvement. Diseases in Asian Aquaculture V, 2005: 379-393
- Nickerson KW, van Holde KE. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. Circular dichroism and absorption spectra. Comp Biochem Phys B Comp Biochem, 1971, 39(4): 855-872
- Qiu R, Cheng Y, Huang X, *et al.* Effect of hypoxia on immunological, physiological response, and hepatopancreatic metabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquacult Int, 2011, 19(2): 283-299
- Racotta IS, Palacios E, Ibarra AM. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture, 2003, 227(1-4): 107-130
- Sun S, Qin J, Yu N, *et al.* Effect of dietary copper on the growth performance, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Fish, 2013, 34(5): 1195-1201
- Verhoef GD, Austin CM, Jones PL, *et al.* Effect of temperature on molt increment and intermolt period of a juvenile Australian fresh-water crayfish, *Cherax destructor*. J Crustacean Biol, 1998, 18(4): 673-679
- Wang L, Chen L, Qin J, *et al.* Effect of dietary lipids and vitamin E on growth performance, body composition, anti-oxidative ability and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquac Res, 2014, 46(10): 2544-2558
- Wu X, Cheng Y, Zeng C, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab, *Portunus trituberculatus* broodstock. Aquaculture, 2010, 301(1-4): 78-64

(编辑 马瑾艳)

## Comparison of the Early Culture Performance, the Disease Resistance, and the Non-Specific Immunity Between Wild-Caught and Pond-Reared Juvenile Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*

JIANG Xiaodong<sup>1</sup>, WU Xugan<sup>1,2①</sup>, LIU Qing<sup>1,3</sup>, HE Jie<sup>1</sup>, ZHANG Qinghua<sup>1</sup>,  
WANG Youpeng<sup>2</sup>, CHENG Yongxu<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Jiangsu Suqian Xubang Fisheries Science and Technology Ltd. Co., Sihong 223900;

3. Collaborative Innovation Center of Aquatic Animal Breeding Center Certificated by Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** It has been revealed that wild juvenile *Eriocheir sinensis* (WC) are advantageous in culture performance compared to pond-reared juvenile crabs (PR), however, their differences in the disease resistance, immunity, and the early culture performance remained unclear. In this study we addressed these questions by conducting the culture experiment, the pathogen challenge test, and the analysis of non-specific immune indices. The early culture performance included the first molt interval, survival rate, and weight gain rate. The mortality during the pathogen challenge test and immune indices of WC and PR populations were also examined. Our results were described as follows: (1) Both male and female WC showed significantly lower first molt interval and weight gain rate (*WGR*) than PRs, but there was no significant difference in the survival rate and the specific growth rate (*SGR*) between the two groups ( $P>0.05$ ). (2) Within 12–96 hours in the pathogen challenge test, the cumulative mortality of WC was lower than that of PR, and after 96 hours the cumulative mortality of WC and PR were 28.3% and 50.0% respectively. (3) In terms of the non-specific immune indices in hepatopancreas, the alkaline phosphatase (ALP) activities of both male and female individuals were significantly lower in the WC population than in the PR population. For males, total antioxidant capacity (T-AOC) and nitric oxide (NO) were higher in WC, and for females, malondialdehyde (MDA) was lower in WC. (4) In terms of the non-specific immune indices in hemolymph, WC had significantly higher NO and lower acid phosphatase (ACP) than PR in both sexes. Moreover, for female, WCs had higher T-AOC, hemocyanin (Hc), and glutathione reductase (GR) than PR, but lower ALP,  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT), and glutathione peroxidase (GSH-Px). In conclusion, the pond-reared juveniles showed better culture performance during the early culture stage, while wild juveniles had stronger immune ability and lower mortality than the pond-reared juveniles. Each type of the crab seeds may have advantages in certain aspects, and the mechanisms underlying the differences need to be investigated in future studies.

**Key words** Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); Juvenile crab; Wild population; Culture performance; Immune performance

① Corresponding author: WU Xugan, E-mail: xgwu@shou.edu.cn



# 不同近交程度对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)繁殖性能的影响\*



王好锋<sup>1,2,3</sup> 高保全<sup>2,3</sup> 刘 萍<sup>2,3①</sup> 李 健<sup>2,3</sup> 潘鲁青<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 以本实验室建立的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)全同胞家系为研究对象,通过连续观测 6 代三疣梭子蟹近交家系的抱卵量、排幼量、孵化率、单位体重抱卵量、单位体重排幼量及幼体发育各阶段的变态率 6 个指标来评价近交对三疣梭子蟹繁殖性能的影响。方差分析显示,在实验亲蟹的规格大小对测量数据无影响的条件下,近交系数每增加 10%,各近交代与非近交代  $F_{1m}$  在单位体重抱卵量与单位体重排幼量的差异不显著( $P>0.05$ ),这 2 个指标的近交衰退系数分别为  $-2.789\% \sim -6.620\%$  和  $-1.188\% \sim -5.938\%$ ; 孵化率的差异也不显著( $P>0.05$ ),衰退系数为  $-1.859\% \sim -7.222\%$ ,表明没有明显的近交衰退;由溞状幼体(Z)阶段、大眼幼体(M)阶段到 II 期幼蟹阶段的变态率变化趋势可知,随着近交代数的增加,各阶段的变态率呈下降趋势。

**关键词** 近交; 三疣梭子蟹; 家系; 繁殖

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0138-06

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)生长较快,个体较大,肉味鲜美,食用价值高,1981 年以来被列为我国海洋水产养殖主导种类之一(孙颖民等, 1984)。为满足水产养殖的需要,越来越多的苗种由人工蓄养的亲本群体提供,在苗种生产过程中,捕获的亲本数量有限,由此不可避免会造成群体内的近交,加之累代养殖所造成的种质退化,遗传多样性降低的可能性大大增加,近交到底能否引起群体近交衰退也日益成为人们关注的焦点(张洪玉等, 2009)。

在自然条件和人工养殖条件下都能产生近交,近交会使得物种的一些表型性状降低(Frankham *et al.*, 2001),称为近交衰退。相比存活、繁殖和竞争能力等与适应性相关的综合性状,形态性状更容易受到近交的影响产生近交衰退(马大勇等, 2005)。近交衰退

的程度随着物种的不同、近交程度的差异、实验测量指标的特性等而产生差异(Lannan, 1981; Keller *et al.*, 2002; Affre *et al.*, 1999),同时,实验材料不同的近交历史以及不同的遗传负荷也能造成不同物种及同种不同群体的实验对象的近交衰退程度产生差异(马大勇等, 2005)。

近交对动物繁殖性能的研究多集中在胎生哺乳动物和禽类(刘卫东等, 2010; Cassinello *et al.*, 2005; Frommen *et al.*, 2008; Nina *et al.*, 1994)。研究发现,近交对水产动物的性腺成熟系数(Gallardo *et al.*, 2004)、产卵数(Su *et al.*, 1996)、卵孵化率、幼鱼死亡率(Gjerde *et al.*, 1983)、幼鱼畸形率及存活率(Gjerde *et al.*, 1983; Nakadate *et al.*, 2003)有显著的影响。但并非所有近交相关的研究都证明近交造成了衰退,如闫喜武等

\* 国家自然科学基金项目(41576147)、青岛海洋科学技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)共同资助。王好锋, E-mail: whf.06@163.com

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

收稿日期: 2015-12-04, 收修改稿日期: 2015-12-10

(2011)研究表明, 虽然近交使菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活性状出现了不同程度的衰退, 却同时改良了近交世代的生长性状。Moss 等(2007)研究表明, 在没有胁迫的养殖条件下, 近交对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的存活没有产生显著的影响。Crnokrak 等(1999)大量的近交相关研究发现, 只有约54%的研究显示了显著的近交衰退。

关于三疣梭子蟹近交多代家系的繁殖性能是否出现衰退还未见报道, 鉴于此, 本研究系统比较了近交6代三疣梭子蟹家系的抱卵量、排幼量、孵化率、变态率等几个相关性状, 以期评价近交对三疣梭子蟹繁殖性能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验于2011年3-6月在中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地山东潍坊市昌邑海丰水产养殖有限责任公司进行。本实验室将收集的莱州湾海区、鸭绿江口海区、海州湾海区和舟山海区4个不同地理群体作为基础群体, 利用人工定向交尾技术, 通过自交构建传代家系, 良种家系留种传代。2005年建立的近交家系至2011年传至6代( $F_6$ ), 每一代挑选形态学指标无差异的3个抱卵亲蟹作为实验材料建立家系, 共6代18个实验家系。

### 1.2 实验设施与方法

**1.2.1 实验设施** 亲蟹于2010年9月在室内设计定向交尾后, 于底面积为30-40 m<sup>2</sup>、水位为0.8-1.2 m的室内水泥池中越冬, 池底铺10-15 cm细沙, 亲蟹入池前用二溴海因进行体表消毒, 越冬温度控制在8-10℃, 越冬期间, 亲蟹密度控制在5-8只/m<sup>2</sup>, 溶氧不低于5 mg/L, pH值为7.8-8.6, 盐度为28-32, 光照强度控制在500 lx以下。

亲蟹排幼前转入8 m<sup>2</sup>×1.5 m的室内单独育苗池中, 幼体以褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)、卤虫(*Brine shrimp*)为饵料, 每天均换水10%, 连续充气培养。

**1.2.2 实验亲蟹的指标测量** 测定实验亲蟹的形态学指标, 用游标卡尺测量所选定亲蟹的全甲宽, 精确到0.1 mm; 根据文献(孙颖民等, 1984)观察越冬抱卵亲蟹的卵块发育情况, 采用显微镜检查膜内幼体的心跳次数(祝世军, 2005), 观测卵块发育颜色, 结合镜检卵膜内幼体每分钟心跳次数, 确定亲蟹布入单独育苗池的时间, 并预估亲蟹排幼时间。

**1.2.3 近交系数与近交衰退系数的确定** 近交系数(Inbreeding coefficient)是衡量被选择物种近交衰退的标准指标, 同时也是对近交进行度量最常用的指标, 是根据近亲交配的世代数, 将基因的纯化程度用百分数来表示, 也指个体由于近交而造成异质基因减少时, 同质基因或纯合子所占的百分比, 其数值越大即表明个体的基因越纯合, 近交程度越高。近交系数( $F_x$ )通过以下公式进行估计(马大勇等, 2005):

$$F_x = \sum \left[ \left( \frac{1}{2} \right)^{n_1 + n_2 + 1} (1 + F_A) \right]$$

式中,  $n_1$ 是共同祖先与该个体父本间的世代间隔数,  $n_2$ 是共同祖先与该个体母本间的世代间隔数,  $F_A$ 是共同祖先本身的近交系数。

各个表型性状与  $F_{1m}$  代相比较的近交衰退系数(Inbreeding depression coefficient,  $IDC$ )可以通过以下的计算公式进行估计:

$$IDC = \frac{1 - \frac{\bar{W}_{Inbred}}{\bar{W}}}{(F - F_{Inbred})}$$

式中,  $\bar{W}_{Inbred}$  和  $\bar{W}$  分别为近交家系和  $F_{1m}$  代家系各个观测指标的平均值,  $F_{Inbred}$  和  $F$  分别为近交家系和  $F_{1m}$  代家系的近交系数。

### 1.2.4 繁殖力的测定

**1.2.4.1 排幼量的测定** 三疣梭子蟹亲蟹一次受精可排幼2-5次, 研究表明, 第2次排幼幼体的质量明显比第1次排幼幼体质量差(Wu *et al.*, 2010)。鉴于经济效益、养殖成本及优化保种, 本研究只对第1次排幼的幼体进行相关实验数据的收集。采用显微镜检查亲蟹卵膜内幼体的心跳次数, 在其排幼前10 h左右, 将亲蟹用箱笼放入8 m<sup>2</sup>×1.5 m的单独育苗池, 监测排幼时间, 排幼后6 h, 在育苗池均匀设6个位置, 分别取400 ml水样, 统计每个位置的 $Z_1$ 幼体个数, 计算6个位置的均值, 再根据育苗池水体的体积计算亲蟹的排幼量。

**1.2.4.2 抱卵量的测定** 用天平测出产卵前亲蟹体重  $m_1$ , 产卵后体重  $m_2$ , 精确到1 g; 用电子天平称取刚产出的卵1.0 g, 在解剖镜下计数, 平行测2次, 平均值为卵密度(粒/g), 通过以下公式计算抱卵量:

$$\text{抱卵量} = (m_1 - m_2) \times \text{卵密度}$$

**1.2.4.3 孵化率的计算** 亲蟹在育苗池中孵化出的  $Z_1$  幼苗数占受精卵总数的百分比即为亲蟹的孵化率, 实验亲蟹的孵化率通过以下公式进行估计:

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{排幼量}}{\text{抱卵量}} \times 100$$

**1.2.4.4 变态率的测定** 三疣梭子蟹的幼体发育经历了溞状幼体(Z)阶段和大眼幼体(M) 2 个阶段。本研究按照孙颖民等(1984)的阶段分期特点作为分期主要依据。采用显微镜观察幼体发育状态,根据发育阶段的时间,设置每次幼体蜕皮变态 6 h 为测量时间点,从育苗池的均匀 6 个位置分别取 400 ml 水样,根据计数时水体体积统计  $Z_1$  和  $Z_4$ ,分别取平均值,记为  $Sz_1$  和  $Sz_4$ ;在家系出苗时,用电子天平称取每个家系 100 只 II 期幼蟹的重量,记为  $m$ ,所出蟹苗的重量为  $N$ ,精确到 0.1 g,根据  $100 N/m$  计算出苗的 II 期幼蟹个体数,记为  $S_{II}$  期幼蟹,计算各阶段的变态率。

**1.2.5 数据处理与分析** 采用统计分析软件 SPSS 17.0 对各性状的平均值、标准差进行统计分析,单因素方差分析(One-way ANOVA)的显著性水平设为  $P < 0.05$ ,比较不同时期实验组间平均值差异,并对差异显著的组间进行多重比较分析(LSD)。以近交代数为分组依据,以亲蟹的全甲宽、体重为协变量,对所测得的抱卵量、排幼量、变态率等指标进行协方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 近交系数与亲蟹形态学指标

本研究以 2005 年采自莱州湾海区、鸭绿江口海区、海州湾海区和舟山海区 4 个不同地理群体的原始

野生蟹作为基础群体,认为原始祖先的“祖父本”和“祖母本”在地理位置上没有近交的可能,即原始祖先的近交系数为 0。根据近交系数计算公式所得每一代的近交系数如表 1 所示,可见全同胞家系的建立在较短的世代内就可以达到非常高的近交系数。

### 2.2 繁殖力分析

对繁殖力指标的数据分析结果如表 2 所示,随着近交代数和近交系数的增加,单位体重抱卵量、单位体重排幼量虽然在总体上有下降的趋势,但方差表明各代之间的差异性并不显著( $P > 0.05$ );抱卵量和排幼量呈下降的趋势,但各代繁殖力的差异性并不显著( $P > 0.05$ );孵化率没有呈现明显的上升或下降的趋势,其各代的实际孵化率差异性也不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.3 协方差分析

为剔除亲蟹的规格大小对测量数据的影响,以近交代数为分组依据,分别以亲蟹的全甲宽和体重为协变量,对所测得的抱卵量、排幼量、孵化率等繁殖性能进行协方差分析,结果如表 3 所示。由表 3 结果可知,以实验所选亲蟹的全甲宽或体重作为协变量,各个因变量的  $F$  统计量的相伴概率值均大于显著性水平 0.05,说明本研究所选亲蟹的规格大小对各个数据的测量没有显著影响。

表 1 三疣梭子蟹亲蟹规格  
Tab.1 Information of *P. trituberculatus* broodstock

代数 Generation	家系类别 Category	全甲宽 Full carapace width (mm)	产前体重 Body weight before hatching $m_1$ (g)	产后体重 Body weight after hatching $m_2$ (g)	近交系数 $F$
F <sub>1m</sub>	HJ9-210	137.75	202.6	169.8	0.0000
	GD1-210	128.24	191.5	143.0	
	HJ6-110	140.16	204.2	162.3	
F <sub>2m</sub>	HJ1821	144.71	257.0	213.2	0.0000
	HJ928	133.06	194.7	151.7	
	HJ839	140.84	204.9	178.3	
F <sub>3m</sub>	Z21	136.83	173.6	139.4	0.2500
	L28	142.69	189.0	157.5	
	HJ1822	140.96	212.6	164.8	
F <sub>4m</sub>	LH1	148.53	233.7	195.4	0.3750
	DZ3-207-3	142.12	205.1	170.8	
	HJ1703	143.15	196.5	164.1	
F <sub>5m</sub>	P4-306-4	153.16	273.7	247.8	0.5000
	Q21-106-4	152.06	250.7	208.8	
	Q17-206-4	165.72	338.5	269.5	
F <sub>6m</sub>	G10	130.22	164.3	137.8	0.5938
	HJ1210	150.07	295.3	246.3	
	Q21	144.07	218.2	180.9	

表 2 三疣梭子蟹不同世代的繁殖力(平均值±标准差)

Tab.2 The reproductive performance of every generation of *P. trituberculatus* (Mean±SD)

代数 Generation	单位体重抱卵量 Fecundity per unit body weight (eggs/g)	单位体重排幼量 Egg production per unit body weight (eggs/g)	抱卵量 Fecundity (10 <sup>4</sup> eggs)	排幼量 Egg production (10 <sup>4</sup> eggs)	孵化率 Hatching rate (%)
F <sub>1m</sub>	5541.68±385.46	2718.27±523.24	86.37±1.65	42.60±4.22	49.98±1.93
F <sub>2m</sub>	4473.22±323.56	3179.41±325.89	79.49±2.04	55.74±2.05	68.73±3.32
F <sub>3m</sub>	5155.36±446.92	3005.13±354.33	79.57±1.83	47.00±1.64	59.01±1.32
F <sub>4m</sub>	4166.06±151.96	2597.17±268.45	73.61±6.33	46.77±2.04	62.51±3.03
F <sub>5m</sub>	3934.38±362.01	2209.81±254.36	95.90±4.58	53.20±2.66	54.63±3.32
F <sub>6m</sub>	4188.33±146.04	2353.93±330.21	79.08±2.36	46.47±2.59	56.25±2.89

表 3 三疣梭子蟹各代的抱卵量、排幼量、孵化率的协方差分析(ANOVA)

Tab.3 Covariance analysis of fecundity, egg production, and hatching rate of *P. trituberculatus* (ANOVA)

源 Source	因变量 Dependent variable	统计量 F	相伴概率 Sig.
体重 Body weight	抱卵量 Fecundity	2.933	0.115
	排幼量 Egg production	3.507	0.088
	孵化率 Hatching rate	1.052	0.327
	单位体重抱卵量 Fecundity per unit body weight	0.192	0.670
	单位体重排幼量 Egg production per unit body weight	0.076	0.787
全甲宽 Full carapace width	抱卵量 Fecundity	3.485	0.089
	排幼量 Egg production	3.345	0.095
	孵化率 Hatching rate	0.990	0.341
	单位体重抱卵量 Fecundity per unit body weight	0.128	0.727
	单位体重排幼量 Egg production per unit body weight	0.073	0.792

## 2.4 衰退系数

依据祝世军(2005)中的计算公式得出的衰退系数数值见表 4, 以 F<sub>1m</sub> 代作为对比代进行分析。由表 4 可知, 相对于 F<sub>1m</sub> 代, 除 F<sub>2m</sub> 代外, 近交系数每增加 10%, 单位体重抱卵量的衰退系数为-2.789% ~ -6.620%, 单位体重排幼量的衰退系数为-1.188% ~ -5.938%, 孵化率没有表现出衰退。

## 2.5 变态率分析

分析各代家系各阶段的变态率, 结果如表 5 所示, 经分析可知, 各期的变态率总体呈下降趋势。

## 3 讨论

### 3.1 遗传多样性、物种适应性与近交衰退

遗传多样性主要是指种内基因的变化, 包括种内不同群体之间或同一群体内不同个体的遗传变异的总和, 研究对象为群体内的个体间变异、群体间变异、品种间变异等。Reed 等(2003)发现, 物种遗传多样性与适应性之间存在显著的正相关。近交的繁育方式是有亲缘关系的个体间交配, 增加了有害等位基因的纯合几率, 多代繁殖后促使遗传多样性降低, 导致后代

个体适合度(即对环境因素的适应性)下降, 而适合度的降低, 则造成后代基因库中的基因频率随世代而减, 这就是近交衰退现象。

### 3.2 近交对动植物繁殖性能的影响

近交衰退是对适合度变化的一种反映, 适合度包含许多成分, 近交衰退可以直接对适合度成分进行测定, 近交衰退程度的大小主要受近交世代即近交系数的影响, 但在不同时期可能受到不同因素的影响(Husband *et al*, 1996)。近交衰退可能发生在植物生长的各个阶段, 非常有害的等位基因通常会在植物生长的早期造成近交衰退, 中等有害的等位基因产生的近交衰退则多在植物生长的后期出现(Fischer *et al*, 2003), 但动物因胚胎发育早期就分化出生殖细胞系, 而这些生殖细胞在有性生殖成为精子、卵细胞前, 仅历经较少的细胞分裂, 积累的突变较少, 而来源于分生组织细胞的植物孢子体细胞经历了较多分类, 比动物生殖细胞更容易积累突变, 造成的遗传负荷大, 更容易受到近交的影响(Hämmerli *et al*, 2003)。对动物近交衰退的研究已证明, 近交系数每增加 10%, 银大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的性腺成熟系数(Gallardo *et al*, 2004)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的产卵数(Su *et al*, 1996)的近交衰退系数分别为-5.3%和-6.1%。

表 4 三疣梭子蟹各代亲蟹的衰退系数(%)  
Tab.4 Inbreeding depression coefficient of every generation of *P. trituberculatus* (%)

代数 Generation	单位体重抱卵量的衰退系数 IDC of fecundity per unit body weight	单位体重排幼量的衰退系数 IDC of egg production per unit body weight	孵化率的衰退系数 IDC of hatching rate
F <sub>2m</sub>	0.000	0.000	0.000
F <sub>3m</sub>	-2.789	4.221	7.222
F <sub>4m</sub>	-6.620	-1.188	6.685
F <sub>5m</sub>	-5.801	-3.741	1.859
F <sub>6m</sub>	-5.938	-5.938	2.112

注: 近交衰退系数为近交系数每增加 10%, 近交群体比基础群体或非近交群体表型值下降的百分率

Notes: The estimated inbreeding depression coefficient in the table is the decrease percentage of the inbreeding population compared with the base or non-inbreeding population when the inbreeding coefficient increases per 10%

表 5 三疣梭子蟹各代家系各个阶段的变态率分析(平均值±标准差)

Tab.5 Metamorphosis rate at each stage from zoea I (Z<sub>1</sub>) to crab II (C<sub>2</sub>) of every generation of *P. trituberculatus* (Mean±SD)

代数 Generation	Z <sub>1</sub> 至 Z <sub>4</sub> 变态率 Metamorphosis rate from zoea I to zoea IV (%)	Z <sub>4</sub> 至 II 期幼蟹变态率 Metamorphosis rate from zoea IV to crab II (%)	Z <sub>1</sub> 至 II 期幼蟹变态率 Metamorphosis rate from zoea I to crab II (%)
F <sub>1m</sub>	58.87±5.12	18.83±2.03	10.32±1.46
F <sub>2m</sub>	45.17±3.37	16.47±1.46	5.52±0.95
F <sub>3m</sub>	61.10±6.41	15.27±1.24	9.31±2.37
F <sub>4m</sub>	44.33±3.23	8.53±1.02	3.73±2.77
F <sub>5m</sub>	47.40±2.93	7.48±0.89	3.34±0.55
F <sub>6m</sub>	42.17±5.60	12.11±1.33	5.57±0.04

### 3.3 近交对三疣梭子蟹繁殖性能的影响

本研究系统比较了近交 6 代三疣梭子蟹的抱卵量、排幼量、孵化率、变态率等几个相关繁殖性状来评价近交对三疣梭子蟹繁殖性能的影响, 相对于 F<sub>1m</sub> 代, 随着近交代数的增加, 单位体重抱卵量、单位体重排幼量均呈现不同程度的近交衰退, 表现在近交系数每增加 10%, 单位体重抱卵量和单位体重排幼量的衰退系数分别为 -2.789%~ -6.620% 和 -1.188%~ -5.938%, 但近交后代与非近交代的孵化率相比并没有表现出衰退。马大勇等(2005)通过分析虹鳟、银大马哈鱼、日本对虾(*Penaeus japonicus*)等水产物种得出结论, 10% 的近交能引起水产物种的总体适应性性状产生 3%~50% 的衰退。本研究中, 单位体重抱卵量、单位体重排幼量 2 个指标的近交衰退系数与该范围值基本一致。本研究发现, 随着近交代数的增加, 虽然繁殖性能的各项性状都出现了不同程度的近交衰退, 但各代之间的差异并不显著, 这可能由于这些家系是本实验室多年良种选育, 致使许多有害基因在多次的家系自繁时被剔除, 有害基因的数量及程度都已有较大降低(Su *et al.*, 1996)。马大勇等(2005)研究指出, 实验材料不同的近交历史以及不同的遗传负荷也能造成不同物种及同种不同群体的近交衰退程度产生差异, 另外, 张洪玉等(2009)也指出, 近交衰退现象具有不

稳定性, 即近交群体在不同的环境条件下表现不一, 同一物种、同一性状在同一种环境条件下产生近交衰退, 而在另一种环境却不产生近交衰退。

虽然并不是所有的种群近交都能引起近交衰退(Lannan *et al.*, 1981; Falconer *et al.*, 1996), 但近交降低了种群的杂合度、增加了近交衰退的可能性(Bensten *et al.*, 2002), 在人工养殖条件下的封闭群体中近交是不可避免的(Falconer *et al.*, 1996; Pante *et al.*, 2001), 除非是有计划、有目的地设计近交, 否则近交通常是有害的, 育苗人员应尽量避免育苗中产生近交衰退(Falconer *et al.*, 1996)。因此, 近交只适宜在种群提纯与保纯的过程中有目的、有计划地采用, 在养殖生产中, 应尽量避免近交的发生。

### 参 考 文 献

- 马大勇, 胡红浪, 孔杰. 近交及其对水产养殖的影响. 水产学报, 2005, 29(6): 849-856
- 孙颖民, 闫愚, 孙进杰, 等. 三疣梭子蟹的幼体发育. 水产学报, 1984, 8(3): 219-226
- 刘卫东, 吴常信, 唐仕强, 等. 猪的不同亲缘关系选配对繁殖性能的影响. 畜牧与兽医, 2010, 42(9): 107-108
- 闫喜武, 孙欣, 张跃环, 等. 菲律宾蛤仔奶牛蛤品系两个世代的杂交与近交效应. 水产学报, 2011, 35(5): 682-692
- 张洪玉, 罗坤, 孔杰, 等. 近交对中国明对虾生长、存活及抗逆性的影响. 中国水产科学, 2009, 16(5): 744-750
- 祝世军. 三疣梭子蟹亲蟹培育及提高其受精卵孵化率的研究. 河北渔业, 2005(4)
- Affre L, Thompson JD. Variation in self-fertility, inbreeding



- depression and levels of inbreeding in four *Cyclamen* species. *J Evol Biol*, 1999, 12(1): 113–122
- Bensten HB, Olesen I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. *Aquaculture*, 2002, 204(3–4): 349–359
- Cassinello J. Inbreeding depression on reproductive performance and survival in captive gazelles of great conservation value. *Biol Conserv*, 2005, 122(3): 453–464
- Crnokrak P, Roff DA. Inbreeding depression in the wild. *Heredity*, 1999, 83(3): 260–270
- Falconer BDS, Mackay TFC, *et al.* Introduction to quantitative genetics. Longman, Essex, England, 1996: 64 pp
- Fischer M, Hock M, Paschke M, *et al.* Low genetic variation reduces cross-compatibility and offspring fitness in populations of a narrow endemic plant with a self-incompatibility system. *Conserv Genet*, 2003, 4(3): 325–336
- Frankham R, Gilligan DM, Morris D, *et al.* Inbreeding and extinction: effects of purging. *Conserv Genet*, 2001, 2(3): 279–285
- Frommen JG, Luz C, Mazzi D, *et al.* Inbreeding depression affects fertilization success and survival but not breeding coloration in three pine sticklebacks. *Behaviour*, 2008, 145(4): 425–441
- Gallardo JA, Garcia X, Lhorente JP, *et al.* Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture*, 2004, 234(1–4): 111–122
- Gjerde B, Gunnes K, Gjedrem T. Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture*, 1983, 34(3–4): 327–332
- Hämmerli A, Reusch TB. Inbreeding depression influences genes size distribution in a marine angiosperm. *Mol Ecol*, 2003, 12(3): 619–629
- Husband BC, Schemske DW, *et al.* Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 1996, 50(1): 54–70
- Keller LF, Waller DM. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol*, 2002, 17(5): 230–241
- Keys SJ, Crocos PJ, BurrIDGE CY, *et al.* Comparative growth and survival of inbred and outbred *Penaeus (Marsupenaeus) japonicas*, reared under controlled environment conditions: indications of inbreeding depression. *Aquaculture*, 2004, 241(1): 151–168
- Lannan JE. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: IV. Inbreeding and larval survival. *Aquaculture*, 1981, 39(1–4): 217–228
- Moss DR, Arce SM, Otoshi CA, *et al.* Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 2007, 272(S1): S30–S37
- Nakadate M, Shikano T, Taniguchi N, *et al.* Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture*, 2003, 220(1–4): 219–226
- Nina M, Valberg N. Effect of inbreeding on reproductive performance in blue fox (*Alopex lagopus*) vixens. *Acta Aquaculture Scandinavica, Section A, Animal Science*, 1994, 44(4): 214–221
- Pante MJR, Gjerde B, McMillan I, *et al.* Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2001, 192(2–4): 213–224
- Reed DH, Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol*, 2003, 17(1): 230–237
- Su GS, Liljedahl LE, Gall GAE. Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1996, 142(3–4): 139–148
- Wu XG, Cheng YX, Zeng CS, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 2010, 303(1–4): 94–100

(编辑 冯小花)

## Effects of Different Inbreeding Degree on Reproductive Performance of Swimming Crab (*Portunus trituberculatus*)

WANG Haofeng<sup>1,2,3</sup>, GAO Baoquan<sup>2,3</sup>, LIU Ping<sup>2,3①</sup>, LI Jian<sup>2,3</sup>, PAN Luqing<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

**Abstract** This study investigated the effects of inbreeding on the reproductive performance of swimming crab *Portunus trituberculatus*, by comparing reproductive traits, including fecundity, egg production, fecundity per unit body weight, egg production per unit body weight, hatchability and metamorphosis rate, in full-sib families of six generations (F<sub>1m</sub> to F<sub>6m</sub>). The results showed that the range of inbreeding depression coefficients were -2.789% ~ -6.620%, -1.188% ~ -5.938% and -1.859% ~ -7.222% for fecundity per unit body weight, egg production per unit body weight and hatching rate, respectively, and there was no significant inbreeding depression in these three traits ( $P > 0.05$ ). As inbreeding level increased, metamorphosis rate from zoea I to juvenile crab II presented a downward trend.

**Key words** Inbreeding; *Portunus trituberculatus*; Family; Reproduction

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

# 固相吸附毒素跟踪技术监测牡蛎养殖区中 腹泻性贝毒\*



宿志伟<sup>1,2</sup> 赵 峰<sup>1</sup> 刘远平<sup>3</sup> 徐 娜<sup>4</sup> 周德庆<sup>1①</sup>  
姚建华<sup>5</sup> 李钰金<sup>3</sup> 刘志敏<sup>4</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306;  
3. 荣成泰祥食品股份有限公司 荣成 264300; 4. 威海时进食品检测服务有限公司 荣成 264300;  
5. 青岛华测检测技术有限公司 青岛 266101)

**摘要** 本研究根据固相吸附毒素跟踪技术(Solid phase adsorbent and toxin tracking, SPATT)原理,在牡蛎养殖区内,利用 HP20 大孔吸附树脂对海水中常见的 4 种腹泻贝类毒素:大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(Dinophysistoxin-1, DTX-1 和 Dinophysistoxin-2, DTX-2)、米氏螺环毒素(Gymnodimine toxins, GYM)进行吸附,对其吸附效率进行评价;建立了从海水中富集与检测 4 种常见腹泻性贝类毒素的方法;在养殖区内,选取 5 个采样点,每隔 7 d,同步采集海水与牡蛎样品,对牡蛎养殖区海水中和牡蛎体内的腹泻性贝类毒素分布情况进行了检测,分析海水中与牡蛎体内毒素含量的关系。结果显示,HP20 树脂对 4 种腹泻性毒素吸附回收率良好,OA 为 98.9%,DTX-1 为 103.3%,DTX-2 为 93.5%,GYM 为 76.6%。在整个监控期内,除 DTX-2 外,其他 3 种毒素均有检出,OA 浓度为 20.451–422.352  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,DTX-1 浓度为 15.954–368.678  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,GYM 浓度为 20.452–282.231  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在整个监控期内,海水样品中 3 种毒素含量随时间的变化呈现同一分布特征,牡蛎体内毒素含量随着海水中毒素含量的升高而升高,且峰值出现延后现象。研究表明,该技术能有效对养殖区水环境进行时空监控,为海水中和海洋贝类体内毒素的监控提供有力的支持,同时也为贝类毒素预警体系的建立提供方法支持。

**关键词** 腹泻性贝类毒素;牡蛎养殖区;固相吸附毒素跟踪技术;高相液相色谱-串联质谱  
**中图分类号** X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0144-07

近年来,受人类活动的影响,有害赤潮现象在我国频繁发生,伴随赤潮而来的产毒藻类产生的海洋生物毒素,不仅恶化海洋环境、严重影响海洋渔业资源和水产养殖,而且还可以通过食物链,危害人体健康,甚至致人死亡(周秀锦等,2012)。腹泻性贝类毒素(Diarrhetic shellfish poisons, DSP)是其中一类常见的危害严重的海洋毒素,它是由海洋中藻类或微生物产生的一类脂溶性次生代谢产物,主要来自于鳍藻属和原甲藻(马荣桢等,2013)。常见腹泻性贝类毒素主要

有以下 4 种:聚醚类毒素的大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)和鳍藻类毒素(Dinophysistoxin-1, DTX-1 和 Dinophysistoxin-2, DTX-2)以及米氏螺环毒素(Gymnodimine toxins, GYM)(母清林等,2013),以 OA 最为常见。人体 DSP 中毒的症状表现为消化功能紊乱,出现腹泻、呕吐、腹痛的同时,并伴有恶心和肠胃绞痛等类似急性肠胃炎的症状(张锐等,2013)<sup>1)</sup>。每年由贝类毒素引起的人体中毒事件屡见不鲜,给水产品加工业及进出口贸易造成了巨大的经济损失(黄翔等,

\* 国家科技支撑计划课题(2015BAD17B01)资助。宿志伟, E-mail: suzw\_ysfri@126.com

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

收稿日期:2015-10-12, 收修改稿日期:2015-11-10

1) 张锐,兰文开,欧小雷,等. 腹泻性贝毒(DSP)研究进展. 中国环境科学学会学术年会论文集,2013, 65–68

2013; 李兆新等, 2016)。

固相吸附毒素跟踪技术(Solid phase adsorbent and toxin tracking, SPATT)由荷兰学者 MacKenzie 等(2004)提出, 该技术利用吸附树脂主动吸附的原理直接从海水中富集毒素。结合毒素检测技术, 能从时间和空间两方面反应整个水体中毒素变化情况, 能全方位实时监控水体环境, 建立海水中毒素提前预警方法(Caillaud *et al*, 2011)。SPATT 技术在麻痹性贝毒与腹泻性贝毒的富集与检测方面的应用已有报道。Fux 等(2010)经过长时间实验, 应用 HP20 树脂成功吸附 OA 和 DTX-2 毒素, 在实验室中证明该种树脂能有效吸附这两种常见的贝类毒素。Rodriguez 等(2011)证明该技术可用于麻痹性贝毒预警体系的建立。荷兰学者 McCarthy 等(2008)在 Longh Hyne 海洋自然保护区, 比较了 HP20 大孔型吸附树脂与 SP700 型树脂对腹泻性贝毒的吸附能力, 建立了水体环境中两种腹泻性贝类毒素的时间和空间变化的全方位检测。在国内, 杨守国(2010)<sup>1)</sup>在胶州湾海域进行相关实验, 研究了 OA 与百日咳毒素(Pertussis toxin, PTX) 2 种毒素随时间的变化趋势, 但未建立整个水体环境内的毒素空间变化规律。上述研究表明, 以 HP20 为代表的树脂能吸附海水中的贝类毒素, SPATT 技术可用于监控水体中贝类毒素的时空变化。但关于树脂对不同贝类毒素的吸附效果(赵慧, 2012)<sup>2)</sup>, 以及树脂吸附贝类毒素的含量同养殖区生物样品中毒素含量之间关系的研究较少(Rodriguez *et al*, 2011)。本研究在前人研究的基础上, 系统研究了 HP20 树脂对 4 种常见腹泻贝类毒素的吸附效果, 在黄海某牡蛎养殖区进行了实验, 调查了海水中 4 种常见的腹泻性贝类毒素, 分析了 4 种毒素在水体环境和牡蛎体内的时间与空间的变化规律, 为我国今后贝类毒素监控体系的建立提供了方法和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用毒素标准品购于加拿大海洋生物科学研究所; 甲醇、乙酸乙酯、甲酸、乙腈、异丙醇(色谱纯)为德国默克公司生产, 氨水, 乙酸铵(色谱纯)购于天津科密欧化学试剂公司。

### 1.2 仪器设备

液相色谱串联四级杆质谱联用仪(Thermo TSQ

Quantum Access, 美国), 配电喷雾离子源(ESI); N-EVAP112 型氮吹仪(Organomation Associates, 美国); KQ-600DE 型超声清洗器(KQ-300VDV, 昆山超声仪器有限公司, 上海); 旋转蒸发仪(R-3, BUCHI, 瑞士); 分析天平, 精确度 0.0001 g (XS10SDU, Mettler Toledo, 瑞士); HP20 大孔吸附树脂(DIAION, 三菱, 日本); 48  $\mu\text{m}$  聚酯网布; 砂芯滤柱(30 cm  $\times$  2 cm), 可调节流速。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 树脂吸附效率实验验证** 选用 HP20 型大孔吸附树脂, 用孔径为 48  $\mu\text{m}$  的聚酯网布缝制成边长为 6 cm  $\times$  6 cm 的正方形布袋, 装入 20 g DIAION HP20 大孔吸附树脂之后密封, 在正方形布袋的一角固定尼龙挂扣。吸附袋在甲醇中浸泡 24 h, 然后用蒸馏水浸泡 2 h, 取出, 换新蒸馏水重复 3 次, 放入密封的塑料袋中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下短时间保存, 待用。

选用本底不含 4 种贝类毒素的海水, 分别放置于 5 个相同的容器中, 每个容器放置约 5 L 海水, 并加入 200  $\mu\text{l}$  浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的含有 4 种毒素的混合标准溶液, 分别放置已活化的树脂吸附袋, 进行主动吸附, 第 1、3、5、7、9 天取出, 进行样品处理, 设 3 组平行, 取平均值。

**1.3.2 海水中贝类毒素富集** 根据统计学原理, 在整个养殖区的 4 个角和对角线的交点位置设置 5 个采样点, 7 d 采样 1 次。将吸附袋系于长绳上, 分上、中、下 3 层, 层间隔 2 m, 每层一次固定 2 个吸附袋, 将绳系于固定位置的漂浮杆上, 每间隔 7 d 将吸附袋取出, 再放入新的吸附袋, 提取的吸附袋用蒸馏水冲洗, 放入预先编号的样品袋中, 冰盒保存直至实验室 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下暂存。

将树脂填料转入砂芯滤柱中, 用 50 ml 去离子水洗去盐分, 把柱子中水分正压吹干, 加入 20 ml 甲醇, 滤入蒸发瓶中, 再加入 20 ml 甲醇重复提取 1 次。提取液在 40 $^{\circ}\text{C}$  蒸去甲醇, 残余 1–2 ml 水, 用 5 ml 二氯甲烷萃取后离心, 取出二氯甲烷层, 重复萃取 1 次, 合并 2 次二氯甲烷萃取液后氮气吹干, 用 1.0 ml 甲醇定容, 以 0.22  $\mu\text{m}$  的聚四氟乙烯滤膜过滤, 供 LC-MS/MS 检测。

**1.3.3 牡蛎中贝类毒素样品的制备、净化** 准确称取均质后的样品 2.00 g 于 25 ml 离心管中, 加入 10 ml 80% 甲醇水溶液, 旋涡振荡 1 min, 超声提取 10 min, 4000 r/min 离心 6 min, 将上清液转移至 25 ml 容量瓶

1) 杨守国. 黄海胶州湾海区腹泻性贝毒的特征和时间变化规律研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 1–10

2) 赵慧. 微囊藻毒素的树脂吸附于原位检测方法研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 12–15

中。重复上述操作并合并上清液, 40℃条件下旋蒸(加异丙醇作消泡剂), 旋蒸至小于 5 ml, 在水相中加入 10 ml 乙酸乙酯, 旋涡 1 min, 萃取, 4000 r/min 离心 6 min。重复上述操作, 合并乙酸乙酯层, 40℃旋蒸蒸干, 加 800  $\mu$ l 甲醇复溶, 后加入 5 ml 水稀释混匀, 待净化。

MAX 固相萃取柱依次用 6 ml 甲醇、6 ml 水活化处理, 加入上样液, 依次用 6 ml 5% 氨水、6 ml 10% 甲醇水溶液淋洗, 最后用 6 ml 甲酸/甲醇(2/98, v/v) 洗脱。接收洗脱液, 在 40℃条件氮气吹干, 准确加入 1 ml 甲醇定容, 旋涡 1 min 后过孔径为 0.22  $\mu$ m 聚四氟乙烯有机滤膜, 滤液供 LC-MS/MS 分析。

**1.3.4 贝类毒素的检测** 色谱柱: MGII C18 (2.0 mm i.d. $\times$ 100 mm, 5  $\mu$ m); 柱温: 35℃; 样品室温度: 4℃; 进样量: 10  $\mu$ l; 流动相分为 A、B 两部分, 其中, A 为乙腈(含 1% 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵), B 为 100% 水(含 1% 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵), 采用梯度洗脱方式, 具体参数见表 1。

表 1 腹泻性贝类毒素梯度洗脱方式  
Tab.1 Gradient elution method of DSP

时间 Time(min)	A(%)	B(%)	流速 Flow rate ( $\mu$ l/min)
0	15	85	300
1	15	85	300
2	90	10	300
6	90	10	300
7	15	85	300
10	15	85	300

离子源: 电喷雾离子源 ESI; 检测方式为选择反应监测(Selected Reaction Monitoring, SRM); 电喷雾电压: 3500 V; 毛细管温度: 350℃; 辅助气压力:

10 psi; 鞘气压力: 30 psi。扫描宽度( $m/z$ ): 0.01; 扫描时间: 0.1 s。经测试, GYM 毒素在 ESI<sup>+</sup>源条件下有较高响应, OA、DTX-1、DTX-2 在 ESI<sup>-</sup>条件下有较高响应, 具体参数见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 HP20 树脂在不同吸附时间对毒素吸附能力的影响

比较了 HP20 树脂对 4 种常见腹泻性贝类毒素的吸附效率, 分别检测吸附第 1、3、5、7、9 天树脂内吸附毒素的含量, 结果取 3 组平行实验的平均值, 见表 3。结果显示, HP20 树脂对腹泻性贝毒 OA、DTX-1、DTX-2 三种毒素的吸附效率较好, 随着时间的延长, 树脂对 3 种毒素的吸附量逐渐增加, 在第 7 天接近饱和状态, 吸附效率在 92.1% 以上, 随着时间继续延长, 第 9 天的吸附量同第 7 天相比变化不大; HP20 对腹泻性贝毒 GYM 的吸附效率较低, 在第 7 天达到峰值, 为 76.6%, 第 9 天的吸附量同第 7 天相比变化不大。表明 HP20 树脂可以很好地吸附上述 4 种毒素, 树脂在海水中放置 7 d 即达到较好的吸附效果, 可用于后续富集海水中的 4 种毒素。

本研究比较了 D101、SP700 两种树脂对 4 种毒素的吸附效率, 结果显示, D101 型树脂只对 OA 有微量吸附, SP700 型树脂对 OA 和 DTX-1 有少量吸附, 这与李鑫(2013)<sup>1)</sup>的研究结果相似。而 HP20 大孔型吸附树脂, 能很好地吸附海水中常见的 4 种腹泻性贝类毒素, 但相比较 OA、DTX-1、DTX-2 三种毒素来讲, 对 GYM 的吸收效率偏低, 这是因为 GYM 含有螺环和亚胺结构, 致使 GYM 偏弱碱性(MacKenzie *et al*, 2002)。HP20 大孔型吸附树脂是一类非极性树脂, 主

表 2 4 种毒素质谱分析参数

Tab.2 Parameters of mass spectrometry for four toxins

毒素 Toxin	离子源 ESI mode	母离子 Parent ion ( $m/z$ )	子离子 Production ion ( $m/z$ )	出峰时间 Retention time (min)	碰撞能量 Collision energy (ev)
GYM	ESI <sup>+</sup>	508.3	174.2	3.54	39
			490.6*		25
OA	ESI <sup>-</sup>	803	208.8	4.72	42
			255*		46
DTX-1	ESI <sup>-</sup>	819.4	810.4*	5.27	55
			783.4		49
			765.6		47
DTX-2	ESI <sup>-</sup>	803	208.8	4.80	34
			255*		29

\* 为定量离子 \*. Quantitative ion

1) 李鑫. 液相色谱-质谱联用技术筛查及测定海水和藻体中脂溶性藻毒素. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2013

表 3 吸附时间对树脂吸附毒素量的影响  
Tab.3 The effect of residence time on quantities of toxins in the resin

毒素种类 Toxin	吸附率 Adsorption rate (%)				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
OA	31.5	77.6	97.3	101.3	98.9
DTX-1	29.1	87.5	83.8	101.2	103.3
DTX-2	54.6	88.6	90.4	92.1	93.5
GYM	5.4	32.6	50.4	62.8	76.6

要为苯乙烯聚合物, 又称为芳香族吸附树脂, 其吸附力主要为范德华力与氢键, 而含有亚胺结构的 GYM 形成氢键的能力较弱, 故而 HP20 型树脂对 GYM 的吸附率小于其他 3 种毒素(赵慧, 2012)<sup>1)</sup>。

### 2.2 养殖海域中 4 种毒素含量的分布特征

在整个监测期间, 海水中 4 种毒素含量的分布情况见图 1。对监控点的上、中、下 3 层海水中的毒素取平均值, 发现在监控期间内, OA 的含量相对较高, 其次为 DTX-1, GYM 含量在 4 种毒素中相对较低, DTX-2 未检测出。

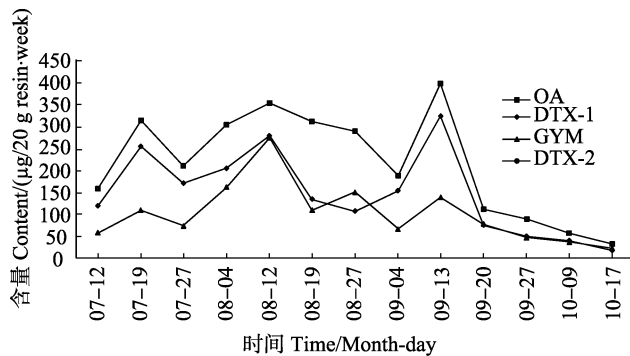


图 1 养殖区内 4 种腹泻性贝类毒素含量的变化

Fig.1 The variation of four DSPs in the oyster farming area

在中国, 目前公认腹泻性贝类毒素中最大的威胁为 OA, 日本也将 OA 作为 LC-MS/MS 检测方法的定量物质, 其他毒素可依据危害转化因子转换为 OA 来定量。本研究发现, 在整个监控期内, OA 的含量均处于较高水平, 而在整个海域内未检测到 DTX-2。DTXs 是一类由鳍藻类产生的腹泻性贝类毒素, 除此之外, 该种藻类还产生 OA 及其衍生物和 PTX, 鳍藻产毒状况存在很大的种间差异, 产生 DTX-2 毒素的藻类主要为 *D. acuta* (尖锐鳍藻) 类, 该种藻类主要分布在爱尔兰、西班牙、斯堪的纳维亚半岛、葡萄牙地域, 它们的产毒能力也随地理分布的差异而有所

不同(罗璇, 2011)<sup>2)</sup>。

### 2.3 养殖海域内腹泻性贝类毒素含量的变化规律

从 2014 年 7 月 12 日-10 月 17 日对养殖区海水中的腹泻性贝类毒素进行了监测(图 2)。在整个监控期内, 3 种腹泻性贝类毒素整体含量呈先递增后下降的趋势, OA 含量在 8 月 12 日检测点含量最高, 为 422.352 µg/20 g resin-week, DTX-1 毒素在 9 月 13 日最高, 为 368.678 µg/20 g resin-week。GYM 毒素含量在 8 月 12 日检测点最高, 为 282.231 µg/20 g resin-week。在整个监测过程中, 养殖海域内未发现 DTX-2。3 种毒素的峰值均出现在 8-9 月, 其中, GYM 与 OA 的峰值出现在 8 月 12 日, DTX-1 峰值出现在 9 月 13 日。分析原因为海域水体温度偏高引起, 据当地海洋局水文资料显示, 8 月中旬-9 月中旬之间, 该海域内平均水温在 23.5 °C 以上, 7 月之前和 10 月之后, 水温一般在 15.3 °C

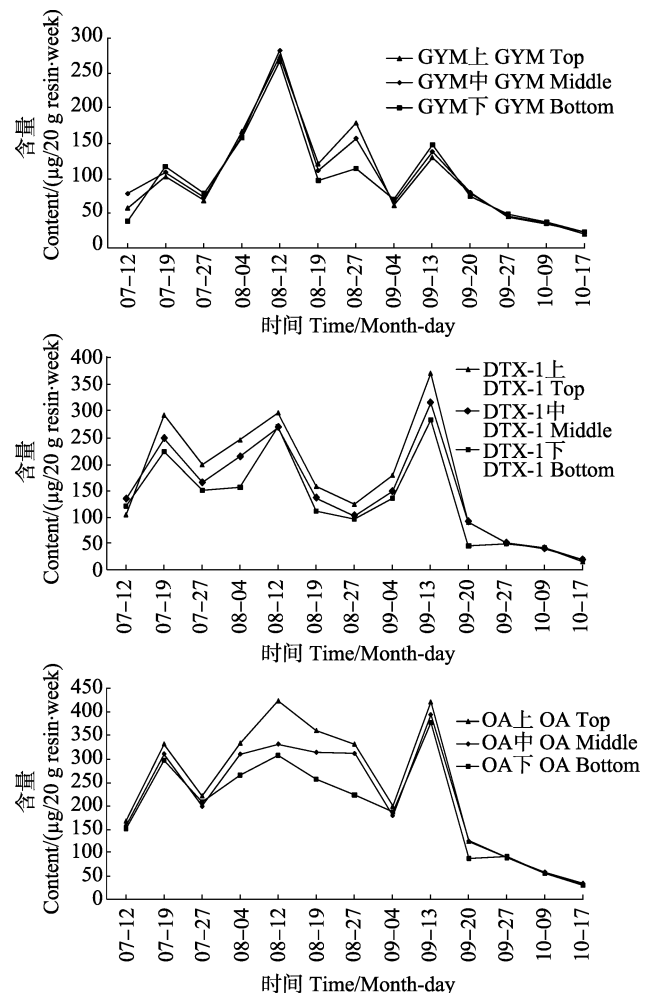


图 2 3 种腹泻性贝类毒素的分布与变化规律

Fig.2 The distribution and variation of three DSPs

1) 赵慧. 微囊藻毒素的树脂吸附与原位监测方法研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 55-59

2) 罗璇. 青岛近海鳍藻种群动态与产毒特征研究. 中国科学院博士研究生学位论文, 2011, 32-40



以下,在较高水体温度下,产毒藻类生长旺盛,新陈代谢活动产生大量毒素,导致水体中毒素含量增高。

在不同水层放置 HP20 树脂吸附袋,结果显示,在 9 月 20 日前,悬挂在上层的树脂中吸附 3 种毒素含量明显高于中、下层,并且呈现上层 > 中层 > 下层的变化特征。说明腹泻性贝类毒素表层水中含有大量毒素,随深度增加,毒素呈现递减趋势。9 月 20 日之后,上、中、下 3 层水层内毒素含量基本相等,海水中毒素整体含量已处于很低的水平。在 8-9 月间不同水层水体中 3 种毒素的含量呈现较大差异,这是因为腹泻性贝类毒素主要是藻类的代谢产生,其含量受到藻类新陈代谢活动的影响,而藻类新陈代谢活动受阳光、温度等影响(赵洪, 2014)<sup>1)</sup>,在 8-9 月期间,上层水温温度高,藻类新陈代谢活动旺盛,产生毒素含量也相对较高,随水深深度的加深,水温及光照强度都呈现递减趋势,故而不同水层水体中毒素含量呈现该分布规律。8 月之前与 9 月之后,不同水层水体中温度都处于较低水平,藻类新陈代谢活动弱,故呈现上、中、下层含量差异不明显。

此外,产毒藻类繁殖和新陈代谢的强弱还受到海水中营养盐和养料的影响,在 8 月 12 日和 9 月 13 日,受今年第 8 号和 14 号台风的影响,台风导致大洋中的营养盐迁移至近海养殖区,为藻类提供丰富的营养物质,此外,台风带来大量降水,淡水经地表流入近海养殖区,淡水中含有大量的营养成分,加剧了海水的富营养化,导致产毒藻活动旺盛,海水中毒素含量激增。国内也有不少文献报道关于天气原因,如台风、持续低压等天气或气候原因引起赤潮的发生(任湘湘等, 2007),这也解释了在 8 月 12 日和 9 月 13 日 3 种毒素含量呈现 2 个峰值。

#### 2.4 海水中与牡蛎体内贝类毒素之间的相关性

本研究同步测定了生物体牡蛎内的 4 种毒素的含量,并与树脂吸附海水中的毒素进行比较,探究二者之间的相关关系。

实验结果显示,海水中与牡蛎体内贝类毒素的含量呈现正相关关系(图 3),当海水中贝类毒素含量相对高时,牡蛎体内毒素含量也相对较高,每年 10 月至次年 6 月期间,牡蛎体内毒素含量相对较低,这是由于随着气温降低,产毒藻生长繁殖减速,赤潮发生概率低,海洋水体相对安全。

此外,实验结果显示,牡蛎体内 3 种毒素与海水

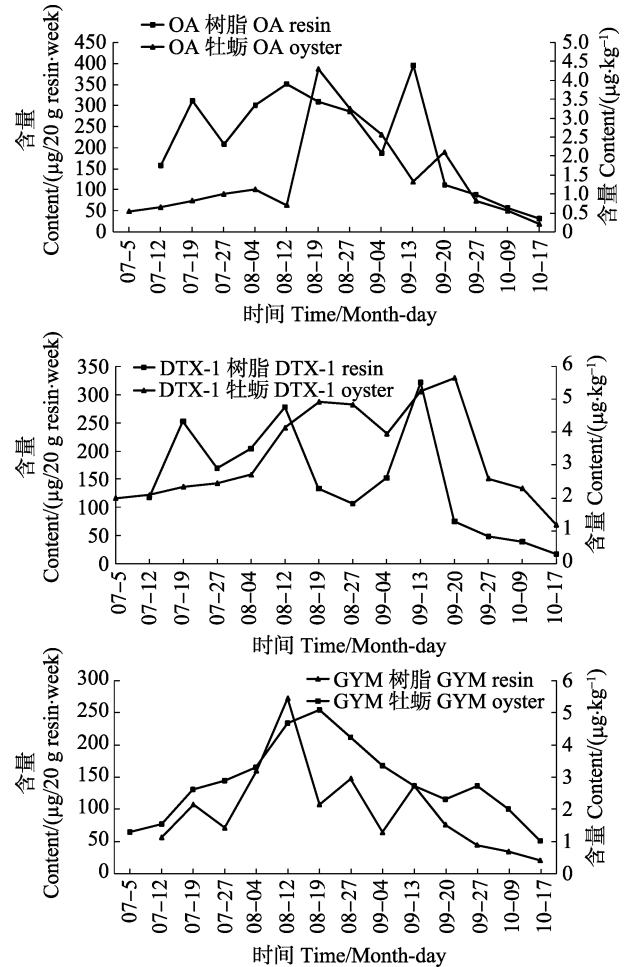


图 3 海水中与牡蛎体内贝类毒素之间的相关性  
Fig.3 The correlation between toxins in oysters and those in the seawater

中毒素的含量峰值上出现延后现象,整个监控期内,在 8 月 12 日,海水中这 3 种贝类毒素的含量达到峰值,而牡蛎体内这 3 种腹泻性毒素在 8 月 19 日含量达到峰值,延后约 1 个采样周期的时间,而后呈现下降趋势;在 9 月 13 日,受台风影响,海水中 DTX-1 毒素含量出现急剧增长,此时牡蛎体内毒素含量也呈现急剧增长,而其他 2 种毒素未出现该现象,主要是因为台风带来大量营养物质,致使鳍藻属藻类迅速增长,新陈代谢旺盛,产生大量腹泻性贝类毒素 DTX-1,海水中毒素含量出现增高,而牡蛎主要滤食该种藻类,该种毒素在牡蛎体内迅速富集,从而致使在 9 月 20 日检测到牡蛎体内 DTX-1 毒素含量增高。随着环境中毒素含量逐渐下降,牡蛎体内毒素含量也随之下降,在整个监控期间内,在牡蛎内未检测到 DTX-2。牡蛎体内与海水中毒素含量峰值上存在延后现

1) 赵洪. 周村水库藻类特征及其在混合胁迫条件下的生长衰亡规律. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2014, 76-80

象的原因,主要是牡蛎体内毒素富集与净化需要一定时间,这与 Seubert 等(2012)的研究结果有相似性,海水中出现的鳍藻类毒素达到最大浓度的时间与贻贝中富集 DSP 最高浓度之间有一定的时间差,即为富集时间。曹际娟等(1998)研究发现,牡蛎的富集时间比贻贝稍慢一些;当海水中毒素含量下降时,牡蛎体内毒素出现净化现象,其净化速度也受到环境水温的影响,在双壳贝类中,净化腹泻性贝毒时间一般为 10 d 左右。此外,还有一部分原因是牡蛎内脏团中的藻类被代谢出体外,这也导致牡蛎体内毒素含量出现降低。

### 3 结论

本研究表明,HP20 大孔吸附树脂能有效富集海水中常见的腹泻性贝类毒素,能够全方位检测海水中贝类毒素的含量。本研究建立了海水中与牡蛎体内贝类毒素含量之间的变化关系,二者之间存在一个采样周期的时间差,这为贝类毒素预警体系的建立提供了数据支持。

### 参 考 文 献

- 马荣桢,高彦,万进,等. 贝类毒素及检测技术的研究现状. 食品研究与开发, 2013, 34(22): 104-108
- 母清林,方杰,王晓华,等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中麻痹性贝类毒素. 中国环境监测, 2013, 39(2): 111-114
- 任湘湘,何恩业,李海,等. 珠江口赤潮生成的天气分型研究. 海洋预报, 2007, 24(3): 46-58
- 李兆新,张婷婷,郭萌萌,等. 贝类毒素固相吸附示踪监测技术研究进展. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 162-166
- 周秀锦,周向阳,周斌,等. HPLC 检测记忆缺失性贝毒软骨甲藻酸. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2012, 31(3): 211-214
- 黄翔,雷芳,江天久,等. 我国东海和南海近岸海域腹泻性贝毒污染现状. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2013, 34(1): 101-105
- 曹际娟,唐守亭. 试探应用贻贝进行海洋生物毒素跟踪监测的可行性. 卫生研究, 1998(s1): 105-108
- Caillaud A, Iglesia PDL, Barber E, et al. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. Harmful Algae, 2011, 10(5): 433-446
- Seubert EL, Trussell S, Eagleton J. Algal toxins and reverse osmosis desalination operations: Laboratory bench testing and field monitoring of domoic acid, saxitoxin, brevetoxin and okadaic acid. Water Research, 2012, 46(19): 6563-6573
- Fux E, Gonzalez-Gil S, Lunven M, et al. Production of diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins at depths within and below the euphotic zone. Toxicon, 2010, 56(8): 1478-1496
- MacKenzie L, Beuzenberg V, Holland P, et al. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. Toxicon, 2004, 44(8): 901-918
- MacKenzie AL, Holland P, McNabb P, et al. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. Toxicon, 2002, 40(9): 1321-1330
- McCarthy M, van Pelt FNAM, Bane V, et al. Application of passive(SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins. Toxicon, 2014, 89(9): 77-86
- Rodriguez P, Alfonso A, Turrell E, et al. Study of solid phase adsorption of paralytic shellfish poisoning toxins (PSP) onto different resins. Harmful Algae, 2011, 10(5): 447-455

(编辑 冯小花)

## Monitoring of Diarrhetic Shellfish Poisons in Aquatic Environment by Solid Phase Adsorbent Toxin Tracking Technology

SU Zhiwei<sup>1,2</sup>, ZHAO Feng<sup>1</sup>, LIU Yuanping<sup>3</sup>, XU Na<sup>4</sup>, ZHOU Deqing<sup>1①</sup>,  
YAO Jianhua<sup>5</sup>, LI Yujin<sup>3</sup>, LIU Zhimin<sup>4</sup>

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

2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Rongcheng Taixiang Food Products Co., Ltd., Rongcheng 264300;

4. Weihai Shijin Food Inspection Service Co., Ltd., Rongcheng 264300;

5. Qingdao Centre Testing International Co., Ltd., Qingdao 266101)

**Abstract** Due to the deteriorating marine environment and the repetitive red tides, harmful pollutions with shellfish toxins have caused increasing concerns. Diarrhetic shellfish poisons (DSP) are one type of the most dangerous shellfish toxins. To develop an effective method of collecting DSP from sea water, we evaluated the adsorption efficiency of HP20 resin for four common diarrhetic shellfish poisons including okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1), dinophysistoxin-2 (DTX-2), and gymnodimine (GYM) in the seawater column, based on the solid phase adsorbent and toxin tracking (SPATT) technology. The distribution of DSPs in the seawater column and their levels in shellfish were measured. We selected five sampling sites in an oyster farming area, collected samples of both the seawater and oysters on a weekly basis, and studied the correlation between the contents of DSPs in the seawater and those in oysters. During a 7-day sampling period, HP-20 resin accumulated showed high adsorption ratios for the four DSPs, which were 98.9%, 103.3%, 93.5%, and 76.6% for OA, DTX-1, DTX-2, and GYM respectively. The DSPs were detected throughout the entire study period except for DTX-2. The concentrations of OA, DTX-1, and GYM were 20.451–422.35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 15.954–368.678  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and 20.452–282.231  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively. During the monitoring period, the contents of the three DSPs in the seawater varied temporally and showed a uniform pattern of distribution. The levels of DSPs in oysters were raised along with the increase of DSPs in the seawater with a latent appearance of peak values. These results suggested that our method should be efficient in the simultaneous temporal and spatial monitoring of DSPs in aquatic environments and in shellfish samples. This method may also be applied in DSP early warning system.

**Key words** Diarrhetic shellfish poisoning; Oyster culture zones; Solid phase adsorbent toxin tracking(SPATT); LC-MS/MS

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

## 溶藻细菌 A3 的溶藻特性\*



郝建云<sup>1,2</sup> 曹煜成<sup>1</sup> 徐武杰<sup>1</sup> 胡晓娟<sup>1</sup> 徐煜<sup>1</sup>  
许云娜<sup>1</sup> 李卓佳<sup>1</sup> 文国樑<sup>1①</sup> 李莎莎<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点实验室 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究以锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)、条纹小环藻(*Cyclotella striata*)作为实验藻种,将浓度为 $10^7$  CFU/ml的菌株 A3 分别加入到4种微藻的单种藻液、2种藻混合藻液、3种藻混合藻液中,每48 h观察藻细胞形态并统计藻细胞数量,实验周期为10 d,以探究菌株 A3 对4种微藻的溶藻效果。结果显示,在单种藻实验中,加菌组锥状斯氏藻细胞于第1天失去运动活性,细胞拉长变形,第5天细胞壁破裂溶解,第10天细胞密度为 $7.07 \times 10^2$  cells/ml,显著低于对照组的 $2.90 \times 10^4$  cells/ml ( $P < 0.05$ );实验期间,加菌组蛋白核小球藻细胞形态保持完整,第10天藻细胞密度为 $2.58 \times 10^7$  cells/ml,显著高于对照组的 $2.09 \times 10^7$  cells/ml ( $P < 0.05$ );加菌组四尾栅藻细胞形态保持完整,与对照组藻细胞密度无显著差异( $P > 0.05$ );加菌组条纹小环藻细胞于第8天溶解,第10天对照组与加菌组藻细胞密度分别为 $4.38 \times 10^5$  cells/ml、 $1.78 \times 10^5$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ )。混合藻实验中,菌株 A3 对各种微藻的溶藻效果与单种藻实验结果类似,菌株 A3 对锥状斯氏藻生长具有显著的溶藻作用,对蛋白核小球藻与四尾栅藻无溶藻作用,对条纹小环藻生长具有较弱的溶藻作用。研究表明,菌株 A3 具有溶藻选择性,对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用,而对其他3种藻无溶藻作用或溶藻作用相对较弱。

**关键词** 溶藻菌 A3; 微藻调控; 溶藻选择性

**中图分类号** S946 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0151-09

锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)等有害甲藻是危害池塘养殖动物的主要藻类之一(Rolton *et al.*, 2014; 李兰涛等, 2011; 陈全震等, 2000; 肖咏之等, 2001)。甲藻主要通过产生藻毒素毒害养殖动物或通过自身分解过程中大量消耗水中溶氧造成养殖动物

缺氧死亡(Linares *et al.*, 2009; 张琪等, 2012)。优良浮游微藻如绿藻(*Chlorophyta* sp.)、硅藻(*Diatoms* sp.)具有调控水体浮游植物群落结构、保持生态系统动态平衡、抑制有害微生物生长、营造适宜对虾生长的水体环境等作用(陆家昌, 2010<sup>1</sup>; 刘新宇, 2014<sup>2</sup>; 黄翔鹤, 2013<sup>3</sup>)。

\* 现代虾产业技术体系专项(CARS-47)、广东省海洋渔业科技与产业发展专项(B201500B16)、农业科技成果转化资金项目(2014GB2E200118)、广东省科技计划(2014B040404056)、中国水产科学研究院南海水产研究所基本科研业务费专项(2014TS21)、国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD13B10)和公益性行业(农业)科研专项(20110303)共同资助。郝建云, E-mail: m15521373889@163.com

① 通讯作者: 文国樑, 副研究员, E-mail: guowen66@163.com

收稿日期: 2016-04-26, 收修改稿日期: 2016-05-17

- 1) 陆家昌. 菌、藻改善水体环境提高凡纳滨对虾幼虾免疫指标和抗逆性的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 32-42
- 2) 刘新宇. 浮游微藻和细菌代谢抑制剂的筛选及其对虾池溶解态氮吸收的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 43-50
- 3) 黄翔鹤. 对虾高位池水环境养殖污染和浮游微藻生态调控机制研究. 东华大学博士研究生学位论文, 2013, 128-142

而微藻优势种由于数量和生物量占微藻总量比例较高,对整个虾池微藻群落结构及其水体环境的稳定起主要调控作用(彭聪聪等, 2010)。因此,为了营造良好的养殖水体环境,需要去除其中的有害甲藻优势种,并且营造以绿藻、硅藻等优良微藻为优势种的微藻生物群落。

相对于传统的物理、化学、生物化感作用等控藻方法(王志富, 2014<sup>1)</sup>; Bao *et al.*, 2013; Accoroni *et al.*, 2015), 溶藻细菌控藻具有高效、安全、无二次污染等优点,且有些溶藻细菌具有调控水质、降解有害物质、促进优良微藻生长等作用,因而受到广泛关注(陆家昌, 2010<sup>2)</sup>; Jing *et al.*, 2014; Hare *et al.*, 2005)。目前,利用溶藻细菌调控甲藻的研究主要集中于溶藻细菌对甲藻的作用效果、作用机制等方面(Yang *et al.*, 2014),缺乏针对养殖池塘有害甲藻与优良微藻溶藻特性的共同研究。将溶藻细菌应用于养殖水体中,溶藻细菌在有效调控有害甲藻的同时,是否对水体中优良绿藻、硅藻产生影响,迄今为止尚未引起研究者的关注。

锥状斯氏藻是养殖池塘的常见有害甲藻优势种(梁伟峰等, 2007; 张瑜斌等, 2009)。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)、条纹小环藻(*Cyclotella striata*)在养殖池塘分布广,组成群落稳定,具有调控、营造适宜养殖对虾生存的水体环境等作用,进而成为虾池中优良绿藻和硅藻的代表种(刘孝竹等, 2011; 赵巧玲, 2010<sup>3)</sup>)。调查显示,低盐度水体环境中,裸甲藻(*Gymnodinium aerucyinosum*)等淡水甲藻、四尾栅藻、条纹小环藻等较易形成优势种;高盐度水体中,适应高盐度生长的锥状斯氏藻等甲藻、蛋白核小球藻、条纹小环藻较易形成优势种(陶晶晶, 2013<sup>4)</sup>; 刘孝竹等, 2011)。因此,本研究将锥状斯氏藻作为甲藻代表种,条纹小环藻作为硅藻代表种,蛋白核小球藻作为高盐度水体绿藻代表种,四尾栅藻作为低盐度水体绿藻代表种,从而探究溶藻细菌 A3 (下文简称菌株 A3)对不同盐度水体优势藻种的溶藻特性,为养殖水体有害甲藻的防控提供初步的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

供试藻种为:锥状斯氏藻、条纹小环藻、蛋白核

小球藻、四尾栅藻,由中国水产科学研究院南海水产研究所提供。藻种扩大培养基为 f/2 培养基(张俊, 2010)<sup>5)</sup>,光照强度约为 70  $\mu\text{mol}/\text{m}\cdot\text{s}$ ,光暗周期为 12 h : 12 h,温度为 23 $^{\circ}\text{C}$ 。

实验菌株 A3 从锥状斯氏藻藻液中筛选获得(张俊, 2010)<sup>5)</sup>,由暨南大学水生生物研究所提供,经鉴定属于海杆菌属(*Marinobacter*)。

### 1.2 菌株 A3 生长曲线

将菌株 A3 在无菌 2216E 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 震荡培养 48 h 得到种子液,利用平板涂布计数法计算细菌浓度。自接种之时起,每 6 h 取样,平板涂布测定细菌浓度,实验周期为 5 d。以菌浓度的对数为纵坐标、时间为横坐标,绘制生长曲线。

### 1.3 菌株 A3 溶藻实验

**1.3.1 菌液的制备** 将菌株 A3 在 2216E 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 48 h 得到种子液,利用平板涂布计数法计算细菌浓度,用无菌 f/2 藻培养液将菌液稀释成浓度为 10<sup>8</sup> CFU/ml 的菌液。

**1.3.2 无菌藻液制备** 取处于对数生长期的 4 种藻的藻液,按 500 U/ml 的浓度加入青霉素、庆大霉素、链霉素、卡那霉素混合抗生素进行无菌处理,处理时间为 4–8 h (张俊, 2010)<sup>5)</sup>。将处理后的藻液放入离心管中,1800 g/min 离心 5 min,去掉上清液,沉淀以无菌 f/2 培养液洗涤,反复洗涤 3 次,得到的沉淀藻液用无菌 f/2 培养液重悬后无菌培养。

**1.3.3 菌株 A3 溶藻实验** 从表 1 可以看出,设置 4 种微藻的单种培养、2 种藻混合培养及 3 种藻混合培养的实验系统。实验在 25 ml 的三角瓶中进行,每个三角瓶装 9 ml 的无菌藻液,将 1 ml 浓度为 10<sup>8</sup> CFU/ml 菌株 A3 菌液分别加入各组藻液,加菌组菌株 A3 最终浓度为 10<sup>7</sup> CFU/ml,对照组以等体积的无菌 f/2 培养液代替细菌菌液,各组均设 3 个平行。将藻液于 23 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 70  $\mu\text{mol}/\text{m}\cdot\text{s}$ 、光暗周期为 12 h : 12 h 条件下培养。每天定时摇动培养瓶 2 次,实验周期为 10 d。自接种之时起,每 48 h 取样 1 次,藻样用 5% 甲醛固定(梁伟峰等, 2007),显微镜下观察藻细胞形态并用血球计数板和浮游生物计数框计数(张俊, 2010)<sup>5)</sup>。

1) 王志富. 改性粘土治理藻华对典型底栖生物的影响研究. 中国科学院大学(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2014, 49–68

2) 陆家昌. 菌、藻改善水体环境提高凡纳滨对虾幼虾免疫指标和抗逆性的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 32–42

3) 赵巧玲. 植物浮床对精养池塘水质及浮游藻类群落结构的效应. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2010, 22–42

4) 陶晶晶. 滴水湖及其外围水体浮游植物群落结构与水质评价. 上海师范大学硕士研究生学位论文, 2013, 17–36

5) 张俊. 赤潮藻际细菌溶藻效应研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2010, 21–75



表 1 实验设计  
Tab.1 Experimental design

实验分组 Groups	微藻接种量 Inoculums amount of microalgae (cells/ml)			
	锥状斯氏藻 <i>S. trochoidea</i>	条纹小环藻 <i>C. striata</i>	蛋白核小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	四尾栅藻 <i>S. quadricauda</i>
锥状斯氏藻 <i>S. trochoidea</i>	$1.44 \times 10^4$			
条纹小环藻 <i>C. striata</i>		$3.51 \times 10^5$		
蛋白核小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>			$3.28 \times 10^6$	
四尾栅藻 <i>S. quadricauda</i>				$1.60 \times 10^5$
锥状斯氏藻-条纹小环藻 <i>S. trochoidea-C. striata</i>	$1.84 \times 10^4$	$4.53 \times 10^4$		
锥状斯氏藻-蛋白核小球藻 <i>S. trochoidea-C. pyrenoidosa</i>	$2.06 \times 10^4$		$1.20 \times 10^4$	
锥状斯氏藻-条纹小环藻-蛋白核小球藻 <i>S. trochoidea-C. striata-C. pyrenoidosa</i>	$4.82 \times 10^4$	$6.53 \times 10^4$	$1.20 \times 10^4$	
锥状斯氏藻-条纹小环藻-四尾栅藻 <i>S. trochoidea-C. striata-S. quadricauda</i>	$5.36 \times 10^4$	$7.00 \times 10^4$		$1.27 \times 10^4$

1.4 数据处理

实验数据采用 Excel 2010 处理作图, 实验结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 利用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  为具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 菌株 A3 生长曲线

菌株 A3 的延滞期为 0-12 h, 12 h 后进入指数生长期, 36 h 后进入稳定期, 54 h 后进入衰亡期(图 1)。

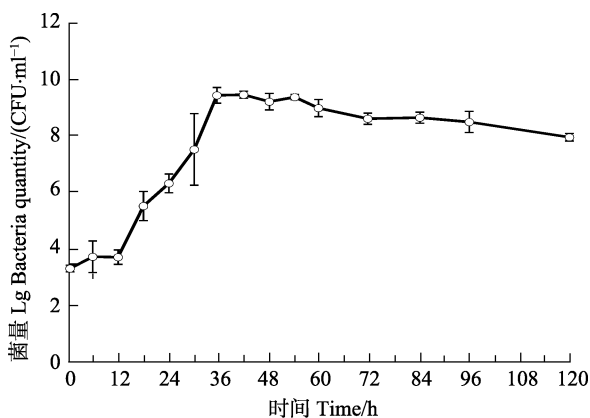


图 1 菌株 A3 的生长曲线  
Fig.1 The growth curve of Strain A3

2.2 菌株 A3 对微藻细胞的溶藻效果

2.2.1 菌株 A3 对微藻细胞形态的影响 菌株 A3 作

用于各微藻细胞共 10 d, 显微镜下观察可见, 对照组各微藻细胞保持形态完整(图 2-a、图 2-d、图 2-f、图 2-h)。

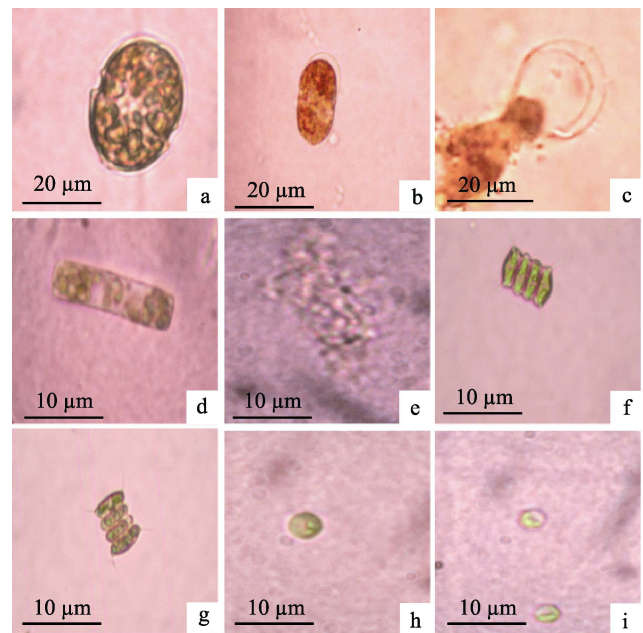


图 2 菌株 A3 作用下的微藻细胞形态  
Fig.2 Morphology of microalgal cells affected by Strain A3

a. 初始锥状斯氏藻细胞; b. 1 d 时锥状斯氏藻; c. 5 d 时锥状斯氏藻细胞; d. 初始条纹小环藻细胞; e. 8 d 时条纹小环藻细胞; f. 初始四尾栅藻细胞; g. 10 d 时四尾栅藻细胞; h. 初始蛋白核小球藻细胞; i. 10 d 时蛋白核小球藻细胞  
a. *S. trochoidea* at initial phase; b. *S. trochoidea* at the first day; c. *S. trochoidea* at the fifth day; d. *C. striata* at initial phase; e. *C. striata* at the eighth day; f. *S. quadricauda* at initial phase; g. *S. quadricauda* at the tenth day; h. *C. pyrenoidosa* at initial phase; i. *C. pyrenoidosa* at the tenth day

而加菌组锥状斯氏藻细胞于第1天失去运动活性,细胞拉长变形(图2-b),第5天细胞壁破裂溶解(图2-c);加菌组条纹小环藻于第8天溶解(图2-e);加菌组四尾栅藻和蛋白核小球藻细胞形态保持完整,菌株A3对其无溶藻效果(图2-g-图2-i)。

**2.2.2 菌株 A3 对单种培养微藻生长的影响** 菌株 A3 对单种培养微藻生长的影响见图 3。从图 3 可以看出,对照组锥状斯氏藻细胞密度总体呈升高的趋势,加菌组呈明显的下降趋势,第 10 天对照组与加菌组锥状斯氏藻细胞密度分别为  $2.90 \times 10^4$  cells/ml、 $7.07 \times 10^2$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),说明菌株 A3 对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用;对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度均呈先升高后降低的趋势,第 10 天对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度分别为  $4.38 \times 10^5$  cells/ml、 $1.78 \times 10^5$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),但此时条纹小环藻细胞密度仍然较高,因此,菌株 A3 对条纹小环藻的溶藻作用较弱;对照组与加菌组蛋白核小球藻细胞密度均呈显著的升高趋势,第 10 天对照组与加菌组蛋白核小球藻细胞密度分别为  $2.09 \times 10^7$  cells/ml、 $2.58 \times 10^7$  cells/ml,因此,菌株 A3 对蛋白核小球藻无

溶藻作用;实验期间,对照组与加菌组四尾栅藻细胞密度均呈先升高后降低的趋势,第 10 天对照组与加菌组藻细胞密度分别为  $1.75 \times 10^4$  cells/ml、 $1.68 \times 10^4$  cells/ml,说明对照组与加菌组藻细胞密度无显著差异( $P > 0.05$ ),菌株 A3 对四尾栅藻生长无溶藻作用。结果显示,在 4 种微藻单独培养条件下,菌株 A3 对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用,对条纹小环藻生长具有较弱的溶藻作用,对蛋白核小球藻与四尾栅藻无溶藻作用。

**2.2.3 菌株 A3 对 2 种混合微藻生长的影响** 菌株 A3 对锥状斯氏藻与条纹小环藻混合培养生长的影响见图 4。从图 4 可以看出,混合藻液中,对照组锥状斯氏藻细胞密度呈平缓的上升趋势,加菌组细胞密度呈显著的下降趋势,实验第 10 天时,对照组与加菌组藻细胞密度分别为  $2.43 \times 10^4$  cells/ml、 $3.93 \times 10^2$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),且加菌组混合藻液中锥状斯氏藻细胞密度很低,因此,菌株 A3 对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用;对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度均呈先升高后下降的趋势,第 10 天时,对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度分别为  $6.07 \times 10^4$  cells/ml、 $2.87 \times 10^4$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),此时,加菌组混合藻液

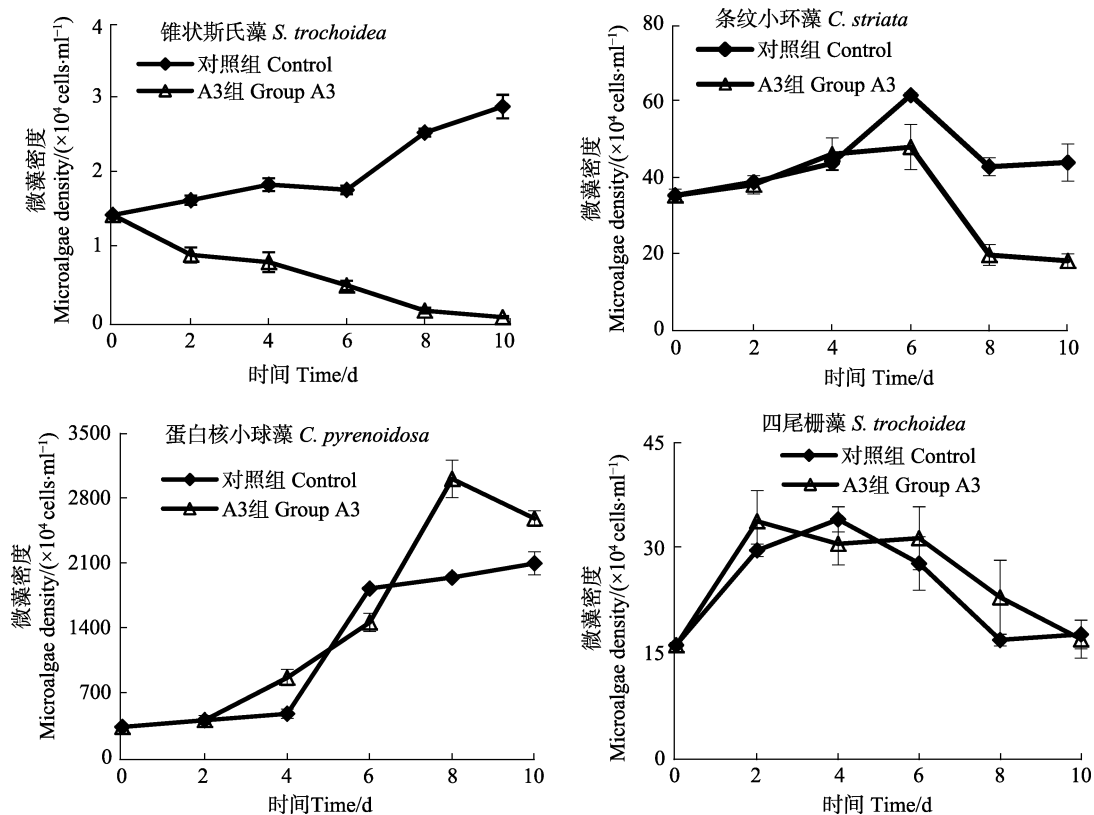


图3 菌株 A3 对单种培养的锥状斯氏藻、条纹小环藻、蛋白核小球藻、四尾栅藻生长的影响  
Fig.3 Effects of A3 on the growth of *S. trochoidea*, *C. striata*, *C. pyrenoidosa* and *S. quadricauda* in the microalgal monoculture system

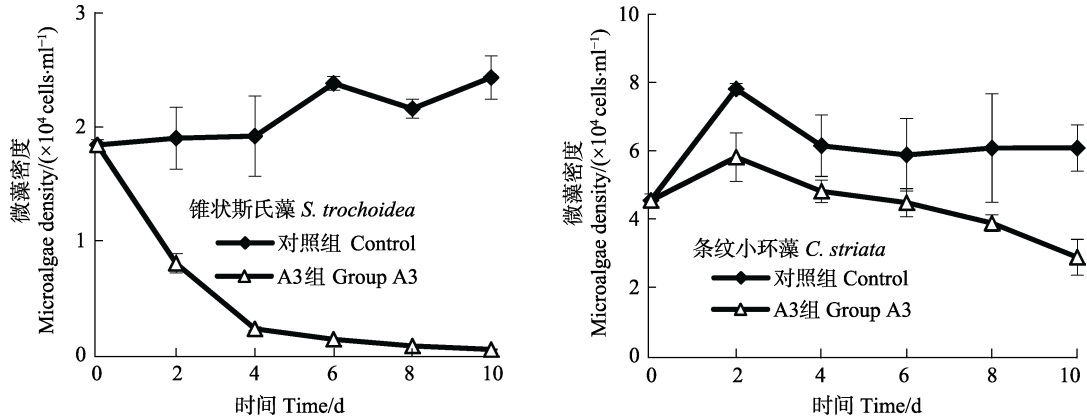


图 4 菌株 A3 对混合培养条件下的锥状斯氏藻与条纹小环藻生长的影响

Fig.4 Effects of A3 on the growth of *S. trochoidea* and *C. striata* in the microalgal mix-culture system

中条纹小环藻细胞密度仍然较高, 因此, 菌株 A3 对条纹小环藻的溶藻作用较弱。结果表明, 在锥状斯氏藻与条纹小环藻混合培养条件下, 菌株 A3 对锥状斯氏藻生长具有显著的溶藻作用, 对条纹小环藻生长的溶藻作用较弱。

菌株 A3 对锥状斯氏藻与蛋白核小球藻混合培养条件下生长的影响见图 5。从图 5 可以看出, 对照组锥状斯氏藻细胞密度总体呈上升趋势, 加菌组细胞密度呈显著的下降趋势, 在实验第 10 天时, 对照组与加菌组藻细胞密度分别为  $1.92 \times 10^4$  cells/ml、 $1.36 \times 10^3$  cells/ml, 加菌组藻细胞密度显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且加菌组混合藻液中锥状斯氏藻细胞密度较低, 因此, 菌株 A3 对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用; 实验期间, 对照组与加菌组蛋白核小球藻细胞密度均呈显著的上升趋势, 第 10 天加菌组与对照组蛋白核小球藻细胞密度分别  $7.40 \times 10^6$  cells/ml、 $7.77 \times 10^6$  cells/ml, 因此, 菌株 A3 对蛋白核小球藻生长无溶藻作用。结果显示, 在锥状斯氏藻与蛋白核小球藻混合培养条件下, 菌株 A3 可以有效溶解锥状斯氏藻, 对蛋白核小球藻无溶藻作用。

2.2.4 菌株 A3 对 3 种混合微藻生长的影响 菌株 A3 对锥状斯氏藻、条纹小环藻、四尾栅藻混合培养生长的影响见图 6。从图 6 可以看出, 对照组锥状斯氏藻细胞密度呈平稳的波动趋势, 加菌组锥状斯氏藻细胞密度呈明显的下降趋势, 第 10 天时, 对照组与加菌组藻细胞密度分别为  $4.92 \times 10^4$  cells/ml、 $31.00$  cells/ml, 加菌组锥状斯氏藻细胞密度显著低于对照组, 表明菌株 A3 对锥状斯氏藻生长具有显著的溶藻作用; 对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度均呈下降趋势, 对照组实验 4 d 后呈平稳的波动趋势, 第 10 天时, 对照组与加菌组条纹小环藻细胞密度分别为  $5.13 \times 10^4$  cells/ml、 $1.80 \times 10^4$  cells/ml, 虽然此时加菌组条纹小环藻细胞密度显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但加菌组条纹小环藻细胞密度仍然较高, 因此, 菌株 A3 对条纹小环藻溶藻作用较弱; 实验期间, 对照组与加菌组四尾栅藻细胞密度呈波动趋势, 第 10 天对照组与加菌组藻细胞密度分别为  $1.27 \times 10^4$  cells/ml、 $1.20 \times 10^4$  cells/ml, 对照组与加菌组藻细胞密度差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 因此, 菌株 A3 对四尾栅藻无溶藻作用。结果显示, 菌株 A3 在锥状

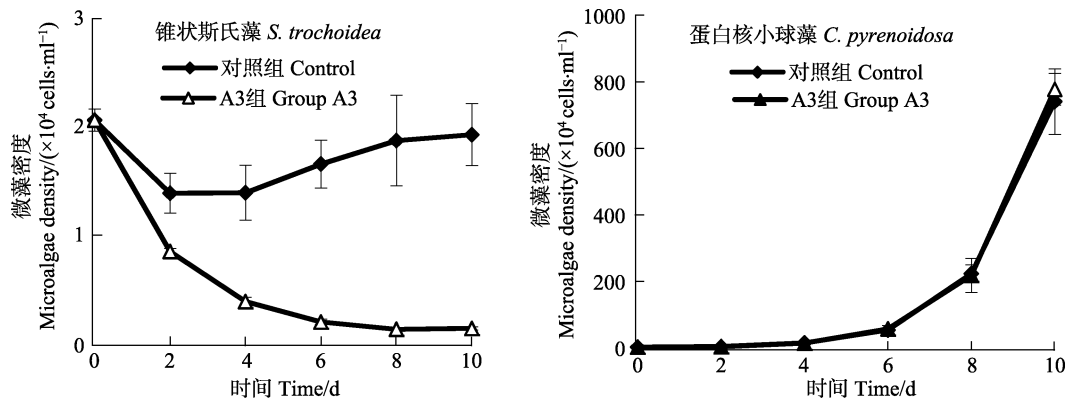


图 5 菌株 A3 对混合培养条件下的锥状斯氏藻与蛋白核小球藻生长的影响

Fig.5 Effects of A3 on the growth of *S. trochoidea* and *C. pyrenoidosa* in the microalgal mix-culture system

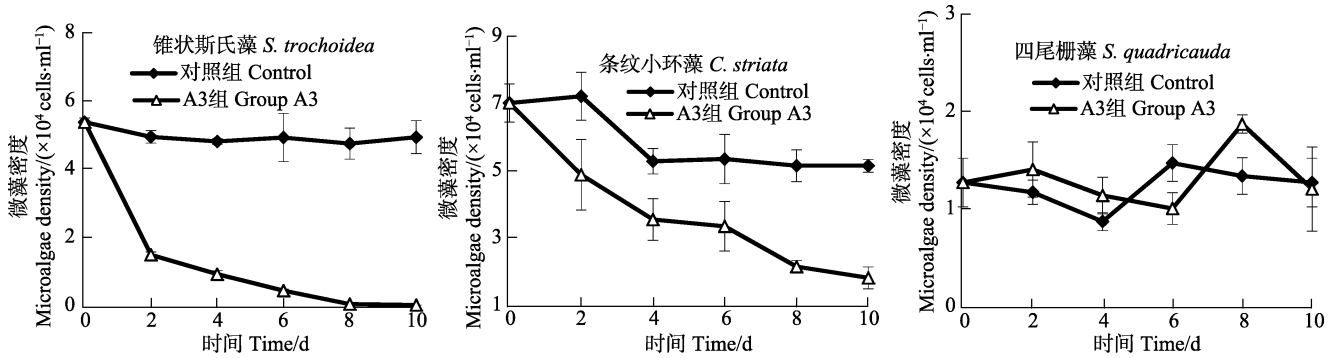


图6 菌株A3对混合培养条件下的锥状斯氏藻、条纹小环藻、四尾栅藻的生长的影响

Fig.6 Effects of A3 on the growth of *S. trochoidea*, *C. striata* and *S. quadricauda* in microalgal mix-culture system

斯氏藻-条纹小环藻-四尾栅藻混合藻液中,可以有效溶解锥状斯氏藻,对条纹小环藻生长溶解作用较弱,对四尾栅藻无溶藻作用。

菌株A3对锥状斯氏藻、条纹小环藻、蛋白核小球藻混合培养生长的影响见图7。从图7可以看出,对照组锥状斯氏藻细胞密度实验前6d呈平稳的波动趋势,之后呈明显的上升趋势,加菌组锥状斯氏藻细胞密度呈明显的下降趋势。第10天时,对照组与加菌组锥状斯氏藻细胞密度分别为 $8.17 \times 10^4$  cells/ml、 $2.83 \times 10^3$  cells/ml,加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),此时,加菌组混合藻液中锥状斯氏藻细胞密度较低,因此,菌株A3对锥状斯氏藻具有显著的溶藻作用;对照组条纹小环藻细胞密度呈平缓的波动

趋势,加菌组条纹小环藻细胞密度实验前6d呈波动趋势,6d后呈显著的下降趋势,第10天对照组与加菌组藻细胞密度分别为 $5.47 \times 10^4$  cells/ml、 $3.27 \times 10^4$  cells/ml,虽然加菌组藻细胞密度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),但加菌组混合藻液中条纹小环藻细胞密度仍然较高,因此,菌株A3对条纹小环藻的溶藻作用较弱;对照组与加菌组蛋白核小球藻细胞密度均呈显著的上升趋势,第10天对照组与加菌组藻细胞密度分别为 $2.85 \times 10^6$  cells/ml、 $7.74 \times 10^6$  cells/ml,因此,菌株A3对蛋白核小球藻无溶藻作用。结果显示,菌株A3在锥状斯氏藻、条纹小环藻、蛋白核小球藻混合藻液中,可以有效溶解锥状斯氏藻,对条纹小环藻生长具有较弱的溶藻作用,对蛋白核小球藻生长无溶藻作用。

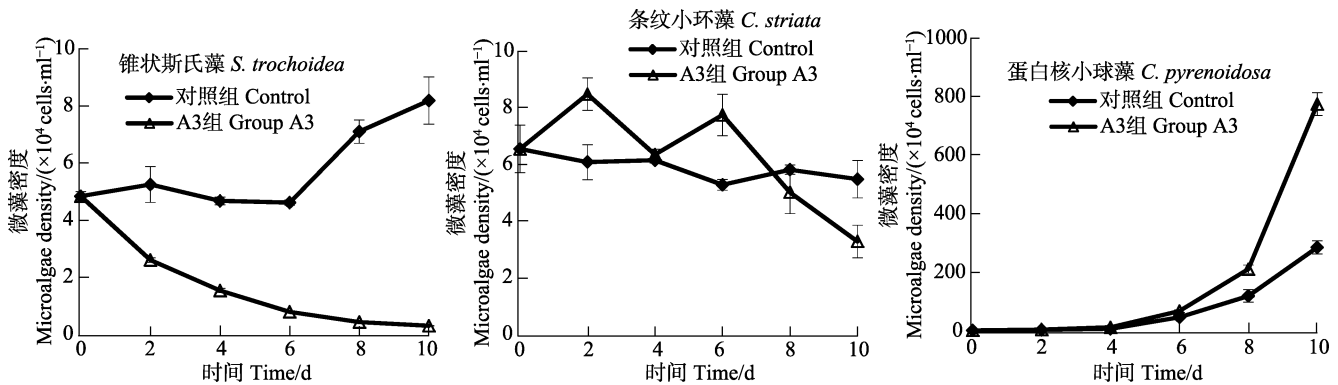


图7 菌株A3对混合培养条件下的锥状斯氏藻、条纹小环藻、蛋白核小球藻生长的影响

Fig.7 Effects of A3 on the growth of *S. trochoidea*, *C. striata* and *C. pyrenoidosa* in the microalgal mix-culture system

### 3 讨论

锥状斯氏藻等有害甲藻在对虾养殖池塘中频繁出现,给对虾的养殖造成潜在威胁(张瑜斌等,2009; Alonso-Rodriguez *et al*, 2003)。目前,利用溶藻菌防控甲藻的相关研究多有报道。如史荣君等(2013)从溶藻效果方面探究了菌株N3对锥状斯氏藻发挥溶藻作用的用菌浓度。Su等(2011)从溶藻机制方面探究发现

9种溶藻菌:交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) (strain SP31与SP44)、交替单胞菌(*Alteromonas* sp.) (strain DH12与DH46)、海源菌(*Idiomarina* sp.) (strain SP96)、弧菌(*Vibrio*) (strain DH47与DH51)、盐单胞菌(*Halomonas* sp.) (strain DH74与DH77)都通过分泌溶藻物质间接溶解塔玛亚力山大藻(*Alexandrium tamarense*)。Park等(2015)探究了多环旋沟藻(*Cochlodinium polykrikoides*)水华暴发之前、暴发期间、暴发之后水

体中菌群优势种与微藻优势种演替间的相互影响。由此可见, 目前国内外利用溶藻菌防控甲藻的研究主要集中于溶藻效果、溶藻机制、藻菌间的相互关系等方面, 而利用溶藻菌防控有害甲藻对优良微藻影响的研究则少见报道(Chen *et al*, 2014; Jauzein *et al*, 2015)。有研究表明, 水体中的优良浮游微藻具有调控水质、促进养殖动物健康生长等作用(陆家昌, 2010<sup>1)</sup>; 黄翔鹤, 2013<sup>2)</sup>; 刘新宇, 2014<sup>3)</sup>)。因此, 在利用溶藻菌防控有害甲藻时, 同时开展其对优良微藻影响的探究, 对于水体有害甲藻调控及优良微藻的保护尤显重要。

溶藻菌具有溶藻专一性, 大部分溶藻菌只能溶解 1 种或 1 类藻(Hare *et al*, 2005)。Guan 等(2014)开展了溶藻菌 LP-10 对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、日本星杆藻(*Asterionella japonica*)、链状亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)、微小亚力山大藻(*Alexandrium minutum*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)等 24 种蓝藻、绿藻、硅藻、甲藻溶藻特性研究, 发现 LP-10 仅对链状亚历山大藻、塔玛亚力山大藻、海洋原甲藻、微小亚力山大藻、日本星杆藻 5 种藻产生有效的溶藻效果, 且这 5 种藻中有 4 种藻属于甲藻种类。Pokrzywinski 等(2012)研究发现, 溶藻菌 IRI-160 分泌的溶藻物质 IRI-160AA 对甲藻门的卡尔藻(*Karlodinium veneticum*)、短凯伦藻(*Karenia brevis*)、条纹环沟藻(*Gyrodinium instriatum*)等具有明显的溶藻作用, 而其对绿藻门的杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)、隐藻门的红细胞藻(*Rhodomonas sp.*)以及硅藻门的假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)无溶藻作用或者作用不显著。上述研究中的几种溶藻菌主要对甲藻类微藻具有溶藻作用, 对其他种类微藻无影响或影响不显著, 这种溶藻特性可能由不同藻类的结构组成不同所决定, 目前缺乏相关方面的研究。本研究表明, 无论在单种藻及混合藻实验中, 菌株 A3 都能够将甲藻类锥状斯氏藻有效溶解, 而对其他 3 种藻无溶藻效果或效果不甚显著。由于溶藻菌具有溶藻专一性, 推测将菌株 A3 应用于养殖水体中, 可以有效调控锥状斯氏藻等有害甲藻, 而对绿藻等优良微藻无危害或者危害作用较弱。另外, 在本研究的混合藻实验中, 对照组中藻间的竞争作用不能抑制锥状斯氏藻

生长, 因此与藻间的竞争作用相比较, 溶藻菌 A3 对锥状斯氏藻的防控更为有效。

本研究表明, 向微藻群落中投放有益菌可以调控微藻群落结构。如 Tilney 等(2014)研究发现, 在条纹环沟藻水华中投放溶藻细菌 IRI-160 的提取物 IRI-160AA, 可以将群落中甲藻浓度降低为最初浓度的 12%, 而硅藻的浓度相对最初浓度升高 110%。本研究将菌株 A3 加入几种藻的混合藻液中, 结果显示, 藻液向着以绿藻为主要优势种、硅藻为次要优势种的方向演替。米振琴等(1999)研究显示, 在对虾养殖水体中, 以绿藻为主的水体藻种类较多, 而以硅藻为主的水体藻类单一, 没有以绿藻为主的水体生态系统稳定, 且以硅藻为主的水体对虾较易产生应激反应, 因此, 菌株 A3 对锥状斯氏藻的有效调控以及对条纹小环藻适当调控, 有助于形成适宜对虾生长的水体环境。Cao 等(2014)同样研究发现, 向养殖虾池中投放芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)与光合细菌复合菌能够调控虾池微藻, 使得虾池中的绿藻(主要是蛋白核小球藻)数量可以达到 95%, 同时能够提高对虾产量。

综合以上研究, 推测溶藻菌 A3 能够用于调控虾池水生生态系统中以甲藻为主要优势种的微藻群落结构。但是, 由于不同的溶藻菌具有不同的特性, 1 株溶藻菌可能对某类有害微藻中绝大多数微藻具有溶藻作用, 而对该类微藻中的某种微藻无溶藻作用。因此, 针对虾池中暴发的不同种类甲藻水华, 在使用菌株 A3 进行防控时仍然需要考虑该菌的溶藻特性。

## 参 考 文 献

- 史荣君, 黄洪辉, 齐占会, 等. 海洋细菌 N3 对几种赤潮藻的溶藻效应. 环境科学, 2013, 34(5): 1922-1929
- 李兰涛, 叶健欣, 叶宁, 等. 利玛原甲藻对湛江港多种鱼虾贝的毒性研究. 水产科学, 2011, 30(9): 547-550
- 刘孝竹, 曹煜成, 李卓佳, 等. 高位虾池养殖后期浮游微藻群落结构特征. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 84-91
- 米振琴, 谢骏, 潘德博, 等. 精养虾池浮游植物、理化因子与虾病的关系. 上海水产大学学报, 1999, 8(4): 304-308
- 肖咏之, 齐雨藻, 王朝晖, 等. 大亚湾海域锥状斯氏藻赤潮及其与孢囊的关系. 海洋科学, 2001, 25(9): 50-54

1) 陆家昌. 菌、藻改善水体环境提高凡纳滨对虾幼虾免疫指标和抗逆性的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 32-42

2) 黄翔鹤. 对虾高位池水环境养殖污染和浮游微藻生态调控机制研究. 东华大学博士研究生学位论文, 2013, 128-142

3) 刘新宇. 浮游微藻和细菌代谢抑制剂的筛选及其对虾池溶解态氮吸收的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 43-50



- 张琪, 缪荣丽, 刘国祥, 等. 淡水甲藻水华研究综述. 水生生物学报, 2012, 36(2): 352–360
- 张瑜斌, 龚玉艳, 陈长平, 等. 高位虾池养殖过程浮游植物群落的演替. 生态学杂志, 2009, 8(12): 2532–2540
- 陈全震, 何德华. 甲藻赤潮对养鲍业的危害及其防治探讨. 水产学报, 2000, 24(2): 151–155
- 梁伟峰, 李卓佳, 陈素文, 等. 对虾养殖池塘微藻群落结构的调查与分析. 南方水产, 2007, 3(5): 33–39
- 彭聪聪, 李卓佳, 曹煜成, 等. 虾池浮游微藻与养殖水环境调控的研究概况. 南方水产, 2010, 6(5): 74–80
- Accoroni S, Percopo I, Cerino F, *et al.* Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and macroalgae. *Harmful Algae*, 2015, 49: 147–155
- Alonso-Rodriguez R, Páez-Osuna F. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 2003, 219(1–4): 317–336
- Bao VWW, Leung KMY, Lui GCS, *et al.* Acute and chronic toxicities of Irgarol alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1140–1148
- Cao YC, Wen GL, Li ZJ, *et al.* Effects of dominant microalgae species and bacterial quantity on shrimp production in the final culture season. *J Appl Phycol*, 2014, 26(4): 1749–1757
- Chen ZR, Zhang JY, Lei XQ, *et al.* Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol*, 2014, 169(1): 784–788
- Guan CW, Guo XY, Cai GJ, *et al.* Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species. *Biol Control*, 2014, 76(3): 79–86
- Hare CE, Demir E, Coyne KJ, *et al.* A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates. *Harmful Algae*, 2005, 4(2): 221–234
- Jauzein C, Evans AN, Erdner DL. The impact of associated bacteria on morphology and physiology of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Erdner Harmful Algae*, 2015, 50: 65–75
- Jing WW, Sui GD, Liu SX. Characteristics of a microcystin-LR biodegrading bacterial isolate: *Ochrobactrum* sp. FDT<sub>5</sub>. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2014, 92(1): 119–122
- Linares JP, Ochoa JL, Martínez AG. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population? *Toxicon*, 2009, 539(2): 185–195.
- Park BS, Kim JH, Kim JH, *et al.* Dynamics of bacterial community structure during blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 2015, 48: 44–54
- Pokrzywinski KL, Place AR, Warner ME, *et al.* Investigation of the algicidal exudate produced by *Shewanella* sp. IRI-160 and its effect on dinoflagellates. *Harmful Algae*, 2012, 19: 23–29
- Rolton A, Vignier J, Soudant P, *et al.* Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on early development of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic Toxicol*, 2014, 155(4): 199–206
- Su JQ, Yang XR, Zhou YY, *et al.* Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Biol Control*, 2011, 56(2): 132–138
- Tilney CL, Pokrzywinski KL, Coyne KJ, *et al.* Effects of a bacterial algicide, IRI-160AA, on dinoflagellates and the microbial community in microcosm experiments. *Harmful Algae*, 2014, 39: 210–222
- Yang XR, Li XY, Zhou YY, *et al.* Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Sci Total Environ*, 2014, 482–483: 116–124

(编辑 陈严)

## Characteristics of Algicidal Activity of Bacterial Strain A3

XI Jianyun<sup>1,2</sup>, CAO Yucheng<sup>1</sup>, XU Wujie<sup>1</sup>, HU Xiaojuan<sup>1</sup>, XU Yu<sup>1</sup>, XU Yunna<sup>1</sup>,  
LI Zhuojia<sup>1</sup>, WEN Guoliang<sup>1①</sup>, LI Shasha<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment; Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Guangzhou 510300; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In this study we performed a series of experiments in order to find an effective control of dinoflagellate in microalgal community of the water environment. *Scrippsiella trochoidea*, *Cyclotella striata*, *Chlorella pyrenoidosa*, and *Scenedesmus quadricauda* were used as representative microalgal species in this study. Strain A3 was added into either monoculture or mix-culture systems of the four microalgae at a concentration of  $10^7$  CFU/ml, and the morphology and cell density of the microalgae were analyzed every 48 hours for 10 days. Treated with A3, *S. trochoidea* in the monoculture system lost the motion activity on Day 1, then they inflated and finally lysed on Day 5. The cell density of *S. trochoidea* was  $7.07 \times 10^2$  cells/ml on Day 10, which was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Morphology of *C. pyrenoidosa* was not affected by Strain A3. The cell density of *C. pyrenoidosa* was  $2.58 \times 10^7$  cells/ml on Day 10, and it was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Morphology of *S. quadricauda* was also unaffected by Strain A3. There was no significant difference in the cell density of *S. quadricauda* between the experimental group and the control group ( $P > 0.05$ ). *C. striata* lysed due to the effects of A3 on Day 8, and the cell density of *C. striata* in the control group and the experimental group were  $4.38 \times 10^5$  cells/ml and  $1.78 \times 10^5$  cells/ml, respectively. The lytic effect of Strain A3 on four microalgal species in the mix-culture systems was similar to that in the monoculture systems. These results suggested that Strain A3 might have strong lytic effect on *S. trochoidea* in the mix-culture systems. However, Strain A3 did not inhibit the growth of *S. quadricauda* and *C. pyrenoidosa*, and had weaker lytic effect on *C. striata*. Therefore, the algicidal activity of Strain A3 was highly specific to *S. trochoidea*, and hence could be used to develop probiotics against dinoflagellate blooms in aquaculture ponds.

**Key words** Algicidal bacteria A3; Microalgae control; Algicidal specificity

① Corresponding author: WEN Guoliang, E-mail: guowen66@163.com

# 《渔业科学进展》2016 年第 37 卷总目录

## 第 1 期



### 研究论文

- 长江干流长鳍吻鲈(*Rhinogobio ventralis*)繁殖生物学.....曲焕韬 郭文韬 杨元金 刘勇 管敏 李莎 刘雪涛 胡美洪 (1)
- 中国南海黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)幼鱼形态特征及其与体重的关系.....李炎璐 陈超 于宏 孙曙光 孟祥君 孔祥迪 (8)
- 兴化湾潮间带大型底栖生物群落生态研究.....林和山 王建军 黄雅琴 林俊辉 何雪宝 刘坤 郑成兴 李荣冠 (15)
- 莱州湾渔业资源群落结构和多样性的年际变化.....杨尧尧 李忠义 吴强 王俊 (22)
- 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)雌、雄个体的形态特征比较.....岳亮 王新安 马爱军 孙志宾 倪世俊 赵艳飞 侯仕营 翟介明 孟雪松 (30)
- 团头鲂(*Megahbrama amblycephala*) Caspase 9 基因全长 cDNA 的克隆及在氨氮胁迫下的表达分析.....章琼 孙盛明 李冰 蒋高中 朱健 戈贤平 (36)
- 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) FAME<sub>T</sub> 基因在卵巢发育周期中的表达分析.....李志敏 李健 李吉涛 何玉英 葛倩倩 索帅 (46)
- 人工培育对虾种体内可培养细菌数量及组成分析.....张晓静 宋晓玲 万晓媛 杨冰 黄捷 (52)
- 急性盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)“黄选 1 号”血清渗透压及离子含量的影响.....马金武 吕建建 刘萍 高保全 李健 (58)
- 基于线粒体 DNA 控制区序列的 6 个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖群体的遗传多样性分析.....刘红 张海强 蔡生力 戴习林 (63)
- 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶的密码子优化与原核表达.....姚琳 江艳华 李凤铃 朱文嘉 郭莹莹 姜薇 翟毓秀 王联珠 (74)
- 两种甘薯饲料原料的营养成分及其对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)摄食与生长的影响.....赵斌 胡炜 李成林 韩莎 严芳 (80)
- 不同投喂水平对刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)生长、消化酶及免疫相关酶活性的影响.....王艺超 梁萌青 郑珂珂 (87)
- 不同分子量壳聚糖对刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)生长和免疫功能的影响.....白阳 徐玮 汪东风 王艳龙 (93)
- 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.....魏佳丽 王际英 宋志东 黄裕 孙永智 张利民 (100)
- 温度和时间对海带(*Saccharina japonica*)孢子囊孢子放散及后期生长发育的影响.....李霞 逢少军 苏丽 (111)
- 桑沟湾筏式养殖鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)的生长特性.....陈洁 张继红 李加琦 张义涛 隋海东 吴文广 牛亚丽 高振焜 (120)
- 不同有机碳源及 C/N 对生物滤池净化效果的影响.....程海华 朱建新 曲克明 杨志强 刘寿堂 孙德强 (127)
- 0<sup>#</sup>柴油和原油的水溶性成分对小球藻(*Chlorella vulgaris*)生长的影响.....李磊 沈新强 王云龙 蒋玫 (135)
- 利用液相氧电极技术研究“海天 1 号”海带(*Saccharina japonica*)幼孢子体光合及呼吸速率.....姚海芹 梁洲瑞 刘福利 王飞久 孙修涛 汪文俊 凌晶宇 (140)
- 液相色谱-三重四级杆复合线性离子阱质谱法分析恩诺沙星在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中的代谢产物.....唐锡招 李兆新 邢丽红 吴海燕 宋才湖 付树林 张婷婷 蒋万枫 (148)
- 通告  
《渔业科学进展》投稿指南..... (156)

## 第 2 期

### 研究论文

- 基于饵料及敌害生物的莱州湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)增殖基础分析.....吴强 金显仕 栾青杉 陈卫 左涛 陈瑞盛 王俊 (1)
- 2014 年春季和冬季渤海海水营养盐时空变化特征及富营养化评价.....

.....隋 琪 夏 斌 谢寒冰 崔 毅 陈碧鹃 崔正国 丁东生 (10)

围填海吹填淤泥及悬浮物对天津海域海洋生物资源的急性毒性效应.....王娟娟 缴建华 马 丹 陈永平 李春青 (16)

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)鱼苗视网膜组织结构与视觉特性.....车景青 陈京华 胡苗峰 (25)

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)F<sub>1</sub>染色体制备方法及其核型分析.....刘 莉 张 岩 陈 超 李炎璐 孔祥迪 于欢欢 陈建国 翟介明 (33)

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)Sox 基因家族生物信息学分析.....高 进 马佳璐 刘 洋 邵长伟 贾晓东 陈松林 (41)

生物絮团对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)生长、消化酶和免疫相关酶活性的影响.....孙盛明 戈贤平 朱 健 江晓浚 张武肖 (49)

饲料镁不影响鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼的生长及鱼体镁含量.....赵 敏 梁萌青 谈 枫 郑珂珂 徐后国 燕 磊 (56)

几种前处理方法所获刀鲚(*Coilia nasus*)耳石年轮的效果比较.....姜 涛 刘洪波 卢明杰 陈婷婷 杨 健 (62)

梭鱼(*Liza haematocheila*) 4 个野生地理群体遗传多样性的微卫星分析.....毛守康 马爱军 丁福红 闫喜武 罗海忠 李伟业 徐宝荣 王怀忠 王宝义 王广宁 (68)

美洲鲟(*Alosa sapidissima*)眼睛早期发育的组织学观察.....高小强 洪 磊 刘志峰 郭正龙 王耀辉 雷霖霖 (76)

不同来源黄鳝(*Monopterus albus*)繁殖力的比较分析.....段国庆 江 河 胡 王 潘庭双 胡玉婷 凌 俊 (84)

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) p38 MAPK 基因克隆及表达分析.....姚万龙 何玉英 刘 萍 李 健 王清印 (91)

恩诺沙星对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) CYP2 基因表达及氨基比林-N-脱甲基酶活性的影响.....王 莹 李 健 葛倩倩 翟倩倩 李东利 葛红星 (99)

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性.....王 娜 王海亮 白 楠 黄 捷 谢达祥 谢起浪 於俊琦 万夕和 (105)

一株芽孢杆菌的分离鉴定及在生物絮团对虾养殖中的应用.....张欢欢 王秀华 李 晨 黄 捷 (111)

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测.....刘 珍 张庆利 万晓媛 马 芳 黄 捷 (119)

白斑综合征病毒 2014 年中国毒株变异区的序列比较.....孙新颖 万晓媛 刘庆慧 黄 捷 (127)

温度和盐度对不同规格甲虫螺(*Cantharus cecillei*)耗氧率和排氨率的影响.....吴文广 张继红 高振锟 房景辉 李加琦 刘 毅 (134)

桑沟湾养殖海带(*Sacharina japonica*)碎屑降解速率及影响因素.....张义涛 张继红 杨 凤 任黎华 陈 洁 隋海东 姜妮妮 高振锟 (139)

中韩刺参(*Apostichopus japonicus*)杂交子一代高温与盐度耐受性比较.....范超晶 陈爱华 谭 杰 王 亮 高 菲 燕敬平 左之良 孙慧玲 (146)

**研究综述**

海洋食物网拓扑学方法研究进展.....朱江峰 戴小杰 王学昉 陈 彦 (153)

**通告**

《渔业科学进展》投稿指南..... (160)

### 第 3 期

#### 研究论文

南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化.....聂玉晨 张 波 赵宪勇 王新良 张吉昌 李显森 (1)

渤海石油平台污损生物生态研究.....周 斌 冯春辉 刘 伟 赵 升 (9)

辽东湾近岸表层海水重金属污染分析与评价.....宋永刚 吴金浩 邵泽伟 于彩芬 张玉凤 杜 静 姜 冰 宋 伦 王年斌 (14)

辽东湾水体中石油类的时空分布特征和污染状况.....王召会 吴金浩 胡超魁 刘桂英 王年斌 李 爱 田甲申 马志强 (20)

温度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响.....张廷廷 陈 超 施兆鸿 李炎璐 于欢欢 任保辉 徐万土 (28)

星突江鲈(*Platichthys stellatus*)、石鲈(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种肌肉的营养成分分析及评价.....曹栋正 张小忠 陈四清 秦 搏 常青 刘长琳 柳 茜 吕云云 (34)

不同糖源对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)日增重、饲料利用和消化酶活性的影响.....

.....董兰芳 张 琴 许明珠 童 潼 王 珺 熊向英 彭银辉 (42)

高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响.....牟玉超 梁萌青 郑珂珂 卫育良 (49)

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用.....李东宇 孔 杰 孟宪红 栾 生 罗 坤 卢 霞 曹宝祥 (58)

我国一株新型黄头病毒的分子流行病学.....朱罗罗 张庆利 万晓媛 邱 亮 马 芳 黄 健 (68)

一株兼具氨氮去除能力和对副溶血弧菌拮抗作用的有益菌的筛选及其初步应用.....王 磊 王志杰 高 戈 黄 健 (78)

对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定.....张欢欢 王秀华 李 晨 黄 健 (85)

普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究.....左之良 谭 杰 吴 彪 陈四清 高 菲 燕敬平 王 爽 孙慧玲 (93)

青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析.....李忠清 夏 斌 王际英 黄炳山 张利民 李宝山 (101)

海萝(*Gloiopeltis furcata*)藻体保存和容器内的培养方法.....陈素文 郭永坚 李俊伟 颌晓勇 朱长波 (108)

基因条码在条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)不同品系间种质鉴定中的适用性.....曹殿嘉 严兴洪 (114)

高温对海带(*Saccharina japonica*)抗氧化酶及叶绿素荧光参数的影响.....凌晶宇 梁洲瑞 王飞久 孙修涛 汪文俊 刘福利 姚海芹 (120)

饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响.....马 俊 魏泽宏 邢淑娟 依丽娜 徐 玮 周慧慧 张文兵 麦康森 (126)

广西茅尾海的香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)在不同养殖区的性腺发育变化.....於 锋 罗 帮 陈雪芬 李琼珍 王 嫣 (134)

不同浓度臭氧对循环水养殖系统生物膜活性及其净化效能的影响.....黄 滨 马 腾 刘宝良 刘 滨 洪 磊 梁 友 翟介明 张丽丽 (143)

**研究简报**

鲜饵不同投饵率对 2-5 龄大鲵(*Andrias davidianus*)生长的影响.....李 欣 张树明 卞秋云 王 震 陈宇珺 梁 刚 (148)

产木聚糖酶菌株 YS1069 的产酶条件优化.....董延娟 郝建华 郑鸿飞 孙 谧 (154)

5 种褐藻的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值测定.....曲艳艳 王伟伟 曹增梅 王 娜 李晓捷 张壮志 梁广津 (160)

### 第 4 期

#### 渤海生态环境监测专题研究论文

渤海中部海域低氧区的发生记录.....江 涛 徐 勇 刘传霞 张 艳 丁东生 孙雪梅 陈聚法 陈碧鹃 赵 俊 曲克明 (1)

渤海中部浮游动物的生态特征.....徐东会 孙雪梅 陈碧鹃 夏 斌 崔正国 赵 俊 江 涛 刘传霞 曲克明 (7)

渤海中部网采浮游植物种类组成和季节变化.....孙雪梅 徐东会 夏 斌 崔正国 曲克明 江 涛 赵 俊 陈聚法 陈碧鹃 (19)

近年渤海中部海域活性磷酸盐的时空变化特征.....陈聚法 赵 俊 过 锋 曲克明 崔正国 孙雪梅 朱建新 丁东生 刘传霞 (28)

基于欧拉-拉格朗日方法的某溢油事故天然渔业资源损失评估方法案例研究.....丁东生 马绍赛 陈碧鹃 崔正国 赵 俊 刘传霞 张旭志 曲克明 (36)

渤海中部 COD 的时空分布特征及其对富营养化的贡献分析.....张 艳 李秋芬 赵 俊 崔正国 周明莹 朱建新 丁东生 过 锋 刘传霞 曲克明 (43)

渤海中部海域沉积物中 Hg 的校正及其空间分布特征.....杨 茜 夏 斌 杨 庶 孙 耀 周明莹 朱建新 过 锋 刘传霞 曲克明 赵 俊 崔正国 (49)

渤海中部海域水体中 Hg、As 的时空分布特征.....杨 茜 夏 斌 孙 耀 陈聚法 张 艳 曲克明 赵 俊 崔正国 (54)

19-3 油田溢油对辽东湾浮游植物群落的影响.....宋广军 李 爱 吴金浩 王召会 (60)

蓬莱 19-3 溢油后莱州湾浮游植物群落结构.....程 玲 王月霞 马元庆 何健龙 刘爱英 宋秀凯 由丽萍 (67)

2013 年春季莱州湾海域理化环境及水质状况分析.....赵玉庭 苏 博 李佳蕙 王立明 齐延民 孙 珊 (74)

#### 研究论文

盐度对云纹石斑鱼(*Epinehelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinehelus lanceolatus* ♂)受精卵孵化的影响及杂交



仔稚幼鱼形态发育观察.....张梦淇 陈 超 李炎璐 孔祥迪 刘 莉 翟介明 (81)

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳宽快速生长选育群体遗传多样性及遗传结构的微卫星标记分析.....张荣良 王卫军 冯艳微 杨建敏 唐海田 纪仁平 (90)

日本枪乌贼(*Loligo japonica*)不同温度冻藏过程中的品质变化.....曹 荣 王凤玉 赵 玲 刘 淇 刘玉川 (97)

中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长、肠道菌群及抗病力的影响.....汤菊芬 黄 瑜 蔡 佳 丘金珠 孙建华 徐中文 简纪常 (104)

引起半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒病.....栗子丹 李 晋 史成银 (110)

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因克隆与表达分析及 SNP 筛选.....邢贺飞 高峰涛 张永珍 董忠典 陈松林 (116)

同步检测 7 种鱼类病毒的扩增子拯救多重 PCR(Arm-PCR)方法的建立和应用.....王胜强 耿伟光 史成银 李 晋 栗子丹 (128)

对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP28 和 VP26 的毕赤酵母组成型分泌表达.....耿小雪 王小霞 周 怡 徐 玮 张文兵 麦康森 (135)

2014 年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较.....孙新颖 刘庆慧 万晓媛 黄 捷 (140)

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长 cDNA 克隆及组织分布.....王修芳 刘庆慧 吴 垠 黄 捷 (147)

### 第 5 期

#### 研究论文

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Hsp90 mRNA 在温度刺激和鳃弧菌感染下的表达特征.....生安志 鞠辉明 李贵阳 李 杰 莫照兰 (1)

虾虎鱼科(Gobiidae)基因组微卫星 DNA 的分布特征.....白翠翠 柳淑芳 庄志猛 (9)

恩诺沙星在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体内的残留消除规律.....常志强 李东利 李 健 (16)

不同糖源饲料对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)生长、体组成、血糖水平和肝脏糖酵解酶活力的影响.....董兰芳 张 琴 程光平 许明珠 童 潼 熊向英 (22)

温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响.....施兆鸿 谢明媚 彭士明 张晨捷 高权新 (30)

养殖 2 龄赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)的营养价值与畸形原因分析.....孔祥迪 刘 莉 李炎璐 于欢欢 翟介明 庞尊方 徐万土 陈 超 (38)

大规模鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)对饲料中花生四烯酸的需求量.....王成强 梁萌青 徐后国 郑珂珂 柳 茜 (46)

微粒饲料中以微藻粉替代鱼油对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)稚鱼生长存活和脂肪酸组成的影响.....乔洪金 王际英 张利民 孙春晓 李宝山 丛 超 宋志东 柳旭东 (56)

蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)大网目流刺网参数优化研究.....朱建成 李显森 都松军 孙中之 孙 珊 尤宗博 (64)

南极磷虾粉作为鲷形目鱼饲料蛋白源的营养价值评价.....严俊丽 陈四清 常 青 曹栋正 王贞杰 (74)

氨氮胁迫下中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)谷氨酸脱氢酶基因的表达分析.....何玉英 李少飞 王清印 李 健 (83)

磺胺二甲嘧啶对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)非特异性免疫酶活性的影响.....孙 铭 葛倩倩 李 健 葛红星 翟倩倩 赵法箴 (92)

超分支滚环扩增试纸检测对虾黄头病毒.....赵玉然 尹伟力 谭乐义 李 诺 岳志芹 房保海 王宫璞 (100)

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)两种养殖塘水体古菌的季节变化.....胡越航 韦 梦 姜柳伊 裘琼芬 王春琳 (108)

刺参(*Apostichopus japonicus*) 4 个群体棘数的重复力估计.....赵 帅 黄 旭 王海峰 张伟杰 刘永旗 宋 坚 王增东 经晨晨 常亚青 (115)

盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响.....付 萍 吕建建 刘 萍 李 健 (122)

池塘养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠含物、附着基和底泥中的菌群结构及其相关性.....李 彬 廖梅杰 荣小军 张 正 王印庚 陈贵平 王 岚 范瑞用 (127)

低溶氧胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)氧化应激指标的影响.....

- .....李根瑞 任利华 孙国华 杨建敏 韦秀梅 刘兆存 李尚俊 姜 汉 (133)
- 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影响.....
- .....吴 彪 杨爱国 孙秀俊 刘志鸿 周丽青 宫一震 (140)
- 不同海域不同品种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)挥发性成分的比较分析.....
- .....李 微 阿曼尼萨·买买提 徐继林 骆其君 于珊珊 朱 鹭 (147)
- 超高压处理对牡蛎(*Crassostrea gigas*)杀菌及贮藏品质的影响.....
- .....赵 峰 袁 超 刘远平 宿志伟 李钰金 周德庆 (157)
- 研究综述**
- 贝类毒素固相吸附示踪监测技术研究进展.....
- .....李兆新 张婷婷 郭萌萌 孙晓杰 宋才湖 周德山 宋新成 (162)

## 第 6 期

### 研究论文

- 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用.....
- .....单秀娟 陈云龙 金显仕 杨 涛 戴芳群 (1)
- 茜素络合物对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)苗种耳石的染色标记效果.....
- .....徐永江 柳学周 史 宝 翟介明 (11)
- 鳀科(Engraulidae)鱼类 DNA 条形码电子芯片研究.....
- .....柳淑芳 李献儒 李 达 庄志猛 (19)
- 太平洋鲑(*Gadus macrocephalus* Tilesius)仔鱼发育过程.....
- .....姜云荣 于道德 刘洪军 官曙光 张少春 张 岩 (26)
- 蛋白营养对工业养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应.....
- .....张 静 高婷婷 李 勇 赵宁宁 马 骏 (34)
- 裂壶藻对津新鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)生长、血液非特异性免疫指标及抗病力的影响.....
- .....刘宏超 程镇燕 翟胜利 林城丽 王金娥 乔秀亭 白东清 (42)
- 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雄性亲鱼繁殖性能及抗氧化功能的影响.....
- .....赵 敏 梁萌青 郑珂珂 徐后国 (49)
- 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性.....
- .....王津津 刘 莹 于 力 贾 鹏 陈 兵 史秀杰 郑晓聪 兰文升 何俊强 刘 荭 (56)
- 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、黑石斑鱼(*Centropristis striata*)的营养成分及加工品质比较.....
- .....赵 睿 娄方瑞 丁福红 马爱军 王 婷 (62)
- 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)外部性征的分化及发育.....
- .....冯政夫 林晓菲 葛蕾蕾 朱 伟 (68)
- 分段养殖模式在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中的应用.....
- .....李俊伟 颀晓勇 郭永坚 朱长波 常 华 王豪杰 陈素文 (74)
- 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)中国群体与韩国群体杂交子一代的生长和存活比较.....
- .....蔡忠强 郑言鑫 任利群 赵春暖 吴 彪 王肖君 于 涛 杨爱国 林建国 (81)
- 盐度、pH 对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率和摄食率的影响.....
- .....杨杰青 蒋 玫 李 磊 董 冉 许高鹏 沈新强 (87)
- 体外仿生消化在华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)体内镉的生物可给性中的应用.....
- .....杨妙峰 (94)
- 人工鱼礁材料添加物碳封存能力及其对褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)固碳量的影响.....
- .....李 娇 公丕海 关长涛 刘 毅 (100)
- 金乌贼(*Sepia esculenta*)早期发育阶段相关酶活性的变化.....
- .....刘长琳 刘思玮 赵法箴 陈四清 刘春胜 燕敬平 (105)
- 不同卵色皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)幼鲍的生长与免疫比较.....
- .....赵海峰 冯艳微 刘相全 姜 绪 韦秀梅 刘佳乐 江海林 (110)
- 配合饲料中添加玉米 DDGS 对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长、体组成及免疫指标的影响.....
- .....张德瑞 张利民 马晶晶 李宝山 夏 斌 谭 清 王际英 (115)
- 海蜇(*Rhopilema esculentum*)磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因的 cDNA、基因组克隆与表达分析.....
- .....杨 洪 朱 玲 骆晓蕊 周春娅 庄志猛 (123)
- 长江野生和池塘养殖河蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹种早期养殖性能、抗病力和非特异性免疫性能的比较.....
- .....姜晓东 吴旭干 刘 青 何 杰 张庆华 王幼鹏 成永旭 (131)
- 不同近交程度对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)繁殖性能的影响.....
- .....王好锋 高保全 刘 萍 李 健 潘鲁青 (138)
- 固相吸附毒素跟踪技术监测牡蛎养殖区中腹泻性贝毒.....
- .....宿志伟 赵 峰 刘远平 徐 娜 周德庆 姚建华 李钰金 刘志敏 (144)
- 溶藻细菌 A3 的溶藻特性.....
- .....郗建云 曹煜成 徐武杰 胡晓娟 徐 煜 许云娜 李卓佳 文国樑 李莎莎 (151)

## Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 37, 2016

### No.1

- The Reproductive Biology of *Rhinogobio ventralis* in the Main Stream of the Yangtze River ..... (1)
- ..... QU Huantao, GUO Wentao, YANG Yuanjin, LIU Yong, GUAN Min, LI Sha, LIU Xuetao, HU Meihong
- Morphological Characteristics and Their Relationships With the Body Weight of Wild Juvenile *Thunnus albacares* ..... (8)
- ..... LI Yanlu, CHEN Chao, YU Hong, SUN Shuguang, Meng Xiangjun, KONG Xiangdi
- An Ecological Study on the Benthos in Intertidal Zone of Xinghua Bay ..... (15)
- ..... LIN Heshan, WANG Jianjun, HUANG Yaqin, LIN Junhui, HE Xuebao, LIU Kun, ZHENG Chengxing, LI Rongguan
- Interannual Variations in Community Structure and Species Diversity of Fishery Resources in the Laizhou Bay ..... (22)
- ..... YANG Yaoyao, LI Zhongyi, WU Qiang, WANG Jun
- Comparison of the Morphological Traits Between Male and Female Individuals of *Takifugu rubripes* ..... YUE Liang, (30)
- WANG Xinan, MA Aijun, SUN Zhibin, NI Shijun, ZHAO Yanfei, HOU Shiyong, ZHAI Jieming, MENG Xuesong
- Molecular Cloning and Expression Analysis of Caspase 9 Gene from Blout Snout Bream (*Megahbrama amblycephala*) (36)
- Under Ammonia-N Stress ..... ZHANG Qiong, SUN Shengming, LI Bing, JIANG Gaozhong, ZHU Jian, GE Xianping
- The Expression Analysis of Farnesoic Acid O-Methyl Transferase (*FAMEt*) Gene During the Ovarian Development (46)
- Cycles of *E. Exopalaemon carinicauda* ..... LI Zhimin, LI Jian, LI Jitao, HE Yuying, GE Qianqian, SUO Shuai
- The Analysis of the Quantity and the Composition of Cultivable Bacteria in Artificially Cultivated Prawn Larvae ..... (52)
- ..... ZHANG Xiaojing, SONG Xiaoling, WAN Xiaoyuan, YANG Bing, HUANG Jie
- Effects of Abrupt Salinity Stress on Serum Osmolarity and Ion Concentration of "Huangxuan No.1" *Portunus trituberculatus* (58)
- ..... MA Jinwu, LV Jianjian, LIU Ping, GAO Baoquan, LI Jian
- Analysis of the Genetic Diversity of Six Populations of Cultured *Litopenaeus vannamei* Based on the Mitochondrial DNA (63)
- Control Region ..... LIU Hong, ZHANG Haiqiang, CAI Shengli, DAI Xilin
- Codon Optimization and Prokaryotic Expression of Fucosyltransferase 2 Like Protein from the Oyster (*Crassostrea gigas*) (74)
- ..... YAO Lin, JIANG Yanhua, LI Fengling, ZHU Wenjia, GUO Yingying, JIANG Wei, ZHAI Yuxiu, WANG Lianzhu
- The Nutritional Effects of Two Feedstuffs from Sweet Potato on Feeding and Growth of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (80)
- ..... ZHAO Bin, HU Wei, LI Chenglin, HAN Sha, YAN Fang
- Effects of Different Ration Levels on Growth, Activities of Digestive Enzymes and Immunity-Related Enzymes in (87)
- Apostichopus japonicus* Selenka ..... WANG Yichao, LIANG Mengqing, ZHENG Keke
- The Effect of Dietary Chitosan with Different Molecular Weights on the Growth and Immunity of *Apostichopus japonicus* (93)
- Selenka ..... BAI Yang, XU Wei, WANG Dongfeng, WANG Yanlong
- Effects of the Partial Substitute for Fish Meal by Hydrolyzed Krill Meal on Growth Performance, the Body Composition (100)
- and the Serum Biochemical Parameters of Juvenile Pearl Gentian Grouper ..... WEI Jiali, WANG Jiying, SONG Zhidong, HUANG Yu, SUN Yongzhi, ZHANG Limin
- Performance of Spore Release, Gametogenesis and Growth of Sporophytes Resulted from Sorus Cultured under Different (111)
- Temperature and Culture Periods ..... LI Xia, PANG Shaojun, SU Li
- The Growth Characteristics of Long-line Cultured Seaweed *Sargassum thunbergii* in the Sanggou Bay ..... (120)
- ..... CHEN Jie, ZHANG Jihong, LI Jiaqi, ZHANG Yitao, SUI Haidong, WU Wenguang, NIU Yali, GAO Zhenkun
- Effect of Different Organic Carbon Sources and C/N on the Bio-filter Purification ..... (127)
- ..... CHENG Haihua, ZHU Jianxin, QU Keming, YANG Zhiqiang, LIU Shoutang, SUN Deqiang
- Effects of Water Accommodated Fraction of No.0 Fuel Oil and Crude Oil on the Growth of *Chlorella vulgaris* ..... (135)
- ..... LI Lei, SHEN Xinqiang, WANG Yunlong, JIANG Mei
- Preliminary Studies on the Photosynthetic and Respiration Rate of Young Sporophyte of a New *Saccharina* Variety "Haitian (140)
- No. 1" Using Liquid-Phase Oxygen Measurement System ..... YAO Haiqin, LIANG Zhourui, LIU Fuli, WANG Feijiu, SUN Xiutao, WANG Wenjun, LING Jingyu
- Analysis on the Metabolites of Enrofloxacin in the Carp Liver by Using HPLC/Q-TRAP MS ..... (148)
- ..... TANG Xizhao, LI Zhaoxin, XING Lihong, WU Haiyan, SONG Caihu, FU Shulin, ZHANG Tingting, JIANG Wanfeng

### No.2

- Analysis on the Reproduction of *Fenneropenaeus chinensis* and *Portunus trituberculatus* Based on Their Food Sources (1)
- and Predators in the Laizhou Bay of China ..... WU Qiang, JIN Xianshi, LUAN Qingshan, CHEN Wei, ZUO Tao, CHEN Ruisheng, WANG Jun
- Study on Temporal and Spatial Variation of Nutrients and Evaluation on Eutrophication in the Seawater of the Bohai Sea (1)
- in Winter and Spring of 2014 .....

- .....SUI Qi, XIA Bin, XIE Hanbing, CUI Yi, CHEN Bijuan, CUI Zhengguo, DING Dongsheng (10)  
Acute Toxic Effects of Reclaimed Silt and Suspended Solids on Marine Organism Resources in Tianjin .....
- .....WANG Juanjuan, JIAO Jianhua, MA Dan, CHEN Yongping, LI Chunqing (16)  
Histological Structure of Retina and Visual Characteristics of Turbot *Scophthalmus maximus* Fry .....
- .....CHE Jingqing, CHEN Jinghua, HU Miaofeng (25)  
Preparation of Chromosomes and Analysis of Karyotypes of Hybrid F<sub>1</sub> (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) Groupers .....
- .....LIU Li, ZHANG Yan, CHEN Chao, LI Yanlu, KONG Xiangdi, YU Huanhuan, CHEN Jianguo, ZHAI Jieming (33)  
Bioinformatics Analysis of Sox Gene Family in *Cynoglossus semilaevis* .....
- .....GAO Jin, MA Jialu, LIU Yang, SHAO Changwei, JIA Xiaodong, CHEN Songlin (41)  
Effects of Bioflocs on Growth Performance, Digestive Enzyme and Immunity Enzyme Activities in Juvenile Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*) .....
- .....SUN Shengming, GE Xianping, ZHU Jian, JIANG Xiaojun, ZHANG Wuxiao (49)  
Dietary Magnesium did not Affect Growth Performance and Fish Body Magnesium Content in Juvenile Japanese Seabass, *Lateolabrax japonicus* .....
- .....ZHAO Min, LIANG Mengqing, TAN Feng, ZHENG Keke, XU Houguo, YAN Lei (56)  
The Comparison of Different Pre-treatment Methods for Acquiring Otolith Annuli of *Coilia nasus* .....
- .....JIANG Tao, LIU Hongbo, LU Mingjie, CHEN Tingting, YANG Jian (62)  
Analysis of Genetic Structures of Four Wild Geographoic Populations of Mullet *Liza haematocheila* by Using Microsatellite Marker Technique .....
- .....MAO Shoukang, MA Aijun, DING Fuhong, YAN Xiwu, LUO Haizhong, LI Weiye, XU Baorong, WANG Huaizhong, WANG Baoyi, WANG Guangning (68)  
Histological Observation of the Eye of American Shad (*Alosa sapidissima*) at the Early Developmental Stage .....
- .....GAO Xiaoqiang, HONG Lei, LIU Zhifeng, GUO Zhenglong, WANG Yaohui, LEI Jilin (76)  
The Comparison of Individual Fecundity of *Monopterus albus* from Different Sources .....
- .....DUAN Guoqing, JIANG He, HU Wang, PAN Tingshuang, HU Yuting, LING Jun (84)  
The cDNA Cloning and Expression Analysis of p38 MAPK Gene of *Fenneropenaeus chinensis* .....
- .....YAO Wanlong, HE Yuying, LIU Ping, LI Jian, WANG Qingyin (91)  
Effects of Enrofloxacin on the Expression Analysis of CYP2 and Activity of APND in *Litopenaeus vannamei* .....
- .....WANG Ying, LI Jian, GE Qianqian, ZHAI Qianqian, LI Dongli, GE Hongxing (99)  
Isolation of Lysogenic Phage in *Vibrio parahaemolyticus* and Its Relationship with the Pathogenicity of the Host Bacteria .....
- .....WANG Na, WANG Hailiang, BAI Nan, HUANG Jie, XIE Daxiang, XIE Qilang, YU Junqi, WAN Xihe (105)  
Isolation and Identification of a *Bacillus* sp. Strain and Its Role in Bioflocs for the Shrimp Culture System .....
- .....ZHANG Huanhuan, WANG Xiuhua, LI Chen, HUANG Jie (111)  
Development of Real-Time PCR Assay for Detecting Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the Application in Shrimp Samples with Different Growth Rates .....
- .....LIU Zhen, ZHANG Qingli, WAN Xiaoyuan, MA Fang, HUANG Jie (119)  
Sequence Comparison of WSSV Variable Regions from Different Parts of China in 2014 .....
- .....SUN Xinying, WAN Xiaoyuan, LIU Qinghui, HUANG Jie (127)  
Effects of Temperature and Salinity on Oxygen Consumption and Ammonia Excretion Rate of Whelk *Cantharus cecillei* with Different Sizes .....
- .....WU Wenguang, ZHANG Jihong, GAO Zhenkun, FANG Jinghui, LI Jiaqi, LIU Yi (134)  
Degradation Rate and Influencing Factors of *Sacharina japonica* Debris from the Sanggou Bay Mariculture Ecosystem .....
- .....ZHANG Yitao, ZHANG Jihong, YANG Feng, REN Lihua, CHEN Jie, SUI Haidong, JIANG Weiwei, GAO Zhengkun (139)  
A Comparative Study on High Temperature and Salinity Tolerance of Hybrids Between Chinese and Korean Populations of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* .....
- .....FAN Chaojing, CHEN Aihua, TAN Jie, WANG Liang, GAO Fei, YAN Jingping, ZUO Zhiliang, SUN Huiling (146)  
A Review of Methodology in Marie Food-web Topology .....
- .....ZHU Jiangfeng, DAI Xiaojie, WANG Xuefang, CHEN Yan (153)

### No.3

- Seasonal Variation in Lipids and Protein Content of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) .....
- .....NIE Yuchen, ZHANG Bo, ZHAO Xianyong, WANG Xinliang, ZHANG Jichang, LI Xiansen (1)  
Ecological Research of Fouling Organisms on the Offshore Platform in Bohai Sea .....
- .....ZHOU Bin, FENG Chunhui, LIU Wei, ZHAO Sheng (9)  
Evaluation of Heavy Metal Pollution in the Offshore Surface Seawater of the Liaodong Bay .....
- .....SONG Yonggang, WU Jinhao, SHAO Zewei, YU Caifen, ZHANG Yufeng, DU Jing, JIANG Bing, SONG Lun, WANG Nianbin (14)  
Temporal and Spatial Distribution of Petroleum Hydrocarbon and the Pollution in Seawater of the Liaodong Bay .....
- .....WANG Zhaohui, WU Jinhao, HU Chaokui, LIU Guiying, WANG Nianbin, LI Ai, TIAN Jiashen, MA Zhiqiang (20)  
Effects of Temperature on the Embryonic Development and Larval Activity of *Epinephelus moara* .....
- .....ZHANG Tingting, CHEN Chao, SHI Zhaohong, LI Yanlu, YU Huanhuan, REN Baohui, XU Wantu (28)  
Analysis and Evaluation of Nutritive Composition in Muscles of *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and Their Reciprocal Hybrids .....
- .....CAO Dongzheng, ZHANG Xiaozhong, CHEN Siqing, QIN Bo, CHANG Qing, LIU Changlin, LIU Xi, LÜ Yunyun (34)  
Effect of Different Carbohydrate Sources on Daily Weight Growth, Feed Utilization and Digestive Enzyme Activities of *Trachinotus ovatus* .....
- .....DONG Lanfang, ZHANG Qin, XU Mingzhu, TONG Tong, WANG Jun, XIONG Xiangying, PENG Yinhui (42)  
Effects of Small Molecule Weight Fish Protein Hydrolysate in High Plant Protein Diets on the Expression of Liver IGF-I

Receptor and the Growth of Juvenile Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> L.)	MU Yuchao, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, WEI Yuliang	(49)
Development of Multiplex PCR Systems of Microsatellite Markers for Pacific White Shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) and Its Application for Parentage Identification	LI Dongyu, KONG Jie, MENG Xianhong, LUAN Sheng, LUO Kun, LU Xia, CAO Baoxiang	(58)
Molecular Epidemiology of a New Yellow Head Virus Strain in China	ZHU Luoluo, ZHANG Qingli, WAN Xiaoyuan, QIU Liang, MA Fang, HUANG Jie	(68)
Identification and Application of a Probiotic Strain Functioning in Both Ammonia Nitrogen Removal and <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Antagonism	WANG Lei, WANG Zhijie, GAO Ge, HUANG Jie	(78)
Isolation and Identification of a Bacterial Strain with Vibrios-Antagonism from Shrimp Ponds	ZHANG Huanhuan, WANG Xiuhua, LI Chen, HUANG Jie	(85)
MSAP Analysis of Genomic DNA in the Tissues of <i>Apostichopus japonicus</i> and White <i>A. japonicus</i>	ZUO Zhiliang, TAN Jie, WU Biao, CHEN Siqing, GAO Fei, YAN Jingping, WANG Shuang, SUN Huiling	(93)
Comparative Study on Nutrient Composition of Body Walls of Green and White Sea Cucumbers ( <i>Apostichopus japonicus</i> )	LI Zhongqing, XIA Bin, WANG Jiying, HUANG Bingshan, ZHANG Limin, LI Baoshan	(101)
Studies on Culture and Storage of <i>Gloiopeltis furcata</i> Thalli	CHEN Suwen, GUO Yongjian, LI Junwei, XIE Xiaoyong, ZHU Changbo	(108)
Applicability of DNA Barcoding in the Identification of Different Strains in <i>Pyropia yezoensis</i>	CAO Dianjia, YAN Xinghong	(114)
Effects of High Temperature on the Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Fluorescence Parameters of <i>Saccharina japonica</i>	LING Jingyu, LIANG Zhouhui, WANG Feijiu, SUN Xiutao, WANG Wenjun, LIU Fuli, YAO Haiqing	(120)
Effects of Dietary Oligo-Methionine on the Growth Performance, Feed Utilization and Protein Metabolism Responses of Juvenile Large Yellow Croaker ( <i>Larimichthys crocea</i> )	MA Jun, WEI Zehong, XING Shujuan, YI Lina, XU Wei, ZHOU Huihui, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen	(126)
Gonad Development of Oyster ( <i>Crassostrea hongkongensis</i> ) at Different Cultural Sites in Maowei Bay, Guangxi, China	YU Feng, LUO Bang, CHEN Xuefen, LI Qiongzheng, WANG Yan	(134)
Effects of Ozone Concentration on the Activity of Biofilm and Its Effectiveness of Purification in Recirculating Aquaculture Systems	HUANG Bin, MA Teng, LIU Baoliang, LIU Bin, HONG Lei, LIANG You, ZHAI Jieming, ZHANG Lili	(143)
Effects of Frequency of Feeding with Fresh Diet on the Growth of the 2 to 5-year-old <i>Andrias davidianus</i>	LI Xin, ZHANG Shuming, BIAN Qiuyun, WANG Zhen, CHEN Yujun, LIANG Gang	(148)
Optimization of the Fermentation Conditions for Xylanase-Producing Strain YS1069	DONG Yanjuan, HAO Jianhua, ZHENG Hongfei, SUN Mi	(154)
Determining the Ratio of Mannuronic Acid to Guluronic Acid(M/G) of Five Species of Brown Algae	QU Yanyan, WANG Weiwei, CAO Zengmei, WANG Na, LI Xiaojie, ZHANG Zhuangzhi, LIANG Guangjin	(160)

## No.4

Report on the Occurrence of Hypoxia in the Central Bohai Sea	JIANG Tao, XU Yong, LIU Chuanxia, ZHANG Yan, DING Dongsheng, SUN Xuemei, CHEN Jufa, CHEN Bijuan, ZHAO Jun, QU Keming	(1)
The Ecological Characteristics of Zooplankton in the Central Bohai Sea	XU Donghui, SUN Xuemei, CHEN Bijuan, XIA Bin, CUI Zhengguo, ZHAO Jun, JIANG Tao, LIU Chuanxia, QU Keming	(7)
Species Composition and Seasonal Variation of Netz-Phytoplankton in the Central Bohai Sea	SUN Xuemei, XU Donghui, XIA Bin, CUI Zhengguo, QU Keming, JIANG Tao, ZHAO Jun, CHEN Jufa, CHEN Bijuan	(19)
Recent Temporal and Spatial Variation in Active Phosphate Concentration in Seawater of the Central Bohai Sea	CHEN Jufa, ZHAO Jun, GUO Feng, QU Keming, CUI Zhengguo, SUN Xuemei, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, LIU Chuanxia	(28)
Evaluation of the Natural Fishery Resources Loss Caused by an Oil Spill Accident in the Central Bohai Sea Based on Euler-Lagrange Method	DING Dongsheng, MA Shaosai, CHEN Bijuan, CUI Zhengguo, ZHAO Jun, LIU Chuanxia, ZHANG Xuzhi, QU Keming	(36)
Temporal and Spatial Distribution of COD and Its Source and Contribution to Eutrophication in the Central Bohai Sea	ZHANG Yan, LI Qiufen, ZHAO Jun, CUI Zhengguo, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming	(43)
Normalization and Spatial Distribution of Mercury in the Sediments and Seawater of the Central Bohai Sea	YANG Qian, XIA Bin, YANG Shu, SUN Yao, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo	(49)
The Temporal and Spatial Distribution of Mercury and Arsenic in the Central Bohai Sea	YANG Qian, XIA Bin, SUN Yao, CHEN Jufa, ZHANG Yan, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo	(54)
Influence of 19-3 Oil Spill Accident on Phytoplankton Community in the Liaodong Bay	SONG Guangjun, LI Ai, WU Jinhao, WANG Zhaohui	(60)
The Structure of the Phytoplankton Community in the Laizhou Bay After the Oil Spills in Penglai 19-3 Oilfield	CHENG Ling, WANG Yuexia, MA Yuanqing, HE Jianlong, LIU Aiyong, SONG Xiukai, YOU Liping	(67)
Evaluation of Physicochemical Environment and Water Quality in the Laizhou Bay in Spring of 2013		



- ..... ZHAO Yuting, SU Bo, LI Jiahui, WANG Liming, QI Yanmin, SUN Shan (74)  
Effects of Salinity on the Hatching of the Fertilized Eggs of *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) and the  
Observation of the Morphological Development of Larvae, Juvenile and Young Fish .....
- ..... ZHANG Mengqi, CHEN Chao, LI Yanlu, KONG Xiangdi, LIU Li, ZHAI Jieming (81)  
Assessment of Genetic Variability and Microsatellite Analysis of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) After Artificial Selection  
of the Shell Width .....
- ..... ZHANG Rongliang, WANG Weijun, FENG Yanwei, YANG Jianmin, TANG Haitian, JI Renping (90)  
Qualitative Changes of Squid (*Loligo japonica*) Under Different Frozen Storage Temperatures .....
- ..... CAO Rong, WANG Fengyu, ZHAO Ling, LIU Qi, LIU Yuchuan (97)  
Effects of a Compound Probiotics Combined with Chinese Herbal Medicine on Growth Performance, Intestinal Flora and  
Resistance to Diseases of GIFT Strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) .....
- ..... TANG Jufen, HUANG Yu, CAI Jia, QIU Jinzhu, SUN Jianhua, XU Zhongwen, JIAN Jichang (104)  
Preliminary Study on Massive Mortality of Hatchery-Reared Half-Smooth Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*, Associated  
with Viral Nervous Necrosis .....
- ..... SU Zidan, LI Jin, SHI Chengyin (110)  
Molecular Cloning, Expression and SNP Screening of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (Nramp) Gene  
cDNA from Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) .....
- ..... XING Hefei, GAO Fengtao, ZHANG Yongzhen, DONG Zhongdian, CHEN Songlin (116)  
Amplicon Rescue Multiplex PCR (Arm-PCR): a Novel Tool for Simultaneous Detection of Seven Types of Fish Viruses .....
- ..... WANG Shengqiang, GENG Weiguang, SHI Chengyin, LI Jin, SU Zidan (128)  
Secretive Expression of White Spot Syndrome Virus Envelope Proteins VP28 and VP26 in *Pichia pastoris* Induced by  
Constitutive Promoter .....
- ..... GENG Xiaoxue, WANG Xiaoxia, ZHOU Yi, XU Wei, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen (135)  
Comparison of the Missing Sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from Different Regions of China in 2014 .....
- ..... SUN Xinying, LIU Qinghui, WAN Xiaoyuan, HUANG Jie (140)  
cDNA Cloning of Coat-Epsilon Gene and Its Tissue Distribution in *Fenneropenaeus chinensis* .....
- ..... WANG Xiufang, LIU Qinghui, WU Yin, HUANG Jie (147)

## No.5

- Expression Patterns of Hsp90 of *Paralichthys olivaceus* in Response to Temperature Treatment and *Vibrio anguillarum* Infection  
..... SHENG Anzhi, JU Huiming, LI Guiyang, LI Jie, MO Zhaolan (1)  
Characteristic Analysis of Microsatellite DNA in the Genome of Gobiidae .....
- ..... BAI Cuicui, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng (9)  
Residue Dynamics of Enrofloxacin in *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* and *Cynoglossus semilaevis* .....
- ..... CHANG Zhiqiang, LI Dongli, LI Jian (16)  
Effect of Different Carbohydrate Sources on the Growth, Body Composition, Plasma Biochemical Indices and Glycolytic  
Enzyme Activities of *Trachinotus ovatus* .....
- ..... DONG Lanfang, ZHANG Qin, CHENG Guangping, XU Mingzhu, TONG Tong, XIONG Xiangying (22)  
Effects of Temperature Stress on Activities of Digestive Enzymes and Serum Biochemical Indices of *Pampus argenteus* Juveniles  
.....
- ..... SHI Zhaohong, XIE Mingmei, PENG Shiming, ZHANG Chenjie, GAO Quanxin (30)  
Nutritional Values of 2-Year-Old Cultured *Epinephelus akaara* and Causes of Its Common Deformities .....
- ..... KONG Xiangdi, LIU Li, LI Yanlu, YU Huanhuan, ZHAI Jieming, PANG Zunfang, XU Wantu, CHEN Chao (38)  
Requirement of Arachidonic Acid in Adult Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) .....
- ..... WANG Chengqiang, LIANG Mengqing, XU Houguo, ZHENG Keke, LIU Xi (46)  
Effects of Dietary Fish Oil Replacement by Microalgae in Microdiets on Growth Performance, Survival and Fatty Acid  
Profile of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Juveniles .....
- ..... QIAO Hongjin, WANG Jiying, ZHANG Limin, SUN Chunxiao, LI Baoshan, CONG Chao, SONG Zhidong, LIU Xudong (56)  
Studies on Parameter Optimization of *Scomberomorus niphonius* Big-mesh Drift Gillnet .....
- ..... ZHU Jiancheng, LI Xiansen, DU Songjun, SUN Zhongzhi, SUN Shan, YOU Zongbo (64)  
Evaluation of Nutrition of Antarctic Krill Meal as Dietary Protein Source for Flatfishes .....
- ..... YAN Junli, CHEN Siqing, CHANG Qing, CAO Dongzheng, WANG Zhenjie (74)  
cDNA Cloning and Expression Analysis of Glutamate Dehydrogenase in Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)  
Exposed to Ambient Ammonia .....
- ..... HE Yuying, LI Shaofei, WANG Qingyin, LI Jian (83)  
Effects of Sulfamethazine on the Non-Specific Immune Enzyme Activities of *Fenneropenaeus chinensis* .....
- ..... SUN Ming, GE Qianqian, LI Jian, GE Hongxing, ZHAI Qianqian, ZHAO Fazhen (92)  
The Detection of Yellow Head Virus by Hyper-Branched Rolling Circle Amplification Test Strip .....
- ..... ZHAO Yuran, YIN Weili, TAN Leyi, LI Nuo, YUE Zhiqin, FANG Baohai, WANG Gongpu (100)  
The Seasonal Variations of Archaea in Two Kinds of Ponds for *Portunus trituberculatus* .....
- ..... HU Yuehang, WEI Meng, JIANG Liuyi, QIU Qiongfeng, WANG Chunlin (108)  
Estimates of Repeatability Coefficients for Papillae Number in Four Populations of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)  
.....
- ..... ZHAO Shuai, HUANG Xu, (115)  
WANG Haifeng, ZHANG Weijie, LIU Yongqi, SONG Jian, WANG Zengdong, JING Chenchen, CHANG Yaqing  
Effects of Different Salinities on the Free Amino Acids Composition in the Gill of *Portunus trituberculatus* .....
- ..... FU Ping, LÜ Jianjian, LIU Ping, LI Jian (122)  
Correlation Analysis of Flora in the Habitat Environment and in the Gut Contents of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)  
.....
- ..... LI Bin, LIAO Meijie, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, WANG Yingeng, CHEN Guiping, WANG Lan, FAN Ruiyong (127)

Effects of Hypoxic Stress on Oxidative Stress Indices in <i>Apostichopus japonicus</i> .....	
..... LI Genrui, REN Lihua, SUN Guohua, YANG Jianmin, WEI Xiumei, LIU Zhaojun, LI Shangjun, JIANG Han	(133)
Effects of Acute Temperature Stress on Genome-Wide DNA Methylation Profiles in <i>Patinopecten yessoensis</i> .....	
..... WU Biao, YANG Aiguo, SUN Xiujun, LIU Zhihong, ZHOU Liqing, GONG Yizhen	(140)
Comparative Study of Volatile Components From Two Strains of <i>Pyropia haitanensis</i> in Different Culture Areas .....	
..... LI Wei, Omannisa-Mamat, XU Jilin, LUO Qijun, YU Shanshan, ZHU Si	(147)
Effects of High-Pressure Treatment on Microbial Inactivation and the Quality of Oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> ) .....	
..... ZHAO Feng, YUAN Chao, LIU Yuanping, SU Zhiwei, LI Yujin, ZHOU Deqing	(157)
Review of the Development and Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking for Shellfish Toxin Monitoring .....	
..... LI Zhaoxin, ZHANG Tingting, GUO Mengmeng, SUN Xiaojie, SONG Caihu, ZHOU Deshan, SONG Xincheng	(162)

## No.6

Reshaping the Distribution of Fish Abundance by Climate Change: A Case Study in the Yangtze River Estuary .....	
..... SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, JIN Xianshi, YANG Tao, DAI Fangqun	(1)
Alizarin Complexone Marking of Otoliths of Juvenile <i>Cynoglossus semilaevis</i> .....	
..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, ZHAI Jieming	(11)
Development of DNA Barcode-Microarray for Identification of Engraulidae Fishes.....	
..... LIU Shufang, LI Xianru, LI Da, ZHUANG Zhimeng	(19)
Observations on Larval Development of Pacific Cod ( <i>Gadus macrocephalus</i> Tilesius).....	
..... JIANG Yunrong, YU Daode, LIU Hongjun, GUAN Shuguang, ZHANG Shaochun, ZHANG Yan	(26)
Effects of the Protein Level on the Growth, Ammonia-Nitrogen Excretion, and Amino Acid Accumulation in the Muscle of Industrially-Cultured Juvenile Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> L.).....	
..... ZHANG Jing, GAO Tingting, LI Yong, ZHAO Ningning, MA Jun	(34)
Effects of Dietary <i>Schizochytrium</i> on the Growth Performance, Serum Nonspecific Immunity Indices, and Disease Resistance of <i>Cyprinus carpio</i> var. Jian.....	
..... LIU Hongchao, CHENG Zhenyan, ZHAI Shengli, LIN Chengli, WANG Jin'e, QIAO Xiuting, BAI Dongqing	(42)
Effects of Dietary Antarctic Krill on the Reproductive Performance and Antioxidant Function in Male Broodstock Tongue Sole ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> ).....	
..... ZHAO Min, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XU Houguo	(49)
Characterization of Grass Carp ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus .....	
..... LIU Ying, YU Li, JIA Peng, CHEN Bing, SHI Xiujie, ZHENG Xiaocong, LAN Wensheng, HE Junqiang, LIU Hong	(56)
The Nutritional Value and Processing Quality of <i>Ctenopharyngodon idellus</i> , <i>Liza haematocheila</i> , and <i>Centropristis striata</i> .....	
..... ZHAO Rui, LOU Fangrui, DING Fuhong, MA Aijun, WANG Ting	(62)
Differentiation and Development of External Sex Characteristics of Shrimp ( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ) .....	
..... FENG Zhengfu, LIN Xiaofei, GE Leilei, ZHU Wei	(68)
Application of Culturing in Stages in the Shrimp Culturing Pond .....	
..... LI Junwei, XIE Xiaoyong, GUO Yongjian, ZHU Changbo, CHANG Hua, WANG Haojie, CHEN Suwen	(74)
Growth and Survival of the First Hybrid Generation of Chinese and Korean Populations of <i>Scapharca broughtonii</i> .....	
..... CAI Zhongqiang, ZHENG Yanxin, REN Liqun, ZHAO Chunnuan, WU Biao, WANG Xiaojun, YU Tao, YANG Aiguo, LIN Jianguo	(81)
Effects of Salinity and pH on the Filtration Rate and Ingestion Rate of <i>Meretrix meretrix</i> .....	
..... YANG Jieqing, JIANG Mei, LI lei, DONG Ran, XU Gaopeng, SHEN Xinqiang	(87)
Preliminary Application of <i>in vitro</i> Bionics Digestion Model for Bioaccessibility of Cd in <i>Chlamys nobilis</i> .....	
..... YANG Miaofeng	(94)
Carbon Sequestration of Additives of Artificial Reefs and Its Effect on Carbon Fixation of <i>Ostrea plicatula</i> Gmelin .....	
..... LI Jiao, GONG Pihai, GUAN Changtao, LIU Yi	(100)
Changes in Activities of Related Enzymes in Early Developmental Stages of <i>Sepia esculenta</i> .....	
..... LIU Changlin, LIU Siwei, ZHAO Fazhen, CHEN Siqing, LIU Chunsheng, YAN Jingping	(105)
Growth and Immune Diversity of <i>Haliotis discus hannai</i> Juvenile Abalone with Different Egg Colors .....	
..... ZHAO Haifeng, FENG Yanwei, LIU Xiangquan, JIANG Xu, WEI Xiumei, LIU Jiale, JIANG Hailin	(110)
Effect of Dietary Dried Distiller's Grains with Solubles (DDGS) on the Growth, Body Composition, and Immune Enzymes Activities of Sea Cucumber ( <i>Apostichopus japonicus</i> ).....	
..... ZHANG Derui, ZHANG Limin, MA Jingjing, LI Baoshan, XIA Bin, TAN Qing, WANG Jiying	(115)
cDNA, Genome Cloning, and mRNA Expression of Phospholipase A <sub>2</sub> Gene from the <i>Rhopilema esculentum</i> .....	
..... YANG Hong, ZHU Ling, LUO Xiaorui, ZHOU Chunya, ZHUANG Zhimeng	(123)
Comparison of the Early Culture Performance, the Disease Resistance, and the Non-Specific Immunity Between Wild-Caught and Pond-Reared Juvenile Chinese Mitten Crab <i>Eriocheir sinensis</i> .....	
..... JIANG Xiaodong, WU Xugan, LIU Qing, HE Jie, ZHANG Qinghua, WANG Youpeng, CHENG Yongxu	(131)
Effects of Different Inbreeding Degree on Reproductive Performance of Swimming Crab ( <i>Portunus trituberculatus</i> ) .....	
..... WANG Haofeng, GAO Baoquan, LIU Ping, LI Jian, PAN Luqing	(138)
Monitoring of Diarrhetic Shellfish Poisons in Aquatic Environment by Solid Phase Adsorbent Toxin Tracking Technology.....	
..... SU Zhiwei, ZHAO Feng, LIU Yuanping, XU Na, ZHOU Deqing, YAO Jianhua, LI Yujin, LIU Zhimin	(144)
Characteristics of Algicidal Activity of Bacterial Strain A3 .....	
..... XI Jianyun, CAO Yucheng, XU Wujie, HU Xiaojuan, XU Yu, XU Yunna, LI Zhuojia, WEN Guoliang, LI Shasha	(151)



## 《中国海洋鱼类》

中国海洋大学水产学院陈大刚教授和张美昭教授编著的《中国海洋鱼类》(上、中、下三卷,三卷定价 698 元)已由中国海洋大学出版社出版。

《中国海洋鱼类》为国家“十二五”重点图书出版规划项目、国家出版基金资助项目和中央高校基本科研业务费专项资助项目。

《中国海洋鱼类》是一部系统的鱼类学基础性专著和全面的分类学工具书,具有如下特点:一是“全”,《中国海洋鱼类》收入盲鳗纲、头甲纲、软骨鱼纲和硬骨鱼纲鱼类共计 47 目 313 科 3200 余种,收录种类数创我国同类图书之最;二是全书配有 3200 余幅鱼类的原色彩色图片,图文并茂,相辅相成;三是书中采用了 Nelson J S(2006)鱼类分类系统,结合国内传统分类框架,编列了系统分类检索表,建立起从“名录”到“志”的平台,架起“名录”到“图鉴”的桥梁;四是每种鱼除原色图照外,还有形态特征、生态习性、区系分布及渔业意义等文字介绍;五是本书系统整理了建国以来使用的同物异名,附于现用名下,并对相关科、目的分类隶属变迁做了相应的注释。

责任编辑:魏建功,联系电话 0532-85902121,信箱 wjg60@126.com

# 《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang

戈贤平 GE Xianping

方建光 FANG Jianguang

王清印 WANG Qingyin

王新鸣 WANG Xinming

包振民 BAO Zhenmin

司徒建通 SITU Jiantong

关瑞章 GUAN Ruizhang

刘占江 LIU Zhanjiang

刘海金 LIU Haijin

孙效文 SUN Xiaowen

孙 溢 SUN Mi

庄 平 ZHUANG Ping

曲克明 QU Keming

江世贵 JIANG Shigui

何建国 HE Jianguo

吴常文 WU Changwen

吴淑勤 WU Shuqin

张士瑾 ZHANG Shicui

张全启 ZHANG Quanqi

张国范 ZHANG Guofan

张显良 ZHANG Xianliang

李来好 LI Laihao

李杰人 LI Jieren

李 健 LI Jian

李家乐 LI Jiale

杨红生 YANG Hongsheng

邹桂伟 ZOU Guiwei

陈立侨 CHEN Liqiao

陈松林 CHEN Songlin

陈雪忠 CHEN Xuezhong

周永灿 ZHOU Yongcan

林 洪 LIN Hong

俞志明 YU Zhiming

姚 杰 YAO Jie

相建海 XIANG Jianhai

赵宪勇 ZHAO Xianyong

徐 皓 XU Hao

桂建芳 GUI Jianfang

殷邦忠 YIN Bangzhong

秦 松 QIN Song

贾晓平 JIA Xiaoping

常亚青 CHANG Yaqing

常剑波 CHANG Jianbo

黄 捷 HUANG Jie

董双林 DONG Shuanglin

翟毓秀 ZHAI Yuxiu

魏宝振 WEI Baozhen

## 渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第37卷 第6期 2016年12月

## PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

( Bimonthly, founded in 1980 )

Vol.37 No.6 Dec. 2016

主管单位 中华人民共和国农业部

Administrated by Ministry of Agriculture, P.R.China

主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

出版单位 科学出版社

Published by Science Press

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.ykxjz.cn

E-mail: ykxjz@ysfri.ac.cn

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.ykxjz.cn; E-mail: ykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

Editor-in-Chief Tang Qisheng

印 刷 青岛国彩印刷有限公司

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch

订 购 全国各地邮政局

Subscription Post Offices All Over China

国外发行 中国国际图书贸易总公司

Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

国内邮发代号: 24-153

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869

ISSN 2095-9869

国外发行代号: 4578Q

CN 37-1466/S

国内外公开发刊



9 772095 986163