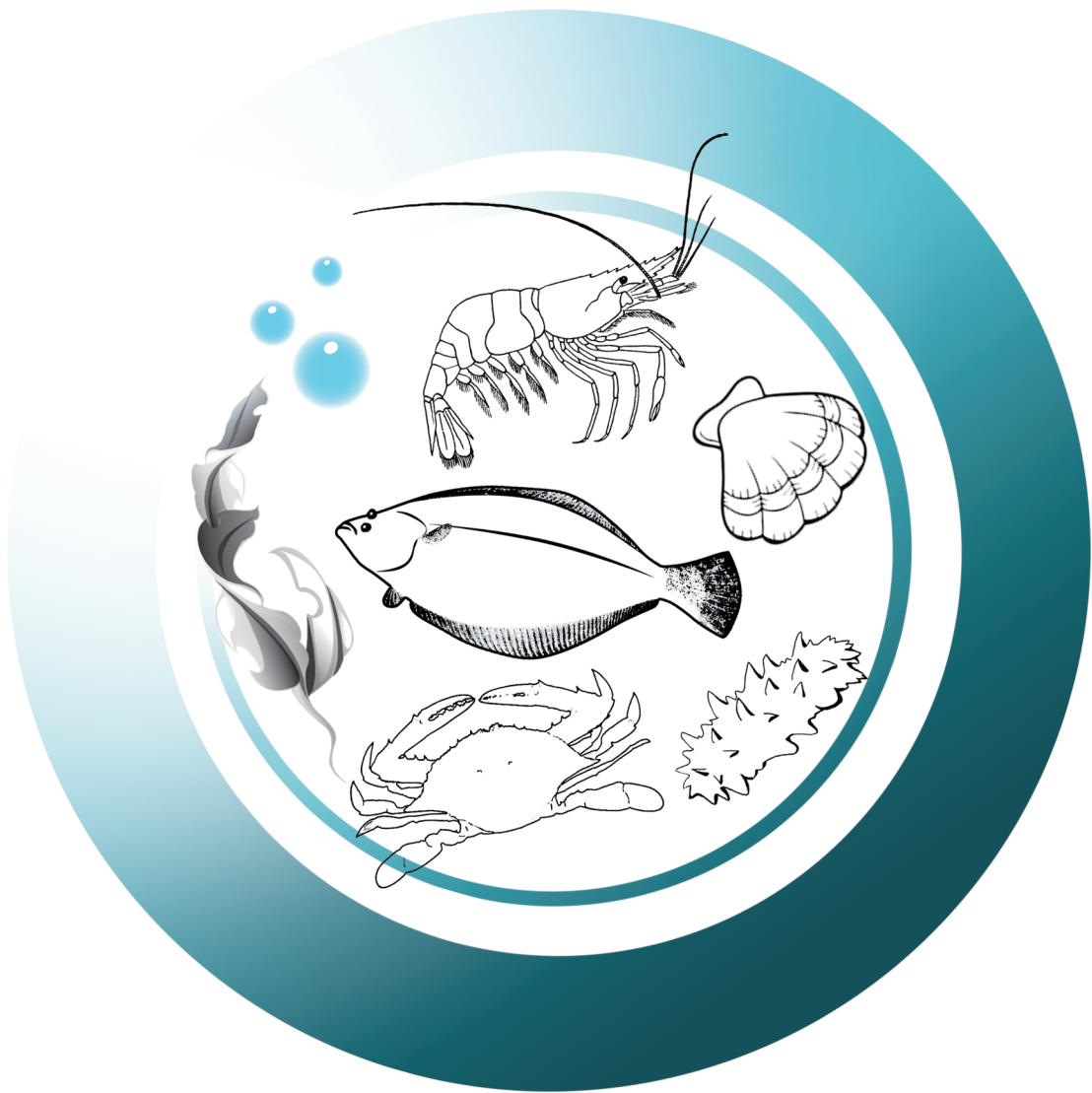


# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第43卷 VOL.43 第4期 NO.4



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办  
中国水产学会



科学出版社 出版  
Science Press

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 43 卷 第 4 期

2022 年 8 月

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

## 目 次

### 专栏：盐碱渔业

- 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究 ····· 速冠政 么宗利 来琦芳 高鹏程 周凯 朱浩拥 刘一萌 孙真 (1)
- 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼血液生理生化及肝脏抗氧化系统的影响 ····· 李海涛 徐伟 赵志刚 罗亮  
李明帅 刘金雨 王雨 张瑞 郭坤 耿龙武 杜汝君 丛艳峰 (12)
- 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究 ····· 王旭江 么宗利 来琦芳 于明超 李新苍  
高鹏程 周凯 崔青曼 刘一萌 孙真 李燕 (22)
- 盐碱水环境对脊尾白虾基因组 DNA 甲基化的影响 ····· 秦桢 李吉涛 李明栋 王佳佳 葛倩倩 刘萍 李健 (33)
- 脊尾白虾水通道蛋白基因 4 和 11 在碱度胁迫过程中的作用 ····· 李明栋 王佳佳 葛倩倩 秦桢 刘萍 李健 李吉涛 (51)
- 绥芬河水系野生绒螯蟹体重分布及常规营养品质 ····· 王世会 罗亮 张瑞 郭坤 张旭彬 孔令杰 赵志刚 (61)
- 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及盐碱度对其增殖的影响 ····· 代金彩 聂竹兰 赵年桦 任永丽 魏杰 (70)

### 研究论文

- 基于渔业数据的南极磷虾 48 渔区渔场时空分布 ····· 赵国庆 罗俊荣 唐峰华 樊伟 宋学锋 杨超 张衡 (81)
- 长江上游宜宾江段鱼类早期资源现状研究 ····· 李祥艳 田辉伍 蒲艳 唐锡良 严忠鑫 陈大庆 刘绍平 段辛斌 (93)
- 6 种大型海洋掠食性鱼类胃含物角质颚分类研究 ····· 欧利国 顾心雨 王冰妍 刘必林 (105)
- 基于氮稳定同位素分析的三峡水库主要鱼类营养级研究 ····· 何春 邓华堂 王果 刘寒文 沈子伟 刘绍平 段辛斌 陈大庆 李云 (116)
- 长吻鮠单核苷酸多态性标记与生长性状关联分析 ····· 李哲 李雨 敬庭森 刘小莉 闫卉果 陆安帅 周剑 罗辉 叶华 (127)
- 半滑舌鳎颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析 ····· 扶晓琴 王娜 王佳林 陈松林 赵法箴 (136)
- 牙鲆半乳糖凝集素 6 基因的克隆、表达及功能研究 ····· 刘晓飞 张爽爽 Endri Hendriansyah 李英瑞 苏琳 李相前 修云吉 顾伟 (147)
- 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼生长性能、体组成及肠道部分生化指标的影响 ····· 王成强 曹体宏 李宝山 王际英 郝甜甜 宋志东 王晓艳 孙永智 (158)
- 不同生物饵料组合对脊尾白虾幼体变态发育的影响 ····· 王林华 沈南南 江海仪 欧阳乐飞 张庆起 胡广伟 王攀攀 高焕 (171)
- 不同浓度亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾生长与免疫功能的影响 ····· 方成 黎兰诗 梁震宇 成良峰 戴习林 (180)
- 颗粒浓度对文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔保留效率的影响 ····· 谢彬 林志华 何琳 (190)
- 2 种塔形马蹄螺肌肉营养成分分析与品质评价 ····· 李晋祯 郑惠娜 任鼎鼎 杨文 曹文红 林海生 秦小明 章超桦 (199)
- 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌头肾转录组分析 ····· 朱鑫海 张紫瑞 周丽颖 汤环宇 敖士齐 周一凡 高晓建 姜群 张晓君 (208)
- 虾肝肠胞虫(EHP)现场快速高灵敏度检测试剂盒的性能评价研究 ····· 李英瑕 徐婷婷 刘爽 万晓媛 张庆利 (218)
- 口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护效果 ····· 王仁宝 王一婷 张惠芬 宋晓玲 万晓媛 谢国驷 史成银 (226)
- 皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白在免疫防御中的作用 ····· 陈钰莹 韩怡静 刘相全 何金霞 杨顶珑 (234)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.43 No.4 August 2022

### Special Topic: Saline-Alkaline Fisheries

- Growth Performance, Blood Parameters, and Texture Characteristics of Juvenile Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) Exposed to Highly Saline-Alkaline Water ..... (1)  
..... LU Guanzheng, YAO Zongli, LAI Qifang, GAO Pengcheng, ZHOU Kai, ZHU Haoyong, LIU Yimeng, SUN Zhen
- Effects of Alkalinity Acclimation on Blood Physiology and Biochemistry and Liver Antioxidant System of Juvenile *Luciobarbus capito* ..... (12)  
..... LI Haitao, XU Wei, ZHAO Zhigang, LUO Liang, LI Mingshuai, LIU Jinyu, WANG Yu, ZHANG Rui, GUO Kun, GENG Longwu, DU Rujun, CONG Yanfeng
- Transcriptomic Analysis of Gene Expression of *Litopenaeus vannamei* during Long-Term Exposure to High Alkaline Water ..... (22)  
..... WANG Xujiang, YAO Zongli, LAI Qifang, YU Mingchao, LI Xincang, GAO Pengcheng, ZHOU Kai, CUI Qingman, LIU Yimeng, SUN Zhen, LI Yan
- Effects of Saline-Alkaline Water Environment on DNA Methylation of *Exopalaemon carinicauda* ..... (33)  
..... QIN Zhen, LI Jitao, LI Mingdong, WANG Jiajia, GE Qianqian, LIU Ping, LI Jian
- The Roles of Aquaporin Gene 4 and 11 of *Exopalaemon carinicauda* under Alkalinity Stress ..... (51)  
..... LI Mingdong, WANG Jiajia, GE Qianqian, QIN Zhen, LIU Ping, LI Jian, LI Jitao
- Body Weight Profile and Proximate Composition of Adult Suifenhe *Eriocheir sensu stricto* ..... (61)  
..... WANG Shihui, LUO Liang, ZHANG Rui, GUO Kun, ZHANG Xubin, KONG Lingjie, ZHAO Zhigang
- Establishment and the Effect of Salinity of Cell Lines Derived from Tail Fin of *Schizothorax biddulphi* ..... (70)  
..... DAI Jincai, NIE Zhulan, ZHAO Nianhua, REN Yongli, WEI Jie

### Research Paper

- Temporal and Spatial Distribution of Antarctic Krill in 48 Fishing Areas Based on Fishery Data ..... (81)  
..... ZHAO Guoqing, LUO Junrong, TANG Fenghua, FAN Wei, SONG Xuefeng, YANG Chao, ZHANG Heng
- Study on the Status of the Early-Stage Fish Resources at Yibin Section in the Upper Reaches of the Yangtze River ..... (93)  
..... LI Xiangyan, TIAN Huiwu, PU Yan, TANG Xiliang, YAN Zhongluan, CHEN Daqing, LIU Shaoping, DUAN Xinbin
- Systematic Classification of Cephalopod Beaks from Stomach Contents of Six Large Marine Predatory Fishes ..... (105)  
..... OU Liguoguo, GU Xinyu, WANG Binyan, LIU Bilin
- Trophic Level of Major Fish Species in the Three Gorges Reservoir Based on Nitrogen Stable Isotope Analysis ..... (116)  
..... HE Chun, DENG Huatang, WANG Guo, LIU Hanwen, SHEN Ziwei, LIU Shaoping, DUAN Xinbin, CHEN Daqing, LI Yun
- Correlation Analysis of SNP Markers and Growth Traits of *Leiocassis longirostris* ..... (127)  
..... LI Zhe, LI Yu, JING Tingsen, LIU Xiaoli, YAN Huiguo, LU Anshuai, ZHOU Jian, LUO Hui, YE Hua
- Characterization and Expression Analysis of *Granzyme B like* Gene in Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) ..... (136)  
..... FU Xiaoqin, WANG Na, WANG Jialin, CHEN Songlin, ZHAO Fazhen
- Cloning, Expression and Function of *Galectin-6* from *Paralichthys olivaceus* ..... (147)  
..... LIU Xiaofei, ZHANG Shuangshuang, HENDRIANSYAH Endri, LI Yingrui, SU Lin, LI Xiangqian, XIU Yunji, GU Wei
- Effects of Fish Oil Replacement by Mixed Microalgae on Growth Performance, Body Chemical Composition and Intestinal Tract Biochemical Indices of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*) ..... (158)  
..... WANG Chengqiang, CAO Tihong, LI Baoshan, WANG Jiying, HAO Tiantian, SONG Zhidong, WANG Xiaoyan, SUN Yongzhi
- Effects of Live Food Combinations on the Metamorphosis and Larval Development of *Exopalaemon carinicauda* ..... (171)  
..... WANG Linhua, SHEN Nannan, JIANG Haiyi, OUYANG Lefei, ZHANG Qingqi, HU Guangwei, WANG Panpan, GAO Huan
- Changes in Immune System and Growth Performance of *Litopenaeus vannamei* after 40-Day Challenge with Different Concentrations of Nitrite ..... (180)  
..... FANG Cheng, LI Lanshi, LIANG Zhenyu, CHENG Liangfeng, DAI Xilin
- Effects of Particle Concentration on the Retention Efficiency of *Meretrix meretrix*, *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes philippinarum* ..... (190)  
..... XIE Bin, LIN Zhihua, HE Lin
- Analysis and Quality Evaluation of Nutrient Components in the Muscles of *Tectus pyramis* ..... (199)  
..... LI Jinzhen, ZHENG Huina, REN Dingding, YANG Wen, CAO Wenhong, LIN Haisheng, QIN Xiaoming, ZHANG Chaohua
- Transcriptomic Analysis of the Head Kidney of *Siniperca chuatsi* Infected with *Aeromonas hydrophila* ..... (208)  
..... ZHU Xinhai, ZHANG Zirui, ZHOU Liying, TANG Huanyu, AO Shiqi, ZHOU Yifan, GAO Xiaojian, JIANG Qun, ZHANG Xiaojun
- Validation of a Highly Sensitive Kit for the Rapid Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Field ..... (218)  
..... LI Yingxia, XU Tingting, LIU Shuang, WAN Xiaoyuan, ZHANG Qingli
- Protective Effects of Oral Specific Egg Yolk Immunoglobulins (IgY) against White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ..... (226)  
..... WANG Renbao, WANG Yiting, ZHANG Huifen, SONG Xiaoling, WAN Xiaoyuan, XIE Guosi, SHI Chengyin
- A Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) from *Haliotis discus hannai*: Possible Roles in Antibacterial Properties ..... (234)  
..... CHEN Yuying, HAN Yijin, LIU Xiangquan, HE Jinxia, YANG Dinglong

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220112002

http://www.yykxjz.cn/

逯冠政, 么宗利, 来琦芳, 高鹏程, 周凯, 朱浩拥, 刘一萌, 孙真. 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 01-11

LU G Z, YAO Z L, LAI Q F, GAO P C, ZHOU K, ZHU H Y, LIU Y M, SUN Z. Growth performance, blood parameters and texture characteristics of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to highly saline-alkaline water. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 01-11

# 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、 血液生理指标与质构特征研究\*



逯冠政<sup>1</sup> 么宗利<sup>2①</sup> 来琦芳<sup>2</sup> 高鹏程<sup>2</sup> 周凯<sup>2</sup>  
朱浩拥<sup>3</sup> 刘一萌<sup>2</sup> 孙真<sup>2</sup>

1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222052;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部低洼盐碱地水产养殖重点实验室  
中国水产科学研究院盐碱水域渔业工程技术研究中心(上海) 上海 200090;
3. 江苏中洋集团股份有限公司 江苏 南通 226000)

**摘要** 盐碱水在世界范围内广泛分布,高碳酸盐碱度、高pH等是盐碱水制约养殖生物生存生长的关键因子。作为潜在的经济养殖对象,大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)已在部分盐碱水域养殖成功,但其对盐碱的适应范围尚不清楚。本文研究了高盐碱环境下大口黑鲈生长性能,测定了大口黑鲈48 h碳酸盐碱度半致死浓度,设置盐水组[SW,盐度为 $7.50\pm 0.07$ ,碳酸盐碱度为 $(1.81\pm 0.12)$  mmol/L]、碱水组[AW,盐度为 $0.35\pm 0.02$ ,碳酸盐碱度为 $(9.96\pm 0.03)$  mmol/L]和淡水对照组[FW,盐度为 $0.13\pm 0.01$ ,碳酸盐碱度为 $(1.82\pm 0.11)$  mmol/L],对比研究大口黑鲈长期盐碱胁迫下生长指标、血液生理指标、肌肉质构特性指标。结果显示,大口黑鲈48 h碳酸盐碱度半致死浓度为 $(29.92\pm 3.90)$  mmol/L,能够在盐度10以下的水环境中安全存活;经过105 d养殖实验,FW、SW以及AW组存活率和终末体重无显著性差异;3组特定生长率(SGR)表现为波动式变化规律,15~45 d、60~75 d时,SGR持续降低,45~60 d、75~90 d时,SGR持续增高;饱满度FW组最高,SW组最低,AW组居中,但均小于3;在碱度为10 mmol/L的水环境中,24 h内血氨变化表现为先升高后降低,最后趋于稳定,在盐度为7的水环境中,渗透压维持在 $(319.53\pm 29.51)$  mOsm/kg,淡水环境下的渗透压维持在 $(300.00\pm 16.44)$  mOsm/kg,均保持较好的存活率;盐碱水养殖大口黑鲈在盐水组表现出较好的肌肉硬度 $[(34.70\pm 4.86)$  N],碱水组则表现出较好肌肉弹性 $[(1.06\pm 0.10)$  mm]。综上所述,大口黑鲈能够适应高盐碱环境,在盐度为7、碱度为10 mmol/L的盐碱水中养殖,并且表现出较好的质构特征。

**关键词** 碳酸盐碱度;盐度;大口黑鲈;生长指标;血氨;质构特性

中图分类号 S965.99 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0001-11

\* 国家重点研发计划(2019YFD0900404)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD52; 2021XT04)共同资助 [This work was supported by National Key Research Program (2019YFD0900404), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institute (2020TD52; 2021XT04)]. 逯冠政, E-mail: gzstable16@163.com

① 通信作者: 么宗利, 研究员, Email: yaozl@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2022-01-12, 收修改稿日期: 2022-03-22

我国拥有广袤的盐碱地资源,面积达  $9.9 \times 10^7 \text{ hm}^2$  (贾恢先, 2003), 绝大多数处于荒芜状态(马晨等, 2010; 王慧等, 2003)。盐碱水具有水化学类型多样、水质缓冲能力差、高 pH 值、高碳酸盐碱度、高离子系数和主要离子比例失衡等特点, 使得大多数水生生物难以适应, 水产养殖产量不稳定(黎道丰等, 2000; 王慧, 2006)。近年来为开发盐碱地养殖潜力, 相关科研院所进行了大量研究探索, 发现了十余种适合盐碱水养殖的水产对象, 包括凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、异育银鲫(*Carassius auratus*)、大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和青蛤(*Cyclina sinensis*)等, 且进行了大规模的养殖(曾凡勇等, 2018; 李明栋等, 2021; 林听听等, 2012; 沈立等, 2014; 王艳玲等, 2021; 张宇婷等, 2021)。但随着盐碱地水产养殖产业的发展, 现有养殖对象不能满足各地区的需求, 需要探索更多优良养殖新对象。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗名加州鲈, 属鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Porcoidei)、太阳鱼科(Ceetrachidae)、黑鲈属(*Micropterus*), 是一种优质的淡水鱼类, 具有适应性强、生长快、易起捕、养殖周期短等优点, 加之肉质鲜美细嫩, 无肌间刺, 外形美观, 受到市场与消费者的欢迎。自 20 世纪 80 年代引进后, 已成为我国淡水养殖业的一种重要经济鱼类(刘家照等, 1990; 谭肖英等, 2005)。大口黑鲈在甘肃、天津等部分盐碱水域养殖成功(臧莉等, 2021; 来琦芳等, 2021), 但其对盐碱的适应范围尚不清楚。

盐碱地水产养殖的 3 个主要限制性因素包括 pH、盐度和碳酸盐碱度, 均会对水生生物的生存与生长造成显著影响。盐度主要通过影响水生生物的渗透调节, 进而影响能量代谢(李希国等, 2006; 王云峰等, 2002)。水环境盐度产生的渗透压与内环境渗透压相近时, 水生生物用于渗透调节的能量消耗较低, 能够提高水生生物的存活率, 促进水生生物的生长, 若环境盐度产生的渗透压远高于或低于内环境渗透压, 水生生物无法适应盐度变化带来的内环境离子变化, 则存活率和增长率会显著下降(黄岫等, 2021; 刘济源等, 2012)。

碳酸盐碱度与 pH 对于水生生物适应盐碱环境的毒害作用是协同的, 二者主要影响水生生物的酸碱调节与氨氮排泄(Wilkie *et al*, 1994、1996)。鱼类通过鳃组织进行气体交换, 最终将体内多余的  $\text{CO}_2$  排出体外, 将水中溶解的  $\text{O}_2$  吸入体内。当水环境中碳酸盐碱度和 pH 升高时, 使鳃组织内外两侧的 pH 梯度差增大,  $\text{H}^+$  外流增多,  $\text{CO}_2$  被过多地携带出鳃组织, 鱼

类血浆 pH 升高, 造成呼吸性碱中毒(Yao *et al*, 2016; Wright *et al*, 1993)。硬骨鱼类体内的蛋白质终产物大多为氨, 包括分子氨和离子氨, 通过与鳃组织边缘的  $\text{H}^+$  结合生成易溶于水的离子氨, 顺着鳃组织两侧离子氨浓度梯度排出体外。当水环境中碳酸盐碱度与 pH 过高时, 鳃组织两侧离子氨浓度梯度缩小甚至倒置, 致使硬骨鱼类氨排泄受阻, 血液中的氨浓度升高, 对机体产生毒害作用等(衣晓飞等, 2017)。

盐度还会影响水产动物肌体的粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和水分等体常规成分(柳旭东等, 2008), 鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)在盐度为 10 的水环境中肌肉脂肪含量显著降低, 胶原蛋白含量显著升高, 肌纤维耐折能力增强(李小勤等, 2007)。随着盐度的升高, 乌鳢(*Channa argus*)肌肉的咀嚼性、硬度和胶黏性均有上升的趋势, 盐水养殖的乌鳢肌肉咀嚼性和硬度显著高于对照组(李小勤等, 2008), 说明盐度可以提升鱼类的肌肉质构特征。通过改变水环境盐度, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的肌肉胶黏性和弹性、咀嚼性均有显著提升(郭振等, 2014)。

为探究高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能和适应能力, 本研究测定了大口黑鲈幼鱼 48 h 碳酸盐碱度半致死浓度, 设置盐水组[SW, 盐度为  $7.50 \pm 0.07$ , 碱度为  $(1.81 \pm 0.12) \text{ mmol/L}$ ]、碱水组[AW, 盐度为  $0.35 \pm 0.02$ , 碱度为  $(9.96 \pm 0.03) \text{ mmol/L}$ ]和淡水对照组[FW, 盐度为  $0.13 \pm 0.01$ , 碱度为  $(1.82 \pm 0.11) \text{ mmol/L}$ ], 对比研究大口黑鲈幼鱼长期在盐碱胁迫下的生长指标、血液氨氮、血浆渗透压、肌肉质构特性指标, 期为盐碱水中大口黑鲈棚塘接力等养殖提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼与暂养条件

实验所用大口黑鲈来自江苏南通繁育场, 规格为  $(15.10 \pm 2.82) \text{ g}$ 、 $(9.02 \pm 0.13) \text{ cm}$  的幼鱼用于生长实验,  $(1.84 \pm 0.70) \text{ g}$ 、 $(2.34 \pm 0.11) \text{ cm}$  的幼鱼用于急性毒性实验, 暂养容器为 1000 L 聚乙烯水缸, 密度为  $500 \text{ ind./m}^3$ 。日换水量为 50%, 养殖用水为曝气 24 h 的过滤自来水(开能 AC/KDF150-1-300)。暂养水温为  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 溶解氧为  $(7.0 \pm 0.5) \text{ mg/L}$ , 氨氮为  $(0.16 \pm 0.02) \text{ mg/L}$ , 亚硝态氮为  $(0.03 \pm 0.01) \text{ mg/L}$ 。每天投喂 1 次, 投喂量为存鱼量总体重的 1%, 饵料为商品配合饲料(东裕丰), 暂养 15 d 后开始实验。

### 1.2 实验设计

**1.2.1 盐度及碳酸盐碱度对大口黑鲈的急性毒性** 根据预实验结果, 盐度梯度设置为 10、12、14 和 16,

实验用盐水使用海水晶(Bluesea 蓝海, 青岛)配制, 使用前曝气 24 h, 淡水组作为对照, 每组 3 个重复, 每个重复投放 16 尾鱼, 实验容器为水量 10 L 的实验缸, 每个缸中配备充气头进行不间断充气, 实验用水为曝气 24 h 的过滤自来水, 水温为(23.2±1.2)℃, 溶解氧为(7.0±0.5) mg/L。实验期间停喂, 每隔 24 h 换水 80%, 每天测量水体温度、溶解氧和盐度, 每 24 h 统计一次大口黑鲈死亡数量, 每 8 h 观察大口黑鲈存活情况, 及时将死鱼捞出。

根据预实验数据结果, 碱度梯度设置为 0、30 (CA30)、35 (CA35)、40 (CA40)和 45 mmol/L (CA45) 5 组, 其中 0 mmol/L 为淡水对照组(FW)。每组 3 个重复, 每个重复投放 20 尾鱼。实验用碱水采用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 按照质量比为 1 : 16.1 配制, 每次换水时收集 2 mL 实验用水测定氨氮浓度, 其他实验条件同盐度急性毒性实验。

### 1.2.2 盐度及碳酸盐碱度对大口黑鲈生长的影响

根据急性毒性实验结果及常见盐碱水盐碱度(胡红浪等, 2021), 以淡水组(FW)作为对照, 设置盐度为 7 (SW), 碳酸盐碱度为 10 mmol/L (AW)的实验水体进行 105 d 生长实验, 每个实验组设置 3 个重复, 每个重复放置 30 尾鱼。实验容器为水量 100 L 聚乙烯水缸, 每个水缸配备充气头不间断充气, 实验用水为曝气 24 h 的过滤自来水。实验开始前, 将大口黑鲈进行盐碱驯化, 首先转移到盐度为 5、碳酸盐碱度为 5 mmol/L 的水体中, 每 24 h 盐度提升 1, 碳酸盐碱度提升 2 mmol/L, 直至暂养水体盐度与碳酸盐碱度达到实验设置浓度。实验用盐水为海水晶(Bluesea 蓝海, 青岛)配制, 实验用碱水采用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 按照质量比 1 : 16.1 配制, 使用前曝气 24 h。水温为(23.2±1.2)℃, 溶解氧为(7.0±0.5) mg/L, 每 24 h 换水 80%, 每日测量水体温度、pH、盐度, 换水前与换水后, 收集 2 mL 水样, 用于检测水体氨氮。虹吸法除去水体中的残饵粪便, 使用管径 15 mm 的塑料软管进行虹吸, 将实验缸底的粪污小心吸出, 直到实验缸剩余 20 L 水, 用水泵将曝气 24 h 实验用水缓慢地加入实验缸底, 期间实验鱼保持平静游泳状态, 直至加水至 100 L 刻度线, 整个过程避免接触实验鱼。采用此换水方法可明显减少实验鱼剧烈运动, 从而避免实验鱼应激。换水后 1 h 投喂存鱼量总体重的 1%配合饲料。每 15 d 实验鱼用麻醉剂 MS-222 麻醉后测量每尾鱼的体长与体重, 实验用麻醉剂为 MS-222 溶液(200 mg/L), 使用 NaHCO<sub>3</sub> 与实验用水将麻醉剂 pH 与盐度调整到与实验水体相同水平。计算存活率(survival rate, SR)、特定生长率(specific growth rate,

SGR)和肥满度(condition factor, CF), 并绘制体长体重拟合曲线, 计算公式如下:

$$SR(\%) = 100 \times \text{存活尾数} / 30$$

$$SGR(\%/d) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

$$CF = 100 \times W_t / L^3$$

式中,  $t$  为养殖时间,  $W_0$  为大口黑鲈幼鱼初始平均体重(g),  $W_t$  为大口黑鲈终末平均体重,  $L$  为大口黑鲈终末平均体长(cm)。

**1.2.3 盐度及碳酸盐碱度对大口黑鲈血气指标的影响** 实验进行到 105 d 时, 每个实验组随机选取 5 尾大口黑鲈, 使用 MS-222 鱼用麻醉剂麻醉后, 在尾端静脉使用肝素锂润湿的注射器抽取 20 μL 血液, 立即离心(4500 r/min, 4℃), 进行渗透压检测; 另取 30 尾大口黑鲈(15.10±2.82) g, 进行 24 h 碱度胁迫, 实验条件与 1.2.2 中碱水组相同, 对照组与淡水组相同, 胁迫期间停喂, 每 6 h 随机抽取 5 尾麻醉, 抽取血液, 立即离心, 取上清液进行血氨的测定。血氨检测使用南京建成血氨试剂盒(A086-1-1), 血浆渗透压使用露点渗透压仪(Vapor Pressure Osmometer-5520, 美国)测量。

**1.2.4 盐度及碳酸盐碱度对大口黑鲈背部肌肉质构特性的影响** 实验进行到 105 d 时, 每个实验组随机选取 5 尾大口黑鲈, 使用 MS-222 鱼用麻醉剂麻醉后, 使用外科手术刀与剪刀取背部一侧肌肉(3.01±0.14) g, 剪去肌肉外皮, 取样肌肉体积尽量相近(2.04±0.12) cm<sup>3</sup>, 取样结束后, 使用 TMS-Pro 质构仪(Food Technology Corporation, 美国)进行肌肉质构特性测定, 测定模式为 TPA 模式, 测试速度为 30 mm/min, 形变量为 50%, 回程距离为 30 mm。

## 1.3 数据分析

统计数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。所有数据符合正态分布, 所有数据均经过方差齐性检验, 显著性水平  $P > 0.05$ , 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析盐度、碳酸盐碱度对存活率以及特定生长率、肥满度、质构特性的影响, 使用 LSD 法进行多重比较, 显著性水平为  $P < 0.05$ , 统计分析使用 SPSS 25.0 软件, 大口黑鲈半致死碱度使用 Proc probit (SAS University Edition)进行统计和计算。

## 2 结果

### 2.1 大口黑鲈碳酸盐碱度及盐度急性毒性

如图 1 所示, 在 48 h, 0~45 mmol/L 碱度范围内,

随着碳酸盐碱度的升高,大口黑鲈的死亡率逐渐升高,对照组死亡率为0%。CA45、CA40处理组的死亡率分别达到(90.00±10.00)%和(86.67±10.40)%,显著高于CA30组(46.67±15.27)%。大口黑鲈48 h碳酸盐碱度半致死浓度为(29.92±3.90) mmol/L。实验期间,淡水组和碱水组的水体氨氮维持在(42.69±7.03)~(14.71±10.01) μmol/L 范围内。

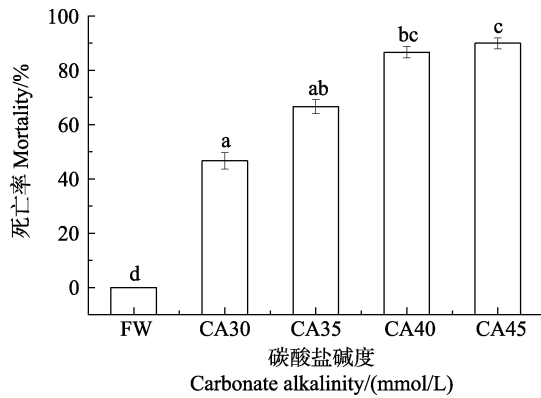


图1 碳酸盐碱度胁迫48 h大口黑鲈死亡率  
Fig.1 Mortality of largemouth bass exposed to carbonate alkalinity stress for 48 h

FW、CA30、CA35、CA40和CA45分别表示淡水组和碳酸盐碱度为30、35、40和45 mmol/L的实验组;

不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

FW, CA30, CA35, CA40, and CA45 represent fresh water group and carbonate alkalinity group of 30, 35, 40, and 45 mmol/L; Different lowercase letters indicate significant differences among each group ( $P < 0.05$ ), the same as below.

如图2所示,在96 h内,随着盐度的上升,大口黑鲈的死亡率有明显升高。对照组死亡率为0,盐度升至14时,大口黑鲈的死亡率为(14.58±3.60)%,显著高于对照组( $P < 0.05$ ),盐度上升至16时,死亡率达到100%,其他盐水组死亡率为0。

## 2.2 盐碱胁迫对大口黑鲈生长性能的影响

**2.2.1 存活率** 如图3所示,经过105 d的盐碱水养殖实验,大口黑鲈AW组平均存活率为(73.33±14.52)%,SW组平均存活率为(90.00±5.77)%,FW组平均存活率为(65.00±22.19)%,3组数据不存在显著差异。

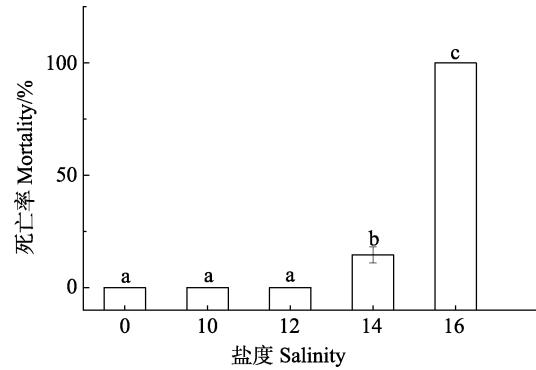


图2 盐度胁迫96 h大口黑鲈死亡率  
Fig.2 Mortality of largemouth bass exposed to salinity stress for 96 h

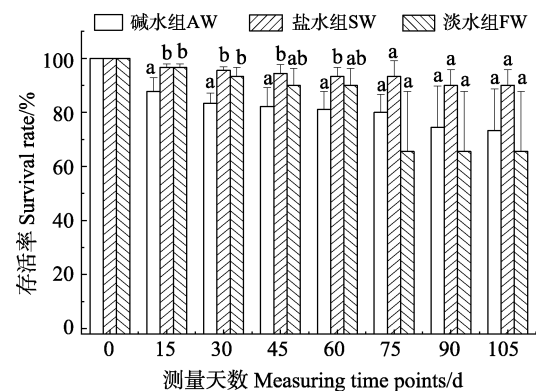


图3 盐碱水养殖大口黑鲈105 d存活率( $n=3$ )  
Fig.3 Survival rate of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d ( $n=3$ )

**2.2.2 平均体重** 如表1所示,在105 d的盐碱水养殖实验中,大口黑鲈的体重呈现出增长的趋势,碱水组、盐水组与对照组的趋势相同,终末体重淡水组>碱水组>盐水组,但组间差异不显著;每个统计周期中,盐水组、碱水组和淡水组的体重也不存在显著差异。

**2.2.3 特定生长率** 如图4所示,特定生长率表现为波动式变化规律。15~45 d和60~75 d阶段,SGR均表现为持续降低。15 d时,SW组SGR(1.68±0.05)%/d显著高于AW组(1.23±0.25)%/d ( $P < 0.05$ ),但与FW组(1.48±0.03)%/d不存在显著差异;45 d时,FW组SGR(0.81±0.10)%/d显著高于AW组(0.53±0.13)%/d,与SW组(0.66±0.11)%/d无显著性差异;45~60 d和75~105 d

表1 大口黑鲈盐碱水养殖实验平均体重

Tab.1 Average body weight of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d (g)

组别 Groups	测量时间 Measuring time							
	0 d	15 d	30 d	45 d	60 d	75 d	90 d	105 d
碱水组 AW	15.52±0.35	19.00±0.63	23.20±0.98	25.70±1.39	29.35±2.25	31.65±2.26	36.88±2.48	44.48±2.38
盐水组 SW	15.12±0.10	19.47±0.26	23.29±0.28	25.73±0.76	29.49±0.75	31.43±1.03	36.46±0.42	43.50±0.85
淡水组 FW	15.16±0.28	18.93±0.36	22.27±0.83	25.13±0.82	30.62±0.47	31.76±0.95	39.05±2.38	47.10±3.34

阶段, SGR 呈上升趋势。60 d 时, FW 组 SGR ( $1.32 \pm 0.13$ )/d 显著高于 AW 组 ( $0.87 \pm 0.13$ )/d 和 SW 组 ( $0.91 \pm 0.03$ )/d, SW 组与 AW 组之间不存在显著差异。90 d 时, FW 组 SGR ( $1.37 \pm 0.21$ )/d 显著高于 AW 组 ( $0.91 \pm 0.21$ )/d 与 SW 组 ( $0.99 \pm 0.14$ )/d, SW 组与 AW 组之间不存在显著差异, 其余时间各组之间不存在显著差异。

**2.2.4 体长体重拟合曲线** 如图 5 所示, 体长体重拟合曲线  $a$  值 AW 组 < FW 组 < SW 组,  $b$  值 SW 组 < AW 组 < FW 组。其中 AW 组  $b$  值接近 3, 体长体重接近等速增长。FW 与 AW 均不等于 3, 体长体重异速增长。

**2.2.5 肥满度** 如图 6 所示, 大口黑鲈盐碱水养殖实验肥满度变化趋势与特定生长率相似, 在数值上呈现波动式变化; 105 d 实验结束时, AW 组肥满度为  $2.28 \pm 0.07$ , SW 组为  $2.17 \pm 0.03$ , FW 组为  $2.41 \pm 0.08$ , FW 组显著高于 SW 组, 与 AW 组没有显著差异, AW 组与 SW 组不存在显著差异; 结合数据来看, 淡水环境下饲养的大口黑鲈肥满程度较高, 盐水环境下大口黑鲈肥满度较低。

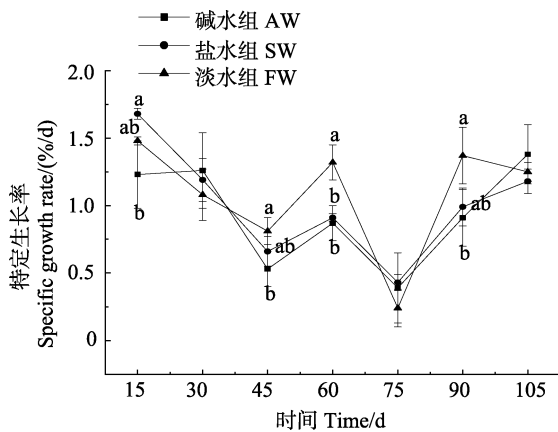


图 4 大口黑鲈盐碱水养殖实验体重特定生长率  
Fig.4 Specific growth rate of body weight of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d

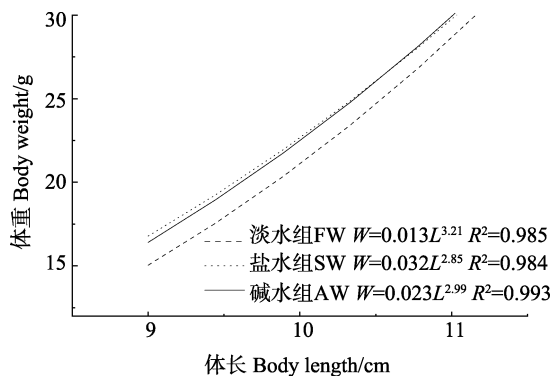


图 5 大口黑鲈盐碱水养殖实验体长体重拟合曲线  
Fig.5 Fitting curve between weight and length of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d

### 2.3 盐碱胁迫对大口黑鲈血浆渗透压和血氨的影响

**2.3.1 盐碱胁迫对大口黑鲈血浆渗透压的影响** 如图 7 所示, 养殖 105 d 的大口黑鲈 SW 组血浆渗透压为 ( $319.53 \pm 29.51$ ) mOsm/kg, FW 组为 ( $300.00 \pm 16.44$ ) mOsm/kg, AW 组为 ( $302.00 \pm 26.21$ ) mOsm/kg, SW 组血浆渗透压显著高于 FW 组, 与 AW 组之间不存在显著差异, FW 组与 AW 组之间不存在显著差异。

**2.3.2 24 h 碱水组大口黑鲈血液氨氮浓度变化** 如图 8 所示, 在 24 h 内, 在碳酸盐碱度为 10 mmol/L 的水环境中, 大口黑鲈血氨浓度呈现先升高后降低最后稳定的趋势, 在 18 h 时血氨浓度达到最高 ( $387.79 \pm 140.21$ )  $\mu\text{mol/L}$ 。淡水组保持较低水平, 最低为 6 h 时 ( $128.16 \pm 45.28$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 最高为 18 h 时  $198.82 \mu\text{mol/L}$ 。碱水组血氨浓度在 6、12、18 和 24 h 时均显著高于对照组。

### 2.4 盐度及碳酸盐碱度对大口黑鲈背部肌肉质构特性的影响

如表 2 所示, SW 组背部肌肉硬度显著高于 FW

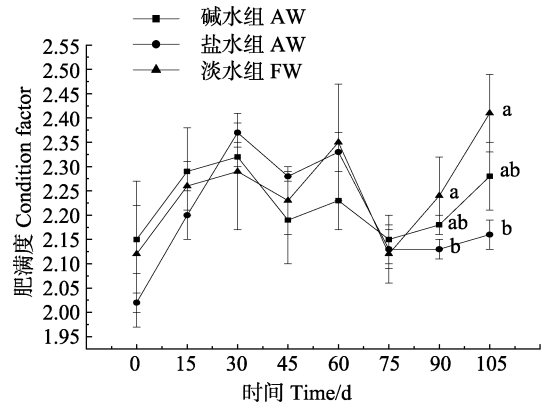


图 6 大口黑鲈盐碱水养殖实验肥满度  
Fig.6 Condition factor of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d

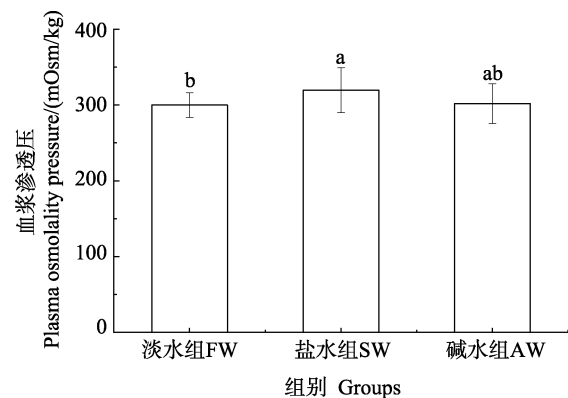


图 7 盐度与碳酸盐碱度对大口黑鲈血浆渗透压的影响  
Fig.7 Plasma osmolality of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d



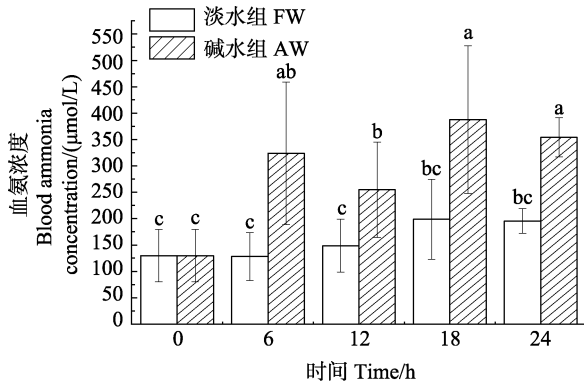


图8 碱度胁迫下大口黑鲈 24 h 血氨浓度变化  
Fig.8 Variation of blood ammonia concentration of largemouth bass exposed to alkaline water for 24 h

组与 AW 组( $P<0.05$ )。FW 组与 SW 组背部肌肉黏附性显著高于 AW 组( $P<0.05$ )。SW 组背部肌肉黏附伸长度显著高于 FW 组与 AW 组( $P<0.05$ )。SW 组背部肌肉弹性显著低于 FW 组与 AW 组( $P<0.05$ )。SW 背部肌肉胶黏性显著高于 AW( $P<0.05$ )。FW 背部肌肉咀嚼性显著高于 SW 组( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 盐碱胁迫对大口黑鲈生长性能的影响

本研究中,大口黑鲈在碳酸盐碱度为 10 mmol/L、盐度为 7 的水环境中养殖成活率达到 73%~90%, 体重增长方式与淡水组类似呈现波动式差异, 最终平均体重与淡水组不存在显著差异, 表现出较好的生长性能, 但在 15~45 d、60~75 d 期间出现特定生长率低于淡水组的现象, 这与盐度和碳酸盐碱度影响鱼类代谢

耗能相关。养殖水环境中的盐度与碳酸盐碱度能够影响鱼类的渗透调节与氨氮代谢等生理过程, 使得鱼类用于渗透调节和氨氮代谢的能量需求升高, 与淡水环境相比, 鱼类可用于生长的能量减少。大部分淡水鱼类在较高盐度的水体中表现出生长受到抑制的现象, 比如欧亚鲈鱼(*Perca fluviatilis* L.)可以在盐度 0~4 的水环境中获得最佳的生长率和存活率, 当养殖环境盐度超过 4 以后, 会对欧亚鲈鱼的生长率和存活率产生显著影响, 水环境盐度为 10 时, 欧亚鲈鱼的存活率、生长率降低至 50% (Overton *et al.*, 2008); 盐度在 0.3~3 之间提升, 可提高鲤鱼幼鱼和卵的成活率和生长率, 但在盐度 14 时, 鲤鱼幼鱼出现成活率下降, 生长率降低的情况(Lam *et al.*, 1985)。高碱胁迫下鱼类通常表现为养殖成活率低、生长速度慢, 比如大鳞鲃幼鱼特定生长率与饵料转化率在碳酸盐碱度高于 25.10 mmol/L 的水环境中显著下降, 碱度升高至 39.80 mmol/L 时, 大鳞鲃幼鱼生长受到抑制(党云飞等, 2013); 咸海卡拉白鱼(*Chalcalburnus chalcoides aralensis*)的增重率在碳酸盐碱度为 32.20 mmol/L 的水环境受到抑制, 60 d 后死亡率达到 5%, 碱度上升至 44.98 mmol/L, 12 d 死亡率达 100%(蔺玉华等, 2004); 杂交鲟(*Huso dauricus* ♀ × *Acipenser schrenckii* ♂)在水环境中的死亡率与碱度呈正相关, 水环境碱度越低, 杂交鲟死亡率越低, 碱度升高至 16.67 mmol/L 时, 死亡率达到 87.4%(王念民等, 2022)。本实验盐度接近大口黑鲈血浆渗透压, 且盐水环境与淡水环境相比更不易出现病害, 大口黑鲈表现出较好的生长性能。本实验发现的盐碱水养殖大口黑鲈波动式生长性能, 为养殖策略的制定提供了依据。

表 2 盐度和碳酸盐碱度对大口黑鲈背部肌肉质构特征的影响

Tab.2 The texture characteristics of the back muscles of largemouth bass exposed to saline-alkaline water for 105 d

组别 Group	硬度 Hardness /N	黏附性 Adhesiveness /(N/mm)	黏附伸长度 Stringiness length/mm	内聚性 Cohesiveness	弹性 Springiness /mm	胶黏性 Gumminess /N	咀嚼性 Chewiness /mJ
碱水组 AW	17.90±5.56 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>b</sup>	0.51±0.01 <sup>b</sup>	0.24±0.02	1.06±0.10 <sup>a</sup>	4.74±1.75 <sup>ab</sup>	5.12±2.22 <sup>ab</sup>
盐水组 SW	34.70±4.86 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.84±0.19 <sup>a</sup>	0.20±0.00	0.62±0.10 <sup>b</sup>	7.18±1.53 <sup>a</sup>	4.44±0.91 <sup>b</sup>
淡水组 FW	24.87±4.09 <sup>b</sup>	0.30±0.02 <sup>a</sup>	0.52±0.04 <sup>b</sup>	0.22±0.05	1.19±0.16 <sup>a</sup>	5.83±0.55 <sup>a</sup>	6.98±1.28 <sup>a</sup>

注: 同列数据肩标字母不同表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different superscripts letters in each column indicate significant difference among each group ( $P<0.05$ ).

#### 3.2 盐碱胁迫对大口黑鲈生理指标的影响

经过 105 d 的盐度、碱度水环境胁迫, 大口黑鲈表现出较强的盐碱耐受性, 盐水组血浆渗透压与淡水组相比有显著的上升, 为(319.53±29.51) mOsm/kg,

但上升幅度较小, 仅为淡水组的 6.3%; 碱水组在 24 h 内的血氨变化趋势为先升高再降低, 最后趋于稳定, 且高于淡水组, 结合存活率和生长率表现来看, 大口黑鲈已经适应了这些环境变化。盐度升高会直接导致鱼类渗透调节与离子调节失衡, 淡水鱼类通常通过改

变血浆渗透压等途径来适应水环境盐度的升高(Evans, 2010)。在 96 h, 盐度为 10 的盐胁迫实验中, 尼罗罗非鱼血清渗透压稳定在 380 mOsm/kg 附近, 高于淡水组的 312 mOsm/kg (赵丽慧等, 2014); 在 14 d、盐度为 10 的盐度胁迫实验中, 日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)血清渗透压稳定在 340 mOsm/kg 附近, 与等渗点渗透压 329.1 mOsm/kg 接近(夏保密等, 2016); 史氏鲟(*Acipenser schrenckii*) 在盐度 10 的水环境中, 渗透压稳定在 290 mOsm/kg 左右, 高于淡水组的 262 mOsm/kg (赵峰等, 2006)。

碳酸盐碱度的升高带来的 pH 值升高会抑制鱼类的酸碱调节和氨氮排泄(Randall *et al.*, 1989; Whittamore, 2012); 氨氮排泄受到抑制时, 表现为血氨持续升高, 到达临界值后会对鱼体产生严重的毒害作用(Michael *et al.*, 1996), 某些鱼类能够调节氨排泄减少毒害作用, 比如在高碱胁迫下青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)氨氮排泄率起初受到抑制, 但在 96 h 内经过重建氨分压梯度恢复对氨的排泄(衣晓飞等, 2017)。在本研究中, 大口黑鲈血浆氨氮浓度变化说明碳酸盐碱度与 pH 的变化影响了大口黑鲈的正常氨排泄过程, 使得氨排泄效率下降, 但其血氨浓度在 24 h 内恢复, 表现一定的氨排泄调控能力。

血浆渗透压与血浆氨氮浓度变化说明, 在本实验设定盐碱环境的胁迫下, 大口黑鲈可调节离子调控和氨氮排泄, 进而适应盐碱环境。这 2 个血液生理指标为判断鱼类对盐碱环境的适应程度, 筛选耐盐碱品种提供理论依据。

### 3.3 盐碱胁迫对大口黑鲈质构特征的影响

在本研究中, 盐度与碳酸盐碱度对大口黑鲈肌肉质构的影响表现为盐水组硬度、黏附性、胶黏性高于淡水组, 碱水组弹性高于盐水组、与淡水组无差别。质构是指由食品成分和组织结构决定的机械学或流变学性质, 包括硬度、胶黏性、内聚性、咀嚼性、弹性, 是评价肉类鲜度与感官品质的关键指标(刘婧懿等, 2020)。李小勤等(2008)研究发现, 当盐度从 0 逐步上升值 10 时, 乌鳢肌肉的咀嚼性、硬度出现先下降后上升的趋势, 盐度为 10 时, 肌肉的咀嚼性均高于对照组。通过改变水体盐度, 发现随着盐度的提升, 吉富罗非鱼的咀嚼性有上升的趋势, 硬度也会随着盐度的上升而上升, 处理时间延长, 硬度提升越明显(郭振等, 2014)。斑节对虾(*Penaeus monodon*)的肌肉硬度、咀嚼性随养殖水环境的盐度上升呈现出增高趋势, 硬度和咀嚼性在各组间均达到极显著差异水平(周伟等, 2018)。本研究结果说明, 盐碱水养殖大口

黑鲈表现出较好的质构特征, 进而提高其经济价值, 为评价盐碱水养殖对象品质提供参考。

## 4 结论

经过 105 d 的盐碱水养殖实验, 大口黑鲈在盐碱水中表现出较好的生长性能, 淡水组、碱水组和盐水组存活率无显著差异, 3 组终末平均体重无显著差异, 特定生长率在 105 d 中表现为波动式变化, 肥满度淡水组最高, 盐水组最低, 碱水组居中, 但均小于 3。

大口黑鲈具有较强的盐碱耐受性, 在碱水环境中, 24 h 内血氨变化表现为先升高后降低, 最后趋于稳定; 在盐水环境中, 渗透压表现为小幅度上升, 最终维持在(319.53±29.51) mOsm/kg。

盐碱水养殖大口黑鲈具有更好的质构特征, 在盐水组表现出较好肌肉硬度(34.70±4.86) N, 碱水组表现出较好肌肉弹性(1.06±0.10) mm。

## 参 考 文 献

- DANG Y F, XU W, GENG L W, *et al.* Effects of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> on growth and gill microstructure in juvenile *Barbus capito*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 577-584 [党云飞, 徐伟, 耿龙武, 等. NaCl 盐度和 NaHCO<sub>3</sub> 碱度对大鳞鲃幼鱼生长及鳃组织特征的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 577-584]
- EVANS D H. A brief history of fish osmoregulation: The central role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory. *Frontiers in Physiology*, 2010, 1(13): 1-10
- GUO Z, LIANG Y J, YANG G. The effects of salinity changes on the nutritional value and flavor of GIFT's muscle. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(4): 77-82 [郭振, 梁拥军, 杨广. 改变水体盐度对吉富罗非鱼肌肉营养和呈味的影响. *淡水渔业*, 2014, 44(4): 77-82]
- HU H L, LAI Q F, YAO Z L, *et al.* Green technology and model of saline-alkaline aquaculture. Beijing: China Agriculture Press, 2021, 1-111 [胡红浪, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式. 北京: 中国农业出版社, 2021, 1-111]
- HUANG S, LI C Z, LI Z X, *et al.* Effects of different salinity on growth and osmotic regulation gene expression of *Gymnocypris przewalskii*. *Fisheries Science*, 2021, doi: 10.16378/j.cnki.1003-1111.21077 [黄岫, 李长忠, 李梓瑄, 等. 盐度对青海湖裸鲤生长及渗透调节基因的影响. *水产科学*, 2021, doi: 10.16378/j.cnki.1003-1111.21077]
- JIA H X. Soil salinization control and sustainable agriculture in north-west endoland region of China. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(6): 1063-1068 [贾恢先. 中国西北内陆盐渍化防治与可持续农业的研究. *西北植物学报*, 2003, 23(6): 1063-1068]

- LAI Q F, YAO Z L, GAO P C, *et al.* Saline-alkaline water environment and farming species. Beijing: China Agriculture Press, 2021, 1–40 [来琦芳, 么宗利, 高鹏程, 等. 盐碱水环境与增养殖种类. 北京: 中国农业出版社, 2021, 1–40]
- LAM T J, SHARMA R. Effects of salinity and thyroxine on larval survival, growth and development in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 1985, 44(3): 201–212
- LI D F, CAI Q H. Comparison of fish flora in waters with different salinity and the growth of main commercial fishes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(5): 493–501 [黎道丰, 蔡庆华. 不同盐碱度水体的鱼类区系结构及主要经济鱼类生长的比较. *水生生物学报*, 2000, 24(5): 493–501]
- LI M D, LI J T, SHI K P, *et al.* Estimation of heritability and genetic correlation of saline-alkali tolerance in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 117–123 [李明栋, 李吉涛, 史鲲鹏, 等. 脊尾白虾耐盐碱性状遗传力和遗传相关的估计. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 117–123]
- LI X G, LI J E, OU Y J. Effects of salinity on digestive enzyme activity and diurnal variation of digestive enzyme activity of young yellowfin black porgy *Sparus latus*. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 40–45 [李希国, 李加儿, 区又君. 盐度对黄鳍鲷幼鱼消化酶活性的影响及消化酶活性的昼夜变化. *海洋水产研究*, 2006, 27(1): 40–45]
- LI X Q, LI X X, LENG X J, *et al.* Effect of different salinities on growth and flesh quality of *Ctenopharyngodon idell*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(3): 343–348 [李小勤, 李星星, 冷向军, 等. 盐度对草鱼生长和肌肉品质的影响. *水产学报*, 2007, 31(3): 343–348]
- LI X Q, LIU X M, LENG X J, *et al.* Effect of salinity on growth and flesh quality of snakehead *Channa argus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(5): 505–510 [李小勤, 刘贤敏, 冷向军, 等. 盐度对乌鳢(*Channa argus*)生长和肌肉品质的影响. *海洋与湖沼*, 2008, 39(5): 505–510]
- LIN T T, LAI Q F, LU J X, *et al.* Toxic effects of several saline-alkali factors on *Cyclina sinensis*. *Marine Fishery*, 2012, 34(2): 183–188 [林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 几种盐碱因子对青蛤的致毒效应. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 183–188]
- LIN Y H, GENG L W, LU J X, *et al.* Studies on tolerance of *Chalcalburnus chalcoides aralensis* to salinity and alkalinity. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2004, 26(5): 561–565 [蔺玉华, 耿龙武, 卢金星, 等. 咸海卡拉白与对盐碱耐受性研究. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(5): 561–565]
- LIU J Y, YAO Z L, LAI Q F, *et al.* Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii*. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(3): 664–669 [刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响. *生态学杂志*, 2012, 31(3): 664–669]
- LIU J Y, ZHAO Q C, CHENG S F, *et al.* Research progress on the influencing factors and determination methods of fish muscle texture. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(9): 3035–3043 [刘婧懿, 赵前程, 程少峰, 等. 鱼肉质构的影响因素及测定方法研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(9): 3035–3043]
- LIU J Z, XIAN C B, YE X, *et al.* Artificial reproduction and embryonic development of largemouth bass. *Freshwater Fisheries*, 1990(1): 15–16 [刘家照, 洗焯彬, 叶星, 等. 大口黑鲈人工繁殖和胚胎发育. *淡水渔业*, 1990(1): 15–16]
- LIU X D, ZHANG L M, WANG J Y, *et al.* The influence of salinity on the body composition and tissue structure of aquatic animals. *Animals Breeding and Feed*, 2008(9): 60–64 [柳旭东, 张利民, 王际英, 等. 盐度对水产动物体组成与组织结构的影响. *养殖与饲料*, 2008(9): 60–64]
- MA C, MA F Y, LIU T X, *et al.* Research progress on improvement and utilization technology of saline-alkali land. *World Forestry Research*, 2010, 23(2): 28–32 [马晨, 马履一, 刘太祥, 等. 盐碱地改良利用技术研究进展. *世界林业研究*, 2010, 23(2): 28–32]
- MICHAEL P W, CHRIS M W. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 113(4): 665–673
- OVERTON J L, BAYLEY M, PAULSEN H, *et al.* Salinity tolerance of cultured Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L.: Effects on growth and on survival as a function of temperature. *Aquaculture*, 2008, 277(3): 282–286
- RANDALL D J, WOOD C M, PERRY S F, *et al.* Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment. *Nature*, 1989, 337(6203): 165–166
- SHEN L, HAO Z R, ZHOU K, *et al.* Tolerability studies of *Carassius auratus gibelio* to salinity and carbonate alkalinity. *Marine Fisheries*, 2014, 36(5): 445–452 [沈立, 郝卓然, 周凯, 等. 异育银鲫“中科三号”对盐度和碳酸盐碱度的耐受性. *海洋渔业*, 2014, 36(5): 445–452]
- TAN X Y, LIU Y J, TIAN L X, *et al.* The effects of dietary carbohydrate levels on the growth, nutrient composition of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(z1): 258–263 [谭肖英, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饲料中碳水化合物水平对大口黑鲈 *Micropterus salmoides* 生长、鱼体营养成分组成的影响. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(z1): 258–263]
- WANG H, LAI Q F, FANG W H. The influence of saline-alkaline water resources on fishery development in Yundong area of Cangzhou. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 16–18 [王慧, 来琦芳, 房文红. 沧州运东地区盐碱水资源对开展渔业的影响. *河北渔业*, 2003(5): 16–18]
- WANG H. One hundred technical questions and answers about aquaculture in saline-alkaline land ( I ). *Hebei Fisheries*, 2006(2): 27–28 [王慧. 盐碱地水产养殖技术 100 问(一). *河北渔业*, 2006(2): 27–28]
- WANG N M, YANG H L, FENG C J, *et al.* Effects of different

- carbonate alkalinity on survival, growth and biochemical indexes in serum of three-month-old hybrid sturgeon (*Huso dauricus*♀ × *Acipenser schrenckii*♂). Journal of Shanghai Ocean University, 2022, doi: 10.12024/jsou.20210603495 [王念民, 杨合霖, 丰超杰, 等. 碳酸盐碱度对3月龄杂交鲟(*Huso dauricus*♀ × *Acipenser schrenckii*♂)生长与血清生化指标的影响. 上海海洋大学学报, 2022, doi: 10.12024/jsou.20210603495]
- WANG Y F, ZHU X H. A review on impact of salinity on patterns of fish ecophysiology. Studia Marina Sinica, 2002(44): 151–158 [王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响. 海洋科学集刊, 2002(44): 151–158]
- WANG Y L, ZHAO Y, CHEN M, *et al.* Study on carbonate alkalinity tolerance of Nile tilapia. South China Fisheries Science, 2021, 17(5): 71–78 [王艳玲, 赵岩, 陈铭, 等. 尼罗罗非鱼对碳酸盐碱度耐受性研究. 南方水产科学, 2021, 17(5): 71–78]
- WHITTAMORE J M. Osmoregulation and epithelial water transport: Lessons from the intestine of marine teleost fish. Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systems and Environmental Physiology, 2012, 182(1): 1–39
- WILKIE M P, WOOD C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Comparative Biochemistry, 1996, 113(4): 665–673
- WILKIE M P, WRIGHT P A, IWAMA G K, *et al.* The physiological adaptations of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) following transfer from well water to the highly alkaline waters of Pyramid Lake, Nevada (pH 9.4). Physiological Zoology, 1994, 67(2): 355–380
- WRIGHT P A, IWAMA G K, WOOD C M. Ammonia and urea excretion in Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) adapted to the highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4). Journal of Experimental Biology, 1993, 175: 153–172
- XIA B M, HOU J L, ZHAO F, *et al.* Effect of salinity on osmoregulation of *Anguilla japonica*. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(8): 2182–2188 [夏保密, 侯俊利, 赵峰, 等. 盐度对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)渗透压调节的影响. 生态学杂志, 2016, 35(8): 2182–2188]
- YAO Z L, GUO W F, LAI Q F, *et al.* *Gymnocypris przewalskii* decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline Lake Qinghai. Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systems and Environmental Physiology, 2016, 186(1): 83–59
- YI X F, LAI Q F, SHI J Q, *et al.* Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 681–689 [衣晓飞, 来琦芳, 史建全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681–689]
- ZANG L, ZHENG Y K, ZHONG W H, *et al.* Key points of aquaculture technology in saline-alkaline water ponds in Tianjin. China Fisheries, 2021(3): 91–92 [臧莉, 郑艳坤, 钟文慧, 等. 天津地区盐碱水池塘水产养殖技术要点. 中国水产, 2021(3): 91–92]
- ZENG F Y, LUO K, LUAN S, *et al.* Analysis of growth and survival among different families of *Litopenaeus vannamei* in the chloride typed alkaline water. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 308–315 [曾凡勇, 罗坤, 栾生, 等. 凡纳滨对虾在氯化物型盐碱水养殖环境下不同家系间生长、存活性能分析. 中国水产科学, 2018, 25(2): 308–315]
- ZENG F Y, LUO K, LUAN S, *et al.* The influence of salinity acclimation on activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in branchial epithelium concentration of ions and osmolarity in serum of *Acipenser schrenckii*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 444–449 [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度驯化对史氏鲟鳃  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响. 水产学报, 2006, 30(4): 444–449]
- ZHANG Y T, YANG J, GENG L W, *et al.* Effect of  $\text{NaHCO}_3$  alkalinity on oxidative stress of *Luciobarbus capito*. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2021, 51(11): 32–39 [张宇婷, 杨建, 耿龙武, 等.  $\text{NaHCO}_3$  碱度胁迫对大鳞鲃氧化应激水平的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(11): 32–39]
- ZHAO L H, ZHAO J L, THAMMARATSUNTORN J, *et al.* Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696–1704 [赵丽慧, 赵金良, Thammaratsuntorn Jeerawat, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响. 水产学报, 2014, 38(10): 1696–1704]
- ZHOU W, WANG Y, SUN X L, *et al.* Effect of stocking salinity on muscle quality of *Penaeus monodon*. Food Research and Development, 2018, 39(22): 7–14 [周伟, 王洋, 孙学亮, 等. 养殖盐度对斑节对虾肌肉品质的影响. 食品研究与开发, 2018, 39(22): 7–14]

## Growth Performance, Blood Parameters, and Texture Characteristics of Juvenile Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) Exposed to Highly Saline-Alkaline Water

LU Guanzheng<sup>1</sup>, YAO Zongli<sup>2</sup>Ⓛ, LAI Qifang<sup>2</sup>, GAO Pengcheng<sup>2</sup>, ZHOU Kai<sup>2</sup>,  
ZHU Haoyong<sup>3</sup>, LIU Yimeng<sup>2</sup>, SUN Zhen<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Ocean University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang, Jiangsu 222052, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Saline-Alkaline Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Saline-Alkaline Water Fisheries Engineering Technology Research Center (Shanghai), Shanghai 200090, China; 3. Jiangsu Zhongyang Group Co., Ltd, Nantong, Jiangsu 226000, China)

**Abstract** The total saline-alkaline land area in China is approximately 99.1 million hectares, distributed throughout northern China, coastal areas, and areas along the bank of the Yellow River. About 45.9 million hectares of saline-alkaline water areas are distributed around these lands, most of which are athalassic saline water characterized by high pH and high carbonate alkalinity concentrations with various types of ion imbalances. The co-effect of high pH and high carbonate alkalinity would directly lead to the respiratory alkalosis of aquatic organisms. High pH affects the excretion of ammonia, resulting in increased blood ammonia and acid-base imbalance. High ionic coefficient affects the osmotic regulation and breaks the ion balance in aquatic organisms. Thus, saline-alkaline water has not been fully used because of its stressful environmental characteristic. Currently, the lack of suitable objects for the saline-alkaline aquaculture restricts the development of the aquaculture industry on saline-alkaline land. Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is a potential economic target that has been successfully farmed in some saline-alkaline waters. However, largemouth bass's tolerance range and response mechanism to saline-alkaline water are still unclear. This study evaluated the growth performance of juvenile largemouth bass in a saline-alkaline environment to propose excellent farming species for saline-alkaline aquaculture. First, the juvenile largemouth bass response to 48 h carbonate alkalinity and 96 h semi-lethal salinity was determined. Hereafter, the saltwater group [SW, salinity of  $7.50\pm 0.07$ , and carbonate alkalinity of  $(1.81\pm 0.12)$  mmol/L], alkaline water group [AW, salinity of  $0.35\pm 0.02$ , and carbonate alkalinity of  $(9.96\pm 0.03)$  mmol/L], and freshwater control group [FW, salinity of  $0.13\pm 0.01$ , and carbonate alkalinity of  $(1.82\pm 0.11)$  mmol/L] were set to comparatively study the growth parameters, physiology parameters, and muscle texture characteristic indexes of largemouth bass under long-term saline-alkaline stress. For the growth experiment, largemouth basses were acclimated to and reared in FW, SW, and AW conditions for 105 days. Triplicate of 30 individuals each were set for each condition using an experimental plastic tank with 100 L of water. Each fish's body length and weight were measured every 15 days after being anesthetized with MS-222. For the physiology parameters study, five largemouth basses were randomly selected from each group at the end of the growth experiment. The fish were anesthetized with MS-222 to draw 20  $\mu$ L of blood from the tail vein using a syringe moistened with lithium heparin, which was immediately centrifugated to measure osmolality. Another 30 largemouth basses were taken and subjected to 24 h carbonate alkalinity stress. The experimental conditions were the same as AW group, and the control group was the same as FW group. During the stress period, feeding was stopped, and blood was

Ⓛ Corresponding author: YAO Zongli, E-mail: yaozl@ecs.f.ac.cn

drawn from five randomly selected fish every 6 h and centrifuged immediately to determine blood ammonia (blood ammonia kit A086-1-1 by Nanjing Jiancheng). Plasma osmolality was measured using an osmometer (Wescor Vapro 5520 Vapor Pressure Osmometer, USA). For the muscle texture characteristic index study, five largemouth basses were randomly selected from each group at the end of the growth experiment. After being anesthetized with MS-222, the muscles on the fish's backside ( $3.01 \pm 0.14$ ) g were taken by using a surgical scalpel and scissors, the muscles' outer skin was cut off, and the sampled muscle sizes were standardized to  $(2.04 \pm 0.12)$  cm<sup>3</sup>. After sampling, the TMS-Pro texture analyzer (Food Technology Corporation, USA) was used to measure the muscle texture characteristics, employing the TPA mode, test speed of 30 mm/min, deformation amount of 50%, and return distance of 30 mm. The results showed that in the 48 h carbonate alkalinity group, the semi-lethal concentration was  $(29.92 \pm 3.90)$  mmol/L, while the fish could survive safely in water with salinity below 10 mmol/L. After 105 days of farming, there are no significant differences in the survival rate and final weight among different groups, in which the specific growth rate (SGR) showed a regular variation. During 15~45 days and 60~75 days, SGR decreased continuously, while it increased during 45~60 days and 75~90 days. The condition factors of the largemouth bass were less than 3 in all groups, with an increase from FW to AW and from AW to SW groups. In the AW group, the blood ammonia within 24 h showed an increase, then a decreased, and finally stabilized. In the SW group, the osmolality was  $(319.53 \pm 29.51)$  mOsm/kg, lower than the  $(300.00 \pm 16.44)$  mOsm/kg observed for the FW group. Largemouth bass raised in saline-alkaline water had better texture characteristics. Largemouth bass raised in SW group had a higher muscle hardness of  $(34.70 \pm 4.86)$  N, while a higher springiness of  $(1.06 \pm 0.10)$  mm was observed in the AW group. In summary, the largemouth bass could adapt to the relatively high saline-alkaline environment and be cultured in typical saline-alkaline water with pH from 8.84 to 8.89, carbonate alkalinity from 9.89 to 10.31 mmol/L, salinity from 6.68 to 7.21, showing good muscle quality characteristics with high muscle hardness and springiness. The success of largemouth bass in saline-alkaline water aquaculture has provided an opportunity to promote the aquaculture of this fish in a saline-alkaline stressful environment, providing the theoretical basis for the mechanisms involved in this adaptation process. Our study will broaden the scope of aquaculture in saline-alkaline water, improving the economic benefits and providing the basic parameters for the quality evaluation of fish in saline-alkaline fisheries.

**Key words** Carbonate alkalinity; Salinity; Largemouth bass; Growth index; Blood ammonia; Texture characteristics

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210712001

http://www.yykxjz.cn/

李海涛, 徐伟, 赵志刚, 罗亮, 李明帅, 刘金雨, 王雨, 张瑞, 郭坤, 耿龙武, 杜汝君, 丛艳峰. 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼血液生理生化及肝脏抗氧化系统的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 12–21

LI H T, XU W, ZHAO Z G, LUO L, LI M S, LIU J Y, WANG Y, ZHANG R, GUO K, GENG L W, DU R J, CONG Y F. Effects of alkalinity acclimation on blood physiology and biochemistry and liver antioxidant system of juvenile *Luciobarbus capito*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 12–21

## 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼血液生理生化 及肝脏抗氧化系统的影响\*



李海涛<sup>1,2</sup> 徐伟<sup>2①</sup> 赵志刚<sup>2①</sup> 罗亮<sup>2</sup> 李明帅<sup>2,3</sup> 刘金雨<sup>1,2</sup>  
王雨<sup>1,2</sup> 张瑞<sup>2</sup> 郭坤<sup>2</sup> 耿龙武<sup>2</sup> 杜汝君<sup>4</sup> 丛艳峰<sup>4</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所  
黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增殖重点开放实验室 黑龙江 哈尔滨 150070;

3. 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 杜尔伯特蒙古族自治县水产总站 黑龙江 大庆 166200)

**摘要** 为了从血液生理生化、肝脏抗氧化应激等方面研究大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)对碱度驯化的生理适应性变化,选择体重为(13.66±1.26) g的大鳞鲃幼鱼开展 NaHCO<sub>3</sub> 碱度适应性驯化实验,空白组一直处于淡水中养殖,驯化组经 20 mmol/L 的碱度适应性驯养 7 d 后再放入 40 mmol/L 的碱度水体中,未驯化组直接放入 40 mmol/L 的碱度水体中,测定并比较了鱼体放入 40 mmol/L 碱度水体中第 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、96 h、7 d 幼鱼血液生理生化指标和肝组织抗氧化系统相关指标变化。结果显示,驯化组和未驯化组鱼体的血液渗透压、白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、血红蛋白、红细胞、血小板、尿素、白蛋白含量和血小板压积等生理生化指标以及肝组织抗氧化系统中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)在 0 h~7 d 的碱度胁迫过程中,均表现为先升高后降低的变化趋势( $P<0.05$ ),且驯化组峰值大小均显著性低于未驯化组( $P<0.05$ ),空白组在此期间均未表现出显著性变化( $P>0.05$ )。驯化组鱼的血常规指标参数和肝脏组织的 SOD、CAT 出现峰值的时间均晚于未驯化组。驯化组鱼体在高碱度胁迫第 7 天时,其血液中的尿素浓度、淋巴细胞、单核细胞、血红蛋白、红细胞、血小板、白蛋白含量、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)以及肝组织中的 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 参数均显著性低于未驯化组( $P<0.05$ )。研究表明,大鳞鲃幼鱼经过一定程度的碱度驯化后,在遭受更高碱度的水环境胁迫时,从生理层面反映出机体具有更强的适应性。

**关键词** 大鳞鲃; 碱度; 生理生化; 抗氧化酶

**中图分类号** S965.199 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0012-10

\* 国家重点研发计划资助项目(2020YFD0900402; 2019YFD0900404)、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD56)和中央公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201803M; HSY201809M)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Project (2020YFD0900402; 2019YFD0900404), Basic Project of Chinese Academy of Fishery Science (2020TD56), and Central Level Public Welfare Scientific Research Institute Basic Scientific Research Business Expense Special (HSY201803M; HSY201809M)]. 李海涛, E-mail: 1834376935@qq.com

① 通信作者: 徐伟, 研究员, E-mail: xwsc23@163.com; 赵志刚, 副研究员, E-mail: zhaozhigang@hrfri.ac.cn

收稿日期: 2021-07-12, 收修改稿日期: 2021-11-01

我国内陆地区约有 0.64 亿  $\text{hm}^2$  的低洼盐碱水域资源, 约占全国湖泊总面积的 55% (武鹏飞等, 2017), 盐碱水具有高盐、高碱、高 pH、离子组成复杂等特点。大多数淡水鱼类无法在这样的水环境中生存或生长(李生荣, 2009), 为充分开发利用盐碱水资源, 科研人员陆续移植和引进了大鳞鲃(*Luciobarbus capito*)、咸海卡拉白(*Chalcalburnus chalcoides aralensis*)、雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等耐盐碱鱼类开展养殖(常玉梅等, 2021)。耐盐碱鱼类在养殖早期, 尤其在鱼苗培育阶段, 由于其身体结构和生理机能尚未发育完全, 对盐碱水环境的适应性较差, 易因应激反应导致鱼体的成活率较低(付占斐等, 2020)。王好等(2011)研究表明, 在盐碱水域养殖过程中, 经过适当驯化可以有效提高鱼体的成活率, 同时, 其生长、抗氧化和免疫性能等方面也均有所提高。杨静雯等(2021)研究表明, 可通过每天 2 g/L 的升盐驯化方式使虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)逐渐适应海水, 驯化后的超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量与对照组相比无显著差异。成智丽等(2021)研究表明, 每 7 d 降低 1 g/L 的慢性盐度驯化过程中, 许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)升高, 而血液渗透压、尿素浓度、白蛋白浓度降低。秦少宗等(2021)研究表明, 以每天 1 g/L 的盐度速率对中华鲟(*Acipenser sinensis*)幼鱼进行海水盐度驯化过程中, 随着盐度的升高, 海水组中华鲟幼鱼血清渗透压和主要离子( $\text{Na}^+$ 和  $\text{Cl}^-$ )均出现先升高后保持稳定的现象。但关于碱度驯化的相关研究还未见报道。

大鳞鲃隶属于鲤科(Cyprinidae)、鲃亚科(Barbinae)、鲃属, 主要分布于西亚的里海和咸海水域, 成鱼体重可达 5~10 kg, 是当地名贵的大型经济鱼类。该鱼具有盐碱耐受性强、食性广、生长速度快、肉质鲜美、抗逆性强等优良养殖特性(徐伟等, 2012a)。2003 年从乌兹别克斯坦引入至今, 我国已在大鳞鲃的人工繁育技术(徐伟等, 2011; 耿龙武等, 2010)、养殖生物学(蔺玉华等, 2009)、养殖技术(徐伟等, 2012b)等方面开展了相关研究。党云飞等(2013)研究表明, 当碱度达到 39.80 mmol/L 时对幼鱼生长有抑制作用, 大鳞鲃幼鱼的总摄食量和饵料转化效率开始急剧下降, 且幼鱼最适生长碱度为 20.57 mmol/L。大鳞鲃在盐碱胁迫初期, 肝、肾和鳃中的抗氧化酶活力、MDA 含量及血清皮质醇含量均与盐度呈显著正相关性(张宇婷等, 2021)。但关于大鳞鲃在盐碱方面的研究

都是单纯的直接放入盐碱水体中以急性胁迫的方式来研究机体适应机制。本研究则是从血液生理生化、抗氧化应激等方面研究大鳞鲃幼鱼经过碱度驯化后与未驯化的生理适应性变化, 旨在探究大鳞鲃幼鱼对碱度环境变化的适应性机制, 并为大鳞鲃在盐碱水域养殖技术的建立提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大鳞鲃幼鱼取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰实验基地, 体长为(15.09±3.54) cm, 体重为(13.66±1.26) g。实验开始前, 鱼体在室内循环水玻璃缸内暂养 7 d, 暂养用水为曝气自来水。暂养期间每天换水 1/3, 暂养过程中溶解氧(DO)保持在 5 mg/L 以上, pH 为 7.4, 水温控制在(22.0±1.5)°C。每天 07:30 左右饱食投喂 1 次, 2 h 后将残饵和粪便吸出。不同碱度的实验用水采用曝气 2 d 的自来水和  $\text{NaHCO}_3$ (国产分析纯)进行配制, 并用酸碱滴定法进行测定和校准。

### 1.2 实验方法

实验分别设置驯化组、未驯化组和空白组, 每组设置 3 个平行, 每个平行挑选规格一致的 80 尾健康大鳞鲃幼鱼。驯化组: 先将暂养后的大鳞鲃置于 20 mmol/L 碱度水体中驯化 7 d 后, 然后将水体碱度增加到 40 mmol/L; 未驯化组: 大鳞鲃在淡水中养殖 7 d 后, 直接将水体碱度调整到 40 mmol/L; 空白组: 大鳞鲃一直淡水中养殖。驯化组和未驯化组分别将鱼体置于 40 mmol/L 碱度水体后的 0、6、12、24、48、96 h 以及 7 d 时的 7 个时间点, 随机收集 10 尾鱼, 经过 40 mg/L MS-222 麻醉后, 对其进行血液和肝脏组织样品的采集。采集的肝脏组织样品立刻用液氮保存。采用 2 mL 规格的注射器, 并用肝素钠抗凝在尾静脉采集血液进行多尾混样处理。空白组在对应的时间内也进行相同操作的采样过程。各组在驯化期间的 DO、水温投喂频率、换水情况和暂养期间一致, 并于采样前 24 h 停止投喂, 且采样期间不进行换水处理。

### 1.3 样品测定

将抽出每个平行组的血液分为 2 份, 1 份新鲜血液采用动物血液细胞分析仪(BC-2800Vet, Mindray)测定其红细胞、白细胞、血小板、淋巴细胞含量等血常规指标; 另 1 份血液静置 2 h 后, 以 2500 r/min 离心



10 min, 取上清液, 用生化分析仪(BS-240Vet, Mindray)及其迈瑞生物医疗电子有限公司生产的天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(IFCC法)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒、尿素(UREA)测定试剂盒(紫外-谷氨酸脱氢酶法)、葡萄糖(Glu)测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)、白蛋白(ALB)测定试剂盒(溴甲酚绿法)对血浆进行测定。血浆渗透压采用冰点下降法, 用冰点渗透压计(Osmomat)取 50  $\mu$ L 血浆进行测定(mOsm/kg)。肝脏样品中的 SOD、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽酶(GSH-Px)和MDA 均采用南京建成所生产的试剂盒进行测定。

#### 1.4 数据统计

采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并对组间或组内不同时期的显著性差异进行 Duncan 多重比较,  $P < 0.05$  为差异显著, 数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用独立样本的非参数检验进行驯化组和未驯化组峰值大小的显著性差异比较( $P < 0.05$ )。使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图。

## 2 结果

### 2.1 血常规分析

大鳞鲃驯化组和未驯化组血液中白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞含量均呈先升高后降低的变化趋势( $P < 0.05$ )(图 1)。驯化组鱼体各项参数的峰值出现在 48 h, 未驯化组的峰值出现时间在 24 h, 在 24 h 时, 驯化组的各项指标均显著低于未驯化组, 但在 48 h 时则相反( $P < 0.05$ )。在碱度胁迫第 7 天时, 驯化组鱼体血液中的淋巴细胞和单核细胞含量均显著低于未驯化组, 但仍显著高于空白组( $P < 0.05$ )。

在 7 d 的碱度胁迫过程中, 驯化组和未驯化组鱼体的血小板、红细胞、血红蛋白含量和血小板压积均表现为先升高后降低的变化趋势( $P < 0.05$ )(图 2)。驯化组和未驯化组各参数的峰值出现在 24 h 和 12 h, 驯化组各参数的峰值大小均显著低于未驯化组 ( $P < 0.05$ )。驯化组鱼体各项参数在胁迫 0 h 时均显著高于未驯化组( $P < 0.05$ ), 而在胁迫第 7 天时则显著低于未驯化组 ( $P < 0.05$ )。

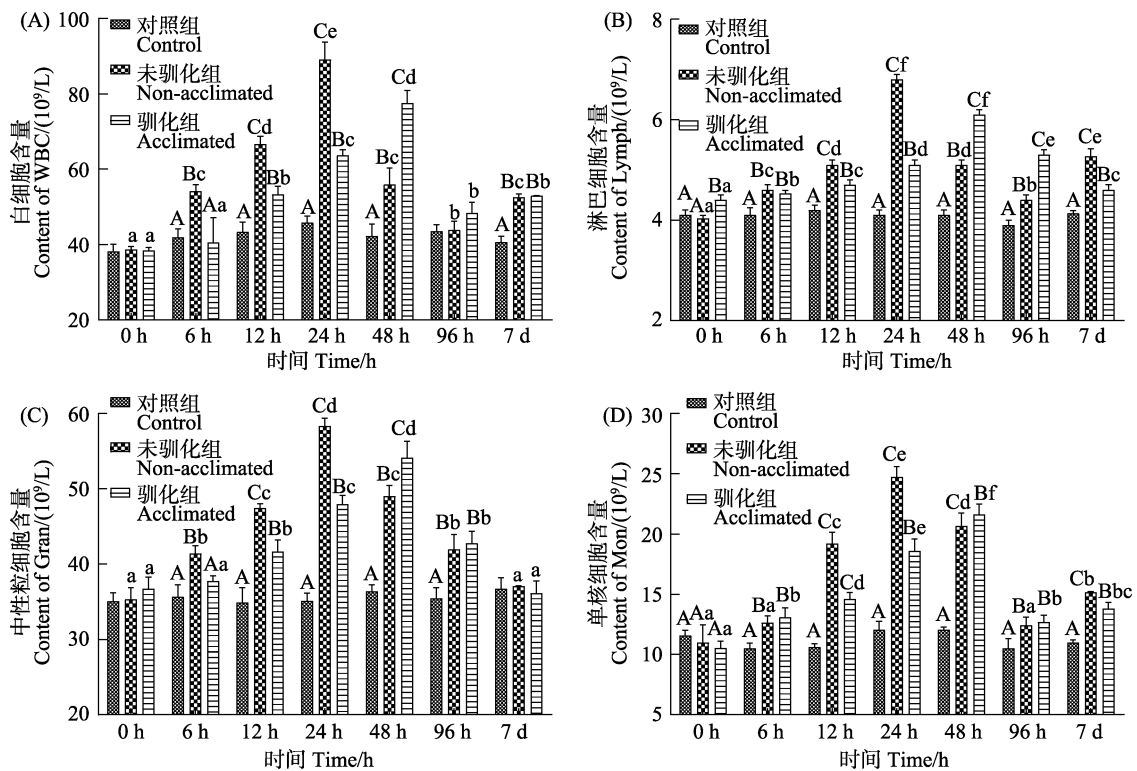


图 1 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼血液中的白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞含量的影响

Fig.1 Effect of alkalinity acclimation on blood white blood cells, lymphocytes, neutrophils, and monocytes of juvenile *L. capito*

不同大写字母表示同时期不同处理组的显著差异( $P < 0.05$ ), 不同小写字母代表同一处理组不同时期的显著差异( $P < 0.05$ )。下同。Different capital letters represent significant differences in different treatment groups at the same period ( $P < 0.05$ ), and different small letters represent significant differences in different periods of the same treatment group ( $P < 0.05$ ). The same as below.

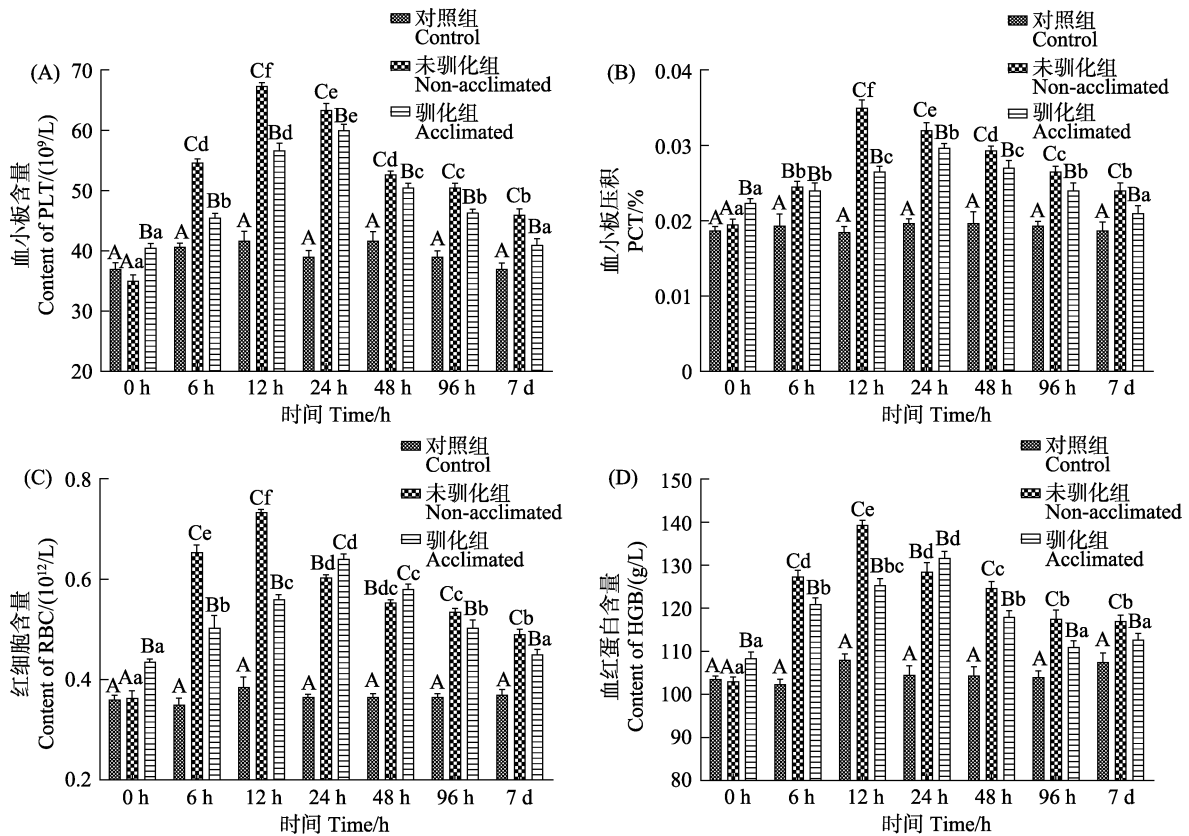


图 2 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼血液中的血红蛋白、红细胞、血小板含量和血小板压积的影响

Fig.2 Effect of alkalinity acclimation on hemoglobin, red blood cells, platelets content and hematocrit of juvenile *L. capito*

## 2.2 血浆生理生化指标

驯化组和未驯化组鱼体血浆中的白蛋白含量、血糖浓度、尿素浓度、血浆渗透压均呈现先升高后降低的变化趋势( $P < 0.05$ )(图 3)。在 6 h~7 d 的各个取样时间点, 驯化组鱼体的白蛋白含量均显著小于未驯化组( $P < 0.05$ )。驯化组和未驯化组鱼体血浆白蛋白和血糖含量均在 48 h 时出现峰值, 但驯化组的峰值显著小于未驯化组( $P < 0.05$ )。驯化组在 24 h 时的血浆渗透压和尿素浓度峰值均显著小于未驯化组(24 h) ( $P < 0.05$ )。驯化组鱼体血浆渗透压在 48 h 后开始趋于稳定, 而未驯化组在 96 h 后才开始逐渐降低。第 7 天时, 驯化组鱼体的血浆白蛋白含量显著小于未驯化组( $P < 0.05$ ), 且与空白组相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。在胁迫第 7 天时, 驯化组鱼体的血浆尿素浓度显著小于未驯化组( $P < 0.05$ ), 而其血浆渗透压在 3 组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

在 0 h~7 d 内, 驯化组和未驯化组鱼体的 AST 和 ALT 均呈现先升高后降低的变化趋势( $P < 0.05$ ), 除 0 h 外, 驯化组的血浆 AST 和 ALT 值均显著小于同时期未驯化组( $P < 0.05$ )(图 4), 但仍显著高于空白组( $P < 0.05$ )。驯化组鱼体在胁迫 0 h 和 7 d 时, 血浆 AST

和 ALT 值均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 2.3 肝脏抗氧化酶系统

驯化组和未驯化组鱼体肝脏的 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 在 7 d 的碱度胁迫范围内均呈先升高后降低的变化趋势( $P < 0.05$ ), 空白组则无显著性变化( $P > 0.05$ )(图 5)。驯化组鱼体在胁迫 24 h 时的 SOD 和 CAT 峰值均显著小于未驯化组在 12 h 出现的峰值( $P < 0.05$ )。胁迫第 7 天时, 驯化组的 SOD 和 CAT 值均显著低于未驯化组( $P < 0.05$ ), 但仍显著高于空白组( $P < 0.05$ )。驯化组鱼体在 96 h 出现的 GSH-Px 峰值和 48 h 出现的 MDA 峰值均显著小于未驯化组( $P < 0.05$ ), 胁迫 7 d 时, 驯化组 GSH-Px 和 MDA 值显著低于未驯化组( $P < 0.05$ ), 与空白组相比, 驯化组的 GSH-Px 未表现出显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 碱度驯化对大鳞鲃血液生理的影响

当鱼体处于应激状态时, 某些血液指标的变化可在一定程度上反映机体的基本状况(张宇婷, 2020)。本研究结果显示, 驯化组和未驯化组的大鳞鲃幼鱼血

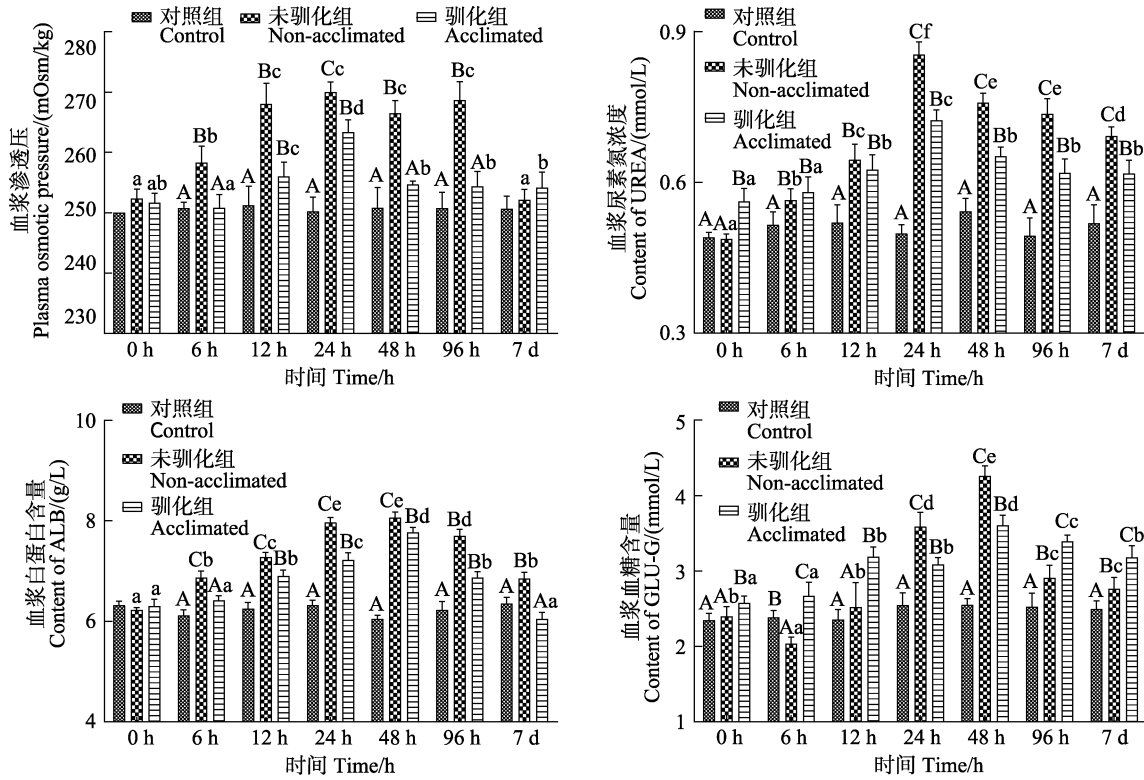


图3 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼的血浆渗透压、尿素浓度、血糖浓度和血浆白蛋白含量的影响

Fig.3 Effect of alkalinity acclimation on plasma osmotic pressure, plasma urea, blood glucose concentration and plasma albumin content of juvenile *L. capito*

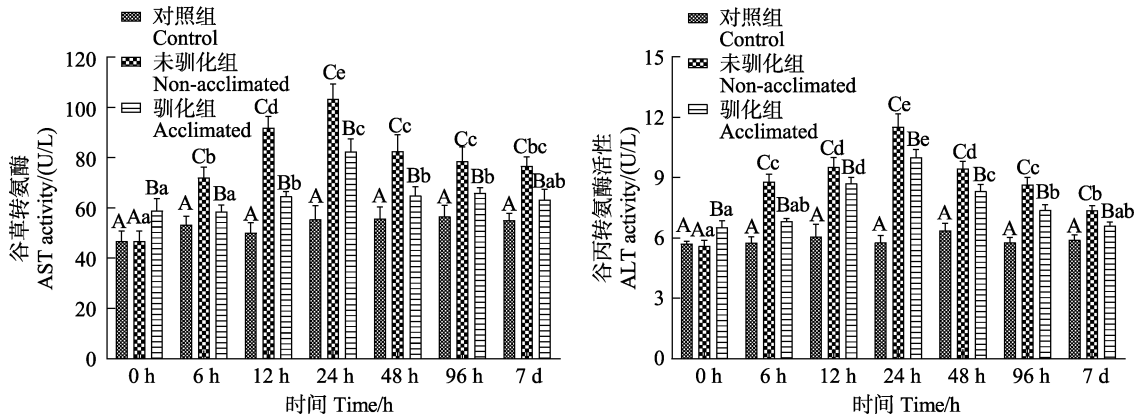


图4 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼的血浆AST和ALT的影响

Fig.4 Effect of alkalinity domestication on plasma AST and ALT of juvenile *L. capito*

液中白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞的含量随着碱度胁迫时间的延长呈先升高后降低的变化趋势。Ashaf-Ud-Douhah等(2019)认为,当鱼体遭受环境因子胁迫时可通过增加自身的免疫反应来应对环境变化。本实验驯化组的大鳞鲃血液白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞含量的上升幅度均显著小于未驯化组,表明大鳞鲃在经过低碱度水体驯化后,再遭遇较高碱度水体时,机体的应激反应较小。且在应激第7天时,虽然驯化组大鳞鲃血液中的淋巴细胞

和单核细胞含量均显著大于空白组,但显著低于未驯化组,表明经驯化后的鱼体在遭遇较高碱度胁迫后,其机体生理恢复能力较强。

血小板在鱼体血液中起着凝血止血、修补破损血管的功能(王龙涛等, 2019)。本研究中,驯化组的大鳞鲃幼鱼急性碱度胁迫下血小板出现峰值时间(24 h)晚于非驯化组(12 h),且变化幅度小于非驯化组;同时,驯化组鱼体的血小板含量和血小板压在胁迫第7天时显著性低于非驯化组,表明大鳞鲃在经低浓度

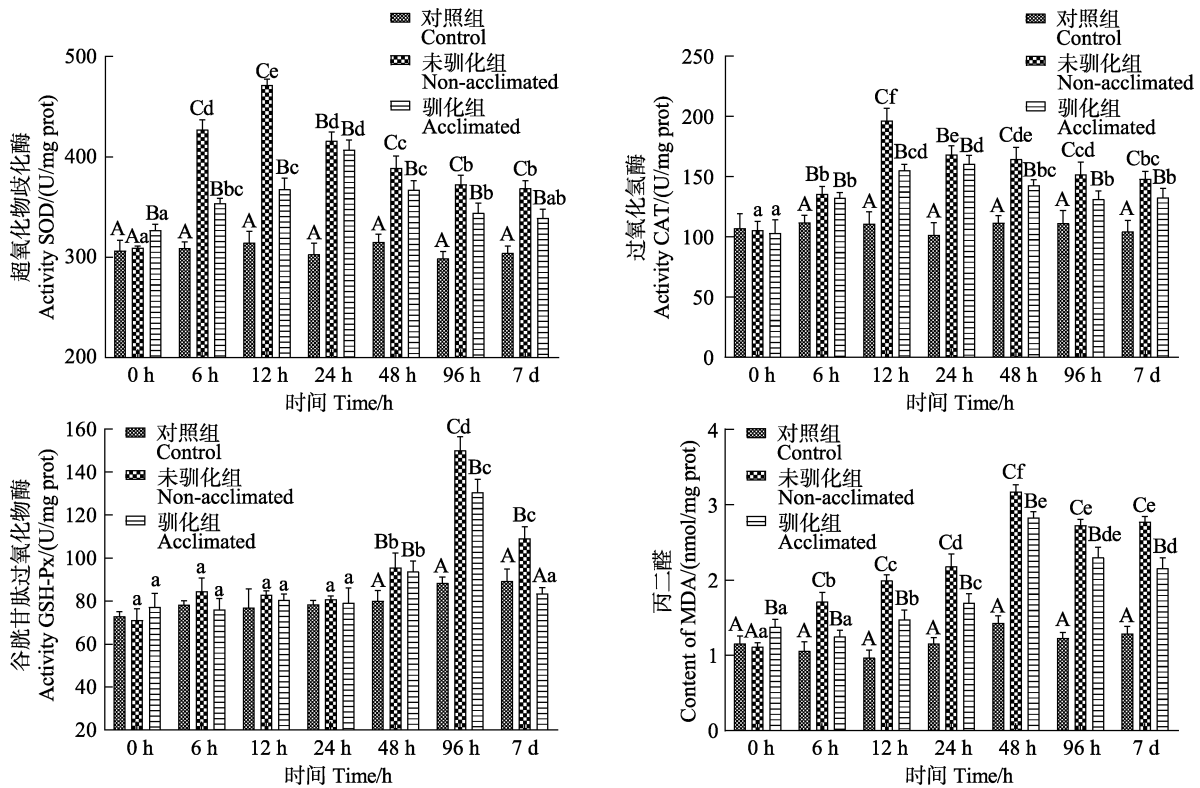


图 5 碱度驯化对大鳞鲃幼鱼 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 的影响

Fig.5 Effect of alkalinity domestication on SOD, CAT, GSH-Px, and MDA of juvenile *L. capito*

碱度驯化后, 机体应对高碱度环境时其组织的血管损伤度有所降低。机体血液红细胞中含有的血红蛋白具有运输氧的功能, 血液中红细胞和血红蛋白数量的增加意味着血液对氧运输能力增强, 鱼体的代谢能力提高(赵海涛等, 2006)。本研究中, 虽然驯化组鱼体在应激 0 h 时的红细胞、血红蛋白含量均显著性高于未驯化组和空白组, 这也有可能是前期驯化导致的, 但从血红蛋白、红细胞含量的峰值大小和峰值出现时间来看, 驯化组鱼体在经历较高浓度的碱度胁迫时表现出更小的应激反应。有研究表明, 碱度胁迫下鱼体的耗氧率增加(姚娜等, 2016; 耿龙武等, 2017), 驯化组鱼体在应激第 7 天时, 其血液红细胞含量、血红蛋白含量均显著低于未驯化组, 表明与未驯化的大鳞鲃相比, 驯化后的鱼体在经历更高碱度胁迫时, 需要消耗更少的能量来维持机体的代谢。

### 3.2 碱度驯化对大鳞鲃血浆生理生化的影响

鱼类生命活动最直接的能量来源于葡萄糖, 鱼体血糖水平的变化与水环境胁迫因子在某种程度上有着密不可分的联系(Wagner *et al*, 2004)。洪磊等(2004)研究指出, 环境胁迫会引起鱼类的内分泌变化, 如儿茶酚胺和皮质类固醇的升高, 随之血液中葡萄糖和乳酸含量增加。本研究中, 驯化组和未驯化组鱼体的血

糖浓度均高于空白组, 这与王龙涛等(2019)对异育银鲫(*Carassius gibelio*)的研究结果一致。王瑞芳等(2019)对瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)的研究中也同样发现, 在盐碱湖泊中的鱼体糖原异生作用增强, 且血糖浓度高于淡水瓦氏雅罗鱼。本研究中, 驯化组大鳞鲃在应激第 7 天时的血糖浓度显著高于未驯化组, 其原因可能是经碱度驯化后的大鳞鲃幼鱼耗氧率有所降低(耿龙武等, 2017), 导致其能量代谢水平降低, 血糖浓度维持在较高水平。机体耗氧率降低, 在一定程度上有利于鱼体生长(徐钢春等, 2012)。驯化组在应激第 7 天时的红细胞含量和血红蛋白浓度显著低于未驯化组, 也间接说明了经驯化后大鳞鲃的耗氧率有所降低。

鱼类通过机体的渗透压调节来适应水环境的变化, 当机体渗透压超过一定限度后会影响到鱼体的生长发育, 严重时会导致鱼体死亡(沈双焯等, 2013)。本研究结果显示, 经碱度驯化后的大鳞鲃幼鱼血浆渗透压在应对 40 mmol/L 的碱度胁迫时其应激反应较低, 应激胁迫后渗透压恢复较快。主要原因是经过驯化后的大鳞鲃在应对更高碱度胁迫时, 机体已经提前适应低碱度变化而进入主动调节阶段, 当鱼体再次应对碱度变化时, 相对于未驯化组并未表现出更大的应激反应(Partridge *et al*, 2002)。黄国强等(2013)对褐牙鲈

(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼的研究中也发现,每日的盐度变化幅度越小,幼鱼血清渗透压达到稳定所需时间越短。驯化组和未驯化组大鳞鲃渗透压在碱度胁迫第7天时,均能恢复至空白组水平,表明大鳞鲃幼鱼能够通过自身调节渗透压来应对40 mmol/L 碱度的变化,这与耿龙武等(2011)的研究结果一致。耿龙武等(2011)研究表明,鱼体血液中尿素含量增加可以在碱性水境中作为其他离子的补充调节渗透压,可在一定程度上增强鱼体在高碱水域中的渗透调节能力,从而提高鱼体对高碱水环境的适应性。本研究驯化组鱼体血浆尿素含量的出现峰值早于未驯化组,且在应激第7天时,其血浆尿素含量显著低于未驯化组,这些结果均表明,驯化组鱼体因在一定程度上适应了碱度变化而导致其血液尿素含量变化较小。同时,驯化后的鱼体此时可能通过调节自身代谢降低氨的产生进而适应高碱环境。

正常情况下,鱼体肝脏组织中的转氨酶只有少量被释放到血浆中,当鱼体受到应激或组织病变时,会引起组织细胞膜通透性增加,细胞内的转氨酶就会大量释放出来进入血液,引起血清中AST和ALT活性的异常升高(黄晓荣等,2007)。本研究中,驯化组和未驯化组大鳞鲃血浆AST和ALT活性在实验过程中均显著高于空白组,说明2组鱼体在此期间均受到了碱度胁迫。驯化组鱼体中2种酶的活性在各时间点均显著低于非驯化组,表明经驯化后的大鳞鲃一定程度上适应了碱度胁迫,避免了在高碱度环境下鱼体组织受到伤害。值得注意的是,驯化组鱼体的AST和ALT在应激0 h和7 d的2个时间点均无显著性差异,表明驯化后的大鳞鲃幼鱼在面对40 mmol/L的 $\text{NaHCO}_3$ 碱度变化时,能够恢复至驯化后胁迫前的水平,相较于未驯化组机体的损伤程度较低。

### 3.3 碱度驯化对大鳞鲃肝脏抗氧化系统的影响

SOD、CAT和GSH-Px等抗氧化酶在生物体的抗氧化防御机制中有着清除活性氧分子、增强吞噬细胞防御能力和机体免疫能力的作用,而MDA含量的高低又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度(张宇婷等,2021)。杨静雯等(2021)研究表明,当水体盐度变化较快时,虹鳟和硬头鳟(*Salmon gairdneri*)因长期处于氧化应激状态且不断产生自由基,抗氧化酶为清除活性氧危害始终处于较高水平状态。本实验结果显示,与空白组相比,驯化组和未驯化组鱼体肝脏的SOD、CAT、GSH-Px酶活性和MDA含量均显著较高,表明鱼体在面对高碱度变化时机体受到了较大程度的应激,肝组织在一定程度上受损,需要较高的

SOD、CAT、GSH-Px酶活来清除体内过多的自由基。驯化组鱼体在应激第7天时,各种酶活性均显著小于未驯化组,且驯化组各种酶的峰值也均显著性小于未驯化组,表明经碱度驯化后的大鳞鲃在遭受更高碱度的胁迫时具有更强的适应性。

## 4 结论

本文研究了碱度适应性驯化对大鳞鲃幼鱼血液生理生化及肝脏抗氧化系统的影响,研究表明,大鳞鲃幼鱼经过一定程度的碱度驯化后,在遭受更高碱度的水环境胁迫时,从生理层面反映出机体具有更强的适应性。

## 参 考 文 献

- ASHAF-UD-DOULAH M, SHAHJAHAN M, ISLAM S M M, *et al.* Thermal stress causes nuclear and cellular abnormalities of peripheral erythrocytes in Indian major carp, rohu *Labeo rohita*. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 86: 102450
- CHANG Y M, LIANG L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 798–812 [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展. *水产学报*, 2021, 45(5): 798–812]
- CHENG Z L, SUN P F, LUO J, *et al.* Changes in serum biochemical profiles and osmotic pressure of Schlegel's black rockfish *Sebastes schlegelii* acclimatized by various salinities. *Fisheries Science*, 2021, 40(3): 310–317 [成智丽, 孙鹏飞, 罗珺, 等. 盐度驯化下许氏平鲈血清生化指标及渗透压的变化. *水产科学*, 2021, 40(3): 310–317]
- DANG Y F, XU W, GENG L W, *et al.* Effects of NaCl and  $\text{NaHCO}_3$  on growth and gill microstructure in juvenile *Barbus capito*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013(3): 577–584 [党云飞, 徐伟, 耿龙武, 等. NaCl盐度和 $\text{NaHCO}_3$ 碱度对大鳞鲃幼鱼生长及鳃组织特征的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 577–584]
- FU Z F, WANG X, WANG F, *et al.* Effect of acclimation at different salinities on survival and growth of rainbow trout and steelhead trout juveniles. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2020, 50(7): 37–43 [付占斐, 王鑫, 王芳, 等. 不同盐度驯化方式对虹鳟和硬头鳟幼鱼存活和生长的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(7): 37–43]
- GENG L W, JIANG H F, XU W, *et al.* Effects of carbonate alkalinity on oxygen consumption and ammonia excretion in bulatmai barbel *Barbus capito*. *Chinese Journal of Fisheries*,

- 2017, 30(6): 30–33 [耿龙武, 姜海峰, 徐伟. 碳酸氢钠对大鳞鲃耗氧率和排氨率的影响. 水产学杂志, 2017, 30(6): 30–33]
- GENG L W, XU W, LI C T, *et al.* Influence of salinity and alkalinity on serum ion concentrations, osmosis and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of *Barbus capito*. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 458–465 [耿龙武, 徐伟, 李池陶, 等. 盐碱对大鳞鲃血清渗透压、离子含量及鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响. 中国水产科学, 2011, 18(2): 458–465]
- GENG L W, XU W, LIN Y H, *et al.* Technique of artificial reproduction of *Barbus capito*. Journal of Jilin Agricultural University, 2010, 32(2): 218–220 [耿龙武, 徐伟, 蔺玉华, 等. 大鳞鲃人工繁育技术初报. 吉林农业大学学报, 2010, 32(2): 218–220]
- HONG L, ZHANG X M. Effects of environmental stress on physiological function of fish. Advances in Marine Science, 2004, 22(1): 114–121 [洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 114–121]
- HUANG G Q, ZHANG L Y, LI J, *et al.* Effects of salinity acclimatization on the osmoregulation and energy metabolism of brown flounder (*Paralichthys olivaceus*). Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2013, 43(5): 44–51 [黄国强, 张灵燕, 李洁, 等. 盐度驯化对褐牙鲆幼鱼渗透压调节和能量代谢的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(5): 44–51]
- HUANG X R, ZHANG L Z, ZHUANG P, *et al.* Haematological biochemistry of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*, at different domestication salinities. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(2): 144–150 [黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 盐度驯化下施氏鲟的血液生化指标. 上海水产大学学报, 2007, 16(2): 144–150]
- LI S R. The present situation and countermeasures of water resources in China—The shortage of water resources restricts the development of China's economy and society. Journal of Yan'an Vocational and Technical Institute, 2009, 23(6): 101–103, 109 [李生荣. 我国水资源的现状与对策—水资源短缺制约着我国经济社会的发展. 延安职业技术学院学报, 2009, 23(6): 101–103, 109]
- LIN Y H, GENG L W, WANG X H, *et al.* Some biological characteristics of *Barbus capito* bred in ponds. Journal of Tianjin Normal University (Natural Science), 2009, 29(2): 72–75 [蔺玉华, 耿龙武, 王信海, 等. 池塘驯养大鳞鲃某些生物学特性研究. 天津师范大学学报(自然科学版), 2009, 29(2): 72–75]
- PARTRIDGE G J, JENKINS G I. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). Aquaculture, 2002, 210(1/2/3/4): 219–230
- QIN S Z, LENG X Q, LUO J, *et al.* Adaptive adjustment of osmotic organ structure of juvenile Chinese sturgeon in seawater conditions. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 82–89 [秦少宗, 冷小茜, 罗江, 等. 中华鲟幼鱼渗透调节器官组织结构在海水条件下的适应性调整. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 82–89]
- SHEN S Y, ZHANG S S, XIE H, *et al.* Effects of salinity domestication on serum biochemistry and osmotic pressure of carp *Cyprinus carpio*. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(12): 3261–3267 [沈双焯, 张赛赛, 谢唤, 等. 盐度驯化对鲤血清生化指标及渗透压的影响. 生态学杂志, 2013, 32(12): 3261–3267]
- WAGNER T, CONGLETON J L. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2004, 61(7): 1066–1074
- WANG L T, GE Z X, GAO C S, *et al.* Effect of different concentrations of saline-alkali stress on the chronic injury of *Carassius auratus gibelio*. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(7): 84–87 [王龙涛, 葛晨霞, 高春山, 等. 不同浓度盐碱胁迫对异育银鲫的慢性损伤效应. 中国兽医杂志, 2019, 55(7): 84–87]
- WANG R F, AN X P, QI J W, *et al.* Energy metabolism and digestive enzyme activity regulation in Amur Ide (*Leuciscus waleckii*) during spawning migration from Dali Nor Lake to Gongger River. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(4): 703–712 [王瑞芳, 安晓萍, 齐景伟, 等. 达里湖瓦氏雅罗鱼生殖洄游过程中能量代谢和消化酶活性的变化. 中国水产科学, 2019, 26(4): 703–712]
- WANG Y, ZHUANG P, ZHANG L Z, *et al.* Effects of salinity on survival, growth and antioxidant defense system of *Siganus guttatus*. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(1): 66–73 [王好, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长及抗氧化防御系统的影响. 水产学报, 2011, 35(1): 66–73]
- WU P F, GENG L W, JIANG H F, *et al.* Tolerance of three Cobitidae fish species to high salinity and alkalinity. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 248–257 [武鹏飞, 耿龙武, 姜海峰, 等. 三种鳅科鱼对  $\text{NaCl}$  盐度和  $\text{NaHCO}_3$  碱度的耐受能力. 中国水产科学, 2017, 24(2): 248–257]
- XU G C, NIE Z J, BO Q K, *et al.* Effects of water temperature on oxygen consumption rate, asphyxiant point, blood glucose content, and muscle and liver glycogen content of juvenile *Coilia nasus*. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(12): 3116–3120 [徐钢春, 聂志娟, 薄其康, 等. 水温对刀鲚幼鱼耗氧率、窒息点、血糖及肌肝糖元指标的影响. 生态学杂志, 2012, 31(12): 3116–3120]
- XU W, GENG L W, LI C T, *et al.* The artificial propagation, embryonic development and saline-alkali tolerant experiment of *Barbus capito*. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 255–260 [徐伟, 耿龙武, 李池陶, 等. 大鳞鲃的人工繁殖、胚胎发育和耐盐碱测定. 水产学报, 2011, 35(2): 255–260]
- XU W, GENG L W, LI C T, *et al.* The growth and overwintering

- survival of *Barbus capito* bred in pond in northern China. *Freshwater Fisheries*, 2012a, 42(1): 68–71 [徐伟, 耿龙武, 李池陶, 等. 北方寒地池养大鳞鲃生长和越冬成活. *淡水渔业*, 2012a, 42(1): 68–71]
- XU W, GENG L W, MIAO J S, *et al.* Current researches on saline-alkali tolerant fish of *Barbus capito*. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2012b, 19(3): 62–64 [徐伟, 耿龙武, 苗建生, 等. 耐盐碱鱼类大鳞鲃的研究现状. *天津农学院学报*, 2012b, 19(3): 62–64]
- YANG J W, YANG X G, HUANG M, *et al.* Effects of salinity change on antioxidant enzyme activities of rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2021, 51(6): 26–33 [杨静雯, 杨小刚, 黄铭, 等. 盐度变化对虹鳟和硬头鳟抗氧化酶活性的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 51(6): 26–33]
- YAO N, CHEN S A, WANG S, *et al.* Effects of salinity, alkali and weight on oxygen consumption and ammonia excretion rate of *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(2): 462–468 [姚娜, 陈生熬, 王帅, 等. 盐度、碱度和体重对叶尔羌高原鳅耗氧率和排氮率的影响. *西南农业学报*, 2016, 29(2): 462–468]
- ZHANG Y T, YANG J, GENG L W, *et al.* Effects of salinity stress on antioxidant enzymes and serum cortisol in *Luciobarbus capito*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 56–62 [张宇婷, 杨建, 耿龙武, 等. 盐度胁迫对大鳞鲃抗氧化酶和血清皮质醇的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 56–62]
- ZHANG Y T. Study of immunological reaction of *Luciobarbus capito* under saline-alkali stress based on transcriptome sequencing technology. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 [张宇婷. 基于转录组技术的大鳞鲃盐碱胁迫免疫应激响应研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- ZHAO H T, ZHANG Q Z, ZHAO H P, *et al.* Comparative study on hematological indices in larval and adult southern catfish. *Chinese Journal of Zoology*, 2006, 41(1): 94–99 [赵海涛, 张其中, 赵海鹏, 等. 南方鲇幼鱼和成鱼血液指标的比较. *动物学杂志*, 2006, 41(1): 94–99]

(编辑 陈 辉)

## Effects of Alkalinity Acclimation on Blood Physiology and Biochemistry and Liver Antioxidant System of Juvenile *Luciobarbus capito*

LI Haitao<sup>1,2</sup>, XU Wei<sup>2①</sup>, ZHAO Zhigang<sup>2①</sup>, LUO Liang<sup>2</sup>, LI Mingshuai<sup>2,3</sup>, LIU Jinyu<sup>1,2</sup>, WANG Yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>, GUO Kun<sup>2</sup>, GENG Longwu<sup>2</sup>, DU Rujun<sup>4</sup>, CONG Yanfeng<sup>4</sup>

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

2. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150070, China;

3. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

4. Aquatic Products Station of Dorbod Mongolian Autonomous County, Daqing, Heilongjiang 166200, China)

**Abstract** There are approximately 64 million hm<sup>2</sup> of low-lying saline-alkali water resources in inland China, accounting for 55% of the total lake area. The characteristics of saline-alkali water are: high salt content, high alkalinity (high pH), and complex ion composition. Most freshwater fish cannot survive or reproduce in these conditions. To utilize saline-alkali water resources for aquaculture, researchers have introduced salt-tolerant fish, such as *Luciobarbus capito*, *Chalcalburnus chalcoides aralensis*, *Leuciscus waleckii*, and *Oreochromis niloticus*. In the initial stage of aquaculture, fish fry are not yet adapted to saline-alkali conditions because their body structure and physiological functions are not underdeveloped. The survival rate of juvenile fish is low because of the stress response to saline-alkali water. Studies of saline-alkali aquaculture have shown that proper acclimation can effectively improve the survival rate, growth, antioxidant, and immune properties of fish.

① Corresponding author: XU Wei, E-mail: xwsc23@163.com; ZHAO Zhigang, E-mail: zhaozhigang@hrfri.ac.cn

*L. capito* belongs to the Cyprinidae family (subfamily Barbinae). It occurs mainly in the Caspian Sea and the Aral Sea of Western Asia. *L. capito* is an economically important fish, with adults weighing 5~10 kg. The species has excellent breeding characteristics, high saline-alkali tolerance, varied food habits, fast growth, delicious meat, and strong stress resistance. In 2003, it was introduced from Uzbekistan to China. To date, research has reported on *L. capito* artificial breeding technology and breeding biology but has not yet considered salt-alkali domestication.

To study the physiological adaptability of *L. capito* to alkalinity with regards to blood physiology, biochemistry, and antioxidative stress, we used juvenile *L. capito* (13.66±1.26) g to test NaHCO<sub>3</sub> alkalinity acclimation. The control group was cultivated in freshwater. The acclimation group was subjected to 20 mmol/L alkalinity for 7 d and then placed in 40 mmol/L alkaline water. The non-acclimation group was placed in 40 mmol/L alkaline water. The experimental media were prepared with tap water and NaHCO<sub>3</sub> (domestic, analytically pure) after aeration for 2 d, and the alkalinity was measured and calibrated by acid-base titration. The fish were fed once a day and fasted for 24 h before sampling.

Blood physiological and biochemical indices (water osmotic pressure, white blood cells, lymphocytes, neutrophils, monocytes, hemoglobin, red blood cells, platelets, platelet hematocrit, urea, and albumin), as well as indices related to the liver antioxidant system of juvenile fish in 40 mmol/L alkalinity water, were measured at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, and 7 d. In the control group, the same sampling was conducted at the corresponding moments. The physiological and biochemical indices for both domesticated and non-domesticated fish initially increased and then decreased across the sampling period ( $P<0.05$ ). In both the domesticated and non-domesticated groups, the antioxidant indices of fish liver tissue, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA), increased initially and then decreased across the sampling period ( $P<0.05$ ). The peak values of each parameter in the domesticated group were significantly lower than those of the non-domesticated group ( $P<0.05$ ). No significant changes were observed in the control group during this period ( $P>0.05$ ). The peak values of leukocytes, lymphocytes, neutrophils, and monocytes appeared at 48 h in the acclimated group and at 24 h in the non-acclimated group; the blood hemoglobin content, red blood cell content, platelet content, hematocrit, SOD, and CAT peaked in both the acclimated and non-acclimated groups at 24 h. After 7 d, the urea, lymphocyte, monocyte, platelet, red blood cell, hemoglobin, and albumin content of the blood and aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), SOD, CAT, GSH-PX, and MDA content of the liver tissue were significantly lower in the acclimation group than in the non-acclimation group ( $P<0.05$ ), but the plasma albumin content and glutathione catalase in the acclimated group returned to the level of the control group ( $P>0.05$ ). Studies have shown that after alkalinity acclimation, juvenile *L. capito* are less stressed and the body tissue shows less damage and greater recovery under high alkalinity. At the physiological level, the body has higher adaptability. This study provides a theoretical basis for the establishment of saline-alkali aquaculture technology for the cultivation of *L. capito* that is based on the adaptability of the species to gradual changes in the alkalinity of the environment.

**Key words** *Luciobarbus capito*; Alkalinity; Physiological and biochemical; Antioxidant enzymes



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220113001

http://www.yykxjz.cn/

王旭江, 么宗利, 来琦芳, 于明超, 李新苍, 高鹏程, 周凯, 崔青曼, 刘一萌, 孙真, 李燕. 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 22–32

WANG X J, YAO Z L, LAI Q F, YU M C, LI X C, GAO P C, ZHOU K, CUI Q M, LIU Y M, SUN Z, LI Y. Transcriptomic analysis of *Litopenaeus vannamei* during long-term exposure to high alkaline water. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 22–32

# 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾基因表达差异研究\*



王旭江<sup>1,2</sup> 么宗利<sup>2①</sup> 来琦芳<sup>2</sup> 于明超<sup>3</sup> 李新苍<sup>2</sup> 高鹏程<sup>2</sup>  
周 凯<sup>2</sup> 崔青曼<sup>1</sup> 刘一萌<sup>2</sup> 孙 真<sup>2</sup> 李 燕<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部低洼盐碱地水产养殖重点实验室 盐碱水域渔业工程技术研究中心(上海) 上海 200090; 3. 通威股份有限公司 成都 610093)

**摘要** 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有较强的环境适应能力,对盐碱水环境有一定的耐受性,但在高 pH、高碱环境下的存活率不稳定。为探究凡纳滨对虾对长期高碱胁迫的响应机制,本研究以低碱对照组(LSW:碳酸盐碱度为 3 mmol/L,盐度为 6, pH 为 8.1)和高碱胁迫组(AW:碳酸盐碱度为 10 mmol/L,盐度为 6, pH 为 8.8)养殖 42 d 的凡纳滨对虾肠道和鳃组织作为实验材料,通过 Illumina 平台进行转录组测序,对测序数据进行拼接、注释,进而筛选、分析高碱胁迫下的差异表达基因及调控通路并进行定量 PCR 验证。结果显示,2 个组织共同差异表达基因有 243 个,其中,98 个表达上调,145 个表达下调。肠道中差异表达基因主要集中在糖代谢、碳水化合物消化吸收、胆汁分泌、ABC 跨膜转运、紧密连接以及免疫调节等途径。鳃中差异表达基因主要集中在谷胱甘肽代谢、碳酸氢盐转运、精氨酸合成、糖代谢以及离子转运等相关途径。进一步筛选获得 10 个最显著的差异表达基因,经 qRT-PCR 验证发现,凡纳滨对虾鳃中碳酸酐酶(CA1、CA10)、蜕皮激素诱导蛋白(Eip74EF)、β-半乳糖基转移酶(UGT8)基因在高碱胁迫下均表达下调,而 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-α(NKA-α)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting ATPase interacting(NKAIN)、氨转运蛋白(Rhbg)、苹果酸脱氢酶(MDH)等基因表达上调,与转录组表达趋势一致,推测其可能参与了对虾高碱胁迫下的应激响应。凡纳滨对虾表现出较强的高碱适应性,可能是通过下调鳃中 CA 的表达,补偿体内碱中毒,上调 Rh 氨转运蛋白防止氨在体内积累,上调 NKA 相关基因维持体内渗透平衡;但蜕皮激素诱导蛋白(Eip74EF)显著下调,推测其蜕皮功能受到影响。本研究为深入探讨凡纳滨对虾在长期高碱胁迫条件下的生理响应机制提供了基础数据。

**关键词** 凡纳滨对虾; 转录组; 碳酸盐碱度; 差异表达基因

**中图分类号** S603.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0022-11

我国拥有丰富的盐碱水资源,其高 pH、高碳酸盐碱度水质特征制约了水生动物的生存、生长和繁

殖。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有较强的抗逆性,在盐碱水中有一定的耐受性。短期盐碱胁迫下,

\* 国家重点研究计划(2019YFD0900404)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2021XT0401; 2020TD52)共同资助 [This work was supported by the National Key Research Program (2019YFD0900404), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021XT0401; 2020TD52)]. 王旭江, E-mail: 2694786690@qq.com

① 通信作者: 么宗利, 研究员, E-mail: yaozli@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2022-01-13, 收修改稿日期: 2022-04-01

凡纳滨对虾碳酸酐酶(CA)、 $Na^+ - K^+ - ATPase$  等离子调控类基因差异表达,以增强离子调节的方式进行酸碱和渗透平衡的调控(么宗利等, 2010、2012),但针对长期高碱胁迫下凡纳滨对虾的基因调控研究相对较少。目前,虽然盐碱水凡纳滨对虾养殖取得一定成功,但养殖存活率不稳定,凡纳滨对虾耐盐碱选育鲜有报道。国内通过引进、消化、吸收和自主创新,建立了基于规模化家系的“水产动物多性状复合育种技术”(张天时, 2010),选育的优良性状包括抗病(黄永春等, 2013)、耐低温(景福涛等, 2006)、耐盐碱(李明栋等, 2021)、耐低盐度(郝登春等, 2018)、养殖存活率(孔杰等, 2017)等,为实现凡纳滨对虾良种本土化打下了良好的基础。为有效利用盐碱水资源,迫切需要开展凡纳滨对虾耐盐碱选育工作,从而促进凡纳滨对虾盐碱水养殖业的健康发展。

水生生物耐盐碱性状由多基因互相作用协同控制(么宗利等, 2010),其分子响应机制是一个复杂的过程。研究发现,耐盐碱性状具有一定的遗传潜力,在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)等水产动物中获得了若干耐盐碱功能基因(唐首杰等, 2018; Chang *et al.*, 2021; 李明栋等, 2021),但功能位点尚不清晰。随着基因组学和生物信息学的高速发展,高通量测序技术逐渐成熟,并广泛应用于功能基因挖掘、分子标记筛选及信号转导等研究中,为耐盐碱响应机制的研究提供了有效的技术手段。其中,转录组测序可以针对各种环境条件下的物种细胞或组织进行高通量测序,并对测序结果进行基因结构分析和功能注释,分析特定条件下相关基因的表达水平,以揭示其代谢网络及调控响应机理(Sims *et al.*, 2014)。本研究采用高通量测序技术对 2 种处理下的凡纳滨对虾肠道和鳃组织进行转录组测序,筛选长期高碱胁迫下差异表达基因以及与盐碱胁迫相关代谢通路,为解析凡纳滨对虾耐盐碱调控机制提供基础数据,同时为盐碱水环境下凡纳滨对虾分子辅助育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾取自通威股份有限公司 2020 年 5 月培育的 G10 代育种群体。对现有 20 个凡纳滨对虾家系进行驯化、筛选、荧光标记后,进行 96 h 高碱急性胁迫实验,依据实验结果,开展 42 d 的高碱胁迫实验。挑选活力相对较好、个体规格比较一

致的凡纳滨对虾作为实验用虾,起始平均体长为  $(7.2 \pm 0.5)$  cm,体重为  $(4.7 \pm 0.6)$  g。

### 1.2 碳酸盐碱度胁迫实验

碳酸盐碱度胁迫实验于 2020 年 8 月开始,每个家系挑选规格相对一致的凡纳滨对虾 96 尾,设置低碱对照组(LSW)和高碱胁迫组(AW),每组设置 3 个平行(每个平行 16 尾),每个平行单独放置在  $50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$  网箱中养殖。AW 组养殖用水通过添加相应的  $Na_2CO_3$  和  $NaHCO_3$  配制而成(碳酸盐碱度为 10 mmol/L,盐度为 6, pH=8.8),LSW 组为对照组(碳酸盐碱度为 3 mmol/L,盐度为 6, pH=8.1)。为保证实验组盐碱水碳酸盐碱度和 pH 稳定,每隔 24 h 换水 50%。经过 42 d 的养殖,选择一个高碱敏感家系[养殖存活率为  $(42.5 \pm 8.33)\%$ ]取样,LSW 和 AW 每组每个平行各取 6 尾虾[体长为  $(9.8 \pm 0.8)$  cm,体重为  $(9.6 \pm 0.9)$  g],活体解剖,取鳃和肠道组织放入 RNA 保存液保存备用,其中,3 尾用于转录组测序,3 尾用于后期 qRT-PCR 验证。

### 1.3 RNA 提取及转录组测序

按照常规 Trizol 法提取每尾虾的鳃和肠道组织总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-2000 分光光度计(Thermo, 美国)检测 RNA 质量及浓度。总 RNA 浓度  $>250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $OD_{260 \text{ nm}}/OD_{280 \text{ nm}}$  介于 1.8~2.2 之间,确保 RNA 无降解、无污染,然后,进行文库构建和高通量测序(Hiseq 2500, Illumina, 美国)。

### 1.4 转录组序列组装及注释

测序原始数据经过质量分析,去除带接头、低质量和 N(无法确定碱基信息)比例大于 10% 的序列,质控后的序列用 Trinity 软件进行拼接,每个基因以拼接得到的最长序列为该基因序列(unigene) (Grabherr *et al.*, 2011)。转录组测序数据用 CASAVA Base Calling 软件、RSEM 软件分析,并利用 HISAT2 将 Clean Reads 与指定参考基因组(ASM378908v1-NCBI)进行序列比对,获取在参考基因组或基因上的位置信息以及测序样本特有的序列特征信息。

### 1.5 差异表达分析及差异基因富集分析

采用 FPKM 方法计算基因表达量(Trapnell *et al.*, 2010)。利用 R 语言 DEGseq 软件包筛选差异表达基因(DEGs),筛选阈值为 fold change  $>2$  和  $Q < 0.05$  (Anders *et al.*, 2010)。对于 DEGs,依据测序结果中的基因 GO (gene ontology)功能注释(Young *et al.*, 2010),

并结合 KEGG 数据库分析差异显著基因参与的代谢通路(Kanehisa *et al*, 2008)。

### 1.6 qRT-PCR 验证

为了进一步验证转录组数据,选取 10 个差异倍数较大的 DEGs 进行鳃组织 qRT-PCR 验证分析,其中包含 5 个上调和 5 个下调表达的基因。利用 Primer

5.0 软件设计特异性引物(表 1),送交生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR 实验采用 TaKaRa 相对荧光定量试剂盒,以 18S rRNA 为内参基因,每个样品 3 次重复,验证所用样品为前期实验经过相同处理的平行样品。利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析基因的相对表达量(Schmittgen *et al*, 2008),与转录组表达数据进行比较分析。

表 1 用于转录组表达验证的引物序列  
Tab.1 Genes and primers used for validation of RNA-seq data

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'~3')
<i>18S rRNA</i>	18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
	18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
<i>Eip74EF</i>	LOC113800214 F	CAACCATAGCAAGCGACACAAG
	LOC113800214 R	CCACCAGGATCAAGGCAAGAG
<i>CA1</i>	LOC113803091 F	ACGGAGAGCACCACATTGAAG
	LOC113803091 R	GCAGTCAGCGAACCATAAATCAG
<i>Hex-t2</i>	LOC113805141 F	CGTCCGCACAGAATATGATAACAC
	LOC113805141 R	CACCAGCCGCACGATAACC
<i>UGT8</i>	LOC113808551 F	CGCTGGTGCTGGTCAACTC
	LOC113808551 R	CAGGTGCTGGTTCGCTCATG
<i>CA10</i>	LOC113830158 F	TGACCTTCTACCATCTTCACATCC
	LOC113830158 R	GCAAGCCACGGACAGACAG
<i>NKAIN</i>	LOC113812436 F	ATCATCGCCACTTCTTCAACTTC
	LOC113812436 R	CCTATCCATACCAGGAGCCAAAC
<i>Nmdar1</i>	LOC113812935 F	GCCGCCGACAAGTGGAGAG
	LOC113812935 R	TCACGCCGTTCGCCTTCAG
<i>NKA-<math>\alpha</math></i>	LOC113815921 F	GTGTAGAATTGGCTGTTGGTGATG
	LOC113815921 R	CGGTCTCGTGGATGGATACTTG
<i>MDH</i>	LOC113820403 F	TCTGCCACCGCTACCTCTG
	LOC113820403 R	GCTGCCTGACCACGAGTAAC
<i>Rhbg</i>	LOC113816830 F	GAAGGCAGCAGACGACATCC
	LOC113816830 R	CACACTCCATTCAGGACATTCATC

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序数据质量评估

转录组测序分析共完成 12 个样本的有参转录组测序,获得 75.62 Gb 的 Clean data,各样本有效数据量在 5.72~7.01 Gb,碱基 Q30 在 92.83%~93.47%,平均 GC 含量为 47.76%,说明测序质量符合生物信息学分析要求,测序数据质量如表 2 所示。

### 2.2 转录组测序 Reads 基因组比对结果

通过将 Clean reads 比对到参考基因组,得到各个样本的基因组比对情况,比对率为 80.93%~91.2%。基于比对结果,进行蛋白编码基因表达量分析。根据

蛋白编码基因在不同样本中的表达量进行差异筛选,设有肠道和鳃 2 个差异分组,其检测到的差异基因数量分别为 2480 和 1699,共同差异表达基因为 243 个(图 1)。

对 AW 和 LSW 的差异表达基因分析结果绘制火山图(图 2)。结果显示,在高碱胁迫条件下,肠道组织有 1224 个基因表达上调,有 1256 个基因表达下调;鳃组织有 613 个基因表达上调,1086 个基因表达下调。将 2 个组织在高碱胁迫下的差异表达基因进行比较,2 个组织有 243 个共同的差异表达基因,其中,98 个基因上调表达,145 个基因下调表达,这 243 个共同的差异表达基因可能与高碱胁迫下凡纳滨对虾组织间协同调控分子机制有关。

表 2 样品测序数据与组装结果统计  
Tab.2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

样本 Sample	原始数据 Raw reads/M	原始碱基 Raw bases/G	过滤数据 Clean reads/M	过滤碱基 Clean bases/G	有效数据 Valid bases/%	Q30 Content/%	GC Content/%
AWI1	44.44	6.67	43.21	6.06	90.98	93.00	46.67
AWI2	41.88	6.28	40.74	5.76	91.77	92.98	46.61
AWI3	41.80	6.27	40.64	5.72	91.17	92.88	47.21
AWG1	46.39	6.96	45.27	6.34	91.09	93.25	47.69
AWG2	46.54	6.98	45.23	6.34	90.85	93.05	49.33
AWG3	43.49	6.52	42.40	5.95	91.25	93.32	47.72
LSWI1	47.11	7.07	45.84	6.39	90.43	93.18	49.02
LSWI2	42.75	6.41	41.58	5.86	91.35	92.83	44.23
LSWI3	48.30	7.24	46.96	6.47	89.30	93.17	47.26
LSWG1	51.76	7.76	50.35	7.01	90.36	93.47	49.35
LSWG2	50.31	7.55	48.94	6.85	90.72	93.20	48.49
LSWG3	50.69	7.60	49.28	6.87	90.32	93.35	49.58

注: AWI1、AWI2 和 AWI3 表示高碱胁迫组对虾肠道组织 3 个生物学重复, AWG1、AWG2 和 AWG3 表示高碱胁迫组对虾鳃组织 3 个生物学重复; LSWI1、LSWI2 和 LSWI3 表示对照组对虾肠道组织 3 个生物学重复, LSWG1、LSWG2 和 LSWG3 表示对照组对虾鳃组织 3 个生物学重复; Q30: Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基百分比。

Note: AWI1, AWI2, and AWI3 are three individual intestines of high-alkaline groups. AWG1, AWG2, and AWG3 are three individual gills of high-alkaline groups; LSWI1, LSWI2, and LSWI3 are three individual intestines of control groups. LSWG1, LSWG2, and LSWG3 are three individual gills of control groups. Q30: The base of the Phred value greater than 30 accounts for the percentage of the overall base.

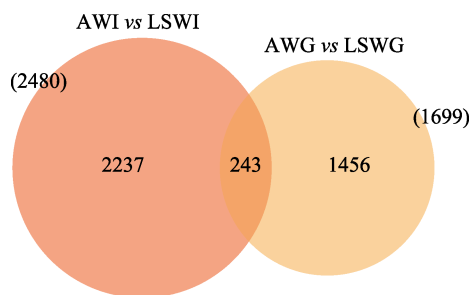


图 1 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道和鳃组织  
差异表达基因维恩图

Fig.1 Numbers of differentially expressed genes in intestine and gills of *L. vannamei* under high alkaline stress

### 2.3 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 GO 富集分析

GO 富集分析显示,差异基因在生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)中均有分布,其中,以生物过程居多。肠道中,差异表达基因共富集到 5253 个 terms,其中,生物过程 3223 个,细胞组分 910 个,分子功能 1120 个。鳃组织中,差异表达基因共富集到 3647 个 terms,其中,生物过程 1244 个,细胞组分 1185 个,分子功能 1218 个。在生物过程中,

生物调节、代谢途径、细胞途径、离子转运以及单有机体过程是包含差异基因最多的几类;在细胞成分分类中,差异基因最多的是细胞组分和细胞这两类;而在分子功能类中,结合和催化活性这两类包含了最多的差异基因,挑选每个分类中富集最显著的前 10 个 GO terms 进行展示(图 3)。

### 2.4 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集结果显示,2 种处理在肠道组织的 DEGs 涉及 238 个通路,在鳃组织的 DEGs 涉及 225 个通路,从 KEGG 富集分析中选取富集最显著的 20 个代谢途径,绘制 KEGG 富集气泡图(图 4)。其中,肠道中差异表达基因主要集中在糖代谢、碳水化合物消化吸收、胆汁分泌、ABC 跨膜转运、紧密连接、免疫调节等途径。鳃中差异表达基因主要集中在谷胱甘肽代谢、碳酸氢盐转运、精氨酸合成、糖代谢以及离子转运等相关途径。

### 2.5 转录组数据的 qRT-PCR 验证

从 2 种不同处理下凡纳滨对虾的肠道和鳃中筛选的 243 个共同 DEGs 中,根据 GO 和 KEGG 富集结果,选取 10 个差异倍数较大 DEGs 进行验证(图 5)。

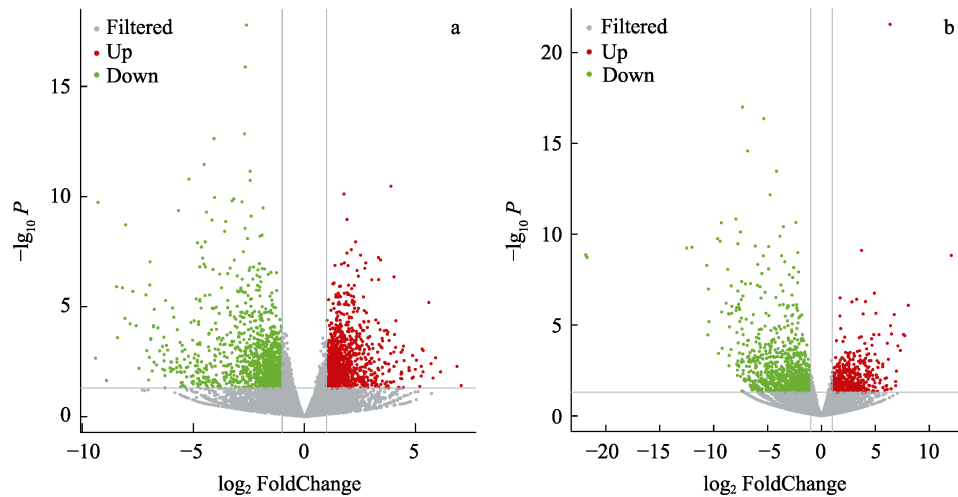


图2 高碱胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因火山图

Fig.2 The volcano plot of differentially expressed genes of *L. vannamei* under high alkaline stress

a: 肠道组织差异基因火山图; b: 鳃组织差异基因火山图

灰色为非显著性差异的基因, 红色为显著上调表达基因, 绿色为显著下调表达基因。

a: The volcano plot of the differentially expressed genes in intestine; b: The volcano plot of the differentially expressed genes in gills; The gray means non-significant different genes, the red and green means a significant different genes, red means the up-regulated genes, and green means down-regulated genes.

各基因 qRT-PCR 验证表达趋势与转录组表达趋势一致。其中, *NKA- $\alpha$* 、*NKAIN*、*MDH*、*Rhbg* 和 *Nmdar1* 基因在高碱胁迫下呈上调表达, 差异倍数在 1.6~4.1 之间; *Eip74EF*、*CA1*、*CA10*、*UGT8* 和 *Hex-t2* 基因呈下调表达, 差异倍数在 1.9~4.4 之间。

### 3 讨论

#### 3.1 长期高碱胁迫下凡纳滨对虾转录组分析

长期高碱胁迫下, 凡纳滨对虾肠道中差异基因主要富集在糖代谢、碳水化合物、胆汁分泌等消化吸收相关通路以及细胞凋亡等免疫相关通路, 鳃中差异基因主要富集在谷胱甘肽代谢等氮代谢相关通路以及碳酸氢根转运等离子转运相关通路。鳃和肠道是凡纳滨对虾酸碱调节、渗透调节和生长调控的重要器官。鳃是水生动物特有的呼吸器官, 在气体交换、渗透压平衡和氨氮排泄等方面发挥重要作用(龚仕玲等, 2019)。肠道在机体的生长调节、营养代谢以及免疫防御等方面起到重要作用。研究表明, 高 pH 胁迫会影响肠道组织的消化酶活性和抗氧化酶活性(Duan *et al.*, 2019)。因此, 本研究以选育凡纳滨对虾的鳃和肠道组织作为实验材料, 通过高通量测序技术分析其高碱胁迫和正常碱度条件下转录水平的差异。高碳酸盐碱度会影响对虾的生长和存活(么宗利等, 2010、2012; 柳飞等, 2016), 而青海湖裸鲤(*Gymnocypris*

*przewalskii*)、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等鱼类在高碱环境下, 其体内会积累氨氮(衣晓飞等, 2017; 徐悦等, 2021; 吴俊伟等, 2016)。本研究中, 凡纳滨对虾肠道消化吸收、鳃氮代谢等通路富集了大量差异表达基因, 推测其在应对长期高碱胁迫时, 生长和氮废物排泄受到较大影响。同时, 凡纳滨对虾细胞凋亡相关通路的变化提示, 胁迫环境可能会破坏其免疫防御系统, 导致免疫抑制(Xiao *et al.*, 2019)。

#### 3.2 高碱环境下凡纳滨对虾相关基因表达

本研究发现, 在应对长期高碱胁迫时, 鳃组织中 *NKAIN*、*NKA- $\alpha$*  等离子转运基因和 *Rhbg* 氨转运基因表现为上调模式, 而 *CA1*、*CA10*、*Eip74EF* 等基因表现为下调模式。凡纳滨对虾应对高碱胁迫的响应机制较为复杂, 当其暴露在高碱环境中时, 碱性水环境中  $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$  等离子可直接腐蚀对虾鳃和其他表面暴露部位, 造成器质性损伤, 破坏其离子交换体系, 进而影响对虾的存活。高碱度水体中较高浓度的  $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$  导致水生动物体内摄入过多的  $\text{HCO}_3^-$ , 同时, 外界环境的高 pH 会抑制一些离子交换(如  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  等),  $\text{HCO}_3^-$  大量累积, 造成水生动物体内酸碱平衡遭到破坏, 最终导致持续性碱中毒(Yao *et al.*, 2015)。本研究中, 鳃中 *NKA* 相关基因表达上调, 有利于高碱环境下凡纳滨对虾维持体内离子平衡,

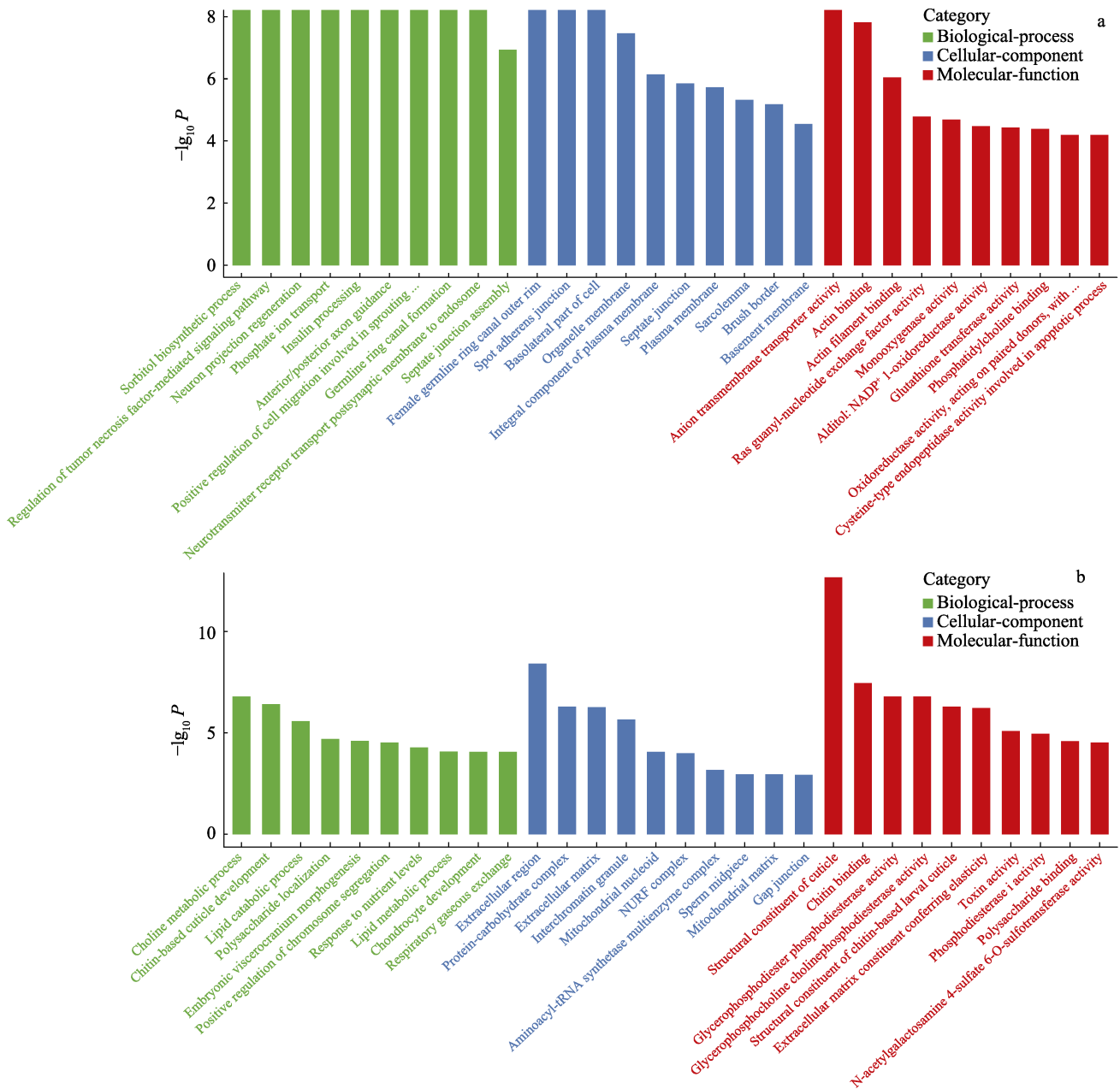


图 3 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道、鳃组织差异基因前 30 GO 富集分析

Fig.3 Top 30 GO enrichment of differentially expressed genes of intestine and gills of *L. vannamei* under high alkaline stress

a: 肠道组织差异基因 GO 富集; b: 鳃组织差异基因 GO 富集

a: GO enrichment terms of differentially expressed genes in intestine tissue;

b: GO enrichment terms of differentially expressed genes in gills tissue

而低表达的碳酸酐酶则有助于降低体内  $\text{HCO}_3^-$  含量, 从而维持酸碱平衡。脊尾白虾中 3 种碳酸酐酶(CAs) 在盐碱水中响应高碱胁迫分子机制的研究也发现, *CAc* 和 *CAG* 在高碱环境中具有重要调节能力, 对高碱环境下对虾的存活发挥重要作用, 为对虾的存活争取了时间(Ge *et al*, 2019)。研究表明, 高碱环境会影响水生动物氨氮的排泄, 鱼类可以通过上调 *Rh*、*Ut* 基因增加氨的排泄(衣晓飞等, 2017)。本研究发现,

凡纳滨对虾鳃中 *Rhbg* 表达上调, 推测其可能参与了长期高碱胁迫下氨排泄。甲壳类动物外壳由大量  $\text{Ca}^{2+}$  化合物构成, 甲壳类动物在蜕皮前期会将外壳中的部分  $\text{Ca}$  重新吸收, 但蜕皮后仍需从食物或者通过鳃组织从水体中获取  $\text{Ca}$  (董少帅等, 2005)。在长期高碱环境下, 由于  $\text{Ca}^{2+}$  的流失, 蜕壳周期延长, AW 组在养殖过程中的蜕壳率较低。本研究发现, *Eip74EF* 在鳃中表达下调, 而这一基因在调控果蝇(*Drosophila*)

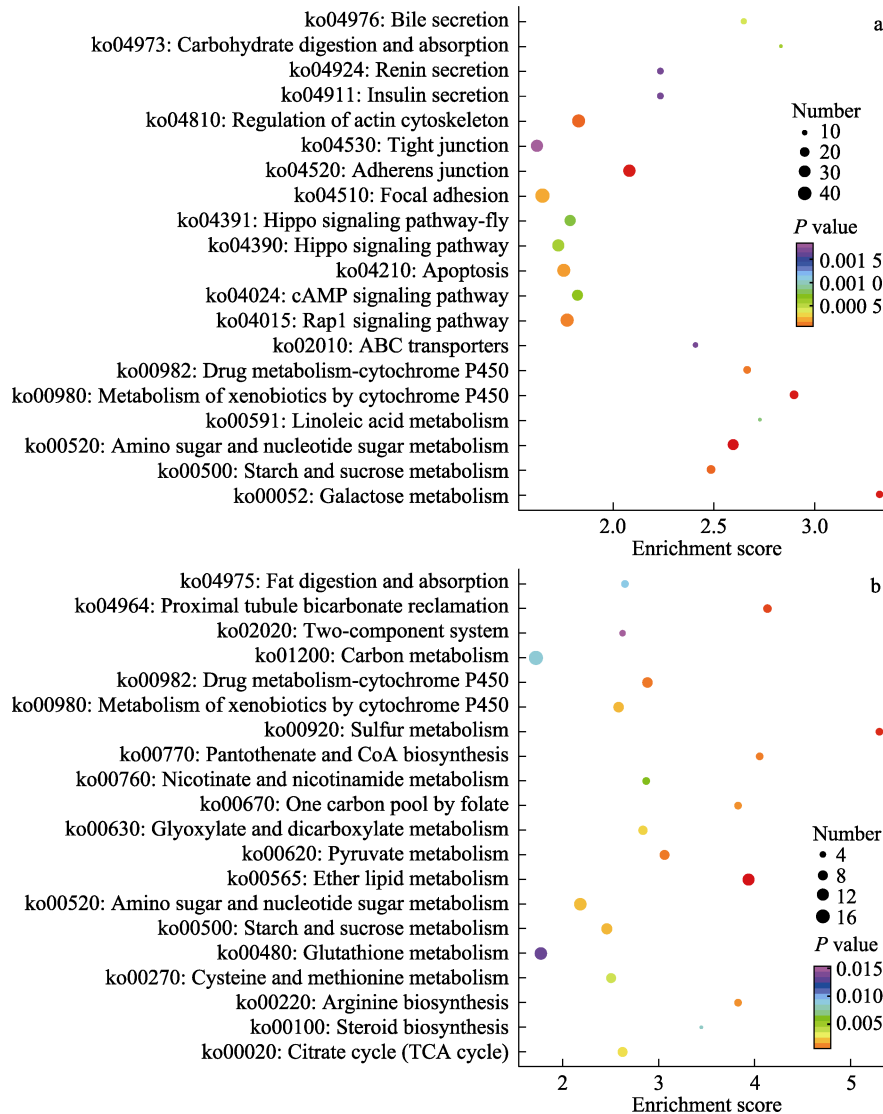


图 4 高碱胁迫下凡纳滨对虾肠道和鳃差异表达基因 KEGG 富集分析气泡图  
Fig.4 KEGG enrichment results of differentially expressed genes in intestine and gills of *L. vannamei* under high alkalinity stress

a: 肠道差异表达基因 KEGG 富集分析; b: 鳃差异表达基因 KEGG 富集分析

$P$  值大小用点的颜色来表示,  $P$ -value 越小则颜色越接近红色,

每个通路下包含差异基因的多少用点的大小来表示。

a: KEGG enrichment results of differentially expressed genes in intestine; b: KEGG enrichment results of differentially expressed genes in gills. The  $P$ -value is represented by the color of dots. Red color indicates small  $P$ -value.

The number of differential genes contained in each pathway is represented by the size of dots.

蜕皮变态发育上有着重要的协同作用(Fletcher *et al.*, 1995), 推测其在高碱胁迫下参与对虾蜕壳调控过程。此外, 本研究发现, 鳃部 *Hex-t2*、*UGT8* 等能量代谢基因表达下调, 推测在高碱胁迫下, 对虾能量消耗较大, 通过降低能量消耗维持其基本生命活动。对虾耐碱胁迫是一个复杂的过程, 涉及生理、生化及遗传多个方面。因此, 虾类对高碳酸盐碱度的抵抗能力不仅是单个耐受基因的启动和识别, 更重要的是在整个生

理过程中多个基因的相互作用。

综合转录组和定量 PCR 实验结果显示, 凡纳滨对虾表现出较强的高碱适应性, 可能是通过下调鳃中 *CA* 的表达补偿体内碱中毒, 上调 *Rh* 氨转运蛋白防止氨在体内积累, 上调 *NKA* 相关基因维持体内渗透平衡而得到的结果; 蜕皮激素诱导蛋白(*Eip74EF*)显著下调, 推测其蜕皮功能受到影响。本研究通过对凡纳滨对虾鳃和肠道进行转录组分析, 寻找高碱环境下差

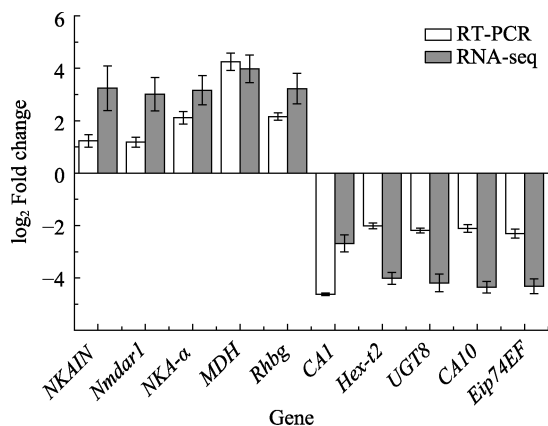


图5 高碱胁迫下凡纳滨对虾鳃组织差异基因 qRT-PCR 验证

Fig.5 Validation of differentially expressed genes in gills of *L. vannamei* using real-time qRT-PCR

异表达基因, 为后续高碱环境下凡纳滨对虾的选育及良种培育提供了理论基础。

## 参 考 文 献

- ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11: R106
- CHANG Y M, ZHAO X F, LIEW H J. Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater forms of Amur ide (*Leuciscus waleckii*). *Aquatic Physiology*, 2021, 12(5): 676–696
- DONG S S, DONG S L, WANG F, *et al.* The effect of  $Ca^{2+}$  concentration on the growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 211–215 [董少帅, 董双林, 王芳, 等.  $Ca^{2+}$ 浓度对凡纳滨对虾稚虾生长的影响. *水产学报*, 2005, 29(2): 211–215]
- DUAN Y F, WANG Y, LIU Q S. Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 88(3): 142–149
- FLETCHER C, THUMMEL C S. The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development*, 1995, 121(5): 1411–1421
- GE Q Q, LI J, WANG J J, *et al.* Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 2(3): 212–224
- GONG S L, XIE D M, LI Y W, *et al.* Cadmium exposure induces histological damage, oxidative stress and immune response in yellow catfish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 340–347 [龚仕玲, 谢冬梅, 李英文, 等. 镉暴露诱导黄颡鱼鳃的组织学损伤、氧化应激和免疫反应. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 340–347]
- GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652
- HAO D C, LUAN S, CAO B X, *et al.* Genetic parameters of survival of juvenile families of *Litopenaeus vannamei* during desalination and culture stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 90–96 [郝登春, 栾生, 曹宝祥, 等. 凡纳滨对虾家系幼虾淡化和养殖阶段存活性状遗传参数估计. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 90–96]
- HUANG Y C, AI H S, PAN Z C, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 359–366 [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. *水产学报*, 2013, 37(3): 359–366]
- JING F T, PAN L Q, HU F W. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to the change of temperature. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(S1): 40–44 [景福涛, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾对温度变化的免疫响应. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(增刊): 40–44]
- KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(3): 480–484
- KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–362
- KONG J, LUAN S, LUO K, *et al.* Genetic evaluation for body weight and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different salinity. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 573–578 [孔杰, 栾生, 罗坤, 等. 不同盐度下凡纳滨对虾生长和存活性状遗传评估. *水产学报*, 2017, 41(4): 573–578]
- LI M D, LI J T, SHI K P, *et al.* Estimation of heritability and genetic correlation of saline-alkali tolerance in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 117–123 [李明栋, 李吉涛, 史鲲鹏, 等. 脊尾白虾耐盐碱性状遗传力和遗传相关的估计. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 117–123]
- LIU F, LI J, LI J T, *et al.* Effect of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137–1147 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响. *中国水产科学* 2016, 23(5): 1137–1147]
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108



- SIMS D, SUDBERY I, ILOTT N E, *et al.* Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(2): 121–132
- TANG S J, LI S F, ZHAO J L, *et al.* Heritability analysis of the late selection generations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) new gift strain using microsatellites. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018, 48(5): 171–174 [唐首杰, 李思发, 赵金良, 等. “新吉富”罗非鱼选育后期世代遗传潜力的微卫星分析, 海洋湖沼通报, 2018, 48(5): 171–174]
- TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511–515
- WU J W, ZHAO J L, ZHAO Y, *et al.* Effects of high carbonate alkalinity stress on changes in ammonia metabolism expression of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1290–1299 [吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 等. 高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1290–1299]
- XIAO J, LI Q Y, TU J P, *et al.* Stress response and tolerance mechanisms of ammonia exposure based on transcriptomics and metabolomics in *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180(5): 491–450
- XU Y, MI B H, ZHAO X F, *et al.* Effects on alkalinity stress on blood biochemical indices *Leuciscus waleckii*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(3): 17–21 [徐悦, 米博瀚, 赵雪飞, 等. 碳酸盐胁迫对瓦氏雅罗鱼血液中部分生理生化指标的影响, 水产学杂志, 2021, 34(3): 17–21]
- YAO Z L, LAI Q F, HAO Z R, *et al.* Carbonic anhydrase 2-like and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase a gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) under carbonate alkalinity stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(6): 1491–1500
- YAO Z L, WANG H, ZHOU K, *et al.* Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post larva *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 945–950 [么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响. 生态学杂志, 2010, 29(5): 945–950]
- YAO Z L, YING C Q, ZHOU K, *et al.* Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 1–12 [么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1–12]
- YI X F, LAI Q F, SHI J Q, *et al.* Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 681–689 [衣晓飞, 来琦芳, 史建全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681–689]
- YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, *et al.* Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11: R14
- ZHANG T S. Analysis of animal models and estimation of genetic parameters in *Fenneropenaeus chinensis* breeding. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 13–17 [张天时. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)育种的模型分析与遗传参数评估. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 13–17]
- ZOU H, SUN J, YU F, *et al.* Effect of cadmium on lysosomes in BRL 3A cells. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(12): 1602–1608 [邹辉, 孙建, 于凡, 等. 镉暴露对 BRL3A 细胞溶酶体的影响. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1602–1608]

(编辑 冯小花)

## Transcriptomic Analysis of Gene Expression of *Litopenaeus vannamei* during Long-Term Exposure to High Alkaline Water

WANG Xujiang<sup>1,2</sup>, YAO Zongli<sup>2①</sup>, LAI Qifang<sup>2</sup>, YU Mingchao<sup>3</sup>, LI Xincang<sup>2</sup>, GAO Pengcheng<sup>2</sup>, ZHOU Kai<sup>2</sup>, CUI Qingman<sup>1</sup>, LIU Yimeng<sup>2</sup>, SUN Zhen<sup>2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>

(1. School of Oceanography and Environment, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture on Saline-Alkaline Land, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Fishery Engineering Technology Research Center for Saline-Alkaline Waters (Shanghai), Shanghai 200090, China; 3. Tongwei Co, LTD, Chengdu, Sichuan 610093, China)

**Abstract** The total saline-alkaline land area in China is approximately 99.13 million hectares, distributed throughout northern China, coastal areas, and areas along the Huanghe River. About 45.87 million hectares of saline-alkaline water areas are spread around these lands, most of which are athalassic waters characterized by a high pH value above 8.8, associated with high-carbonate alkalinity and various types of ions imbalances. The saline-alkaline land and water cannot be directly used for agriculture, and most of them are arid. The development of aquaculture in saline-alkaline land is not only beneficial to expanding the aquaculture area but also can restore the saline-alkaline soil, which is of great significance to food security and ecological restoration. Saline-alkaline aquaculture is one of the main inland aquaculture models developed in the past ten years. With the maturity of aquaculture technologies, the saline-alkaline aquaculture area has expanded year by year, which has brought earnings to local farmers. China has abundant saline-alkaline water resources. The high pH and high-carbonate alkalinity of these waters restrict the survival, growth, and reproduction of aquatic animals. *Litopenaeus vannamei* is highly resistant to stress and has a certain tolerance to saline-alkaline water. Under short-term saline-alkaline stress, the expression of the carbonic anhydrase (CA),  $Na^+/K^+$ -ATPase, and other ion-regulated genes of *L. vannamei* were induced, and the acid-base and osmolality balance were determined by strengthening ion regulation. At present, relatively few studies on gene regulation of *L. vannamei* under long-term stress have been performed. Although *L. vannamei* farming has been successful in saline-alkaline water, the survival rate is unstable, and there are few reports on the selective breeding of *L. vannamei* tolerant to salinity and alkalinity. Through independent innovation, a family-based "multi-trait compound breeding technology for aquatic animals" has been established in China. These techniques have laid a good foundation for developing improved *L. vannamei* strains. To effectively utilize saline-alkaline water resources, it is urgent to conduct *L. vannamei* salt-alkali-tolerant breeding and promote the healthy development of the saline-alkaline aquaculture industry. *L. vannamei* has strong environmental adaptability and relatively high tolerance to saline-alkaline water. It is one of the main species of saline-alkaline aquaculture. However, its survival rate in high pH and high-alkaline environments is not stable. To explore the response mechanism to long-term high-alkaline stress, *L. vannamei* was exposed to low-alkaline water as the control group (LSW, carbonate alkalinity of 3 mmol/L, salinity of 6, pH of 8.1) and to high-alkaline stress (AW, carbonate alkalinity of 10 mmol/L, salinity of 6, pH of 8.8) for 42 days. The intestine and gill of *L. vannamei* raised for 42 days were used as the experimental materials. Transcriptome sequencing was performed using the Illumina platform. After splicing analysis and gene annotation, the differentially expressed genes and regulatory pathways regulated under high-alkaline

① Corresponding author: YAO Zongli, E-mail: yaozl@ecsf.ac.cn

stress were screened and analyzed, with further verification by qRT-PCR. The results showed 243 differentially expressed genes in both tissues, of which 98 were up-regulated and 145 were down-regulated. The differentially expressed genes in the intestine were enriched for glucose metabolism, carbohydrate digestion and absorption, bile secretion, ABC transmembrane transport, and tight junction related pathways. The differentially expressed genes in gills were enriched for glutathione metabolism, bicarbonate transport, arginine synthesis, sugar metabolism, and ion transport related pathways. The ten most significant differentially expressed genes were further studied and verified by qRT-PCR. Carbonic anhydrase (*CA1*, *CA10*), ecdysone-inducible protein (*Eip74EF*), and  $\beta$ -galactosyltransferase (*UGT8*) genes in gills were down-regulated. However, the expression of  $Na^+/K^+$ -ATPase- $\alpha$  (*NKA-\alpha*),  $Na^+/K^+$  transporting ATPase interacting (*NKAIN*), ammonia transporter (*Rhbg*), and malate dehydrogenase (*MDH*) were up-regulated under high-alkaline stress. The transcriptome expression pattern and qRT-PCR results were consistent. We speculated that these genes may be involved in the shrimp stress response to high-alkaline stress. *L. vannamei* showed a relatively strong high-alkaline tolerance, which may be compensated by down-regulating the expression of *CA* to prevent alkalosis, up-regulating *Rhbg* to prevent ammonia accumulation and *NKA*-related genes to maintain the osmotic balance. The ecdysone function was probably affected as the *Eip74EF* gene was down-regulated. This study provides basic data for further analyzing the physiological response mechanisms of *L. vannamei* under long-term highly alkaline stress.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Transcriptome; Carbonate alkalinity; Differential expression genes

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220310001

http://www.yykxjz.cn/

秦桢, 李吉涛, 李明栋, 王佳佳, 葛倩倩, 刘萍, 李健. 盐碱水环境对脊尾白虾基因组 DNA 甲基化的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 33-50

QIN Z, LI J T, LI M D, WANG J J, GE Q Q, LIU P, LI J. Effects of saline-alkaline water environment on DNA methylation of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 33-50

## 盐碱水环境对脊尾白虾基因组 DNA 甲基化的影响\*

秦桢<sup>1,2</sup> 李吉涛<sup>2①</sup> 李明栋<sup>2</sup> 王佳佳<sup>2</sup> 葛倩倩<sup>2</sup> 刘萍<sup>2</sup> 李健<sup>2</sup>

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

**摘要** 为探讨盐碱水环境对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)基因组 DNA 甲基化的影响,本研究利用 MethylRAD-Seq 技术探究了长期盐碱水养殖组(SAS)和正常海水养殖对照组(SW)脊尾白虾鳃组织中的 DNA 甲基化水平,并对关键通路和基因进行了差异表达分析。结果显示,脊尾白虾鳃组织基因组中 CG 和 CWG 位点(W=A 或 T)分别检测到 2 347 003 和 416 176 处甲基化,甲基化普遍存在于基因组的基因间区和内含子区域,共筛选到 8805 个(8189 个 CG-DMSs 和 616 个 CWG-DMSs)差异甲基化位点,盐碱水环境下 DNA 甲基化水平略有增强。通过 KEGG 富集分析发现,DMS 所在差异表达基因显著富集在 HIF-1 信号通路和剪接体通路,通路中 *hif-p*、*hk* 和 *sf3b1* 等关键基因在脊尾白虾盐碱水环境适应中可能发挥着重要作用;对 SW 和 SAS 组差异甲基化基因(DMG)进行筛选,得到 158 个 CG-DMGs 和 94 个 CWG-DMGs,其中,富集到脂质代谢和囊泡介导的转运通路中的 DMG 最多;此外,有一些 DNA 甲基化位点与基因表达呈负相关,表明 DNA 甲基化与基因调控之间存在复杂的联系,大部分基因组 DNA 甲基化对基因表达有正调控效应。本研究结果首次分析了在盐碱水环境下脊尾白虾鳃组织的 DNA 甲基化水平特征,为解析甲壳类盐碱水环境适应机制提供了基础信息。

**关键词** 脊尾白虾; 盐碱水环境; DNA 甲基化; 差异表达基因

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0033-18

受气候、地形等自然和人为因素的影响,全球土壤和水的盐渍化程度正在增加(常玉梅等, 2021)。据研究推测,这些地区在未来将日趋扩大,严重威胁水产养殖的发展空间(张建峰, 2008)。目前,已有大量研究集中在盐碱地管理和盐碱水对水生动物(包括甲

壳类)的毒性影响(Arooj *et al*, 2021; Chen *et al*, 2020; Conrado *et al*, 2017; 杨富亿等, 2004)。为促进盐碱地水产养殖的发展,对一些适应性较强的品种开展了盐碱地池塘养殖,例如耐盐碱鱼类、广盐性鱼类和虾蟹类等,目前应用于盐碱水规模化养殖的品种包括罗非

\* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900404-03)、国家自然科学基金项目(32072974)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900404-03), National Natural Science Foundation of China (32072974), China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 秦桢, E-mail: 1285946211@qq.com

① 通信作者: 李吉涛, 研究员, E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-10, 收修改稿日期: 2022-04-07

鱼(*Oreochromis mossambicus*)、梭鲈(*Sander lucioperca*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等(徐文龙等, 2021; 来琦芳等, 2021)。对鱼类耐盐碱机制的研究主要集中在生理和分子调控机制(渗透压调节、氨氮代谢、激素调节等方面, 而对甲壳动物耐盐碱的研究则主要集中在对碱度胁迫的耐受能力及其生理变化(常玉梅等, 2021)。然而, 目前对甲壳类动物耐盐碱的分子机制尚不清楚。

越来越多的证据表明, 表观遗传学调控机制在生物对环境胁迫后的适应性调控过程中占据着至关重要的地位(Xu *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021)。研究发现, 生物体可以通过 DNA 甲基化调节当代和后代的环境适应能力, 比如对低氧、低盐、盐碱等环境胁迫的适应(Wang *et al.*, 2021; 王会等, 2017; 环朋朋等, 2019; Su *et al.*, 2020)。在甲壳动物中, 有学者开展关于 DNA 甲基化对其生长发育、防御生物和非生物胁迫(包括热应激、盐度、重金属等)的影响。例如, 薛蓓等(2017)研究了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 4 个生长发育阶段线粒体基因组的甲基化水平, 发现脊尾白虾通过甲基化调节能量代谢影响机体的生长发育进程。热应激下, 卤虫(*Artemia*)和海鞘(*Didemnum vexillum*)的胞嘧啶甲基化导致基因的差异表达(Norouzitalab *et al.*, 2014; Hawes *et al.*, 2018)。Lovett 等(2001)研究发现, 甲基法尼酯(methyl farnesoate)能够调节岸蟹(*Carcinus maenas*)机体渗透压, 使其适应盐度变化很大的河口环境。年龄、取样地点、水温、禁食和镉暴露均能显著影响淡水钩虾(*Gammarus fossarum*)基因组胞嘧啶的甲基化水平(Cribiu *et al.*, 2018)。

脊尾白虾俗称海水小白虾、白米虾, 是我国东部沿海广温广盐的重要中小型经济虾类, 以黄、渤海产量最高, 年产量数千吨(Ge *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2020)。近年来, 脊尾白虾养殖业迅速扩大, 成为促进我国沿海渔业经济发展的重要品种(柳飞等, 2016; 李明栋等, 2021)。在滨海盐碱水试养脊尾白虾过程中, 发现脊尾白虾虽然能够正常生存, 但其生长及繁殖能力在高碳酸盐碱度下明显降低(Ge *et al.*, 2019; 柳飞等, 2016)。开展脊尾白虾盐碱适应机制解析, 对耐盐碱良种培育和盐碱水养殖具有重要意义。本研究利用河北沧州养殖基地脊尾白虾耐盐碱品系和山东日照试验基地脊尾白虾“黄育 1 号”作为研究对象, 利用高效、低成本全基因组 DNA 甲基化检测技术(MethylRAD-Seq)对脊尾白虾鳃组织 DNA 甲基化水平进行分析, 筛选与盐碱胁迫相关的关键基因和重要甲基化位点, 旨在为解析脊尾白虾适应盐碱水环境的分

子机制提供基础数据, 为甲壳类盐碱适应机制研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究用脊尾白虾“黄育 1 号”养殖于山东省日照海辰水产有限公司正常海水中(盐度 25、pH 8.2、碳酸盐碱度 2.0~3.0 mmol/L), 脊尾白虾耐盐碱品系养殖于河北沧州滨海型盐碱水中(盐度 15~20、pH 8.3~9.2、碳酸盐碱度 3.5~8.0 mmol/L)。根据实验目的, 正常海水养殖对照组(SW)取自日照养殖的“黄育 1 号”健康成虾, 长期盐碱水养殖组(SAS)为 2019 年“黄育 1 号”引入河北沧州滨海型盐碱水选育 3 代的成虾个体。实验用脊尾白虾体长为(5.65±0.50) cm, 体重为(1.52±0.38) g, 随机选取体质健康、活力良好的个体。进行实验前 3 d 停止喂食, 待虾状态稳定后解剖其鳃组织于-80℃下保存。SW 和 SAS 组分别取 6 个生物平行, 每个平行 3 份鳃组织, 各组织样品分别标记为 SW1~3 和 SAS1~3, 用于后期 DNA 和总 RNA 提取。

### 1.2 DNA 提取和文库构建

采用 TIANamp Marine Animals DNA Kit (TIANGEN)提取 DNA, 利用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)和 1%琼脂糖检测 DNA 质量、浓度和完整性。利用修饰依赖性内切酶 *FspEI* 5U 于 37℃酶切 4 h 消化基因组 DNA, 按照 10 μL 酶切产物与 0.80 μL 特异性接头、1 μL 10×T<sub>4</sub> ligase buffer、1 μL 10 mmol/L ATP 和 2 μL T<sub>4</sub> DNA ligase (400 U/μL)的比例混合, 加超纯水使总体积为 20 μL。4℃连接 6~8 h, 连接产物经特异性引物反应扩增, 反应条件: 98℃初始变性 30 s, 98℃ 20 个循环变性 5 s, 60℃退火 20 s, 72℃片段延伸 10 s。每个样品平行扩增 3 管, 用于后续回收目的片段。取 3 μL PCR 产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶进行非变性电泳检查。然后按照制造商说明将 PCR 产物用 SteadyPure Agarose Gel DNA Purification Kit (Accurate Biotechnology Co., Ltd)进行切胶回收。利用 QIAquick PCR Purification Kit 和 Qubit 对 PCR 产物进行纯化和定量, 基于 MethylRAD 技术构建标签文库, 由上海欧易生物医学科技有限公司采用 Illumina SE sequencing (50 bp)测序平台进行文库测序。

### 1.3 数据处理与统计分析

1.3.1 原始数据的质控 利用 Illumina 测序平台

得到的原始图像数据文件经碱基识别转化为原始测序序列(raw reads)。在组装之前,通过预处理(随机截取 103%的数据,去除距 5'或 3'端 13~17 bp 的片段、有待检测酶切位点的片段和低质量片段)对原始数据进行过滤与质控,得到各样品的高质量的有效数据(clean reads),进行后续的数据分析。

**1.3.2 甲基化位点水平的定量** 以本课题组前期组装的脊尾白虾全基因组序列为参考基因组(数据尚未发表),使用 Bowtie 2 软件(V2.3.4.1)对 clean reads 进行比对,参数设置为: --no-unal。比对完成后,去除能够同时比对到参考序列的多个位置的 reads,采用 RPM (reads per million)为单位对甲基化位点水平进行定量,计算公式为位点甲基化水平定量值=位点覆盖 reads 数/文库高质量 reads $\times 1\ 000\ 000$ 。根据比对结果,统计 CG 位点( $C^mCGG$ 、 $G^mCGG$ 、 $C^mCGA$ 、 $A^mCGG$ 、 $C^mCGC$ 、 $C^mCGT$ 、 $T^mCGG$  和  $G^mCGC$ )和 CWG 位点( $^mCAG$  和  $^mCTG$ )的数目、电子酶切位点数目及 reads 深度,从而描绘整条染色体上 2 种位点的分布情况。

通过修饰依赖型核酸内切酶(*FspEI* 酶和 *LpnPI* 酶)进行电子酶切,识别 C5-甲基化胞嘧啶(5-mC)和 C5-羟甲基化胞嘧啶(5-hmC),得到一个 30 bp (28~37 bp)左右的酶切片段。图 1 为 *FspEI* 酶和 *LpnPI* 酶的酶切位点示意图。对于  $^mCG$  位点,只选择 *FspEI* 酶的  $C^mCGG$  位点和 *LpnPI* 酶的 8 种比较稳定的 CG 位点进行下游数据分析(Boers *et al.*, 2018); 对于  $^mCHG$  (H 代表简并碱基 A、C、T)位点,*FspEI* 酶和 *LpnPI* 酶都采用  $^mCAG$  和  $^mCTG$  结果,用 CWG 表示(W 代表简并碱基 A、T)。

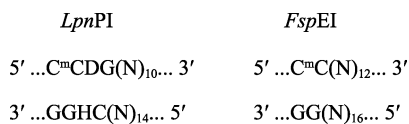


图 1 *LpnPI* 酶和 *FspEI* 酶的酶切位点

Fig.1 Cleavage sites of *LpnPI* and *FspEI* enzyme

**1.3.3 甲基化位点注释及分布** 根据甲基化位点的位置信息,使用 SnpEff 软件(V 4.1.g)位点进行注释,给出每个位点所在的基因元件以及位点注释的详细信息,利用 bedtools 软件(V 2.25.0)统计各个样品中不同基因元件中甲基化位点的分布情况,进一步选取基因转录起始位置(TSS)上下游各 2 kb 区段,转录终止位置(TTS)上下游各 2 kb 区段及基因体(genebody),将分布在不同区域的每个基因的序列均分为多个窗口,统计每个窗口的 RPM 值,将所有基因相同窗口的 RPM 值取平均,作为该窗口的 RPM 值,描述测序 reads 在上述区段的分布趋势。

**1.3.4 甲基化位点的差异分析** 将各个样本的 base mean 值作为测序深度的表达量估算值,利用 DESeq 包(V 1.36.0)对测序深度进行标准化处理,计算差异倍数,并采用负二项分布检验对 reads 数进行差异显著性检验,以此来筛选差异甲基化位点(DMS)。默认  $P < 0.05$  且差异倍数(fold change)大于 2 为筛选差异的条件。使用 bedtools 软件对各个比较组中不同基因元件中甲基化位点的分布情况进行统计。记录 DMS 的分布,并统计 DMS 在不同基因功能元件上的分布。统计 DMS 的甲基化水平,用以描述 DMS 所在基因的甲基化水平,获得 DMS 所在差异表达基因(DEG)。根据 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)数据库进行 GO 和 KEGG pathway 功能和富集分析。 $P < 0.05$  的 GO term 被认为是显著富集, Benjamini-Hochberg 多重检验校正所有  $P$  值以获得 FDR。

**1.3.5 基因水平的甲基化差异分析** 以某一基因内的所有甲基化位点水平之和代表该基因的甲基化水平,对 SW 和 SAS 两组样品进行组间比较。同样计算差异倍数,利用负二项分布检验的方式对基因进行差异显著性检验,最终根据差异倍数及差异显著性检验结果来筛选差异甲基化基因(DMG)。由 DMG 组成基因集,根据 GO 和 KEGG 数据库进行 GO 和 KEGG pathway 功能和富集分析。

**1.3.6 通过 qRT-PCR 验证差异甲基化基因和差异表达基因** 利用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取鳃组织样本的总 RNA,经核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。按照 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (Vazyme)说明书进行 RNA 反转录,合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行引物的验证和后续 2 组脊尾白虾鳃组织的甲基化特征分析。为了验证由 MethylRAD-seq 确定的脊尾白虾鳃组织中 DMS 相关的 DEG,选取显著富集的 KEGG 通路相关的 12 个 DEGs 进行了 qRT-PCR 分析。用于 qRT-PCR 分析的 mRNAs 引物见表 1。以 18S 为内参,引物序列如下:5'-TATACGCTA GTGGAGCTGGAA-3'和 3'-GGGGAGGTAGTGACGA AAAAT-5' (李美玉等, 2012; Wang *et al.*, 2015)。在 7500 fast Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems)中,使用 SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)进行 qRT-PCR。取每个时间点的 3 个转录组样本进行 qRT-PCR,每个生物重复进行 3 个技术重复。使用 CT 方法( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )计算目的基因的相对表达量(Tapia *et al.*, 2017)。

表1 用于 qRT-PCR 分析的 mRNA 引物

Tab.1 Primers of mRNAs used for the qRT-PCR analysis

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')
HIF-P-F	GCTGCGAGTGTGAATCTGAAGGAG
HIF-P-R	AAACCCGTCAAACCGACCGAATC
HK-F	CGATACCACAGGCACGCTCATG
HK-R	CCAATTCGCCGTCCACAGTTC
mTOR-F	CTCCACAGCGAAGACTCCACAAC
mTOR-R	AACCGTCTCAGCCACTCTAGCC
SLC2A1-F	GGTGAGATGAGAAACGAGGCAGAAG
SLC2A1-R	ACAAGAGGGATGCGAAGAGTAGGG
PLK1-F	GCGTCTTCTACTTCTTGCCTCAC
PLK1-R	TCACTGCCTCCTTGTTCTTCATTGG
CPEB2-F	TACCTGTGCGTGTCTCTCTCTAC
CPEB2-R	CCAATGGAAGCGAGGCATCAAGG
STAG2-F	ACAGCAGTCACAGCAGCAACAG
STAG2-R	TCTGGTTCTGGCTCTGGCTCTG
CDC5-F	TGGACGAGGACGAGTTGGAGATG
CDC5-R	CCTTCCGCTTCGCCTTCTTTC
SNRP70-F	CTCGGAGGTTAGGAGGAGGATTGG
SNRP70-R	CGTTCTTCTTCTCGCCACTTCC
PRP19-F	ACGCCACAGTCTTCAACAAGGATAC
PRP19-R	ATGCCGTGATGATCGTGTCTTCTG
SF3B1-F	ATCGCAGAGCCAGTTTAGCAAGAC
SF3B1-R	CGTAGTATCCACCGCCATCCAATC
WBP11L-F	CCTCCCTCATCCTCCAGGTGTTT
WBP11L-R	AGGCATACGCATATTTGGCAGTCTC

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 甲基化测序结果统计

对 SAS 和 SW 的 6 个样本进行 MethylRAD 测序和数据统计, 测序结果显示, 平均每个样本获得 184 868 782 条原始数据。对完成过滤质控的 CG 和 CWG 位点进行酶切, 共获得 55 642 471 条有效数据, 占总 reads 的 35.04%~37.49%。统计每条 scaffold 上各种酶切位点的数目, 每组有效数据平均 88.71% 可比对到脊尾白虾的参考基因组, 共有 22 633 946 条有效数据在参考基因组上有唯一比对位置, 具体测序信息见表 2。

### 2.2 组间甲基化位点的分布统计

根据参考基因组比对结果, 统计 6 个样品筛选到的甲基化位点数目及平均测序深度, 在 SW 组的 3 个样品中平均发现 377 441 和 64 655 个 CG 和 CWG 型 DNA 甲基化位点, 平均甲基化位点覆盖深度分别为 7.990 和 5.203 (表 3)。在 SAS 中共发现 404 893 个和 74 071 个 CG 和 CWG 型 DNA 甲基化位点, 平均甲基化覆盖率分别为 7.986 和 5.183, 每个样本 DNA 甲基化位点(CG 位点和 CWG 位点)的测序覆盖深度见表 3。此外, 与 SW 相比, SAS 中 CG 处的 DNA 甲基化水平增加了 0.05%, CWG 处的 DNA 甲基化也增加了 0.38%。这些结果表明, 对于脊尾白虾鳃组织来说, <sup>m</sup>CG 二核苷酸的胞嘧啶上发生突变是甲基化的主要表现形式, 同时盐碱胁迫下, 脊尾白虾鳃组织基因组的甲基化水平有所升高。

表2 MethylRAD 文库测序数据统计

Tab.2 Statistics of sequencing data of MethylRAD library

组别 Group	样品 Sample	原始数据 Raw read	有效数据 Clean read				
			序列数 Reads	比例 Percent /%	有唯一比对位置的 有效数据 Uniquely mapped	发生多处比对的 有效数据 Multiple mapped	总比对率 Total mapped ratio /%
SAS	SAS-1	258013252	56 801 958	37.31	3 965 172	48 917 135	93.10
	SAS-2	202778144	55 726 626	36.77	3 906 407	47 987 465	93.12
	SAS-3	167325972	53 840 219	35.04	3 774 226	46 421 647	93.23
SW	SW-1	171218800	56 649 706	36.95	4 073 188	48 718 005	93.19
	SW-2	159829202	54 588 993	35.48	2 986 379	33 270 835	66.42
	SW-3	150047320	56 247 324	37.49	3 928 574	48 500 524	93.21

根据甲基化位点的位置信息, 对位点进行注释, 发现这些 DNA 甲基化位点主要分布在 5'端的核酸区、外显子、基因区、基因间区、内含子、剪接位点、3'端的核酸区域, CG 型甲基化位点在不同功能元件

上的分布数量均显著多于 CWG 型, 但 CG 和 CWG 两种类型位点的分布趋势基本一致, 基因间区中分布的甲基化位点比例最高, 其次是内含子区。总之, 盐碱胁迫导致基因组功能组成元件中 CG 和 CWG 位点

分布具有重叠变化(图 2)。统计 reads 在转录起始位置(TSS)上下游各 2 kb 区段, 转录终止位置(TTS)上下游各 2 kb 区段和基因体的分布趋势, 结果发现各个样品之间的 DNA 甲基化水平趋势是相似的, DNA 甲基化位点多分布在基因体, DNA 甲基化位点分布曲线在 TSS 的下游序列和 TTS 的上游序列甲基化标签频率明显高于其他序列(图 3)。

### 2.3 差异甲基化位点表达分析

测序深度信息进行标准化处理后, 分别筛选到 8189 个和 616 个 CG 型差异甲基化位点(CG-DMSs) 和 CWG 型差异甲基化位点(CWG-DMSs) (图 4)。CG-DMS 和 CWG-DMS 大多数分布在基因间区和内

含子区, DMS 在不同功能元件上的分布详情见图 5A 和 B。可以看出 CG-DMS 的数目显著多于 CWG-DMS, 基因间区和内含子区筛选到的 DMS 占较大比例。

### 2.4 位点水平的甲基化差异分析

对 DMS 所在的差异表达基因(DEG)进行 GO 功能富集分析, 分析了 CG 和 CWG 甲基化水平中 DEG 最显著丰富的前 30 条 GO terms。分析基于筛选 3 个类别中具有 2 个以上不同表达位点相关基因的 GO 条目, 根据每个条目对应的 $-\log_{10}P$  从大到小排序 10 个, 分为生物过程、细胞成分和分子功能。在 CG-DEG 中, 最显著富集的 GO term 包括 RNA 剪接(RNA splicing)、剪接体复合体(spliceosomal complex)和 ATP

表 3 甲基化位点数据及其深度统计  
Tab.3 Statistics of methylation site data and depth

组别 Group	样品 Sample	CG site		CWG site	
		CG 位点数目 CG site number	CG 位点深度 CG site depth	CWG 位点数目 CWG site number	CWG 位点深度 CWG site depth
SAS	SAS-1	407 998	8.110	73 021	5.390
	SAS-2	398 533	8.160	72 723	5.350
	SAS-3	408 149	7.700	76 468	4.870
	Average	404 893	7.990	74 071	5.203
SW	SW-1	405 236	8.430	70 612	5.370
	SW-2	322 023	7.410	54 962	4.890
	SW-3	405 064	8.120	68 390	5.290
	平均 Average	377 441	7.986	64 655	5.183
总和 Total		2 347 003		416 176	

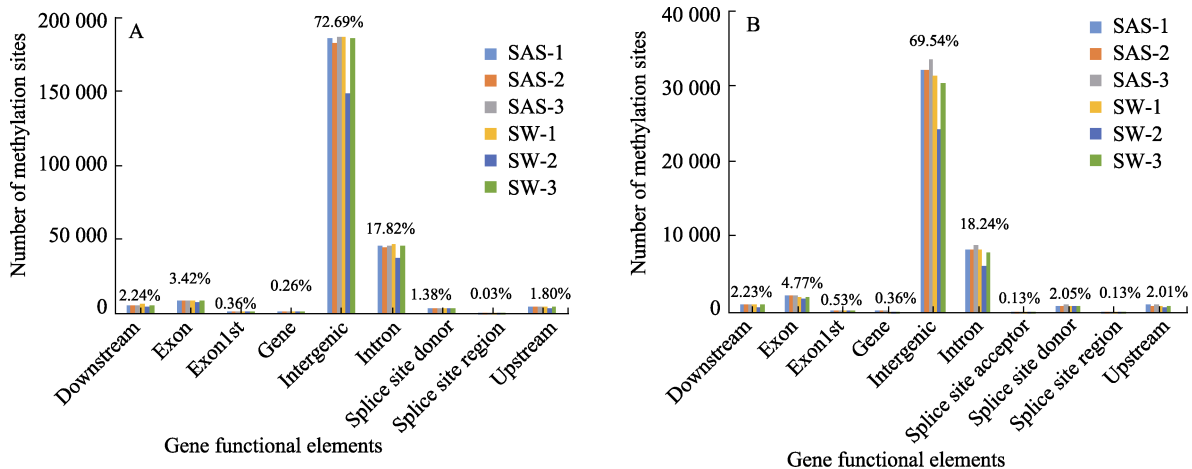


图 2 甲基化位点在不同基因功能元件上的分布  
Fig.2 Distribution of methylation sites on different gene functional elements

A: CG 位点的分布; B: CWG 位点的分布  
A: Distribution of CG methylation site; B: Distribution of CWG methylation site



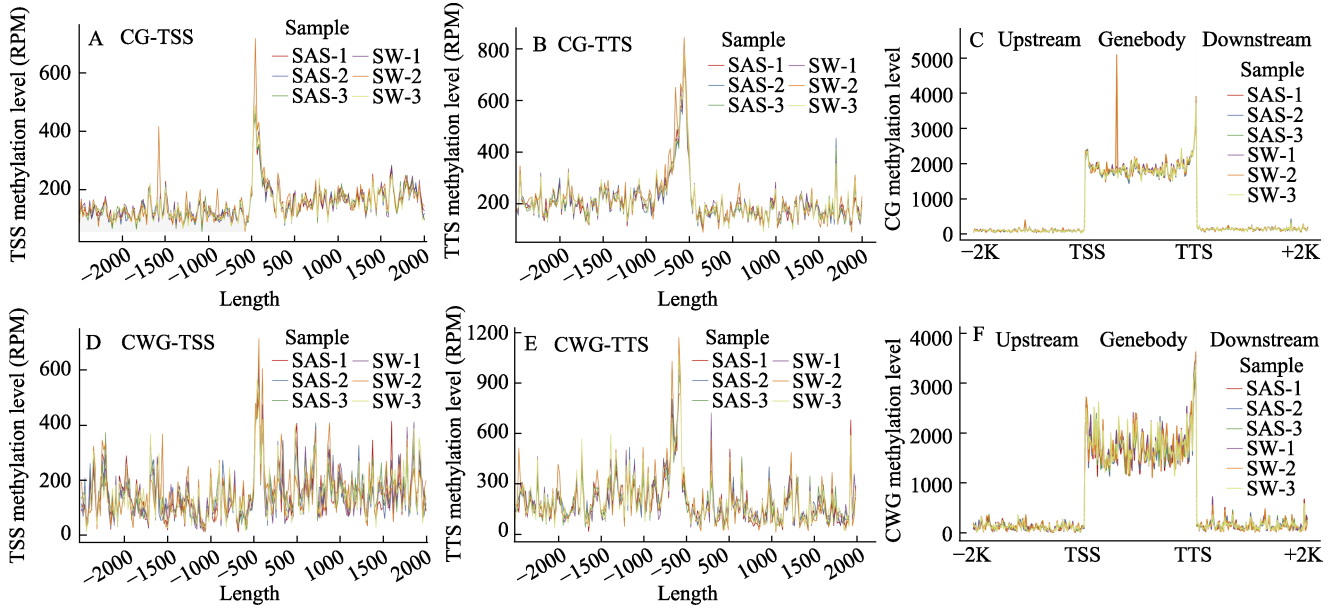


图3 甲基化位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布  
 Fig.3 Distribution of methylation sites in TSS, TTS, and Genebody regions

A: CG 位点在 TSS 的分布; B: CG 位点在 TTS 的分布; C: CG 位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布;

D: CWG 位点在 TSS 的分布; E: CWG 位点在 TTS 的分布; F: CWG 位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布

A: Distribution of CG sites in TSS; B: Distribution of CG sites in TTS; C: Distribution of CG sites in TSS, TTS, and Genebody;  
 D: Distribution of CWG sites in TSS; E: Distribution of CWG sites in TTS; F: Distribution of CG sites in TSS, TTS, and Genebody

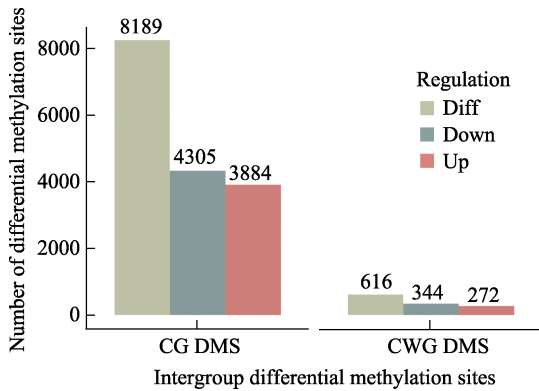


图4 差异甲基化位点统计

Fig.4 Statistical of differential methylation sites

依赖的 5'-3'DNA 解旋酶活性(ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity) (图 6A)。CWG-DEG 的 GO 富集分析结果表明,生物过程、细胞成分和分子功能中最显著富集的 GO term 分别是上皮细胞迁移,开放性气管系统(epithelial cell migration, open tracheal system)、中心体(centrosome)和蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)(图 6B)。

KEGG 通路分析用于筛查 DEG 在 CG 和 CWG 甲基化水平上的生物学通路和信号转导。图 7 显示了 CG-DMG 富集到的前 20 个 KEGG 通路。结果显示,CG-DMG 在 HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、剪接体(spliceosome)、孕酮介导的卵母细胞成熟

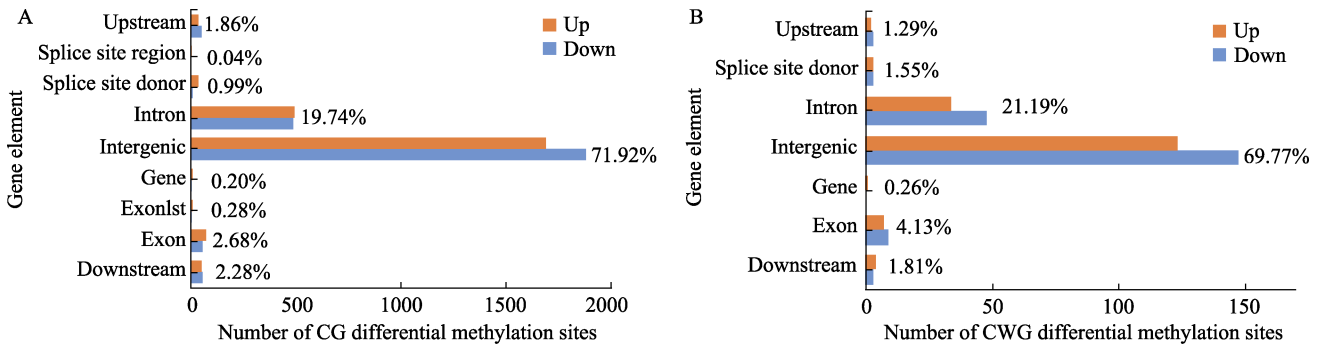


图5 差异甲基化位点在不同基因功能元件上的分布

Fig.5 Distribution of differential methylation sites on different gene functional elements

A: CG 位点的分布; B: CWG 位点的分布

A: Distribution of CG methylation site; B: Distribution of CWG methylation site

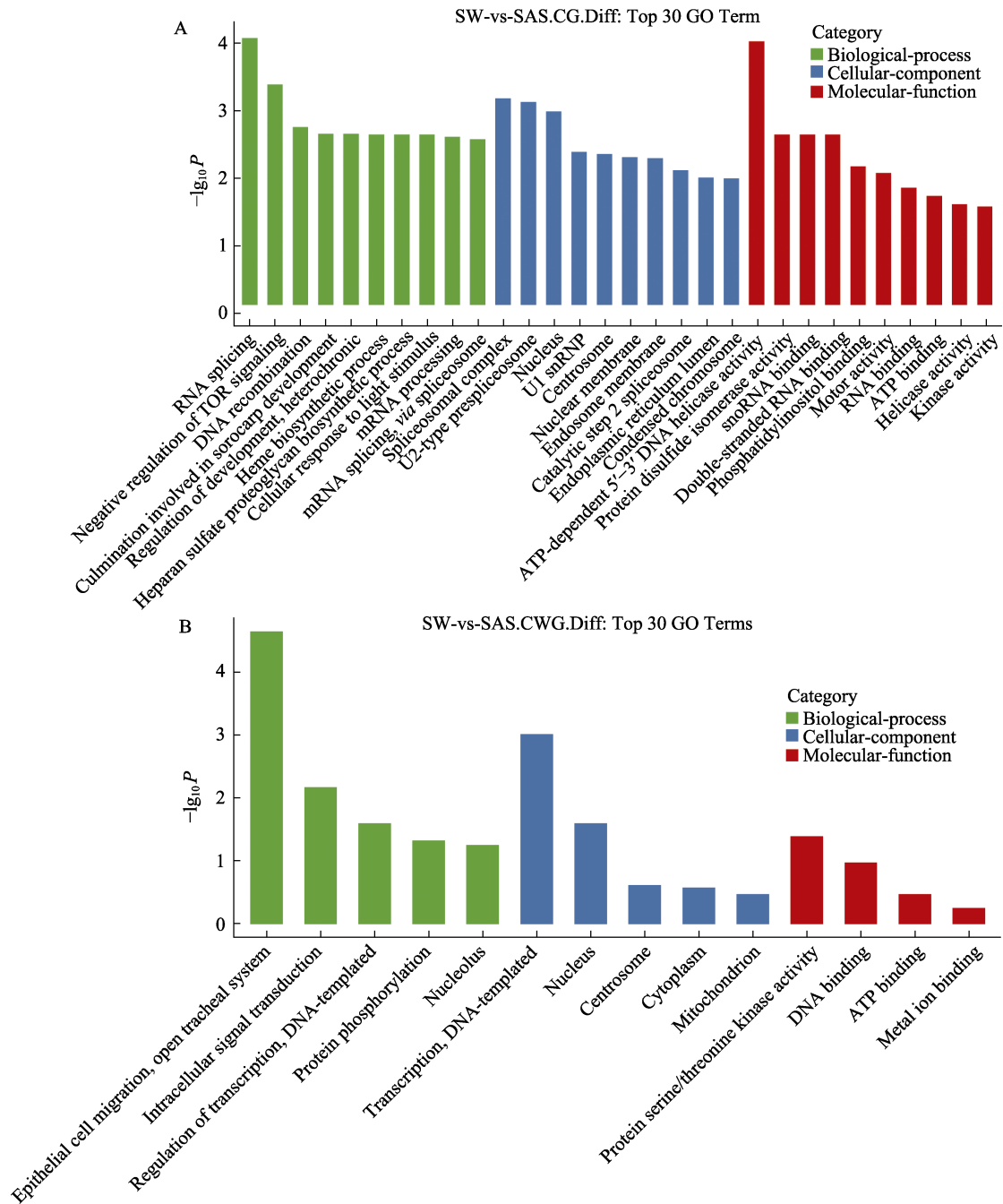


图 6 CG 和 CWG 以及上调和下调差异甲基化位点所在基因的前 30 个 GO 功能条形图  
 Fig.6 Bar chart of the top 30 GO functions of the gene where CG and CWG up and downregulated differential methylation sites are located

A: CG 位点 DEG 的 GO 分类前 30; B: CWG 位点 DEG 的 GO 分类前 30

A: The top 30 GO classification of the DEGs at the CG site; B: The top 30 GO classification of the DEGs at the CWG site

(progesterone-mediated oocyte maturation)、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)和细胞周期(cell cycle)通路显著富集(图 7A)。下调 DEG 在富集剪接体通路,而上调 DEG 在 HIF-1 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂、细胞周期和 cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)显著富集(图 7B, C)。HIF 脯氨酰羟化酶(*hif-p*)、己糖激酶(*hk*)、丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶 mTOR 样(*mTOR*)和溶质载体家族 2 (促进葡萄糖转运蛋白)成员 1 (*slc2a1*)在 HIF-1 信号通路中显著富集上调表达(表 4)。细胞分裂周期 5 样蛋白(*cdc5*)、U1 小核核糖核蛋白(*snrp70*)、前 mRNA 处理因子(*prp19*)、剪接因子(*sf3b1*)、WW 结构域结合蛋白(*wbp11l*)基因参与剪接体途径且显著下调表达(表 4)。

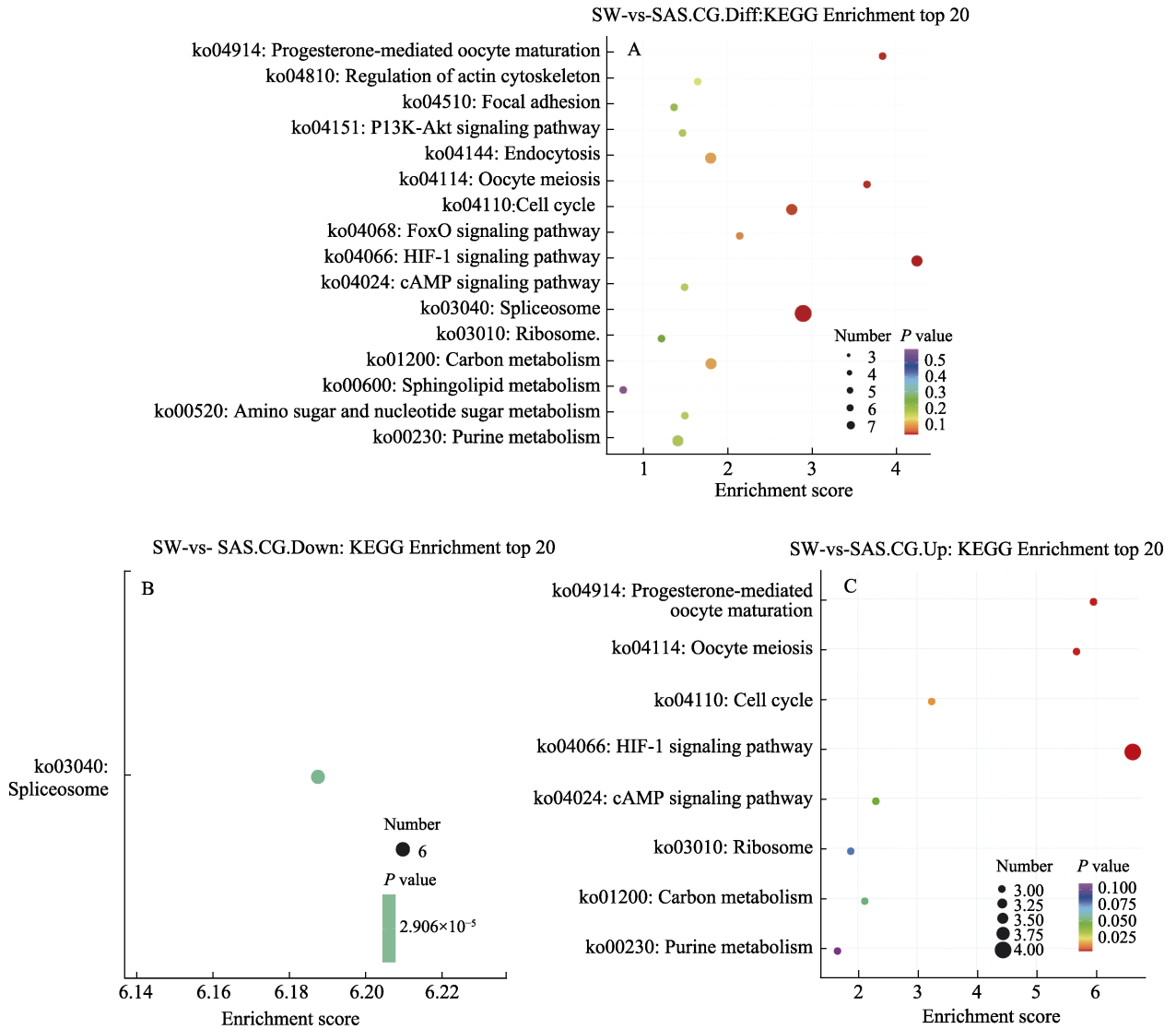


图 7 CG 差异甲基化位点所在基因的前 20 条 KEGG 富集分析

Fig.7 Top 20 KEGG enrichment analyses of the genes where the CG differential methylation sites are located

A: CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20; B: 下调表达 CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20;

C: 上调表达 CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20

A: The top 20 KEGG enrichment analyses of the CG-DEG; B: The top 20 KEGG enrichment analyses of down-regulated expression of CG-DEG; C: The top 20 KEGG enrichment analyses of up-regulated expression of CG-DEG

表 4 HIF-1 信号通路和剪切体通路中差异表达基因

Tab.4 Differentially expressed genes of HIF-1 signaling pathway and spliceosome

ID	KEGG 通路	P	DEG 差异表达基因	log <sub>2</sub> Fold Change
ko04066	HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	0.001 95	HIF 脯氨酰羟化酶( <i>hif-p</i> )	1.438
			己糖激酶( <i>hk</i> )	1.054
			丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 mTOR 样( <i>mTOR</i> )	1.157
			溶质载体家族 2(促进葡萄糖转运蛋白)成员 1-样( <i>slc2a1</i> )	1.855
ko03040	剪切体 Spliceosome	0.002 39	细胞分裂周期 5 样蛋白( <i>cdc5</i> )	-4.385
			U1 小核核糖核蛋白 70kDa 样( <i>snrp70</i> )	-2.386
			前 mRNA 处理因子 19 样( <i>prp19</i> )	-5.462
			剪接因子 3B 亚单位 1 样亚型 X1( <i>sf3b1</i> )	-3.760
			WW 结构域结合蛋白 11 样( <i>wbp11</i> )	-4.831

## 2.5 基因水平的甲基化差异分析

对不同比较组间的差异表达甲基化位点所在基因进行统计, 差异甲基化基因数目见图 8。CG 位点共注释到 12 892 个表达甲基化基因, 其中筛选到

158 个 CG 型差异甲基化基因(CG-DMGs), 包括 77 个(48.73%)上调表达和 81 个(51.27%)下调表达; CWG 位点注释到 8666 个甲基化基因, 其中 94 个显著差异表达, 上调基因 33 个(35.11%), 下调基因 61 个(64.89%)。与 DMS 表达相同, 下调表达基因多于上调表达。

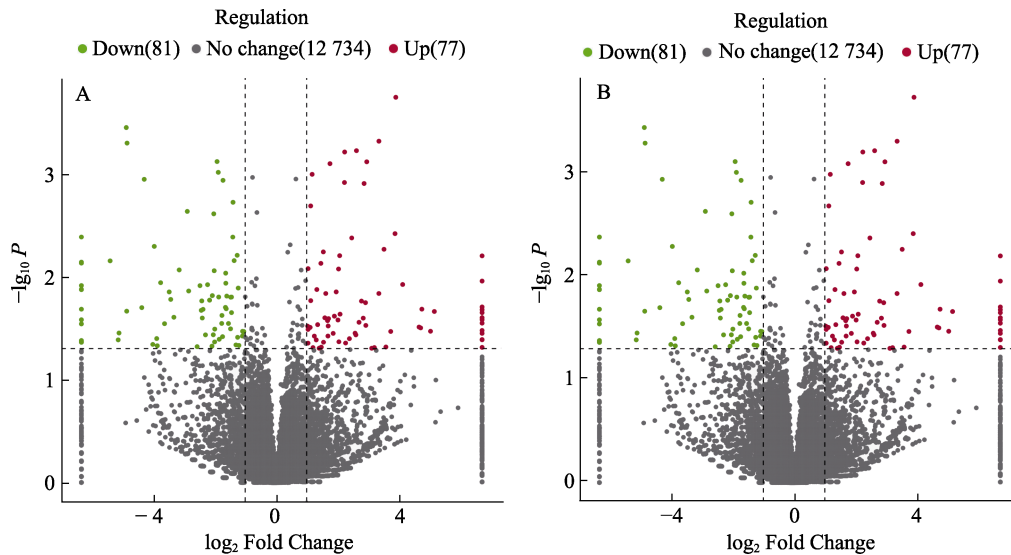


图 8 组间差异甲基化基因火山图

Fig.8 Volcano map of differentially methylated genes between groups

A: CG 型差异甲基化基因分布; B: CWG 型差异甲基化基因分布  
A: Distribution of CG-DMG; B: Distribution of CWG-DMG

通过对差异甲基化基因进行 GO 功能富集, 对基因的功能进行描述。GO 富集分析前 30 如图 9 所示: CG-DMG 在肌肉组织发育(muscle organ development)过程显著富集(图 9A); CWG-DMG 在囊泡介导的转运(vesicle-mediated transport)、细胞膜(membrane)和铁离子结合(zinc ion binding)等离子转运过程中显著富集(图 9B)。

CG-DMG 共富集到 39 条显著富集 KEGG 通路( $P < 0.05$ ), 可分为 5 类, 包括 cellular processes (4 条)、environmental information processing (6 条)、genetic information processing (2 条)、metabolism (16 条)和 organismal systems (11 条)(图 9C)。发现 41% 的相关基因与代谢过程(16 条)相关, 其中脂质代谢通路(6 个)中富集到的基因数目最多(图 9C)。CWG-DMG 富集到 21 条 KEGG 通路, 与 CG 型不同的是, CWG 型缺少 genetic information processing 条目, 大部分基因与生物过程(6 条)相关, 但信号转导通路(4 个)中富集到的基因数目最多(图 9D)。

## 2.6 组间差异甲基化位点在差异甲基化基因上的分布

对 2 组 DMS 和 DMG 进行比对分析, 196 个 CG-

DMSs 对应到 125 个 CG-DMGs 上, 36 个 CWG-DMSs 比对到 34 个 CWG-DMGs (表 5)。基因和甲基化位点表达大部分呈正相关, 但有一少部分位点与基因呈负相关。共 13 个 CG-DMSs 与对应的 9 个 CG-DMGs 呈负相关, 其中, 有 8 个 CG-DMSs 高甲基化而基因表达下调, 5 个 CG-DMSs 低甲基化而基因表达上调, 只有 2 个 CWG-DMSs 与对应的 2 个 CWG-DMGs 呈负相关, 均是高甲基化而基因下调表达(表 6)。对所筛选到的负相关的甲基化位点所在功能元件进行统计, 发现 CG-DMS 和 CWG-DMS 绝大比例分布在基因间区, 仅有 1 个 CG-DMS 分布在内含子区, 具体详情见表 6。

## 2.7 qRT-PCR 验证

为了验证 MethylRAD-seq 检测到的 DMS 所在 DEG 的甲基化水平变化及其在盐碱环境下基因表达水平之间的相关性, 利用 qRT-PCR 分析评估了与 HIF-1 信号通路、剪接体、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂和细胞周期通路相关的 12 个 DEGs。结果显示, 这些基因存在显著差异表达: *slc2a1*、*hif-p*、*mTOR*、*hk*、*cpeb2* 和 *plk1* 上调表

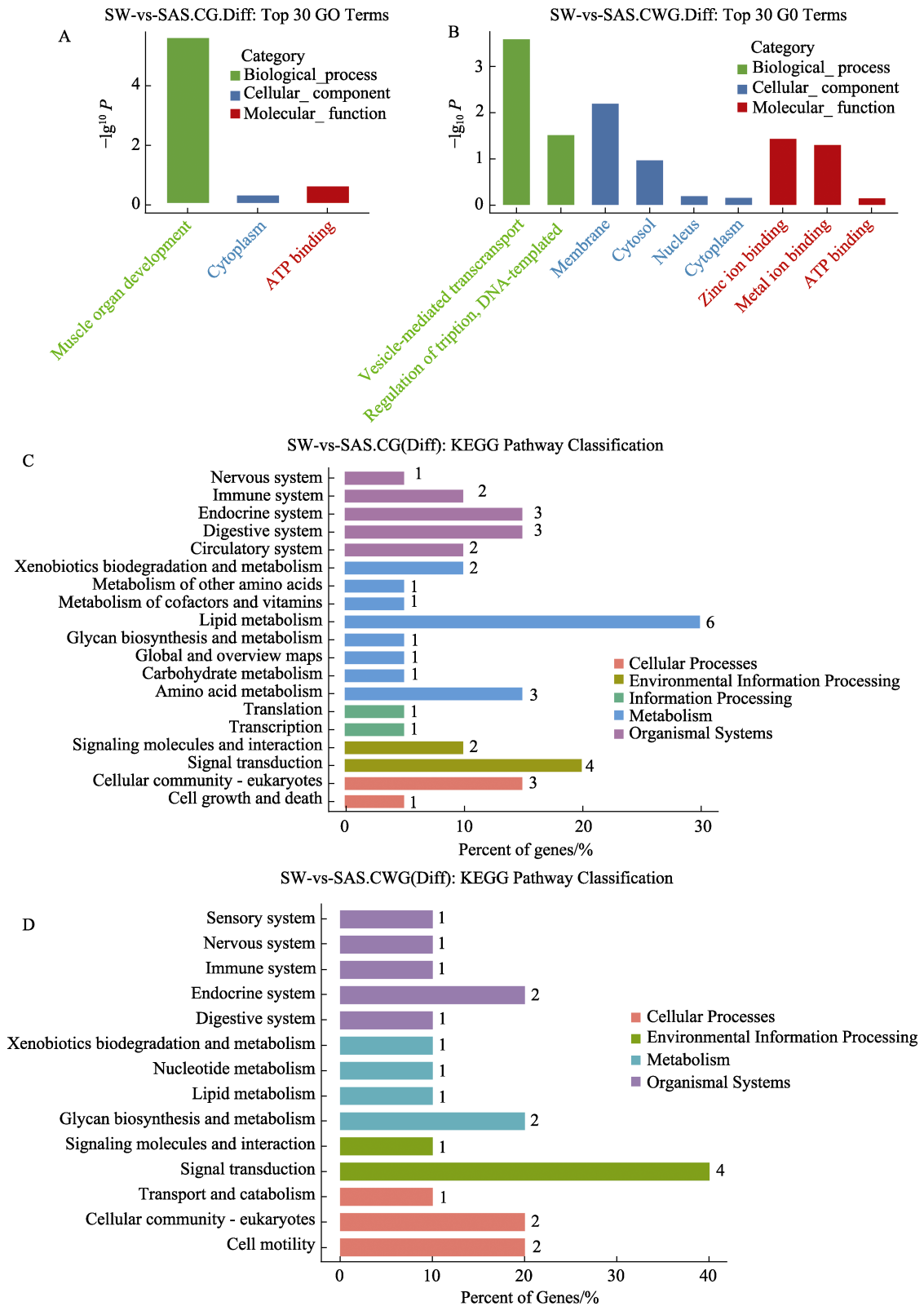


图 9 差异甲基化基因的 GO 功能和 KEGG 通路富集  
Fig.9 KEGG pathway enrichment of differentially methylated genes

A: CG 型差异甲基化基因的 GO 分类; B: CWG 型差异甲基化基因的 GO 分类;  
C: CG 型差异甲基化基因的 KEGG 富集通路; D: CWG 型差异甲基化基因的 KEGG 富集通路  
A: GO functional classification of CG-DMG; B: GO functional classification of CWG-DMG;  
C: KEGG pathway enrichment of CG-DMG; D: KEGG pathway enrichment of CWG-DMG

表 5 差异甲基化位点映射到差异甲基化基因的数量统计  
Tab.5 Quantitative statistics of differential methylation sites mapped to differential methylation genes

项目 Project	CG 位点 CG site		CWG 位点 CWG site	
	总数	有对应比对位置的数量	总数	有对应比对位置的数量
	Total number	Number of mapped	Total number	Number of mapped
差异甲基化位点 Differential methylation genes	8189	196	616	36
差异甲基化基因 Differential methylation sites	158	125	94	34

表 6 差异甲基化位点与差异甲基化基因呈负相关的基因  
Tab.6 Genes with negative correlation between differential methylation sites and differential methylation genes

描述 Description	DMG		DMS		
	Gene ID	表达 Regulation	Site ID	表达 Regulation	区域 Region
CG 解整合素金属蛋白酶 17 ADAM17 protein	000381Fc001671	up	000381F-936652	down	内含子区 Intron
类纤维囊蛋白 Fibrocytin-L-like	000395Fc001730	up	000395F-166381	down	基因间区 Intergenic
细胞色素 P450 Cytochrome P450 2L1-like	002552Fc007693	up	002552F-62412	down	基因间区 Intergenic
预测蛋白 C7M84_002415 Hypothetical protein C7M84_002415	000573Fc002374	up	000573F-136638	down	基因间区 Intergenic
预测蛋白 Hypothetical protein	000936Fc003579	up	000936F-434665	down	基因间区 Intergenic
Fem-1c 蛋白 Fem-1-like C protein	000598Fc002505	down	000598F-317610	up	基因间区 Intergenic
			000598F-450009	up	基因间区 Intergenic
膜金属内肽酶样 1 X2 亚型 Membrane metallo-endopeptidase-like 1 isoform X2	000946Fc003607	down	000946F-237291	up	基因间区 Intergenic
			000946F-238732	up	基因间区 Intergenic
			000946F-543189	up	基因间区 Intergenic
			000946F-545343	up	基因间区 Intergenic
预测非特征蛋白 LOC108670558 Predicted: Uncharacterized protein LOC108670558	001956Fc006376	down	001956F-434970	up	基因间区 Intergenic
钾通道亚家族 K 成员 18 Potassium channel subfamily K member 18-like	004352Fc010744	down	004352F-241655	up	基因间区 Intergenic
CWG 非特征蛋白 LOC113800830 Uncharacterized protein LOC113800830	002598Fc007765	down	002598F-151320	up	基因间区 Intergenic
非特征蛋白 LOC113811415 Uncharacterized protein LOC113811415	005861Fc012964	down	005861F-30651	up	基因间区 Intergenic

达; *stag2*、*snrp70*、*sf3b1*、*wbp11l*、*cdc5* 和 *prp19* 下调表达。长期盐碱水养殖环境使脊尾白虾鳃组织

中这些基因的 DNA 甲基化状态发生显著变化 (图 10)。

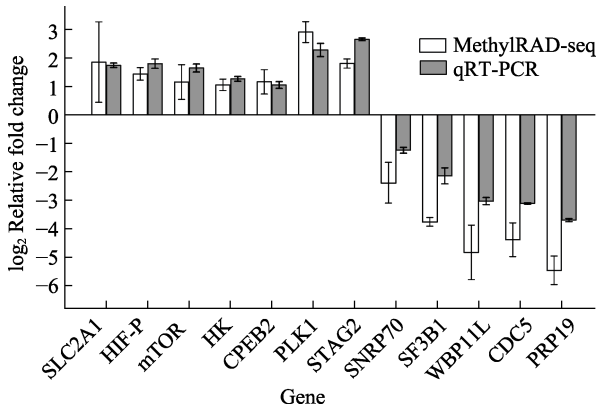


图10 KEGG富集途径中差异表达基因的qRT-PCR结果  
Fig.10 qRT-PCR results of DEGs in the KEGG enrichment pathways

### 3 讨论

DNA 甲基化对真核生物生长发育至关重要, 包括调节配子的形成、早期胚胎发育、细胞分化、衰老和致癌等关键过程(Varriale *et al.*, 2006; 蔡影等, 2018)。无脊椎动物的整体基因组胞嘧啶甲基化水平较低, 甲壳类动物和昆虫相比其他无脊椎动物如软体动物的胞嘧啶甲基化水平更低(Gavery *et al.*, 2013)。本研究中, 通过对正常海水养殖和长期盐碱水养殖的脊尾白虾鳃组织构建 DNA 甲基化文库, 利用 MethylRAD 测序, 发现了一些可能与脊尾白虾鳃组织响应盐碱胁迫的差异甲基化位点及其相关基因和差异甲基化基因。结果显示, SAS 组鳃组织基因组中 CG 和 CWG 位点略有增加, 表明盐碱水环境诱导脊尾白虾鳃组织基因组中 DNA 甲基化升高, 通过激活或抑制某些通路的表达来适应盐碱环境, 在脊尾白虾适应外界环境的变化中发挥着非常重要的作用。环境变化总能引起水生生物 DNA 甲基化的变化, 研究发现, 水环境中化合物和温度等外界环境变化能够引起斑马鱼(*Danio rerio*)和仿刺参(*Apostichopus japonicus*) DNA 甲基化水平升高(陈宏姍等, 2016; Yang *et al.*, 2020)。随着环境条件的变化, 水生生物 DNA 甲基化的水平可能出现趋势性变化, 例如, 随着干露胁迫时间的增长, 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)基因组甲基化水平呈现先增高后降低的趋势; 斑马鱼 ZF4 细胞在短期低温培养时基因组 DNA 甲基化水平明显增高, 但长期低温培养后 DNA 甲基化水平反而下降(张鑫等, 2017; 侯艳雯等, 2019)。也有研究表明, 高温胁迫使得仿刺参、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)和近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) CG 平均甲基化水平显著降低(温争争等, 2021; 吴彪等, 2016; 王翠丽等,

2019)。之前的研究发现, CG 位点在各种物种中显示出较高水平, 范围从虾夷扇贝约 89.5%到仿刺参约 91%(吕佳, 2013; 李玉强等, 2018)。除 CG 外, CWG 甲基化在基因内并不常见, 但在基因组的基因间和内含子区域中更为丰富(Lister *et al.*, 2009)。本研究中, 甲基化位点水平相对定量结果显示, 脊尾白虾 CG 型甲基化与其他海洋无脊椎动物类似, 是甲基化主要的表现形式。

DNA 甲基化水平根据基因组功能元件的不同而变化, 且在基因组的基因间区和内含子区域中更为丰富。研究表明, DNA 甲基化的分布主要分布在基因间、外显子、内含子、下游和上游区域(Saha *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021)。此外, 大量研究发现, 脊椎动物甲基化位点主要在启动子区(promoter)分布, 启动子区 CG 型甲基化水平决定转录水平结果(Xu *et al.*, 1999; Yoder *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2019; 齐云峰等, 2019)。但海洋无脊椎动物香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)、仿刺参等甲基化位点在基因间区和内含子区中更丰富(Rajan *et al.*, 2021; 李玉强等, 2018; 李欣容, 2022)。这与本研究中 CG 和 CWG 位点在不同功能元件中的分布结果相一致。同样, 本研究中, 基因体的甲基化水平高于 TSS 和 TTS。DNA 甲基化会形成不易去除的局部异染色质化状态, 表明基因体具有相对稳定的染色体结构, 抑制转录水平的进行。基因启动子区通常位于 TSS 的上游, 负责基因的表达调控(Jiang *et al.*, 2019)。在人(*Homo sapiens*)体组织中的研究表明, TSS 下游区域的甲基化是基因表达的高度信息。本研究中, 甲基化水平高峰期明显处于 TSS 区下游, 进一步推测脊尾白虾基因间区 CG 型甲基化水平的高低可能影响基因在转录水平的表达, 并且对转录水平抑制表达有着重要作用。在位点水平上对 DEG 进行 GO 分析发现, 这些基因主要分为 3 类 GO terms, 包括生物过程、细胞成分和分子功能。这些功能包括 RNA 剪接、DNA 重组转录调控和 DNA 模板, 表明盐碱胁迫诱导的甲基化变异抗性基因(Ackah *et al.*, 2022)。进一步对 DEG 进行 KEGG 途径富集分析表明, HIF-1 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂、细胞周期和剪接体途径在脊尾白虾鳃组织的盐碱胁迫响应中起关键作用。

鳃是水生动物氧气运输、渗透压调节、离子转运、酸碱调节等的主要组织, 环境因子如盐度、pH、低氧等均可能造成鳃组织损伤, 从而影响呼吸和离子转运等功能(Nikinm, 2014)。缺氧诱导因子 1(HIF-1)是一种碱性螺旋-环-螺旋-PAS 结构域转录因子, 能够调控机体对环境适应性应答(杨梦思等, 2016)。另外,

HIF-1 可增强氧气供给并介导低氧适应性反应。以往的研究发现, 脊尾白虾在低溶氧环境下易诱导 HIF 产生, 从而刺激血液氧的供应能力(曹梅等, 2021)。高盐碱胁迫会改变机体的渗透压和酸碱平衡, 机体不仅能通过离子调控、应激蛋白合成等维持, 也会产生自我调节机制适应环境胁迫(王楠等, 2015)。在高盐胁迫下, 水生生物同样易产生氧化应激及渗透压失衡, Bal 等(2021)观察到高盐水环境中印度囊鳃鲶(*Heteropneustes fossilis*)血红蛋白含量显著下降, 耗氧率升高。在高碱度下, 水环境无法维持罗非鱼机体中足够的溶解氧水平, 最终导致死亡, 若能保持水中充足氧含量, 在高碱度下生物死亡率不会增加(Colt *et al.*, 2013)。本研究发现, *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 在 HIF-1 信号通路中显著富集上调表达。*hk* 作为一种转移酶, 能够催化葡萄糖的磷酸化, 这是葡萄糖代谢的第一步, 并能抑制 ADP (Majewski *et al.*, 2004)。*mTOR* 属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶蛋白家族, 能够促进物质代谢, 参与细胞凋亡、生长、增殖和运动, 调节蛋白质合成和转录(Sarbasov *et al.*, 2005)。同时, qRT-PCR 结果显示, 基因的表达水平同甲基化水平均显著上调, 这意味着 *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 可通过保持高甲基化水平促进其相应靶基因表达以响应盐碱胁迫。

剪接体是由大量蛋白质和小核 RNA 组成的大型核糖核蛋白复合物, 主要存在于真核细胞的细胞核中, 是一种在转录后的初级转录物(Marondedze *et al.*, 2020)。本研究中, *cdc*、*snrp70*、*prp19*、*sf3b1* 和 *wbp11l* 参与剪接体途径并且显著下调表达, 这意味着盐碱胁迫减少了 RNA 过程和蛋白质合成通路。进一步表明, 盐碱胁迫可能通过减少 RNA 的合成, 降低鳃组织的代谢速率以及参与 RNA 剪接的基因的甲基化状态来抑制 RNA 剪接。总之, 这些结果表明, DNA 甲基化可能调节了以上基因以响应盐碱胁迫。我们推测脊尾白虾由于长期生活在盐碱环境, DNA 甲基化水平变化在响应盐碱胁迫中发挥重要作用, 盐碱胁迫致使 HIF-1 信号途径增强, 同时抑制了剪接体的表达, 从而进化出独特的生存机制。

基因水平的 GO 和 KEGG 富集结果表明, 盐碱胁迫不仅影响细胞的生长发育, 还与离子转运有关, 表明脊尾白虾对盐碱有较强的适应性。同时, 本研究发现一些差异甲基化基因在一些信号通路中富集。离子转运相关基因在许多生理功能和细胞过程中影响不同的渗透调节(Cao *et al.*, 2019; Si *et al.*, 2019; Zimmer *et al.*, 2021)。另外, 水生动物对外部非生物环

境的适应不仅有内在的调节, 而且取决于能量的支持(Song *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2020; Root *et al.*, 2021)。脊尾白虾因长期盐碱胁迫而导致脂质过氧化和生理代谢的变化, 本研究中能量代谢通路和脂质代谢通路显著富集, 推测脊尾白虾通过调节鳃组织 DNA 甲基化水平对能量代谢通路和脂质代谢通路的影响适应盐碱水环境。

解整合素金属蛋白酶 17 (ADAM17 protein, ADAM17)是一种跨膜金属蛋白酶, 能够参与多种蛋白质胞外域脱落, 具有黏附和蛋白水解特性, 参与细胞分子、生长因子受体及表皮生长因子受体过程, 在膜结合型蛋白的翻译后修饰中发挥关键作用(王超男等, 2016; Li *et al.*, 2015)。盐碱胁迫后 ADAM17 可能通过低甲基化促进膜结合型蛋白的翻译后修饰, 促进质膜对胞内环境的维持。类纤维囊蛋白(fibrocystin-L-like, FPC-L)是一个单次跨膜的受体样蛋白, 含有一个潜在蛋白激酶 C 磷酸化位点, 胞外区存在被高度糖基化的可能(连培文等, 2011)。盐碱胁迫下脊尾白虾鳃组织中 FPC-L 可能发生糖基化, 对翻译后蛋白进行了修饰, 从而适应盐碱环境。细胞色素 P450 (cytochrome P450 2L1-like, CYP450)主要分布在内质网和线粒体内膜上, 能够参与环境化合物在内的外源性物质(在类固醇/甾醇)的代谢(Ventura *et al.*, 2017)。盐碱水环境中, CYP450 可能诱导脊尾白虾鳃组织细胞凋亡, 内质网和线粒体相关的凋亡途径可能发挥了重要的作用。本研究中, 我们发现 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 呈现出低甲基化状态。然而, 对应的差异甲基化基因却显示表达水平在盐碱环境下显著升高, 这表明 DNA 甲基化可能通过激活蛋白激酶和防御化合物来诱导脊尾白虾中 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 的调节以适应盐碱水环境。

## 4 结论

本研究通过对正常海水养殖和长期盐碱水养殖脊尾白虾的甲基化水平比对分析发现, 盐碱水环境下 DNA 甲基化水平略有增强, 甲基化位点丰富呈现在基因间区和内含子区域并且在 TSS 区下游出现甲基化水平高峰期。分析了脊尾白虾鳃组织在 2 种养殖水环境中位点和基因水平的富集通路及组间 DMS 和 DMG 的表达情况, 提示 *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 基因共同参与的 HIF-1 信号通路和 *cdc*、*snrp70*、*prp19*、*sf3b1* 和 *wbp11l* 基因共同参与的剪接体通路可能在脊尾白虾盐碱水环境适应中发挥重要作用。进一步研究参与 HIF-1 信号通路和剪接体通路的基因



表达情况,为揭示脊尾白虾盐碱水环境适应机制提供新的见解。位点水平和基因表达呈负相关的 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 可作为后期解析脊尾白虾盐碱水环境下表观调控的重点研究对象。因此,该研究将为揭示盐碱水环境对脊尾白虾的影响提供新的理论依据。

## 参 考 文 献

- ACKAH M, GUO L, LI S, *et al.* DNA methylation changes and its associated genes in mulberry (*Morus alba* L.) Yu-711 response to drought stress using MethylRAD sequencing. *Plants* (Basel), 2022, 11(2): 190
- AROOJ F, SADDAM H, SADAM H, *et al.* Differential morphophysiological, biochemical, and molecular responses of maize hybrids to salinity and alkalinity stresses. *Agronomy*, 2021, 11(6): 1150
- BAL A, PATI S G, PANDA F, *et al.* Low salinity induced challenges in the hardy fish *Heteropneustes fossilis*: Future prospective of aquaculture in near coastal zones. *Aquaculture*, 2021, 543(8): 737007
- BOERS R, BOERS J, HOON B D, *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme *LpnPI*. *Genome Research*, 2018, 28(1): 88–99
- CAI Y, MENG X L, LIU P, *et al.* Molecular cloning of the DNA methyltransferase-2 gene and its expression during embryonic, larval, and gonadal development in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 928–935 [蔡影, 孟宪亮, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹甲基转移酶 2 基因克隆及在胚胎、幼体和性腺发育过程中的表达分析. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 928–935]
- CAO J, SHI F. Comparative analysis of the aquaporin gene family in 12 fish species. *Animals* (Basel), 2019, 9(5): 233
- CAO M, WANG X Q, QIN C X, *et al.* Transcriptome analysis of *Palaemon carinicauda* subjected to hypoxic stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 112–123 [曹梅, 王兴强, 秦传新, 等. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 112–123]
- CHANG Y M, LIANG L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 798–812 [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展. *水产学报*, 2021, 45(5): 798–812]
- CHEN H S, SHENG L X, BIAN H F. Investigation of the effects of developmental toxicity and genomic DNA methylation upon naphthalene exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Northeast Normal University (Natural Science)*, 2016, 48(3): 167–173 [陈宏姗, 盛连喜, 边红枫. 化合物萘对斑马鱼发育毒性及基因组 DNA 甲基化影响的研究. *东北师大学报(自然科学版)*, 2016, 48(3): 167–173]
- CHEN M M, ZHANG S R, WU L P, *et al.* Organic fertilization improves the availability and adsorptive capacity of phosphorus in saline-alkaline soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2020, 21(1): 487–496
- COLT J, KROEGER E. Impact of aeration and alkalinity on the water quality and product quality of transported tilapia: A simulation study. *Aquacultural Engineering*, 2013, 55(1): 46–58
- CONRADO G V, JANET H B. Effects of alkalinity and total hardness on growth and survival of postlarvae freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Aquaculture*, 2017, 473: 521–527
- CRIBIU P, CHAUMOT A, GEFFARD O, *et al.* Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology*, 2018, 205: 11–18
- FAN Z, PENG F, LI J, *et al.* Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on growth performance, antioxidant capacity and ammonia metabolism against chronic carbonate alkalinity stress in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu). *Aquaculture Research*, 2020, 51(5): 29–40
- GAVERY M R, ROBERTS S B. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ*, 2013, 1: e215
- GE Q Q, LI J T, WANG J J, *et al.* Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(3): 503–515
- GE Q Q, LIANG J P, LI J T, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Relish gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fisheries Science*, 2015, 81(4): 699–711
- HAN J, HU Y, QI Y, *et al.* High temperature induced masculinization of zebrafish by down-regulation of *sox9b* and *esr1* via DNA methylation. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 107(9): 160–170
- HAWES N A, TREMBLAY L A, POCHON X, *et al.* Effects of temperature and salinity stress on DNA methylation in a highly invasive marine invertebrate, the colonial ascidian *Didemnum vexillum*. *PeerJ*, 2018, 6: e5003
- HOU Y W, LIU W, JIANG P L, *et al.* Effect of cold stress on genomic DNA methylation in zebrafish ZF4 cells. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 271–279 [侯艳雯, 刘玮, 姜蓬垒, 等. 低温对斑马鱼 ZF4 细胞基因组 DNA 甲基化水平的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 271–279]
- HUAN P P, LÜ J J, SUN D F, *et al.* The cloning of the PtDNMT1 gene of *Portunus trituberculatus* and its expression analysis in low salinity adaptation. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 92–100 [环朋朋, 吕建建, 孙东方, 等. 三疣梭子蟹 PtDNMT1 基因的克隆及其在低

- 盐适应中的表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 92–100]
- JIANG Y, LI J, REN F, *et al.* PM2.5-induced extensive DNA methylation changes in the heart of zebrafish embryos and the protective effect of folic acid. *Environmental Pollution*, 2019, 255(3): 113331
- LAI Q F, YAO Z L, GAO P C, *et al.* Saline-alkaline water environment and suitable culture species. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [来琦芳, 么宗利, 高鹏程, 等. 盐碱水环境与增养殖种类. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- LI M D, LI J T, SHI K P, *et al.* Estimation of heritability and genetic correlation of saline-alkali tolerance in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 117–123 [李明栋, 李吉涛, 史鲲鹏, 等. 脊尾白虾耐盐碱性状遗传力和遗传相关的估计. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 117–123]
- LI M Y, LI J, LIU P, *et al.* Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2): 306–312 [李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 306–312]
- LI Q, XIE J, HE L, *et al.* Identification of ADAM10 and ADAM17 with potential roles in the spermatogenesis of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Gene*, 2015, 562(1): 117–127
- LI X R, LIAO M J, LI B, *et al.* Genomic DNA methylation levels and transcriptome differences of *Apostichopus japonicus* in response to *Vibrio splendidus* infection and their association analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 176–185 [李欣容, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 176–185]
- LI Y Q, WANG R J, LI Y L, *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* based on MethylRAD-Seq. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(9): 41–50 [李玉强, 王睿甲, 李语丽, 等. 基于 MethylRAD-Seq 技术对仿刺参 DNA 甲基化图谱的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(9): 41–50]
- LI Z Q, TANG M Q, LUO D J, *et al.* Integrated methylome and transcriptome analyses reveal the molecular mechanism by which DNA methylation regulates kenaf flowering. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 709030
- LIAN P W, FU Y L, LI A, *et al.* Preparation and characterization of a polyclonal antibody against human Fibrocystin-L. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 27(1): 78–81 [连培文, 付玉龙, 李奥, 等. 新基因 PKHDL71 产物 Fibrocystin-L 的抗体制备及其亚细胞定位的初步研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 78–81]
- LISTER R, PELIZZOLA M, DOWEN R H, *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462(7271): 315–322
- LIU F, LI J, LI J T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137–1147 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137–1147]
- LOVETT D L, VERZI M P, CLIFFORD P D, *et al.* Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology*, 2001, 128(2): 299–306
- LÜ J. Establishment of an efficient and cost-effective method for genome-wide DNA methylation profiling (MethylRAD-Seq) and its application in marine bivalves. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [吕佳. 高效低成本全基因组 DNA 甲基化检测技术(MethylRAD-Seq)的建立及其在海洋贝类中的应用. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- MAJEWSKI N, NOGUEIRA V, ROBEY R B, *et al.* Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(2): 730–740
- MARONDEDZE C, THOMAS L, LILLEY K S, *et al.* Drought stress causes specific changes to the spliceosome and stress granule components. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 6: 163
- NIKINM A M. Chapter 15 – Interactions between natural environmental factors and toxicity. *An Introduction to Aquatic Toxicology*, 2014: 173–184
- NOROUZITALLAB P, BARUAH K, VANDEGEHUCHTE M, *et al.* Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic *Artemia* model. *FASEB Journal*, 2014, 28(8): 3552–3563
- QI Y F, WANG R J, JIN T C, *et al.* Analyzing distribution patterns of epigenetic factor among different genome regions. *Journal of Northeast Normal University (Natural Science)*, 2019, 51(1): 108–112 [齐云峰, 王仁俊, 金太成, 等. 表观遗传因子在不同基因组区域的分布模式研究. 东北师大学报(自然科学版), 2019, 51(1): 108–112]
- RAJAN K C, YUAN M, YU Z, *et al.* Oyster biomineralisation under ocean acidification: From genes to shell. *Global Change Biology*, 2021, 27(16): 3779–3797
- ROOT L, CAMPO A, MACNIVEN L, *et al.* Nonlinear effects of environmental salinity on the gill transcriptome versus proteome of *Oreochromis niloticus* modulate epithelial cell turnover. *Genomics*, 2021, 113(5): 3235–3249
- SAHA D, NORVIL A B, LANMAN N A, *et al.* Simplified MethylRAD sequencing to detect changes in DNA methylation at enhancer elements in differentiating embryonic stem cells. *Epigenomes*, 2020, 4(4): 24

- SARBASSOV D D, ALI S M, SABATINI D M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(6): 596–603
- SI L J, PAN L Q, ZHANG X, *et al.* Evidence that dopamine is involved in neuroendocrine regulation, gill intracellular signaling pathways and ion regulation in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Biology*, 2019, 222(15): jeb204073
- SONG L, ZHAO Y, SONG Y *et al.* Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2021, 544: 737036
- SU H H, MA D M, ZHU H W, *et al.* Transcriptomic response to three osmotic stresses in gills of hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* female × *O. urolepis hornorum* male). *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 110
- TAPIA D, EISSLER Y, ESPINOZA J C, *et al.* Inter-laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 28: 20–26
- VARRIALE A, BERNARDI G. DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene*, 2006, 385: 111–121
- VENTURA T, BOSE U, FITZGIBBON Q P, *et al.* CYP450s analysis across spiny lobster metamorphosis identifies a long sought missing link in crustacean development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 171: 262–269
- WANG C L. Influence of high temperature stress on Hsp90 expression and CpG methylation in *Crassostrea rivularis*. *Guangxi Sciences*, 2019, 26(4): 424–429 [王翠丽. 高温胁迫对近江牡蛎 Hsp90 表达及 CpG 甲基化的影响. *广西科学*, 2019, 26(4): 424–429]
- WANG C N, DONG J, SHAO N S. Role of ADAM17 in transmembrane protein shedding. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2016, 13(6): 345–349 [王超男, 董洁, 邵宇生. ADAM17 在膜蛋白胞外结构域剪切机制中的作用. *医学分子生物学杂志*, 2016, 13(6): 345–349]
- WANG H, ZHONG J C, CHAI Z X, *et al.* Advances of research on interactions between hypoxia and epigenetics. *Journal of Southwest Minzu University*, 2017, 43(6): 557–561 [王会, 钟金城, 柴志欣, 等. 低氧与表观遗传学互作的研究进展. *西南民族大学学报*, 2017, 43(6): 557–561]
- WANG N, CHANG Y M, TANG R, *et al.* Screening microsatellite markers associated with alkaline tolerance in *Leuciscus waleckii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1105–1114 [王楠, 常玉梅, 唐然, 等. 瓦氏雅罗鱼耐碱性状相关分子标记的筛选. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1105–1114]
- WANG S, LV J, ZHANG L L, *et al.* MethylRAD: A simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes. *Open Biology*, 2015, 5: 150130
- WANG X X, LI A, WANG W, *et al.* Direct and heritable effects of natural tidal environments on DNA methylation in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Research*, 2021, 197: 111058
- WEN Z Z, ZUO S, CHEN M, *et al.* DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 46–54 [温争争, 左闪, 陈梦, 等. 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 46–54]
- WU B, YANG A G, SUN X J, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 140–146]
- XU G L, BESTOR T H, BOURC'HIS D, *et al.* Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 1999, 402(6758): 187–191
- XU W L, WANG H Q, LI Y H. Distribution and aquaculture application of saline alkali water at home and abroad. *China Fisheries*, 2021(7): 50–53 [徐文龙, 汪惠庆, 李月红. 国内外盐碱水域分布及水产养殖应用. *中国水产*, 2021(7): 50–53]
- XU Y H, XU Y C, HOGSTRAND C, *et al.* Waterborne copper exposure up-regulated lipid deposition through the methylation of GRP78 and PGC1alpha of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205: 111089
- XUE B, ZHANG B, LI Z H, *et al.* Methylation profile in mitochondrial genome of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to different developmental stages. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 628–633 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾不同发育期线粒体基因组甲基化特征分析. *水产科学*, 2017, 36(5): 628–633]
- YANG F Y, SUN L M, YANG X Q. Toxicity of carbonate alkalinity to *Penaeus vannamei* juveniles. *Fisheries Science*, 2004, 23(9): 3–6 [杨富亿, 孙丽敏, 杨欣乔. 碳酸盐碱度对南美白对虾幼虾的毒性作用. *水产科学*, 2004, 23(9): 3–6]
- YANG M S, ZHOU N, WANG Z G, *et al.* Research progress on the role of transcription factor HIF-1 $\alpha$  and its signal pathway in the pathogenesis. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 8–13 [杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 $\alpha$  及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 8–13]
- YANG Y, ZHENG Y, SUN L, *et al.* Genome-wide DNA methylation signatures of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during environmental induced aestivation. *Genes*, 2020, 11(9): 1020
- YODER J A, WALSH C P, BESTOR T H. Cytosine methylation

- and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 1997, 13(8): 335–340
- ZHANG J F. Discussion on ecological rehabilitation of salt-affected soils. *Research of Soil and Water Conservation*, 2008, 4: 74–78 [张建锋. 盐碱地的生态修复研究. 水土保持研究, 2008, 4: 74–78]
- ZHANG X, LI Q, YU H, *et al.* Effects of air exposure on genomic DNA methylation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 690–697 [张鑫, 李琪, 于红, 等. 干露胁迫对太平洋牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响. 中国水产科学, 2017, 24(4): 690–697]
- ZIMMER A M, MANDIC M, HONG M Y, *et al.* Use of a carbonic anhydrase Ca17a knockout to investigate mechanisms of ion uptake in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2021, 320(1): R55–R68

(编辑 冯小花)

## Effects of Saline-Alkaline Water Environment on DNA Methylation of *Exopalaemon carinicauda*

QIN Zhen<sup>1,2</sup>, LI Jitao<sup>2①</sup>, LI Mingdong<sup>2</sup>, WANG Jiajia<sup>2</sup>, GE Qianqian<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>

(1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** The global levels of soil and water salinization and alkalization are increasing with the influence of climate and topography changes, as well as other natural and human factors. Saline-alkaline water (SAW) all over the world has specific characteristics such as high alkalinity, high pH, and complex water quality types, which inhibits the survival and culture of common aquatic animals. The ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* is an economically important marine shrimp with many advantages, such as widely environmental adaptability, rapid growth, and good reproductive capability. It is potentially suitable for large-scale culture in SAW; however, its adaptability to this environment remains unclear. Exploring the *E. carinicauda* adaptability mechanism to SAW will help to guide culture management for marine crustaceans. In this study, the DNA methylomes of the *E. carinicauda* gill tissue cultured in SAW and normal seawater (SW) were analyzed and the impact on gene regulation was investigated by MethylRAD sequencing. The results showed 2 347 003 and 416 176 methylations at the CG and CWG sites ( $W = A$  or  $T$ ), respectively. Comparing the SAW and SW groups, the CG and CWG loci in the SAW group increased slightly, indicating that SAW induced more DNA methylation in the gill cells that activated or inhibited pathways and played a crucial role in the environmental changes adaption. Methylation was prevalent in the exon, intron, splice site, and upstream and downstream regions of the *E. carinicauda* gill genes, as well as in the intergenic regions. DNA methylation sites were mostly distributed in the Genebody. The DNA methylation distribution curve peaked in the downstream sequence of the transcription start site and upstream sequence of the transcription termination site. The methylation label frequency was significantly higher in these regions in relation to other sequences. A total of 8805 differential methylation sites (DMSs) were screened, including 8189 CG DMSs and 616 CWG DMSs. Obviously, the CG DMS was significantly higher than the CWG DMS. The intergenic and intron regions accounted for a large proportion of the DMS observed. Overall, the DMS showed a higher trend in the genic downstream regions of the gene relative to upstream regions. The Gene Ontology (GO) enrichment

① Corresponding author: LI Jitao, E-mail: lijtao@ysfri.ac.cn

analysis of the differentially expressed genes (DEGs) based on the DMS showed enrichment of genes involved in the "development, heterochrony, and protein disulfide isomerase activity," which played a role in the CG level down-regulation. In addition, "incubation involved in sorocarp development" and "nucleus and double-stranded RNA binding" were molecular functions up-regulated by the CG methylations. The down-regulated genes with CWG methylation were enriched for the "regulation of transcription and DNA template" process, while the up-regulated genes were enriched for the "epithelial cell migration and open trail" system. These two processes were induced in *E. carinicauda* cultured in saline-alkali water. The key genes in the HIF-1 signal and spliceosome pathways, such as *hif-p*, *hk*, and *sf3b1*, play an important role in response to saline-alkaline stress; therefore, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis based on DMS of the DEG was performed. In addition, 158 CG methylated genes (MGs) were detected in DEGs from shrimps exposed to SAW, among which 77 and 81 were up- and down-regulated, respectively. Moreover, 94 CWG MGs were differentially expressed, from which 33 and 61 were up- and down-regulated, respectively. GO enrichment analysis of the CG MGs showed significant enrichment of the "muscle organ development" process; CWG MGs were significantly enriched for the "vesicle-m transport" and "membrane mediated zinc binding plasma transport" processes. This indicated that *E. carinicauda* was damaged by the saline-alkaline environment, but the shrimp may adapt to this stress by adjusting the ion balance. The KEGG enrichment analysis indicated that lipid metabolism and signal transduction pathways may play crucial roles in the *E. carinicauda* gill tissue response to saline-alkaline stress. Moreover, changes in lipid peroxidation and physiological metabolism may be caused by long-term saline-alkaline stress. The energy metabolism pathway was significantly enriched and many different genes in the lipid metabolism pathway were expressed in the stressed *E. carinicauda*. Therefore, it was speculated that the changes in DNA methylation level might play an important role in response to saline-alkaline stress. Overall, the results showed that a series of *E. carinicauda* physiological activities related to environmental adaptation was activated by SAW. In addition, a small number of methylated loci were negatively correlated with gene expressions, which indicated a complex relationship between DNA methylation and gene regulation. Although *ADAM17*, *FPC-1*, and *CYP450* showed hypomethylation, the corresponding differentially MGs showed a significantly increased expression level in a saline-alkaline environment. Therefore, genomic DNA methylation may promote gene expression under saline-alkaline stress, including the *ADAM17*, *FPC-1*, and *CYP450* genes. This study analyzed the DNA methylation levels in gill tissue of *E. carinicauda* cultured with SAW and provided information that will further elucidate the molecular mechanisms involved in crustacean adaptation to saline-alkaline environment.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; Saline-alkaline water environment; DNA methylation; Differentially expressed gene

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211231003

http://www.yykxjz.cn/

李明栋, 王佳佳, 葛倩倩, 秦桢, 刘萍, 李健, 李吉涛. 脊尾白虾水通道蛋白基因 4 和 11 在碱度胁迫过程中的作用. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 51–60

LI M D, WANG J J, GE Q Q, QIN Z, LIU P, LI J, LI J T. The roles of aquaporin gene 4 and 11 of *Exopalaemon carinicauda* under alkalinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 51–60

# 脊尾白虾水通道蛋白基因 4 和 11 在碱度胁迫过程中的作用\*



李明栋<sup>1,2</sup> 王佳佳<sup>1,2</sup> 葛倩倩<sup>1,2</sup> 秦桢<sup>1,2</sup>  
刘萍<sup>1,2</sup> 李健<sup>1,2</sup> 李吉涛<sup>1,2①</sup>

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

**摘要** 水通道蛋白(aquaporin)是一种细胞膜上特异性转运水分子及其他中性代谢分子的膜蛋白家族,对生物的细胞内外渗透压稳定具有重要的调节作用。为了了解水通道蛋白在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)应对碱度胁迫中的作用,本研究利用 RACE 技术成功克隆了脊尾白虾水通道蛋白 4 (aquaporin 4, *EcAQP4*)与水通道蛋白 11 (aquaporin 11, *EcAQP11*)基因 cDNA 全长,*EcAQP4* 基因的开放阅读框为 621 bp,编码 206 个氨基酸,预测分子量为 21.673 kDa,理论等电点为 8.30,为疏水性蛋白,具有 5 个跨膜结构域;*EcAQP11* 基因的开放阅读框长度为 783 bp,编码 260 个氨基酸,预测蛋白分子量为 28.490 kDa,理论等电点为 5.40,为疏水性蛋白,具有 4 个跨膜结构域。序列比对结果显示,*EcAQP4* 基因与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)同源性最高,为 94.63%;*EcAQP11* 与斑节对虾(*Penaeus monodon*)同源性最高,为 81.47%。为验证水通道蛋白的功能,利用 RNA 干扰技术特异性沉默 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因,结果显示,碳酸盐碱度胁迫后,注射干扰后的脊尾白虾死亡率显著升高,*EcAQP4* 干扰组 72 h 死亡率达到 45%,*EcAQP11* 干扰组 72 h 死亡率达到 55%,与对照组差异显著( $P<0.05$ )。同时发现,*EcAQP4* 干扰组在碳酸盐碱度胁迫 24、48 与 72 h 时的血液渗透压变化幅度显著高于对照组( $P<0.05$ ),72 h 时渗透压显著升高( $P<0.05$ );*EcAQP11* 干扰组血液渗透压在 3 个时间点均显著升高( $P<0.05$ )。以上结果表明,水通道蛋白在脊尾白虾应对碱度胁迫过程中起到了调节渗透压、维持体内外离子平衡的作用。

**关键词** 脊尾白虾;水通道蛋白;基因克隆;渗透压

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0051-10

\* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901302)、国家自然科学基金(32072974)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46)共同资助 [This study was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901302), National Natural Science Foundation of China (32072974), China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 李明栋, E-mail: lmdanyany@163.com

① 通信作者:李吉涛,研究员, E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-31, 收修改稿日期: 2022-02-11

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又称小白虾、迎春虾,主要分布于黄渤海浅海低盐水域,是我国重要的中小型经济虾类。脊尾白虾为广温、广盐、广布种,具有生长速度快、繁殖周期短、适应能力强等优点,现已成为我国沿海地区的特色养殖品种。我国有低洼盐碱水域 4600 万  $\text{hm}^2$ ,具有养殖潜力的盐碱水面积可达 667 万  $\text{hm}^2$ ,盐碱水由于具有高 pH、高碳酸盐碱度及离子组成复杂等特点,阻碍了盐碱水资源的充分开发利用。脊尾白虾作为一种对盐碱环境适应能力强的经济虾类,是开展甲壳类盐碱适应分子机制研究的理想材料。

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种细胞膜上特异性转运水分子及其他中性代谢分子的膜蛋白家族(冯学超等, 2005; 王渝等, 2014)。目前,共有 13 种哺乳动物水通道蛋白被鉴定,根据其功能可分为三类: AQP0、AQP1、AQP2、AQP4 和 AQP5 仅对水分子有通透性,为水选择性水通道蛋白; AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10 对水、甘油、尿素等均有通透性,为水甘油通道蛋白; AQP11 与 AQP12 的功能还未确定且基因同源性低,为超级水通道蛋白。水通道蛋白对生物的细胞内外渗透压稳定具有重要的调节作用,其对水产动物的生存意义重大。现阶段对水通道蛋白的研究主要集中于植物与哺乳动物,研究表明,植物水通道蛋白可以通过调节根部的导水率来增加水分的吸收以响应盐胁迫与干旱胁迫;在哺乳动物中,水通道蛋白在肾脏的表达量最高,在水运输的主要组织中发挥重要作用(Li *et al.*, 2019; 段梦莎, 2020; 郝建峰, 2020; 李娟等, 2021; 李青云, 2020; 张亚楠等, 2019)。目前,关于水产动物水通道蛋白的研究尚少,主要集中于三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (王渝等, 2014)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (杨志刚等, 2021)、萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*) (甘远迪, 2014)等水产动物中,研究表明,水通道蛋白基因在水产动物的肠道、胃与鳃组织中相对表达量较高,且盐度胁迫可显著改变其表达模式,推测水通道蛋白在水产动物渗透压调节过程中起重要作用。本研究根据前期碱度胁迫下脊尾白虾的转录组测序结果,克隆碱度胁迫下的差异表达基因 *EcAQP4* 和 *EcAQP11*,并分析其序列特征;利用 RNA 干扰技术特异性地沉默 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因的表达,然后对脊尾白虾进行碱度胁迫,验证 *EcAQP4* 和 *EcAQP11* 基因在碱度胁迫过程中的作用。结果可为解析脊尾白虾响应碱度胁迫机制提供基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

实验用脊尾白虾平均体长为(2.1±0.4) cm,均取自山东日照海辰水产有限公司。实验前将脊尾白虾在 100 L 的桶中暂养 7 d,按时投喂饲料,连续充氧。

取 6 尾体长、体重相近且活力旺盛的脊尾白虾,取其鳃、肝胰腺、肌肉、肠、血细胞和胃组织于液氮中储存,用于合成 RACE 模板。

### 1.2 *AQP4* 与 *AQP11* 基因的 cDNA 全长克隆

使用 *TransZol Up Plus* RNA 试剂盒(TRAN, 中国)提取脊尾白虾 RNA。配制 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳,检测 RNA 的条带完整性;使用 Thermo NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。RACE 模板第一链使用 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'试剂盒合成。根据脊尾白虾转录组中 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的测序结果,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'与 5'引物,引物序列见表 1。使用 Advantage 2 Polymerase Mix 高保真聚合酶依据说明书进行目的基因 RACE 5'和 3'

表 1 水通道蛋白基因克隆所用引物序列  
Tab.1 The sequence of primers used for *AQP* gene cloning

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>EcAQP4</i> -F1	GGATGCCACATCA ACCCAGCCGTCAC	3'-RACE
<i>EcAQP4</i> -F2	GGAATCCTGGCTG CTGTCTCTACTC	3'-RACE
<i>EcAQP4</i> -R1	CGCCCGATACCAC AGCAGGTCCGAAT	5'-RACE
<i>EcAQP4</i> -R2	GGAGCCCTGAAGA CATAGGAGTAGACG	5'-RACE
<i>EcAQP11</i> -F1	TGGCTTGAAAGGT CCAACGATCATAT	3'-RACE
<i>EcAQP11</i> -F2	GATGGACCCGGCC CAGTAGACGATGA	3'-RACE
<i>EcAQP11</i> -R1	TCGACGCTGACAG TCATCACCCAGAT	5'-RACE
<i>EcAQP11</i> -R2	CTTACAGCCTGTTG GAGGAATACGTGGA	5'-RACE
UPM-long	CTAATACGACTCAC TATAGGGCAAGCA GTGGTATCA ACGCAGAGT	RACE 通用 RACE universal
UPM-short	CTAATACGACT CACTATAGGGC	RACE 通用 RACE universal
M13F	TGTAAAACG ACGGCCAGT	测序通用引物 Sequencing universal
M13R	CAGGAAACA GCTATGACC	测序通用引物 Sequencing universal

末端巢式 PCR 扩增, 将获得的 PCR 产物进行切胶回收、连接转化, 然后挑取阳性单克隆, 经 M13 通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 并将所筛选的菌液进行测序。

### 1.3 生物信息学分析

使用 Contig Express 软件进行拼接, 得到 *EcAQP4* 基因与 *EcAQP11* 基因 cDNA 全长, 将 cDNA 序列用 ORFFinder 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框, 得到基因的氨基酸序列后, 使用在线软件 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测其蛋白质信号肽、蛋白质结构域、蛋白跨膜情况、蛋白质特性和亲水性。

利用在线软件 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析基因与其他物种的同源性和一致性; 使用 DNAMAN 软件对多个物种氨基酸序列进行比对; 使用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-joining 进化树。

### 1.4 RNA 干扰实验

**1.4.1 dsRNA 的合成** 使用 T7 RNAi Transcription Kit-BOX1 (Vazyme, 中国) 合成 dsRNA。合成干扰的引物需添加 T7 启动子, 使用在线设计软件 [https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi\\_find\\_primers.pl](https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl) 设计引物, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

本次干扰实验以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein (GFP)为对照, 具体的合成步骤: 将 GFP 质粒溶解, 取 2  $\mu$ L 质粒溶液加入 100  $\mu$ L 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 再冰浴 2 min, 加入 900  $\mu$ L 未加卡那霉素(KAN)的 LB 液体培养基, 200 r/min 震荡培养 45 min。将菌液 6000 r/min 离心 5 min, 取沉淀涂至已加 KAN 的 LB 固体培养基上, 过夜培养 12 h 以上。挑取单克隆菌落至已加 KAN 的 LB 液体培养基中, 震荡培养 12 h。以培养后的菌液为模板, 使用 T7 RNAi Transcription Kit-BOX1 按照 dsRNA 合成步骤合成 GFP, 其引物 GFP-T7F: GATCACTAATACGACTCACT ATAGGGATGGTGAGCAAGGGGGAGGA; GFP-T7R: GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTACTTGTA CAGCTCGTCCA。

**1.4.2 dsRNA 的注射** 准备 9 个 10 L 整理箱, 每个箱子加入 8 L 海水, 调节其碳酸盐碱度至 8.26 mmol/L, 稳定 24 h, 每天调节 2 次海水碱度。设置 GFP 组、

*EcAQP4* 组和 *EcAQP11* 组, 每组 3 个平行。挑选体长、体重相近的脊尾白虾进行胁迫实验, 每个箱子放入 10 尾虾, 依据组别在脊尾白虾的第 4 腹足基部注射干扰, 注射量为 1  $\mu$ g/g, 观察记录脊尾白虾在 24、48 和 72 h 的死亡率。

另设置空白组、GFP 组、*EcAQP4* 组和 *EcAQP11* 组, 调节其碳酸盐碱度至 8.26 mmol/L, 每个箱子放入 30 尾脊尾白虾, 依据组别在脊尾白虾的第 4 腹足基部注射干扰, 注射量为 1  $\mu$ g/g, 空白组不进行胁迫与干扰, 在 24、48 和 72 h 3 个时间点, 取其血液测量渗透压, 并取鳃组织检测其中 *EcAQP* 基因表达量。

**1.4.3 干扰后血淋巴渗透压的变化** 每个时间点取 6 尾虾的血淋巴混合测量其渗透压。将混合后的血淋巴样品放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 24 h 后, 3000 r/min 离心 15 min, 取 60  $\mu$ L 上清液, 使用渗透压测定仪测量渗透压, 每个样品测量 3 次。

**1.4.4 干扰后 AQP 基因表达量的检测** 在干扰后 24、48 和 72 h 3 个时间点取 GFP 组、*EcAQP4* 组与 *EcAQP11* 组的鳃组织, 液氮研磨, 使用 TransZol Up Plus RNA kit (TRAN, 中国) 提取 RNA。

通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 在不同组织中的表达, 以 18S 基因作为内参基因, 针对 *EcAQP4*、*EcAQP11* 与 18S 设计特异性引物(表 2), 按照 ChamQTM SYBR<sup>®</sup> Color qPCR master mix 说明书, 利用荧光定量 PCR 仪器进行定量分析, 通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算分析注射干扰后 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因 mRNA 的相对表达量, 利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 运用多重比较进行显著性检验。

表 2 qRT-PCR 所用引物  
Tab.2 Primers used for qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>EcAQP4</i> -F	GAAGATCAACGCCGCAAG
<i>EcAQP4</i> -R	GGCGAGAGGTGCAGATCCTT
<i>EcAQP11</i> -F	GAAGATCAACGCCGCAAG
<i>EcAQP11</i> -R	GGCGAGAGGTGCAGATCCTT
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

## 2 结果与分析

### 2.1 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因 cDNA 的克隆与序列分析

本研究利用 RACE 技术成功克隆了脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的 cDNA 全长, 序列分析结果



显示, *EcAQP4* 基因开放阅读框(ORF)长度为 621 bp, 共编码 206 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 21.673 kDa, 理论等电点为 8.30, 为疏水性蛋白(图 1); 跨膜分析结果显示, 该基因跨膜 5 次; SMART 分析显示, 该基因具有 5 个跨膜结构域(图 2)。*EcAQP11* 基因 ORF 长度为 783 bp, 共编码 261 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 28.490 kDa, 理论等电点为 5.40, 为疏水性蛋白(图 3); 跨膜分析结果显示, 该基因跨膜 4 次; SMART 分析显示, 该基因具有 4 个跨膜结构域(图 4)。

**2.2 AQP4 与 AQP11 氨基酸序列及同源性分析**

将 *EcAQP4* 与 *ECAQP11* 的氨基酸序列在 NCBI 上比对发现, 与 *EcAQP4* 氨基酸序列同源性较高的物种有罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、斑节对虾

(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、三疣梭子蟹(图 5); 与 *EcAQP11* 氨基酸序列同源性较高的物种有斑节对虾、灰眼雪蟹(*Chionoecetes opilio*)、凡纳滨对虾(图 6)。同源性分析显示, *EcAQP4* 具有多个保守区域, 其中与罗氏沼虾同源性最高, 为 94.63%, 与三疣梭子蟹同源性最低, 为 68.14%, 所比对的物种均含有 HINPAVT 和 PLAIGL 这 2 个保守域;*EcAQP11* 比 *EcAQP4* 保守性较差, 与斑节对虾同源性最高, 达到 81.47%, 与灰眼雪蟹同源性最低, 为 67.18%。

**2.3 AQP4 与 AQP11 基因系统进化树分析**

利用 MEGA 7.0 软件对脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的氨基酸序列进行系统进化分析(图 7,

```

1 aagcagtggtatcaacgcagagtacatgggtgtatcggcggctggtcggggggctacgccccctctATGGTGCAATAGCCTTC 84
                                     M V Q I A F
85 GCCTTCGGGGTGACCGTAGCCACTGTGGCTCAGGCAATCGGACACATCTCTGGATGCCACATCAACCCAGCCGTCACATGTGGA 168
   A F G V T V A T V A Q A I G H I S G C H I N P A V T C G
169 TTGCTCGTAGCTCGTTACGTGTCTGTACTGCGCTCGTCTCTATATCATGTGCTCAGTGCTGGGAGCACTGGTTGGTGCTGCT 252
   L L V A R Y V S V L R S L L Y I I A Q C L G A L V G A A
253 ATTCTTAAGGGTGTGACCGCCGAAGAGATCCAAGGTAACCTCGGCATGACGCTCGTGAACCCGAAGATCAACGCCGGCCAAGCC 336
   I L K G V T A E E I Q G N L G M T L V N P K I N A G Q A
337 CTCGGCGTGGAACTCATCATCCTTCGTGTTGGTCTGACGGTGTTCGGCGTGTGCGACGAGAGGAGGAACGACGTGAAAGGA 420
   L G V E L I I T F V L V L T V F G V C D E R R N D V K G
421 TCTGCACCTCTCGCCATAGGACTTCCATCACCACCTGTCATCTCATGGCTATTTCCATCACTGGCTCTTCTATGAACCCCGCC 504
   S A P L A I G L S I T T C H L M A I P I T G S S M N P A
505 CGTACATTGGGACCTGCTGTGGTATCGGGCGTGTGGGCTGATCACTGGGTGACTGGGCTGGACCCATCCTCGGAGGAATCCTG 588
   R T L G P A V V S G V W A D H W V Y W A G P I L G G I L
589 GCTGGTGTGCTCTACTCTATGCTTTCAGGCTCCCAAACCTACGCTTACGATGACGTACAGATGGACAATTATAACAAGAGA 672
   A G V V Y S Y V F R A P K P Q P Y D D V Q M D N Y N K R
673 GGAAACAACCCCTTAAaacctactccacgtggctataggcctagccctagaccaagtggttgctgtaccgccccgctgaggaaaa 756
   G N N P *
757 ctgctgatcaagcacccttgaggaccaaaggcgcaactaacaaggcgcttttggtgtccaatattgtctagttttctctcc 840
841 atgcaaaagtatatcataagaaaatcttaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 901

```

图 1 *EcAQP4* 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列  
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *EcAQP4*

ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子。图 3 同。  
ATG: Initiation codon; TAA: Termination codon. The same as in Fig.3.

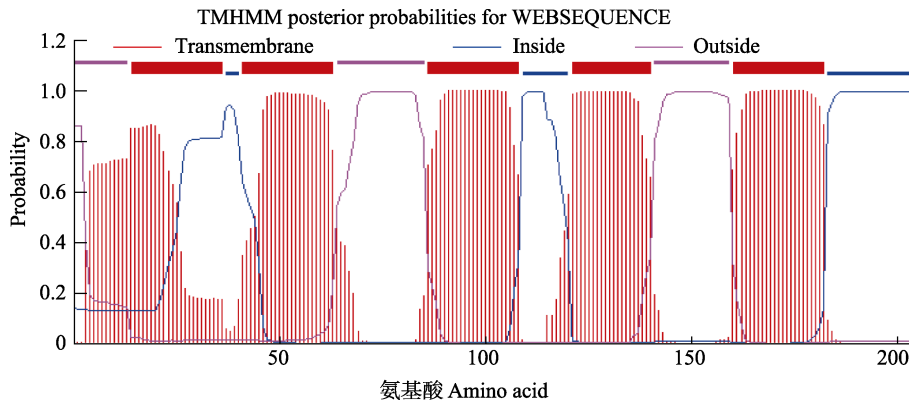


图 2 *EcAQP4* 的跨膜结构域  
Fig.2 The transmembrane domain of *EcAQP4*

```

1 [ATG]TCGATCATAATATCGACGCTGACAGTCATCACCCAGATGGCGCTGTCCGAC 54
  M S I I I S T L T V I T Q M A L S H
55 ATCATCCGCGCGGTTGTCCGAAATAGTGACCAACGAGCTGGTCAAGGGATGC 108
  I I R G R L S E I V T N E L V K G C
109 CTGCTAGAGCTGGTGGCTGCTGCCGAGATGTGCGGCACCTGTTATGAGCTTATT 162
  L L E L V A A A E M C G T C Y E L I
163 ATCATTGCTGATAACTACGGCGTCTACGCTTACGGTGTGTATCTTCTCCTCATG 216
  I I A D N Y G V Y A Y G V Y L F L M
217 ACCATCTGGTGGGGTCAGAGTTGGGGAAGTCCACTGCTTGTCTTACAGCCTG 270
  T I W W G Q S W G T A T A C P Y S L
271 TTGGAGGAATACGTGGAATCTGGTGCCGATGCTGTCTCTGTCTCCTCAAGATT 324
  L E E Y V E S G A D A V S V V L K I
325 GTATGTCAGGTCATTGGAGGTTTGGCATCATTCAGATGGGTGAAAATGATCTGG 378
  V C Q V I G G L A S F R W V K M I W
379 ATGATGGAATTTGCCGAGACCCACATCGGCCGCGGTGTGGACAGCTGCACGGCT 432
  M M E F A E T H I G R G V D S C T A
433 GACCTGGCTGTACCTGTCCCGTCGGCTTCTGATTGAGGGTGGCCTCACCTGC 486
  D L A V P V A V G F L I E G G L T C
487 GCTTGAGAATCGTCTCGAGGACTCTCGGGGAAGTCCGAGCCCAAGTTTGCTGCC 540
  A C R I V S R T L G E L E P K F A A
541 ACTTTCGACTCGTTCTTCTACTTCCATGGTGGTCTCGCTTTCACCACCTCT 594
  T F D S F F S T S M V V L A F T T S
595 GGTGGTTACTTCAACCCAGTGTGGCCACTGGCCTGAAGTGGGCTTGCCGAGGA 648
  G G Y F N P V L A T G L K W A C R G
649 CACACCAACGTCGAGCACATCATCGTCTACTGGCCGCGGTCCATCCTGGGATCC 702
  H T N V E H I I V Y W A G S I L G S
703 ATGCTCTCCATCAGGCTCTGGAACACTCCACCTTCAAAAATATGATCGTTGGA 756
  M L S I R L W N T P T F K N M I V G
757 CCTTCAAGCCAAAGGAAGAGTAG 780
  P F K P K E E *
    
```

图 3 *EcAQP11* 基因 ORF 及其推导的氨基酸序列

Fig.3 Open reading frame and deduced amino acid sequence of *EcAQP11*

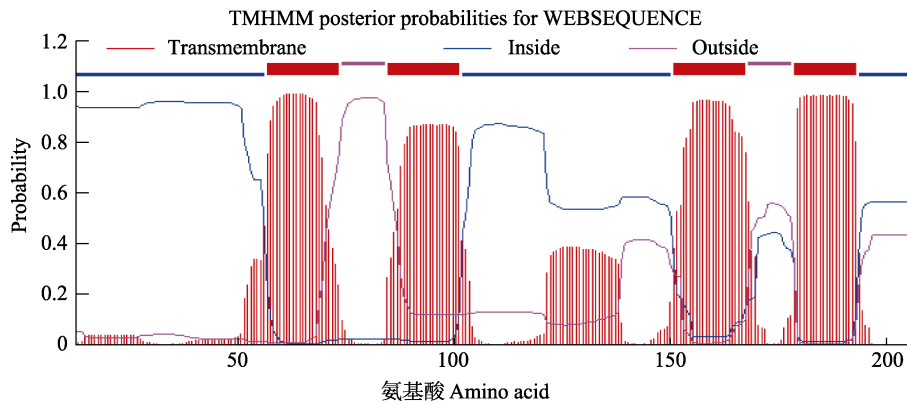


图 4 *EcAQP11* 的跨膜结构域

Fig.4 The transmembrane domain of *EcAQP11*

图 8), 结果显示, *EcAQP4* 基因的进化树分为两支, 第一支为节肢动物门, 第二支为脊索动物门, 脊尾白虾与罗氏沼虾聚为一支, 亲缘关系最为相近, 与其他甲壳纲动物亲缘关系也较近; 脊索动物门中的硬骨鱼类为一支, 与脊尾白虾亲缘关系较远。*EcAQP11* 基因的进化树分为两支, 第一支为昆虫纲, 第二支为甲壳纲, 脊尾白虾与斑节对虾与凡纳滨对虾聚为一支, 亲缘关系较近。

#### 2.4 RNA 干扰后 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 的表达变化

取干扰后脊尾白虾的鳃组织, 提取 RNA, 进行

反转录, 通过 qRT-PCR 检测 2 个基因在各个时间点的表达量。结果显示, 注射 dsRNA 对脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因干扰效果明显。与 GFP 对照组相比, *EcAQP4* 基因在注射干扰 24 h 与 48 h 后的表达量下降 80%左右, 72 h 干扰效果逐渐减弱; *EcAQP11* 基因在注射干扰 24 h 时表达量下降 87%, 干扰效果显著, 48 h 时基因表达量下降 60%, 72 h 时基因表达量下降 35%。

#### 2.5 RNA 干扰对脊尾白虾死亡率的影响

统计每个时间点各组别的死亡率, 如图 10 所示。

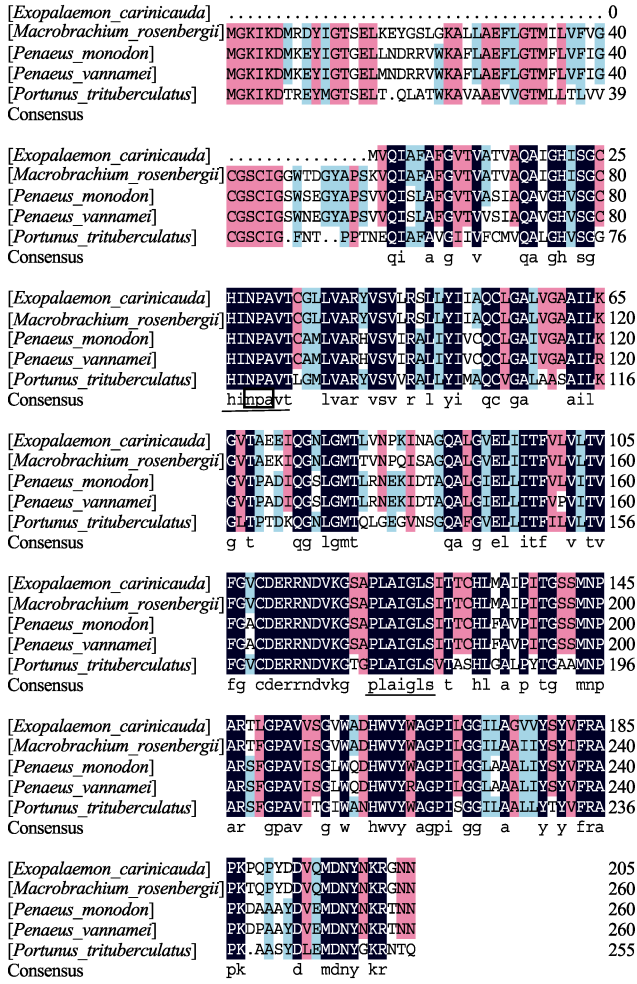


图 5 *EcAQP4* 基因氨基酸序列与其他已知物种同源序列比对

Fig.5 Amino acid sequences alignment of *EcAQP4* with other species' AQP

NPA 结构单元以方框表示；2 个保守序列 HINPAVT 和 PLAIGL 以下划线表示。

The NPA structural motifs are marked in the box. Two conserved sequences (HINPAVT and PLAIGL) are underlined.

与 GFP 组相比，注射干扰后，*EcAQP4* 与 *EcAQP11* 组死亡率显著升高( $P<0.05$ )，说明 RNA 干扰这 2 个基因表达后，脊尾白虾耐碱度能力降低，最终导致死亡。同时，发现 24 h 与 48 h 2 个时间点 AQP11 组死亡率显著高于 AQP4 组( $P<0.05$ )，在 72 h 时 2 组死亡率接近，相比 *EcAQP4* 基因，*EcAQP11* 基因能够更加快速地影响脊尾白虾渗透压调节能力，在脊尾白虾耐碱机制中起到更为重要的作用。综上所述，*EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因对脊尾白虾耐碱能力有重要的作用。

### 2.6 RNA 干扰对脊尾白虾血液渗透压的影响

使用渗透压测量仪测量各组在不同时间点脊尾

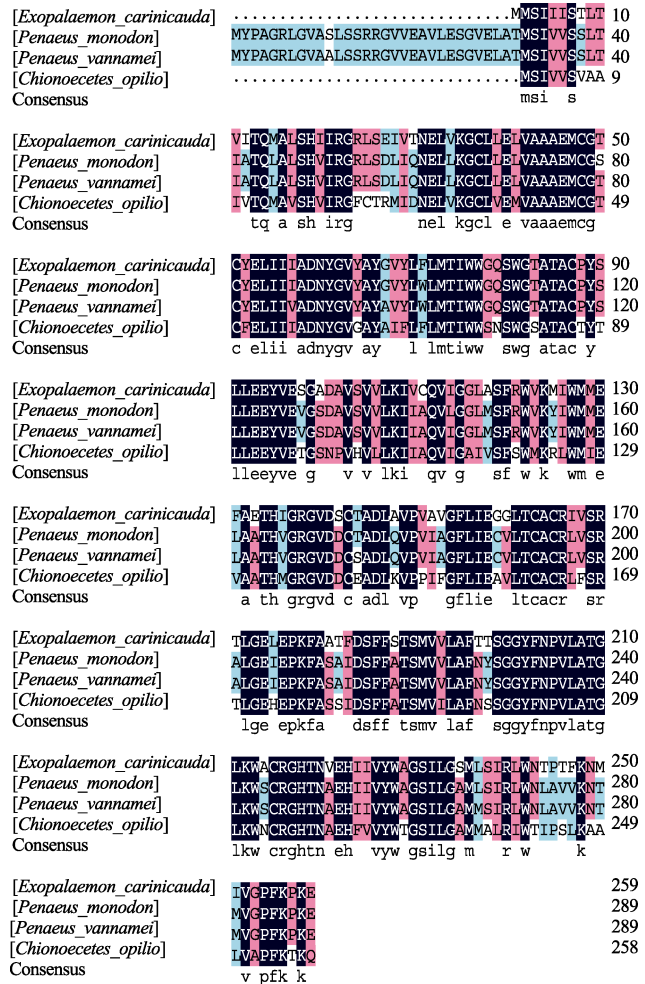


图 6 *EcAQP11* 基因氨基酸序列与其他已知物种同源序列比对

Fig.6 Amino acid sequences alignment of *EcAQP11* with other species' AQP

白虾的血液渗透压，结果如图 11 所示。与空白组相比，碱度胁迫后，脊尾白虾血液渗透压显著升高( $P<0.05$ )，这是由于水体碱度升高，其中的离子浓度也随之升高，脊尾白虾体内累积的离子升高所导致，但总体来看，GFP 组脊尾白虾血液渗透压相对稳定，呈现先上升后下降的趋势；*AQP4* 干扰组的渗透压变化趋势与 GFP 组相同，在 48 与 72 h 时 2 个时间点其渗透压高于 GFP 组；*AQP11* 干扰组渗透压则是一直升高的，72 h 时显著升高( $P<0.05$ )，升高的幅度较大。推测干扰 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因表达后，水分子的转运受到影响，脊尾白虾渗透压调节能力降低，造成 AQP4 组上升与下降趋势大于对照组；AQP11 干扰组脊尾白虾渗透压上升明显，说明 *EcAQP11* 在脊尾白虾渗透压调节过程中发挥重要作用，是脊尾白虾耐碱机制中的重要基因。

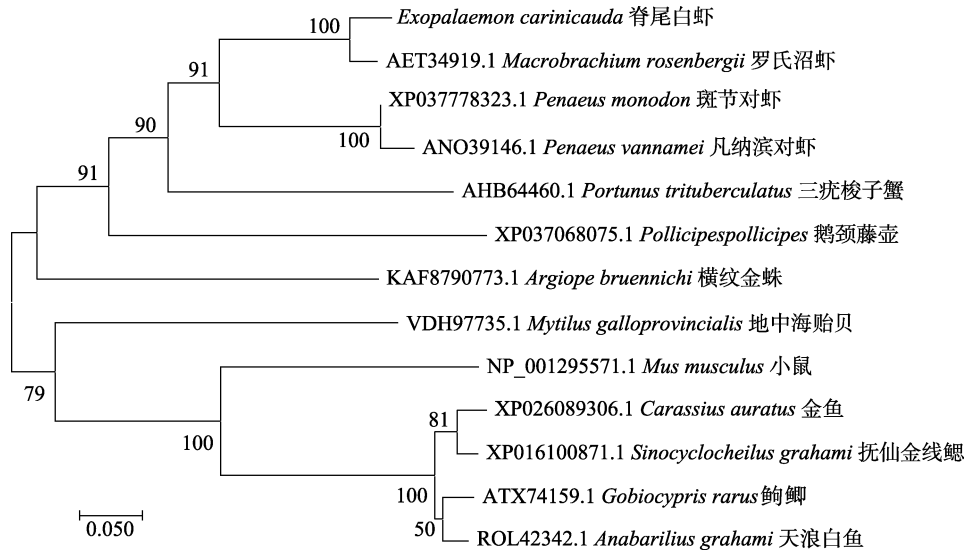


图 7 基于 *EcAQP4* 基因氨基酸序列构建的 Neighbor-joining 进化树  
Fig.7 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *EcAQP4* amino acid sequences

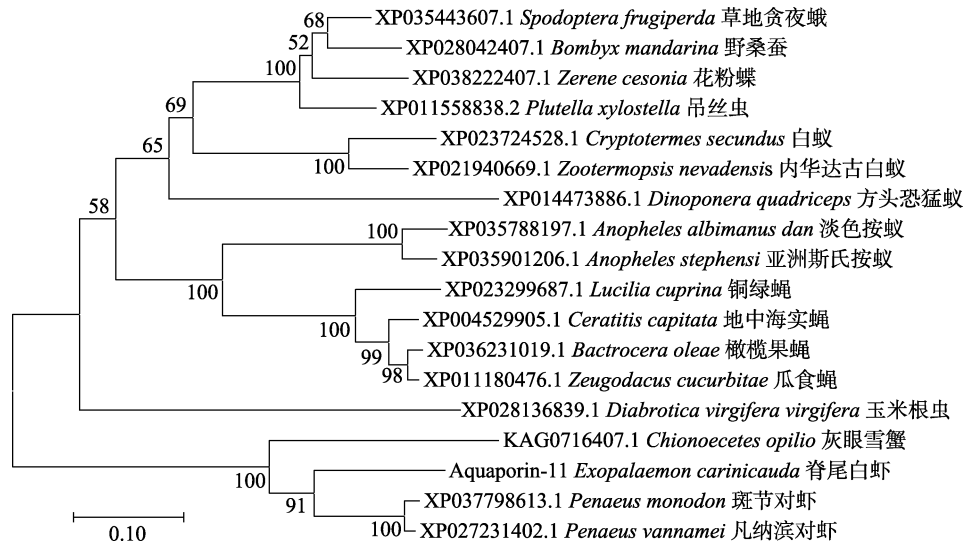


图 8 基于 *EcAQP11* 基因氨基酸序列构建的 Neighbor-joining 进化树  
Fig.8 Neighbor-joining phylogenetic tree based on *EcAQP11* amino acid sequences

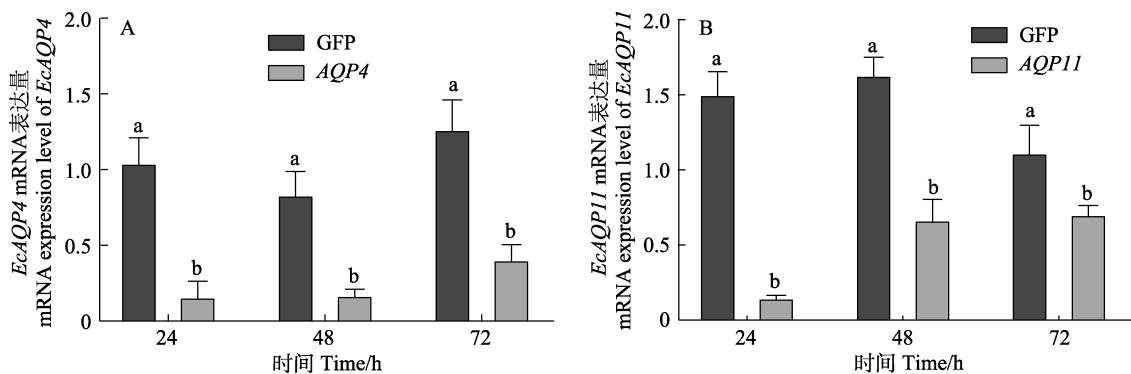


图 9 脊尾白虾注射干扰后 *EcAQP4* (A)与 *EcAQP11* (B)基因的表达情况  
Fig.9 The expression of *EcAQP4* (A) and *EcAQP11* (B) after interference

GFP 为对照组。不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同。  
GFP was the control group. Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

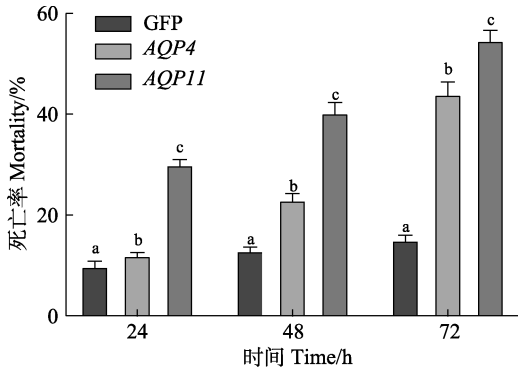


图 10 RNA 干扰后脊尾白虾的死亡率  
Fig.10 The mortality of *E. carinicauda* after RNA interference

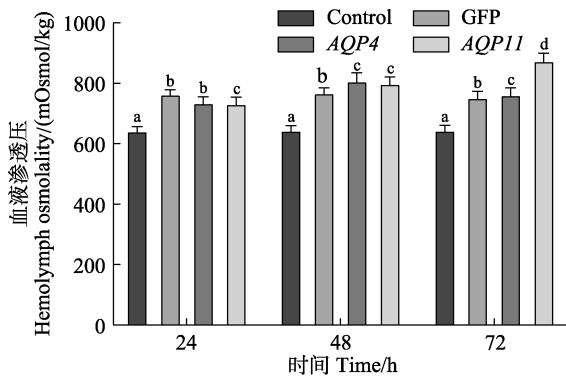


图 11 RNA 干扰后脊尾白虾的血液渗透压变化  
Fig.11 The hemolymph osmolality of *E. carinicauda* after RNA interference

### 3 讨论

本研究通过对转录组中差异表达基因的分析,发现在碱度胁迫后,与渗透压调节相关的基因大量表达,为了进一步了解脊尾白虾的耐碱机制,我们从差异表达基因中挑选了水通道蛋白这一渗透压调节的关键基因(Deane *et al.*, 2006; Holm *et al.*, 2005; MacIver *et al.*, 2009; Preston *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1996; 隋海心等, 2004),通过 RACE 技术克隆 cDNA 全长并对其进行序列分析,利用 RNA 干扰技术验证其在碱度胁迫过程中的响应机制。

#### 3.1 AQP4 与 AQP11 基因的氨基酸序列及同源性分析

本研究利用 RACE 技术首次克隆获得脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的 cDNA 全长,并运用生物信息学软件对其序列进行分析。通过比对发现,脊尾白虾 *EcAQP4* 基因保守性较好,具有 HINPAVT 和 PLAIGL 两个保守域,与高沿等(2017)研究结果相同。

#### 3.2 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因的功能验证

水通道蛋白是生物细胞膜转运水分子的重要结构,在维持细胞内外渗透压平衡中起重要作用,现阶段关于水通道蛋白的研究有很多,最初人们在脑星形胶质细胞、胃壁细胞和肾集合小管等部位发现 AQP4 蛋白,它是一种水特异性通道蛋白,仅对水分子具有渗透性,其在人体中主要作用为维持脑内水平衡及脑水肿发生发展(张士保等, 2013)。现阶段对 AQP4 的研究主要集中于其在脑水肿、视神经脊髓炎(Yang *et al.*, 2013)、癫痫(Hsu *et al.*, 2011)等中枢神经系统疾病中所起的作用,其调节机制主要是维持细胞间隙  $K^+$  缓冲与渗透压平衡,但其在水产动物中的研究还未见报道。*EcAQP11* 基因在各个物种之间的氨基酸同源性低,功能尚不确定,但有研究表明,*EcAQP11* 具有水转运活性,作为水通道发挥作用(Yakata *et al.*, 2007),对体内水的稳态平衡有重要作用(He *et al.*, 2017),其发挥作用的主要方式为维持上皮细胞水和离子的吸收转运,保持细胞渗透压平衡。

为验证 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 两基因在脊尾白虾适应碱度胁迫中所起的作用,本研究设计合成了相应的 dsRNA,对脊尾白虾进行注射干扰后,通过 qRT-PCR 技术检测了碱度胁迫后上述 2 个基因的表达变化,结果显示,与对照组相比,各个时间点基因的表达均发生了显著下降,说明所设计的 dsRNA 具有良好的干扰效果。对脊尾白虾注射干扰后进行碱度胁迫,发现其死亡率明显升高,碱度胁迫 72 h 时, *EcAQP4* 组死亡率达到 45%, *EcAQP11* 组达到 55%,说明基因的沉默对脊尾白虾的耐碱能力产生明显影响。渗透压测定结果显示,与空白组相比, GFP 对照组血液渗透压升高,各时间点总体变化不大,从侧面反映了脊尾白虾的耐碱能力较强。渗透压的变化趋势总体来说呈现先上升后下降的趋势,与盐碱胁迫对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)血清渗透压变化趋势相同(赵丽慧等, 2014)。在碱度胁迫条件下,脊尾白虾体内的离子逐渐累积增强,导致血液渗透压增高,但脊尾白虾通过体内的渗透压调节机制将渗透压维持稳定。与 GFP 对照组相比, *EcAQP4* 干扰组脊尾白虾的血液渗透压上升下降的幅度变大,说明 *EcAQP4* 基因的沉默表达影响了脊尾白虾的渗透压调节能力,从而导致脊尾白虾耐碱能力减弱,死亡率升高。相比对照组和 *EcAQP4* 干扰组, *EcAQP11* 干扰组的渗透压升高更明显,且呈现一直升高的趋势,这可能是 *EcAQP11* 基因在脊尾白虾耐碱机制中起到了

更重要的作用, 其对脊尾白虾的渗透压调节影响较大。前文提到, *EcAQP11* 基因现阶段的功能与调控机制尚未完全解析, 但本研究结果表明, *EcAQP11* 基因在脊尾白虾渗透压调节中发挥了重要作用。

本研究成功克隆了脊尾白虾 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 基因, 设计干扰 dsRNA 并对脊尾白虾进行注射沉默上述 2 个基因的表达, 结果发现, 与对照组相比, 注射干扰后的脊尾白虾在碱度胁迫下死亡率明显升高; *EcAQP4* 干扰组脊尾白虾血液渗透压变化幅度增大, *EcAQP11* 干扰组血液渗透压升高明显, 干扰 *EcAQP4* 与 *EcAQP11* 表达后的脊尾白虾耐碱度胁迫能力减弱, 表明上述 2 个基因在脊尾白虾适应碱度胁迫过程中发挥着重要作用。

## 参 考 文 献

- DEANE E E, WOO N Y S. Tissue distribution, effects of salinity acclimation, and ontogeny of aquaporin 3 in the marine teleost, silver sea bream (*Sparus sarba*). *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 663–671
- DUAN M S. Identification of aquaporin gene in tea tree and study of *CsPIPI;5* functional. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 [段梦莎. 茶树水通道蛋白基因的鉴定与 *CsPIPI;5* 的功能研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2020]
- FENG X C, MA T H. Physiological importance of aquaporin water channels accessed by phenotype studies of aquaporin knockout mice. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, 32(4): 291–297 [冯学超, 麻彤辉. 水通道蛋白的生理功能——水通道基因敲除小鼠表型研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(4): 291–297]
- GAN Y D. cDNA cloning of aquaporin 3 in *Sarotherodon melanothorn*, *Oreochromis niloticus* and tissue expression patterns under salinity stresses. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [甘远迪. 萨罗罗非鱼、尼罗罗非鱼 AQP3cDNA 序列克隆及盐度胁迫下组织表达特征. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- GAO Y, HU C Q, REN C H, *et al.* Molecular cloning of aquaporin-4 (*AQP4*) gene in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the effect of salinity stress on its expression in hepatopancreas. *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 61–70 [高沿, 胡超群, 任春华, 等. 凡纳滨对虾水孔蛋白-4 的 cDNA 克隆及盐度胁迫对其肝胰腺 mRNA 表达水平的影响. *海洋科学*, 2017, 41(2): 61–70]
- HAO J F. Genome-wide identification of aquaporin gene family in cotton and functional characterization in response to osmotic stresses. Master's Thesis of Zhengzhou University, 2020 [郝建峰. 棉花水通道蛋白家族基因鉴定及其渗透胁迫应答功能研究. 郑州大学硕士研究生学位论文, 2020]
- HE L Q, HUANG N, LI H, *et al.* AMPK/ $\alpha$ -ketoglutarate axis regulates intestinal water and ion homeostasis in young pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(11): 2287–2298
- HOLM L M, JAHN T P, MØLLER A L B, *et al.*  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2005, 450(6): 415–428
- HSU M S, SELDIN M, LEE D J, *et al.* Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 2011, 178: 21–32
- LI J, WANG L, LUO X L, *et al.* Cloning of AQP1 and AQP3 genes and their locations and expressions in different tissues of yak (*Bos grunniens*). *Acta Theriologica Sinica*, 2021, 41(1): 51–58 [李娟, 王利, 罗晓林, 等. 牦牛水通道蛋白 AQP1 和 AQP3 基因克隆及在不同组织中表达和定位. *兽类学报*, 2021, 41(1): 51–58]
- LI Q Y. Genome-wide identification and transcriptome analysis of aquaporin gene family in *Nicotiana tabacum*. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 [李青云. 普通烟草中水通道蛋白基因家族的鉴定和转录组分析. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2020]
- LI W X, ZHANG D Y, ZHU G Z, *et al.* Combining genome-wide and transcriptome-wide analyses reveal the evolutionary conservation and functional diversity of aquaporins in cotton. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 538
- MACIVER B, CUTLER C P, YIN J, *et al.* Expression and functional characterization of four aquaporin water channels from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Experimental Biology* 2009, 212(17): 2856–2863
- PRESTON G M, CARROLL T P, GUGGINO W B, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992, 256(5055): 385–387
- ROBINSON D G, SIEBER H, KAMMERLOHER W, *et al.* PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of arabidopsis thaliana mesophyll. *Plant Physiology*, 1996, 111(2): 645–649
- SUI H X, REN G. Structure and mechanism of water channels. *Progress in Chemistry*, 2004, 16: 145 [隋海心, 任罡. 水分子通道蛋白的结构与功能. *化学进展*, 2004, 16(2): 145–152]
- WANG Y, LÜ J J, LIU P, *et al.* Cloning and characterization of aquaporins 1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatu*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 893–901 [王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹水通道蛋白 1 cDNA 及其盐度胁迫下的表达分析. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 893–901]
- YAKATA K, HIROAKI Y, ISHIBASHI K, *et al.* Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768
- YANG Y, HUANG D H, WU W P, *et al.* The role of aquaporin-4 antibodies in Chinese patients with neuromyelitis optica.

- Journal of Clinical Neuroscience, 2013, 20(1): 94–98
- YANG Z G, ZHANG L, CHEN C Y, *et al.* Study on cloning, expression and RNA interference of aquaporin 1 gene of *Eriocheir sinensis*. Journal of Fudan University (Natural Science), 2021, 60(1): 93–101 [杨志刚, 张龙, 陈春宇, 等. 中华绒螯蟹水通道蛋白 1 基因的克隆、表达及 RNA 干扰研究. 复旦学报(自然科学版), 2021, 60(1): 93–101]
- ZHAO L H, ZHAO L, JEERAWAT T, *et al.* Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696–1704 [赵丽慧, 赵金良, Jeerawat T, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响. 水产学报, 2014, 38(10): 1696–1704]
- ZHANG S B, DAI D W, DAI Y M. Advances of aquaporin-4 research. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2013, 21(4): 451–455 [张士保, 代大伟, 代亚美. 水通道蛋白-4 的研究进展. 中国临床神经科学, 2013, 21(4): 451–455]
- ZHANG Y N, WANG Y, ZHU J J, *et al.* Analysis of cloning and expression of AQP7 gene in Tibetan goat. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(8): 1956–1960 [张亚楠, 王永, 朱江江, 等. 藏山羊 AQP7 基因克隆和不同组织器官差异表达分析. 西南农业学报, 2019, 32(8): 1956–1960]

(编辑 冯小花)

## The Roles of Aquaporin Gene 4 and 11 of *Exopalaemon carinicauda* under Alkalinity Stress

LI Mingdong<sup>1,2</sup>, WANG Jiajia<sup>1,2</sup>, GE Qianqian<sup>1,2</sup>, QIN Zhen<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, LI Jitao<sup>1,2①</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China;

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

**Abstract** Aquaporins are a family of cell membrane proteins, and their key role is to specifically transport water molecules and other neutral metabolic molecules. Moreover, aquaporins play an important role in regulating the balance between internal and external osmotic pressure in organisms. Here, aquaporin 4 and 11 genes from *Exopalaemon carinicauda* were successfully cloned using rapid amplification of cDNA ends cloning. The open reading frame of *EcAQP4* is 621 bp, encoding 206 amino acids, with a predicted molecular weight of 21.673 kDa and a theoretical isoelectric point of 8.30; it is a hydrophobic protein with five transmembrane structural domains. The open reading frame of *EcAQP11* is 783 bp, encoding 260 amino acids, with a predicted molecular weight of 28.490 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.40; it is a hydrophobic protein with four transmembrane domains. In sequence alignment, AQP4 in *E. carinicauda* shared the highest homology with that in *Macrobrachium rosenbergii* (94.63%), while AQP11 in *E. carinicauda* shared the highest homology with that in *Penaeus monodon* (81.47%). Furthermore, RNA interference was used for silencing *EcAQP4* and *EcAQP11* expression to verify their function. In carbonate alkalinity stress, the mortality of *E. carinicauda* increased significantly following RNA interference. At 72 h, mortality reached 45% and 55% in the *EcAQP4* and *EcAQP11* groups, respectively, being significantly higher than that in the control group. The blood osmotic pressure of *E. carinicauda* in the *EcAQP4* group was significantly higher than that in the control group. Similarly, the blood osmotic pressure of *E. carinicauda* in the *EcAQP11* group was significantly increased. In summary, aquaporins play important roles in regulating osmotic pressure and maintaining ion balance in response to alkalinity stress in *E. carinicauda*.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; Aquaporin; Gene cloning; Osmolality

① Corresponding author: LI Jitao, E-mail: lijtao@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211228004

http://www.ykxjz.cn/

王世会, 罗亮, 张瑞, 郭坤, 张旭彬, 孔令杰, 赵志刚. 绥芬河水系野生绒螯蟹体重分布及常规营养品质. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 61–69

WANG S H, LUO L, ZHANG R, GUO K, ZHANG X B, KONG L J, ZHAO Z G. Body weight profile and proximate composition of adult Suifenhe *Eriocheir sensu stricto*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 61–69

## 绥芬河水系野生绒螯蟹体重分布 及常规营养品质\*



王世会<sup>1</sup> 罗亮<sup>1</sup> 张瑞<sup>1</sup> 郭坤<sup>1</sup> 张旭彬<sup>2</sup> 孔令杰<sup>2</sup> 赵志刚<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增殖重点开放实验室  
黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 黑龙江省水产技术推广总站 黑龙江 哈尔滨 150010)

**摘要** 绒螯蟹(*Eriocheir sensu stricto*)是高盐碱耐受性水产动物,然而随着绒螯蟹种质退化等原因,北方地区养殖绒螯蟹面临规格小、抗逆性差和病害频发等问题,开发利用新的土著绒螯蟹种质保证绒螯蟹产业健康发展显得尤为必要。团队于2020和2021年9月,在黑龙江省绥芬河水系用地笼捕捉野生绒螯蟹共计299只(雌体156只,雄体143只),统计绒螯蟹性成熟情况并分别计算不同体重绒螯蟹所占百分比,测量性成熟个体的甲壳长、甲壳宽,解剖取出肝胰腺和性腺,精刮肌肉,测定可食率、色泽及常规营养成分。结果显示,绥芬河绒螯蟹雌体未性成熟比例显著低于性成熟比例( $P<0.05$ ),而雄体则相反。不论是雌体还是雄体,性成熟个体的平均体重均显著高于未性成熟个体( $P<0.05$ )。雌性成熟个体平均体重为( $110.51\pm 2.42$ ) g,雄性则为( $147.79\pm 5.94$ ) g。雌性成熟个体( $\geq 100.00$  g/只)的百分比为55.94%,雄性成熟个体( $\geq 125.00$  g/只)的百分比为60.00%。9月29日,雌体肝胰腺指数(HSI)和性腺指数(GSI)均显著高于雄体,而出肉率(MY)和肥满度(CF)则显著低于雄体( $P<0.05$ )。雌体甲壳亮度值( $L^*$ )和黄度值( $b^*$ )均显著低于雄体( $P<0.05$ )。雌体性腺和肌肉中粗蛋白含量显著高于雄体,而性腺中水分含量则显著低于雄体( $P<0.05$ )。综上所述,绥芬河绒螯蟹具有性成熟个体平均体重大且大规格个体百分比高等特点,卵巢和肌肉中粗蛋白与粗脂肪百分比较高,是一种重要的高蛋白低脂肪营养物质来源。本研究结果为绥芬河水系野生绒螯蟹种质资源开发以及利用提供了基础资料。

**关键词** 绥芬河绒螯蟹; 体重; 色泽; 品质

**中图分类号** S932.52 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0061-09

绒螯蟹(*Eriocheir sensu stricto*)是我国重要的水产经济养殖品种之一(姜晓东等, 2016),目前消费者

所知最多的是河蟹,且绝大多数消费者认为河蟹即中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),这不严谨。中华绒螯蟹

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202008Q)、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2021XT05; 2020TD56)和国家重点研发计划(2020WED0900402)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, HRFRI (HSY202008Q), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021XT05; 2020TD56), and National Key Research and Development Program of China (2020WED0900402)]. 王世会, E-mail: firstwsh@163.com

① 通信作者: 赵志刚, 副研究员, E-mail: Zhaozhigang@hrfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-28, 收修改稿日期: 2022-01-21



简称为河蟹,但河蟹不仅包括中华绒螯蟹一个种,还包括日本绒螯蟹(*Eriocheir japonicus*)和合浦绒螯蟹(*Eriocheir hepuensis*)两个种(Guo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; 王武等, 2013),所以严格来说河蟹是绒螯蟹的简称,更为准确。绒螯蟹是降河洄游生活史的水产动物,在河口半咸水区域交配并产卵,孵化后的大眼幼体再迁移到淡水中生长(Cheng *et al.*, 2008)。绒螯蟹广泛分布于我国沿海的各大水系中,北至黑龙江省绥芬河水系,南至广西壮族自治区南流江水系,均有野生绒螯蟹的群体分布。2020年全国绒螯蟹产量为77.59万t(农业农村部渔业渔政管理局, 2021),养殖产量较高的区域主要集中于长江流域,如江苏、湖北、安徽和辽河流域如辽宁等省。虽然我国绒螯蟹产业规模较大,但目前开发利用的绒螯蟹种质主要是长江和辽河水系中华绒螯蟹(王武等, 2013),而其他水系的绒螯蟹种质资源状况了解甚少。

绥芬河绒螯蟹是分布于黑龙江省牡丹江市东宁市绥芬河水系的土著野生绒螯蟹群体。张志华等(2005)指出,绥芬河绒螯蟹学名应为日本绒螯蟹,因绒螯蟹是洄游性水产动物,绥芬河绒螯蟹被认为是日本海的日本绒螯蟹溯河洄游到绥芬河而形成的地理群体。2003年黑龙江省水产技术推广总站开展科技攻关,设立“绥芬河河蟹人工繁育及养殖技术研究”科研项目,初次实现绥芬河绒螯蟹苗种的人工繁育,并成功孵化出80 kg的大眼幼体(张志华等, 2005)。近些年,随着辽宁盘锦中华绒螯蟹种质退化严重,“牛奶病”病害频发,而绥芬河绒螯蟹因规格相对较大,部分孵化企业从业者到黑龙江收集绥芬河绒螯蟹进行苗种繁育。在苗种繁育之前,首先要系统调查绥芬河水系野生绒螯蟹的种质资源状况,并阐述其优异性状,这样才能为新种质开发利用提供重要支撑,而绥芬河水系野生绒螯蟹种质资源评估内容却一直未见报道,这对全面评估绒螯蟹新种质十分不利。2021年《农业农村部关于开展全国农业种质资源普查》的文件中提出:“农业种质资源是保障国家粮食安全和重要农产品有效供给的战略性资源,是农业科技原始创新与现代种业发展的物质基础”,对打赢我国水产种业翻身仗具有重要的意义。杨雨虹等(2022)研究表明,中华绒螯蟹是高盐碱耐受性水产动物,适宜在低中碱度盐碱水中开展养殖。而新绒螯蟹种质开发利用对我国绒螯蟹产业发展及盐碱水养殖均具有重要意义,为此,团队利用2年时间分别收集了绥芬河水系野生绒螯蟹,并对其性成熟比例、平均体重、体重分布、色泽和常规营养成分进行测定和分析,以期绒螯蟹新种质资源评估及开发利用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

本研究所用绒螯蟹为2020和2021年9月采用地笼捕捉自绥芬河水系的野生绒螯蟹,捕捉江段为绥芬河水系东宁段(44.01°N, 131.14°E)。两年共捕捉雌体156只,雄体143只。活体运输至中国水产科学研究院黑龙江水产研究所黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增殖重点开放实验室进行分析测定。

### 1.2 性成熟个体及体重分布统计

根据王武等(2013)判别所捕获绥芬河水系野生绒螯蟹性成熟状况,并计算未性成熟与性成熟个体百分比含量。生殖蜕壳的判断标准:雌体主要依据腹脐形状和腹脐绒毛长度;雄体主要依据交接器是否突出和硬化、大螯绒毛覆盖面积和长度(王世会等, 2019a)。用电子天平(型号:JA2002,精确度为0.01 g,上海浦春计量仪器有限公司)逐一称量所有捕获绒螯蟹个体,计算未性成熟与性成熟的平均体重,并统计各规格所占总个体数的百分比含量。

### 1.3 性成熟绒螯蟹可食组织比例及肥满度测定

选取性成熟且百分比含量最高的绒螯蟹组雌雄体各15只,用电子天平准确称量,并用游标卡尺(型号:605,精确度为0.01 mm,哈尔滨量具刃具有限责任公司)测量甲壳长和甲壳宽,计算肥满度(condition factor, CF)。解剖取出全部肝胰腺和性腺精确称重,计算肝胰腺指数(hepatosomatic index, HSI, %)和性腺指数(gonadosomatic index, GSI, %)。精刮绒螯蟹一半肌肉,计算出肉率(muscle yield, MY, %)和总可食率(total edible yield, TEY, %)(王世会等, 2019a)。

$$CF = W/L^3;$$

$$HSI (\%) = 100 \times W_H/W;$$

$$GSI (\%) = 100 \times W_G/W;$$

$$MY (\%) = 100 \times W_M/W;$$

$$TEY (\%) = GSI + HSI + MY$$

式中, $L$ 为甲壳长(cm), $W_H$ 为肝胰腺重(g), $W_G$ 为性腺重(g), $W_M$ 为肌肉重(g), $W$ 为体重(g)。

### 1.4 色泽及常规营养品质测定

选取解剖后获得的甲壳、肝胰腺和性腺样品,用高精度分光测色仪(型号:CR-400,日本柯尼卡美能达控股公司)分别测定湿样和冻干样的色泽,每个样品随机测量3个点取平均值作为其色泽的参考值,测量参数包括亮度值( $L^*$ )、红度值( $a^*$ )和黄度值( $b^*$ )(Long *et al.*, 2017)。

采用真空冷冻干燥法(赵恒亮, 2016)测定绒螯蟹可食组织(肝胰腺、性腺和肌肉)的水分含量(-50℃真空冷冻至恒重);采用 AOAC(1995)方法测定绒螯蟹可食组织中的粗蛋白(凯氏定氮法)和灰分(550℃灼烧至恒重);参考 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》索氏抽提法提取绒螯蟹可食组织中粗脂肪并测定其含量。

### 1.5 数据分析

应用 SPSS 22.0 软件处理实验数据并统计分析,所有数据均采用平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用 Levene 法进行方差齐性检验,当不满足齐性方差时,对百分比数据进行反正弦或平方根处理。采用独立 *T* 检验检查各项指标间的差异性, *P*<0.05 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 性成熟比例及平均体重分布

9 月末黑龙江省绥芬河水系(东宁段)野生绒螯蟹存在未性成熟和性成熟两种状态,比例如图 1 所示。雌体未性成熟比例为(24.36±2.56)%,性成熟比例为(75.64±3.97)%,性成熟比例显著高于未性成熟比例(*P*<0.05);雄体未性成熟比例为(65.03±3.08)%,性成熟比例为(34.97±2.46)%,性成熟比例显著低于未性成熟比例(*P*<0.05)。未性成熟和性成熟绒螯蟹平均体重如图 2 所示。雌体未性成熟绒螯蟹平均体重为(70.28±4.03)g,性成熟绒螯蟹平均体重为(110.51±2.42)g,性成熟绒螯蟹平均体重显著高于未性成熟绒螯蟹(*P*<0.05);雄体未性成熟绒螯蟹平均体重为(75.25±2.95)g,性成熟绒螯蟹平均体重为(147.79±5.94)g,性成熟绒螯蟹平均体重显著高于未性成熟绒螯蟹(*P*<0.05)。

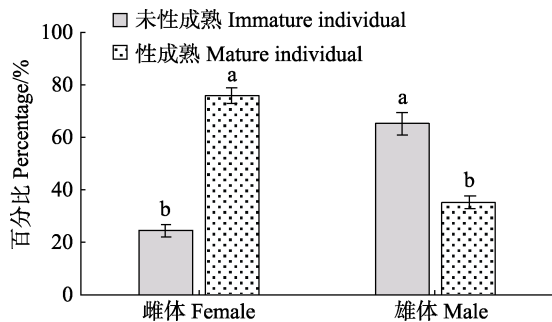


图 1 绥芬河绒螯蟹雌雄成熟比例

Fig.1 The percentage of maturity Suifenhe mitten crab

数据上标中含有不同字母表示差异显著(*P*<0.05),下同。

Values with different superscripts are significantly different (*P*<0.05), the same as below.

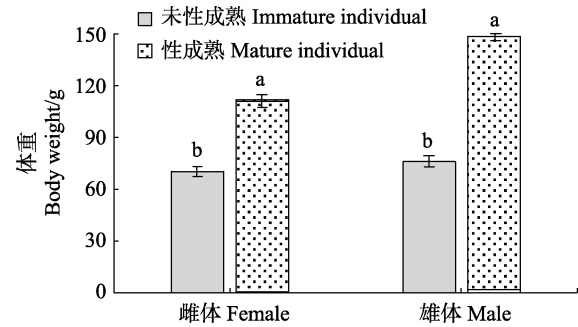


图 2 绥芬河绒螯蟹雌雄平均体重

Fig.2 The average body weight of adult Suifenhe mitten crab

绥芬河绒螯蟹不同规格分布比例如图 3 所示。就雌体而言(图 3),未性成熟绒螯蟹平均体重主要集中于 50.00~99.99 g 范围内,且不同规格组间存在显著性差异(*P*<0.05)。性成熟绒螯蟹平均体重主要集中于 75.00~149.99 g 范围内,除 50.00~74.99 g 规格和 175.00~199.99 g 规格间无显著性差异外,其余各规格组间均存在显著性差异(*P*<0.05),同时 ≥100.00 g 的个体数比例达到了 55.94%。就雄体而言(图 3),未性成熟绒螯蟹平均体重主要集中于 30.00~124.99 g 范围内,

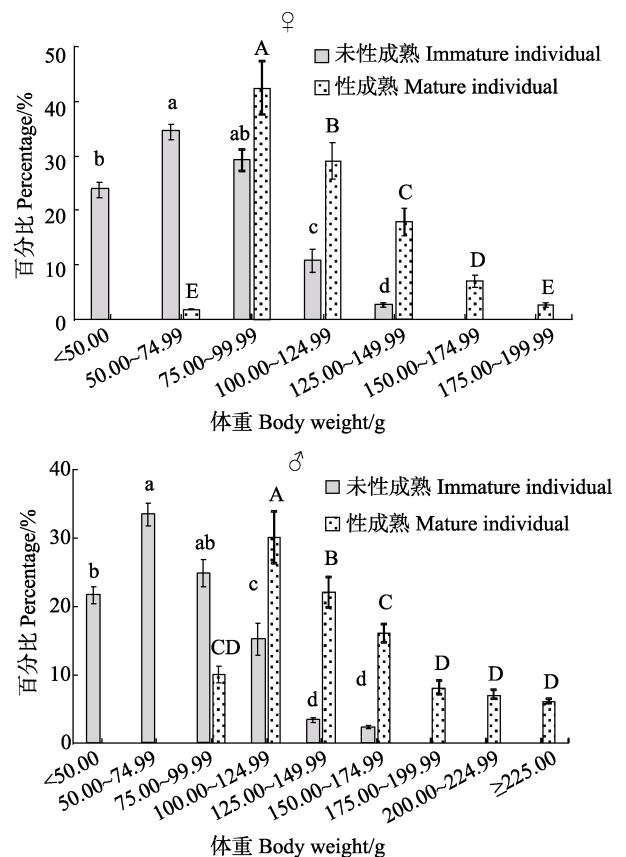


图 3 绥芬河绒螯蟹不同规格分布比例

Fig.3 The body weight distribution of Suifenhe mitten crab

除 125.00~149.99 g 规格和 150.00~174.99 g 规格无显著性差异外, 其余各规格组间均存在显著性差异 ( $P<0.05$ )。性成熟绒螯蟹平均体重分布较为分散, 除 175.00~199.99 g、200.00~224.99 g 和  $\geq 225.00$  g 规格无显著性差异外, 其余各规格组间均存在显著性差异 ( $P<0.05$ ), 同时  $\geq 125.00$  g 的个体数比例达到了 60.00%。

## 2.2 可食组织比例及肥满度

绥芬河绒螯蟹雌体和雄体可食组织比例及 CF 比较见表 1 所示。雌体平均体重、MY 和 CF 显著低于雄体 ( $P<0.05$ ), 而 HSI 和 GSI 则显著高于雄体 ( $P<0.05$ ), 其余指标甲壳长、甲壳宽和 TEY 则无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

## 2.3 色泽及常规营养品质

绥芬河绒螯蟹成体色泽参数见表 2 所示。雌体甲壳湿样及干样的  $L^*$  和  $b^*$  均显著低于雄体 ( $P<0.05$ ) (图 4), 肝胰腺湿样的  $L^*$  显著低于雄体 ( $P<0.05$ ), 其余甲壳和肝胰腺雌雄性别间色泽参数均无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

表 1 绥芬河绒螯蟹可食组织比例及肥满度比较  
Tab.1 Edible tissue ratio and condition factor of adult Suifenhe mitten crab ( $n=15$ )

项目 Item	雌体 Female	雄体 Male
体重 BW/g	87.01 $\pm$ 2.78 <sup>b</sup>	104.74 $\pm$ 2.85 <sup>a</sup>
甲壳长 CL/mm	56.08 $\pm$ 0.53	55.85 $\pm$ 0.47
甲壳宽 CW/mm	59.61 $\pm$ 0.58	61.01 $\pm$ 0.50
肝胰腺指数 HSI/%	8.51 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	6.66 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
性腺指数 GSI/%	2.65 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
出肉率 MY/%	31.57 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	34.04 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>
总可食率 TEY/%	42.73 $\pm$ 0.75	42.13 $\pm$ 0.74
肥满度 CF	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

注: 同行数据上标中含有不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

Notes: Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ), the same as below.

绥芬河绒螯蟹常规营养品质如表 3 所示。就性腺而言, 雌体水分含量显著低于雄体 ( $P<0.05$ ), 而粗蛋白和粗脂肪含量则显著高于雄体 ( $P<0.05$ ), 灰分含量无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 就肝胰腺而言, 雌雄性别间均无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 就肌肉而言, 雌体粗蛋白含量显著高于雄体 ( $P<0.05$ ), 其余指标无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

表 2 绥芬河绒螯蟹成体色泽比较

Tab.2 The comparison of color quality of adult Suifenhe mitten crab ( $n=9$ )

项目 Item	色泽 Color	雌体 Female	雄体 Male			
甲壳 Carapace	湿样 Wet sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	44.36 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup> 3.16 $\pm$ 0.18 14.74 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	51.52 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup> 3.07 $\pm$ 0.20 19.79 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>		
	干样 Dry sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	57.33 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup> 19.96 $\pm$ 0.66 33.06 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	60.33 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup> 19.05 $\pm$ 0.50 36.18 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>		
	肝胰腺 Hepatopancreas	湿样 Wet sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	69.32 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup> 10.76 $\pm$ 0.71 48.10 $\pm$ 2.36	66.64 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup> 12.28 $\pm$ 0.54 46.43 $\pm$ 2.11	
		干样 Dry sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	55.82 $\pm$ 1.13 12.34 $\pm$ 0.30 34.05 $\pm$ 0.77	56.62 $\pm$ 1.28 13.07 $\pm$ 0.77 31.96 $\pm$ 1.33	
		性腺 Gonads	湿样 Wet sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	27.74 $\pm$ 0.46 2.88 $\pm$ 0.37 2.31 $\pm$ 0.41	— — —
			干样 Dry sample	$L^*$ $a^*$ $b^*$	72.17 $\pm$ 0.75 24.65 $\pm$ 0.58 43.66 $\pm$ 0.85	— — —

## 3 讨论

种质资源(又称为遗传资源)是亲代传递给子代的遗传物质, 往往存在于物种之中(Primack, 1992), 包括野生物种、培育推广的新品种以及重要的遗传材料等(刘英杰等, 2015)。野生土著种的开发利用是增加水产养殖新品种的重要途径, 而种质资源调查则是了解野生种质资源状况的重要手段。本研究表明, 9月末绥芬河水系野生绒螯蟹性成熟雌体平均体重为(110.51 $\pm$ 2.42) g, 雄体为(147.79 $\pm$ 5.94) g, 这显著高于闽江水系(徐建峰等, 2020)和南流江水系野生绒螯蟹体重(2019年度调研)。通常来讲, 长江流域中华绒螯蟹个体平均体重最大, 随着纬度升高或降低, 绒螯蟹个体平均体重均逐渐减小。例如, 由于二龄辽河水系中华绒螯蟹长成规格较小, 故养殖区域主要限制在东北及华北部分地区。目前, 南流江水系绒螯蟹由于并未开发利用, 但通过调研可知其平均体重较小。但在黑龙江省, 绥芬河野生绒螯蟹的平均体重却显著高于人工养殖中华绒螯蟹, 与通常认知有悖。与人工池塘养殖或稻田养殖环境相比较而言, 绥芬河野生绒螯蟹生长于绥芬河天然水域中, 推测可能水体平均深度较大, 水温较低, 同时动物性饵料资源较为匮乏等因素, 导致 2 年生长期不能性成熟, 故生活史延长到 3 年或

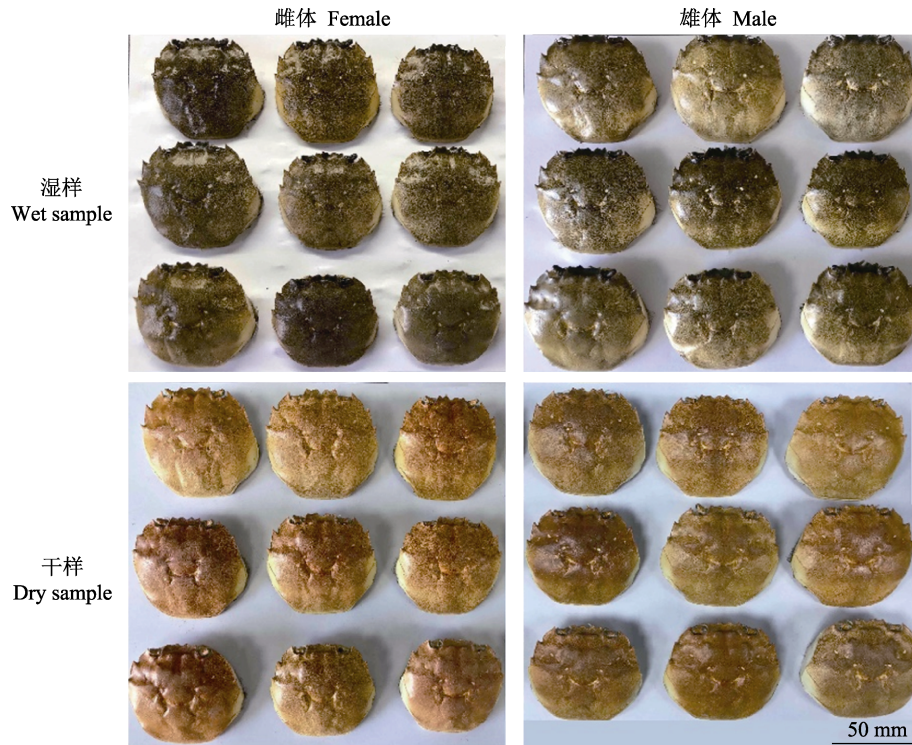


图 4 绥芬河绒螯蟹头胸甲湿样及干样色泽比较

Fig.4 The color of wet and dry carapace of adult Suifenhe mitten crab

表 3 绥芬河绒螯蟹常规营养成分比较(%，湿重)  
Tab.3 The proximate composition of adult Suifenhe mitten crab (%，wet weight) (n=15)

项目 Item	雌体 Female	雄体 Male
性腺 Gonad		
水分 Moisture	67.07±2.30 <sup>b</sup>	78.80±0.64 <sup>a</sup>
粗蛋白 Crude protein	21.65±0.20 <sup>a</sup>	13.31±0.03 <sup>b</sup>
粗脂肪 Crude lipid	8.08±0.26 <sup>a</sup>	1.27±0.15 <sup>b</sup>
灰分 Ash	1.71±0.10	1.78±0.00
肝胰腺 Hepatopancreas		
水分 Moisture	55.94±1.94	56.75±2.11
粗蛋白 Crude protein	8.72±0.23	9.18±0.33
粗脂肪 Crude lipid	32.12±0.63	30.36±0.17
灰分 Ash	1.01±0.04	1.04±0.09
肌肉 Muscle		
水分 Moisture	81.39±0.49	82.02±0.51
粗蛋白 Crude protein	15.51±0.08 <sup>a</sup>	14.58±0.22 <sup>b</sup>
粗脂肪 Crude lipid	0.60±0.03	0.55±0.01
灰分 Ash	1.37±0.03	1.35±0.05

4 年，多 1~2 年的生长期直接影响了绥芬河野生绒螯蟹雌雄个体平均体重。这与刘艳春(2014)提及的黄河三角洲天然水域中也存在大规格个体的成因相似。绥

芬河野生绒螯蟹未性成熟雌体平均体重为(70.28±4.03) g，雄体则为(75.25±2.95) g，而在水温、水草和饵料资源均很丰富的前提下，一年人工养殖扣蟹的平均体重仅约为 4.00~10.00 g 左右(王世会等, 2019b)，通过这个数据也能从侧面反映绥芬河天然水域中绒螯蟹的生活史不太可能是 2 年。目前关于蟹类年龄鉴定文献报道较少，仅从蟹类眼柄组织切片观察生长纹细纹与宽纹等(蒋瑞等, 2018; 倪震宇等, 2019)角度探讨过，这为蟹类年龄鉴定提供了新的方法，但对在生产实践中蟹类年龄鉴定指导意义有限，并未广泛应用。

就性别差异而言，雌体平均体重要小于雄体，这在许多水产动物体现出较为明显的生长速度差异(王世会等, 2019b)，同时雄体规格大于雌体，也有利于繁殖群体中雌体保持生殖潜力(杜楠等, 2021)。本研究表明，雌体 HSI、GSI 和 TEY 高于雄体，而 MY 和 CF 则低于雄体，这与以往公开报道文献结果一致(王世会等, 2020; Wang *et al*, 2021)，说明野生绒螯蟹与人工养殖中华绒螯蟹在可食组织比例和 CF 等指标参数上是一致的。但由于野生绒螯蟹的生物饵料不足等原因，其 GSI 数值略低于人工养殖绒螯蟹，性腺发育速度较慢。

色泽是绒螯蟹感官评价的重要指标参数，也是影

响消费者购买欲的重要因素(Tume *et al*, 2009; Long *et al*, 2017)。通常来讲, 绒螯蟹的甲壳及可食组织红度值越高, 则相对市场价格越高(Chien *et al*, 1992),  $L^*$ 、 $a^*$ 和  $b^*$ 是评价水产动物色泽的重要指标参数, 数值高低与其中的类胡萝卜素(尤其是虾青素)含量密切相关(Long *et al*, 2017)。本研究中, 雄体甲壳的  $L^*$ 和  $b^*$ 值均显著高于雌体, 这与西双版纳池塘养殖中华绒螯蟹的甲壳色泽数据相似(王世会等, 2019c)。雄体肝胰腺  $a^*$ 值高于雌体, 可能原因是由于在性腺发育过程中, 雌蟹肝胰腺中的大量类胡萝卜素营养被转运至卵巢性腺发育, 而雄体肝胰腺中营养则无需转移至精巢(王世会等, 2019c)。

可食组织中常规营养成分是评价水产品营养价值的重要指标(Kause *et al*, 2002)。绒螯蟹营养成分组成受遗传、养殖环境和饵料等多种因素影响(成永旭等, 1998; Wu *et al*, 2011)。本研究表明, 绥芬河野生绒螯蟹肝胰腺和肌肉的常规营养成分因性别差异影响不大, 而性腺中常规营养成分则因性别差异影响较大, 这与王世会等(2019a、2020)报道结果一致。就不同可食组织比较而言, 性腺和肌肉中粗蛋白含量较高, 而肝胰腺中粗脂肪含量较高, 这可能与性腺中蛋白积累为性腺发育提供营养及能量有关, 而肝胰腺则是甲壳动物脂质存储和代谢的重要器官(Vogt, 1994)。尤其值得关注的的数据是, 绥芬河野生绒螯蟹卵巢中粗蛋白/粗脂肪的含量比值为 2.68, 而山东东营、青海海西蒙古族藏族自治州、上海崇明岛和云南西双版纳(王世会等, 2019a; Wang *et al*, 2021)养殖中华绒螯蟹卵巢中粗蛋白/粗脂肪的比值仅为 1.80、2.11、1.84 和 1.94。绥芬河野生绒螯蟹雌体和雄体肌肉中粗蛋白/粗脂肪的比值高达 25.85 和 26.51, 而山东东营、青海海西蒙古族藏族自治州、上海崇明岛和云南西双版纳(王世会等, 2019a; Wang *et al*, 2021)养殖绒螯蟹雌体比值仅为 14.28、16.32、18.31 和 15.48, 雄体比值仅为 15.98、17.32、16.44 和 19.33。以上数据说明, 与其他地区养殖或野生绒螯蟹比较而言, 绥芬河野生绒螯蟹可食组织(卵巢和肌肉)是一种高蛋白低脂肪的食物, 符合人们对高蛋白低脂肪食物的需求。

综上所述, 绥芬河野生绒螯蟹性成熟个体平均体重较大, 且大规格个体百分比含量较高, 可食组织比例、CF 指标、色泽及常规营养品质与现已开发利用的辽河和长江水系中华绒螯蟹无明显差异, 但卵巢和肌肉中粗蛋白与粗脂肪比例更加符合人体对高蛋白低脂肪食物的需求, 是一种具有较大开发潜力的绒螯蟹新种质。

## 参 考 文 献

- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2021 China Fishery Statistical Yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2021, 34 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021, 34]
- CHENG Y X, DU N S, LAI W. Lipid composition in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* at different stages. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(4): 420–429 [成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成变化. *动物学报*, 1998, 44(4): 420–429]
- CHENG Y X, WU X G, YANG X Z, *et al*. Current trends in hatchery techniques and stock enhancement for Chinese mitten crab, *Eriocheir japonica sinensis*. *Reviews in Fisheries Science*, 2008, 16(1/2/3): 377–384
- CHIEN Y H, JENG S C. Pigmentation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture*, 1992, 102: 333–346
- DU N, GENG Z, ZHANG T, *et al*. Reproductive population composition and physiological characteristics of *Eriocheir sinensis* in the Yangtze River estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210823002 [杜楠, 耿智, 张涛, 等. 长江口中华绒螯蟹繁殖群体的组成与生理特征. *渔业科学进展*, 2021, DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210823002]
- GUO J Y, NG N K, DAI A, *et al*. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* de Hann, 1835 (Crustacea: Decapod: Brachyura: Grapsidae). *Raffles Bulletin of Zoology*, 1997, 45(2): 445–476
- JIANG R, LIU B L, LIU H X, *et al*. Microstructures of eyestalks of three common commercial shrimp and crab species in China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 99–105 [蒋瑞, 刘必林, 刘华雪, 等. 三种常见经济虾蟹类眼柄微结构分析. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 99–105]
- JIANG X D, WU X G, LIU Q, *et al*. 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*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 131–137 [姜晓东, 吴旭干, 刘青, 等. 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. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 131–137]
- KAUSE A, RITOLA O, PAANANEN T, *et al*. Coupling body weight and its composition: A quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture*, 2002, 211: 65–79
- LIU Y C. Feasibility analysis of growing large-sized river crabs

- in three years of artificial control of sexual maturity. Hebei Fisheries, 2014, 248(8): 15–17 [刘艳春. 人工控制性成熟三年养成大规格河蟹可行性分析. 河北渔业, 2014, 248(8): 15–17]
- LIU Y J, LIU Y X, FANG H, *et al.* Advances and prospect in research on aquaculture germplasm resources in China. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(5): 48–55, 60 [刘英杰, 刘永新, 方辉, 等. 我国水产种质资源的研究现状与展望. 水产学杂志, 2015, 28(5): 48–55, 60]
- LONG X W, WU X G, ZHAO L, *et al.* Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* cell powder on coloration, ovarian development and antioxidation capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Aquaculture, 2017, 473: 545–553
- NI Z Y, LIU B L, ZHANG J, *et al.* Current progresses direct age determination and growth of shrimps and crabs using microstructure of eyestalks: A review. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(1): 139–144 [倪震宇, 刘必林, 张健, 等. 利用眼柄微结构研究虾蟹类年龄和生长的进展. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 139–144]
- PRIMACK R B. Tropical community dynamics and conservation biology. Biology Science, 1992, 42(11): 818–820
- TUME R K, SIKES A L, TABRETT S, *et al.* Effect of background colour on the distribution of astaxanthin in black tiger prawn (*Penaeus monodon*): Effective method for improvement of cooked colour. Aquaculture, 2009, 296(1/2): 129–135
- VOGT G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus*, (Crustacea, Decapoda). Zoomorphology, 1994, 114(2): 83–101
- WANG C H, LI C H, LI S F. Mitochondrial DNA-inferred population structure and demographic history of the mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) found along the coast of mainland China. Molecular Ecology, 2008, 17(15): 3515–3527
- WANG S H, CHENG Y X, SHI L Y, *et al.* A comparative study of edible yield and quality in adult Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in different periods of autumn. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(10): 1196–1209 [王世会, 成永旭, 石连玉, 等. 秋季不同时期上市中华绒螯蟹可食率和品质比较. 中国水产科学, 2020, 27(10): 1196–1209]
- WANG S H, LONG X W, ZU L, *et al.* Preliminary study on gonadal development and nutritional composition of adult *Eriocheir sinensis* from Xishuangbanna. Journal of Shanghai Ocean University, 2019a, 28(4): 483–490 [王世会, 龙晓文, 祖露, 等. 西双版纳河蟹性腺发育规律和营养品质. 上海海洋大学学报, 2019a, 28(4): 483–490]
- WANG S H, WANG H N, LIU Q, *et al.* A comparative study between culture performance and total edible yield of first-generation Chinese mitten crabs produced from inbred families and hybrid families. Journal of Fishery Sciences of China, 2019b, 26(4): 664–676 [王世会, 王海宁, 刘青, 等. 中华绒螯蟹 1 龄性早熟自交和 1 龄性早熟与 2 龄正常成熟杂交 F<sub>1</sub> 养殖性能及可食率比较. 中国水产科学, 2019b, 26(4): 664–676]
- WANG S H, WANG Y Z, WU X G, *et al.* Gonadal development and biochemical composition of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) from four sources. Journal of Food Science, 2021, 86(3): 1066–1080
- WANG W, WANG C H, MA X Z. Ecological culture of Chinese mitten crab aquaculture. 2nd ed. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2013, 59–84 [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]
- WU X G, WANG Z, CHENG Y X, *et al.* Effects of dietary phospholipids and highly unsaturated fatty acids on the precocity, survival, growth and hepatic lipid composition of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards). Aquaculture Research, 2011, 42(3): 457–468
- XU J F, WANG S H, CHEN L W, *et al.* Adult body weight profile and gonadal development of wild Chinese mitten handed crab in Minjiang River, Fujian Province. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(5): 26–31 [徐建峰, 王世会, 陈立武, 等. 闽江水系成体野生河蟹体质量分布和性腺发育研究. 水产学杂志, 2020, 33(5): 26–31]
- XU J W, CHAN T Y, TSANG L M, *et al.* Phylogeography of the mitten crab *Eriocheir sensu stricto* in East Asia: Pleistocene isolation, population expansion and secondary contact. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52(1): 45–56
- YANG Y H, LI M S, LUO L, *et al.* Study on toxicity of salinity and alkalinity on *Eriocheir sinensis*. Journal of Northeast Agricultural University, 2022, 53(2): 36–41 [杨雨虹, 李明帅, 罗亮, 等. 盐碱胁迫对中华绒螯蟹毒性作用研究. 东北农业大学学报, 2022, 53(2): 36–41]
- ZHANG Z H, ZOU M, YANG X, *et al.* Experiment report on artificial propagation of Suifenhe River crab. Fisheries Economy Research, 2005, 3: 42–45 [张志华, 邹民, 杨秀, 等. 绥芬河河蟹人工繁殖试验报告. 渔业经济研究, 2005, 3: 42–45]
- ZHAO H L. Comparative studies on morphology, culture performance and biochemical composition among Yangtze, Huang, and Liao River populations of adult *Eriocheir sinensis* reared in ponds. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 1–2 [赵恒亮. 池塘养殖条件下中华绒螯蟹长江、黄河和辽河 3 个地理种群成蟹形态学、养殖性能和营养品质的比较研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 1–2]

## Body Weight Profile and Proximate Composition of Adult Suifenhe *Eriocheir sensu stricto*

WANG Shihui<sup>1</sup>, LUO Liang<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, GUO Kun<sup>1</sup>,  
ZHANG Xubin<sup>2</sup>, KONG Lingjie<sup>2</sup>, ZHAO Zhigang<sup>1①</sup>

(1. Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070, China;

2. Heilongjiang Province Fisheries Technology Extension Center, Harbin, Heilongjiang 150010, China)

**Abstract** Mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) is an important aquaculture species in China, with three main species: Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), Japanese mitten crab (*Eriocheir japonicus*), and Hepu mitten crab (*Eriocheir hepuensis*). Mitten crab has a catadromous life cycle. Paired mitten crabs mate and spawn in estuaries, and the progeny migrate upriver into freshwater rivers to grow. Mitten crab is widely distributed in major basins along the coast of China. Wild mitten crab populations are distributed from the Suifenhe River in the Heilongjiang Province in the north to the Nanlijiang River in the Guangxi Zhuang Autonomous Region in the south. Suifenhe mitten crab is an indigenous wild mitten crab population distributed in the Suifenhe River basin of Dongning City, Mudanjiang City, Heilongjiang Province. It is a highly salt-tolerant aquatic animal, and the current mitten crab germplasm is severely degraded. Therefore, the development of a new mitten crab germplasm is of great significance for crab industry development and salt-alkali aquaculture in China. In September 2020 and 2021, ground cages were used to capture 299 wild crabs (156 females and 143 males) from the Suifenhe River basin of Heilongjiang to investigate the parameters of sexual maturity, body weight (BW) profile, color, total edible yield, and proximate composition.

The sexual maturity of wild Suifenhe mitten crab was determined by puberty molting, and BW was measured using an electronic balance. The hepatosomatic index (HSI, %) and gonadosomatic index (GSI, %) were calculated from their respective weights and the ratio of BW. A high-precision spectrophotometer was used to determine the color of the wet and dry samples. Vacuum freeze-drying was used to determine the moisture content of the edible tissues (hepatopancreas, gonads, and muscles). Protein, lipid, and ash were analyzed by the AOAC and Soxhlet extractor method.

In late September, wild crabs in the Suifenhe River basin (Dongning Section) in Heilongjiang Province comprised of two stages: immature and sexually mature. The ratio of immature females was significantly lower than that of sexually mature ones ( $P < 0.05$ ); however, it was the opposite for males. Regardless of sex, the average BW of sexually mature individuals was significantly higher than that of immature individuals ( $P < 0.05$ ). The average BW of mature females was  $(110.51 \pm 2.42)$  g, and the average BW of mature individuals was  $(147.79 \pm 5.94)$  g. The average BW of sexually mature female crabs was mainly concentrated in the range of 75.00~149.99 g, and the percentage of mature female individuals ( $\geq 100.00$  g/ind) was 55.94%. The average BW distribution of sexually mature male crabs was relatively scattered, and the percentage of mature male individuals ( $\geq 125.00$  g/ind) was 60.00%. On September 29, the HSI and GSI of females were significantly higher than those of males, whereas the rates of muscle yield (MY) and condition factor (CF) were higher in males than those in females ( $P < 0.05$ ). The brightness

① Corresponding author: ZHAO Zhigang, E-mail: Zhaozhigang@hrfri.ac.cn

( $L^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ) values of the female carapace were significantly lower than those of the males ( $P<0.05$ ). The crude protein content in female gonads and muscles was significantly higher than that in male carapace, whereas the moisture content in male gonads was significantly higher than that in females ( $P<0.05$ ). The results of this study provide basic data for the development and utilization of Suifenhe mitten crab germplasm resources.

Wild adult Suifenhe mitten crab had larger BW and a higher percentage of large-sized individuals than pond-reared *E. sinensis* in the north of China. The proportion of edible tissues, condition factor, color, and proximate composition of Suifenhe mitten crab were not significantly different from those of *E. sinensis* from the Liao River and Yangtze River. Meanwhile, the ratio of crude protein to crude lipid in ovaries and muscles was in accordance with the human body's need for high-protein and low-fat foods. Hence, Suifenhe mitten crab is a new crab germplasm with significant development potential. These results provide basic data for the development and utilization of Suifenhe mitten crab germplasm resources.

**Key words** Suifenhe *Eriocheir sensu stricto*; Body weight; Color; Quality



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210412003

http://www.yykxjz.cn/

代金彩, 聂竹兰, 赵年桦, 任永丽, 魏杰. 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及盐碱度对其增殖的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 70–80

DAI J C, NIE Z L, ZHAO N H, REN Y L, WEI J. Establishment and the effect of salinity of cell lines derived from tail fin of *Schizothorax biddulphi*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 70–80

# 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及 盐碱度对其增殖的影响\*



代金彩 聂竹兰<sup>①</sup> 赵年桦 任永丽 魏杰

(塔里木大学动物科学学院 新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室  
塔里木珍稀鱼类研究中心 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要** 为了建立塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)尾鳍细胞系,本研究采用组织块法,分别用含胎牛血清(FBS)的 DME/F12 培养基体外培养塔里木裂腹鱼尾鳍组织,初步建立了塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系(BICF1)。采用 MTT 法测定分析盐度(NaCl)和碱度(NaHCO<sub>3</sub>)对其增殖的影响。结果显示, BICF1 悬浮培养传至 45 代,最适培养液为 DME/F12,最适 FBS 浓度为 20%,最适温度为 25℃。第 10 代 BICF1 的群体倍增时间为 28.11 h,呈“S”型生长。第 6 代 BICF1 液氮冻存 180 d 后复苏,经台盼蓝染色计数, BICF1 有(87.85±0.66)%的细胞具有活性,复苏后可增殖并传代。BICF1 无细菌、真菌、支原体污染。第 10 代 BICF1 线粒体 16S rRNA 测序结果与 GenBank 基因序列进行一致性对比,结果显示, BICF1 与 JQ844133.1 的一致率为 100%,表明 BICF1 来自于塔里木裂腹鱼。BICF1 增殖数量在盐度为 1、2、4、6 时呈上升趋势,在盐度为 6、8、10 时呈下降趋势;盐度为 6 时, BICF1 增殖数量最高。BICF1 增殖数量在碱度为 2、3、4、5、6 g/L 时呈上升趋势,在碱度为 6、7、8、10 g/L 时呈下降趋势;碱度为 6 g/L 时, BICF1 增殖数量最高。细胞增殖数量随盐碱度增加呈现先升高后下降的趋势。本研究旨在为合理开发和利用塔里木裂腹鱼遗传资源以及建立和保护其种质资源提供一定的科学依据。

**关键词** 塔里木裂腹鱼;尾鳍组织;细胞培养

中图分类号 Q952 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0070-11

国家二级保护动物塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothracinae)、裂腹鱼属(*Schizothorax*),俗称“尖嘴鱼”,是我国的特有物

\* 国家自然科学基金(31560721; 31860729)、自治区研究生科研创新项目(TDGRI201918)、国家大学生创新创业训练计划项目(202010757007)、中国海洋大学塔里木大学科研合作联合基金项目(ZHYLH201902)和华中农业大学塔里木大学科研合作联合基金项目(TDHNH201702; 2662017PY118)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31560721; 31860729), Research and Innovation Program for Graduate Students of Autonomous Region (TDGRI201918), Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (202010757007), Joint Research Fund between Ocean University of China and Tarim University (ZHYLH201902), and Huazhong Agricultural University and Tarim University Research Cooperation Joint Fund Project (TDHNH201702; 2662017PY118)].

代金彩, E-mail: 1477496028@qq.com

<sup>①</sup> 通信作者: 聂竹兰, 教授, E-mail: niezh2004@163.com

收稿日期: 2021-04-12, 收修改稿日期: 2021-05-22

种(王德忠, 1998)。有关塔里木裂腹鱼的报道主要集中在其地理分布(张人铭等, 2007)、形态特征(杨天燕等, 2018)、繁殖特性(魏杰等, 2011)、线粒体基因组 DNA 结构分析(杨天燕等, 2011)、遗传标记开发(Luo *et al.*, 2012)及遗传多样性(海萨等, 2016)等方面。

鱼类组织细胞培养起步于 20 世纪 60 年代。最早的研究开始于海水鱼类组织细胞培养, 并建立蓝仿石鲈(*Haemulon sciurus*)尾鳍细胞系(CF-1)(Clew *et al.*, 1961); 但公认的第 1 个鱼类永久性细胞系是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系(RTG-2)(Wolf *et al.*, 1962)。之后建立了胖头鲮(*Pimephales promelas*)肌肉细胞系(FHM)(Gravell *et al.*, 1965)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)胚胎细胞系(SWT)(Kelly *et al.*, 1973)和大西洋鲑(*Salmo salar*)内脏细胞系(AS)(Nicholson *et al.*, 1973)。我国鱼类细胞培养技术发展于 20 世纪 70 年代, 早期研究主要是淡水养殖鱼类, 张念慈等(1981)建立了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)吻端细胞株(ZC-7901)及其上皮样细胞亚株(ZC-7901S1)。左文功等(1986)建立了草鱼肾脏组织细胞系(CIK)。随后, 魏彦章等(1987)建立了草鱼尾鳍细胞系(GCCF-2)。随着海水养殖鱼类的发展, 在 1997 年我国建立了 4 个永久的细胞系, 分别为牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)鳃组织细胞系(FG)、鲈(*Perca fluviatilis*)脾组织细胞系(SPS)和心组织细胞系(SPH)、真鲷(*Pagrus major*)鳍组织细胞系(RSBF)(童裳亮等, 1997)。随着各国鱼类细胞系建立的迅速发展, 进行细胞培养的鱼种类不断增多, 由淡水鱼类扩展到海水鱼类, 而且来源的组织更为广泛, 从鳍条、肌肉、性腺、内脏等组织扩展到肿瘤、垂体、神经组织等。其中, 因鳍条组织本身具有很强的再生能力, 细胞迁出成功率高, 同时, 取鳍条组织时不用杀死鱼, 因此, 有很多鱼类的细胞来源于鳍条组织, 如金头鲷(*Sparus aurata*)鳍条细胞(SAF-1)(Bejar *et al.*, 1997)、绿腹丽鱼(*Etilopterus suratensis*)尾鳍细胞(PSF)(Swaminathan *et al.*, 2010)、胡鲇(*Clarias batrachus*)鳍条细胞(ICF)(Babu *et al.*, 2011)和金鱼(*Carassius auratus*)尾鳍细胞(GFTF)(Yan *et al.*, 2011)。

盐碱度水平是影响硬骨鱼类生存、繁殖、发育、生长和生理功能的最重要环境因素之一, 会由于自然因素或人为因素而发生变化, 从而对养殖鱼类造成渗透调节胁迫, 影响其正常生长(Resley *et al.*, 2006)。水体中盐碱度水平对鱼类的存活有显著影响, 盐碱度过高或过低都会使鱼类的存活率显著的降低(Yao *et al.*, 2010)。鱼类细胞系是进行病毒学、环境毒理学、分子遗传学、基因功能分析、细胞遗传学

与种质保存等研究的材料和模型(周广舟等, 2011)。草鱼鳍细胞系可用于研究草鱼源维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)对宿主细胞的毒性及致死机制(刘明珠等, 2019); 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)尾鳍细胞(GiCF)可用于辛硫磷对 GiCF 毒性研究(赵燕楠等, 2020); 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)鳍细胞系用于研究铜、锌对泥鳅鳍细胞 DNA 损伤及金属硫蛋白表达的影响(姜姗等, 2020)。

本研究建立了塔里木裂腹鱼尾鳍组织细胞系, 测定了盐度(NaCl)和碱度(NaHCO<sub>3</sub>)对其增殖的影响。本研究旨在为合理开发和利用塔里木裂腹鱼遗传资源以及建立和保护其种质资源提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用塔里木裂腹鱼于 2019 年 9 月取自新疆克孜勒河, 饲养在新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室。取其中 1 条健康雌塔里木裂腹鱼, 体重为 21.37 g, 全长为 15.46 cm。

DME/F12、L-15、MEM、RPMI-1640、M199 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; 磷酸缓冲液(PBS)、青霉素-链霉素双抗、二甲基亚砜(DMSO)购自 Solarbio 公司; 台盼蓝和 0.25% 胰酶购自 Biotopped 公司; MS-222 购自渔夫宝公司; 基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 原代培养与传代培养** 取健康塔里木裂腹鱼, 加入 0.1 μL/g 的 MS-222 麻醉剂麻醉后, 剪取上尾鳍。用 75% 的酒精对尾鳍进行消毒, 置于超净台中。取 4 个培养皿, 其中, 1 个加入 75% 的酒精, 3 个加入添加含 500 IU/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素、12.5 μg/mL 两性霉素 B 的 PBS。尾鳍放入酒精中 30 s, 然后依次在另外 3 个培养皿中浸泡, 之后将其放入 2 mL 无菌离心管中, 并用无菌眼科剪将其剪成大约 1~2 mm<sup>3</sup> 的组织碎块, 向其中加入 500 μL 的 DME/F12 培养液, 将组织碎块移到 25 mm<sup>2</sup> 培养瓶中, 正相放入 25℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 观察细胞贴壁情况。4 h 后反相放置, 培养 2 h 后, 向其中加入 1 mL DME/F12 培养液(含 20% FBS、500 IU/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素、12.5 μg/mL 两性霉素 B), 正相放入 25℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养, 12 h 后加入 9 mL 培养液, 继续正相放置培养。每天用倒置荧光显微镜(AMG

EVOS F1)观察组织块迁移情况。

原代培养过程中, 更换培养液的时间为 2~4 d。当组织碎块周围迁出细胞, 细胞浓度达  $10^6$  cells/mL 时, 按 1:2 的比例进行传代。直到第 5 代后, 青霉素、链霉素的浓度降低到 200 IU/mL 和 200  $\mu$ g/mL, FBS 浓度也降低到 15%。到第 8 代后, 使用含 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F12 培养液。

**1.2.2 细胞生长曲线** 将一定浓度的细胞接种到 24 孔细胞培养板, 分成 8 组, 每组 6 孔, 连续 7 d 常规培养, 用血球计数板进行计数, 每天记 1 组, 分析数据并绘制细胞生长曲线。细胞生长曲线的纵坐标为每天计数的细胞平均个数, 时间为横坐标。根据下面公式计算细胞的群体倍增时间:

$$T=t \times \lg(N_t/N_0)$$

式中,  $N_t$  为时间  $t$  后的细胞数,  $N_0$  接种细胞数(Nicholas, 1991)。

**1.2.3 最佳培养基** 检测 DME/F12、M199、L-15、MEM、RPMI-1640 共 5 种不同培养基维持细胞生长的能力。每种培养基中均补充 10% FBS 和 1% P/S。分别将一定浓度的细胞接种在不同的培养基中, 在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO<sub>2</sub> 条件下培养 96 h, 在 5 个时间点, 即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞的生长曲线。

**1.2.4 最适培养温度** 检测 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 不同温度对细胞生长的影响。所用培养液为含 10% FBS 和 1% P/S 的 DME/F12 培养液。在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO<sub>2</sub> 条件下培养 96 h, 在 5 个时间点即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞的生长曲线。

**1.2.5 最适血清浓度** 确定最适合的培养液及温度后, 其他条件一致, 设置不同 FBS 浓度(0、5%、10%和 20%), 在 25 $^{\circ}$ C、5%的 CO<sub>2</sub> 条件下培养, 在 5 个时间点, 即 0、24、48、72 及 96 h 利用血球计数板进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线。

**1.2.6 细胞冻存与复苏** 配制 10% DMSO、20% FBS、70% DME/F-12 的细胞冻存液, 细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL, 倒入冷冻管, 液氮冻存。按细胞:培养液=1:5 比例加入培养液使细胞悬浮, 复苏培养。

**1.2.7 细胞污染鉴定** 选用观察法与 PCR 法检测细胞是否被细菌、真菌、支原体污染。所用引物见表 1。

**1.2.8 细胞来源鉴定** 利用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)提取塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的基因组 DNA。通过 PCR 扩增提取 DNA。根据塔里木裂腹鱼 16S rRNA 设计引物, 扩增引物为 16SF 和 16SR (表 1)。配制 50  $\mu$ L 反应体系: 25  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR MasterMix, 引物各 2.5  $\mu$ L, 5  $\mu$ L 模板 DNA, 15  $\mu$ L 的灭菌超纯水。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56.8 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增反应结束后, 取 1  $\mu$ L PCR 产物在核酸蛋白检测仪上检测 DNA 的浓度; 取 8  $\mu$ L PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳检测。PCR 产物测序, 比较获得序列与已发表序列的一致率。

**1.2.9 盐碱度对塔里木裂腹鱼细胞系增殖数量的影响** NaCl 盐度设置 1、2、4、6、8、10 共 6 个梯度。称取 NaCl 加入 DME/F12 培养液溶解, 溶解后再用 0.22  $\mu$ m 过滤筛过滤。

NaHCO<sub>3</sub> 碱度设置 2、3、4、5、6、7、8、10 g/L 共 8 个梯度。称取 NaHCO<sub>3</sub> 加入 DME/F12 培养液溶解, 溶解后再用 0.22  $\mu$ m 过滤筛过滤。

**细胞铺板:** 将第 10 代对数生长期 BICF1 用含 10% 胎牛血清 DME/F12 培养液调整密度为  $1 \times 10^4$  cells/mL 的细胞悬液, 铺置于 96 孔细胞培养板上, 每种材料铺 6 孔。每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液, 25 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 12 h 后, 按分组分别加入不同浓度盐和碱, 各孔 20  $\mu$ L, 继续培养 24、48、72 h。之后将每个液体孔加入 20  $\mu$ L MTT 后继续培养 4 h, 小心吸出各孔内液体, 然后, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO。摇床

表 1 通用引物序列

Tab.1 Universal primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	参考文献 Reference
细菌 Bacteria	F: ATCAATAAGCGGAGGAAAAG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	万颖杰等(2005)
真菌 Fungus	F: ATCAATAAGCGGAGGAAAAG R: CTCTGGCTTACCCTATTC	金敏等(2009)
支原体 Mycoplasma	F: TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC R: GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	龚巧玲等(2007)
塔里木裂腹鱼 16S rRNA <i>S.biddulphi</i> 16S rRNA	AAATCGGACCCACCATTGGC GGCCGTTGAACTTGTTGGTCA	-

培养 20 min, 酶联免疫检测仪 490 nm 波长下测定各孔的 OD 值。通过计算, 得出细胞相对增殖率:

$$\text{相对增殖率} = \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{空白对照组}} \times 100\%$$

使用 SPSS 20 软件包对数据进行统计学分析, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,  $P < 0.05$  为差异具有显著性。多组间比较用方差分析, 两组间比较采用  $T$  检验。 $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞原代培养与传代培养

观察塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长状态。3 d 后, 细

胞贴壁且组织块周围逐渐有细胞迁出; 7 d 后, 细胞正常迁出; 13 d 后, 细胞铺满细胞瓶 70%; 18 d 后, 细胞出现悬浮现象(图 1); 19 d 后, 进行原瓶传代。细胞浓度到  $10^6$  cells/mL 时, 进行 1:2 传代, 此后每隔 2~4 d 传代 1 次。细胞悬浮生长, 成功传至 45 代。

### 2.2 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长曲线

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系第 10 代细胞的生长曲线呈“S”型, 0~1 d 为潜伏期, 1~4 d 为指数生长期, 4~5 d 为平台期, 5 d 之后为衰退期(图 2)。第 10 代塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的群体倍增时间为 28.11 h, 细胞分裂旺盛。

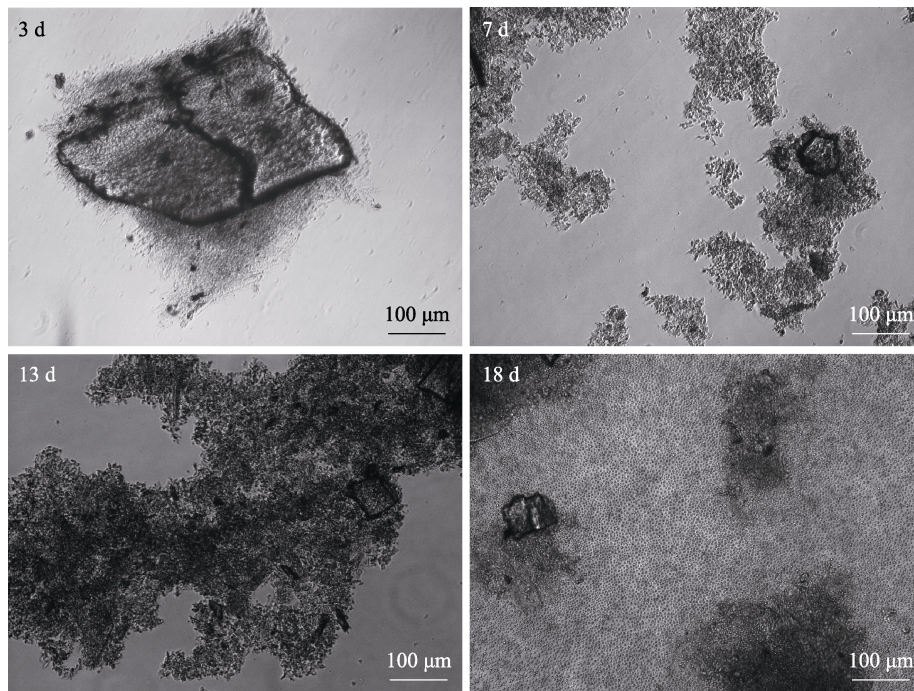


图 1 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞原代培养的不同阶段  
Fig.1 Different stages of primary culture of tail fin cells of *S. biddulphi*

### 2.3 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最佳培养基

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在 DME/F12、M199、L-15、MEM、RPMI-1640 不同培养基中维持细胞生长的能力如图 3 所示, 在这些培养基中均能生长, 但在 DME/F12 培养基中细胞生长最好。因此, DME/F12 为最佳培养基( $P < 0.05$ )。

### 2.4 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适培养温度

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在 30℃ 生长最慢, 25℃ 生长最快, 20℃ 生长较快, 在 20℃~25℃ 范围内, 皆能良性生长(图 4), 生长的最适温度为 25℃ ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适血清浓度

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞在未加血清的培养基中生长明显低于添加血清的细胞生长, 随着血清浓度 5%、10%、20% 依次增大, 细胞生长依次加快, 当 FBS 浓度为 20% 时, 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长明显最快( $P < 0.05$ )(图 5)。

### 2.6 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞冻存与复苏

对塔里木裂腹鱼第 6 代尾鳍细胞系进行液氮冷冻, 保存 40、90 及 180 d 后复苏, 经台盼蓝染色并计数统计, 40 d 存活率为  $(91.49 \pm 0.69)\%$ , 90 d 存活率

为(88.41±0.80)%, 180 d存活率为(87.85±0.66)%, 90和180 d存活率差异不显著( $P>0.05$ )(表2)。细胞具有活性,且复苏后增殖速度快(图6),可正常传代(图7)。

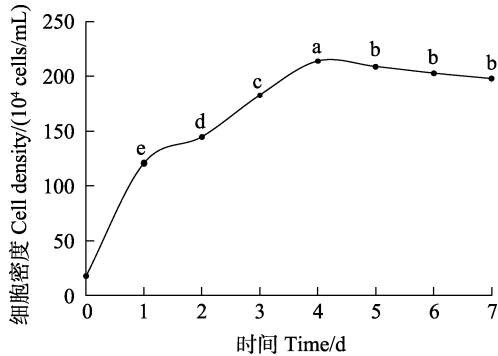


图2 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞生长曲线  
Fig.2 The growth curve of tail fin cells of *S. biddulphi*

标有不同字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。下同。  
Means with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The same as below.

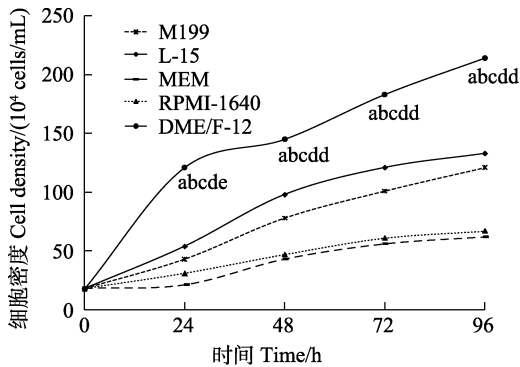


图3 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最佳培养基  
Fig.3 Optimum medium of tail fin cells of *S. biddulphi*

小写字母表示同一时间下 BICF1 多重比较。下同。  
Indicated with lowercase letters for BICF1 multiple comparisons at the same time. The same as below.

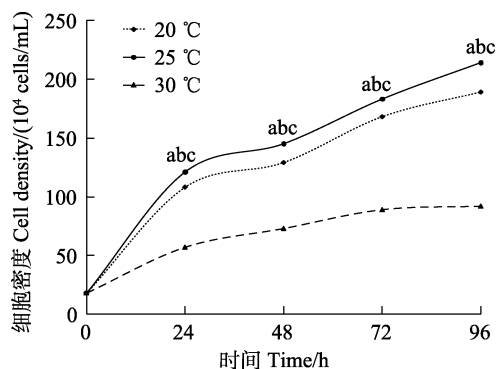


图4 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适培养温度  
Fig.4 Optimum culture temperature of tail fin tissue cell of *S. biddulphi*

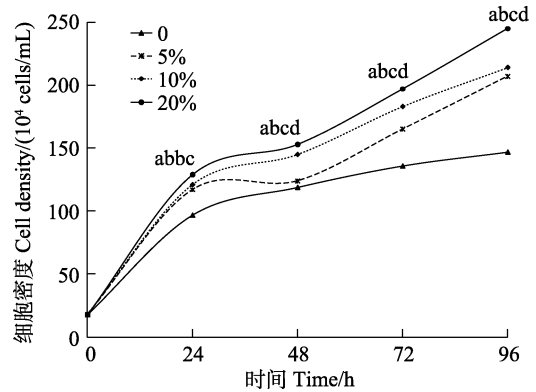


图5 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞最适血清浓度  
Fig.5 Optimum serum concentration of tail fin tissue cells of *S. biddulphi*

表2 冻存后复苏存活率

Tab.2 Survival rate of recovery after freezing

冻存时间 Freezing time /d	复苏存活率 Recovery survival rate /%
40	91.49±0.69 <sup>a</sup>
90	88.41±0.80 <sup>a</sup>
180	87.85±0.66 <sup>a</sup>

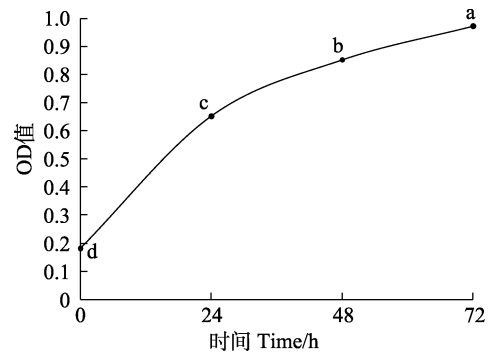


图6 MTT法测定复苏细胞增殖  
Fig.6 Determination of the resuscitated cells by MTT method

### 2.7 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞污染与检测鉴定

塔里木裂腹鱼尾鳍细胞中提取细菌、真菌和支原体,经过 PCR 法鉴定细菌、真菌、支原体污染,样品均无与阳性对照组一致的条带,样品中无细菌、真菌、支原体,塔里木裂腹鱼尾鳍细胞未被污染。

### 2.8 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞来源鉴定

用基因组 DNA 试剂盒提取塔里木裂腹鱼尾鳍细胞 DNA,经 PCR 扩增,在琼脂糖凝胶中电泳检测,PCR 产物目的条带大小符合 16S rRNA 的大小。经测序后的序列片段与数据库中的 GenBank 进行 Blast 比对。塔里木裂腹鱼尾鳍细胞同源性与 GenBank 中发

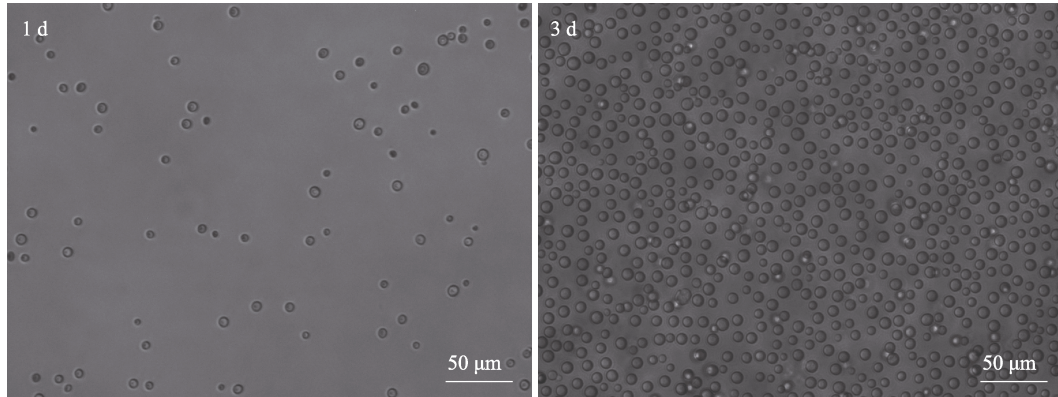


图 7 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞复苏培养

Fig.7 The resuscitation culture of tail fin of *S. biddulphi*

布的来源于塔里木裂腹鱼线粒体基因(JQ844133.1)的序列达到 100%;证明尾鳍细胞来自于塔里木裂腹鱼。

### 2.9 MTT 法检测各组盐碱度的细胞增殖数量

**2.9.1 盐度对塔里木裂腹鱼尾鳍细胞增殖数量的影响** 在盐度一定的情况下, BICF1 的增殖数量随时间延长而下降, 盐度对 BICF1 的相对增殖数量的抑制可随时间延长而增强。BICF1 增殖数量在盐度为 1、2、4、6 时呈上升趋势, 在盐度为 6、8、10 呈下降趋势, 盐度为 6 时, BICF1 增殖数量最高。BICF1 增殖数量随盐度增加呈先升高后下降的趋势(表 3 和图 8)。

**2.9.2 碱度对塔里木裂腹鱼尾鳍细胞增殖数量的影响** 在碱度一定时, BICF1 的增殖数量随时间(24、48、72 h)延长而下降, 碱度对 BICF1 的相对增殖数量的抑制随时间延长而增强。在同一时间点上, BICF1 增殖数量在碱度 2、3、4、5、6 g/L 时呈上升趋势, 在碱度为 6、7、8、10 g/L 时呈下降趋势, 碱度为 6 g/L 时, BICF1 增殖数量最高。BICF1 增殖数量随 NaHCO<sub>3</sub> 碱度增加呈先升高后下降的趋势(表 4 和图 8)。

## 3 讨论

本研究以塔里木裂腹鱼尾鳍组织为材料, 采用组织块移植法成功进行了塔里木裂腹鱼尾鳍组织细胞原代培养, 命名为 BICF1。BICF1 在 10% FBS 的 DME/F12 培养液中生长良好。细胞培养常用的培养液有 L-15、MEM 和 M199, 但不同的鱼类对环境要求不尽相同, 因此, 不同鱼类的最适培养基亦不同。青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)尾鳍细胞系(BC-Fin)的最佳培养液为 L-15(张雪萍等, 2016); 麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)鳍细胞系的最佳培养液为 MEM(杨坤等, 2013); 匙吻鲟(*Polyodon spathula*)鳍细胞系(PF-Fin)的最佳培养液为 M199(肖艺等, 2010);

表 3 盐度对 BICF1 增殖的影响(Mean±SD)

Tab.3 Effects of salinity on BICF1 cell proliferation

盐度 Salinity	BICF1 /%		
	24 h	48 h	72 h
1	81.73±2.98 <sup>A,a</sup>	80.77±5.16 <sup>A,a</sup>	79.78±3.03 <sup>A,a</sup>
2	81.80±2.12 <sup>A,a</sup>	81.25±5.14 <sup>A,a</sup>	80.46±3.25 <sup>A,a</sup>
4	83.10±3.12 <sup>A,a</sup>	82.38±7.53 <sup>A,a</sup>	80.77±3.55 <sup>A,a</sup>
6	84.93±1.86 <sup>A,a</sup>	83.39±3.12 <sup>A,a</sup>	81.62±2.16 <sup>A,a</sup>
8	82.43±3.23 <sup>A,a</sup>	79.71±6.83 <sup>A,a</sup>	79.17±3.61 <sup>A,a</sup>
10	80.96±7.86 <sup>A,a</sup>	66.67±4.56 <sup>B,b</sup>	64.39±2.68 <sup>B,b</sup>
F	0.624	7.561	32.359
P	0.683	0.000	0.000

注: 标有不同字母表示组间有显著差异( $P < 0.05$ ), 其中, 大写字母为不同盐度同一时间下 BICF1 多重比较, 小写字母为同一盐度不同时间下 BICF1 多重比较。下同。

Note: The means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The capital letters are BICF1 multiple comparisons at the same time with different salinity, and the small letters are BICF1 multiple comparisons at the same time with the same salinity. The same as below.

表 4 NaHCO<sub>3</sub> 碱度对 BICF1 增殖的影响

Tab.4 Effect of NaHCO<sub>3</sub> alkalinity on BICF1 cell proliferation (Mean±SD)

NaHCO <sub>3</sub> / (g/L)	BICF1 /%		
	24 h	48 h	72 h
2	98.81±1.38 <sup>A,a</sup>	97.52±7.86 <sup>A,a</sup>	95.01±6.20 <sup>A,a</sup>
3	99.99±4.74 <sup>A,a</sup>	98.42±7.66 <sup>A,a</sup>	97.30±10.94 <sup>A,a</sup>
4	102.39±1.41 <sup>A,a</sup>	100.81±7.29 <sup>A,a</sup>	97.51±9.25 <sup>A,a</sup>
5	110.92±1.04 <sup>B,a</sup>	108.38±1.68 <sup>A,a</sup>	98.18±13.48 <sup>A,a</sup>
6	123.47±8.76 <sup>C,a</sup>	117.33±1.47 <sup>B,b</sup>	107.41±9.23 <sup>B,c</sup>
7	115.47±2.52 <sup>D,a</sup>	112.78±9.29 <sup>B,a</sup>	107.31±6.58 <sup>C,b</sup>
8	114.50±4.94 <sup>E,a</sup>	110.87±1.02 <sup>B,a</sup>	106.92±3.18 <sup>D,a</sup>
10	108.28±1.06 <sup>F,a</sup>	100.43±4.86 <sup>B,a</sup>	94.17±9.32 <sup>E,b</sup>
F	5.564	3.516	2.828
P	0.000	0.004	0.015

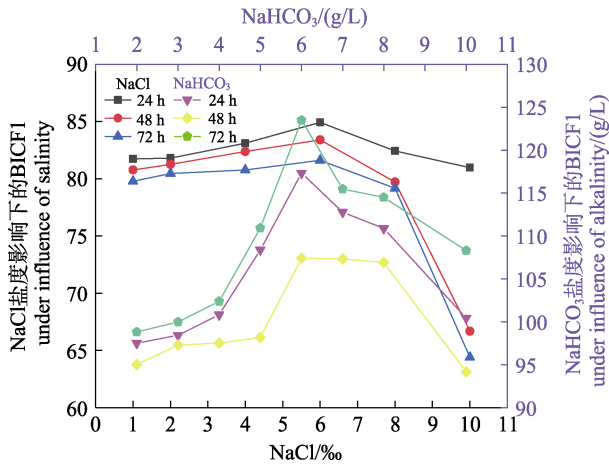


图8 不同浓度 NaCl/NaHCO<sub>3</sub>对 BICF1 细胞增殖数量的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of NaCl/NaHCO<sub>3</sub> on the number of proliferation of BICF1 cells

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)鳍细胞系的最佳培养液为 DMEM/F12(王缙云等, 2018), 本研究中筛选了 DME/F12、L-15、MEM、RPMI-1640 和 M199 培养基, 得出 DME/F12 为最佳培养液。鱼类组织细胞生长温度范围和哺乳类组织细胞比较, 范围比较广。BICF1 在 20℃~25℃均能正常生长。研究表明, 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与鲈(*Perca fluviatilis*)鳍细胞系为广温性(童裳亮等, 1997), 本研究与已报道的鱼类细胞的温度适应范围是一致的(Wang *et al.*, 2010), 这与鱼类是变温动物有很大关系。在 0、5%、10%、20%的 FBS 中生长时, 未加 FBS 的生长速度明显低于添加 FBS 的生长速度, 在 FBS 为 20%时生长最快, FBS 浓度对细胞生长有明显的影响, 与已报道的研究相似(王缙云等, 2018)。本研究测定的第 10 代 BICF1 生长曲线呈“S”型生长曲线, 1 d 为指数生长期。红鳍东方鲀鳍细胞系在 2~4 d 为指数生长期, 4~5 d 为平稳期(王缙云等, 2018), 5 d 之后为衰退期。与红鳍东方鲀鳍细胞相比, BICF1 进入指数生长期更快。

本研究塔里木裂腹鱼 BICF1 呈悬浮生长。贴壁培养型的细胞, 细胞膜表面含有大量黏附因子。这些黏附因子可激活不同的信号通路调节贴壁细胞的活性和增殖, 如整合素(integrins)活化黏着斑激酶(focal adhesion kinase)激活信号通路抑制细胞内源性的凋亡(Zhong *et al.*, 2012; Hofmann *et al.*, 2007)。悬浮培养的细胞一般为淋巴细胞等血液系统来源的细胞, 细胞体积小, 缺乏粘附分子的表达(姬广超等, 2020; 徐伟等, 2020)。在塔里木裂腹鱼 BICF1 染色体的制备中发现, 用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗时间达 90 min。有研究报道, 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀)×鞍带石斑

鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂) F<sub>1</sub> 染色体制备中低渗时间为 25 min (刘莉等, 2016); 鲤(*Procypris rabaudi*)染色体标本的制备中低渗的时间控制在 35 min (耿波等, 2003); 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)染色体标本的制备中低渗的时间控制在 40 min (宋立民等, 2010); 灰海马(*Hippocampus erectus*)染色体标本的制备中低渗的时间为 50 min (刘鑫等, 2020); 报道的研究中低渗的时间在 25~50 min。因此, 推测塔里木裂腹鱼 BICF1 细胞膜不易破裂, 与 BICF1 细胞膜的坚韧程度有关。用物理方法进行贴壁型细胞的悬浮驯化时, 使细胞发生失巢凋亡(anoikis)(王朋朋等, 2021), 无血清与生物反应器驯化使贴壁细胞产生失巢凋亡的拮抗。目前, MDCK(吴培培等, 2016)、BHK-21(赵彩红等, 2019)、Hi5-SF(马伟等, 2017)、PK15(刘天伦等, 2019)等被驯化。塔里木裂腹鱼 BICF1 培养中可能产生类似于失巢凋亡的调节。塔里木裂腹鱼肾细胞呈悬浮生长的状态, 可能与其体积和细胞膜表面粘附分子的表达及细胞膜坚韧程度有关, 可能与类似于失巢凋亡的调节有关, 具体原因有待于进一步研究。

细胞来源的鉴定通常采用 16S rRNA、12S rRNA 和 Cytb 等基因片段, 本研究选择 16S rRNA 进行鉴定, BICF1 序列分析结果与塔里木裂腹鱼基因序列一致性为 100%, 证明细胞系来自于塔里木裂腹鱼。

塔里木裂腹鱼曾是新疆博斯腾湖主要经济鱼类, 由于开荒造田, 农田盐碱水大量排入湖水, 盐碱度逐年升高(刘立彭, 1983)。水体中盐碱度水平对鱼类存活有显著影响, 盐碱度过高或过低都会显著降低鱼类的存活率(张雅芝等, 2009; 秦志清等, 2010)。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)盐碱度的耐受性研究中发现, 盐度为 20 时, 仅少数个体能存活 96 h; NaHCO<sub>3</sub> 碱度为 12 g/L 时, 96 h 全部死亡(赵丽慧等, 2014); 对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)急性低盐胁迫, 并检测当盐度由 2 到 0 时, 其存活率随盐度的下降而降低(李智等, 2020); 当碳酸盐碱度为 0~44.58 mmol/L、pH 为 9.0~10.0 时, 随着碳酸盐碱度浓度的上升, 缢蛏的存活率明显下降(叶博等, 2019)。本研究中, 盐度为 1~6 时, BICF1 增殖数量上升; 盐度为 6~10 时, BICF1 增殖数量下降; 盐度为 6 时, BICF1 增殖数量最高。NaHCO<sub>3</sub> 碱度为 2~6 g/L 时, BICF1 增殖数量上升; 碱度为 6~10 g/L 时, BICF1 增殖数量下降; 碱度为 6 g/L 时, BICF1 增殖最高。本研究中, 盐碱度过高或过低都会使塔里木裂腹鱼尾鳍细胞的存活率降低。红鲫(*Carassius auratus* red)鳍细胞系被建立被用于抗药性和抗病性的研究, 细胞系可用于毒性筛选和病毒分离的材料(Xiao *et al.*, 2018)。草鱼鳍细胞系用

于研究草鱼源维氏气单胞菌对宿主细胞的毒性致死机制(刘明珠等, 2019); 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)尾鳍细胞(GiCF)用于辛硫磷对 GiCF 毒性研究, 表明 GiCF 可作为农药的细胞毒性研究材料(赵燕楠等, 2020)。本研究中, 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系可作为研究盐碱度对塔里木裂腹鱼的影响的材料, 可为其选择育种和功能基因研究提供良好的载体。

## 参 考 文 献

- BABU V, NAMBI K, CHANDRA V, *et al.* Establishment and characterization of a fin cell line from Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(5): 355–364
- BEJAR J, BORREGO J J, ALVAREZ M C. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 1997, 150(1/2): 143–153
- CLEW L W, MOEWUS L, SIGEL M M. Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1961, 108(3): 762–766
- GENG B, LIANG L Q, SUN X W. The search for the blood lymphocytic cell cultivation of the common carp and the preparation of chromosomes. *Chinese Journal of Fisheries*, 2003(2): 32–34 [耿波, 梁利群, 孙效文. 鲤鱼血淋巴细胞培养及染色体制备条件探索. *水产学杂志*, 2003(2): 32–34]
- GONG Q L, ZHENG L, ZHANG H L, *et al.* Testing lab animal dermatophytes using PCR method. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2007, 17(3): 132–135 [龚巧玲, 郑龙, 张换铃, 等. PCR 方法检测实验动物皮肤病原真菌. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(3): 132–135]
- GRAVELL M, MALSBERGER R. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965, 126(1): 555–565
- HAYSA A, GUO Y, MENG W, *et al.* Genetic diversity and population differentiation of *Schizothorax biddulphi* based on mtDNA control region sequences. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 944–954 [海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 基于线粒体控制区序列的塔里木裂腹鱼遗传多样性及种群分化分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 944–954]
- HOFMANN C, OBERMEIER F, ARTINGER M, *et al.* Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 587–600
- JI G C, WANG X M, SU M M, *et al.* Analysis of lymphocyte subsets to predict their killing activity. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2020, 13(27): 172–173 [姬广超, 王晓明, 苏苗苗, 等. 淋巴细胞的亚群分析预测其杀伤活性研究. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(27): 172–173]
- JIANG S, LI X, LI Z Z, *et al.* Toxicity of copper sulfate and zinc chloride on DNA damage and metallothionein gene expression in loach cell lines. *Fisheries Science*, 2020, 39(3): 381–387 [姜姗, 李霞, 李状状, 等. 铜、锌对泥鳅细胞 DNA 损伤及金属硫蛋白表达的影响. *水产科学*, 2020, 39(3): 381–387]
- JIN M, HUANG A H, CHEN Z L, *et al.* Detection of common fungal pathogens by general primer PCR. *Journal of Environment and Health*, 2009, 26(11): 969–971 [金敏, 黄爱华, 陈照立, 等. 常见致病真菌通用引物 PCR 检测技术研究. *环境与健康杂志*, 2009, 26(11): 969–971]
- KELLY R K, LOH P C. Some properties of an established fish cell line from *Xiphophorus helleri* (red swordtail). *In Vitro*, 1973, 9(2): 73–80
- LI Z, PENG M X, YE B, *et al.* Effects of acute low salinity on *Sinonovacula constricta* survival rate,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and phagocytosis of hemocytes. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 489–495 [李智, 彭茂潇, 叶博, 等. 急性低盐度对缢蛏存活率、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性以及血淋巴细胞吞噬能力的影响. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 489–495]
- LIU L, ZHANG Y, CHEN C. Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid  $\text{F}_1$  (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 33–40 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)×鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)  $\text{F}_1$  染色体制备方法及其核型分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 33–40]
- LIU L P. Comments on the Bosten Lake fishery and its resource multiplication. *Freshwater Fisheries*, 1983(3): 12–14 [刘立彭. 博斯腾湖渔业及其资源增殖的意见. *淡水渔业*, 1983(3): 12–14]
- LIU M Z, YU Q, XIAO H H, *et al.* Study on cytotoxicity and apoptosis of *Aeromonas veronii* to grass carp pectoral fin cell. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(3): 213–218 [刘明珠, 余庆, 肖贺贺, 等. 维氏气单胞菌对草鱼背鳍细胞的毒性及凋亡研究. *广西科学院学报*, 2019, 35(3): 213–218]
- LIU T L, LANG H B, KONG S. Domestication of a PK15 cell line to suspension culture by serum-free medium. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(9): 12–18 [刘天伦, 郎洪彬, 孔飒. PK15 细胞的无血清全悬浮驯化研究. *中国兽药杂志*, 2019, 53(9): 12–18]
- LIU X, ZHANG D, LIN T T, *et al.* Chromosome preparation and karyotype of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*). *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(6): 907–914 [刘鑫, 张东, 林听听, 等. 灰海马染色体制备及核型分析. *水产学报*, 2020, 44(6): 907–914]
- LUO W, NIE Z L, ZHAN F B, *et al.* Rapid development of microsatellite markers for the endangered fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) using next generation sequencing and cross-species amplification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(11): 14946–14955
- MA W, WANG J M, MA G L, *et al.* Establishment and



- identification of Hi5-SF suspension cell line. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, 26(2): 173–178 [马伟, 王家敏, 马桂兰, 等. Hi5-SF 悬浮细胞系的建立及鉴定. *西北农业学报*, 2017, 26(2): 173–178]
- NICHOLAS H A, TERRY R, ALLEN W, *et al.* Evaluation of flow cytometric methods for determining population potential doubling times using cultured cells. *Cytometry Part A*, 1991, 12(3): 234–241
- NICHOLSON B L, BYRNE C. An established cell line from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1973, 30(70): 913–916
- QIN Z Q, ZHANG Y Z, LIN Y J, *et al.* Effects of salinity on growth and survival of young *Paralichthys lethostigma*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(2): 1–5 [秦志清, 张雅芝, 林越超, 等. 盐度对漠斑牙鲂幼鱼生长与存活的影响. *水产学杂志*, 2010, 23(2): 1–5]
- RESLEY M J, WEBB Jr. K A, HOLT G J. Growth and survival of juvenile coibia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 2006, 253(1/2/3/4): 398–407
- SONG L M, WANG W M, WANG Y F. The tissue cultivation of fins and preparation of chromosomes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010, 25(6): 502–505 [宋立民, 王卫民, 王玉芬. 黄颡鱼鳍组织培养及染色体制备条件的研究. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(6): 502–505]
- SWAMINATHAN T R, LAKRA W S, GOPALAKRISHNAN A, *et al.* Development and characterization of a new epithelial cell line PSF from tail fin of green chromide, *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 2010, 46(8): 647–656
- TONG S L, LI H, MIAO H Z. Four continuous cell lines of three marine fish species were established. *Progress in Biomedical Engineering*, 1997, 17(3): 3–4 [童裳亮, 李宏, 苗宏志. 牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立. *生物工程进展*, 1997, 17(3): 3–4]
- WAN Y J, ZHANG J L, AN J. Rapid detection of bacterial or microbial contamination in cell cultures. *Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery*, 2005, 14(2): 88–90 [万颖杰, 张俊磊, 安静. 细胞培养中细菌类微生物污染的快速检测. *同解手术学杂志*, 2005, 14(2): 88–90]
- WANG D Z. The Schiz. Othoracinae fish in Xinjing. *Arid Zone Research*, 1998, 15(4): 26–32 [王德忠. 新疆的裂腹鱼亚科鱼类研究. *干旱区研究*, 1998, 15(4): 26–32]
- WANG J Y, LI X, QIN Y J, *et al.* Establishment and characterization of fin cell lines from redfin puffer *Takifugu rubripes*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(6): 703–708 [王缙云, 李霞, 秦艳杰, 等. 红鳍东方鲀鳍细胞系的建立及生长特性研究. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(6): 703–708]
- WANG P P, HUANG S L, ZHANG Y K, *et al.* Research progress on serum free suspension culture of mammalian cells. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 48(3): 839–845 [王朋朋, 黄书林, 张云科, 等. 哺乳动物细胞无血清全悬浮培养技术研究进展. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 839–845]
- WANG X L, CHEN S L, SHA Z X, *et al.* Establishment and characterization of a new cell line from the kidney of spotted halibut *Verasper variegates*. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 9(2): 162–168
- WEI J, NIE Z L, LI J, *et al.* Morphological and histological observation of gonadal development of Tarim schizothoracin *Schizothorax biddulphi*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2011, 26(3): 227–231 [魏杰, 聂竹兰, 李杰, 等. 塔里木裂腹鱼性腺形态学与组织学的研究. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(3): 227–231]
- WEI L, NIE Z L, ZHAN F B, *et al.* Rapid development of microsatellite markers for the endangered fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) using next generation sequencing and cross-species amplification. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13: 14946–14955
- WEI Y Z, LU R H, BAI G D. Establishment of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) caudal fin diploid cell line GCCF-2 and analysis of some of its biological characteristics. *Journal of Fisheries of China*, 1987, 11(4): 269–275 [魏彦章, 陆仁后, 白国栋. 草鱼尾鳍组织二倍体细胞系 GCCF-2 的建立及其部分生物学特性分析. *水产学报*, 1987, 11(4): 269–275]
- WOLF K, QUIMBY M. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, 1962, 135(3508): 1065–1066
- WU P P, TANG Y H, CHU X, *et al.* Domestication of MDCK suspension cell lines for the H9 subtype of avian influenza virus proliferation and its biological characteristics evaluation. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(6): 1377–1383 [吴培培, 唐应华, 褚轩, 等. 适应 H9 亚型禽流感病毒增殖的 MDCK 悬浮细胞株的驯化及其生物学特性. *江苏农业学报*, 2016, 32(6): 1377–1383]
- XIAO J, FU W M, ZHOU W, *et al.* Establishment of fin cell lines and their use to study the immune gene expression in cyprinid fishes with different ploidy in rhabdovirus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 88: 55–64
- XIAO Y, ZENG L B, LI X L, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of paddlefish, *Polyodon spathula walbaum*. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(4): 533–540 [肖艺, 曾令兵, 李晓莉, 等. 匙吻鲟鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(4): 533–540]
- XU W, FANG S J, GUAN R, *et al.* Immunomodulatory effect of *Atractylodis macrocephalae* Koidz polysaccharides on mouse lymphocytes. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(13): 1573–1577 [徐伟, 方思佳, 关然, 等. 白术多糖对小鼠淋巴细胞的免疫调节作用. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(13): 1573–1577]

- YAN W, NIE P, LU Y. Establishment, characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from goldfish, *Carassius auratus* (L.) tail fin. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(10): 757–768
- YANG K, ZHU D M, WANG W M. Studies on fin tissue cultivation, Ag-NORS and C-banding patterns of *Pseudorasbora parva*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 20–25 [杨坤, 祝东梅, 王卫民. 麦穗鱼鳍条组织培养及染色体 Ag-NORS 和 C-带研究. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 20–25]
- YANG T Y, MENG W, GUO Y, *et al.* The multivariate morphometric analysis of *Schizothorax biddulphi* and *Schizothorax irregularis*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, 37(3): 221–227 [杨天燕, 孟玮, 郭焱, 等. 塔里木裂腹鱼和厚唇裂腹鱼多变量形态学分析. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(3): 221–227]
- YANG T Y, ZHANG R M, GUO Y, *et al.* Comparative study on partial mitochondrial COI gene of *Aspiorhynchus laticeps* and *Schizothorax biddulphi*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(1): 45–50 [杨天燕, 张人铭, 郭焱, 等. 扁吻鱼和塔里木裂腹鱼线粒体 COI 基因片段的比较研究. *水生态学杂志*, 2011, 32(1): 45–50]
- YAO Z L, LAI Q F, ZHOU K, *et al.* Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(3): 397–402
- YE B, CHENG Z Y, PENG M X, *et al.* Effects of pH and carbonate alkalinity on survival rate,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and phagocytic ability of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(8): 1723–1732 [叶博, 程之扬, 彭茂潇, 等. 急性 pH 和碳酸盐碱度对缢蛏存活率、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性及血淋巴吞噬能力的影响. *水产学报*, 2019, 43(8): 1723–1732]
- ZHANG N C, YANG G Z. The establishment of strain ZC-7901 and substrain ZC-7901S<sub>1</sub> from the snout tissue cells of grass carp. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(2): 111–118 [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): 111–118]
- ZHANG R M, GUO Y, MA Y W, *et al.* A Survey on the resource and distribution of *Schizothorax biddulphi* gunther. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(6): 76–78 [张人铭, 郭焱, 马燕武, 等. 塔里木裂腹鱼资源与分布的调查研究. *淡水渔业*, 2007, 37(6): 76–78]
- ZHANG X P, ZENG L B, CHEN Q, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of *Mylopharyngodon piceus*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(2): 3–9 [张雪萍, 曾令兵, 陈倩, 等. 青鱼鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. *淡水渔业*, 2016, 46(2): 3–9]
- ZHANG Y Z, LIU D E, FANG Q S, *et al.* Effects of temperature and salinity on growth and survival rate of young *Epinephelus coioides*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2009, 14(1): 8–13 [张雅芝, 刘冬娥, 方琼珊, 等. 温度和盐度对斜带石斑鱼幼鱼生长与存活的影响. *集美大学学报(自然科学版)*, 2009, 14(1): 8–13]
- ZHAO C H, WANG M H, ZANG R X, *et al.* Growth characteristics and tumorigenic of suspension cultured BHK-21 cells. *Journal of Northwest Minzu University (Natural Science)*, 2019, 40(4): 53–59 [赵彩红, 王美皓, 臧荣鑫, 等. 悬浮培养型 BHK-21 细胞生长特性及成瘤性研究. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(4): 53–59]
- ZHAO L H, JIA J H, ZHANG Y H, *et al.* The tolerance and growth of three strains of *Oreochromis niloticus* in salinity-alkalinity water. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 26–32 [赵丽慧, 笪金华, 张艳红, 等. 3 种品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)盐碱耐受性和生长比较. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 26–32]
- ZHAO Y N, ZHOU H Z, LI W J, *et al.* Transcriptome analysis of the caudal fin cell line of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)(GiCF) affected by the pesticide phoxim. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(11): 4953–4963 [赵燕楠, 周宏正, 李婉娟, 等. 辛硫磷胁迫对异育银鲫细胞基因表达的影响. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(11): 4953–4963]
- ZHONG X, RESCORLA F J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: Understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cellular Signalling*, 2012, 24(2): 393–401
- ZHOU G, GUI L, LI Z, *et al.* Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(8): 2058–2067
- ZHOU G Z, JING H J. Application development of fish cell lines on virology research. *Letters in Biotechnology*, 2011, 3: 21–26 [周广舟, 景红娟. 鱼类细胞系在病毒学研究中的应用进展. *生物技术通讯*, 2011, 3: 21–26]
- ZUO W G, QIAN H X, XU Y F, *et al.* Establishment of kidney cell lines CIK from grass carp. *Freshwater Fisheries*, 1984, 14(2): 38–39 [左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立. *淡水渔业*, 1984, 14(2): 38–39]

## Establishment and the Effect of Salinity of Cell Lines Derived from Tail Fin of *Schizothorax biddulphi*

DAI Jincai, NIE Zhulan<sup>①</sup>, ZHAO Nianhua, REN Yongli, WEI Jie

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

**Abstract** To establish the caudal fin cell line of *Schizothorax biddulphi*, this study employed the tissue block method with fetal bovine serum (FBS) DME/F12 medium for *in vitro* cultivation of the tail fin, using previously established tail-fin cell lines (BICF1) of *S. biddulphi*. In this study, the effect of NaCl salinity and NaHCO<sub>3</sub> alkalinity on the proliferation of tail fin cells was investigated using the MTT method. The main results are as follows: the BICF1 suspension culture was propagated to 45 generations. The optimum medium was DME/F12. The optimal FBS concentration was determined to be 20%. The optimum temperature was 25°C. The population doubling time of the 10th generation BICF1 was 28.11 h, showing an "S" type growth. The 6th generation BICF1 in liquid nitrogen was recovered after freezing for 180 days. Trypan blue staining showed that after recovery, (87.85±0.66)% of BICF1 cells were active, and the cells could proliferate and pass to next generation. The BICF1 cell line is free of contamination by bacteria, fungi, and mycoplasma. The sequencing results of mitochondrial 16S rRNA of the 10th generation BICF1 were consistent with the GenBank gene sequence, and the consistency rate of BICF1 and JQ844133.1 was 100%, proving that BICF1 was from *S. biddulphi*. BICF1 cell proliferation increased with salinity of 1, 2, 4, and 6, but decreased with salinity of 6, 8, and 10; BICF1 cell proliferation was the highest at 6. The NaHCO<sub>3</sub> alkalinity of BICF1 increased at 2, 3, 4, 5, and 6 g/L, whereas the proliferation of BICF1 cells decreased at 6, 7, 8, and 10 g/L, respectively. BICF1 cell proliferation was the highest at 6 g/L. Cell proliferation first increased and then decreased with increasing salinity and alkalinity. This study aimed to provide a scientific basis for the rational development and utilization of genetic resources of *S. biddulphi*, including the establishment and protection of the germplasm.

**Key words** *Schizothorax biddulphi*; Tail fin; Cell culture

① Corresponding author: NIE Zhulan, E-mail: niezh12004@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210407004

http://www.ykxjz.cn/

赵国庆, 罗俊荣, 唐峰华, 樊伟, 宋学锋, 杨超, 张衡. 基于渔业数据的南极磷虾 48 渔区渔场时空分布. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 81–92

ZHAO G Q, LUO J R, TANG F H, FAN W, SONG X F, YANG C, ZHANG H. Temporal and spatial distribution of Antarctic krill in 48 fishing areas based on fishery data. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 81–92

## 基于渔业数据的南极磷虾 48 渔区渔场时空分布\*

赵国庆<sup>1,2</sup> 罗俊荣<sup>3</sup> 唐峰华<sup>2</sup> 樊伟<sup>2</sup>  
宋学锋<sup>2</sup> 杨超<sup>1,2</sup> 张衡<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;  
3. 福建正冠渔业有限公司 福建 福州 350500)

**摘要** 根据我国 2010—2019 年南极磷虾(*Euphausia superba*)捕捞渔船的生产资料,分析了南极海域 48 渔区南极磷虾渔场的分布特点,采用重心迁移轨迹模型和标准差椭圆(SDE)模型探讨了南极磷虾的渔场变动特征和规律。结果显示,南极磷虾捕捞量主要集中在 48.1 亚区,占比为 70.30%, 48.2 亚区和 48.3 亚区的产量相差很小,占比分别为 14.28%和 15.42%;年间单位捕捞努力量渔获量(CPUE)曲线上升,最小值为 2012 年,最大值为 2019 年;月间 CPUE 先增后降,最小值为 1 月,最大值为 6 月。48.1 亚区的年间和月间渔场重心均往西南方向移动;48.2 亚区年间的渔场重心东移,但移动范围较小,月间规律不强;48.3 亚区年间渔场重心南移,月间渔场重心向西北移动。经 SDE 分析可知,48.1 亚区渔场分布范围最广、离散程度最大,48.3 亚区渔场方向性最强、向心力最明显。48.1 亚区渔场重心主要分布于布兰斯菲尔德海峡,48.2 亚区渔场重心分布于南奥克尼群岛东侧,48.3 亚区渔场重心分布于南乔治亚群岛东北侧。聚类结果表明,48.1 亚区年间渔场重心均较为集中,48.2 和 48.3 亚区除 2017 年外,其他年间渔场重心较为集中。

**关键词** 南极磷虾; 渔场重心; 标准差椭圆分析; 聚类分析; 时空分布; 48 渔区

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0081-12

南极磷虾通常指南极大磷虾(*Euphausia superba*, 以下称磷虾),属于甲壳类浮游动物,广泛分布于南极大陆周围,既是浮游植物的主要捕食者,又是鱼类、头足类、企鹅、海豹、鲸鱼等的主要饵料,在食物网中起着承上启下的作用,是整个南大洋生态系统物质和能量流动的关键物种(Siegel, 2005; Atkinson *et al.*, 2012; Stowasser *et al.*, 2012)。在地球已知的多细胞动物中,磷虾生物量最高,据估算,其资源量可达  $3.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$  t (Atkinson *et al.*, 2009)。磷虾脂类物

质含量很高,富含长链多不饱和脂肪酸(Ericson *et al.*, 2018),被称为全球最大的动物蛋白质库,另外,还富含丰富的矿物元素和胡萝卜素等(Wang *et al.*, 2011)。因此,磷虾具有十分巨大的开发价值。磷虾捕捞业始于 20 世纪 60 年代早期,中国于 1984 年首次开展南极科学考察时即将磷虾列为重点考察目标,而正式商业性探捕开发始于 2009—2010 年度(国家海洋局极地专项办公室,2016)。目前,我国磷虾捕捞技术和捕捞产量都取得了重大进展,由 2009—2010 年

\* 国家重点研发计划(2018YFC1406802)资助 [This work was supported by National Key Research and Development (2018YFC1406802)]. 赵国庆, E-mail: zgq617717@163.com

① 通信作者: 张衡, 副研究员, E-mail: zhangziqian0601@163.com

收稿日期: 2021-04-07, 收修改稿日期: 2021-06-09

度 4000 t 上升到 2019 年 50 000 多 t (CCAMLR, 2020)。

掌握磷虾渔场时空分布对磷虾商业性捕捞具有重大意义。目前,对磷虾分布特征的研究,主要通过大型渔船的生产资料(Krafft *et al.*, 2015)、科学调查资料(Marrari *et al.*, 2008)、暂养实验(Kawaguchi *et al.*, 2010a)或远程监测(Saenz *et al.*, 2020)等进行,相关研究多结合环境数据(Atkinson *et al.*, 2019)或借助声学探测(Seok *et al.*, 2018; 张吉昌等, 2012)来进行,侧重于某一时空尺度下磷虾的分布特征或已知因子如何影响磷虾分布,并探讨磷虾分布是否存在统计意义上的聚集或离散性质。Krafft 等(2015)通过商业捕捞渔船对磷虾丰度和垂直结构等种群动态进行研究后认为,使用商业捕捞渔船作为研究平台,对了解渔业动态及量化生物资源量水平具有很大的优势。Patricio 等(2020)通过 2011—2016 年磷虾捕捞数据总结了智利磷虾渔业现状,展示了磷虾捕捞深度、单位捕捞努力量渔获量(CPUE)、网次地理分布等。张瑛瑛等(2020)利用 2010—2015 年 1—6 月的磷虾捕捞数据研究了渔场重心总体上的轨迹变化,并探讨了 CPUE 与海表温度和叶绿素 *a* (Chl-*a*)的关系。但是,目前基于长时间序列的磷虾渔业数据对磷虾渔场的变动时间、变动方向和变动格局的研究鲜有报道。因此,本研究依据我国 2010—2019 年磷虾捕捞渔船的生产资料,探讨了 48 区磷虾渔场重心轨迹的迁移和分布格局情况,以期为磷虾合理开发利用提供借鉴。

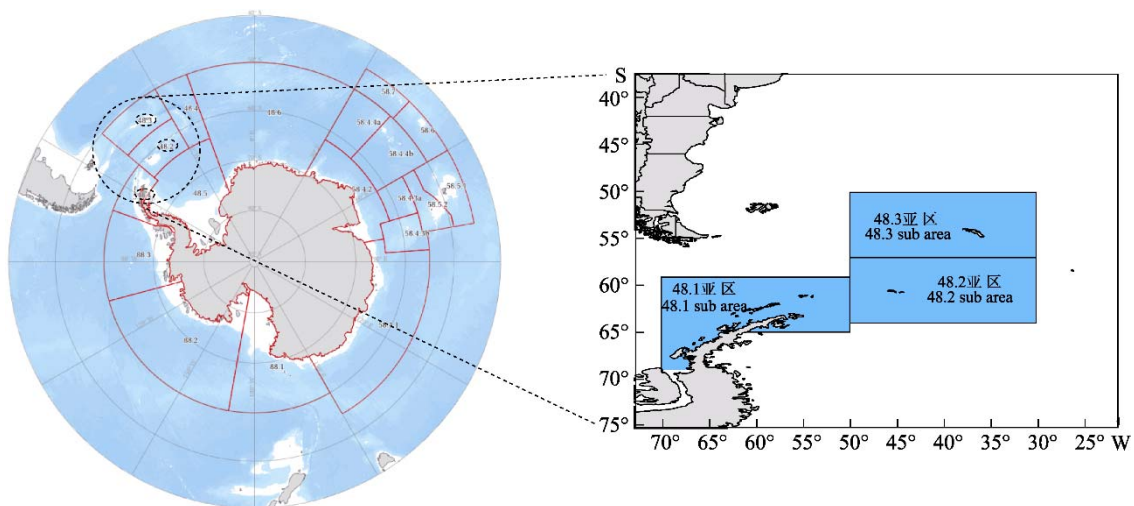


图2 调查海域示意图

Fig.2 Sketch map of investigation area

## 1.2 数据处理

**1.2.1 渔获数据处理** 对渔获数据进行标准化处理,采用标准化后的 CPUE 来表示磷虾渔场资源丰

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源及捕捞海域

渔业数据来源于我国磷虾捕捞渔船(中国水产总公司、上海开创远洋渔业公司、辽宁远洋渔业公司等 10 艘渔船)的渔捞记录资料(图 1),包括作业日期(年、月、日)、作业位置(经度和纬度)、渔获产量、拖网次数、拖网时间、拖速、网具类型、拖网作业时的网口高度和网口水平扩张。时间跨度为 2010—2019 年,主要作业月份为每年的 1—9 月。作业区域主要分布在南极海域 48.1 区、48.2 区和 48.3 区,空间分辨率为  $1^\circ \times 1^\circ$ (图 2)。

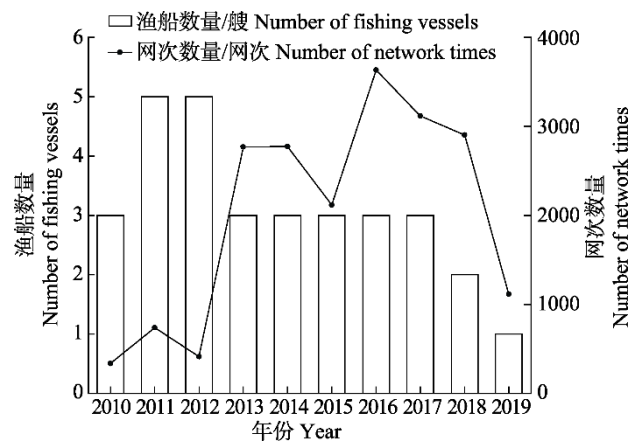


图1 南极磷虾拖网渔船数量和拖网次数统计

Fig.1 Statistics of *E. superba* trawlers and trawling times

度,单位为 t/h,计算公式为:

$$CPUE_k = \frac{C}{E} \quad (1)$$

$$CPUE = CPUE_k \times [W_A \times H_A \times S_A / (W_k \times H_k \times S_k)] \quad (2)$$

式中,  $CPUE_k$  为各捕捞渔船的名义 CPUE,  $C$  为  $1^\circ \times 1^\circ$  单位渔区内的渔获量(t),  $E$  为  $1^\circ \times 1^\circ$  单位渔区内的网具作业时间(h),  $W_A$ 、 $H_A$  和  $S_A$  分别为标准渔船的网口水平扩张(m)、网口高度(m)和拖网速度(kn),  $W_k$ 、 $H_k$  和  $S_k$  分别为  $k$  类船的网口水平扩张、网口高度和拖网速度。本研究中, 标准渔船为使用“832”型网具的渔船, 选取办法和标准参照 Zhang 等(2015)。

**1.2.2 重心迁移轨迹模型** 重心迁移轨迹模型可基于地理要素的加权中心表达时空迁移规律(陈明发, 2021), 本研究将磷虾产量作为变量, 用该模型进行渔场重心时空变化计算, 渔场重心( $\bar{X}_w$ 、 $\bar{Y}_w$ )计算公式如下:

$$\bar{X}_w = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i \times X_i)}{\sum_{i=1}^n C_i}; \bar{Y}_w = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i \times Y_i)}{\sum_{i=1}^n C_i} \quad (3)$$

式中,  $\bar{X}_w$ 、 $\bar{Y}_w$  表示重心坐标,  $C_i$  为第  $i$  网次的渔获产量,  $X_i$  为第  $i$  网次的纬度,  $Y_i$  为第  $i$  网次的经度,  $n$  为统计期间的总网次。

**1.2.3 标准差椭圆分析** 标准差椭圆(standard deviational ellipse, SDE)是一种定量描述研究对象空间分布整体特征及时空演变过程的空间格局统计分析方法, 能够精确表达地理要素空间分布的整体特征(Lefever, 1926), 本研究采用产量作为权重字段, 用来揭示磷虾渔场的变动方向和分布格局。SDE 相关参数计算公式如下:

$$\tan \theta = \frac{\left( \sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{x}_i^2 - \sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{y}_i^2 + \sqrt{\sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{x}_i^2 - \sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{y}_i^2 - 4 \sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{x}_i \tilde{y}_i} \right)}{2 \sum_{i=1}^n w_i^2 \tilde{x}_i \tilde{y}_i} \quad (4)$$

$$\delta_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \tilde{x}_i \cos \theta - w_i y_i \sin \theta)^2}{\sum_{i=1}^n w_i^2}} \quad (5)$$

$$\delta_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \tilde{x}_i \sin \theta - w_i y_i \cos \theta)^2}{\sum_{i=1}^n w_i^2}} \quad (6)$$

式中,  $\theta$  为椭圆方位角,  $w_i$  为研究单元的权重,  $x_i$ 、 $y_i$  为各研究区域的中心坐标,  $\tilde{x}_i$ 、 $\tilde{y}_i$  为各个研究对象与椭圆重心坐标的偏差,  $\delta_x$ 、 $\delta_y$  分别为沿  $x$  轴、 $y$  轴的标准差。

**1.2.4 渔场重心聚类分析** 利用欧式距离来计算年产量重心的距离, 比较渔场重心的变化情况, 公式如下(Carlo, 2021):

$$D_{ab} = \sqrt{(X_a - X_b)^2 + (Y_a - Y_b)^2} \quad (7)$$

式中,  $D_{ab}$  为  $a$  年和  $b$  年产量重心之间的距离,  $X_a$ 、 $Y_a$  分别为第  $a$  年的经度和纬度,  $X_b$ 、 $Y_b$  分别为第  $b$  年的经度和纬度。根据欧式距离, 对 2010—2019 年各年的产量重心按照最小距离法进行聚类, 分析比较年份和月份之间的差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷虾产量和 CPUE 时空变化

将捕捞区域分为  $1^\circ \times 1^\circ$  若干单位小渔区, 统计 2010—2019 年每单位渔区的磷虾总产量, 产量分布见图 3A, CPUE 分布见图 3B。2010—2019 年的产量集中于 48.1 亚区, 48.2、48.3 亚区的产量占比和有产量的单位小渔区分布数量相差较小, 且产量多集中在各亚区的岛屿周围。48.1、48.2 和 48.3 亚区的产量分别占总产量的 70.30%、14.28%和 15.42%。各亚区 CPUE 的变化与产量的变化一致, 各区域中平均 CPUE 值以 48.1 亚区最高, 其次为 48.2 亚区, 48.3

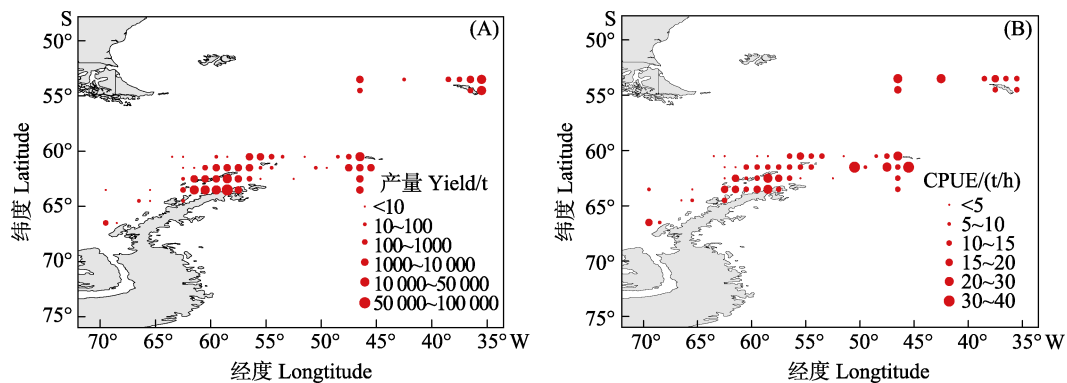


图 3 2010—2019 年磷虾产量空间变化(A)和 CPUE 空间变化(B)

Fig.3 Spatial variation of *E. superba* production (A) and CPUE (B) from 2010 to 2019

亚区最低, 分别为 19.95、12.31 和 11.69 t/h。

年间捕捞力量的投入存在较大差异, 年间产量差距较大, 因此, 本研究仅对 CPUE 进行统计分析。从年间变化来看, CPUE 呈上升趋势, 在 2019 年达到最大值, 最小值发生在 2012 年。网次占比的变化情况基本与 CPUE 的变动趋势相似, 最小值和最大值分别发生在 2010 年和 2016 年(图 4A)。从月间变化来看, 1—9 月 CPUE 和网次占比均呈先增后降的趋势, 且均在 9 月达到最低值(图 4B)。

### 2.2 磷虾产量重心的时空变化

从年间变化来看, 48.1 亚区的产量重心呈现西南—东南—西南的变动趋势, 产量重心总体上向西南方向移动(图 5A); 48.2 亚区的产量重心在 2010—2016 年基本上在东西方向上来回移动, 在 2017 年往南移动, 2018 年和 2019 年又基本移动到 2013 年重心的经度上, 但在纬度上东移, 产量重心总体向东移动(图 5B); 48.3 亚区的产量重心除 2017 年外总体上在南北方向上移动, 且整体上往南移动(图 5C)。

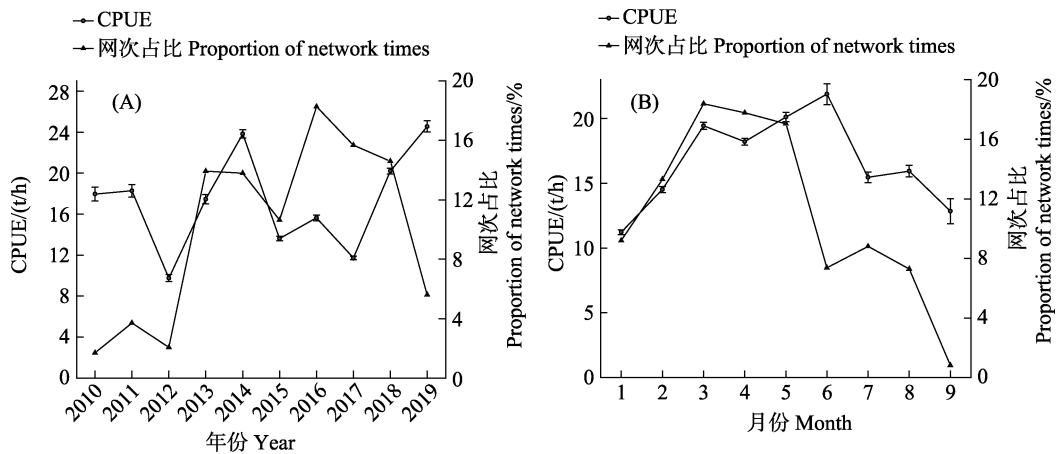


图 4 2010—2019 年磷虾平均 CPUE 的年间(A)变化和月间(B)变化  
Fig.4 Annual (A) and monthly (B) changes of average CPUE of *E. superba* from 2010 to 2019

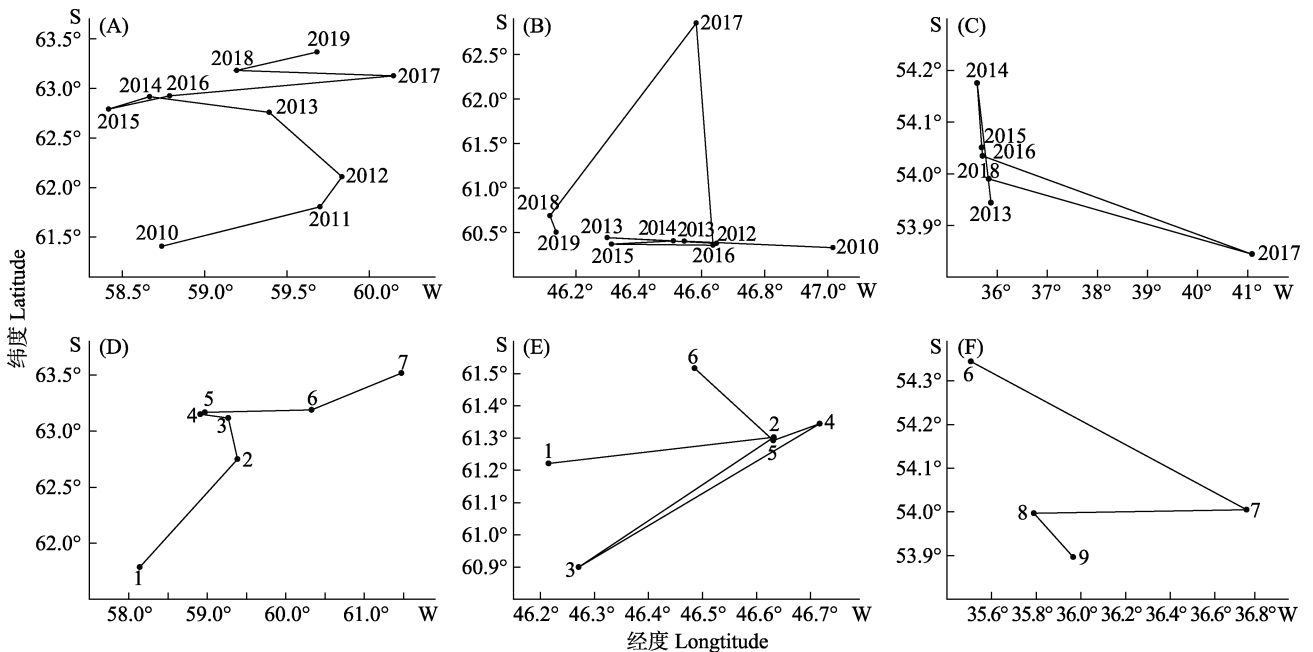


图 5 48 区磷虾历年产量重心年间(A、B 和 C)和月间(D、E 和 F)变化

Fig.5 Distribution of annual (A, B, and C) and monthly (D, E, and F) catch gravity position of *E. superba* in the 48 fishing area

A、B 和 C 分别表示 48.1、48.2 和 48.3 亚区渔场重心的年间变动,

D、E 和 F 分别表示 48.1、48.2 和 48.3 亚区渔场重心的月间变动。

A, B and C represent the annual variation of fishing ground gravity center in sub region 48.1, 48.2 and 48.3 respectively;  
D, E and F represent the monthly variation of fishing ground gravity center in sub region 48.1, 48.2 and 48.3 respectively.

从月间变化来看, 48.1 亚区产量重心总体上逐渐向西南方向移动(图 5D); 48.2 亚区的产量重心随月份无明显变动规律, 产量重心集中在 46.20°W~46.75°W、60.90°S~61.55°S 范围内, 变动范围较小(图 5E); 48.3 亚区仅在 6—9 月有产量存在, 产量重心总体上逐渐向西北移动(图 5F)。

### 2.3 磷虾渔场变动方向和分布格局

为进一步揭示 48 区磷虾渔场的变动方向和分布格局, 采用 SDE 法对磷虾的重心迁移轨迹进行了互补分析。如图 6A 所示, 对 2010—2019 年 10 年的数

据进行汇总分析可得, 从分布方向上看, 磷虾资源在 48.1 亚区基本上沿布兰斯菲尔德海峡分布, 在 48.2 亚区则分布在南奥克尼群岛偏东方向, 在 48.3 亚区分布在南乔治亚群岛东北侧。另外, 通过椭圆的扁率、面积、长轴和短轴可知, 磷虾资源在 48.1 亚区的分布范围最广, 离散程度最大; 在 48.3 亚区的方向性最强, 向心力最明显。

图 6B、6C、6D 和表 1 分别展示了 48.1、48.2 和 48.3 亚区 2010—2019 年每年磷虾渔场的变动情况、产量分布 SDE 形状的相关参数。48.1 亚区磷虾的渔场重心逐渐从西北往东南迁移到布兰斯菲尔德

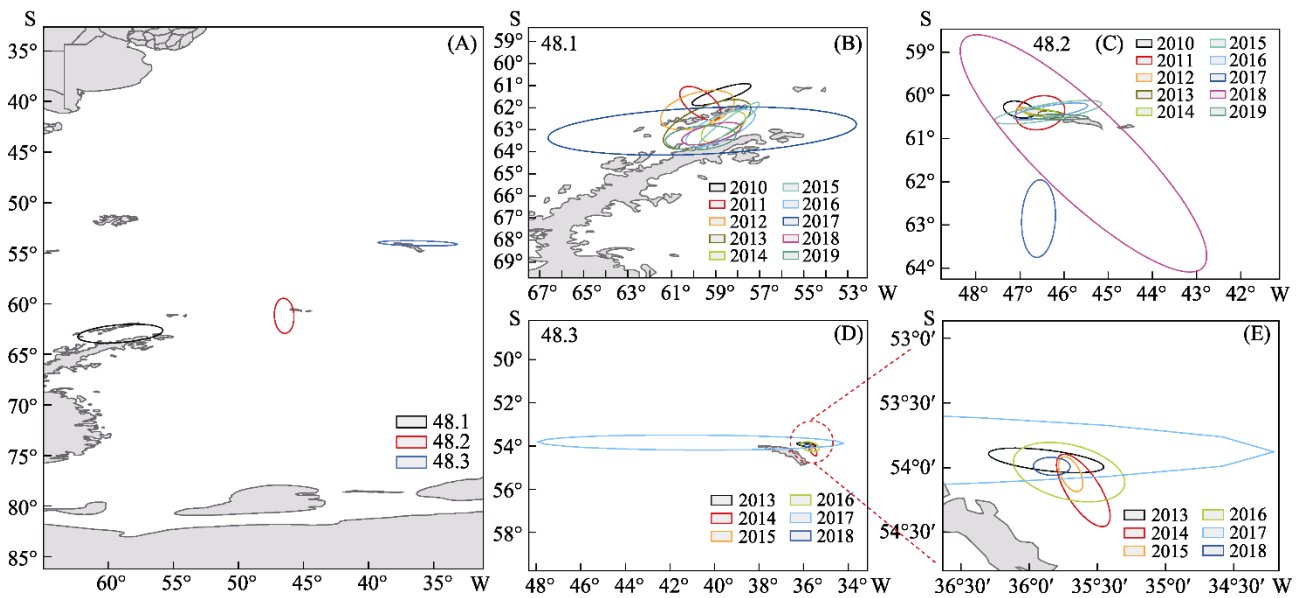


图 6 2010—2019 年磷虾产量分布标准差椭圆

Fig.6 Clustering results of annual and monthly *E. superba* yield barycenter in 48.3 fishing area

表 1 2010—2019 年磷虾产量分布标准差椭圆形状参数

Tab.1 Variation of parameters of standard deviational ellipse of production distribution of *E. superba* from 2010 to 2019

年份 Year	方位角 Azimuth/°			长轴 Major axis			短轴 Minor axis			扁率 Oblateness		
	48.1	48.2	48.3	48.1	48.2	48.3	48.1	48.2	48.3	48.1	48.2	48.3
2010	72.60	103.35	—	1.39	0.36	—	0.28	0.18	—	4.97	1.96	—
2011	125.06	77.56	—	1.07	0.56	—	0.55	0.39	—	1.94	1.46	—
2012	73.28	100.38	—	1.73	0.43	—	0.78	0.06	—	2.23	6.79	—
2013	66.80	94.48	97.13	2.13	0.29	0.43	0.81	0.08	0.79	2.64	3.51	5.37
2014	60.86	94.22	148.56	1.11	0.40	0.32	0.53	0.08	0.12	2.11	4.8	2.63
2015	54.05	80.64	155.03	1.71	1.23	0.14	0.27	0.19	0.07	6.32	6.61	2.01
2016	66.70	80.71	105.03	1.70	0.86	0.42	0.56	0.14	0.21	3.03	6.20	2.00
2017	87.46	2.76	90.27	7.02	6.90	6.86	1.04	0.38	0.35	6.72	2.36	19.82
2018	76.26	134.50	91.87	1.38	3.78	0.13	0.40	1.02	0.07	3.49	3.70	1.94
2019	84.75	90.57	—	1.60	0.68	—	0.53	0.59	—	3.01	11.43	—

注: 作图时使用经纬度作为度量单位, 因此, 短轴和长轴只用来提供距离比例和计算扁率。

Note: Latitude and longitude are used as the unit of measurement in drawing, so the minor axis and major axis only provide distance proportion and calculation of flatness.



海峡内, 年间扩张海域面积差距较大, 在 2017 年达到最大值。除 2011 年外, 渔场分布方位角均在  $54.05^{\circ}\sim 87.46^{\circ}$  之间变动, 表明磷虾渔场分布呈东南-西北格局, 2015、2017 年的扁率较大, 表明 2015 年和 2017 年的方向性较强。

48.2 亚区除 2011 年和 2018 年外, 渔场重心及扩张海域均在南奥克尼群岛偏东方向, 且结合图 6A 可以得出, 48.2 亚区的磷虾渔场扩张海域和方向基本受 2011 年和 2017 年支配, 表明这 2 年的产量较其他年份占比大。渔场分布方位角的变动范围为  $2.76^{\circ}\sim 103.35^{\circ}$ , 年间变动较大, 不具有规律, 2012、2015 年的扁率较大, 方向性较强。

48.3 亚区除 2017 年外, 其他年份渔场重心及扩张海域均在南乔治亚群岛东北方向, 且较为集中, 在  $53^{\circ}30'S\sim 54^{\circ}30'S, 35^{\circ}20'W\sim 36^{\circ}20'W$  之间(图 6E), 2017 年的扩张海域最大, 且渔场重心与其他年份均有较大差距, 结合图 6A 可知, 渔场重心和扩张海域基本不受 2017 年影响, 因此, 2017 年的产量占比较小。渔场分布方位角在  $90.27^{\circ}\sim 155.03^{\circ}$  之间变动, 表明渔场基本分布在东西方向, 2017 年的扁率最大, 方向性最强。

## 2.4 产量重心聚类分析

2010—2019 年 48.1 区不同年份产量重心分布差异较小, 由欧式距离可得, 年间产量重心的空间距离范围在 0.122 (2014 年/2016 年)~2.223 (2010 年/2017 年)之间, 且欧氏距离超过 2 的仅有 2010 年/2017 年和 2010 年/2019 年, 其他年份之间均小于 2(表 2)。经聚类分析可得, 若以空间距离 2 为阈值, 则可将产量重心分为 4 类, 即 2010 年为一组, 2011 年和 2012 年为一组, 2013 年、2014 年、2015 年、2016 年和 2018 年为一组, 2017 年和 2019 年为一组(图 7A)。48.2 亚区 2017 年产量重心分布与其他年份间差异较大, 2017 年与其他年份之间的欧式距离均  $>2$ , 其他年份之间的欧式距离均  $<1$ , 表明除了 2017 外, 其他年份渔场重心较为集中(表 3)。经聚类分析可得, 若以空间距离 2 为阈值, 可以将年产量重心分为 2 类, 即 2017 年为一组, 其他年份为一组(图 7B)。48.3 亚区 2017 年产量重心分布与其他年份差异较大, 均  $>5$ , 其他年份之间重心的欧式距离均  $<1$ , 表明除 2017 年外, 渔场重心较为集中(表 4)。经聚类分析可得, 以空间距离 2 为阈值, 可将年产量重心分为 2 类, 即 2017 年为一组, 其他年份为一组(图 7C)。

表 2 48.1 渔区磷虾各年产量重心的空间距离

Tab.2 Distribution of annual catch gravity position of *E. superba* in the 48.1 fishing area

年份 Year	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
2010	0	1.040	1.299	1.499	1.509	1.421	1.518	2.223	1.832	2.175
2011		0	0.331	1.001	1.517	1.619	1.445	1.396	1.467	1.563
2012			0	0.785	1.419	1.573	1.328	1.066	1.249	1.269
2013				0	0.743	0.976	0.628	0.841	0.468	0.675
2014					0	0.278	0.122	1.496	0.593	1.112
2015						0	0.394	1.763	0.871	1.390
2016							0	1.375	0.482	0.998
2017								0	0.954	0.524
2018									0	0.521
2019										0

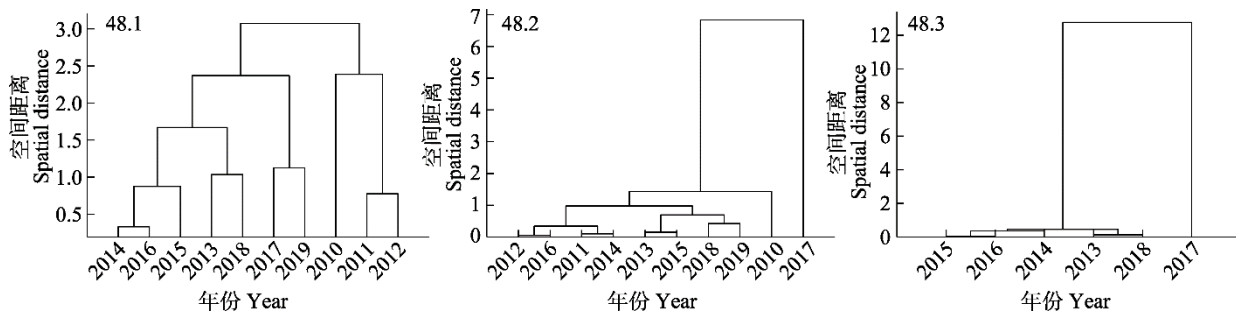


图 7 各渔区磷虾年产量聚类结果

Fig.7 Clustering results of annual *E. superba* yield barycenter in fishing area

表 3 48.2 渔区磷虾各年产量重心的空间距离

Tab.3 Distribution of annual catch gravity position of *E. superba* in the 48.2 fishing area

年份 Year	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
2010	0	0.479	0.373	0.727	0.513	0.706	0.383	2.562	0.969	0.898
2011		0	0.106	0.248	0.034	0.233	0.102	2.453	0.514	0.420
2012			0	0.354	0.140	0.334	0.026	2.476	0.614	0.526
2013				0	0.214	0.072	0.347	2.429	0.307	0.174
2014					0	0.200	0.134	2.450	0.484	0.386
2015						0	0.323	2.498	0.374	0.221
2016							0	2.498	0.615	0.520
2017								0	2.215	2.392
2018									0	0.186
2019										0

表 4 48.3 渔区磷虾各年产量重心的空间距离

Tab.4 Distribution of annual catch gravity position of *E. superba* in the 48.3 fishing area

年份 Year	2013	2014	2015	2016	2017	2018
2013	0	0.358	0.210	0.192	5.190	0.062
2014		0	0.155	0.176	5.472	0.297
2015			0	0.020	5.374	0.152
2016				0	5.361	0.135
2017					0	5.233
2018						0

### 3 讨论

#### 3.1 磷虾渔场时空变化特征

自 20 世纪 70 年代磷虾渔业商业性开发以来,发展迅速,磷虾渔场的时空分布和资源量变动研究等越来越受重视。然而,有关磷虾渔场的年间和季节性分布、资源量变化的研究结果多有分歧(Siegel *et al*, 2005)。磷虾渔业活动一直处在变化中,渔场和渔季也随之发生变化。20 世纪 70 年代,磷虾渔业遍布整个南极大陆周围海域,80 年代末,印度洋成为磷虾捕捞的主要渔场,90 年代开始逐渐向南大西洋转移,自 1996 年以来,磷虾渔业几乎完全集中在南设得兰群岛、南乔治亚岛和南奥克尼群岛(图 8)(Krafft *et al*, 2015; Kawaguchi *et al*, 2007; CCAMLR, 2020)。自 1973 年以来,磷虾渔场范围逐渐缩小,捕捞量表现出较强的波动性。总体来看,20 世纪 90 年代之前磷虾的年均总产量要远大于 90 年代以后的年均产量,但 90 年代以后,其产量呈现逐年增加的趋势(赵国庆, 2018)。磷虾捕捞量的季节性变化也存在较大波动,20 世纪 80 年代磷虾捕捞产量主要集中在夏季,但自 90 年代以后,秋冬季磷虾产量比例逐渐增大并占据优势

(Kawaguchi *et al*, 2006)。赵国庆(2018)通过对以往相关文献和资料总结分析后发现,磷虾全年均可生产。目前,主要捕捞区域位于 48 区,其中,48.1 区作业时间最长,1—6 月产量较高;48.2 区主要作业时间为 3—8 月;48.3 区主要作业时间为 5—10 月,其中,5—8 月产量较高。李显森等(2015)对 2012/2013 渔季磷虾的捕捞量进行统计分析后认为,各渔区中 CPUE 均值以 48.1 区最高,48.3 区最低;月均 CPUE 值在 1—6 月较为稳定,7—9 月逐渐下降。张瑛瑛等(2020)对中国 2010—2015 年磷虾捕捞数据分析后发现,磷虾渔场年际重心由南设得兰群岛周边海域向东北方的南奥克尼群岛、南乔治亚群岛周边海域推移,且大多数捕捞作业频次分布于南设得兰群岛夏季时段(1—3 月)。Francisco 等(2018)通过对各个时空尺度上的捕捞渔船活动情况和磷虾产量分析后发现,历史上的渔场和渔获量的空间分布已经发生了很大变化,并确定了布兰斯菲尔德海峡为主要磷虾渔场。

据南极海洋生物资源养护委员会(Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources, CCAMLR)统计,自 1996 年以来,磷虾的捕捞作业几乎全部集中在 48.1、48.2 和 48.3 亚区(CCAMLR, 2020; CCAMLR Secretariat, 2020),因此,本文对该海域的磷虾进行时空分布的研究具有较大的现实意义。磷虾广泛分布于南极大陆周围各个海域,栖息地范围为  $19 \times 10^6 \text{ km}^2$  (Atkinson *et al*, 2009),密集区基本上出现在大陆架边缘、冰架边缘、海峡以及岛屿周围(Siegel *et al*, 2005; Atkinson *et al*, 2009)。Patricio 等(2020)对智利 2011—2016 年磷虾捕捞数据分析后发现,48.1 区作业范围逐年扩大;48.2 区的捕捞活动主要发生在南奥克尼群岛西北部,捕捞频次逐年减少;48.3 区的捕捞活动主要集中在南乔治亚岛东北部,捕捞范围逐年缩小。这与本文所得出的结论相吻合,即磷虾渔场

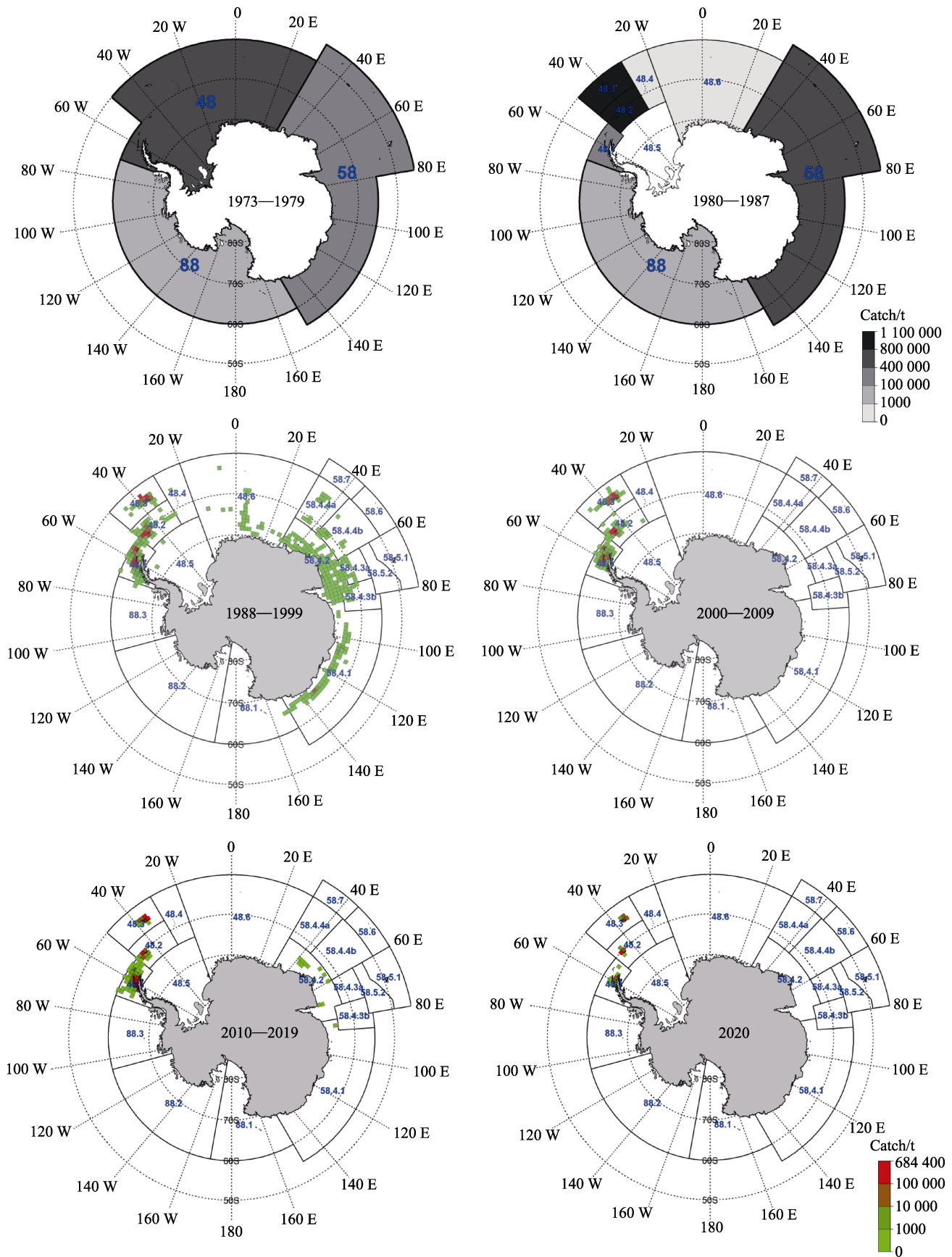


图8 南极海洋生物资源养护委员会统计的磷虾渔获量空间分布(CCAMLR Secretariat, 2020)

Fig.8 Spatial distribution of catches in *E. superba* fishery reported to CCAMLR (CCAMLR Secretariat, 2020)

重心在 48.1 亚区基本上沿布兰斯菲尔德海峡分布, 在 48.2 亚区则分布在南奥克尼群岛东侧, 在 48.3 亚区分布在南乔治亚群岛东北侧, 表明中国与智利的磷虾捕捞区域有一定的重合。在此基础上, 本研究运用重心迁移轨迹模型和 SDE 模型, 从更深层次挖掘磷虾渔场重心在各个亚区的移动轨迹和分布格局。2010—2019 年磷虾产量和捕捞网次主要集中在 48.1 亚区, 且斯菲尔德海峡的磷虾产量大于 48.2 亚区和 48.3 亚区, 基本与 CCAMLR 的统计结果相吻合 (CCAMLR, 2020; CCAMLR Secretariat, 2020)。从本研究还可以看出, 48.1 亚区磷虾渔场的分布范围要远远大于 48.2 亚区和 48.3 亚区。

### 3.2 磷虾渔场变动的影响因素

磷虾的商业性捕捞已近 50 年, 磷虾渔业多次被强调为世界上最后未被开发的渔业之一 (Garcia *et al.*, 2011), 具有很大的发展潜力, 几十年来, 磷虾渔场的主要海域、渔季都发生了巨大变化。

磷虾渔业往往跟随磷虾群进行捕捞作业, 因此磷虾渔场的选择与其集群行为具有很大关系。集群是磷虾的主要生态行为, 在它们的整个生命史中都发挥着重要作用, 它们通过集群在某些区域高度集中, 但是在某些区域几乎完全没有分布 (Murphy *et al.*, 1988), 有时磷虾集合成群时面积可达 100 万 km<sup>2</sup>, 内含 200 万 t 磷虾 (Siegel, 2005)。磷虾的集群和分布是多种因素互相作用的结果, 很少有研究能够证明单一因素诸如温度、盐度、溶解氧浓度、溶解有机质、海水理化性质、洋流、锋面系统和经纬度等与磷虾密度或分布具有明显的可预测关系 (Siegel *et al.*, 2016)。磷虾往往因为洋流和水深的共同影响集中分布于陆架边缘和峡谷, 可能会密集聚集形成热点区域 (Bernard *et al.*, 2017)。本文与相关研究 (Patricio *et al.*, 2020) 发现, 近年来, 磷虾捕捞多集中于岛屿周围 (南奥克尼群岛和南舍得兰群岛) 和海峡 (布兰斯菲尔德海峡) 内。据研究, 磷虾生物量的聚集也依赖于潮汐 (Bernard *et al.*, 2017)、风向 (Krafft *et al.*, 2015) 的情况, 在昼夜潮汐期间, 安弗斯岛附近水域的生物量显著更高, 当西风为主和局地混合潮处于日变化状态时, 大密度聚集更频繁发生。但不得不提的是, 磷虾的集群分布难以预测, 到目前为止, 仍无法准确掌握磷虾的集群机制 (Krafft *et al.*, 2015)。

磷虾渔业是一种利益驱动的经济性活动, 渔船通常以利润最大化为目标 (Krafft *et al.*, 2015), 磷虾渔场的变迁、渔获量的增减除了受各种物理环境因素的影响外, 还与磷虾的商业用途、市场的需求、捕捞渔船

的增减和磷虾管理政策等有很大关系 (Nicol *et al.*, 2012)。影响渔船收入的因素有很多, 但磷虾集群的密度具有预测性。Krafft 等 (2015) 指出, 声学得到磷虾集群密度最高的深度与实际捕捞深度一致, 并表示渔船更倾向于在垂直方向上瞄准高密度磷虾群。但有时磷虾渔场的变动可能并不完全由磷虾集群的密度决定。Hewitt 等 (2004) 分析了南设德兰群岛周围海域磷虾捕捞随时间的变化模式后指出, 该海域磷虾密度较高的区域主要有象岛东端、象岛和乔治国王岛屿之间和希里夫角附近, 但前二者均不是磷虾的主要渔场。磷虾捕捞量的时空波动与船队组成也有一定关联。前苏联自 1972 年开始在南极水域进行商业捕捞以来一直占据主导地位, 年捕捞量超过 20 万 t, 主要的捕捞地为南极洲东部海域和南大西洋 (Nicol *et al.*, 2011)。20 世纪 90 年代初期前苏联解体后, 磷虾产量大幅下降, 主要来自于如本和韩国, 后来随着挪威、中国、韩国等国家相继加入磷虾的捕捞, 其产量有较大提升, 挪威逐渐占据主导地位, 磷虾渔场逐渐向南大西洋迁移 (陈雪忠等, 2009; 赵宪勇等, 2016; CCAMLR Secretariat, 2020)。

因为磷虾渔船的捕捞活动只发生在无冰区, 海冰是影响捕捞渔船作业的主要因素, 捕捞热点区域位置与海冰覆盖度关系密切, 这也导致磷虾渔场季节性明显 (Kawaguchi *et al.*, 2010b)。另外, 海冰为磷虾提供了优良的栖息环境, 为越冬的磷虾群提供了优良的索饵环境, 也减少了被捕捞和猎食的风险 (Brierley *et al.*, 2002)。据研究, 48 渔区磷虾夏季的磷虾丰度与上一季度冬季海冰的面积呈正比 (Hewitt *et al.*, 2004), 而磷虾渔业中, CPUE 与海冰总面积年间变化呈显著负相关关系 (戴立峰等, 2012)。近年来, 全球气候变暖导致海冰形成延迟、无冰区域扩大, 进而使磷虾捕捞的时间跨度变得越来越长, 曾只在夏季的捕捞活动现已持续到秋季 (Kawaguchi *et al.*, 2006)。而冰川融化对磷虾的生存具有不容忽视的威胁, 据研究, 气候引起的冰川融水导致海洋中悬浮颗粒增加, 大量的岩性颗粒影响了磷虾的摄食、吸收能力和交配行为, 这可能是南极洲波特湾磷虾大量死亡的原因 (Fuentes *et al.*, 2016)。随着全球气候变暖, 在过去的 90 年里, 西南大西洋磷虾的分布逐渐向南收缩, 在分布的北部极限区域密度急剧下降, 密度重心越来越靠近南极冰架 (Atkinson *et al.*, 2019), 这可能也是导致 48.1 亚区磷虾渔场重心逐渐向西南方向移动的主要原因。据研究, 在未来几十年里南大洋将会持续变暖 (Michael *et al.*, 2021), 而这可能进一步对磷虾的栖息地、分布等产生重要影响。Veytia 等 (2020) 模拟了磷虾栖息地质量

的季节性变化,指出未来 80 年里海洋温度和初级生产力的改变可能会导致磷虾栖息地萎缩,渔场不断向高纬度地区转移。

随着磷虾渔业的发展,磷虾渔场的掌控能力和捕捞技术都有了长足的发展。自 2007 年以来,挪威将连续泵吸技术应用到磷虾捕捞,磷虾渔获产量持续增加,已达到季节性配额,导致渔场提前关闭(Francisco *et al.*, 2018)。目前,磷虾渔业多集中在西南大西洋(48 区),CCAMLR 对 48.1、48.2 和 48.3 亚区的捕捞出发限额分别为 15.5 万 t、27.9 万 t 和 27.9 万 t(Nicol *et al.*, 2012)。48.1 亚区作为捕捞热点区域,已多次达到触发水平,对磷虾捕捞时长产生了一定影响(CCAMLR Secretariat, 2020)。目前,CCAMLR 以亚区为单位进行捕捞限额的制定,而并未考虑磷虾的聚集特征。南极半岛周边水域,特别是布兰斯菲尔德海峡,作为磷虾重要的产卵场、索饵场和越冬场,大量磷虾聚集在此,捕捞区域和捕捞季节与企鹅和鲸鱼的捕食活动有较大的重合(Weinstein *et al.*, 2017)。Francisco 等(2018)指出,应在较小的空间单元中重新分配预防性捕捞限制,以尽量减少对依赖磷虾的捕食者的不良影响。大约 20 年前,CCAMLR 探索过这种依据小单元进行管理的方法,目前仍有待实施(Hewitt *et al.*, 2004)。在局部渔获产量不断提升的前提下,这种管理方法很可能会得到采用,而这将进一步对磷虾渔场的时空分布产生影响。

磷虾渔场的选择需要多方面考虑,在进行安全捕捞的前提下,既要严格遵守 CCAMLR 的管理措施,又需要实现利益最大化,特别是目前气候变化可能已经对南极产生了不可逆的影响,这就要求我们要实时掌握磷虾资源和其生存环境的相关信息,并做出迅捷反应,掌握更先进的泵吸捕捞技术,提升渔场的掌控能力,在世界磷虾渔业中占据有利地位。

## 参 考 文 献

- ATKINSON A, SIEGEL V, PAKHOMOV E A, *et al.* A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep-Sea Research Part I*, 2009, 56(5): 727–740
- ATKINSON A, NICOL S, KAWAGUCHI S, *et al.* Fitting *Euphausia superba* into southern ocean foodweb models: A review of data sources and their limitations. *CCAMLR Science*, 2012, 19: 219–245
- ATKINSON A, HILL S L, PAKHOMOV E A, *et al.* Krill (*Euphausia superba*) distribution contracts southward during rapid regional warming. *Nature Climate Change*, 2019, 142–149
- BERNARD K S, CIMINO M, FRASER W, *et al.* Factors that affect the nearshore aggregations of Antarctic krill in a biological hotspot. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2017, 126: 139–147
- BRIERLEY A S, FERNANDES P G, BRANDON M A, *et al.* Antarctic krill under sea ice: Elevated abundance in a narrow band just south of ice edge. *Science*, 2002, 295(5561): 1890–1890
- CARLO R. From the Euclidean distance to compositional dissimilarity: What is gained and what is lost. *Acta Oecologica*, 2021, 111: 1–3
- CCAMLR. CCAMLR statistical bulletin volume 32. Tasmania, Australia: Commission for the conservation of Antarctic marine living resources, 2020
- CCAMLR Secretariat. Fishery report 2020: *Euphausia superba* in Area 48. Tasmania, Australia: Commission for the conservation of Antarctic marine living resources, 2020
- CHEN M F, LIU F, ZHAO Y L, *et al.* The expansion and gradient evolution of impervious surface within the Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area from 1987 to 2017. *Journal of Geo-Information Science*, 2021, 23(3): 443–455 [陈明发, 刘帆, 赵耀龙, 等. 1987—2017 年粤港澳大湾区城市群的不透水地表扩张与梯度演化. *地球信息科学学报*, 2021, 23(3): 443–455]
- CHEN X Z, XU Z L, HUANG H L, *et al.* Development strategy on Antarctic krill resource utilization in China. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(3): 451–458 [陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮, 等. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 451–458]
- DAI L F, ZHANG S M, FAN W. The abundance of Antarctic krill and its relationship to sea ice and sea surface temperature. *Chinese Journal of Polar Research*, 2012, 24(4): 352–360 [戴立峰, 张胜茂, 樊伟. 南极磷虾资源丰度变化与海冰和表温的关系. *极地研究*, 2012, 24(4): 352–360]
- ERICSON J A, HELLESSEY N, NICHOLS P D, *et al.* Seasonal and interannual variations in the fatty acid composition of adult *Euphausia superba* Dana, 1850 (*Euphausiacea*) samples derived from the Scotia Sea krill fishery. *Journal of Crustacean Biology*, 2018, 38(6): 1–11
- FRANCISCO S C, BILLY E, ARATA J A, *et al.* Spatial and temporal dynamics of the Antarctic krill fishery in fishing hotspots in the Bransfield Strait and South Shetland Islands. *Fisheries Research*, 2018, 208: 157–166
- FUENTES V, ALURRALDE G, MEYER B, *et al.* Glacial melting: An overlooked threat to Antarctic krill. *Scientific Reports*, 2016, 1–6
- GARCIA S M, ROSENBERG A A. Food security and marine capture fisheries: Characteristics, trends, drivers and future perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2010, 365(1554): 2869–2880
- HEWITT R P, WATKINS J, NAGANOBU M, *et al.* Biomass of Antarctic krill in the Scotia Sea in January/February 2000 and its use in revising an estimate of precautionary yield. *Deep-Sea Research II*, 2004, 51: 1215–1236

- KAWAGUCHI S, NICOL S, TAKI K, *et al.* Fishing ground selection in the Antarctic krill fishery: Trends in patterns across years, seasons and nations. *CCAMLR Science*, 2006, 13: 117–141
- KAWAGUCHI S, NICOL S. Learning about Antarctic krill from the fishery. *Antarctic Science*, 2007, 19(2): 219–230
- KAWAGUCHI S, CANDY S G. Quantifying movement behaviour of vessels in the Antarctic krill fishery. *CCAMLR Science*, 2009, 16: 131–148
- KAWAGUCHI S, KING R, MEIJERS R, *et al.* An experimental aquarium for observing the schooling behaviour of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Deep-Sea Research Part II*, 2010a, 57(7–8): 683–692
- KAWAGUCHI S, NICOL S, PRESS A J. Direct effects of climate change on the Antarctic krill fishery. *Fisheries Management and Ecology*, 2010b, 16: 424–427
- KRAFFT B A, SKARET G, KNUITSEN T. An Antarctic krill (*Euphausia superba*) hotspot: Population characteristics, abundance and vertical structure explored from a krill fishing vessel. *Polar Biology*, 2015, 38(10): 1687–1700
- LEFEVER D W. Measuring geographic concentration by means of the standard deviational ellipse. *American Journal of Sociology*, 1926, 32(1): 88–94
- LEHODEY P, BERTIGNAC, HAMPTON J, *et al.* El Niño Southern Oscillation and tuna in the western Pacific. *Nature*, 1997, 389(6652): 715–718
- LI X S, ZHANG J C, ZHAO X Y, *et al.* Spatiotemporal distribution of *Euphausia superba* in CCAMLR Area 48 during 2012/2013 fishing season. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 1–9 [李显森, 张吉昌, 赵宪勇, 等. 2012/2013 渔季 CCAMLR 48 区南极磷虾(*Euphausia superba*)资源时空分布. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 1–9]
- MARRARI M, DALY K L, HU C. Spatial and temporal variability of SeaWiFS chlorophyll *a* distributions west of the Antarctic Peninsula: Implications for krill production. *Deep-Sea Research Part II*, 2008(55): 377–392
- MICHAEL K, SUBERG LA, WESSELS W, *et al.* Facing Southern Ocean warming: Temperature effects on whole animal performance of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Zoology*, 2021, 146: 1–31
- MURPHY E J, MORRIS D J, WATKINS J L, *et al.* Scales of interaction between Antarctic krill and the environment. Springer Berlin Heidelberg, 1988
- NICOL S, FOSTER J. Recent trends in the fishery for Antarctic krill. *Aquatic Living Resources*, 2003, 16(1): 42–45
- NICOL S, FOSTER J, KAWAGUCHI S. The fishery for Antarctic krill: Recent developments. *Fish and Fisheries*, 2011, 13(1): 30–40
- PATRICIO M A, RENZO R, ÁLVARO D C. Chilean Antarctic krill fishery (2011–2016). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2020, 48(2): 179–196
- Polar Special Office of State Oceanic Administration. Investigation and assessment of krill and other biological resources in the waters around Antarctica. Beijing: Ocean Press, 2016, 3 [国家海洋局极地专项办公室. 南极周边海域磷虾等生物资源考察与评估. 北京: 海洋出版社, 2016, 3]
- SAENZ B T, AINLEY D G, DALY K L, *et al.* Drivers of concentrated predation in an Antarctic marginal-ice-zone food web. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1–17
- SEOK G C, EUN A Y, DOO H A, *et al.* Characterization of frequency and aggregation of the Antarctic krill (*Euphausia superba*) using acoustics. *Ocean Science Journal*, 2018, 53(4): 1–11
- SIEGEL V. Distribution and population dynamics of *Euphausia superba*: Summary of recent findings. *Polar Biology*, 2005, 29(1): 1–22
- SIEGEL V. Biology and ecology of Antarctic krill. *Advances in Polar Ecology*. Springer International Publishing, 2016, 22–28
- STOWASSER G, ATKINSON A, MCGILL R, *et al.* Food web dynamics in the Scotia Sea in summer: A stable isotope study. *Deep Sea Research Part II*, 2012, 59(1): 208–221
- VEYTIA D, CORNEY S, MEINERS K M, *et al.* Circumpolar projections of Antarctic krill growth potential. *Nature Climate Change*, 2020, 10(6): 1–8
- WANG L Z, XUE C H, WANG Y M, *et al.* Extraction of proteins with low fluoride level from Antarctic krill (*Euphausia superba*) and their composition analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(11): 6108–6112
- WEINSTEIN B G, DOUBLE M, GALES N, *et al.* Identifying overlap between humpback whale foraging grounds and the Antarctic krill fishery. *Biological Conservation*, 2017, 210: 184–191
- ZHANG J C, ZHAO X Y, WANG X L, *et al.* Numericalization of pictorial image of Antarctic krill echogram taken from a commercial echo-sounder. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 64–71 [张吉昌, 赵宪勇, 王新良, 等. 商用探鱼仪南极磷虾声学图像的数值化处理. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 64–71]
- ZHANG H, ZHANG S M, CUI X S, *et al.* Spatiotemporal dynamics in the location of the fishing grounds and catch per unit effort (CPUE) for Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi* Nichols, 1920) from Chinese trawl fleets on the high seas of the Southeast Pacific Ocean, 2001–2010. *Journal of Applied Ichthyology*, 2015, 31(4): 646–656
- ZHANG Y Y, XU B, ZHANG H, *et al.* Interannual and monthly variations of catch per unit effort and the relation with sea surface temperature and chlorophyll concentration in fishing grounds (Fishing Area 48) of Antarctic krill. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(5): 1685–1694 [张瑛瑛, 徐博, 张衡, 等. 南极磷虾渔场(48 渔区)CPUE 的年、月变化及其与海表温度、叶绿素浓度的关系. *生态学杂志*, 2020, 39(5): 1685–1694]
- ZHAO G Q. Study on the spatial-temporal distribution of Antarctic krill (*Euphausia superba*) fishing ground and its relationship with environmental factors. Master's Thesis of

Yantai University, 2018, 6 [赵国庆. 南极磷虾在渔场中的分布及与环境因子之间关系研究. 烟台大学硕士研究生学位论文, 2018, 6]  
ZHAO X Y, ZUO T, LENG K L, *et al.* Engineering science and

technology challenges in the Antarctic krill fishery. Engineering Sciences, 2016, 18(2): 85–90 [赵宪勇, 左涛, 冷凯良, 等. 南极磷虾渔业发展的工程科技需求. 中国工程科学, 2016, 18(2): 85–90]

(编辑 冯小花)

## Temporal and Spatial Distribution of Antarctic Krill in 48 Fishing Areas Based on Fishery Data

ZHAO Guoqing<sup>1,2</sup>, LUO Junrong<sup>3</sup>, TANG Fenghua<sup>2</sup>, FAN Wei<sup>2</sup>,  
SONG Xuefeng<sup>2</sup>, YANG Chao<sup>1,2</sup>, ZHANG Heng<sup>2①</sup>

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

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China;

3. Fujian Zhengguan Fishery Development Cooperation, Fuzhou, Fujian 350500, China)

**Abstract** Antarctic krill (*Euphausia superba*) is a vital part of the food web, supporting substantial fishery in the Southern Ocean. Krill represent the world's largest animal protein pool, rich in lipids, nutritional long-chain polyunsaturated fatty acids, mineral elements, and carotene, with great potential for development. It is of great significance to understand the changes in fishing grounds, as they profoundly affect the krill population. The distribution characteristics of Antarctic krill fishing grounds in 48 areas were analyzed based on the production statistics of Antarctic krill fishing vessels in China from 2010 to 2019. The gravity center migration trajectory model and standard deviational ellipse (SDE) model were used to analyze the trends and characteristics of Antarctic krill fishing grounds. The results showed that the production of Antarctic krill was mainly concentrated in sub-region 48.1, accounting for 70.30% of total production. The yields of the 48.2 and 48.3 sub-regions showed little difference, accounting for 14.28% and 15.42%, respectively. The annual catch per unit effort (CPUE) curve increased over time, with a minimum value in 2012 and a maximum value in 2019. The monthly CPUE first increased and then decreased, with the minimum value in January and the maximum value in June. The annual and monthly gravity center of Antarctic krill in sub-region 48.1 moved southwest. The annual gravity center of Antarctic krill in sub-region 48.2 moved to the east, but the range of movement was small, and the monthly trends were weak. The annual gravity center of Antarctic krill in sub-region 48.3 moved to the south, and the monthly gravity center moved to the northwest. According to SDE analysis, krill fishing grounds in sub-region 48.1 had the widest distribution and the greatest dispersion, with the strongest directivity and the most obvious centripetal force in sub-region 48.3. The center of gravity of the fishing ground was distributed along the Bransfield Strait in sub-region 48.1, east of the South Orkney Islands in sub-region 48.2, and northeast of the South Georgia Islands in sub-region 48.3. Clustering results showed that the annual fishing ground gravity centers were concentrated in sub-region 48.1. The annual fishing ground gravity centers of sub-regions 48.2 and 48.3 were relatively concentrated in all years, except in 2017.

**Key words** Antarctic krill; Fishing ground gravity center; Standard deviation ellipse analysis; Cluster analysis; Spatial and temporal distribution; 48 fishing areas

① Corresponding author: ZHANG Heng, E-mail: zhangziqian0601@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210319002

http://www.yykxjz.cn/

李祥艳, 田辉伍, 蒲艳, 唐锡良, 严忠鑫, 陈大庆, 刘绍平, 段辛斌. 长江上游宜宾江段鱼类早期资源现状研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 93-104

LI X Y, TIAN H W, PU Y, TANG X L, YAN Z L, CHEN D Q, LIU S P, DUAN X B. Study on the status of the early-stage fish resources at Yibin Section in the upper reaches of the Yangtze River. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 93-104

# 长江上游宜宾江段鱼类早期资源现状研究\*



李祥艳<sup>1,2</sup> 田辉伍<sup>2</sup> 蒲艳<sup>1,2</sup> 唐锡良<sup>3</sup> 严忠鑫<sup>3</sup>  
陈大庆<sup>2</sup> 刘绍平<sup>2</sup> 段辛斌<sup>2①</sup>

(1. 西南大学生命科学学院 重庆 400715; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所  
农业农村部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站 湖北 武汉 430223;  
3. 中国三峡建设管理有限公司 四川 成都 610023)

**摘要** 本研究于2017—2019年每年4—7月在宜宾江段开展鱼类早期资源调查。结果显示, 宜宾江段有鱼类22种, 隶属于3目5科, 以鲤科(Cyprinidae)鱼类为主, 其中, 产漂流性卵鱼类13种, 特有鱼类6种。不同鱼类繁殖时间具有明显的年内和年间差异, 但均在6月进入繁殖盛期。2017—2019年, 鱼卵总径流量分别为 $12.10 \times 10^6$ 、 $70.42 \times 10^6$ 和 $35.77 \times 10^6$ 粒, 鱼苗总径流量分别为 $30.95 \times 10^6$ 、 $41.47 \times 10^6$ 和 $39.44 \times 10^6$ 尾, 其中, 特有鱼类3年累计总卵径流量为 $15.91 \times 10^6$ 粒。经推算, 在宜宾江段分布着多个产漂流性卵鱼类的产卵场, 规模较大的产卵场主要分布在周坝、桃子湾和华龙码头3处。吻鮰(*Rhinogobio typus*)产卵场从东岳庙至向家坝坝下均有分布, 3年累计产卵量最大达 $40.93 \times 10^6$ 粒, 且吻鮰产卵场有向下游迁移的趋势。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)产卵场主要分布在马铭溪码头和桃子湾。CCA分析结果显示, 水位、水温和流量等环境因子对鱼卵密度有不同程度的影响, 犁头鳅(*Lepturichthys fimbriata*)和花斑副沙鳅(*Parabotia fasciata*)在水温和流量较高时产卵; 草鱼和小眼薄鳅(*Leptobotia microphthalmia*)繁殖条件相近, 与水位、流量和流速相关性较高; 吻鮰和铜鱼(*Coreius heterokon*)产卵受溶解氧和透明度变化的影响较大。虽然受到金沙江下游梯级水电开发等多种因素的影响, 但宜宾江段作为保护区的重要组成部分, 仍是多种鱼类产卵繁殖的重要分布区, 近年来, 资源量呈上升趋势缓慢恢复。建议加强该江段早期资源研究, 开展生境保护与修复, 落实好“十年禁渔”, 以促进资源恢复。

**关键词** 长江上游; 宜宾江段; 种类组成; 鱼类资源

中图分类号 S932.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0093-12

\* 国家重点研发计划(2018YFD0900903)、中国三峡建设管理有限公司项目(JG/18056B; JG/18057B)、中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD09)、农业农村部财政专项“长江渔业资源与环境调查”和生态环境部生物多样性调查、观测和评估项目(2019—2023年)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900903), Project of Three Gorges Construction Management Co., Ltd (JG/18056B; JG/18057B), Innovation Team Project of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD09), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, and the Biodiversity Investigation, Observation, and Assessment Program (2019—2023) of the Ministry of Ecology and Environment of China].

李祥艳, E-mail: lxyqin96@163.com

① 通信作者: 段辛斌, 研究员, E-mail: duan@yfi.ac.cn

收稿日期: 2021-03-19, 收修改稿日期: 2021-05-10



长江上游地貌类型多样,河床海拔落差大,生境复杂,水能资源丰富,孕育了数量众多的珍稀特有鱼类,历史记载长江上游分布鱼类达 286 种,其中特有鱼类 124 种(危起伟, 2012; He *et al.*, 2010; 孟宝等, 2019)。该流域内具有众多全球和国家保护意义的重要生境和生态敏感区(李德旺等, 2013), 其中, 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区(以下简称保护区)是我国最长的河流型自然保护区, 宜宾江段是保护区的核心区, 是长江上游许多珍稀特有鱼类的重要栖息地(危起伟, 2012)。

2012 年以来, 随着向家坝、溪洛渡等大型水库相继蓄水, 河流连续性受阻, 也阻断了鱼类洄游路径, 坝上与坝下群体不能有效进行遗传交流, 多样性降低。水文情势发生变化, 坝下河流水位流量波动频繁, 流水性鱼类栖息生境受到严重影响, 不利于鱼类繁殖, 资源量下降。下泄水流的含沙量明显减少, 坝下河道冲刷和局部河段调整, 改变了原有鱼类的繁殖和栖息场所。下泄水温升降滞后, 鱼类繁殖时期延迟, 种群数量减少(陈大庆等, 2005; 曹文宣, 2017), 对长江上游的渔业资源带来了显著影响。高天珩(2016)在长江上游江津江段的研究表明, 蓄水后江津江段鱼类卵苗总量有明显下降, 圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)、长薄鳅(*Leptobotia elongata*)等大型鱼类在蓄水后未曾监测到。宜宾江段即位于向家坝下, 监测断面距向家坝仅约 32 km, 受大坝建设后水文情势改变的影响更明显。鱼类早期资源的动态变化是引起种群数量变动和年龄结构变化的主要原因(Chambers *et al.*, 2012), 对其的研究也是评估水利工程建设对鱼类资源影响的一个重要手段(徐田振等, 2018), 并与渔业资源开发利用尺度及保护政策的制定等密切相关。然而, 目前该水域鱼类早期资源的基础资料极少, 为此本研究于 2017—2019 年在长江上游宜宾江段开展鱼类早期资源调查, 通过分析种类组成、资源量变化、鱼卵密度与环境因子间的关系, 推算产卵场位置和繁殖规模, 以期了解宜宾江段早期资源现状, 为宜宾江段渔业资源管理和保护提供数据支撑, 同时为金沙江下游梯级水电站运行对长江上游鱼类的影响分析提供数据参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 调查时间与区域

于 2017 年 4 月 23 日—7 月 15 日、2018 年 4 月 27 日—7 月 17 日和 2019 年 5 月 7 日—7 月 20 日在

长江上游宜宾江段开展鱼类早期资源调查, 3 年累计监测 241 d。该断面位于宜宾市叙州区南门大桥上行约 400 m 处(28°45'N, 104°37'E)(图 1), 上距向家坝水电站约 32 km, 下距金沙江与岷江交汇口约 1.5 km, 是保护区的重要部分。采用定点断面的方式进行采样, 采样点设置在断面的主流水域的南岸和北岸, 该处江岸平直, 两岸水流较缓, 流速范围为 0.46~1.71 m/s, 相应江面宽度约 260 m。

### 1.2 采样方法及卵苗鉴定

样品采集按照《内陆水域渔业资源调查手册》和《河流水生生物调查指南》的方法进行(张觉民等, 1991; 陈大庆, 2014)。采集网具为圆锥网(50 目, 网长为 2.5 m, 网口面积为 0.196 m<sup>2</sup>), 网后接圆柱形集苗器。每天 08:00 和 14:00 开始采集, 上、下午各采集 6 网, 每网采集 15 min。若出现卵苗高峰期, 则适当增加采样频率。同时测量水温和溶解氧(YSI ProODO 型溶氧仪测定), 网口流速(采用 LS45A 型旋杯式流速仪记录), 透明度(使用萨氏盘测定)等环境因子数据, 水位和流量数据来源于中国长江三峡集团有限公司水情信息网向家坝站(<https://www.ctg.com.cn/sxjt/sqqk/index.html>)。

采集的卵苗在野外先使用奥林巴斯解剖镜 SZX16 进行观察, 记录鱼卵发育时期, 测定其卵径、膜径和胚体长, 并拍照保存, 采用线粒体 DNA 细胞色素 b 基因鉴定种类。仔鱼先根据色素的分布、肌节数目等形态特征进行初步种类鉴定(曹文宣等, 2007), 后用 95% 的酒精保存带回实验室进行 DNA 分子鉴定, 以对照校准(Liu *et al.*, 2018)。

### 1.3 数据处理与分析

产卵场位置和卵苗径流量等的计算参考易伯鲁等(1998)的计算方法。

**1.3.1 产卵场位置推算** 根据采集鱼卵的发育时期, 并结合水流速度来推算鱼卵的漂流距离和产卵场的位置:

$$L=VT$$

式中,  $L$  为卵苗的漂流距离(m),  $V$  为网口流速(m/s),  $T$  为鱼卵胚胎发育时间(s)。

**1.3.2 卵苗径流量估算** 一昼夜流经调查断面的卵苗径流量( $N_m$ ), 是 24 h 内各次定时采集的卵苗径流量之和( $\sum M$ )与前后 2 次采集之间非采集时间内计算出的卵苗径流量之和( $\sum M'$ )的总和, 即:

$$N_m = \sum M + \sum M'$$

一次定时采集的断面卵苗径流量( $M$ ), 按下式求出:

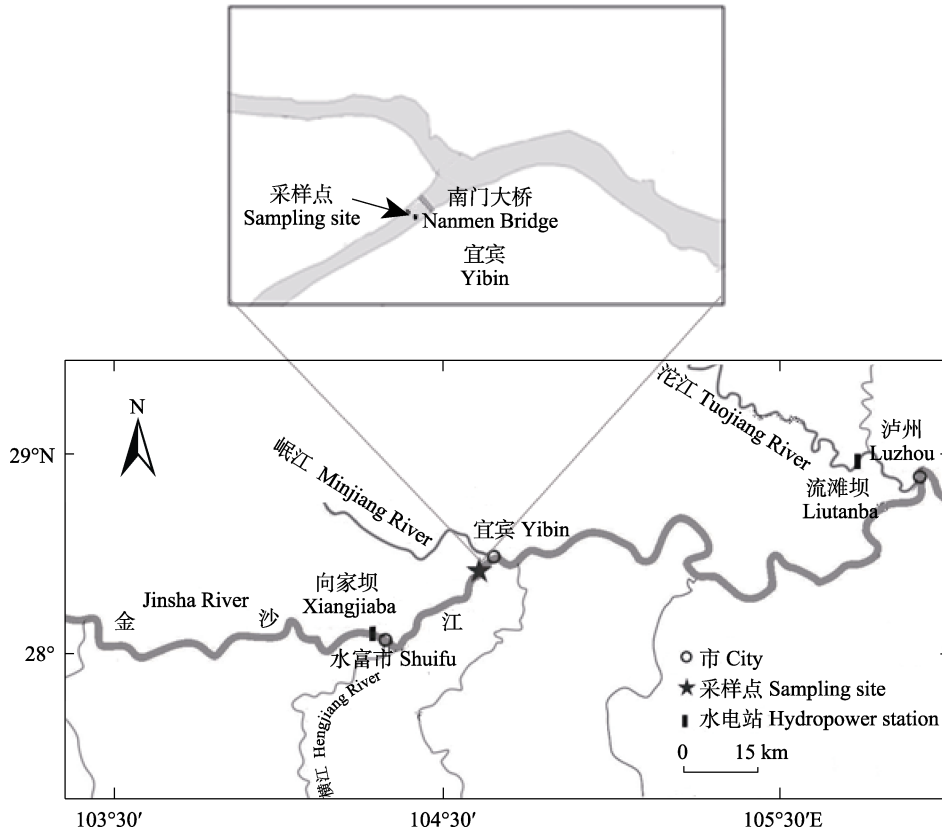


图1 调查断面示意图

Fig.1 Sketch map of sampling site

$$M=(Q/q)\cdot m\cdot C$$

式中,  $Q$  为调查断面的平均江水流量( $\text{m}^3/\text{s}$ ),  $q$  为流经网内的江水流量( $\text{m}^3/\text{s}$ ),  $m$  为断面固定点一次采到的卵苗数量(粒/尾),  $C$  为断面卵苗流量系数。

卵苗流量系数( $C$ )是断面各常规采集点的卵苗平均密度( $\bar{D}$ )与常规采集点的卵苗密度( $d$ )之比, 即:

$$C = \bar{D} / d$$

$$\bar{D} = \sum_{i=1}^n d_i / n$$

式中,  $\sum_{i=1}^n d_i$  为采集断面所设各点密度之和,  $n$  为采集断面所设采集点的数量。2次样本采集之间的非采集时间内, 流经断面的卵苗径流量  $M'$  采用插补法来计算, 即:

$$M' = (M_1/t_1 + M_2/t_2)t'/2$$

式中,  $t'$  为前后2次采集之间的间隔时间,  $t_1$ 、 $t_2$  为前后2次采集的持续时间;  $M_1$ 、 $M_2$  为前后2次采样的卵苗数量。

**1.3.3 统计分析** 应用方差分析(ANOVA)检验环境因子的年际变化差异, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。为探究鱼卵密度与各环境因子间的关系, 运用束缚型排序

(constrained ordination)分析调查数据。水位、流量和水温等环境因子的逐日变化数据作为环境数据源, 不同种类的鱼卵密度( $\text{ind./1000 m}^3$ )逐日变化数据作为物种数据源, 由此构成环境因子与物种矩阵。先对物种数据进行除趋势对应分析(detrended correspondence analysis, DCA), 表明单峰模型(lengths of gradient  $> 4$ )更适合本研究, 故采用典型对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)。DCA和CCA分析和排序图输出均采用 Canoco 5 软件, 其余数据分析与作图在 Excel 2010 与 SPSS 软件中完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 种类组成

2017—2019年在长江上游宜宾断面累计采集到鱼卵457粒, 仔鱼313尾, 属于3目5科22种(表1), 其中产漂流性卵鱼类13种。鉴定结果显示, 宜宾江段鱼类早期资源以鲤科(Cyprinidae)鱼为主, 共13种; 其次是鳅科(Cobitidae)鱼类, 4种; 平鳍鳅科(Balitoridae)和鰕虎鱼科(Gobiidae)各2种; 鲮科(Bagridae)最少, 仅1种。长江上游特有鱼类有6种,

分别是张氏鲮 (*Hemiculter tchangi*)、小眼薄鳅 (*Leptobotia microphthalmia*)、异鳔鳅 (*Xenophysogobio boulengeri*)、长鳍吻鲈 (*Rhinogobio ventralis*)、中华金沙鳅 (*Jinshaia sinensis*)、红唇薄鳅 (*Leptobotia rubrilabris*)，以小眼薄鳅数量最多，占特有鱼类总数的 58.33%。相比 2017 年，2018 年调查到的鱼类种类增多，新增了花斑副沙鳅 (*Parabotia fasciata*)、中华沙鳅 (*Botia superciliaris*) 等沙鳅亚科 (Botiinae) 鱼类以及长鳍吻鲈、异鳔鳅、小眼薄鳅、红唇薄鳅等长江上游特有鱼类。采集到鱼卵的种类有吻鲈、花斑副沙鳅、寡鳞飘鱼 (*Pseudolaubuca engraulis*)、小眼薄鳅、犁头鳅 (*Lepturichthys fimbriata*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 等 18 种，其中，吻鲈数量最多，占比 54.80%，其次是花斑副沙鳅，占 11.30%，寡鳞飘鱼 7.06%，红唇薄鳅、长鳍吻鲈、中华沙鳅等种类数量较少。

采集到的仔鱼中鱼丹亚科 (Danioninae) 的宽鳍鱮 (*Zacco platypus*) 数量最多，占仔鱼总数的 25.20%，其次是鲃亚科 (Cultrinae) 的鲮 (*Hemiculter leucisculus*)，占 22.76%。

## 2.2 主要鱼类繁殖的时间分布

对 2017—2019 年调查期间不同鱼类产卵的主要出现时间进行分析，显示不同鱼类繁殖有一定的时间差异，年间也有不同 (图 2)。

2017 年 5 月鱼卵主要采集种类为吻鲈，占当月采集卵数的 75%，其次为寡鳞飘鱼 (*Pseudolaubuca engraulis*)，占 12.5%；6 月仍以吻鲈为主，但占比有所下降，降低至 58.33%，其次为宜昌鳅 (*Xenophysogobio filifer*)，占 16.67%；7 月仅发现铜鱼 (*Coreius heterokon*) 有繁殖活动。

2018 年相较于 2017 年，鱼类种类数增多，且鱼类繁殖时间有所延长，7 月仍有 8 种鱼类繁殖，吻鲈、花斑副沙鳅和犁头鳅在整个调查期间均有繁殖活动。其中吻鲈仍为 5 月主要繁殖种类，但占比增加到 93.39%；6 月花斑副沙鳅成为主要种类，占 41.98%，其次为草鱼，占 12.35%；7 月为小眼薄鳅，占 55.88%。

2019 年调查期间各种鱼类基本集中在 6 月繁殖，仅发现吻鲈和子陵吻鳅虎鱼 (*Rhinogobius giurinus*) 分别在 5 月和 7 月有繁殖活动，6 月主要繁殖种类为寡

表 1 2017—2019 年长江上游宜宾江段鱼类早期资源种类组成

Tab.1 Species composition of early fish resources in Yibin Section of the upper reaches of the Yangtze River from 2017 to 2019

目 Order	科 Family	亚科 Subfamily	种类 Species	鱼卵 Egg	仔鱼 Larva		
鲤形目 Cypriniformes	鳅科 Cobitidae	沙鳅亚科 Botiinae	花斑副沙鳅 <i>Parabotia fasciata</i> ●	+	+		
			小眼薄鳅 <i>Leptobotia microphthalmia</i> ●★	+			
			红唇薄鳅 <i>Leptobotia rubrilabris</i> ●★	+			
			中华沙鳅 <i>Botia superciliaris</i> ●	+			
	鲤科 Cyprinidae	鳅鲃亚科 Gobiobotinae	宜昌鳅 <i>Xenophysogobio filifer</i> ●	+	+		
			异鳔鳅 <i>Xenophysogobio boulengeri</i> ●★	+			
		鲈亚科 Gobioninae	麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>			+	
			铜鱼 <i>Coreius heterokon</i> ●	+			
			长鳍吻鲈 <i>Rhinogobio ventralis</i> ●★	+			
			吻鲈 <i>Rhinogobio typus</i> ●	+	+		
			鲃亚科 Cultrinae	鲮 <i>Hemiculter leucisculus</i>	+	+	
				张氏鲮 <i>Hemiculter tchangi</i> ★	+		
				寡鳞飘鱼 <i>Pseudolaubuca engraulis</i> ●	+		
			雅罗鱼亚科 Leuciscinae	飘鱼 <i>Pseudolaubuca sinensis</i>			+
				鱼丹亚科 Danioninae	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ●	+	
宽鳍鱮 <i>Zacco platypus</i>	+	+					
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>					+		
平鳍鳅科 Balitoridae		中华金沙鳅 <i>Jinshaia sinensis</i> ●★	+				
		犁头鳅 <i>Lepturichthys fimbriata</i> ●	+				
鲇形目 Siluriformes	鲇科 Bagridae		短尾拟鲇 <i>Pseudobagrus brevicaudatus</i>		+		
鲈形目 Perciformes	鳅虎鱼科 Gobiidae		子陵吻鳅虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	+	+		
			波氏吻鳅虎鱼 <i>Rhinogobius cliffordpopei</i>	+	+		

注：● 代表产漂流性卵鱼类，★ 代表长江上游特有鱼类

Note: ● represents drifting fish, and ★ represents endemic fish of upper Yangtze River

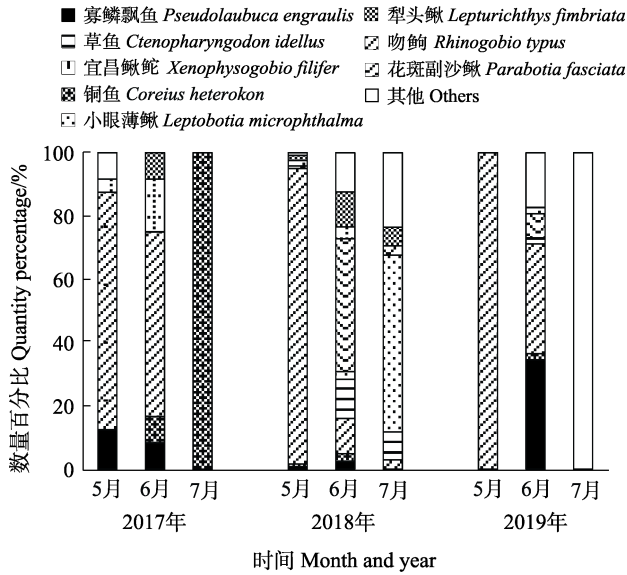


图 2 2017—2019 年长江上游宜宾江段鱼卵数量百分比  
Fig.2 Quantity percentage of fish eggs at Yibin Section of the upper Yangtze River from 2017 to 2019

鳞鲃和吻鲃, 各占 34.62%。整体而言, 宜宾江段鱼类繁殖盛期为 6 月, 吻鲃、花斑副沙鳅和犁头鳅繁殖期相对较长。

### 2.3 繁殖高峰

从卵苗密度的日变化来看(图 3), 鱼卵密度总体上随时间呈现先上升后下降的趋势。2017 年鱼卵平均密度为 $(0.52\pm 0.10)$ 粒/1000 m<sup>3</sup>, 在 5 月 16—24 日、5 月 29 日和 6 月 12 日达到产卵高峰, 其中, 以 6 月 12 日最高, 达到 3.91 粒/1000 m<sup>3</sup>; 仔鱼平均密度为 $(0.96\pm 0.32)$ 尾/1000 m<sup>3</sup>, 在 6 月 24 日出现峰值, 密度为 23.56 尾/1000 m<sup>3</sup>。

2018 年鱼卵平均密度为 $(2.49\pm 0.45)$ 粒/1000 m<sup>3</sup>, 在 5 月 6—11 日、5 月 13—16 日、5 月 22—24 日和 6 月 27—28 日达到产卵高峰, 其中, 以 6 月 27 日最高, 达到 24.96 粒/1000 m<sup>3</sup>; 仔鱼平均密度为 $(1.33\pm 0.37)$ 尾/1000 m<sup>3</sup>, 5 月 22 日出现峰值, 密度为 25.58 尾/1000 m<sup>3</sup>。

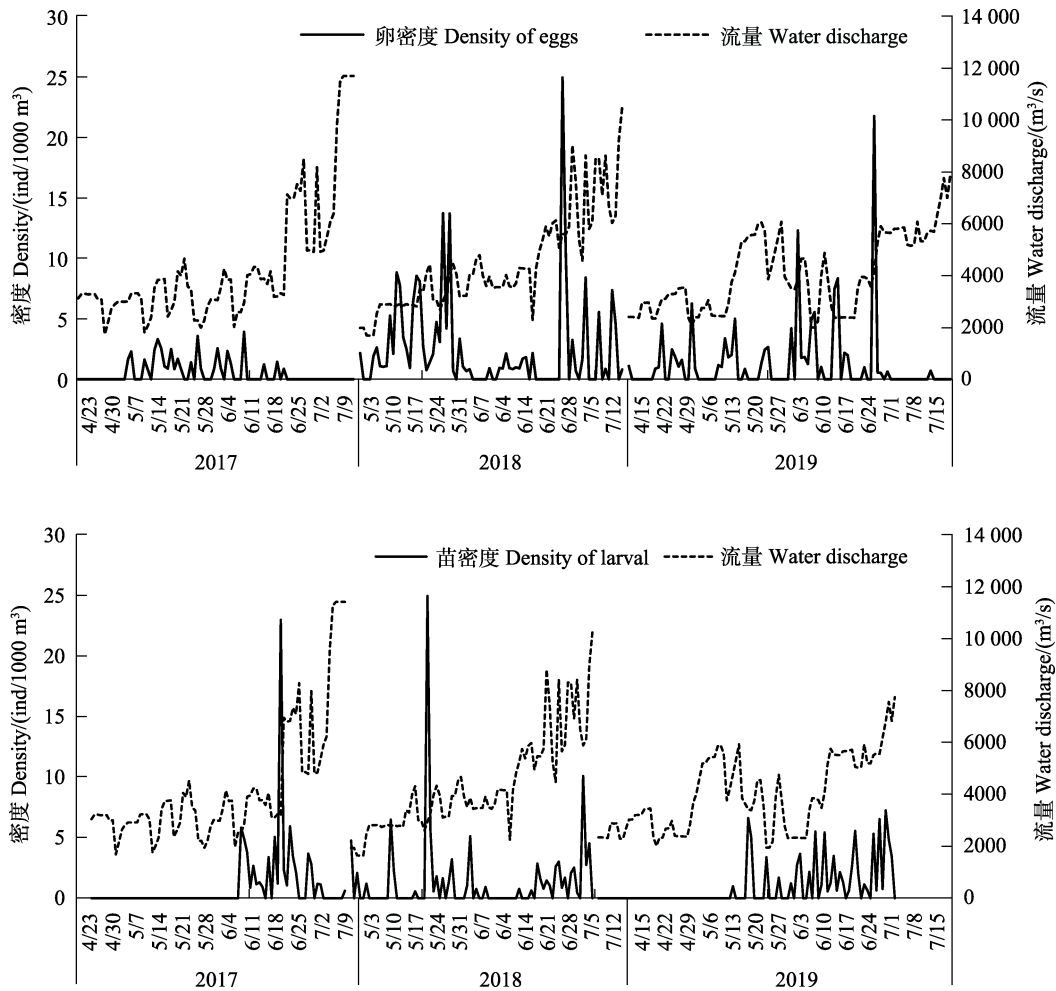


图 3 2017—2019 长江上游宜宾江段鱼卵、鱼苗密度日变化

Fig.3 Diurnal variation of fish eggs and larval density in Yibin Section of upper reaches of Yangtze River from 2017 to 2019

2019年鱼卵平均密度为 $(1.24 \pm 0.30)$ 粒/ $1000 \text{ m}^3$ , 在5月12—15日、6月3日、6月14—15日和6月26达到产卵高峰, 以6月26日最高, 达到21.76粒/ $1000 \text{ m}^3$ ; 仔鱼平均密度为 $(0.95 \pm 0.19)$ 尾/ $1000 \text{ m}^3$ , 在7月17日出现峰值, 密度为7.42尾/ $1000 \text{ m}^3$ 。

年际对比发现, 2018和2019年鱼卵密度显著高于2017年( $P < 0.01$ ), 2018年鱼苗密度高于2017和2019年。整体而言, 鱼卵密度高峰较为分散, 仔鱼密度高峰较为集中, 主要以5月下旬或6月下旬较高。

## 2.4 鱼类早期资源量与产卵场

2017年4—7月估算通过宜宾断面的卵苗径流量为 $43.10 \times 10^6$ 粒(尾), 其中, 鱼卵径流量 $12.10 \times 10^6$ 粒; 2018年4—7月通过宜宾断面的卵苗径流量为 $111.89 \times 10^6$ 粒(尾), 其中, 鱼卵径流量 $70.42 \times 10^6$ 粒; 2019年4—7月通过宜宾断面的卵苗径流量为 $75.20 \times 10^6$ 粒(尾), 其中, 鱼卵径流量 $35.77 \times 10^6$ 粒。调查期间, 长江上游特有鱼类——中华金沙鳅、红唇薄鳅、小眼薄鳅、异鳔鳅、长鳍吻鲈卵径流量分别为 $2.23 \times 10^6$ 、 $0.30 \times 10^6$ 、 $10.72 \times 10^6$ 、 $1.83 \times 10^6$ 、 $0.21 \times 10^6$ 、 $0.63 \times 10^6$ 粒, 累计流经宜宾断面径流量 $15.92 \times 10^6$ 粒, 约占3年产卵总规模的13.45%。

对产漂流性卵鱼类产卵场的位置进行推算, 表明在宜宾江段上游约32 km的范围内, 分布有多种鱼类的产卵场, 采集到的鱼卵发育期介于桑葚期至神经胚期间, 产卵量较大的有周坝、桃子湾和华龙码头3处。其中, 吻鲈产卵场在东岳庙至向家坝坝下均有分布, 产卵场主要集中在桐梓林码头至桃子湾间, 3年累计产卵量最大, 达 $40.93 \times 10^6$ 粒。年际对比发现,

2017—2019年吻鲈产卵场有下移趋势, 其规模和范围在2018年扩大后, 2019年开始缩小。花斑副沙鳅产卵场主要在桃子湾至华龙码头间, 产卵规模达 $7.59 \times 10^6$ 粒。2018年调查发现, 草鱼产卵场主要分布在马铭溪码头和桃子湾, 产卵规模为 $4.39 \times 10^6$ 粒, 2019年仅发现桃子湾有小规模草鱼产卵。中华金沙鳅产卵场集中在桐梓林码头—周坝; 小眼薄鳅产卵场集中在桃子湾至华龙码头间; 宜昌鳅、犁头鳅和铜鱼产卵规模相对较小, 主要分布在周坝—桃子湾。

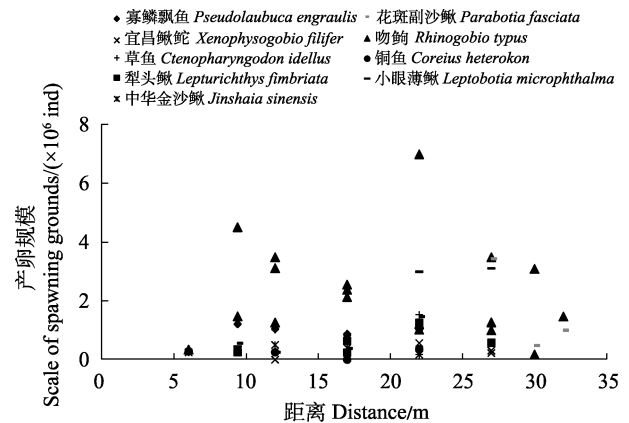


图4 长江上游宜宾段产卵场分布

Fig.4 Distribution of spawning grounds in Yibin Section in the upper Reaches of Yangtze River

## 2.5 鱼卵密度与环境因子

2017—2019年调查期间, 宜宾江段各环境因子整体情况如表2所示, 流量、水位和水温变化规律表现为整体随时间呈逐渐上升趋势, 透明度和溶氧整体随时间呈逐渐下降趋势, 流速随时间不断波动, 无明显

表2 2017—2019年宜宾段环境因子  
Tab.2 Environmental factors in Yibin Section from 2017 to 2019

因子 Factors	2017		2018		2019	
	范围 Range	均值 Mean	范围 Range	均值 Mean	范围 Range	均值 Mean
流速 Velocity /(m/s)	0.74~1.71	1.06±0.03	0.47~1.36	0.96±0.02	0.46~1.59	0.89±0.02
流量 Water discharge /(m <sup>3</sup> /s)	1730~11 700	4394.88±277.56	1925~10 300	4069.69±215.69	1995~6340	4114.13±151.72
水位 Water level /m	266.34~275.04	269.26±0.25	266.09~275.60	269.44±0.24	266.50~271.06	268.81±0.16
水温 Water temperature /°C	16.60~22.05	19.70±0.18	17.10~22.60	20.01±0.20	16.2~22.95	19.95±0.22
透明度 Transparency /m	3~70	42.84±2.46	5~135	83.48±3.60	57.5~189.5	136.67±3.26
溶解氧 Dissolved oxygen /(mg/L)	7.37~9.32	8.59±0.05	8.03~10.04	8.84±0.07	7.67~9.73	8.57±0.06

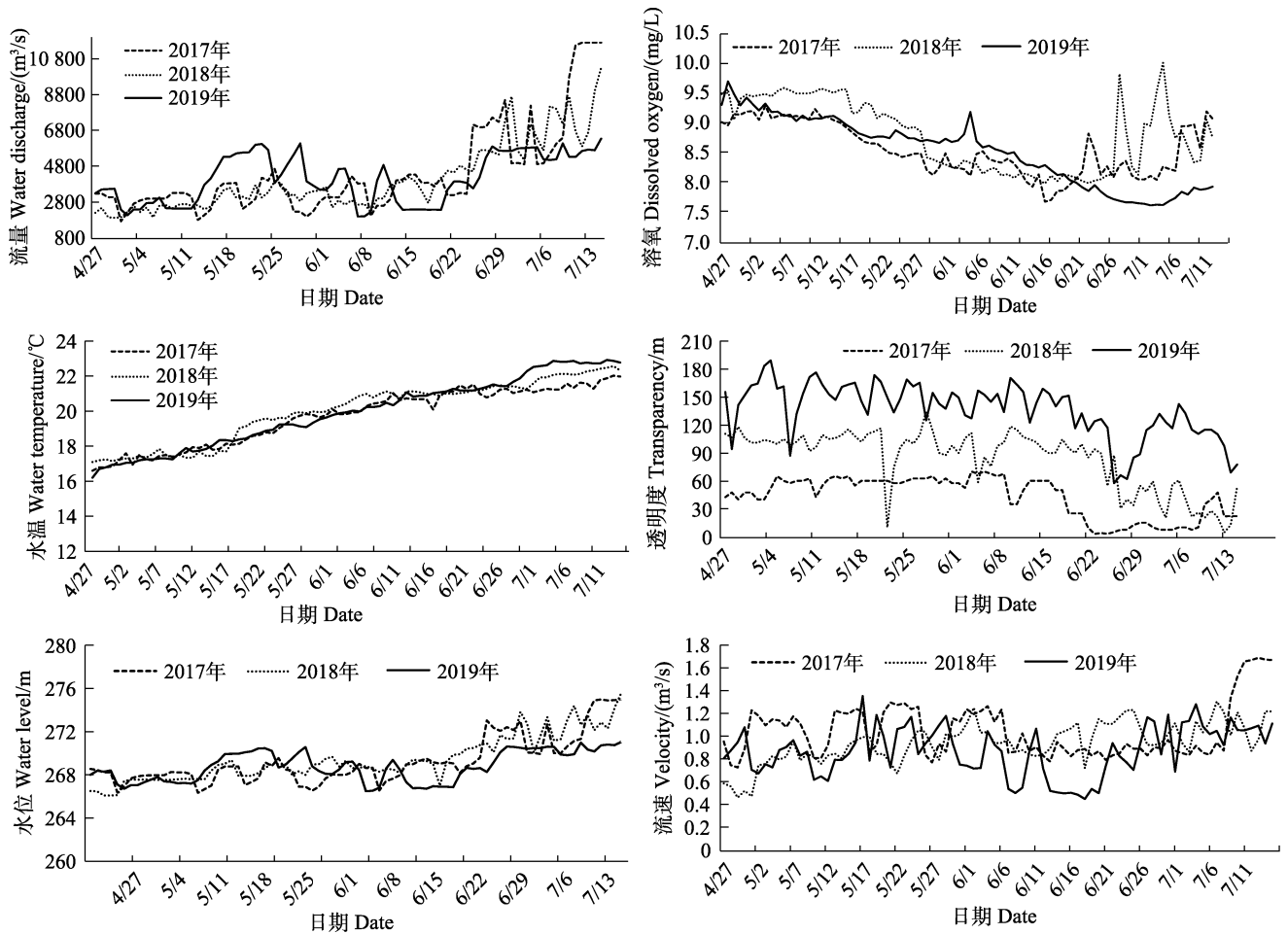


图 5 2017—2019 年长江上游宜宾江段各环境因子日变化

Fig.5 Diurnal variation of environmental factors in Yibin Section of the upper Reaches of the Yangtze River from 2017 to 2019

显规律(图 5)。比较不同年份、同时段各环境因子间的差异, 结果表明, 流量、水位和水温年间无显著差异, 其他环境因子不同年份间差异显著( $P < 0.05$ )。

对宜宾断面产漂流性卵鱼类每日鱼卵密度与环境因子的关系进行 CCA 分析, 结果表明, 水位(WL)、水温(WT)、溶氧(DO)、流量(WD)、流速( $V$ )和透明度( $T$ )等对鱼卵漂流密度有不同程度的影响, 其中, 受水位影响较大(图 7)。流量与溶氧、透明度呈负相关, 水温与水位、流量的变化呈正相关。犁头鳅和花斑副沙鳅繁殖条件相似, 在水温和流量较高时产卵, 宜昌鳅鲃产卵也受温度的影响; 草鱼和小眼薄鳅繁殖条件相近, 与水位、流量和流速相关性较高; 吻鮰和铜鱼产卵受溶解氧和透明度变化的影响较大。

### 3 讨论

#### 3.1 种类组成及资源量变化

研究表明, 由于水利工程建设、过度捕捞等的影响, 宜宾江段鱼类种类数呈下降趋势, 并逐渐以小型

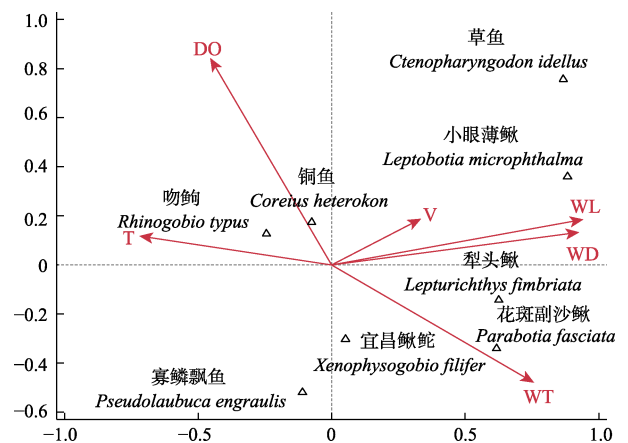


图 6 2017—2019 年长江上游宜宾江段鱼卵密度与环境因子的 CCA 排序

Fig.6 The relationship between density of eggs and environmental factors in Yibin Section of the upper Yangtze River from 2017 to 2019

WL: 水位; WT: 水温; DO: 溶解氧;

WD: 流量;  $V$ : 流速;  $T$ : 透明度

WL: Water level; WT: Water temperature; DO: Dissolved oxygen; WD: Water discharge;  $V$ : Velocity;  $T$ : Transparency

鱼类为主,产漂流性卵鱼类也有所减少(但胜国等,1999;李雷等,2013;徐薇等,2012;高天珩等,2013)本研究结果也符合这一趋势变化。而水利工程对鱼类的影响已有大量研究,水坝的修筑会影响下游鱼类繁殖(肖琼,2015),例如,向家坝截流后长江上游江津江段鱼类早期资源量明显下降(高天珩,2016)。本研究表明,有22种鱼类能在宜宾江段产卵繁殖,多于上游金沙江巧家和攀枝花江段,但少于江津江段及长江上游支流赤水河和岷江,也少于长江中游(表3),其次,产漂流性卵鱼类数远少于长江上游历史记载的29种,对比显示,长江上游随河段往下,鱼类早期资源种类数逐渐增多,其原因除了上述因素外,与各江段自身水体环境也有一定关系。

历史记载的圆口铜鱼和长薄鳅卵苗本次调查未出现,但同期宜宾上游巧家与攀枝花江段调查发现过(周湖海等,2019;王导群等,2019),这可能是由于金沙江下游水利工程的修建阻隔了金沙江与长江上游之间的洄游通道,同时该江段水文条件不能满足其繁殖需求,这与江津断面2011—2015年监测结果一致(高天珩,2016)。其次,宜宾江段产漂流性卵鱼类较相邻的长江支流岷江、长江干流江津段少,较长江支流赤水江段、金沙江巧家与攀枝花江段多(表3),说明产漂流性卵鱼类更喜较大的流水环境,这与吕浩等(2019)的结论一致。此次调查发现,四大家鱼中的草鱼在坝下有繁殖活动,表明坝下水文条件在一定程度上可以满足草鱼的繁殖需求。本次调查的卵苗组成以吻鲈、中华沙鳅等广布型种和花斑副沙鳅、寡鳞飘鱼、宜昌鳅鲇等小型鱼类居多,表明宜宾江段当前生境条件能够满足这些种类的栖息生存和产卵繁殖活动,成为该江段鱼类早期资源的重要补充种类,这与其他水利工程建成之后情况类似(雷欢等,2018)。

根据2017—2019年早期资源量估算数据,结合有关研究数据[长江上游珍稀特有鱼类及保护区生态

补偿项目-水生生态环境监测(2006—2021年度)报告,未正式发表],10年来宜宾鱼类早期资源发生了较大变化(图8)。金沙江I期工程蓄水前后,鱼类卵苗总量有明显下降,蓄水后(2013年)比蓄水前(2010年)的鱼类早期资源量下降了80.61%,大坝蓄水造成下游水文环境急剧突变,导致坝下一些鱼类无法适应新的生境,原有产卵场失去功能,自然繁殖受到了影响。同时,蓄水阻断了金沙江与长江上游干流江段的鱼类洄游通道,使长江上游江段渔业资源失去了金沙江鱼类早期资源的补充,这与三峡大坝蓄水后鱼类卵苗数量显著下降的情况相似(刘明典等,2018)。随后直至2017年,卵苗总量逐渐回升,表明向家坝等水电站蓄水后鱼类逐步完成了对环境的适应,该江段能够满足部分鱼类产卵繁殖的生态需求,可能与该江段仍保留的部分流水生境有关,同时也与近年来长江上游开展的多项鱼类资源保护措施有关。

### 3.2 产卵场分布

产卵场是鱼类重要的栖息地,产卵场位置的确定是鱼类繁殖群体和卵苗时空分布研究的重要内容,对鱼类资源的补充、可持续利用及保护也有着重要作用(高天珩,2016)。2009—2015年江津断面早期资源监测结果显示,宜宾至重庆江段分布着多种鱼类的产卵场,且产卵规模巨大(段辛斌等,2015;田辉伍等,2017)。历史记录显示,宜宾境内共有鱼类产卵场36处,珍稀特有鱼类的种类达数10种,但近期产卵场功能评价表明,一般和良好(8.33%)等级共占总数的33.33%,大部分产卵场功能退化,甚至消失(孟宝等,2019)。本次调查结果显示,宜宾断面上游存在多种产漂流性卵鱼类产卵场,产卵量较大的产卵场有周坝、桃子湾和华龙码头3处,较历史产卵场数量和规模均有减小。

1984—1986年吴国犀等(1988)在宜宾和屏山进

表3 近年长江干支流部分鱼类早期资源调查对比

Tab.3 Comparison of early fish resources in the main and tributaries of the Yangtze River in recent surveys

地点 Site	总种类 Total species	产漂流性卵鱼类 Drifting fish	长江上游特有鱼类 Endemic fish of upper Yangtze River	调查时间 Survey time	数据来源 Data source
赤水河 Chishui River	27	9	5	2015—2016	刘飞等(2019)
岷江 Minjiang River	28	18	8	2016—2017	吕浩等(2019)
巧家 Qiaojia Section	14	12	7	2016—2018	周湖海等(2019)
攀枝花 Panzhihua Section	7	7	5	2016—2018	王导群等(2019)
江津 Jiangjin Section	38	29	12	2011—2015	高天珩(2016)
宜昌 Yichang Section	27	22	—	2014—2015	刘明典等(2018)
宜宾 Yibin Section	22	13	6	本次	This study

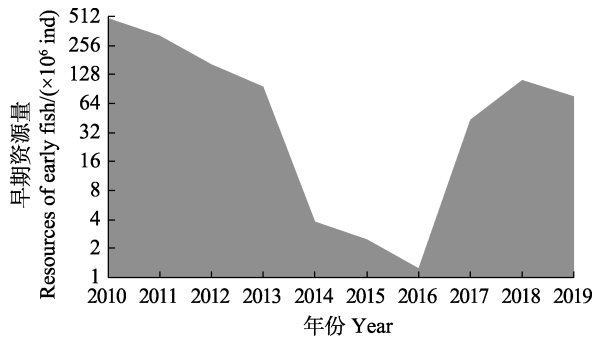


图 7 宜宾段早期资源规模对比

Fig.7 Comparison of propagation scale of early resources in Yibin Section

行的早期资源调查表明,草鱼产卵场分布在金沙江下游美结河口附近至宜宾县柏溪镇的 200 多 km 江段,其中,规模较大的产卵场为新市镇、绥江、屏山和安边 4 处。本次调查发现,草鱼产卵场主要分布在马铭溪码头和桃子湾,与历史数据对比发现,向家坝坝下草鱼产卵场位置有所下移;吻鲟在宜宾以上江段产卵场分布范围较广,从东岳庙至向家坝坝下均有分布,2017—2019 年调查显示,吻鲟产卵场有下移趋势,上述产卵场位置的改变可能是由于向家坝坝下水文环境的变化使原产卵场生境发生改变,致使鱼类向下迁移产卵场。

### 3.3 繁殖特性

2017—2019 年调查期间,共出现 11 次产卵高峰,大多出现在洪峰期间或洪峰后 1~2 d,整体表明洪峰与鱼类繁殖有密切关系。鱼类早期资源的时间动态是其繁殖时间的直接反映,对渔业资源的管理和保护具有重要意义(Doyle *et al.*, 1992; King *et al.*, 1995; Pavlov *et al.*, 1994)。调查期间,宜宾江段 4 月底便有鱼类开始繁殖,6 月进入鱼类繁殖盛期,江水平均水温为 20.64℃,多种鱼类加入繁殖,吻鲟、花斑副沙鳅和犁头鳅繁殖期相对较长,这对该江段渔业资源保护与管理有一定指导意义。

金沙江梯级水电站相继蓄水后,坝下水文环境发生改变,宜宾距离大坝较近,流量和透明度所受影响较大,鱼类产卵活动通常伴随水位或流量的上涨而发生,小眼薄鳅和草鱼与水位和流量存在一定相关性,流量上涨会刺激其产卵。CCA 分析结果显示,铜鱼产卵受透明度影响较大,这与姜伟(2009)的结论一致,其原因是透明度能间接反映江水流量的变化,流量上涨,透明度下降,提高了铜鱼产卵的可能性,同时能更好躲避敌害。一般认为,水温是鱼类繁殖的限制条件,例如,草鱼需要水温达到 18℃ 以上时才开始产

卵(申玉春, 2008)。本次调查,宜昌鳅鲃、犁头鳅、花斑副沙鳅等产卵与水温变化有一定关系,其他鱼类繁殖与水温相关性不显著,因每年 5 月 15 日后,宜宾江段水温已达到 18℃ 以上,能满足多数鱼类繁殖需求。

## 4 结论与展望

溪洛渡、向家坝等水电站蓄水后,生境阻隔和水文情势等发生改变,长江上游宜宾江段鱼类早期资源种类数有所减少,产卵量也大幅降低;但随着鱼类逐步适应了环境,宜宾江段保留的流水生境能够满足部分鱼类栖息和产卵繁殖所需的水文条件,其中以小型鱼类和广布种鱼类为主,并保留了部分原有产卵场或迁移形成新的产卵场,使得该江段有一定规模的繁殖群体,再加上诸如生态调度等多项鱼类资源保护措施地开展,近几年鱼类资源量呈上升趋势缓慢恢复。关于鱼类繁殖时期,吻鲟在该江段 4 月底至整个 5 月都占据绝对优势,大多数鱼类在 5 月下旬乃至 6 月初才陆续开始产卵而开始进入繁殖盛期,这对该江段保护和相关研究有一定指导意义。水位、流量和水位等环境因子对不同鱼类产卵的影响程度不同,水位流量的上涨、水温的升高和洪峰的产生通常能刺激鱼类产卵,但环境因子的变化具体如何影响鱼类的繁殖还需要开展持续的研究进一步探讨。

**致谢:**感谢长江水产研究所研究生吕浩、王导群、张浩,调查辅助人员田超,宜宾市水产渔政局陈永胜等在野外调查和数据整理等方面给予的支持与帮助。

## 参 考 文 献

- CAO W X, CHANG J B, QIAO Y, *et al.* Fish resources of early life history stages in Yangtze River. Beijing: China Water and Power Press, 2007, 41–252 [曹文宣, 常剑波, 乔晔, 等. 长江鱼类早期资源. 北京: 中国水利水电出版社, 2007, 41–252]
- CAO W X. Water ecological protection in the cascade development of hydropower in the upper reaches of the Yangtze River. *Technology and Economy of Changjiang*, 2017, 1(1): 25–30 [曹文宣. 长江上游水电梯级开发的水域生态保护问题. *长江技术经济*, 2017, 1(1): 25–30]
- CHAMBERS R C, TRIPPEL E. Early life history and recruitment in fish populations. Amsterdam: Springer Science and Business Media, 2012, 173–196
- CHEN D Q, CHANG J B, GU H B. Impacts of Jinsha River first stage project on ecology and environment of nature reserve and its countermeasures. *Journal of Yangtze River Scientific Research Institute*, 2005(2): 21–24 [陈大庆, 常剑波, 顾洪



- 宾. 金沙江一期工程对保护区生态环境的影响与对策. 长江科学院院报, 2005(2): 21–24]
- CHEN D Q. Guidelines for river aquatic biology survey. Beijing: Science Press, 2014, 214–236 [陈大庆. 河流水生生物调查指南. 北京: 科学出版社, 2014, 214–236]
- DAN S G, ZHANG G H, MIAO Z G, *et al.* A survey on the commercial net fishery in the upper reaches of the Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 655–661 [但胜国, 张国华, 苗志国, 等. 长江上游三层流刺网渔业现状的调查. 水生生物学报, 1999, 23(6): 655–661]
- DOYLE M J, MORSE W W, KENDALL J A W. A comparison of larval fish assemblages in the temperate zone of the northeast Pacific and northwest Atlantic oceans. *Bulletin of Marine science*, 1992, 53(2): 588–644
- DUAN X B, TIAN H W, GAO T H, *et al.* Resources status of ichthyoplankton in the upper Yangtze River before the storage of Jinsha River first stage project. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2015, 24(8): 1358–1365 [段辛斌, 田辉伍, 高天珩, 等. 金沙江一期工程蓄水前长江上游产漂流性卵鱼类产卵场现状. 长江流域资源与环境, 2015, 24(8): 1358–1365]
- GAO T H, TIAN H W, YE C, *et al.* Diversity and composition of fish in the mainstream of national nature reserve of rare and endemic fish in the upper Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(2): 36–42 [高天珩, 田辉伍, 叶超, 等. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区干流段鱼类组成及其多样性. 淡水渔业, 2013, 43(2): 36–42]
- GAO T H. Studies on Gobioninae fish resources and habitat selections in the upper Yangtze River. Doctoral Dissertation of Southwest University, 2016, 1–57 [高天珩. 长江上游鮡亚科鱼类资源及生境选择策略研究. 西南大学博士研究生学位论文, 2016, 1–57]
- HE Y, WANG J, LEK A S, *et al.* Predicting assemblages and species richness of endemic fish in the upper Yangtze River. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(19): 4211–4220
- JIANG W. Studies on Fish early resources in the main stream of state-level natural protection area for rare and endemic fishes in the upper Yangtze River. Doctoral Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2009 [姜伟. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区干流江段鱼类早期资源研究. 中国科学院水生生物研究所博士研究生学位论文, 2009]
- KING M. Fisheries biology, assessment and management. Oxford: Fishing News Books, 1995, 247–248
- LEI H, XIE W X, HUANG D M, *et al.* The early evolution of the fish with pelagic eggs resources in the upstream of Danjiangkou Reservoir after the cascade development. *Journal of Lake Sciences*, 2018, 30(5): 1319–1331 [雷欢, 谢文星, 黄道明, 等. 丹江口水库上游梯级开发后产漂流性卵鱼类早期资源及其演变. 湖泊科学, 2018, 30(5): 1319–1331]
- LI D W, LI H Q, LEI X Q, *et al.* Ecological sensitivity in the upper Changjiang River with GIS technology and hierarchy analysis method. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2013, 22(5): 633–639 [李德旺, 李红清, 雷晓琴, 等. 基于 GIS 技术及层次分析法的长江上游生态敏感性研究. 长江流域资源与环境, 2013, 22(5): 633–639]
- LI L, WEI Q W, WU J M, *et al.* Current status of fish assemblages in Yibin reaches of the Yangtze River. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2013, 22(11): 1449–1457 [李雷, 危起伟, 吴金明, 等. 长江宜宾江段渔业资源现状调查. 长江流域资源与环境, 2013, 22(11): 1449–1457]
- LIU F, ZHANG F B, WANG X, *et al.* Relationships between reproduction activities of fishes with drifting eggs and environmental factors in the Chishui River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(S1): 77–83 [刘飞, 张富斌, 王雪, 等. 赤水河产漂流性卵鱼类的繁殖活动及其与环境因子之间的关系. 水生生物学报, 2019, 43(S1): 77–83]
- LIU M D, GAO L, TIAN H W, *et al.* Status of fishes at the early life history stage in the Yichang Section in the middle reaches of the Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 147–158 [刘明典, 高雷, 田辉伍, 等. 长江中游宜昌江段鱼类早期资源现状. 中国水产科学, 2018, 25(1): 147–158]
- LIU M D, WANG D Q, GAO L, *et al.* Species diversity of drifting fish eggs in the Yangtze River using molecular identification. *PeerJ*, 2018, 6: e5807
- LÜ H, TIAN H W, SHEN S W, *et al.* The larval resources of fishes spawning drifting eggs in the lower reaches of the Minjiang River. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2019, 28(3): 586–593 [吕浩, 田辉伍, 申绍祎, 等. 岷江下游产漂流性卵鱼类早期资源现状. 长江流域资源与环境, 2019, 28(3): 586–593]
- MENG B, ZHANG J F, YE H, *et al.* Current situation and protection enlightenment of the function of fishing spawning grounds in the national nature reserve for the rare and endemic fishes, upper reaches of the Yangtze River. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2019, 28(11): 2772–2785 [孟宝, 张继飞, 叶华, 等. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区鱼类产卵场功能现状分析及保护启示. 长江流域资源与环境, 2019, 28(11): 2772–2785]
- PAVLOV D S. The downstream migration of young fishes in rivers: Mechanisms and distribution. *Folia Zoologica*, 1994, 43(3): 193–208
- SHEN Y C. Culture and enhancement of fish. Beijing: Agriculture Press of China, 2008 [申玉春. 鱼类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 2008]
- TIAN H W, WANG H, GAO T H, *et al.* Early resources of *Gobiobotia filifer* and its relationship with environmental factors in the upper Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(2): 71–78 [田辉伍, 王涵, 高天珩, 等. 长江上游

- 宜昌鳅鲇早期资源特征及影响因子分析. 淡水渔业, 2017, 47(2): 71-78]
- WANG D Q, TIAN H W, TANG X L, *et al.* Early fish resources of drifting egg fish in Panzhihua Section of Jinsha River. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(6): 41-47 [王导群, 田辉伍, 唐锡良, 等. 金沙江攀枝花江段产漂流性卵鱼类早期资源现状. 淡水渔业, 2019, 49(6): 41-47]
- WEI Q W. Scientific investigation report on the national nature reserve for the rare and endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River. Beijing: Science Press, 2012, 3-251 [危起伟. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区科学考察报告. 北京: 科学出版社, 2012, 3-251]
- WU G X, LIU L H, WANG Z L, *et al.* Studies on natural reproduction of *Ctenopharyngodon idellus* in the Jinsha Section of the upper Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 1988(1): 3-6 [吴国犀, 刘乐和, 王志玲, 等. 长江上游金沙江江段草鱼自然繁殖的研究. 淡水渔业, 1988(1): 3-6]
- XIAO Q. The effect of water conservancy project in the downstream of Jinsha River of the change of Cobitidae. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2015, 13-16 [肖琼. 金沙江下游水利工程对鳅科鱼类的变动影响. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2015, 13-16]
- XU T Z, LI X H, LI Y F, *et al.* Status of early resources in Yujiang Jinling River Section. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(2): 19-25 [徐田振, 李新辉, 李跃飞, 等. 郁江中游金陵江段鱼类早期资源现状. 南方水产科学, 2018, 14(2): 19-25]
- XU W, QIAO Y, GONG Y T. Changes of fish resources in upper Yangtze River and its protection. *Yangtze River*, 2012, 43(1): 67-71 [徐薇, 乔晔, 龚昱田. 长江上游鱼类资源变迁及其保护评析. 人民长江, 2012, 43(1): 67-71]
- YI B L, YU Z T, LIANG Z S, *et al.* The distribution, natural conditions and breeding production of the spawning grounds of four famous freshwater fishes on the main stream on the Yangtze River. In: YI B L, YU Z T, LIANG Z S, *et al.* Gezhouba water control project and our famous fishes in Yangtze River. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1988, 1-46 [易伯鲁, 余志堂, 梁秩桑, 等. 长江干流草、青、鲢、鳙四大家鱼产卵场的分布、规模和自然条件. 见: 易伯鲁, 余志堂, 梁秩桑, 等. 葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1988, 1-46]
- ZHANG J M, HE Z H. Handbook of fisheries natural resources investigation in inland waters. Beijing: Agriculture Press of China, 1991, 1-461 [张觉民, 何志辉. 内陆水域渔业自然资源调查手册. 北京: 中国农业出版社, 1991, 1-461]
- ZHOU H H, TIAN H W, HE C. Surveys for resources of drifting eggs fish at early life history stages in the Qiaojia Section in the lower reaches of the Jinsha River. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2019, 28(12): 2910-2920 [周湖海, 田辉伍, 何春, 等. 金沙江下游巧家江段产漂流性卵鱼类早期资源研究. 长江流域资源与环境, 2019, 28(12): 2910-2920]

(编辑 冯小花)

## Study on the Status of the Early-Stage Fish Resources at Yibin Section in the Upper Reaches of the Yangtze River

LI Xiangyan<sup>1,2</sup>, TIAN Huiwu<sup>2</sup>, PU Yan<sup>1,2</sup>, TANG Xiliang<sup>3</sup>, YAN Zhongluan<sup>3</sup>, CHEN Daqing<sup>2</sup>,  
LIU Shaoping<sup>2</sup>, DUAN Xinbin<sup>2①</sup>

(1. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of the Upper-Middle Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Wuhan, Hubei 430223, China;  
3. Three Gorges Construction Management Co., Ltd, Chengdu, Sichuan 610023, China)

**Abstract** To understand the status of early-stage fish resources in the Yibin Section in the upper reaches of the Yangtze River and guide the protection of fish resources in this section, surveys were carried out from April to July in the years of 2017~2019. The results showed that there were 22 species of eggs and larvae in five families and three orders, and the largest proportion was in the Cyprinidae. Among these, 13 species produced drifting eggs, and six species were endemic to the upper reaches of the Yangtze River. The breeding time of different fish had obvious annual differences, but the peak of fish breeding occurred in June. From 2017 to 2019, the number of drifting eggs was estimated to be  $12.10 \times 10^6$ ,  $70.42 \times 10^6$ , and  $35.77 \times 10^6$  for each year, respectively. The number of larvae was estimated to be  $30.95 \times 10^6$ ,  $41.47 \times 10^6$ , and  $39.44 \times 10^6$ , respectively. The number of eggs of endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River was estimated at  $15.91 \times 10^6$  over three years. According to the calculation, there were many spawning sites of fish drifting upstream of the Yibin Section, and the larger spawning sites were mainly located in the reaches of Zhouba, Peachwan, and Hualong Wharf. The spawning sites of *Rhinogobio typus* were distributed from Dongyuemiao to Xiangjiaba, with the largest cumulative spawning amount in three years, up to  $40.93 \times 10^6$ . The spawning grounds of *R. typus* tended to migrate downstream. The spawning grounds of *Ctenopharyngodon idellus* are mainly distributed in the Mamingxi Wharf and Peachwan areas. The results of the canonical correlation analysis showed that environmental factors such as water level, water temperature, and water discharge had different effects on the density of drifting fish eggs. *Lepturichthys fimbriata* and *Parabotia fasciata* lay eggs when the water temperature and water discharge are high. The reproductive conditions of *C. idellus* and *Leptobotia microphthalmia* were similar to each other, and they were highly correlated with the water level, water discharge, and velocity. The spawning of *R. typus* and *Coreius heterokon* was significantly affected by changes in dissolved oxygen and transparency. Although affected by many factors, such as the development of cascade hydropower in the Jinsha River, the Yibin Section, as an important part of the mainstream national nature reserve of rare and endemic fish in the upper Yangtze River, is still a crucial distribution area for the spawning and breeding of many fish species, and the fish populations have slowly recovered in recent years. Therefore, we should strengthen the early resource research in this section, carry out habitat conservation and remediation, and implement a “10-year Fishing Ban” to promote resource recovery.

**Key words** Upper Yangtze River; Yibin Section; Species composition; Fish resource

① Corresponding author: DUAN Xinbin, E-mail: duan@yfi.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210315002

http://www.yykxjz.cn/

欧利国, 顾心雨, 王冰妍, 刘必林. 6 种大型海洋掠食性鱼类胃含物角质颚分类研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 105–115  
OU L G, GU X Y, WANG B Y, LIU B L. Systematic classification of Cephalopod beaks from stomach contents of six large marine predatory fishes. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 105–115

## 6 种大型海洋掠食性鱼类胃含物角质颚分类研究\*

欧利国<sup>1</sup> 顾心雨<sup>1</sup> 王冰妍<sup>2</sup> 刘必林<sup>1,3①</sup>

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

**摘要** 为了研究大型海洋掠食性鱼类胃含物中角质颚的分类效果, 于 2017 年 10 月, 2018 年 3、5 和 11 月, 收集了南大西洋、中东太平洋和西印度洋海域的大型海洋掠食性鱼类的 36 个胃并分析其残留角质颚的形态。对采集的角质颚形态侧视图和顶视图进行种类鉴定, 建立检索表, 提取椭圆傅里叶描述子(EFDs)系数进行聚类分析。结果显示, 通过对胃含物角质颚形态进行种类鉴定, 共发现头足类 2 目 10 科 17 种。根据角质颚形态分类检索分析, 17 种头足类角质颚形态种间差异明显。枪形目(Teuthoidea)的 13 种头足类角质颚喙部形态分别为三角形和等腰三角形, 侧壁为近似菱形, 翼部发达; 八腕目(Octopoda)的 4 种头足类角质颚有喙部发育, 侧壁近似长四边形, 有翼部发育。角质颚形态信息聚类分析在目级别区分效果显著。通过对胃含物角质颚形态进行分类研究, 不仅可佐证胃含物头足类的识别, 而且丰富了胃含物头足类的鉴定内容, 也为大型海洋掠食性鱼类胃含物头足类分类鉴定体系奠定基础。

**关键词** 头足类; 角质颚下颚; 大型海洋掠食性鱼类; 胃含物; 分类检索; 聚类分析  
**中图分类号** Q958.8; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0105-11

角质颚为几丁质组织, 由上颚(upper beak)和下颚(lower beak)组成(刘必林等, 2009)。角质颚是头足类的摄食器官, 是头足类存储生活信息的重要硬组织(刘必林等, 2009), 具有稳定的结构和抗腐蚀性强等特性(Clarke, 1962), 因此, 角质颚具有十分广泛的研究意义和应用价值。角质颚主要应用在头足类的年龄与生长(刘必林等, 2010、2014)、栖息环境重建(刘必林等, 2018)、色素沉着变化(林静远等, 2020a)和机械强

度(林静远等, 2020b)等研究。此外, 角质颚还因其形态具有类似鱼类耳石形态的特异性(欧利国等, 2019a、2020), 在种类鉴定方面得到了很好的应用, 如基于传统形态测量法对 5 种近海头足类角质颚进行识别研究, 其判别分析效果显著(刘必林等, 2015); 运用不同的形态学研究方法对 2 种大洋性柔鱼(*Ommastrephes bartramii*)角质颚进行识别比较(苏杭等, 2016)。而在不同的头足类群体识别应用方面, 利

\* 国家重点研发计划(2019YFD0901404)、国家自然科学基金面上项目(NSFC41876141)、上海市“浦江人才”计划项目(18PJ1404100)、上海市高校特聘教授“东方学者”岗位计划项目(0810000243)和上海市科技创新行动计划(10DZ1207500)共同资助 [This work was supported of National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901404), National Nature Science Foundation of China (NSFC 41876141), Shanghai Pujiang Program under Contract (18PJ1404100), Program for Professor of Special Appointment (Eastern Scholar) at Shanghai Institutions of Higher Learning under Contract (0810000243), and Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (10DZ1207500). 欧利国, E-mail: 919989412@qq.com

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

收稿日期: 2021-03-15, 收修改稿日期: 2021-06-11

用角质颚和耳石对阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)的 2 个群体进行了分析,在群体划分过程中,部分形态指标存在差异(方舟等, 2012); 在不同海域短蛸(*Amphioctopus fangsiao*)的角质颚形态研究分析中,不同的摄食和栖息环境下,短蛸角质颚形态存在较大差异(方舟等, 2018)。

头足类是鲸鱼(Clarke, 1998)、海豚(Cremer *et al.*, 2012)和鲨鱼(Smale *et al.*, 1998)等大型海洋掠食者的主要食物来源之一,因此,头足类生物是海洋食物链的重要组成部分,在大型海洋掠食者的胃含物研究中具有十分重要的意义。而在这些大型海洋掠食者的胃含物分析过程中,由于角质颚具有不易被消化和形态特异性的特点,使头足类角质颚成为胃含物研究的一个重要标志。科研人员通过鉴定角质颚形态,对其掠食者进行胃含物分析,如通过分析抹香鲸(*Physeter macrocephalus*)胃含物组成时发现,头足类残留以及角质颚较多,Evans 等(2004)研究表明,澳大利亚南部的抹香鲸主要以海洋头足类生物为食。在国内头足类角质颚应用于种类鉴定和种群识别研究较多,而在大型海洋掠食性鱼类胃含物角质颚分类应用研究中却未见报道。因此,本研究以白色四鳍旗鱼

(*Tetrapturus albidus*)、大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)、剑鱼(*Xiphias gladius*)、沙氏刺鲛(*Acanthocybium solandri*)、小吻四鳍旗鱼(*Tetrapturus angustirostris*)共 6 种大型海洋掠食性鱼类的胃含物角质颚为实例,基于角质颚形态特异性识别其胃含物中头足类种类,建立角质颚形态分类检索,并对鉴定的角质颚进行科级别的聚类分析,旨在为大型海洋掠食性鱼类胃含物研究提供基础资料 and 为完善胃含物头足类分类鉴定体系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究采集了 6 种共 36 尾大型海洋掠食性鱼类,分别是白色四鳍旗鱼、大眼金枪鱼、黄鳍金枪鱼、剑鱼、沙氏刺鲛、小吻四鳍旗鱼。样品在甲板上鉴定鱼种后,测量叉长(fork length, FL)精确到 1 cm。将胃样品运回实验室解冻后进行分析,并采集角质颚样品。将采集的角质颚清洗后,放入盛有 75%乙醇的瓶中保存。获得角质颚上颚 71 个、下颚 82 个(表 1)。

表 1 大型海洋掠食性鱼类采样信息  
Tab.1 The sampling information of large marine predatory fishes

种类 Species	采样海域 Sampling location	采样日期 Sampling date	叉长范围 Fork length /cm	鱼胃样品数 Sample number of fish stomach	上颚样品数 Sample number of upper beak	下颚样品数 Sample number of lower beak
白色四鳍旗鱼 <i>T. albidus</i>	07°44'S, 19°19'W	2017-10 October 2017	163~163	1	6	8
大眼金枪鱼 <i>T. obesus</i>	10°15'~30°22'S 114°29'~117°33'W	2018-03; 2018-04 March and April 2018	86~162	9	18	27
大眼金枪鱼 <i>T. obesus</i>	00°09'~10°14'N 00°09'~08°29'S 45°48'~68°44'E	2018-05; 2018-11 May and November 2018	151~190	7	13	14
黄鳍金枪鱼 <i>T. albacares</i>	10°15'~30°22'S 114°29'~117°33'W	2018-03 March 2018	88~112	7	16	8
黄鳍金枪鱼 <i>T. albacares</i>	00°09'~10°14'N 00°09'~08°29'S 45°48'~68°44'E	2018-05; 2018-11 May and November 2018	131~135	2	4	4
剑鱼 <i>X. gladius</i>	00°09'~10°14'N 00°09'~08°29'S 45°48'~68°44'E	2018-05; 2018-11 May and November 2018	121~184	3	7	10
沙氏刺鲛 <i>A. solandri</i>	10°15'~30°22'S 114°29'~117°33'W	2018-03; 2018-04 March and April 2018	120~154	6	6	9
小吻四鳍旗鱼 <i>T. angustirostris</i>	10°15'~30°22'S 114°29'~117°33'W	2018-03 March 2018	148~148	1	1	2

## 1.2 角质颚形态分析

**1.2.1 形态信息和分类检索** 角质颚下颚共82个, 使用Olympus SZX16显微镜(日本)对较小的角质颚下颚进行拍摄, 同时, 使用佳能EOS 6D Mark II单反照相机(日本)对较大的角质颚进行拍照, 分别采集角质颚下颚侧视图和顶视图二维数字图像。角质颚种类鉴定参考Xavier等(2009)、Smale等(2010)、陈新军等(2019)、Takashi(2015)和刘必林等(2017)的研究方法(表2); 角质颚形态特异性及形态术语参考刘必林等(2009、2017)、Clarke(1962)和方舟(2016)的相关研究, 并结合相关形态术语描述角质颚形态特异性。通过ImageJ图像处理软件测量角质颚形态其颚角的喙部与翼部交汇处颚角角度。利用角质颚形态信息特异性及相关形态术语编制角质颚形态信息分类检索表。

**1.2.2 形态聚类分析** 对2目10科17种角质颚侧面形态图像提取椭圆傅里叶描述子(Elliptic Fourier Descriptors, EFDs)归一化系数, 并对角质颚形态信息系数在科级别进行聚类分析(Cluster Analysis, CA), 采用系统聚类分析角质颚形态信息。对角质颚形态信息提取的EFDs系数参考欧利国(2019b)的研究方法。首先, 运行ChainCoder程序把角质侧面形态图像中提取其整体轮廓, 并存储链码信息; 然后运行Chc2Nef程序把角质颚侧面整体形态轮廓链码转换为EFDs

系数, 最后, 将得到各个种形态信息归一化系数进行科级别的形态信息系数均值化处理, 并用于聚类分析。聚类方法采用组间联接法和欧氏距离进行分析。

以上所有数据的分析处理使用SPSS 20.0软件和Excel 2016软件完成。

## 2 结果

通过大型海洋掠食性鱼类中胃含物食性鉴定出角质颚下颚种类有2目10科17种, 其中, 枪形目(Teuthoidea)13种, 八腕目(Octopoda)4种。

### 2.1 头足类角质颚形态

头足纲(Cephalopoda)内头足类生物的角质颚下颚形态均有头盖, 侧壁和翼部发育。枪形目角质颚下颚侧面形态其喙部发育较好, 且其形态近似三角形, 侧壁为四边形, 近似菱形, 其两侧翼部发达。八腕目角质颚下颚侧面形态有喙部发育, 侧壁发育较好近似长四边形, 且侧壁后部上方远离头盖处, 其两侧均有翼部发育(图1和图2)。

**2.1.1 夏威夷双柔鱼(*N. hawaiiensis*)** 夏威夷双柔鱼隶属枪形目、柔鱼科(Ommastrephidae)、双柔鱼属(*Nototodar*) (图1A)。夏威夷双柔鱼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形, 喙长和头盖长的长度基本

表2 下颚样品鉴定

Tab.2 Identification of sample of lower beak

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	下颚样品数 Sample number of lower beak
枪形目 Teuthoidea	柔鱼科 Ommastrephidae	双柔鱼属 <i>Nototodar</i>	夏威夷双柔鱼 <i>Nototodar hawaiiensis</i>	15
		乌柔鱼属 <i>Ornithoteuthis</i>	乌柔鱼 <i>Ornithoteuthis volatilis</i>	1
		鸢乌贼属 <i>Sthenoteuthis</i>	鸢乌贼 <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i>	13
		玻璃乌贼属 <i>Hyaloteuthis</i>	玻璃乌贼 <i>Hyaloteuthis pelagica</i>	2
		发光柔鱼属 <i>Eucleoteuthis</i>	发光柔鱼 <i>Eucleoteuthis luminosa</i>	1
	小头乌贼科 Cranchiidae	纺锤乌贼属 <i>Liocranchia</i>	纺锤乌贼 <i>Liocranchia reinhardti</i>	14
		欧文乌贼属 <i>Teuthowenia</i>	透明欧文乌贼 <i>Teuthowenia pellucida</i>	12
		帆乌贼科 Histioteuthidae	帆乌贼属 <i>Histioteuthis</i>	赛拉斯帆乌贼 <i>Histioteuthis cerasina</i>
	太平洋帆乌贼 <i>Histioteuthis pacifica</i>			1
				大帆乌贼 <i>Histioteuthis macrohista</i>
	武装乌贼科 Enoploteuthidae	武装乌贼属 <i>Enoploteuthis</i>	网纹武装乌贼 <i>Enoploteuthis reticulata</i>	2
	爪乌贼科 Onychoteuthidae	南爪乌贼属 <i>Notonykia nesis</i>	南爪乌贼 <i>Notonykia africanae</i>	4
	鱼钩乌贼科 Ancistrocheiridae	鱼钩乌贼属 <i>Ancistrocheirus</i>	鱼钩乌贼 <i>Ancistrocheirus lesueurii</i>	2
八腕目 Octopoda	单盘蛸科 Bolitaenidae	乍波蛸属 <i>Japetella</i>	乍波蛸 <i>Japetella diaphana</i>	1
	快蛸科 Ocythoidae	快蛸属 <i>Ocythoe</i>	快蛸 <i>Ocythoe tuberculata</i>	1
	船蛸科 Argonautidae	船蛸属 <i>Argonauta</i>	扁船蛸 <i>Argonauta argo</i>	7
	水孔蛸科 Tremoctopodidae	水孔蛸属 <i>Tremoctopus</i>	薄肌水孔蛸 <i>Tremoctopus gracilis</i>	1

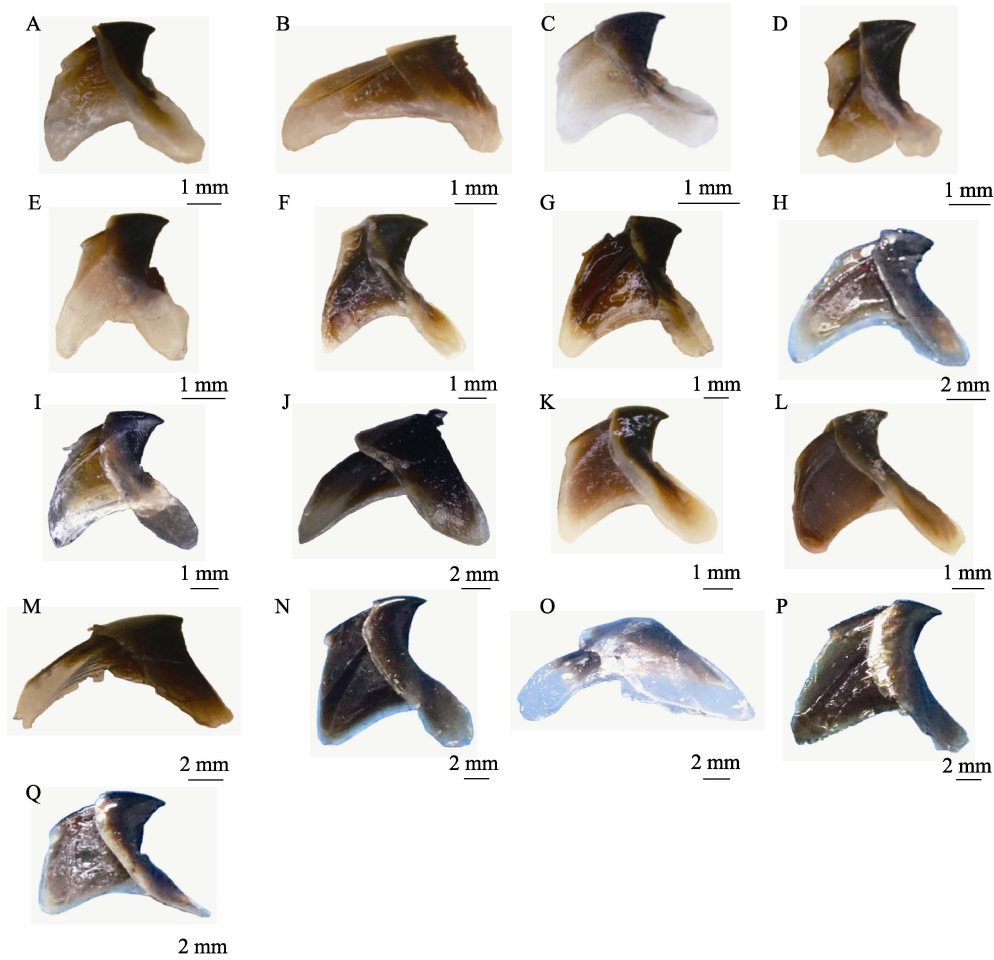


图1 大型海洋掠食性鱼类胃含物头足类角质颚(侧视)

Fig.1 Cephalopod beaks from stomachs of large marine predatory fishes (side view)

A: 夏威夷双柔鱼; B: 乍波蛸; C: 纺锤乌贼; D: 赛拉斯帆乌贼; E: 乌柔鱼; F: 网纹武装乌贼;

G: 太平洋帆乌贼; H: 南瓜乌贼; I: 鱼钩乌贼; J: 快蛸; K: 鸢乌贼; L: 玻璃乌贼;

M: 扁船蛸; N: 透明欧文乌贼; O: 薄肌水孔蛸; P: 大帆乌贼; Q: 发光柔鱼。下同

A: *N. hawaiiensis*; B: *J. diaphana*; C: *L. reinhardti*; D: *H. cerasina*; E: *O. volatilis*; F: *E. reticulata*; G: *H. pacifica*;

H: *N. africanae*; I: *A. lesueurii*; J: *O. tuberculata*; K: *S. oualaniensis*; L: *H. pelagica*; M: *A. argo*; N: *T. pellucida*;

O: *T. gracilis*; P: *H. macrohista*; Q: *E. luminosa*. The same as below.

相当, 喙顶点呈钩状。侧壁后部弯曲向下, 并有侧壁皱发育, 侧壁皱偏离侧壁斜对角线发育, 侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达, 并有翼齿发育(图2A)。角质颚下颚颚缘处在喙顶点处钩状弯曲, 其余发育较平直, 喙部与翼部交汇处颚角角度大约为  $120^\circ$ 。

**2.1.2 乍波蛸(*J. diaphana*)** 乍波蛸隶属八腕目、单盘蛸科(Bolitaenidae)、乍波蛸属(*Japetella*)(图1B)。乍波蛸角质颚下颚侧面形态其喙部只有小小凸起, 并且喙顶点较钝。侧壁发育很好且较长, 侧壁皱发育不明显, 侧壁后部上方远离头盖。翼部发育明显, 无翼齿发育。角质颚下颚颚缘处呈锯齿状(图2B)。

**2.1.3 纺锤乌贼(*L. reinhardti*)** 纺锤乌贼隶属枪形目、小头乌贼科(Cranchiidae)、纺锤乌贼属(*Liocranchia*)

(图1C)。纺锤乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形, 喙长和头盖长的长度基本相当, 喙顶点呈钩状。侧壁后部弯曲向下, 无侧壁皱发育且其侧壁较平坦。翼部发达, 有翼齿发育(图2C)。角质颚下颚颚缘处在喙顶点处钩状弯曲, 其余发育较平直, 喙部与翼部交汇处颚角角度大约为  $110^\circ$ 。

**2.1.4 赛拉斯帆乌贼(*H. cerasina*)** 赛拉斯帆乌贼隶属枪形目、帆乌贼科(Histioteuthidae)、帆乌贼属(*Histioteuthis*)(图1D)。赛拉斯帆乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈三角形, 喙长大于头盖长。侧壁后部倾斜向下, 有侧壁皱发育, 其侧壁皱沿侧壁斜对角线发育, 侧壁后部上方往头盖方向收缩明显。翼部发达, 无翼齿发育(图2D)。

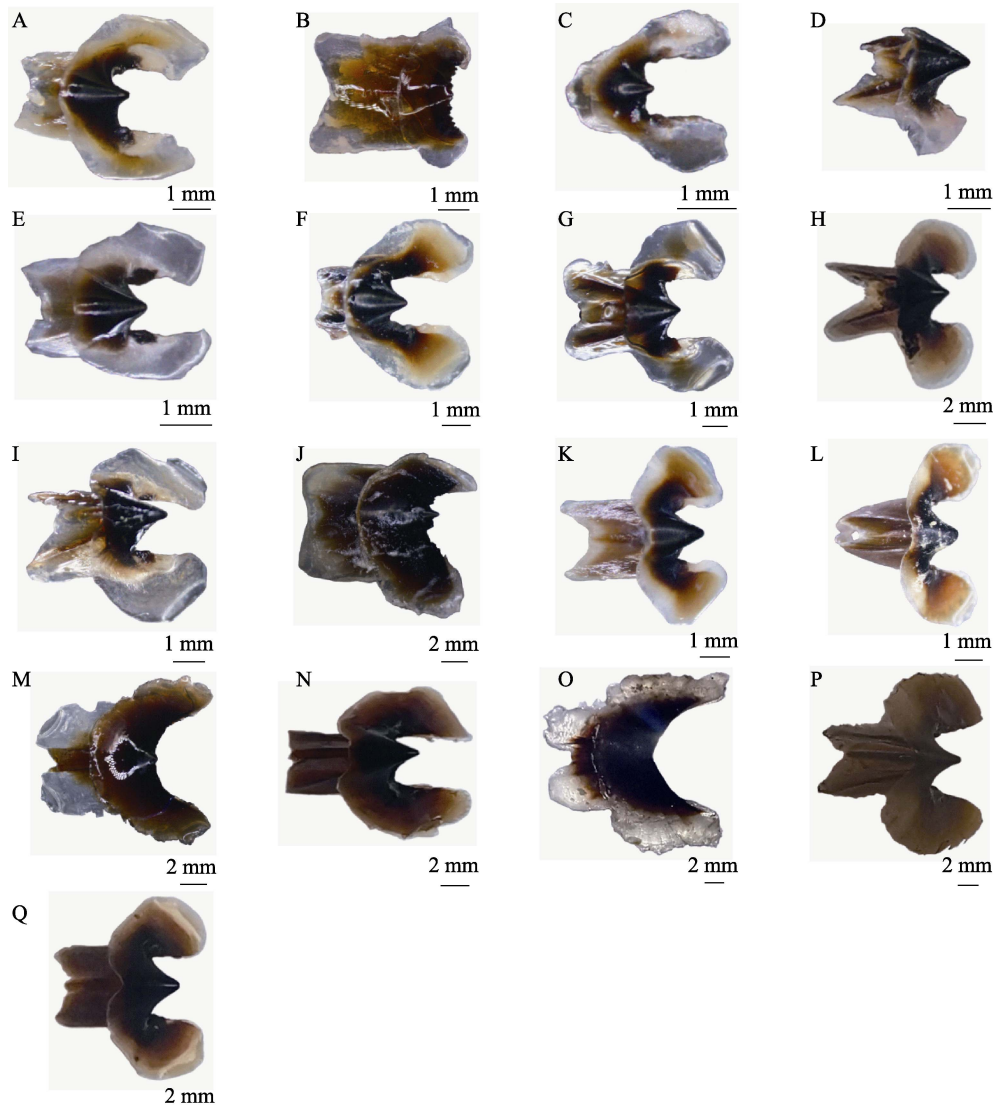


图 2 大型海洋掠食性鱼类胃含物头足类角质颚(顶视)

Fig.2 Cephalopod beaks from stomachs of large marine predatory fishes (Top view)

颚缘在靠近喙顶点处向内弯曲,其余均较为笔直,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $130^\circ$ 。

**2.1.5 乌柔鱼(*O. volatilis*)** 乌柔鱼隶属枪形目、柔鱼科(Ommastrephidae)、乌柔鱼属(*Ornithoteuthis*) (图 1E)。乌柔鱼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当,喙顶点呈钩状。侧壁后部倾斜向下,侧壁皱发育,并偏离侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩明显。两侧翼部发达,有翼齿发育(图 2E)。角质颚下颚颚缘处向内弯曲,喙部与翼部交汇处颚角角度为  $120^\circ$  左右。

**2.1.6 网纹武装乌贼(*E. reticulata*)** 网纹武装乌贼隶属枪形目、武装乌贼科(Enoploteuthidae)、武装乌贼属(*Enoploteuthis*) (图 1F)。网纹武装乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈三角形,喙长大于头盖长。侧

壁后部倾斜向下,侧壁皱发育,并偏离侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩明显。翼部发达,无翼齿发育(图 2F)。角质颚下颚颚缘处向内弯曲明显,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $120^\circ$ 。

**2.1.7 太平洋帆乌贼(*H. pacifica*)** 太平洋帆乌贼隶属枪形目、帆乌贼科、帆乌贼属(图 1G)。太平洋帆乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当,喙顶点呈钩状。侧壁后部倾斜向下,并有侧壁皱发育明显,其侧壁皱沿侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,翼齿发育不明显(图 2G)。角质颚下颚颚缘处在喙顶点处钩状弯曲,其余发育较平直,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $120^\circ$ 。

**2.1.8 南瓜乌贼(*N. africanae*)** 南瓜乌贼隶属枪



形目、爪乌贼科(Onychoteuthidae)、南爪乌贼属(*Notonykia nesis*)(图 1H)。南爪乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当。侧壁后部倾斜向下,并有侧壁皱发育,其侧壁皱偏离侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,无翼齿发育(图 2H)。角质颚下颚颚缘处较平直,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $100^\circ$ 。

**2.1.9 鱼钩乌贼(*A. lesueurii*)** 鱼钩乌贼隶属枪形目、鱼钩乌贼科(Ancistrocheiridae)、鱼钩乌贼属(*Ancistrocheirus*)(图 1I)。鱼钩乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当,喙顶点呈钩状。侧壁后部弯曲向下,侧壁皱发育,并偏离侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,有翼齿发育,在翼齿附近有翼沟形成(图 2I)。角质颚下颚颚缘处在喙顶点处钩状弯曲,其余发育较平直,颚缘与翼部交汇处颚角角度约为  $110^\circ$ 。

**2.1.10 快蛸(*O. tuberculata*)** 快蛸隶属八腕目、快蛸科(Ocythoidae)、快蛸属(*Ocythoe*)(图 1J)。快蛸角质颚下颚侧面形态其喙部只有小凸起且喙顶点较尖。侧壁发育很好且较长,无侧壁皱发育,侧壁后部上方远离头盖。翼部发育显著,无翼齿发育。角质颚下颚喙顶点发育出显著的小尖凸,颚缘处呈锯齿状(图 2J)。

**2.1.11 鸢乌贼(*S. oualaniensis*)** 鸢乌贼隶属枪形目、柔鱼科、鸢乌贼属(*Sthenoteuthis*)(图 1K)。鸢乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当,喙顶点呈钩状。侧壁后部弯曲向下,无侧壁皱发育且侧壁较平坦。翼部发达,翼齿发育(图 2K)。角质颚下颚颚缘处在喙顶点钩状弯曲,其余发育较平直,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $120^\circ$ 。

**2.1.12 玻璃乌贼(*H. pelagica*)** 玻璃乌贼隶属枪形目、柔鱼科、玻璃乌贼属(*Hyaloteuthis*)(图 1L)。玻璃乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈等腰三角形,喙长和头盖长的长度基本相当,喙顶点呈钩状。侧壁后部弯曲向下,并有侧壁皱发育,其侧壁皱偏离侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,翼齿发育不明显(图 2L)。角质颚下颚颚缘处向内弯曲明显,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $120^\circ$ 。

**2.1.13 扁船蛸(*A. argo*)** 扁船蛸隶属八腕目、船蛸科(Argonautidae)、船蛸属(*Argonauta*)(图 1M)。扁船蛸角质颚下颚侧面形态其喙部只有小小凸起,并且喙顶点较钝。侧壁发育很好且较长,无侧壁皱发育,侧壁后部上方远离头盖。翼部发育显著,无翼齿发育。从两侧翼部沿颚缘到喙顶点形似残月(图 2M)。

**2.1.14 透明欧文乌贼(*T. pellucida*)** 透明欧文乌

贼隶属枪形目、小头乌贼科、欧文乌贼属(*Teuthowenia*)(图 1N)。透明欧文乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈三角形,喙长大于头盖长的长度。侧壁后部倾斜向下,并有侧壁皱发育,侧壁皱沿侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,无翼齿发育(图 2N)。角质颚下颚颚缘处向内弯曲,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $120^\circ$ 。

**2.1.15 薄肌水孔蛸(*T. gracilis*)** 薄肌水孔蛸隶属八腕目、水孔蛸科(Tremoctopodidae)、水孔蛸属(*Tremoctopus*)(图 1O)。薄肌水孔蛸角质颚下颚侧面形态其喙部极短且发育不明显。侧壁发育很好且较长,无侧壁皱发育,侧壁后部上方远离头盖。翼部发育显著,无翼齿发育。从两侧翼部沿颚缘到喙顶点形似残月(图 2O)。

**2.1.16 大帆乌贼(*H. macrohista*)** 大帆乌贼隶属枪形目、帆乌贼科、帆乌贼属(图 1P)。大帆乌贼角质颚下颚侧面形态其喙部呈三角形,喙长大于头盖长。侧壁后部倾斜向下,并有侧壁皱发育,其侧壁皱沿侧壁斜对角线发育,侧壁后部上方往头盖方向收缩。翼部发达,无翼齿发育(图 2P)。角质颚下颚颚缘处向内弯曲显著,喙部与翼部交汇处颚角角度大约为  $110^\circ$ 。

**2.1.17 发光柔鱼(*E. luminosa*)** 发光柔鱼隶属枪形目、柔鱼科、发光柔鱼属(*Eucleoteuthis*)(图 1Q)。发光柔鱼角质颚下颚侧面形态其喙部呈三角形,喙长大于头盖长。侧壁后部弯曲向下,无侧壁皱发育且其侧壁较平坦。翼部发达,有翼齿发育(图 2Q)。角质颚下颚在颚缘大约 1/2 处向内弯折明显,喙部与翼部交汇处颚角角度约为  $105^\circ$ 。

## 2.2 形态信息分类及聚类

**2.2.1 角质颚形态信息分类检索** 通过大型海洋掠食性鱼类中胃含物食性鉴定出角质颚下颚种类有 2 目 10 科 17 种;其中,枪形目 13 种,八腕目 4 种(图 1 和图 2)。根据头足类角质颚形态特异性结合角质颚形态术语,编制角质颚形态信息分类检索(表 3)。

**2.2.2 角质颚形态信息聚类分析** 通过角质颚形态信息在头足类科级别进行聚类分析显示,由科聚到目之间的聚类效果显著。角质颚整体形态的聚类关系中,10 个科的头足类生物主要被分为 2 组,分别是枪形目和八腕目。而在目级别之下的聚类过程中,枪形目的柔鱼科和鱼钩乌贼科、帆乌贼科和爪乌贼科、小头乌贼科和武装乌贼科分别先聚为一组,其欧式距离分别为 0.1、0.251、0.165;八腕目的单盘蛸科和船蛸科先聚为一组,其欧式距离为 0.117(图 3)。

表 3 角质颚形态分类检索

Tab.3 Classification retrieval of beak morphology

序号 Number	角质颚形态特征 Feature of beak morphology
1(26)	侧壁为四边形近似菱形, 侧壁后部上方往头盖方向收缩
2(11)	喙部呈三角形, 喙长大于头盖长的长度
3(4)	颚缘处向内弯折.....发光柔鱼( <i>E. luminosa</i> )
4(3)	颚缘处向内弯曲
5(8)	喙顶点较尖锐
6(7)	侧壁后部倾斜明.....大帆乌贼( <i>H. macrohista</i> )
7(6)	侧壁后部倾斜不明显.....透明欧文乌贼( <i>T. pellucida</i> )
8(5)	喙顶点稍微尖
9(10)	颚角角度为 130°左右.....赛拉斯帆乌贼( <i>H. cerasina</i> )
10(9)	颚角角度为 120°左右.....网纹武装乌贼( <i>E. reticulata</i> )
11(2)	喙部呈等腰三角形, 喙长和头盖长的长度基本相当
12(13)	喙顶点无钩状.....南瓜乌贼( <i>N. africanae</i> )
13(12)	喙顶点呈钩状
14(15)	喙顶点呈钩状尖锐.....纺锤乌贼( <i>L. reinhardti</i> )
15(14)	喙顶点呈钩状略尖
16(19)	翼齿发育明显
17(18)	翼齿近似三角形.....夏威夷双柔鱼( <i>N. hawaiiensis</i> )
18(17)	翼齿近似梯形.....乌柔鱼( <i>O. volatilis</i> )
19(16)	翼齿发育不明显
20(21)	翼齿附近有翼沟.....鱼钩乌贼( <i>A. lesueurii</i> )
21(20)	翼齿附近无翼沟
22(23)	无侧壁皱发育.....鸢乌贼( <i>S. oualaniensis</i> )
23(22)	有侧壁皱发育
24(25)	侧壁皱沿对角线发育.....太平洋帆乌贼( <i>H. pacifica</i> )
25(24)	侧壁皱偏离对角线发育.....玻璃乌贼( <i>H. pelagica</i> )
26(1)	侧壁为近似长四边形, 侧壁后部上方远离头盖处
27(28)	喙部无凸起.....薄肌水孔蛸( <i>T. gracilis</i> )
28(27)	喙部有凸起
29(30)	喙部凸起明显且较尖.....快蛸( <i>O. tuberculata</i> )
30(29)	喙部凸起不明显且较钝
31(32)	颚缘呈锯齿状.....乍波蛸( <i>J. diaphana</i> )
32(31)	颚缘无锯齿状且较平滑.....扁船蛸( <i>A. argo</i> )

注: 角质颚形态相互区别的特征用不同序号表示, 其中加括号以表示它们是相对的特征。

Note: The distinct features of the beaks morphology are represented by different serial numbers, with brackets added to indicate that they are relative features.

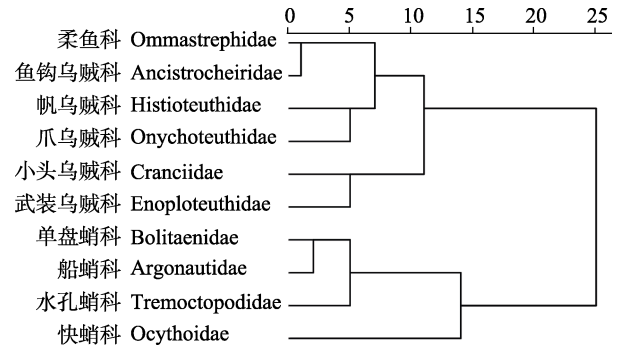


图 3 基于角质颚形态信息的头足类聚类分析  
Fig.3 Clustering analysis of Cephalopod based on morphological information of beaks

### 3 讨论

#### 3.1 基于角质颚分析胃含物的可行性

角质颚具有较好的抗腐蚀性和结构稳定性。大型海洋掠食性鱼类胃含物中采集的角质颚下颚, 由于长时间在胃里会受到胃液侵蚀, 其角质颚形态最外围会受到一定的影响, 但是其整体形态特异性基本保留。角质颚为几丁质组织(刘必林等, 2017), 其角质颚的机械强度与其化学成分相关(Miserez *et al*, 2008), 在机械性能变化中, 其喙部具有很高的机械强度(林静远等, 2020a、b), 从翼部到喙部机械强度逐渐变大, 而在角质颚各个部分中, 喙部受到胃液影响变化最小, 本研究中, 喙部在角质颚鉴定中起到十分重要的作用。因此, 在分类过程中将角质颚侧面形态分为喙部、侧壁、翼部 3 个部分。

角质颚具有显著的形态特异性, 并具有很好的三维空间立体感。角质颚与鱼类耳石(欧利国等, 2019a、2020)在形态分析中, 虽然都具有种的特异性, 但是, 耳石形态特异性明显仅在内侧面和外侧面, 立体感明显不如角质颚明显。以往国内角质颚形态研究都主要集中在其侧视形态分析上, 而忽视角质颚立体形态特性。通过角质颚侧面形态测量形态参数, 从而进行角质颚形态分析(瞿俊跃等, 2018), 以及利用角质颚侧面形态进行地标点标记(方舟, 2016), 进而提取相关形态信息等。因此, 本研究对胃含物角质颚形态进行分析过程中, 分析了其侧视形态和顶视形态。通过对角质颚进行多维面的分析, 使胃含物角质颚在鉴定过程中, 能准确观察到各个种之间的形态差异。

此外, 以往的大型海洋掠食性鱼类胃含物分析中, 直接利用头足类躯体进行种类鉴定存在一定的局限性。鉴定胃含物头足类种类是通过其躯体等其他外部

特征进行种类鉴定,然而在某些情况时,大型海洋掠食性鱼类在摄食头足类生物后,如消化时间过长,外部形态特征会变得很难辨识。如在帆蜥鱼(*Alepisaurus ferox*)食性分析研究中,虽然通过躯体特征鉴定出多种头足类生物,但仍然存在一定数量的未鉴定头足类(刘攀等, 2019)。基于采集样品的稀缺性和不可重复性,应用头足类内部硬组织角质颚形态进行鉴定,不仅可以对其外部形态进行佐证,而且又丰富了头足类分类鉴定内容,对其食性组成分析更为完善,其效果与传统食性分析相辅相成,对胃含物分析鉴定头足类生物具有十分重要的意义。

### 3.2 形态特异性对胃含物角质颚识别的有效性

角质颚形态特异性(刘必林等, 2017)在胃含物头足类生物识别中具有很好的优越性,角质颚不仅在空间上是立体感极强的三维构造,而且其二维形态内的细致变化也极为丰富。因此,在研究角质颚种类鉴定过程中,以侧视形态为主,顶视形态为辅,对角质颚形态进行准确描述分析。本研究鉴定枪形目和八腕目,其枪形目的角质颚喙部发育显著,呈三角形,侧壁近似菱形,翼部发达;而八腕目的角质颚喙部发育一般或者不明显,侧壁近似长矩形,翼部发育较好。本研究根据各个种的角质颚喙部形态对其进行初步区分,角质颚喙部主要形态有近似三角形、等腰三角形和凸起形态等。

在枪形目下的各个种,其侧壁均为四边形近似菱形,但大致根据其侧壁后部形态变化可分为2种情况,一种是侧壁后部近似水平向下,另一种是侧壁后部倾斜向下。而角质颚在其侧壁上的形态变化又可分为无侧壁皱发育、侧壁皱偏离对角线发育和侧壁皱沿对角线发育3种。研究发现,喙部与翼部交汇处所形成的颚角角度大小,影响其角质颚侧面形态中喙顶点和翼部最前端点之间距离的远近,同时,也造成了其角质颚整体形态的变化差异。角质颚喙部内侧为颚缘,各个种的颚缘形态变化丰富,在本研究中有向内弯曲、向内弯折等变化。

在八腕目中的各个种,其喙部变化为无凸起,凸起较钝,凸起较尖。侧壁后部上方均远离头盖处,其侧壁表面较光滑。但在八腕目个别种的颚缘处变化较为特别,其颚缘呈现出锯齿状,这可能与其喙部发育不明显有关。角质颚是头足类的摄食器官,其主要功能是撕咬食物(刘必林等, 2009、2017),因此,其颚缘处形态变化,很可能是因为捕食需要从而进化出锯齿形状,符合适者生存的自然法则。

### 3.3 角质颚形态分类和聚类对胃含物分析的重要性

通过对角质颚形态进行系统描述,并对角质颚形态的共性和个性进行了整体归类,进而建立胃含物角质颚分类检索。由于角质颚对头足类种类鉴定具有重要作用,因此,通过分类检索对其胃含物的角质颚形态进行分类,进而识别头足类种类。本研究以角质颚形态的特异性,根据喙部、侧壁、翼部的整体形态信息作为角质颚形态区分的共性信息,将17种头足类角质颚中具有共性的形态信息进行归类。枪形目角质颚其侧面形态喙部近似三角形,侧壁为四边形近似菱形等,八腕目角质颚其侧面形态侧壁近似长四边形,因此,区分出2个目,把13个种角质颚归为枪形目,把4个种角质颚归为八腕目。此外,通过角质颚的喙部、侧壁、翼部3个重要组成部分的局部细节形态信息,如侧壁皱、颚角角度、翼齿等作为各个种之间区分的个性信息,进而实现种与种之间的形态特征的进一步细分。本研究利用角质颚形态信息所建立的分类检索,在胃含物角质颚形态的种间层次上区分明显,区分出各个种在其形态上具有独特的个性。

此外,本研究通过聚类分析得到的聚类结果主要聚成两大类,分别是枪形目和八腕目,也验证了本研究在角质颚形态分类中共性特征。椭圆傅里叶变换分析得到整体形态信息系数,很好地把多个科级别的头足类角质颚形态共性进行聚类,在目级别其聚类划分与分类检索相一致。通过聚类分析可以对角质颚整体形态共性进行聚类,而对角质颚各个种的个性特征分析需要结合分类检索进行更为细致的分类和归类。以往角质颚形态研究主要分析各个种角质颚形态种间区别(刘必林等, 2015),并未讨论过多个种角质颚之间内在的共性联系。因此,本研究在胃含物角质颚形态的分类上即分析了各个种之间个性特征,也分析了各个种之间的内在联系的共性特征。

随着海洋渔业的迅速发展(陈新军, 2019),大型海洋掠食性鱼类作为人类捕捞目标物种(林龙山等, 2005),同时也是竞争者。开展大型海洋掠食性鱼类胃含物的分类研究,将有助于认识大型海洋掠食性鱼类的食物组成和摄食习性,也有利于减轻远洋渔业捕捞与大型海洋掠食性鱼类捕食之间的竞争关系(Ohizumi, 2002)。

## 4 结论

本研究通过分类检索和聚类分析研究胃含物角质颚形态,认为利用角质颚能实现大型海洋掠食性鱼

类胃含物中头足类种类的识别和分类,并取得很好的分析效果,共鉴定出2目10科17种头足类生物。通过进一步对胃含物角质颚的侧视和顶视形态特征的分析,发现角质颚形态在不同视角下形态特征变化丰富多样。在其分类过程中,角质颚在种与种之间的个性形态差异具有显著独特性,在同一个目中,各个种之间其形态又具有明显的一致性。本研究表明,角质颚可作为胃含物头足类生物鉴定的一种标志,它不仅佐证了以往胃含物分析,丰富了胃含物头足类鉴定的内容,而且有利于进一步完善胃含物头足类分类鉴定体系,为大型海洋掠食性鱼类食性分析研究奠定鉴定基础。

**致谢:** 在此感谢海上观察员们的辛苦采样,以及操亮亮、贺芊菡、崔钰莹、舒畅、卜心宇、力清影、刘岩和储莫闲在实验过程中提供的帮助。

## 参 考 文 献

- CHEN X J, LIU B L, FANG Z, *et al.* Tou zu gang. Beijing: China Ocean Press, 2019 [陈新军, 刘必林, 方舟, 等. 头足纲. 北京: 海洋出版社, 2019]
- CHEN X J. Development status of world cephalopod fisheries and suggestions for squid jigging fishery in China. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(3): 321–330 [陈新军. 世界头足类资源开发现状及我国远洋鱿钓渔业发展对策. 上海海洋大学学报, 2019, 28(3): 321–330]
- CLARKE M R, ROELEVELD M A C. Cephalopods in the diet of sperm whales caught commercially off Durban, South Africa. *African Journal of Marine Science*, 1998, 20(1): 41–45
- CLARKE M R. A handbook for the identification of cephalopod beaks. Oxford: Clarendon Press, 1986
- CLARKE M R. The identification of cephalopod “beaks” and the relationship between beak size and total body weight. *Bulletin of the British Museum (Natural History). Zoology*, 1962, 8(10): 419–480
- CREMER M J, PINHEIRO P C, SIMÕES-LOPES P C. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 2012, 102(2): 131–137
- EVANS K, HINDELI M A. The diet of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in Southern Australian waters. *ICES Journal of Marine Science*, 2004, 61(8): 1313–1329
- FANG Z, CHEN X J, LU H J, *et al.* Morphological differences in statolith and beak between two spawning stocks for *Illex argentinus*. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(19): 5986–5997 [方舟, 陈新军, 陆化杰, 等. 阿根廷滑柔鱼两个群体间耳石和角质颚的形态差异. 生态学报, 2012, 32(19): 5986–5997]
- FANG Z, JIN Y, HU F F, *et al.* Beak morphometrics of short arm octopus (*Amphioctopus fangsiao*) in different sea areas of China in autumn. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1050–1059 [方舟, 金岳, 胡飞飞, 等. 秋季我国近海不同海域短蛸角质颚形态学研究. 水产学报, 2018, 42(7): 1050–1059]
- FANG Z. Fisheries ecology of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* in North Pacific Ocean based on beak. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2016 [方舟. 基于角质颚的北太平洋柔鱼渔业生态学研究. 上海海洋大学博士学位论文, 2016]
- LIN J Y, LIU B L, JIN X. Mechanical strength of *Dosidicus gigas* beak. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020b, 29(3): 385–391 [林静远, 刘必林, 金宵. 茎柔鱼角质颚的机械强度特性. 上海海洋大学学报, 2020b, 29(3): 385–391]
- LIN J Y, LIU B L, JIN X. Mechanism analysis of cephalopod beak pigmentation. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(5): 777–783 [林静远, 刘必林, 金宵. 头足类角质颚的色素沉积机制. 水产学报, 2020a, 44(5): 777–783]
- LIN L S, DING F Y, CHEN J H. Analyses on the composition of catches by purse seine from the Western and Central Pacific Ocean. *Marine Fishery*, 2005, 27(1): 10–14 [林龙山, 丁峰元, 程家骅. 中西太平洋金枪鱼围网渔获物组成分析. 海洋渔业, 2005, 27(1): 10–14]
- LIU B L, CHEN X J, FANG Z, *et al.* Beak of cephalopod. Beijing: Science Press, 2017 [刘必林, 陈新军, 方舟, 等. 头足类角质颚. 北京: 科学出版社, 2017]
- LIU B L, CHEN X J, FANG Z, *et al.* Species identification of cephalopods based on beak morphometric variables. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(6): 1365–1372 [刘必林, 陈新军, 方舟, 等. 基于角质颚长度的头足类种类判别. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1365–1372]
- LIU B L, CHEN X J, FANG Z, *et al.* Study of age and growth of cephalopod using their beaks. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(6): 930–936 [刘必林, 陈新军, 方舟, 等. 利用角质颚研究头足类的年龄与生长. 上海海洋大学学报, 2014, 23(6): 930–936]
- LIU B L, CHEN X J. Beak length analysis of the purple back flying squid *Sthenoethis oualaniensis* in northwest Indian Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 8–14 [刘必林, 陈新军. 印度洋西北海域鸢乌贼角质颚长度分析. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 8–14]
- LIU B L, CHEN X J. Review on the research development of beaks in Cephalopoda. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 157–164 [刘必林, 陈新军. 头足类角质颚的研究进展. 水产学报, 2009, 33(1): 157–164]
- LIU B L, LIN J Y, FANG Z, *et al.* Review on the stable isotopes in cephalopod beaks. *Marine Fisheries*, 2018, 40(2): 242–248 [刘必林, 林静远, 方舟, 等. 头足类角质颚稳定同位素研究进展. 海洋渔业, 2018, 40(2): 242–248]
- LIU P, DAI X J, WANG J, *et al.* Composition of stomach contents of longnose lancetfish (*Alepisaurus ferox*) in western tropical Pacific Ocean. *South China Fisheries*

- Science, 2019, 15(1): 20–30 [刘攀, 戴小杰, 王杰, 等. 热带西太平洋帆蜥鱼胃含物组成分析. 南方水产科学, 2019, 15(1): 20–30]
- MISEREZ A, SCHNEBERK T, SUN C J, *et al.* The transition from stiff to compliant materials in squid beaks. *Science*, 2008, 319(5871): 1816–1819
- OHIZUMI H. Dietary studies of toothed whales: A review of technical issues and new topics. *Fisheries Science*, 2002, 68(1): 264–267
- OU L G, LIU B L, FANG Z. Identification of sagittal otolith morphology and sulcus morphology based on elliptic Fourier transform. *Marine Fishery*, 2019, 41(4): 385–396 [欧利国, 刘必林, 方舟. 基于椭圆傅里叶变换的鱼类矢耳石和听沟形态识别. 海洋渔业, 2019b, 41(4): 385–396]
- OU L G, LIU B L. Identification of sagittal otolith shapes of four species in family Carangidae based on landmark morphometrics analysis. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 114–120 [欧利国, 刘必林. 基于地标点法的4种鲹科鱼类矢耳石形态分类. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 114–120]
- OU L G, LIU B L. Sagittae morphology of genus *Decapterus* from Dongsha Islands in South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2019a, 15(3): 33–40 [欧利国, 刘必林. 南海东沙群岛海域圆鲹属鱼类矢耳石的形态特征分析. 南方水产科学, 2019a, 15(3): 33–40]
- QU J Y, LI J H, CHEN P, *et al.* The morphology and growth characteristics of beaks of European common cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the coast of West Africa. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 164–170 [瞿俊跃, 李建华, 陈芑, 等. 西非沿岸乌贼角质颚形态及生长特征. 渔业科学进展 2018, 39(2): 164–170]
- SMALE M J, CLARKE M R, KLAGES N T W, *et al.* Octopod beak identification-resolution at a regional level (Cephalopoda, Octopoda: Southern Africa). *South African Journal of Marine Science*, 2010, 13(1): 269–293
- SMALE M J, CLIFF G. Cephalopods in the diets of four shark species (*Galeocerdo cuvier*, *Sphyrna lewini*, *S. zygaena* and *S. mokarran*) from Kwazulu-Natal, South Africa. *South African Journal of Marine Science*, 1998, 20(1): 241–253
- SU H, FANG Z, CHEN X J. Beak shape identification of two oceanic squids based on different methods. *Marine Fisheries*, 2016, 38(3): 225–235 [苏杭, 方舟, 陈新军. 2种大洋性柔鱼类角质颚形态识别法的比较. 海洋渔业, 2016, 38(3): 225–235]
- TAKASHI O. *Cuttlefishes and squids of the world* (New edition). Tokyo: Tokai University Press, 2015
- XAVIER J C, CHEREL Y. *Cephalopod beak guide for the Southern Ocean*. Cambridge: British Antarctic Survey, 2009

(编辑 陈 严)

## Systematic Classification of Cephalopod Beaks from Stomach Contents of Six Large Marine Predatory Fishes

OU Ligu<sup>1</sup>, GU Xinyu<sup>1</sup>, WANG Binyan<sup>2</sup>, LIU Bilin<sup>1,3</sup>✉

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

2. College of Information Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Distant-Water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** With extensive utilization of fishery resources, it is important to understand the related feeding habits of large marine predatory fish. In traditional studies on stomach contents, cephalopod organisms in the stomach of fish are identified mainly on the basis of cephalopod body characteristics. However, because the physical characteristics of cephalopods are affected by digestive juices in fish stomachs, the appearance of cephalopods are easily destroyed. Therefore, there are some limitations in the identification of cephalopods based on these characteristics. Cephalopod beaks have morphological characteristics that can be used for species identification and classification, but the classification of cephalopod beaks from stomach contents of large marine predatory fish has not yet been conducted. Thus, in order to investigate the possibility of classifying cephalopod beaks from stomach contents of six large marine predatory fishes, we examined a total of 36 fish stomachs from the South Atlantic, Middle East Pacific, and Western Indian Oceans in October 2017, March~May 2018, and November 2018, and analyzed cephalopod beak morphology. In this study, two-dimensional digital images of beak morphology were collected. The side and top morphologies of each lower beak were collected for species identification. Based on the morphological characteristics of the beak and the terminology related to beak morphology, a classification retrieval table for beak morphology was developed. The morphology coefficients were analyzed by clustering at the family level by extracting the elliptic Fourier descriptor coefficients of beak morphology. Results showed that a total of 17 species of cephalopods were found in two orders and ten families through species identification using beak morphology. Analysis of the beak morphology from stomach contents revealed that the morphological characteristics of the beaks of 17 species of cephalopods are clearly different among species. According to the classification retrieval of beak morphology, the lower beak of the rostrum of 13 species of Teuthoidea was triangular and isosceles triangle, and the lateral wall was approximately rhomboid. The wings were well-developed. The lower beak of the rostrum of four species of Octopoda was developed, and the lateral wall was approximately a long quadrangle. Wing development occurred. The morphology of beaks in different cephalopods has unique characteristics, and the characteristics of each species are very different, as indicated during the analysis. Cluster analysis of morphological information from beaks was effective for distinguishing cephalopods at the order level. In the cluster analysis, beak morphology was divided into two main parts: one mainly corresponded to Teuthoidea and the other corresponded to Octopoda. The identification and classification of beak morphology from stomach contents can be used as a marker for the biological identification of cephalopods. This not only can support the recognition of cephalopods from stomach contents, but also enrich the identification content of cephalopods from stomach contents. This study lays the foundation for the classification and identification of cephalopods in the stomachs of large marine predatory fish.

**Key words** Cephalopod; Lower beak; Large marine predatory fishes; Stomach contents; Classification search; Cluster analysis

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210913002

http://www.yykxjz.cn/

何春, 邓华堂, 王果, 刘寒文, 沈子伟, 刘绍平, 段辛斌, 陈大庆, 李云. 基于氮稳定同位素分析的三峡水库主要鱼类营养级研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 116-126

HE C, DENG H T, WANG G, LIU H W, SHEN Z W, LIU S P, DUAN X B, CHEN D Q, LI Y. Trophic level of major fish species in the Three Gorges Reservoir based on nitrogen stable isotope analysis. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 116-126

# 基于氮稳定同位素分析的三峡水库 主要鱼类营养级研究\*



何春<sup>1,2</sup> 邓华堂<sup>2</sup> 王果<sup>1</sup> 刘寒文<sup>2</sup> 沈子伟<sup>2</sup>  
刘绍平<sup>2</sup> 段辛斌<sup>2</sup> 陈大庆<sup>2</sup> 李云<sup>1①</sup>

(1. 西南大学水产学院 重庆三峡生态渔业产业技术研究院 重庆 400715; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所 农业农村部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站 湖北 武汉 430223)

**摘要** 运用稳定同位素技术对2018年7月—2019年1月采自三峡库区干流木洞、涪陵、云阳和秭归江段的38种鱼类进行氮稳定同位素分析,同时计算鱼类营养级并构建了鱼类连续营养谱。研究结果显示,三峡库区干流鱼类 $\delta^{15}\text{N}$ 值平均值为11.02‰,变化范围为5.31‰~17.79‰。以初级消费者螺类作为基准生物估算出三峡库区干流鱼类平均营养级为2.67,范围为1.47~4.12。营养级大于4级的鱼类仅有1种,营养级位于2~3级之间的鱼类种类数最多,占种类总数的50.0%,其次是营养级大于3级的鱼类,占种类总数的31.6%,不同食性鱼类组合的营养级存在差异。库区干流鱼类营养级的时空差异均不显著,而越靠近大坝的江段食物链长度的季节性波动幅度越大。和水库蓄水运行初期相比,鱼类营养级显著升高且高营养级鱼类的群落结构和营养特征发生了一定程度的改变,特别是拥有较高营养级的短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)在库区干流逐渐扩张并成为优势种,其可能对库区干流鱼类营养结构产生影响。

**关键词** 鱼类; 稳定同位素; 三峡库区; 营养级; 连续营养谱

**中图分类号** S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0116-11

营养级(trophic level, TL)表征了生物在生态系统或群落食物网中的位置,是复杂食物网络关系中的一个基本的、可测量的特性,反映了食物网的垂直结构(Pimm, 1982; 纪炜炜等, 2010)。营养级的研究有助于划分群落功能群来简化食物网,对生态系统模型的构

建及营养动力学研究具有重要意义(Amezcuca *et al.*, 2015; 高春霞等, 2020)。目前,对鱼类营养级的分析方法主要包括胃含物分析法(stomach content analysis, SCA)和稳定同位素分析法(stable isotope analysis, SIA),其中稳定同位素分析法基于生物组织中氮稳定

\* 国家自然科学基金项目(51909271)、中央高校基本科研业务费专项(2362020-2020jd002)、农业农村部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站开放课题(FRESES201905)和中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD09)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (51909271), Fundamental Research Funds for the Central Universities (2362020-2020jd002), Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of the Upper-Middle Reaches of Yangtze River Ministry of Agriculture and Rural Affairs (FRESES201905), and Innovation Team Project of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD09)]. 何春, E-mail: hechun@email.swu.edu.cn

① 通信作者: 李云, 教授, E-mail: aquatics@swu.edu.cn

收稿日期: 2021-09-13, 收修改稿日期: 2021-11-11

同位素的分馏效应, 即氮稳定同位素( $\delta^{15}\text{N}$ )能在食物与捕食者之间产生 3‰~4‰的同位素分馏, 因此,  $\delta^{15}\text{N}$  常用于确定生物营养级(巴家文等, 2015; 张博伦等, 2019)。和传统的胃含物分析法相比, 稳定同位素分析法不仅能更好地反映动物长时间吸收、利用的食物信息(Vander Zanden *et al*, 1999), 还可以连续测出生物的营养位置, 能更准确地量化评估生物的营养级(Carscallen, *et al*, 2012; Amezcua *et al*, 2015), 其为探究营养级及其动态关系提供了一种切实有效的手段并被广泛运用(Power *et al*, 2013; 张硕等, 2019; 白怀宇等, 2021)。

三峡工程是世界上最大的水利枢纽工程, 是治理和开发长江的关键性骨干工程, 其在长江流域的防洪、航运、发电以及调节水资源季节分配不均等方面发挥着重要作用(Wu *et al*, 2004)。但三峡大坝建成后也带来了诸多生态问题, 如大坝建设和水库运行使河流水生环境片段化, 并改变了河流的物理和化学特征以及河流原有的水文规律(Wu *et al*, 2003、2004), 环境特征的改变可能对鱼类群落结构和鱼类摄食生态产生影响, 最终造成鱼类营养结构的差异(Wang *et al*, 2016; Liu *et al*, 2019)。由于鱼类营养结构的动态变化能反应鱼类群落结构和鱼类饵料生物的种类组成和丰度的变化状况, 而这些变化通常与环境干扰息息相关(薛莹等, 2003; 纪炜炜等, 2010), 对三峡库区鱼类营养结构时空差异的研究不仅可以揭示库区鱼类群落的营养格局和结构组成特征, 还有助于人们了解水库生态系统演替过程中鱼类食物网营养结构的动态变化及其环境干扰过程。目前, 对三峡库区干流鱼类营养级的研究主要集中在水库正常蓄水运行之前(张亮, 2007)和运行初期(Li *et al*, 2015)。三峡水库蓄水运行多年后, 库区鱼类群落结构已经发生改变(魏念等, 2021), 这可能对鱼类营养结构产生影响, 而有关三峡水库正常蓄水运行后库区干流江段鱼类营养结构时空差异的研究未见报道。因此, 本研究运用稳定同位素技术对三峡库区干流包括回水区江段、库首江段、库中江段以及库尾江段 4 个典型水域不同季节的鱼类营养级进行研究, 以期为三峡库区渔业资源评估、保护以及合理利用提供基础科学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查区域与采样时间

三峡水库位于长江中上游, 东起重庆市巴南区, 西至湖北省宜昌市, 全长约 600 km, 贯穿宜昌市和重庆市的 20 多个区县, 是世界上最大的水利水电型

水库。三峡库区属湿润亚热带季风气候, 年平均气温为 15℃~19℃, 年降水量丰沛, 季节差异明显。三峡水库采用周期性反季节“冬蓄夏排”的年度水位调节方式, 在临近 4 月的汛期前, 三峡大坝水位逐渐下降至 145 m 的最低水位, 汛期后三峡大坝正常蓄水且水位维持在 175 m 附近(Wu *et al*, 2004)。

为全面了解三峡库区干流鱼类营养级的时空差异, 本研究于 2018 年 7—8 月(汛期)和 2018 年 12 月—2019 年 1 月(枯水期)分别在三峡库区干流木洞江段、涪陵江段、云阳江段和秭归江段进行鱼类和基准生物样本采集, 其中, 木洞江段位于三峡水库干流回水区, 涪陵江段位于库尾, 云阳江段位于库中, 秭归江段位于库首(图 1)。

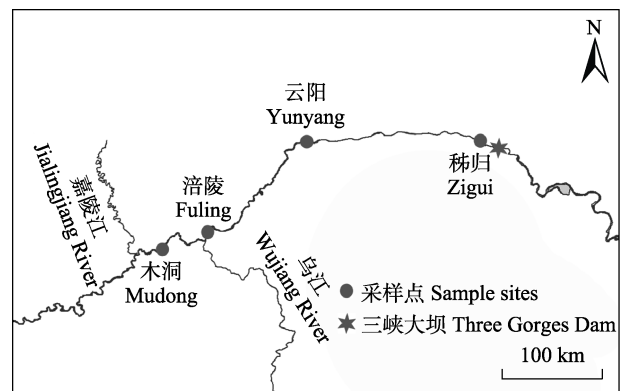


图 1 研究区域及采样点示意图  
Fig.1 The study area and sample sites

### 1.2 样品采集和处理

鱼类样本的获取主要使用包括流刺网、地笼以及 3 层刺网在内的渔具进行主动捕捞。鱼类捕捞后现场对采集到的每一尾鱼进行种类鉴定和生物学测量, 测量指标包括体长和体重, 其中体长测量精确到 1 mm, 体重测量精确到 1 g。用于氮稳定同位素分析的鱼类标本每种鱼选择 3~5 尾, 取其背部白色肌肉 2~3 g, 用去离子水冲洗后, 60℃连续烘干至恒重后干燥保存。基准生物螺类样本主要在地笼中收集, 对采集到的螺类进行种类鉴定后, 取去除壳和内脏后的肌肉, 用去离子水冲洗干净, 60℃连续烘干至恒重后干燥保存。

### 1.3 稳定同位素分析

所有样品均使用美国 Thermo Fisher Scientific 公司的 Flash EA1112 HT 元素分析仪和 DELTA V Advantage 同位素比率质谱仪分析氮同位素比率。氮稳定同位素分析的标准物质为标准大气氮( $\text{N}_2$ )。实验



中每 5 个样品加测 1 个标准样品, 每 10 个样品中随机选取 1~2 个样品进行重复测定, 分析精度为 $\pm 0.2\text{‰}$ 。

氮稳定同位素比值计算公式如下:

$$\delta^{15}\text{N}=(R_s-R_{st})/R_{st}\times 1000$$

式中,  $R_s$  表示样品重同位素与轻同位素比值( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ );  $R_{st}$  为标准大气氮同位素比值。

#### 1.4 营养级计算

营养级的计算公式如下:

$$\text{TL}=(\delta^{15}\text{N}_{\text{消费者}}-\delta^{15}\text{N}_{\text{基准生物}})/\Delta\delta^{15}\text{N}+\lambda$$

式中, TL 为消费者的营养级,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{消费者}}$  为消费者氮稳定同位素比值,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{基准生物}}$  为系统中作为基准生物的氮稳定同位素比值,  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  为相邻营养级之间氮稳定同位素富集度,  $\lambda$  为该基准生物的营养级, 初级生产者时  $\lambda=1$ , 初级消费者时  $\lambda=2$ 。本研究中, 相邻营养级之间氮稳定同位素富集度( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ )取  $3.4\text{‰}$  (Post, 2002), 同时选择初级消费者螺类作为基准生物。

#### 1.5 数据处理与分析

参考 FishBase 数据库(Froese *et al*, 2021)和已有文献资料(丁瑞华, 1994; 王赛, 2016), 将所采集鱼类分为 5 个食性类型以研究不同食性类型鱼类组合营养级的差异。5 个食性类型包括肉食性鱼类(主要以小型鱼类为摄食对象)、底栖动物食性鱼类(主要以底栖无脊椎动物为摄食对象)、杂食性鱼类(既以动物性饵料为食也以植物性饵料为食)、浮游生物食性鱼类(主要以浮游生物为摄食对象)和草食性鱼类(主要以水生高等植物和固着藻类为摄食对象)。利用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验不同江段鱼类的  $\delta^{15}\text{N}$  值和营养级的空间差异, 用配对样本  $t$  检验分析鱼类的  $\delta^{15}\text{N}$  值和营养级的季节差异, 以  $P<0.05$  作为显著水平。分别以不同季节不同江段顶级捕食者(拥有最高营养级的鱼类)的营养级来表征食物链长度(food chain length, FCL)(Sabo *et al*, 2009)并比较其差异。统计分析和绘图使用 SPSS 16.0、Excel 2019 和 R 4.0.3 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 基准生物氮稳定同位素比值

基准生物共采集到螺类 3 种, 包括梨形环棱螺(*Bellamya purificata*)、铜锈环棱螺(*B. aeruginosa*)和方格短沟蜷(*Semisulcospira cancellate*)。氮稳定同位素分析结果显示, 不同江段螺类的  $\delta^{15}\text{N}$  平均值为  $8.37\text{‰}$ , 变化范围为  $8.29\text{‰}\sim 8.53\text{‰}$ 。单因素方差分析

结果显示, 不同江段之间螺类的  $\delta^{15}\text{N}$  值无显著差异( $P>0.05$ ); 木洞江段汛期和枯水期的螺类的  $\delta^{15}\text{N}$  值无显著差异( $P>0.05$ ), 而涪陵、云阳及秭归江段螺类的  $\delta^{15}\text{N}$  值在汛期显著高于枯水期( $P<0.05$ )(图 2)。

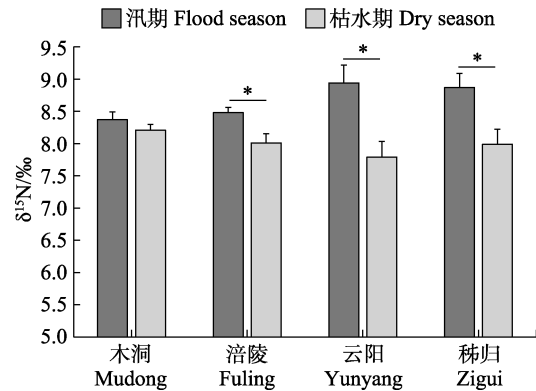


图 2 三峡水库干流螺类的  $\delta^{15}\text{N}$  值(平均值 $\pm$ 标准差)  
Fig.2 The  $\delta^{15}\text{N}$  value of snails in the main stream of the Three Gorges Reservoir (Mean $\pm$ SD)

\*表示存在显著差异( $P<0.05$ )。

\* indicates significant differences ( $P<0.05$ ).

### 2.2 鱼类氮稳定同位素比值

本研究测定了三峡库区干流不同江段不同季节共计 38 种鱼的氮稳定同位素比值, 结果显示, 所有鱼类样本的  $\delta^{15}\text{N}$  平均值为  $11.02\text{‰}$ , 变化范围为  $5.31\text{‰}\sim 17.79\text{‰}$ 。其中, 木洞江段不同种鱼类的  $\delta^{15}\text{N}$  值范围为  $5.8\text{‰}\sim 15.05\text{‰}$ , 涪陵江段为  $7.04\text{‰}\sim 14.64\text{‰}$ , 云阳江段为  $6.63\text{‰}\sim 16.55\text{‰}$ , 秭归江段为  $5.31\text{‰}\sim 14.61\text{‰}$  (表 1)。单因素方差分析结果显示, 不同江段之间鱼类的  $\delta^{15}\text{N}$  值无显著差异( $P>0.05$ )。配对样本  $t$  检验分析结果显示, 汛期和枯水期鱼类的  $\delta^{15}\text{N}$  值无显著的季节差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 鱼类营养级和连续营养谱

根据营养级计算公式计算了三峡库区干流江段主要鱼类的营养级并构建连续营养谱, 分析结果显示, 三峡库区干流鱼类营养级范围为  $1.47\sim 4.12$ , 平均值为  $2.67$ , 营养层次为 4 级, 营养级大于 4 级的鱼类仅有铜鱼(*Coreius heterodon*) 1 种, 营养级位于 3~4 级之间的鱼类占种类总数的  $31.6\%$ , 主要为肉食性鱼类和底栖动物食性鱼类; 营养级位于 2~3 级之间的鱼类占  $50.0\%$ , 主要为杂食性鱼类、底栖动物食性鱼类和浮游生物食性鱼类; 营养级位于 1~2 级之间的鱼类占  $15.8\%$ , 包括 3 种草食性鱼类和 3 种杂食性鱼类(图 3)。不同食性鱼类组合营养级呈肉食性鱼类>底栖动物食性鱼类>浮游生物食性鱼类和杂食性鱼类>草食性鱼类(图 4)。

表 1 三峡库区干流鱼类体长、体重特征及其  $\delta^{15}\text{N}$  值Tab.1 Characteristics of body length, body weight and  $\delta^{15}\text{N}$  value of fish in the main stream of the Three Gorges Reservoir

种类 Species	编号 Code	木洞 Mudong		涪陵 Fuling		云阳 Yunyang		秭归 Zigui		体长 Body length/mm		体重 Body weight/g		营养 类型 Nutrition types
		$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	平均值 Mean	范围 Range	平均值 Mean	范围 Range	
		鲱形目 Clupeiformes												
鳀科 Engraulidae														
短颌鲚 <i>Coilia brachygnathus</i>	CoBr	14.92	3	14.24	4	14.29	5	14.61	5	218	180~269	29	14~51	Pis
鲤形目 Cypriniformes														
鲤科 Cyprinidae														
鳊 <i>Parabramis pekinensis</i>	PaPe			8.57	2	9.34	2	7.22	2	326	288~379	601	344~956	Her
鳊 <i>Hemiculter leucisculus</i>	HeLe	11.14	3	12.08	4	11.44	4	8.81	3	133	107~170	27	12~52	Omn
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	CtId	5.89	3	8.61	3	6.62	3	5.31	1	336	245~470	803	260~2200	Her
赤眼鳟 <i>Squaliobarbus curriculus</i>	SqCu	8.55	1	9.73	2	12.03	1	8.06	1	263	228~293	292	172~415	Omn
达氏鲌 <i>Culter dabryi</i>	CuDa	11.94	4					13.11	2	284	284~284	352	352~352	Pis
鳊 <i>Elopichthys bambusa</i>	ElBa					13.81	1	12.55	2	409	378~458	538	384~816	Pis
银鲃 <i>Pseudolaubuca sinensis</i>	PsSin	8.36	2					6.79	3	229	204~253	135	91~178	Omn
花鲢 <i>Hemibarbus maculatus</i>	HeMa	11.33	2	11.75	2	10.95	1	14.02	1	162	110~249	87	20~211	Ben
鲫 <i>Carassius auratus</i>	CaAu	8.99	4	10.47	3	7.62	4	7.28	3	196	102~320	216	28~547	Omn
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	CyCa	9.68	2	8.62	2	9.61	3	7.67	2	232	201~291	281	186~508	Omn
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	HyMo	10.5	3	12.61	3	8.62	2	7.86	2	290	161~445	461	63~1216	Pla
蒙古鲌 <i>Culter mongolicus</i>	CuMo	12.97	3	13.17	1	13.95	4	12.75	3	283	199~358	291	91~509	Pis
翘嘴鲌 <i>Culter alburnus</i>	CuAl	12.56	4	13.07	5	13.56	5	13.42	5	312	215~475	349	84~1199	Pis
蛇鲡 <i>Saurogobio dabryi</i>	SaDa	10.9	3	12.02	3	11.37	3	8.08	1	159	122~198	40	15~72	Omn
似鳊 <i>Pseudobrama simoni</i>	PsSim	14.47	1	9.98	1	9.42	2			129	115~152	40	18~81	Her
铜鱼 <i>Coreius heterodon</i>	CoHe	15.05	3	14.64	3	16.55	3			263	194~302	241	72~309	Ben
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	MeAm	12.72	1	8.99	2	6.22	2			241	184~310	375	141~764	Her
吻鲡 <i>Rhinogobio typus</i>	RhTy	12.17								230	230~230	134	134~134	Ben
岩原鲤 <i>Procypris rabaudi</i>	PrRa	10	2			10.06	3			182	167~203	139	94~175	Omn
银鲴 <i>Xenocypris argentea</i>	XeAr							7.56	4	222	214~234	187	151~227	Her
银鲡 <i>Squalidus argentatus</i>	SqAr	10.4	2	8.32	1	10.75	2	8.94	1	111	103~123	20	14~32	Omn
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	ArNo			10.11	3	11.73	3	9.49	2	305	205~560	913	140~3100	Pla
圆口铜鱼 <i>Coreius guichenoti</i>	CoGu	8.97	2			9.65	1			214	185~251	168	118~250	Omn
圆筒吻鲡 <i>Rhinogobio cylindricus</i>	RhCy	10.04	3	11.14	1					225	215~245	128	104~177	Ben
中华倒刺鲃 <i>Spinibarbus sinensis</i>	SpSi			10.04	3					228	196~259	274	152~395	Omn

续表

种类 Species	编号 Code	木洞 Mudong		涪陵 Fuling		云阳 Yunyang		秭归 Zigui		体长 Body length/mm		体重 Body weight/g		营养 类型 Nutrition types
		$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	<i>n</i>	平均值 Mean	范围 Range	平均值 Mean	范围 Range	
		鳅科 Cobitidae												
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	PaDa	6.3	1	7.36	1	6.54	1			146	134~162	35	22~54	Omn
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	MiAn	6.48	2	7.06	1	6.54	1	6.39	2	112	99~124	10	9~12	Omn
长薄鳅 <i>Leptobotia elongata</i>	LeEl	11.23	2	11.42	1	9.64	1	12.37	1	199	159~238	98	42~166	Pis
鲇形目 Siluriformes														
鲿科 Bagridae														
粗唇鲿 <i>Leiocassis crassilabris</i>	LeCr	11.77	3					10.33	3	198	198~198	115	115~115	Ben
大鳍鲿 <i>Mystus macropterus</i>	MyMa	11.99	5							198	179~210	57	47~71	Ben
光泽黄颡鱼 <i>Pelteobagrus nitidus</i>	PeNi	9.86	4	11.08	4	9.62	4	11.98	3	122	97~142	21	9~35	Ben
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	PeFu	11.33	2					10.31	3	144	109~188	51	21~95	Ben
瓦氏黄颡鱼 <i>Pelteobagrus vachelli</i>	PeVa	9.55	3	10.66	4	12.02	4	10.46	3	200	167~247	112	63~231	Ben
长吻鲿 <i>Leiocassis longirostris</i>	LeLo			12.33	3	15.18	4			212	182~270	129	63~258	Ben
鲇科 Siluridae														
鲇 <i>Silurus asotus</i>	SiAs	13.12	4	12.59	4	13.08	3	12.23	3	267	200~399	176	52~643	Pis
IV 鲈形目 Perciformes														
鲈科 Serranidae														
大眼鲈 <i>Siniperca kneri</i>	SiKn			13.32	3			11.84	2	205	177~244	180	126~289	Pis
塘鳢科 Eleotridae														
沙塘鳢 <i>Odontobutis obscurus</i>	OdOb			12.4	1	12.99	2			109	87~130	32	14~51	Pis

注: Pis: 肉食性; Ben: 底栖动物食性; Omn: 杂食性; Pla: 浮游生物食性; Her: 草食性。

Note: Pis: Piscivorous; Ben: Benthivorous; Omn: Omnivorous; Pla: Planktivorous; Her: Herbivorous.

## 2.4 鱼类营养级的时空差异

三峡库区干流木洞江段鱼类平均营养级为 2.73, 不同种鱼类之间营养级跨度为 2.7; 涪陵江段鱼类平均营养级为 2.79, 营养级跨度为 2.23; 云阳江段鱼类平均营养级为 2.68, 营养级跨度为 3.04; 秭归江段鱼类平均营养级为 2.44, 营养级跨度为 2.74。单因素方差分析结果显示, 不同江段之间鱼类营养级无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 5)。除肉食性鱼类组合营养级无显著的空间差异外 ( $P>0.05$ ), 其他同种食性鱼类组合营养级均存在一定的空间差异 (表 2)。

三峡库区干流汛期鱼类平均营养级为 2.66, 变化

范围为 1.29~4.05; 枯水期鱼类平均营养级为 2.68, 变化范围为 1.50~4.22。木洞和涪陵江段鱼类食物链长度的季节变异幅度相对较小, 而云阳和秭归江段鱼类食物链长度的季节变异幅度相对较大 (表 3)。配对样本 *t* 检验分析结果显示, 汛期和枯水期的鱼类营养级差异不显著 ( $P>0.05$ ) (图 6)。

## 3 讨论

运用稳定同位素技术开展鱼类营养级的研究中, 通常选择初级生产者或初级消费者等食物网中低营养级生物作为基准生物 (Vander Zanden *et al.*, 1999)。

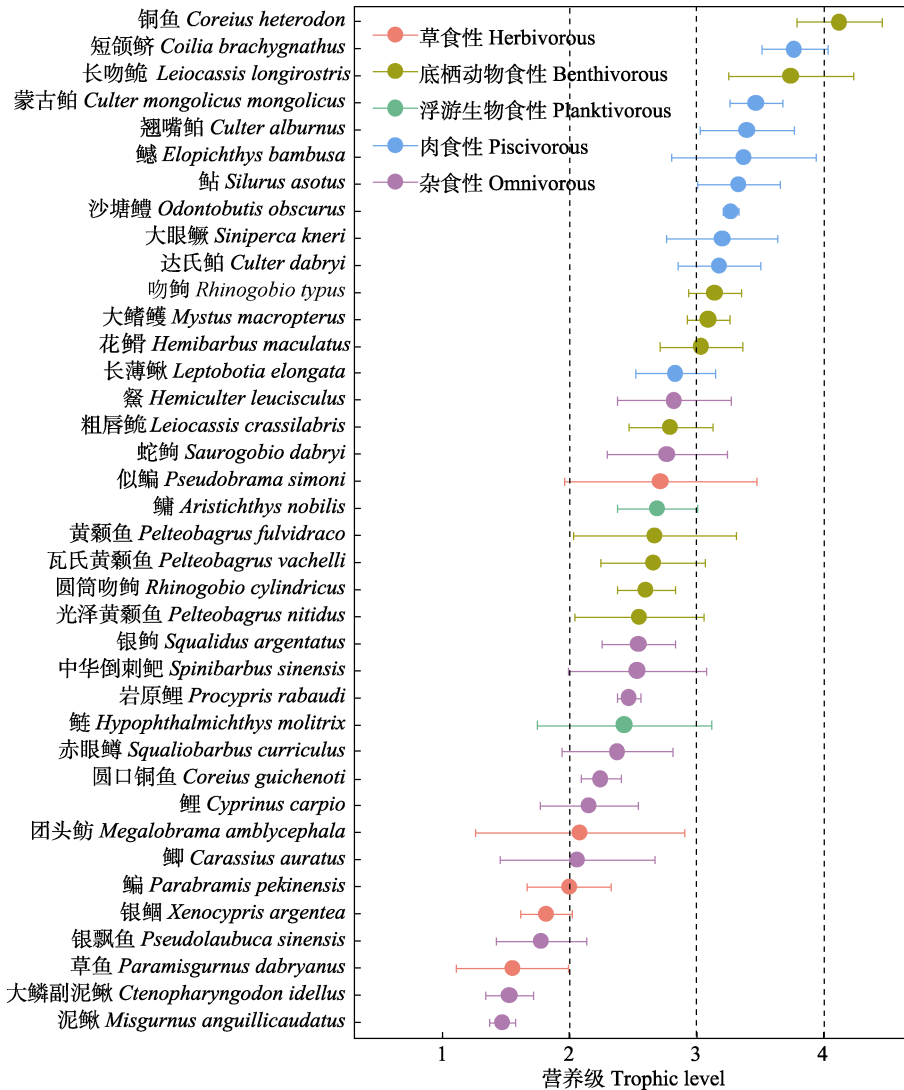


图 3 三峡库区干流鱼类连续营养谱(平均值±标准差)

Fig.3 Continuous nutrition spectra of fish in the mainstream of the Three Gorges Reservoir (Mean±SD)

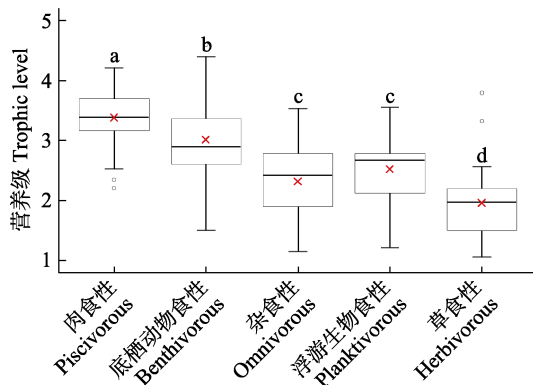


图 4 三峡水库干流不同食性鱼类组合营养级箱型图

Fig.4 Box plots for the trophic level of fish assemblages with different feeding habits in the mains team of the Three Gorges Reservoir

相同字母代表组间无显著差异( $P>0.05$ )。

The same letter indicate that there is no significant difference between the groups ( $P>0.05$ ).

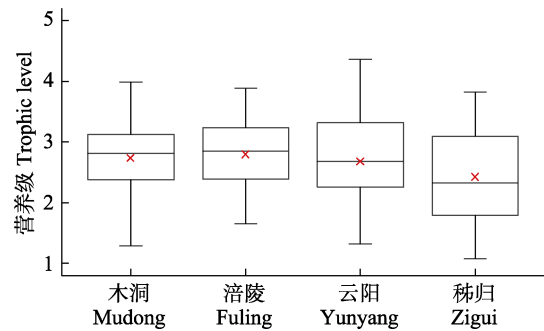


图 5 不同江段鱼类营养级箱型图

Fig.5 Box plots for the trophic level of fish in different river sections

由于浮游动植物等受其生长环境中理化因素的影响较大, 其  $\delta^{15}N$  值时空差异较大, 使用其作为基准生物评估营养级可能会出现较大误差, 而周转率低、寿命长、活动范围小的螺类能够整合一定时间和空间尺度上

表 2 三峡库区干流不同食性鱼类组合营养级差异  
(平均值±标准差)

Tab.2 Differences in trophic level of fish assemblages with different feeding habits in the main stream of the Three Gorges Reservoir area (Mean±SD)

食性类型 Food type	营养级 TL			
	木洞 Mudong	涪陵 Fuling	云阳 Yunyang	秭归 Zigui
肉食性 Piscivorous	3.30±0.37 <sup>a</sup>	3.47±0.27 <sup>a</sup>	3.49±0.36 <sup>a</sup>	3.36±0.55 <sup>a</sup>
底栖动物食性 Benthivorous	2.78±0.53 <sup>b</sup>	3.14±0.54 <sup>ab</sup>	3.35±0.59 <sup>a</sup>	2.78±0.51 <sup>b</sup>
杂食性 Omnivorous	2.38±0.56 <sup>a</sup>	2.57±0.57 <sup>a</sup>	2.32±0.62 <sup>a</sup>	1.78±0.35 <sup>b</sup>
浮游生物食性 Planktivorous	2.64±0.10 <sup>ab</sup>	2.92±0.49 <sup>a</sup>	2.50±0.65 <sup>ab</sup>	2.07±0.35 <sup>b</sup>
草食性 Herbivorous	2.05±0.34 <sup>ab</sup>	2.14±0.16 <sup>a</sup>	1.81±0.55 <sup>ab</sup>	1.60±0.33 <sup>b</sup>

注：不同字母代表组间差异显著(P<0.05)。

Note: Different letters indicate significant difference among the groups (P>0.05).

表 3 三峡库区干流鱼类营养级的时空差异

Tab.3 Spatio-temporal variation of trophic level of fishes in the main stream of the Three Gorges Reservoir area

江段 River section	汛期 Flood season		枯水期 Dry season		ΔFCL
	平均值±标准差 Mean±SD	FCL	平均值±标准差 Mean±SD	FCL	
木洞 Mudong	2.70±0.67	3.96	2.60±0.71	3.97	-0.01
涪陵 Fuling	2.72±0.61	3.81	2.87±0.52	3.79	0.02
云阳 Yunyang	2.57±0.91	4.50	2.82±0.71	4.22	0.28
秭归 Zigui	2.49±0.82	4.00	2.33±0.57	3.48	0.52

注：ΔFCL 为汛期鱼类食物链长度减去枯水期的鱼类食物链长度。

Note: ΔFCL is the food chain length in flood season minus that in dry season.

生产者的同位素特征，因此使用螺类作为基准生物更具优势(Post *et al*, 2002; Wang *et al*, 2013)。本研究测得螺类 δ<sup>15</sup>N 平均值为 8.37‰，高于部分鱼类的 δ<sup>15</sup>N 值，说明以螺类作为基准生物评估鱼类营养级仍然有一定局限，而其他系统的研究中也存在类似的情况(Abrantes *et al*, 2014; 蒋日进等, 2014; 邓华堂等, 2015; Li *et al*, 2015)。对于食物网结构较为复杂的系统来说，其可能包含了诸多不同营养路径的食物链，这使得基准生物的选择更加困难，因此，不同的研究应根据自身所关注的生态学问题与系统特点选择最为

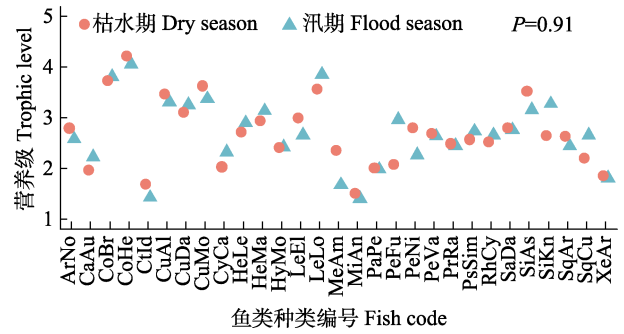


图 6 鱼类营养级的季节差异  
Fig.6 Seasonal differences of trophic level of fish

鱼类种类编号见表 1, P 值为配对样本 t 检验分析结果, 下同。  
the fish codes are shown in Tab.1, P-value is the result of paired sample t-test analysis, the same as below.

合适的同位素基准(徐军等, 2010; Post *et al*, 2002)。由于所选基准生物的不同会对营养级的计算结果产生影响(Xu *et al*, 2011; 史方等, 2016; 田甲申等, 2018)，为了便于和水库蓄水运行初期的研究进行对比，本研究同样选择在三峡库区数量多，分布广，样本易于获取的螺类作为基准生物，以此保证研究结果的可靠性。除木洞江段外，涪陵、云阳及秭归江段螺类 δ<sup>15</sup>N 值汛期显著高于枯水期(P<0.05)，Wang 等(2013)的研究发现，在营养浓度较高的水体中，螺类的 δ<sup>15</sup>N 值也相对较高，而造成螺类的 δ<sup>15</sup>N 值存在差异的原因可能与环境因素有关。由于大部分江段螺类的 δ<sup>15</sup>N 值存在显著的季节差异，因此在计算不同季节鱼类营养级时，本研究基准值选用的是各自季节所采集螺类的 δ<sup>15</sup>N 值(邓华堂等, 2015; Woodland *et al*, 2012)。

三峡库区干流鱼类营养级范围为 1.47 (泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus*)~4.12 (铜鱼)，营养层次为 4 级，而水库蓄水运行初期鱼类营养级范围为 1.29 (草鱼 *Ctenopharyngodon idellus*)~3.55 (鳊 *Siniperca chuatsi*)，营养层次为 3 级(Li *et al*, 2015)。和水库蓄水运行初期的研究结果相比，本研究鱼类食物链长度更长，营养层次更丰富，造成研究结果差异的原因主要与顶级捕食者的种类组成和其营养级差异有关。本研究营养级最高的鱼类为铜鱼，其营养级大于 4 级，且在木洞、涪陵和云阳江段均为顶级捕食者，营养级远高于水库运行初期的研究结果(营养级为 2.63)(Li *et al*, 2015)，陈薛伟杰(2018)近年在库区干流万州江段的研究也表明，铜鱼具有较高的营养级，由于摄食偏好是决定鱼类营养级的重要原因(闫光松等, 2016)，因此，推测造成铜鱼营养级显著升高可能和铜鱼摄食了更高营养级的饵料生物有关。库区干流鱼类营养级

大于 3 级的鱼类种类占 31.6%, 高于水库运行初期的研究结果(23.4%)(Li *et al.*, 2015), 研究结果的差异一方面和鱼类营养级的升高有关, 另一方面反应了库区高营养级鱼类的群落结构和营养特征发生了改变。三峡库区蓄水运行多年以后, 复杂而稳定的食物网结构逐渐形成, 使得库区食物网抵御干扰的能力增强, 加之库区可利用资源充足, 这为高营养级鱼类的生存和扩张提供了适宜的条件(He *et al.*, 2020)。例如, 本研究在调查过程中发现, 原来主要分布于长江中下游的短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)在库区中下游江段为主要的渔获物捕捞对象之一, 并且其种群动态有从库区下游向上游逐渐扩张的趋势, 而在 2013—2015 年库区干流的渔获物调查中(董纯等, 2019)并未发现短颌鲚, 说明短颌鲚是近年开始迅速扩张并逐渐成为优势种的鱼类(魏念等, 2021)。由于外来物种在争夺食物饵料和生存空间方面相对本地鱼类通常处于优势地位(Kolar *et al.*, 2002; 巴家文等, 2012), 因此短颌鲚的扩张可能压缩了原有鱼类的生存空间, 而短颌鲚是仅次于铜鱼的顶级捕食者, 其种群动态可能会对库区食物网营养结构产生影响, 后续需加强关注。本研究与 Li 等(2015)在三峡水库正常蓄水运行初期的研究中均有采集的鱼类有 26 种。通过比较发现, 本研究所测 26 种鱼类的平均营养级显著高于水库蓄水运行初期的研究结果( $P < 0.05$ )(图 7)。由于所选基准生物种类相同且其  $\delta^{15}\text{N}$  值相似, 而鱼类摄食偏好是决定鱼类营养级的重要原因(闫光松等, 2016), 因此, 推测三峡库区鱼类营养级的升高可能主要与鱼类摄食生态的改变有关, 由于水生生物的杂食性和营养塑性普遍存在(巴家文等, 2015), 水库蓄水运行多年后, 库区各种

消费者逐渐适应了库区多变的生态环境, 加之库区可利用资源丰富(汤显强, 2020), 使得库区鱼类更容易捕食优质的饵料生物而降低杂食性, 最终使其营养级升高。

三峡库区干流不同江段鱼类种类组成、鱼类营养级范围、食物链长度以及同种食性鱼类的营养级均存在一定的空间差异, 但整体上不同江段之间鱼类营养级无显著差异( $P > 0.05$ ), 说明库区干流不同江段自身环境特征差异和受大坝影响的程度不同主要造成不同江段鱼类食物网的内部结构存在差异, 而并未使鱼类群落的营养级在河流纵向梯度上存在显著差异。过去的研究表明, 环境变动可能使鱼类所摄食饵料生物的种类组成和比例发生改变, 最终造成营养级的波动(巴家文等, 2015; 高春霞等, 2020)。库区干流不同季节的鱼类营养级发生了一定程度的改变, 但整体上鱼类营养级无显著的季节差异( $P > 0.05$ ), 说明季节变化和水库调度可能改变了同种鱼类的摄食组成并对其营养级产生影响, 但总体上对鱼类群落营养特征的影响有限, 而这可能主要得益于库区干流复杂而稳定的食物网结构和生境异质性缓冲了环境扰动对鱼类营养结构的影响(He *et al.*, 2020)。尽管如此, 水库干流越靠近大坝的江段鱼类食物链长度的季节波动幅度越大, 这在一定程度上说明了越靠近大坝的江段鱼类营养结构受环境干扰的影响越严重。

## 参 考 文 献

- ABRANTES K G, BARNETT A, BOUILLON S. Stable isotope-based community metrics as a tool to identify patterns in food web structure in east African estuaries. *Functional Ecology*, 2014, 28(1): 270–282
- AMEZCUA F, MURO-TORRES V, SOTO-JIMÉNEZ M F. Stable isotope analysis versus TROPH: A comparison of methods for estimating fish trophic positions in a subtropical estuarine system. *Aquatic Ecology*, 2015, 49(2): 235–250
- BA J W, CHEN D Q. Invasive fishes in Three Gorges Reservoir area and preliminary study on effects of fish invasion owing to impoundment. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(2): 185–189 [巴家文, 陈大庆. 三峡库区的入侵鱼类及库区蓄水对外来鱼类入侵的影响初探. *湖泊科学*, 2012, 24(2): 185–189]
- BA J W, DENG H T, DUAN X B, *et al.* Trophic level analysis on main fish species in the middle reaches of Yangtze River by  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(4): 537–546 [巴家文, 邓华堂, 段辛斌, 等. 应用稳定性同位素( $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ )技术研究长江中游干流主要鱼类的营养级. *动物学杂志*, 2015, 50(4): 537–546]
- BAI H Y, WANG Y K, ZHANG T T, *et al.* Trophic levels and

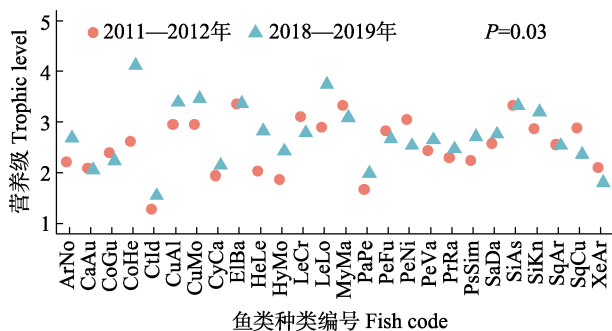


图 7 不同年度鱼类营养级的差异

Fig. 7 Differences in trophic levels of fish in different years

2011—2012 年的数据来自历史资料(Li *et al.*, 2015),

2018—2019 年的数据为本研究实测所得。

Data from 2011 to 2012 are from historical data (Li *et al.*, 2015), and data from 2018 to 2019 are the measured data of this study.

- feeding characters of marine fishes in the Yellow Sea and northern East China Sea based on stable isotope analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 10–17 [白怀宇, 王玉堃, 张廷廷, 等. 基于碳、氮稳定同位素研究黄海及东海北部主要鱼类的营养级和食性. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 10–17]
- CARSCALLEN W M A, VANDENBERG K, LAWSON J M, *et al.* Estimating trophic position in marine and estuarine food webs. *Ecosphere*, 2012, 3(3): 1–20
- CHEN X W J. Studies on fish food web structure and function of Wanzhou section and Xiaojiang River in the Three Gorges Reservoir. Master's Thesis of Guizhou University, 2018 [陈薛伟杰. 三峡库区万州江段和小江鱼类食物网结构与功能研究. 贵州大学硕士研究生学位论文, 2018]
- DENG H T, BA J W, DUAN, X B, *et al.* The analysis of the trophic levels of the major fish species in the Daning River using stable isotope technology. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 893–901 [邓华堂, 巴家文, 段辛斌, 等. 运用稳定同位素技术分析大宁河主要鱼类营养层级. *水生生物学报*, 2015, 39(5): 893–901]
- DING R H. The fishes of Sichuan. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1994 [丁瑞华. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 1994]
- DONG C, YANG Z, GONG Y, *et al.* Fish resource status and biodiversity conservation in the main channel of Three Gorges Reservoir. *Journal of Hydroecology*, 2019, 40(1): 15–21 [董纯, 杨志, 龚云, 等. 三峡库区干流鱼类资源现状与物种多样性保护. *水生态学杂志*, 2019, 40(1): 15–21]
- FROESE R, PAULY D. FishBase [EB/OL]. (2019-8) [2021-5-20]. <https://www.fishbase.de/search.php>
- GAO C X, DAI X J, TIAN S Q, *et al.* Trophic structure of major fishery organisms in the offshore waters of southern Zhejiang: Insights from stable isotope analysis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(4): 438–453 [高春霞, 戴小杰, 田思泉, 等. 基于稳定同位素技术的浙江南部近海主要渔业生物营养级. *中国水产科学*, 2020, 27(4): 438–453]
- HE C, DENG H T, BA J W, *et al.* Food chain length associated with environmental factors affected by large dam along the Yangtze River. *Water*, 2020, 12(11): 3157
- JI W W, LI S F, CHEN X Z. Application of fish trophic level in marine ecosystem. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 878–887 [纪炜炜, 李圣法, 陈雪忠. 鱼类营养级在海洋生态系统研究中的应用. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 878–887]
- JIANG R J, ZHANG S Y, WANG K, *et al.* Stable isotope analysis of the offshore food web of Gouqi Island. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(4): 930–938 [蒋日进, 章守宇, 王凯, 等. 枸杞岛近岸海域食物网的稳定同位素分析. *生态学杂志*, 2014, 33(4): 930–938]
- KOLAR C S, LODGE D M. Ecological predictions and risk assessment for alien fishes in North America. *Science*, 2002, 298(5596): 1233–1236
- LI J, ZHOU Q, YUAN G L, *et al.* Mercury bioaccumulation in the food web of Three Gorges Reservoir (China): Temporal patterns and effect of reservoir management. *Science of the Total Environment*, 2015, 527/528: 203–210
- LIU X J, QIN J J, XU Y, *et al.* Biodiversity decline of fish assemblages after the impoundment of the Three Gorges Dam in the Yangtze River Basin, China. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2019, 29(1): 177–195
- PIMM S L. Food webs. London, UK: Chapman and Hall, 1982
- POST D M. Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology*, 2002, 83(3): 703–718
- POWER M E, HOLOMUZKI J R, LOWE R L. Food webs in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia*, 2013, 719(1): 119–136
- SABO J L, FINLAY J C, POST D M. Food chains in freshwaters. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1162: 187–220
- SHI F, CHEN X J, YANG Z, *et al.* Determination of fish trophic level in Xiaojiang River of Three Gorges Reservoir by stable carbon and nitrogen isotope Analysis. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(4): 70–77 [史方, 陈小娟, 杨志, 等. 三峡水库小江流域鱼类营养层次研究. *水生态学杂志*, 2016, 37(4): 70–77]
- TANG X Q. Evolution, driving mechanism and control strategy for eutrophication in Changjiang River Basin. *Yangtze River*, 2020, 51(1): 80–87 [汤显强. 长江流域水体富营养化演化驱动机制及防控对策. *人民长江*, 2020, 51(1): 80–87]
- TIAN J S, LI D H, WANG B, *et al.* Assessment of the trophic level of main fishery species in coastal waters of Daling River and Yalu River based on stable isotope technique. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(4): 1181–1186 [田甲申, 李多慧, 王摆, 等. 运用稳定同位素技术研究大凌河、鸭绿江近岸海域春季主要生物种类的营养级. *生态学杂志*, 2018, 37(4): 1181–1186]
- VANDER ZANDEN M J, RASMUSSEN J B. Primary consumer  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 1999, 80(4): 1395–1404
- WANG J Z, LI L, XU J, *et al.* Initial response of fish trophic niche to hydrological alteration in the upstream of Three Gorges Dam. *Ecological Processes*, 2016, 5: 11
- WANG S. Structure of fish food webs and energy flow of ecosystems in the East River. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2016 [王赛. 东江鱼类食物网结构与生态系统能流模式研究. 暨南大学博士研究生学位论文, 2016]
- WANG Y Y, YU X B, ZHANG L, *et al.* Seasonal variability in baseline  $\delta^{15}\text{N}$  and usage as a nutrient indicator in Lake Poyang, China. *Journal of Freshwater Ecology*, 2013, 28(3):

- 365–373
- WEI N, ZHANG Y, WU F, *et al.* Current status and changes in fish assemblages in the Three Gorges Reservoir. *Resources and Environment in The Yangtze Basin*, 2021, 30(8): 1858–1869 [魏念, 张燕, 吴凡, 等. 三峡库区鱼类群落结构现状及变化. *长江流域资源与环境*, 2021, 30(8): 1858–1869]
- WOODLAND R J, MAGNAN P, GLÉMET H, *et al.* Variability and directionality of temporal changes in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of aquatic invertebrate primary consumers. *Oecologia*, 2012, 169: 199–209
- WU J G, HUANG J H, HAN X G, *et al.* The Three Gorges Dam: An ecological perspective. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2004, 2(5): 241–248
- WU J G, HUANG J H, HAN X G, *et al.* Three-Gorges Dam - Experiment in habitat fragmentation? *Science*, 2003, 300(5623): 1239–1240
- XU J, ZHANG M, XIE P, *et al.* Variability of stable nitrogen isotopic baselines and its consequence for trophic modeling. *Journal of Lake Sciences*, 2010, 22(1): 8–20 [徐军, 张敏, 谢平. 氮稳定同位素基准的可变性及对营养级评价的影响. *湖泊科学*, 2010, 22(1): 8–20]
- XU J, ZHANG M, XIE P. Sympatric variability of isotopic baselines influences modeling of fish trophic patterns. *Limnology*, 2011, 12(2): 107–115
- XUE Y, JIN X S. Review of the study on feeding habits of fishes and food webs. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(2): 76–87 [薛莹, 金显仕. 鱼类食性和食物网研究评述. *海洋水产研究*, 2003, 24(2): 76–87]
- YAN G S, ZHANG T, ZHAO F, *et al.* A study on trophic level of the major fishery species from the Yangtze Estuary based on stable isotope technology. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(11): 3131–3136 [闫光松, 张涛, 赵峰, 等. 基于稳定同位素技术对长江口主要渔业生物营养级的研究. *生态学杂志*, 2016, 35(11): 3131–3136]
- ZHANG B L, GUO B, YU Y, *et al.* Study of the food-web structure in the Dashentang artificial reef area in Tianjin using a stable isotope technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 25–35 [张博伦, 郭彪, 于莹, 等. 基于稳定同位素技术的天津大神堂海域人工鱼礁区食物网结构研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 25–35]
- ZHANG L. A stable carbon and nitrogen isotopes study of fishes from the Three Gorges riverine of the Yangtze River. Doctoral Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007 [张亮. 长江三峡江段鱼类碳、氮稳定性同位素研究. 中国科学院水生生物研究所博士研究生学位论文, 2007]
- ZHANG S, GAO S K, YU W W *et al.* Research progress of stable carbon and nitrogen isotopes in the construction of marine food web and ecosystem community structure. *Journal of Aquaculture*, 2019, 40(7): 6–10 [张硕, 高世科, 于雯雯, 等. 碳、氮稳定同位素在构建海洋食物网及生态系统群落结构中的研究进展. *水产养殖*, 2019, 40(7): 6–10]

(编辑 马璀艳)

## Trophic Level of Major Fish Species in the Three Gorges Reservoir Based on Nitrogen Stable Isotope Analysis

HE Chun<sup>1,2</sup>, DENG Huatang<sup>2</sup>, WANG Guo<sup>1</sup>, LIU Hanwen<sup>2</sup>, SHEN Ziwei<sup>2</sup>,  
LIU Shaoping<sup>2</sup>, DUAN Xinbin<sup>2</sup>, CHEN Daqing<sup>2</sup>, LI Yun<sup>1①</sup>

(1. *Institute of Three Gorges Ecological Fisheries of Chongqing, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China*; 2. *Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of the Upper-Middle Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Wuhan, Hubei 430223, China*)

**Abstract** Trophic level, a basic and measurable feature in complex food networks, represents the position of organisms in the ecosystem and reflects the vertical structure of the food web. The study of trophic levels is used to interpret sophisticated ecological relationships through simplified functional groups and is of great significance to the construction of ecosystem models and the study of nutrient cycling. The construction of the Three Gorges Dam and the operation of the reservoir have fragmented the

① Corresponding author: LI Yun, E-mail: aquatics@swu.edu.cn



river ecosystem. The influences of reservoir storage and operation vary between river sections with disparate geomorphic characteristics. Environmental heterogeneity may cause temporal and spatial variation in the structure of the fish community of each section of the mainstream from the reservoir. After two decades, research on fish trophic levels has mainly focused on the initial stage of storage and operation of the reservoir, while information on the fish trophic level in the mainstream remains scarce. To evaluate the long-term spatiotemporal variation in fish trophic levels in the Three Gorges Reservoir, nitrogen stable isotopes of 38 fish species and three snail species were collected from the Mudong, Fuling, Yunyang, and Zigui river sections of the main stream of the Three Gorges Reservoir from July 2018 to January 2019, and the continuous spectra of fish species trophic levels in the reservoir were constructed based on stable isotope analysis. The results showed that the average  $\delta^{15}\text{N}$  value of snails was 8.37‰, ranging from 8.29‰ to 8.53‰, and there was no significant spatial difference between the river sections. Except for the Mudong section, the  $\delta^{15}\text{N}$  values of snails in the other river sections were significantly higher in the flood season than in the dry season. Nitrogen stable isotope analysis of fish samples showed that the average value ranged from 5.31‰ to 17.79‰, with an average of 11.02‰. Taking snails as the baseline organism, fish trophic levels were calculated for each river section according to season, and the results showed that the average trophic level of fish species in the reservoir area was 2.67, ranging from 1.47 to 4.12. There was only one fish species with a trophic level higher than 4; 12 species of fish (31.6%) with trophic levels between 3 and 4, mainly piscivorous and benthivorous fish; 19 species of fish (50.0%) with trophic levels between 2 and 3, mainly omnivorous, benthivorous, and planktivorous fish; and six species of fish (15.8%) with trophic levels between 1 and 2, including three herbivorous and three omnivorous fish species. The trophic levels of fish combinations with different feeding habits varied, and were found to be piscivorous > benthivorous > planktivorous fish and omnivorous > herbivorous fish, indicating that fish feeding preference was one of the key factors determining the trophic level of fish. Between different river sections, there were differences in the range of fish trophic levels, food chain length, and trophic levels of fish combinations with the same feeding habits. However, there was no significant spatial difference in the trophic level of the fish community among the river sections. A paired sample *t*-test showed that there was no significant difference in fish trophic levels between the flood and dry seasons. Within the same river section, the seasonal fluctuation in food chain length decreased with distance from the dam. Compared with the initial stage of reservoir impoundment, the fish trophic level increased significantly, and the community structure and trophic characteristics of high trophic-grade fish changed to a certain extent. In particular, *Coilia brachygnathus* with higher trophic levels gradually expanded and became the dominant species in the mainstream of the reservoir area, which might affect the trophic structure of fish in the greater Three Gorges Reservoir area. The results of this study provide a reference for the assessment, protection, and rational utilization of fishery resources in the Three Gorges Reservoir area.

**Key words** Fishes; Stable isotope; Three Gorges Reservoir area; Trophic level; Continuous nutrition spectra

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210412001

http://www.yykxjz.cn/

李哲, 李雨, 敬庭森, 刘小莉, 闫卉果, 陆安帅, 周剑, 罗辉, 叶华. 长吻鲢单核苷酸多态性标记与生长性状关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 127-135  
LI Z, LI Y, JING T S, LIU X L, YAN H G, LU A S, ZHOU J, LUO H, YE H. Correlation analysis of SNP markers and growth traits of *Leiocassis longirostris*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 127-135

# 长吻鲢单核苷酸多态性标记与生长性状关联分析\*

李哲<sup>1</sup> 李雨<sup>1</sup> 敬庭森<sup>1</sup> 刘小莉<sup>1</sup> 闫卉果<sup>1</sup>  
陆安帅<sup>1</sup> 周剑<sup>2</sup> 罗辉<sup>1</sup> 叶华<sup>1①</sup>



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

**摘要** 为开发长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)生长性状相关的分子标记, 为其分子辅助育种提供基础资料, 以 115 尾长吻鲢为研究对象, 运用 57 个单核苷酸多态性标记(SNPs)位点与体重、全长、体长和头高进行关联分析。结果显示, 有 10 个 SNPs 位点与生长性状显著相关, 其中 3 个 SNPs 位点(*Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_111833* 和 *Cluster-65\_137642*)对所测量的 4 个生长性状均有显著影响( $P<0.05$ ); 3 个 SNPs 位点(*Cluster-65\_120392*、*Cluster-65\_5592\_0* 和 *Cluster-65\_105077*)对体重、全长和体长有显著影响( $P<0.05$ ); *Cluster-65\_110382* 对全长、体长和头高有显著影响( $P<0.05$ ); *Cluster-65\_19497* 和 *Cluster-24304\_1* 对全长和体长有显著影响( $P<0.05$ ); *Cluster-65\_130153* 对体长和头高有显著影响( $P<0.05$ )。此外, *Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_111833*、*Cluster-65\_110382* 和 *Cluster-65\_137642* 分别与阴离子交换蛋白 2 样亚型 X1 (anion exchange protein 2-like isoform X1)神经突起导向因子 4 样(*netrin-4-like*)、酪氨酸蛋白激酶 Tec 亚型 X2 (tyrosine-protein kinase Tec isoform X2)和氨甲酰磷酸合成酶 1 (carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial, CPS1)相似度最高, 表明这 4 个基因可能参与调控了长吻鲢的生长。对与生长相关的 10 个 SNPs 位点进行多态性检测, 平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.537 和 0.467, 平均多态信息含量为 0.357。本研究为长吻鲢的遗传改良和选择育种提供了基础资料, 并首次发现了 4 个可能与长吻鲢生长相关的基因。

**关键词** 长吻鲢; SNP; 生长性状; 关联分析

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0127-09

长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)俗称鲢鱼, 属鲢形目(Siluriformes)、鲢科(Bagruidae)、鲢属(*Leiocassis*), 因其吻部较一般鱼长, 故名长吻鲢(邓楠楠等, 2018)。长吻鲢肉质细嫩, 口感爽滑, 且肌间刺少, 非常鲜美,

民间素有“不食江团, 不知鱼味”之说, 特别是长吻鲢的鳔十分肥厚, 干制成“鱼肚”是享誉中外的珍肴(Liang *et al.*, 2016; 吴清江, 1975)。长吻鲢背部呈黑色, 腹部灰白色, 是一种温水型鱼类, 多分布于我国

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

① 通信作者: 叶华, 教授, E-mail: yhlh2000@126.com

收稿日期: 2021-04-12, 收修改稿日期: 2021-05-12

长江干流、通江湖泊和各大支流的下游水域(Shen *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2005)。但由于人工捕捞、水利工程建设等影响,野生长吻鮠资源急剧衰减,从而影响了长吻鮠生态资源的保存(Yang *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2011)。因此,为保证长吻鮠养殖产业的可持续发展,开展长吻鮠的良种选育刻不容缓。

研究表明,相对于传统育种,分子标记辅助育种可以提高育种速度近 11% (Gomez-Raya *et al.*, 1999)。单核苷酸多态性(SNPs)是第 3 代分子标记技术,具有高遗传稳定性、高密度、便于自动化分析等优点,已被广泛应用于群体遗传学、遗传图谱构建、个体识别、亲缘关系鉴定和分子标记辅助育种的研究中(Vignal *et al.*, 2002)。关联分析能将分子标记的遗传变异与生长性状联系起来,是实现分子标记辅助育种的有效方法(董玉等, 2016)。目前,运用关联分析筛选与生长性状相关联的 SNPs 标记已在农作物(李兆波等, 2010)和家畜(石磊等, 2007)中广泛开展,也在水产动物中得到了广泛应用,多位学者先后进行了 SNP 标记与中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)(李纯, 2017)、建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)(陶文静等, 2011)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(王春晓等, 2015)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)(张猛, 2016)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)(李胜杰等, 2018)、刺参(*Apostichopus japonicus*)(刘安然等, 2019)等水产动物生长性状的关联分析。

本研究随机挑选同批繁殖的长吻鮠作为研究对象,从本实验室构建的长吻鮠肝脏转录组数据库中随机挑选 57 个 SNP,并分析这些 SNPs 位点与长吻鮠生长性状(体重、全长、体长和头高)的相关性,以期为长吻鮠分子辅助育种和遗传改良提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用材料取自四川省农科院水产研究所的四川岷江中游珍稀鱼类保护基地,随机选取 115 尾同批次人工繁殖且饲养条件一致的 14 月龄的长吻鮠,经浓度为 100 mg/L 的丁香酚溶液麻醉后,测定其体重、全长、体长和头高,并剪取部分背鳍保存于无水乙醇中备用。

### 1.2 SNP 标记开发

本研究所用的 SNP 来自本实验室从长吻鮠肝脏转录组数据开发的 SNP(未发表),随机挑选 57 个与氨基酸代谢、发育、内分泌系统、能量代谢、碳水化

合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等相关基因的 SNP 用于基因分型。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 基因组 DNA 提取** 剪取 20 mg 左右的鳍条,采用上海生工 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽取试剂盒提取基因组 DNA,操作参照说明进行。采用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并在 4℃ 保存。

**1.3.2 SNPs 分型检测** 根据 SNP 位点序列信息,使用 Sequenom 公司的引物设计软件 Assay design 3.1,设计 PCR 反应和单碱基扩展引物合成。PCR 反应体系为 5  $\mu$ L: 1.75  $\mu$ L 超纯水, 0.625  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer (含 15 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>), 0.1  $\mu$ L dNTP Mix, 0.325  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L Primer Mix, 0.2  $\mu$ L HotStar *Taq*, 1  $\mu$ L DNA。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, 退火温度 56℃ 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 45 个循环; 72℃ 终延伸 3 min, 4℃ 保存。为了消除 PCR 扩增产物中多余的 dNTP 和引物,进行 SAP 消化,反应体系为 2  $\mu$ L: 1.53  $\mu$ L 超纯水, 0.17  $\mu$ L 的 10 $\times$ SAP buffer, 0.3  $\mu$ L 浓度为 1.7 U/ $\mu$ L 的 SAP。SAP 反应程序: 37℃ 消化 40 min, 最后 85℃ 灭活 5 min, 保存于 4℃。采用延伸反应对 SNP 进行多重单碱基延伸,反应体系为 2  $\mu$ L: 0.76  $\mu$ L 超纯水, 0.2  $\mu$ L 10 $\times$ iPLEX buffer plus, 0.2  $\mu$ L iPLEX terminator, 0.8  $\mu$ L Primer Mix, 0.04  $\mu$ L iPLEX 酶。延伸反应程序: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 5 s; 退火温度 52℃ 5 s, 80℃ 延伸 5 s, 按 1 次变性循环 5 次退火和延伸循环的方式,共 45 个循环; 72℃ 终延伸 3 min, 于 4℃ 保存。最后将反应产物(共 9  $\mu$ L)稀释 3 倍,树脂脱盐,将脱盐后的样品点在样品靶上,自然结晶,MassARRAY 质谱仪进行质谱检测,采用 MassARRAY typer4 对 SNP 进行分型检测。

### 1.4 数据处理

**1.4.1 遗传特性分析** 采用 POPGENE 3.2 计算观测杂合度、期望杂合度和表示 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)偏差的 *P* 值。多态性信息含量(PIC)由 Botstein 等(2014)提出的公式计算。

**1.4.2 SNPs 与性状的关联分析** 采用 SPSS 20.0 对长吻鮠体重、全长、体长和头高进行正态分布检验与相关性检测。然后进行其生长性状的主成分分析,按累计贡献率 85%提取主成分。采用 *T* 检验分析各 SNP 位点与生长性状的相关性,并用 Duncan 法进行多重比较分析,在 0.05 水平下检测显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长性状分布

运用 SPSS 20.0 对 115 尾长吻鲢体重、全长、体长和头高进行正态分布检验。本研究所用实验鱼平均体重为 154.107 g, 平均全长、体长和头高分别为 26.431、21.316 和 3.668 cm。正态分布检验结果显示各性状的  $P$  值均大于 0.05, 符合正态分布, 均具有连续遗传变异的特点(表 1)。

### 2.2 各性状相关性和主成分分析

对 115 尾长吻鲢的生长性状进行降维处理, 结果如表 2 所示。按照选择  $k$  个较大特征值来满足主成分的累计贡献率大于 85% 的要求, 长吻鲢提取 1 个主成分便满足了入选主成分的条件。长吻鲢生长的第一主

成分的特征值是 3.665, 累计贡献率为 91.617%。由性状的第一主成分的成份矩阵可知, 第一主成分可称为增长、增重因子(表 3)。

对长吻鲢体重、全长、体长和头高进行相关性检验。结果显示, 体长和全长的相关系数最高, 达到 0.964; 体长和头高的相关系数最低, 为 0.827。各性状之间具有极显著的相关性( $P < 0.01$ )(表 3)。

### 2.3 SNPs 位点与生长性状的相关性

运用 SPSS 20.0 对 57 个 SNPs 位点与体重、全长、体长和头高进行连锁显著性分析,  $T$  检验结果以及与生长性状相关的 SNP 位点引物信息如表 4 所示。在随机挑选的 57 个 SNPs 中, 共有来自氨基酸代谢、发育、内分泌系统、碳水化合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等基因的 10 个 SNPs 位点对生长性状

表 1 长吻鲢体重、全长、体长和头高的正态分布检验

Tab.1 Normal distribution of body weight, total length, body length, and head height of *L. longirostris*

性状 Traits	平均值±标准差 Mean±SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	$P$ 值 $P$ value
体重 Body weight /g	154.107±47.111	0.267	-0.501	54.900	285.300	0.169
全长 Total length /cm	26.431±2.579	-0.299	-0.369	19.800	31.300	0.200
体长 Body length /cm	21.316±2.234	-0.392	-0.236	15.700	25.400	0.200
头高 Head height /cm	3.668±0.440	0.003	-0.482	2.600	4.700	0.200

表 2 长吻鲢生长性状的主成分分析

Tab.2 Principle component analysis on growth traits of *L. longirostris*

成份 Component	初始特征值 Initial component			提取平方和载入 Sum of squares of extracted component		
	合计 Total	方差百分比 Variance ratio /%	累积方差百分比 Accumulative variance ratio /%	合计 Total	方差百分比 Variance ratio /%	累积方差百分比 Accumulative variance ratio /%
1	3.665	91.617	91.617	3.665	91.617	91.617
2	0.221	5.529	97.146			
3	0.079	1.974	99.120			
4	0.035	0.880	100.000			

表 3 长吻鲢体重、全长、体长和头高的相关性检验及性状的成份矩阵

Tab.3 Correlation test on body weight, total length, body length, and head height and component matrix on growth traits of *L. longirostris*

性状 Traits	体重 Body weight	全长 Total length	体长 Body length	头高 Head height	成份矩阵 Component matrix
体重 Body weight	1.000	0.936**	0.926**	0.839**	0.968
全长 Total length		1.000	0.964**	0.831**	0.976
体长 Body length			1.000	0.827**	0.972
头高 Head height				1.000	0.911

注: \*\*表示两两性状之间差异极显著( $P < 0.01$ )。

Note: \*\* indicates significant correlation between two traits at 0.01 level.

产生了显著影响( $P<0.05$ )。

消化系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_137265*、发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_111833* 和氨基酸代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_137642* 对所测量的 4 个生长性状均有显著影响( $P<0.05$ )。内分泌系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_120392*、发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_105077* 和细胞生长与死亡相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_5592\_0* 对体重、全长和体长有显著影响( $P<0.05$ )。发育相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_110382* 对全长、体长和头高有显著影响( $P<0.05$ )。氨基酸代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_19497* 和消化系统相关基因的 SNP 位点 *Cluster-24304\_1* 对全长和体长有显著影响( $P<0.05$ )。碳水化合物代谢相关基因的 SNP 位点 *Cluster-65\_130153* 对体长和头高有显著影响( $P<0.05$ )。

在这 10 个 SNPs 位点中, 5 个 SNPs 位点(*Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_5592\_0*、*Cluster-65\_130153*、*Cluster-65\_137642* 和 *Cluster-65\_19497*) 的纯合突变基因型个体在体重、全长、体长和头高的均值均大于杂合突变基因型和未发生突变的个体。此外, 在 2 个 SNPs 位点(*Cluster-65\_110382* 和 *Cluster-24304\_1*) 中, 未发生突变的个体在体重、全长、体长和头高的均值均大于杂合突变基因型和纯合突变基因型的个体。

#### 2.4 SNPs 位点多态性分析及注释信息

10 个 SNPs 位点的多态性检测结果及所在基因序列注释信息见表 5。10 个 SNPs 位点的观测杂合度范围为 0.350~0.781, 期望杂合度范围为 0.411~0.502, 平均值分别为 0.537 和 0.467。在 10 个 SNPs 位点中, *Cluster-65\_120392*、*Cluster-24304\_1*、*Cluster-65\_110382* 和 *Cluster-65\_19497* 这 4 个位点出现极显著偏离哈代-温伯格平衡的现象( $P<0.01$ ), *Cluster-65\_130153* 出现显著偏离哈代-温伯格平衡的现象( $P<0.05$ )。此外, 10 个 SNPs 位点均具有中度多态性( $0.25 \leq \text{PIC} < 0.5$ )。将 10 个与生长性状显著关联的 SNPs 位点所处基因的序列在 NCBI 在线数据库中进行 BLASTn 分析, 详细的 unigene 注释信息见表 5。

### 3 讨论

#### 3.1 长吻鲩 SNP 标记开发

SNPs 是基因组中分布最稳定的点突变, 且它比微卫星等重复序列多态标记具有更高的遗传稳定性。研究表明, 使经济性状产生差异的 SNPs 位点对分子

标记辅助育种具有重要意义(Feng *et al*, 2008), 这也使得 SNPs 与生长性状的关联分析广泛应用于分子标记辅助育种。曹婷婷等(2012)分析与草鱼消化能力相关的羧肽酶 A 部分片段中的 2 个 SNPs 的多态性, 发现 *A36C* 位点与增重具有显著相关性。陈雪峰等(2010)分析吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中控制生长和脂肪沉积的胰岛素生长因子 2 中的 SNPs 的多态性, 发现外显子 *3161 nt* 在雄鱼中与增重显著相关。杨月静等(2018)基于转录组测序得到的 SNPs 位点, 随机挑选了 26 个 SNPs 位点, 结果表明 4 个 SNPs 位点对齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)的生长性状有显著影响, SNP 标记准确率为 15.38%, 其中, *ug25050-0-1678* 和 *ug22712-0-2452* 对增重有显著影响。本研究从本实验室开发的 SNPs 位点, 随机挑选 57 个 SNPs 位点, 结果表明, 10 个 SNPs 位点对长吻鲩生长性状有显著影响, SNP 标记准确率为 17.54%, 这高于杨月静等(2018)和李胜杰等(2018)的研究结果, 这是因为在挑选 SNPs 位点时, 存在不确定性和随机性。

遗传杂合度和多态信息含量是测量和评价遗传标记效用的参数, 一般认为, PIC 是衡量基因变异程度高低的较好指标(Beacham *et al*, 2004; Kalinowski *et al*, 2002)。本研究筛选得到 10 个与生长性状相关的 SNPs 位点, 均达到中度多态性。这一结果与在齐口裂腹鱼(杨月静等, 2018)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (王婷等, 2014)、大口黑鲈(李胜杰等, 2018) 中的研究结果一致, 即 SNPs 位点的 PIC 均属于低度多态性和中度多态性。这是因为 SNP 标记是一种典型的两等位基因标记, 不具有微卫星标记的高多态性特点, 但 SNP 在基因组中广泛存在, 弥补了多态性较低的不足(Emahazion *et al*, 1999; Wang *et al*, 1998)。

#### 3.2 SNP 标记与长吻鲩生长性状的相关性

SNP 标记与长吻鲩生长性状的相关性分析显示, 有 9 个 SNPs 位点和长吻鲩全长显著相关, 表明长吻鲩的全长受多个基因(位点)控制, 存在基因连锁或多因一效的现象, 符合同一数量性状是由多对基因控制的理论(董玉等, 2016; 喻树迅等, 2002)。此外, 本研究选取了与氨基酸代谢、发育、内分泌系统、能量代谢、碳水化合物代谢、细胞生长与死亡和消化系统等相关基因的 SNP, 在最终结果中, 来自氨基酸代谢、发育、内分泌系统、细胞生长与死亡和消化系统相关基因的 6 个 SNPs 位点对长吻鲩体重显著相关, 符合鱼类的生长是由多种生理途径调控的理论(Santis *et al*, 2007)。同时, 本研究中, 10 个 SNPs 位点均与长吻鲩

表 4 长吻鲮 SNPs 位点基因型与生长性状的关联分析及引物信息  
Tab.4 The primer information and correlation analysis between genotypes of SNPs and growth traits of *L. longirostris*

编号 No.	突变碱基 SNP	序列 Primer sequence (5'~3')	分型 Genotype	数目 Number	体重 Body weight/g	全长 Total length/cm	体长 Body length/cm	头高 Head height/cm
Cluster-65_105077	A/G	F: ACGTTGGATGAGAAACCAAGTCCGAACCCAC	GG	39	137.641±42.242 <sup>a</sup>	25.482±2.577 <sup>a</sup>	20.700±2.226 <sup>a</sup>	3.574±0.433 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGTGATAAAGCCGGTGTGATCC	AG	62	161.995±48.224 <sup>b</sup>	26.932±2.529 <sup>b</sup>	21.616±2.295 <sup>b</sup>	3.718±0.440 <sup>a</sup>
		E: AACCACCAACCCAGGTCAC	AA	14	165.043±45.777 <sup>ab</sup>	26.857±2.195 <sup>ab</sup>	21.700±1.693 <sup>ab</sup>	3.707±0.446 <sup>a</sup>
Cluster-65_120392	C/T	F: ACGTTGGATGGACATTAACATCCCTGTGCC	CC	20	155.775±45.057 <sup>ab</sup>	26.780±2.667 <sup>a</sup>	21.705±2.085 <sup>a</sup>	3.645±0.438 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGGTGTAAAGTTAGCGTCTCC	TT	15	127.807±44.920 <sup>a</sup>	24.673±2.496 <sup>b</sup>	19.947±2.091 <sup>b</sup>	3.507±0.509 <sup>a</sup>
		E: TGAGCCACCTTTGCCGTAAC	TC	66	158.327±45.066 <sup>b</sup>	26.620±2.482 <sup>a</sup>	21.397±2.258 <sup>a</sup>	3.686±0.423 <sup>a</sup>
Cluster-65_137265	G/T	F: ACGTTGGATGAAAGGTGCATGCGTAGAGTG	GT	43	138.214±46.964 <sup>a</sup>	25.465±2.674 <sup>a</sup>	20.495±2.165 <sup>a</sup>	3.549±0.449 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGATGTGCTGCTTCTGATGCC	TT	61	164.256±44.144 <sup>b</sup>	27.080±2.386 <sup>b</sup>	21.979±1.972 <sup>b</sup>	3.749±0.411 <sup>b</sup>
		E: TCCAAAATATCACCCGGACCAT	GG	11	159.955±50.930 <sup>ab</sup>	26.609±2.241 <sup>ab</sup>	20.845±2.842 <sup>ab</sup>	3.682±0.494 <sup>ab</sup>
Cluster-65_19497	C/T	F: ACGTTGGATGCTATCGCTCACCTCCTCAG	CT	86	154.512±46.150 <sup>a</sup>	26.513±2.608 <sup>a</sup>	21.402±2.206 <sup>a</sup>	3.676±0.455 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGTATGACTGAAGACTCGGTG	CC	15	135.087±42.340 <sup>a</sup>	25.067±2.203 <sup>b</sup>	20.033±2.202 <sup>b</sup>	3.520±0.388 <sup>a</sup>
		E: TCTCTCCTGAGAGCTCAGCAGT	TT	9	165.511±36.877 <sup>a</sup>	27.356±2.043 <sup>a</sup>	22.122±1.686 <sup>a</sup>	3.733±0.255 <sup>a</sup>
Cluster-24304_1	T/C	F: ACGTTGGATGCGGTAATGACAGGACCAAAAC	CC	18	143.722±39.081 <sup>a</sup>	25.578±1.943 <sup>a</sup>	20.439±1.956 <sup>a</sup>	3.572±0.468 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGCAGATGTGCAGGGTAA GAAC	TC	87	153.584±48.810 <sup>a</sup>	26.408±2.660 <sup>a</sup>	21.340±2.275 <sup>ab</sup>	3.671±0.436 <sup>a</sup>
		E: GTGGTGTGTGCTGGAGACC	TT	10	177.350±40.552 <sup>a</sup>	28.170±2.170 <sup>b</sup>	22.680±1.711 <sup>b</sup>	3.810±0.420 <sup>a</sup>
Cluster-65_110382	T/C	F: ACGTTGGATGAACTCTGACCTGATGTCTCC	CC	33	163.209±45.108 <sup>a</sup>	26.748±2.305 <sup>ab</sup>	21.670±1.900 <sup>ab</sup>	3.770±0.409 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGACTTGCCATGCAACCAATTG	TC	74	147.618±47.763 <sup>a</sup>	26.072±2.679 <sup>a</sup>	20.972±2.358 <sup>a</sup>	3.586±0.441 <sup>b</sup>
		E: TGGCCATCTACATCACACAC	TT	8	176.588±40.496 <sup>a</sup>	28.450±1.645 <sup>b</sup>	23.038±1.272 <sup>b</sup>	4.000±0.334 <sup>a</sup>
Cluster-65_111833	A/G	F: ACGTTGGATGGCCATTGTGATCAGTGTGTG	GG	13	164.677±56.700 <sup>ab</sup>	26.785±2.546 <sup>ab</sup>	21.262±2.584 <sup>ab</sup>	3.746±0.489 <sup>ab</sup>
		R: ACGTTGGATGACTTGCCATGCAACCAATTG	AG	40	139.888±43.220 <sup>a</sup>	25.478±2.482 <sup>a</sup>	20.445±2.136 <sup>a</sup>	3.513±0.401 <sup>a</sup>
		E: CCCTGGCCACACCCCAATC	AA	62	161.065±45.994 <sup>b</sup>	26.973±2.510 <sup>b</sup>	21.889±2.066 <sup>b</sup>	3.752±0.433 <sup>b</sup>
Cluster-5592_0	C/T	F: ACGTTGGATGAGTGTGGTGAGACCTTTGAC	CT	56	145.905±45.270 <sup>a</sup>	25.939±2.608 <sup>a</sup>	20.909±2.191 <sup>a</sup>	3.600±0.414 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGGCAGCAGCACTGAACACAACAAC	CC	28	160.579±44.968 <sup>ab</sup>	26.593±2.005 <sup>ab</sup>	21.404±1.993 <sup>ab</sup>	3.718±0.443 <sup>a</sup>
		E: CAGTAGGAGCTTCATGCACAGAGA	TT	28	168.257±50.247 <sup>b</sup>	27.321±2.764 <sup>b</sup>	22.086±2.363 <sup>b</sup>	3.746±0.467 <sup>a</sup>
Cluster-65_137642	A/G	F: ACGTTGGATGACAGTGGTGGTGAACCAACA	AA	53	144.709±45.839 <sup>a</sup>	26.040±2.645 <sup>a</sup>	20.974±2.317 <sup>a</sup>	3.581±0.473 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGGCGTCAGCTCCTCGAAATAG	AG	47	157.257±46.915 <sup>ab</sup>	26.521±2.498 <sup>ab</sup>	21.368±2.143 <sup>ab</sup>	3.721±0.418 <sup>ab</sup>
		E: AACCACAACCCAGAGAC	GG	14	184.393±38.275 <sup>b</sup>	27.957±1.823 <sup>b</sup>	22.714±1.509 <sup>b</sup>	3.864±0.259 <sup>b</sup>
Cluster-65_130153	G/T	F: ACGTTGGATGCAGCTCACTGGAACAAAATG	GT	17	139.429±42.790 <sup>a</sup>	25.535±2.255 <sup>a</sup>	20.341±2.186 <sup>a</sup>	3.471±0.409 <sup>a</sup>
		R: ACGTTGGATGGATTAGCCATTTCCACAAAAGG	GG	41	152.153±47.713 <sup>a</sup>	26.278±2.430 <sup>a</sup>	21.273±2.030 <sup>ab</sup>	3.654±0.434 <sup>ab</sup>
		E: CTTTAAAGCAAAATTACATGCTGTATA	TT	57	159.889±47.111 <sup>a</sup>	26.809±2.732 <sup>a</sup>	21.637±2.336 <sup>b</sup>	3.737±0.440 <sup>b</sup>

注: 同列中不同的小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The different superscript lowercase letters within the same column mean significantly difference at 0.05 level.

表5 长吻鲈10个SNPs位点的特征及注释信息

Tab.5 The features and gene annotation prediction of 10 SNPs of *L. longirostris*

编号 No.	观测杂合度 $H_O$	期望杂合度 $H_E$	H-W 平衡 $P_{HWE}$	多态信息含量 PIC	预测基因名称 Predicted gene name
Cluster-65_105077	0.542	0.477	0.134	0.362	Semaphorin-4C-like
Cluster-65_120392	0.657	0.502	0.001	0.375	G2/mitotic-specific cyclin-B3-like isoform X1
Cluster-65_137265	0.375	0.411	0.330	0.326	Anion exchange protein 2-like isoform X1
Cluster-24304_1	0.758	0.499	0.000	0.374	Collagen alpha-1(VII) chain-like
Cluster-65_110382	0.642	0.477	0.000	0.362	Tyrosine-protein kinase Tec isoform X2
Cluster-65_111833	0.350	0.415	0.085	0.328	Netrin-4-like
Cluster-65_19497	0.781	0.500	0.000	0.374	N-acetylglutamate synthase, mitochondrial
Cluster-5592_0	0.513	0.502	0.817	0.375	Putative ATP-dependent RNA helicase an3-like isoform X1
Cluster-65_137642	0.403	0.448	0.273	0.347	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial
Cluster-65_130153	0.350	0.441	0.024	0.343	6-Phosphofructokinase, liver type-like
均值 Mean	0.537	0.467	0.166	0.357	

2个及以上的生长性状显著相关,例如,3个SNPs位点(*Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_111833*和*Cluster-65\_137642*)对所测量的4个生长性状均有显著影响,表明体重、全长、体长和头高4种生长性状之间存在一定的相关性,这对长吻鲈不同生长性状的间接良种选育具有重要意义(董玉等,2016)。其次,对长吻鲈生长性状的主成分分析结果表明,体重是长吻鲈生长性状的第1主成分,且累计贡献率超过92%,表明直接运用对长吻鲈体重产生显著影响的SNPs位点可以在保证标记准确性的前提下有效节约成本。本研究中对长吻鲈生长性状产生显著影响的SNPs位点有10个,但仅有6个SNPs位点(*Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_111833*、*Cluster-65\_137642*、*Cluster-65\_120392*、*Cluster-65\_5592\_0*和*Cluster-65\_105077*)对长吻鲈的体重产生显著性影响,在实际应用中可利用这6个SNPs标记对长吻鲈进行良种选育。

目前,利用SNPs位点与生长性状关联分析发掘与生长相关的基因也得到了应用。在李胜杰等(2018)的研究中,发现*CL1452.Contig9.All-847*标记所处的基因序列与RILP like protein相似,并推测RILP基因是大口黑鲈生长相关的功能基因。本研究中,*Cluster-65\_110382*标记所处的基因序列与酪氨酸蛋白激酶Tec亚型X2 (tyrosine-protein kinase Tec isoform X2)相似度最高。钟明贵等(2006)的研究表明,在小鼠(*Mus musculus*)的肝脏中,Tec和Stat3同时发生活化,提示Tec可能参与了HGF介导的Ras-MPAK-REK1/2信号转导途径,从而影响细胞分裂增殖、分化及离散等变化。在本研究中,该标记的TT基因型

在体重、全长、体长和头高的均值均高于TC和CC基因型,表明该标记的突变可能影响了基因表达产物对细胞的分裂增殖的调控,从而调控了长吻鲈的生长。此外,*Cluster-65\_137265*、*Cluster-65\_111833*和*Cluster-65\_137642*位点对所测量的4个生长性状均有显著影响( $P<0.05$ )。经序列分析发现,*Cluster-65\_137265*标记所处的基因序列与羧甲酰胺磷酸合成酶1 (carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial)相似度最高。研究表明,CPS1编码的线粒体酶能催化氨和碳酸氢盐合成羧甲酰胺磷酸,在尿素循环中扮演重要的角色(林雅宁,2011)。通过GO分析发现,CPS1富集到机体的尿素循环、氮化合物代谢过程和蛋白水解等生物过程。可能表明*Cluster-65\_137265*标记的突变影响了基因表达产物对氨的去除以及对蛋白质水解的调控,从而影响长吻鲈的生长。*Cluster-65\_111833*标记所处的基因序列与神经突起导向因子4样(netrin-4-like)相似度最高。研究发现,敲除斑马鱼HT080细胞中的netrin-4后,HT080细胞的增殖能力增强(贾茵,2014),可能表明该基因通过调节细胞的增殖来影响长吻鲈的生长。*Cluster-65\_137265*标记所处的基因序列与阴离子交换蛋白2样亚型X1 (anion exchange protein 2-like isoform X1)相似度最高,Pathway network显示SLC4A3的相关途径包括葡萄糖和其他糖类的转运,胆盐和有机酸,金属离子和胺化合物以及肝ABC转运蛋白的转运,可能揭示该基因在长吻鲈中通过参与其他相关途径影响了长吻鲈的生长。推测这4个基因可能是与长吻鲈生长相关的功能基因,对生长发挥调控作用。

## 参 考 文 献

- BEACHAM T D, LAPOINTE M, CANDY J R, *et al.* DNA in action: Rapid application of DNA variation to sockeye salmon fisheries management. *Conservation Genetics*, 2004, 5(3): 411–416
- BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 2014, 32: 314–331
- CAO T T, BAI J J, YU L Y, *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (*CPA1*) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(3): 301–307 [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析. *农业生物技术学报*, 2012, 20(3): 301–307]
- CHEN X F, YANG G L, YU J H, *et al.* Isolation of *IGF2* gene and correlation of its SNPs with fish sharp and weight gain in GIFT strain Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 109–116 [陈雪峰, 杨国梁, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 *IGF2* 基因分离及其单核苷酸多态性与体型、增重相关性. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 109–116]
- DENG N N, WANG R L, XU Z L. A preliminary study on imitating ecological breeding of *Leiocassis longirostris*. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(12): 33–34 [邓楠楠, 王荣林, 徐志良. 长吻鮠仿生态养殖初探. *水产养殖*, 2018, 39(12): 37–38]
- DONG Y, LI Q. Correlation analysis between SNPs and growth traits of *Apostichopus japonicus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(2): 49–58 [董玉, 李琪. 刺参 SNP 标记与生长性状的关联分析. *海洋湖沼通报*, 2016(2): 49–58]
- EMAZION T, JOBS M, HOWELL W M, *et al.* Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene*, 1999, 238(2): 315–324
- FENG H, WEN H S, DONG S L, *et al.* Identification of single nucleotide polymorphism cytochrome P450-C19a and its relation to reproductive traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2008, 279(1/2/3/4): 181
- GOMEZ-RAYA L, KLEMETS DAL G. Two-stage selection strategies utilizing marker-quantitative trait locus information and individual performance. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(8): 2008
- JIA Y. Roles and mechanism of Netrin4 and Neogenin in fibrosarcoma cell HT1080. Master's Thesis of Xiamen University, 2014 [贾茵. Netrin4 和 Neogenin 在成纤维肉瘤细胞 HT1080 中的作用及其机制探讨. 厦门大学硕士学位论文, 2014]
- KALINOWSKI S T. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, 2002, 88(1): 62–65
- LI C. SNPs detection and its association with growth traits in Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus sinensis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [李纯. 中华鳖 SNPs 的筛选及生长性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- LI S J, BAI J J, ZHAO L, *et al.* Development of Est-Snps in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and analysis of their correlation with growth traits. *Marine Fisheries*, 2018, 40(1): 38–46 [李胜杰, 白俊杰, 赵萃, 等. 大口黑鲈 EST-SNP 标记开发及其与生长性状的相关性分析. *海洋渔业*, 2018, 40(1): 38–46]
- LI Z B, WU Y, WANG Y, *et al.* On the SNP technology and its application in crops breeding. *Journal of Liaoning Agricultural College*, 2010(3): 12–13 [李兆波, 吴禹, 王岩, 等. SNP 标记技术及其在农作物育种中的应用. *辽宁农业职业技术学院学报*, 2010(3): 12–13]
- LIANG H, GUO S, LUO X, *et al.* Molecular diagnostic markers of *Tachysurus fulvidraco* and *Leiocassis longirostris* and their hybrids. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 2115
- LIN Y N. Studies on the key genes of the urea cycle induced by aflatoxin B1 and the candidate gene *CPS1*. Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 [林雅宁. 黄曲霉毒素 B1 致毒中尿素循环关键基因的研究和 *CPS1* 的生物学研究. 福建农林大学硕士研究生学位论文, 2011]
- LIU A R, LIAO M J, LI B, *et al.* Validation of SNPs associated with important economic traits of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 101–109 [刘安然, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 重要经济性状相关 SNP 标记的验证分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 101–109]
- SANTIS C D, JERRY D R. Candidate growth genes in finfish: Where should we be looking? *Aquaculture*, 2007, 272(1/2/3/4): 22–38
- SHEN T, HE X, LEI M, *et al.* Cloning and structure of a histocompatibility class Iia Gene (Lelo-Daa) in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Genes and Genomics*, 2014, 36(6): 745–753
- SHEN T, XU S Y, YANG M, *et al.* Molecular cloning, expression pattern, and 3D structural analysis of the *Mhc* class Iib gene in the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(1/2): 33–45
- SHI L, YUE W B. Advance in single nucleotide polymorphism and its application in livestock. *Livestock and Poultry Industry*, 2007(3): 2–4 [石磊, 岳文斌. SNP 的研究进展及其在家畜育种中的应用. *畜禽业*, 2007(3): 2–4]
- TAO W J, MA L J, RUAN R X, *et al.* SNP loci associated with weight gain on growth hormone receptor genes in *Cyprinus carpio* var. Jian. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4):



- 622–629 [陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 GHR 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选. 水生生物学报, 2011, 35(4): 622–629]
- VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275–275
- WANG C X, LU M X, GAO F Y, *et al.* Screening of single nucleotide polymorphisms (SNPs) related with growth in growth hormone secretagogue receptor gene (GHSR) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(6): 762–771 [王春晓, 卢迈新, 高凤英, 等. 尼罗罗非鱼生长激素促分泌素受体基因 (GHSR) 生长相关单核苷酸多态性 (SNPs) 位点的筛选. 农业生物技术学报, 2015, 23(6): 762–771]
- WANG G D. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280(5366): 1077–1082
- WANG T, HUANG Z H, MA A J, *et al.* Development and polymorphic analysis of SNP markers in *Scophthalmus maximus* based on transcriptome database. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1300–1307 [王婷, 黄智慧, 马爱军, 等. 基于转录组数据的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) SNP 标记开发及多态性分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1300–1307]
- WU Q J. Population ecology of [*Leiocassis longirostris* (Günther)] (Pisces, Bagridae) with reference to the problem of maximum sustained yield. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(3): 387–409 [吴清江. 长吻鲶 (*Leiocassis longirostris* (Günther)) 的种群生态学及其最大持续渔获量的研究. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 387–409]
- XIAO M S, XIA H W, MA Y H. Genetic variation of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* in the Yangtze River revealed using mitochondrial DNA cytochrome B sequences. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(6): 305–313
- YANG G, XIAO M, YU Y, *et al.* Genetic variation at mtDNA and microsatellite loci in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4605–4617
- YANG Y J, XIANG M B, YE X Y, *et al.* Association analysis between SNP markers and growth-related traits in *Schizothorax prenanti*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 278–285 [杨月静, 向梦斌, 叶祥益, 等. 齐口裂腹鱼 SNP 标记与生长性状的关联分析. 中国水产科学, 2018, 25(2): 278–285]
- YU S X, YUAN Y L. New progress of genetic study on quantitative traits. *Cotton Science*, 2002(3): 180–184 [喻树迅, 袁有禄. 数量性状遗传研究的新进展. 棉花学报, 2002(3): 180–184]
- ZHANG M. Development of SNP markers and their association with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [张猛. 草鱼 SNP 标记开发及与生长性状关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- ZHONG M G, LI F F, ZHENG H, *et al.* Tissue distribution and signal transduction of Tec tyrosine kinase in rats. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14(19): 1874–1877 [钟明贵, 李菲菲, 郑红, 等. Tec 酪氨酸蛋白激酶的大鼠组织分布及参与的信号途径. 世界华人消化杂志, 2006, 14(19): 1874–1877]
- ZHU X, XIE S, WU L, *et al.* Compensatory growth in the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* following feed deprivation: Temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Aquaculture*, 2005, 248(1/2/3/4): 307–314

(编辑 冯小花)

## Correlation Analysis of SNP Markers and Growth Traits of *Leiocassis longirostris*

LI Zhe<sup>1</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, JING Tingsen<sup>1</sup>, LIU Xiaoli<sup>1</sup>, YAN Huiguo<sup>1</sup>,  
LU Anshuai<sup>1</sup>, ZHOU Jian<sup>2</sup>, LUO Hui<sup>1</sup>, YE Hua<sup>1</sup>①

(1. Fisheries Breeding and Healthy Cultivation Research Centre, Southwest University, Chongqing 402460, China;  
2. Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 611731, China)

**Abstract** In this study, a correlation analysis of 57 single nucleotide polymorphism (SNP) markers and growth-related traits of *Leiocassis longirostris* was conducted using 115 samples under the same growth conditions. The results showed that 10 loci were related to growth-related traits. Among them, three (cluster-65\_137265, cluster-65\_111833, and cluster-65\_137642) loci had a significant influence on growth-related traits (body weight, total length, body length, and head height) ( $P < 0.05$ ). Cluster-65\_120392, cluster-65\_105077, and cluster-65\_5592\_0 had significant influences on body weight, total length, and body length ( $P < 0.05$ ). Cluster-65\_110382 significantly influenced total length, body length, and head height ( $P < 0.05$ ). Cluster-65\_19497 and cluster-24304\_1 had a significant influence on the total length and body length ( $P < 0.05$ ). Cluster-65\_130153 significantly influenced body length and head height ( $P < 0.05$ ). We also estimated the genetic diversity parameters for the 10 loci. The mean observed heterozygosity, expected heterozygosity, and the polymorphism information content (PIC) were 0.537, 0.467, and 0.357, respectively. In addition, cluster-65\_137265, cluster-65\_111833, cluster-65\_110382, and cluster-65\_137642 were associated with anion exchange protein 2-like isoform X1, Netrin-4-like, Tec isoform X2, anion exchange protein 2-like isoform X1, and carbamoyl-phosphate synthase [ammonia] have the highest similarity, respectively. This finding indicates that these four genes may be involved in the regulation of *L. longirostris* growth. The study provides primary data for the genetic improvement and selective breeding of *L. longirostris*.

**Key words** *Leiocassis longirostris*; SNP markers; Growth traits; Correlation analysis

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210518002

http://www.yykxjz.cn/

扶晓琴, 王娜, 王佳林, 陈松林, 赵法箴. 半滑舌鲷颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 136–146  
FU X Q, WANG N, WANG J L, CHEN S L, ZHAO F Z. Characterization and expression analysis of *granzyme B like* gene in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 136–146

## 半滑舌鲷颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析\*

扶晓琴<sup>1,2</sup> 王娜<sup>2</sup> 王佳林<sup>2</sup> 陈松林<sup>1,2</sup> 赵法箴<sup>1,2①</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 颗粒酶(*granzyme*, *Gzm*) B 是免疫炎症反应必不可少的介质,可激活半胱天冬酶 3, 进而诱导靶细胞的凋亡。本研究通过 PCR 扩增和 RACE 技术获得了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)颗粒酶 B 基因(*CsGzmBI*)的全长 cDNA 序列,并对其序列特征和表达水平进行了分析。结果显示,*CsGzmBI* cDNA 全长为 923 bp, 开放阅读框长度为 780 bp, 编码 259 个氨基酸(前 19 个氨基酸残基为信号肽序列), 5'非编码区为 49 bp, 3'非编码区为 94 bp。*CsGzmBI* 的基因组结构比较保守, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成。*CsGzmBI* 蛋白包含 2 个 N 端糖基化位点、1 个催化三联体“His63Asp112Ser207”、1 个“PHSRPYMA”结构域及 6 个保守的半胱氨酸。荧光定量 PCR 结果显示, *CsGzmBI* 在半滑舌鲷健康成鱼不同组织中均有表达, 其中, 在脾脏中表达量最高, 头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 在肌肉中表达量最低。与对照组 0 h 相比, *CsGzmBI* 在哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染后的不同时间点的脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中的表达水平均有不同程度的上调。研究表明, *CsGzmBI* 基因在半滑舌鲷抵御哈维氏弧菌感染过程中发挥重要作用。

**关键词** 半滑舌鲷; 哈维氏弧菌; 颗粒酶 B 基因; 表达分析

中图分类号 Q522 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0136-11

细胞毒性淋巴细胞(CLTs)可以识别感染病毒或转化的细胞, 并随后诱导其凋亡, 是免疫系统的重要组成部分(Naneh *et al*, 2014)。CLTs 包括细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤(NK)细胞, CTL 和 NK 细胞在其自身分泌的细胞毒性颗粒的帮助下, 介导病原体或病毒感染的细胞以及肿瘤细胞的死亡(Bolitho *et al*, 2007)。细胞毒性颗粒的主要内容物包括穿孔素以及颗粒酶等可溶性的细胞毒蛋白(Sutton *et al*, 2016)。颗粒酶(*granzyme*, *Gzm*)是以 His-Asp-Ser 三联体催化位点为特征的丝氨酸蛋白酶, 具有底物特异性

(Wernersson *et al*, 2006)。到目前为止, 在人类(*Homo sapiens*)中发现有 5 种 *Gzms* (*Gzm A*、*B*、*H*、*K* 和 *M*), 在小鼠(*Mus musculus*)中发现有 11 种 *Gzms* (*Gzm A*~*G*、*K*~*N*) (Bots *et al*, 2006)。鱼类 *Gzms* 与哺乳动物相应 *Gzms* 的相似性较低, 其 *Gzms* 的鉴定与命名存在争议, 例如, 首次在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中发现的 *Gzm* 被命名为 *Gzm-like* (Wernersson *et al*, 2006), 而其他鱼类中存在 5 种被明确命名为 *Gzms* 的基因(*Gzm A*、*B*、*H*、*K* 和 *M*) (Chaves-Pozo *et al*, 2019)。每种 *Gzm* 分别由不同的细胞表达且拥有不同

\* 国家自然科学基金(31530078; 31973006)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD20)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31530078; 31973006), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20)]. 扶晓琴, E-mail: qinxiaoqinxiao@163.com

① 通信作者: 赵法箴, E-mail: zhaofz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-05-18, 收修改稿日期: 2021-06-08

的特异性底物和功能(Turner *et al*, 2019a)。

GzmB是目前研究最深入、含量最丰富的丝氨酸蛋白酶之一(Turner *et al*, 2019a、b),它是免疫炎症反应必不可少的介质,可诱导靶细胞的凋亡(Trapani, 2001; Matsuura *et al*, 2014)。活化的CTL识别靶细胞后,从细胞毒颗粒中释放成熟的GzmB,然后,与穿孔素通过内吞作用进入细胞质基质中(Darmon *et al*, 1996),可激活caspase-3,进而诱导靶细胞凋亡。除了caspase依赖途径,GzmB也参与caspase非依赖途径的靶细胞凋亡(Boivin *et al*, 2009)。人类GzmB长度约3500 bp,由5个外显子和4个内含子组成,其ORF编码247个氨基酸,包含2个6链 $\beta$ 折叠和3个反式结构域片段(Klein *et al*, 1989; Estébanez-Perpiñá *et al*, 2000)。目前,关于GzmB功能的研究在人类和小鼠中已有不少报道(Turner *et al*, 2019b; Smyth *et al*, 1995; Larimer *et al*, 2017)。然而,在鱼类中,关于GzmB的研究仅在鲤(*Cyprinus carpio*)、银鲫(*Carassius auratus langsdorffii*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大西洋鲑(*Atlantic salmon*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)和大西洋鳕(*Gadus morhua*)等中有报道(Huang *et al*, 2010; Wernersson *et al*, 2006; Praveen *et al*, 2006; Matsuura *et al*, 2014)。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖经济鱼类之一,主要分布在我国沿海地区,其肉质鲜美、营养丰富,深受广大消费者喜爱,具有良好的市场需求和养殖开发潜力。然而,高密度集约化养殖以及环境污染等导致半滑舌鲷多种疾病频繁暴发。其中,最严重的是由哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)引起的细菌性疾病,严重制约了半滑舌鲷养殖业的健康发展(陈政强等, 2012; 于孟君等, 2017; 王双艳等, 2019)。近年来,以提高鱼体抗病力为目标的良好选育,被认为是当下解决半滑舌鲷病害的一种行之有效的办法(Zhou *et al*, 2019)。长期以来,鱼类免疫机制及抗病分子机制的基础研究比较薄弱,严重阻碍了鱼类抗病育种的发展(陈松林, 2004; 周欣等, 2021)。因此,对半滑舌鲷抗病分子机制的研究迫在眉睫,这将其病害防治提供重要的理论依据。目前,关于GzmB基因在半滑舌鲷中的研究尚未见报道。因此,本研究对半滑舌鲷GzmB基因(*CsGzmB1*)的全长cDNA序列进行克隆,采用实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)检测了该基因在健康半滑舌鲷不同组织中的表达模式,以及哈维氏弧菌感染后不同组织的表达水平,旨在为进一步研究该基因在半滑舌鲷免疫应答中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

**1.1.1 正常组织样品采集** 本实验所用半滑舌鲷均购自山东省海阳市黄海水产公司,在22℃循环海水中养殖。选取5尾健康、体重为(104.9±4.6)g的半滑舌鲷个体,分别收集鳃、头肾、肝脏、肠、皮肤、脑、中肾、肌肉和脾脏共9个组织,立即置于液氮中冷冻,然后转入-80℃保存。

**1.1.2 哈维氏弧菌感染与样品采集** 采用Wei等(2018)的方法,对10月龄健康半滑舌鲷进行哈维氏弧菌感染实验。首先定量培养哈维氏弧菌(Wang *et al*, 2017),然后用无菌PBS将哈维氏弧菌稀释至终浓度为 $1.0 \times 10^4$  CFU/mL,用于半滑舌鲷腹腔注射实验,对照组注射等体积的无菌PBS。分别在感染前0h与感染后12、24、48、72及96h共6个时间点取样,每个时间点分别取3尾半滑舌鲷,取其肝脏、脾脏、肾脏、肠、鳃和皮肤共6个组织,放入液氮中速冻,随后转入-80℃保存。

### 1.2 RNA提取与cDNA合成

使用RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取各组织的总RNA,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,用分光光度计检测RNA的浓度和纯度。RNA质量鉴定合格后,使用Prime Script<sup>RT</sup> reagent kit with gDNA eraser试剂盒(TaKaRa, 日本)合成cDNA。使用Smart<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit (TaKaRa, 日本)合成RACE-Ready cDNA。

### 1.3 *CsGzmB1*基因全长cDNA的克隆

根据半滑舌鲷全基因组测序结果(Chen *et al*, 2014),获得*CsGzmB1*基因的预测序列(登录号:XM\_008328902.3),以该序列片段设计引物(表1),先进行普通PCR扩增,验证其ORF区。普通PCR扩增体系:2×ExTaq Mix(TaKaRa, 日本)25  $\mu$ L, CsPRF11-ORF-F/R引物各1  $\mu$ L, cDNA模板2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O补至50  $\mu$ L。PCR扩增条件:94℃ 4 min; 35个循环(94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 45 s); 72℃ 10 min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并使用DNA胶回收试剂盒(天根, 中国)进行纯化回收。将纯化的片段连接到pEasy-T1载体(全式金, 中国),通过42℃热激法转入到Trans-T1感受态细胞中(全式金, 中国),最后挑取单克隆,送华大基因进行测序,成功获得*CsGzmB1*的ORF区序列。

以得到的ORF区序列设计RACE引物(表1),以

合成的 RACE-Ready-cDNA 为模板, 通过降落 PCR 进行 5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增。第 1 轮反应体系为 10  $\mu$ L, 按照 *Taq*<sup>TM</sup> hot start (TaKaRa, 日本)说明书加样。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将第 1 轮的 PCR 反应产物稀释 50 倍后作为第 2 轮普通 PCR 的模板, 普通 PCR 体系和程序均同上所述。扩增完成后, 进行分子克隆实验, 并挑取单克隆送测序。成功获得 5'和 3'端序列, 然后, 通过 DNASTar 软件进行拼接, 最终获得 *CsGzmBl* 的 cDNA 全长序列。

#### 1.4 序列分析

利用在线程序 ORFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)推导 *CsGzmBl* 基因的氨基酸序列。使用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对不同物种 *GzmB* 的氨基酸序列进行同源性搜索。使用 ExPASy 在线软件的 ProtParam 程序(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算 *CsGzmB* 的相对分子质量和理论等电点等理化参数。基于 SMART 4.0 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测该蛋白的信号肽序列及功能结构域。使用在线程序 SoftBerry-Psite

(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>)预测该蛋白的功能位点。使用 Predict Protein (<https://www.predictprotein.org/>)预测该蛋白的二级结构。使用在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>)比较不同物种 *GzmB* 的基因组结构。使用 BioEdit 软件进行脊椎动物 *GzmB* 的氨基酸序列比对。使用 MEGA 7.0 软件通过 NJ 法-邻位相连法构建 *GzmB* 的系统进化树。

#### 1.5 检测 *CsGzmBl* 基因的表达模式

应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *CsGzmBl* 基因在半滑舌鲷健康成鱼不同组织以及哈维氏弧菌刺激后免疫相关组织中的表达水平。选用  $\beta$ -actin 作为内参基因, 用于 qRT-PCR 的引物均列在表 1 中。使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> (TaKaRa, 日本)试剂盒, 按照说明书在 ABI 7500 Fast Real-time (Applied Biosystems, 美国)仪器上进行 *CsGzmBl* 基因的定量分析。每个样品设置 3 个平行, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法 (Livak *et al*, 2001)计算目的基因的相对表达量。所有实验数据以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示, 使用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。当  $P < 0.05$  时为差异显著( $P < 0.05$ ); 当  $P < 0.01$  时为差异极显著( $P < 0.01$ )。

表 1 本研究所用的引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Application
<i>CsGzmBl</i> -ORF-F	ATGCACATATTCTGCATTTTGTGG	ORF verification
<i>CsGzmBl</i> -ORF-R	TCAGACAGCATTTTCTCTCTCTG	ORF verification
<i>CsGzmBl</i> -GSP5'	TGTCTTTCACGGGTAACCTTGATGGTCTG	5'RACE
<i>CsGzmBl</i> -GSP3'	CAGTTCAAGGATGAATGTGTATGGATTGG	3'RACE
<i>CsGzmBl</i> -NGSP5'	CCACTTGGATGGATTGTTGACTT	5'RACE
<i>CsGzmBl</i> -NGSP3'	GACTCTGGAGGACCGCTAATCT	3'RACE
<i>CsGzmBl</i> -RT-F	ATCTTGAGTCTACGCAGCCCAT	qRT-PCR
<i>CsGzmBl</i> -RT-R	TCACGGGTAACCTTGATGGTCTG	qRT-PCR
$\beta$ -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	qRT-PCR
$\beta$ -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	qRT-PCR

## 2 结果

### 2.1 *CsGzmBl* 基因的 cDNA 序列分析

*CsGzmBl* 基因的 cDNA 全长为 923 bp, 其开放阅读框(ORF)为 780 bp, 5'非编码区(UTR)为 49 bp, 3'UTR 为 94 bp (在 polyA 尾部上游 5 bp 处存在一个多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA))。ORF 编码一个由

259 个氨基酸残基组成的蛋白, 分子量为 29.06 kDa, 理论等电点为 9.23, 总平均疏水系数为-0.353, 脂肪系数为 77.53, 不稳定指数(II)为 42.36, 表明该蛋白不稳定。信号肽预测显示, 该蛋白的 N 端存在一个由 19 个氨基酸残基组成的信号肽。功能位点预测发现, 该蛋白包含 2 个 N 端糖基化位点(分别为 NSSH 和 NNSK)以及 5 个二硫键。亚细胞定位预测发现, *CsGzmBl* 属于胞外分泌蛋白(图 1)。

```

                                agtctgagtcaaactgcacactgacacgcacactgacgcggtgacaatc 49
ATGCACATATTCTGCATTTTGTGGCTTTTCAGCTCTGCTCCCCATCTGGACAGACTGAGGATGGCATAAGTGAAT 124
M H I F C I L L A F Q L C S P S G Q T E D G I V N 25
GGTCAGGTTTCAAAGCCTCATTCCAGGCCCTACATGGCTTCACTGCAGTACAGTGGAAAAACAACCTGTGGTGA 199
G Q V S K P H S R P Y M A S L Q Y S G K H N C G G 50
CTCCTTGTTTCAGGAGGACTTTGTTCTGACAGCAGCACACTGTAAAAATGGAAATCTTGAGTCTACGCAGCCCATG 274
L L V Q E D F V L T A A H C K N G N L E S T Q P M 75
ACGGTGGTACTCGGGGGCCACAACCTTAAACATAAAGAAAAAGTCAACAATCCATCCAAGTGGCCGCTTCTAT 349
T V V L G A H N L K H K E K S Q Q S I Q V A A F Y 100
GCTCATCCAAAGTACCATGGAAAGTTTGATAATGATATTATGCTACTCAAGCTGGAAAAGAAAGCTCGACTGAAC 424
A H P K Y H G K F D N D I M L L K L E K K A R L 125
AAGTTTGTCAGACCATCAAGTTACCCGTGAAAGACAAGACCATTTCGAGCTAAGGTCGCCCTGTGTTGTCGCTGGC 499
K F V Q T I K L P V K D K T I R A K V A C V V A G 150
TGGGGCCAAAAAGGCAGAAAGTGAACCTTCTCAGATGCTCTGAAGGAGGCCACAGAGTGGACTCAGTTCAAGGAT 574
W G Q K G R S E P S S D V L K E A T E W T Q F K D 175
GAATGTGTATGGATTTGGAATATCTACTTCAACAGCAGTCACATGATCTGCACCAGGTTTGACAAAACAAAGGA 649
E C V W I W N I Y F N S S H M I C T R F D K N K G 200
GGCCTCTGCCAGGGTACTCTGGAGGACCGCTAATCTGTAAGGATAAACTGGTGGGAATAACTGCCTTACGCAT 724
G L C Q G D S G G P L I C K D K L V G I T A F T H 225
GGAGAAGACTGCAATAATTCCAAGTTTCTCATGTTTTCTACTAGGATAGGTCACCTTTCTTCCATGGATCAAGAAA 799
G E D C N N S K F P H V F T R I G H F L P W I K K 250
ACTTTGCAGAGAGAAAAATGCTGTCTGAgaaaaagtggTTTTccataatactctttcaatttccacaaca 874
T L Q R E K N A V * 259
tatagatgtcaagc aaataaaatacc aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 949
    
```

图 1 CsGzmB1 基因的核苷酸与氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CsGzmB1

非编码区用小写字母表示, 编码区用大写字母表示。2 个预测的 N 端糖基化位点(NSSH 和 NNSK)用灰色阴影标注。起始密码子和终止密码子用红色加粗字母表示。聚腺苷酸化信号和多聚腺苷酸加尾信号分别用方框和下划线标出。

UTR is in lowercase, and ORF is in uppercase. Two predicted N-glycosylation sites (NSSH and NNSK) are shaded in greys.

The start codon and stop codon are red in bold. The polyadenylation signal and polyadenylation tail are boxed and underlined, respectively.

## 2.2 多氨基酸序列比对和进化分析

对不同物种的 GzmB 氨基酸序列进行比对发现, 在脊椎动物 GzmB 中比较保守的一些功能域及位点也同样存在于 CsGzmB1 中。CsGzmB1 具有一个典型的丝氨酸蛋白酶家族所特有的“催化三联体 His63Asp112Ser207”, 一个保守的蛋白活性中心, 一个保守的前导肽(ED), 一个保守的“PHSRPYMA”序列以及 6 个保守的半胱氨酸(Cys)(图 2)。保守的 Cys 分别为 Cys 48、Cys 64、Cys 146、Cys 177、Cys 192 和 Cys 213, 其中, Cys 48 与 Cys 64, Cys 146 与 Cys 213, Cys 177 与 Cys 192 分别各自形成了二硫键。此外, CsGzmB1 的 Cys 5 与 Cys 13, Cys 203 与 Cys 229 也分别各自形成了二硫键。CsGzmB1 5 个二硫键位置如图 2 所示。

BLAST 同源性搜索发现, CsGzmB1 与其他硬骨鱼类的 GzmB 氨基酸序列的一致性在 41.00%~63.35% 之间, 如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(63.35%)、黄鳍 (*Monopterus albus*)(61.66%)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)(61.39%)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*)(60.41%)、小丑鱼(*Amphiprion ocellaris*)(59.92%)、金

头鲷(*Sparus aurata*)(59.85%)、剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)(59.06%)、弹涂鱼 (*Periophthalmus magnuspinnatus*)(57.54%)、荫平鲷(*Sebastes umbrosus*)(57.31%)、青鳉(*Oryzias melastigma*)(56.69%)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(58.66%)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(48.24%)和斑点叉尾鲷(41.00%)。此外, CsGzmB1 氨基酸序列与哺乳动物及爬行动物 GzmB 蛋白的氨基酸序列同一性低于 43%, 大约在 38.31%~42.80% 之间, 如人(40.15%)、大鼠(42.80%)、小鼠(40.43%)、马(*Equus caballus*)(40.86%)和海龟(*Chelonia mydas*)(38.31%)。

为更明确 CsGzmB1 的进化地位, 选用 CsGzmB1 与其他物种的 GzmB、GzmA 及 GzmM 的氨基酸序列, 构建系统发育树。如图 3 所示, 所有物种的 GzmA 聚为一大支; CsGzmB1 与其他物种的 GzmB 聚为另一大支, 其中, 部分物种的 GzmM 与 GzmB 聚在一起。在 GzmB 这一支中, 发现有 2 个主要的不同分支, 其中, 所有硬骨鱼类的 GzmB 聚为一支, 其他脊椎动物的 GzmB 聚为一支, 这 2 大支最终汇聚在一起。因此, 脊椎动物 Gzm 氨基酸的同源性符合进化规则。

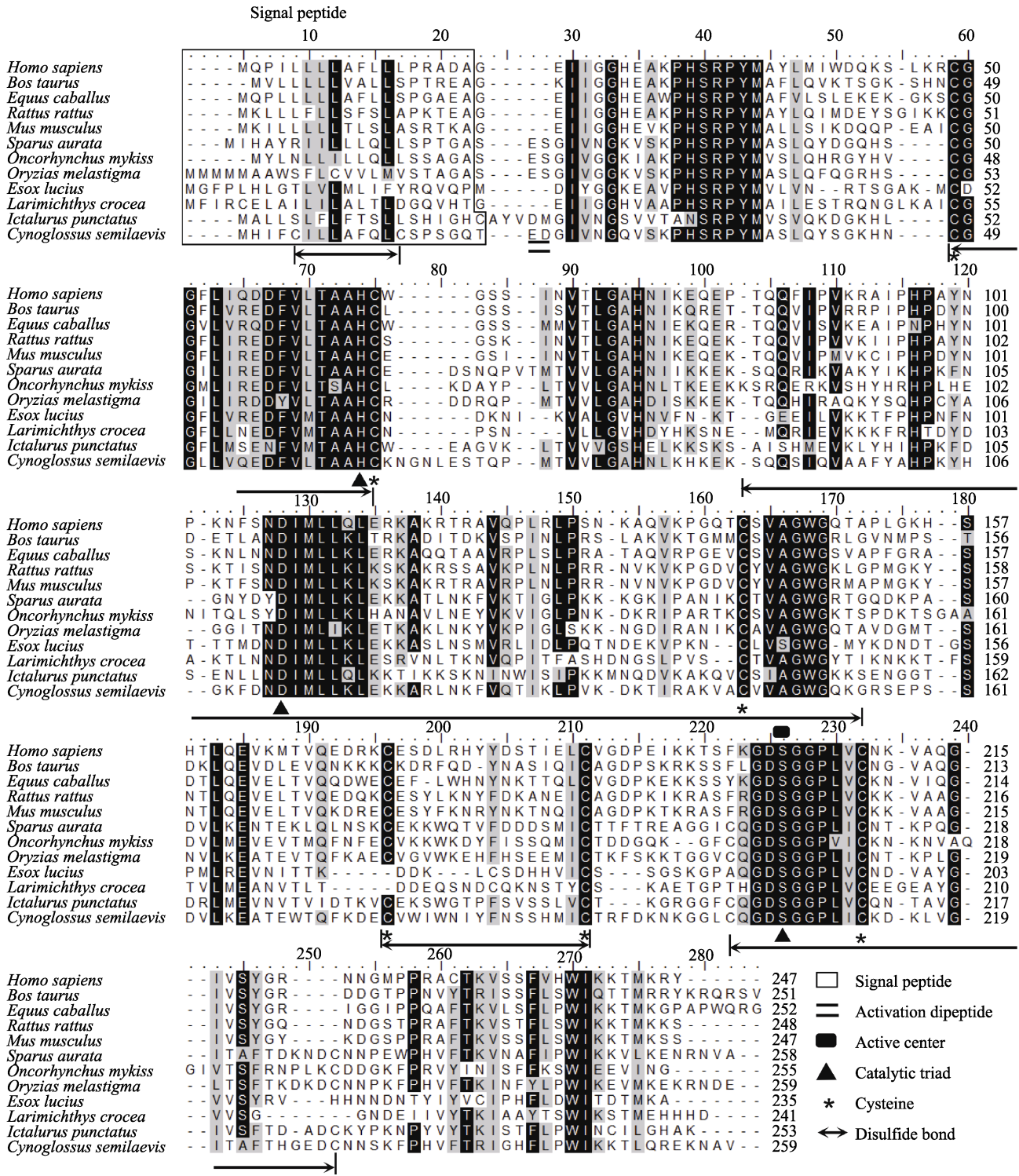


图 2 CsGzmB1 基因与其他脊椎动物 GzmB 基因的多氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignment of the GzmB amino acid sequences among vertebrates

相同氨基酸和相似氨基酸分别用黑色和浅灰色阴影表示。星号表示 6 个保守的半胱氨酸的位置，三角形表示保守的催化三联体，黑色长方形表示保守的蛋白活性中心。不同物种信号肽的位置用白色框标注。

CsGzmB1 蛋白的二硫键由双箭头表示，其前导肽由双线表示。

Identical and similar amino acids are shaded in black and light gray, respectively. Asterisks indicate 6 conserved cysteines, black triangles indicate conserved catalytic triads, and black rectangles indicate conserved protein active centers. The positions of signal peptides of different species are marked with white boxes. The disulfide bond of the CsGzmB1 protein is represented by a double arrow, and its activation di-peptide peptide is represented by a double line.

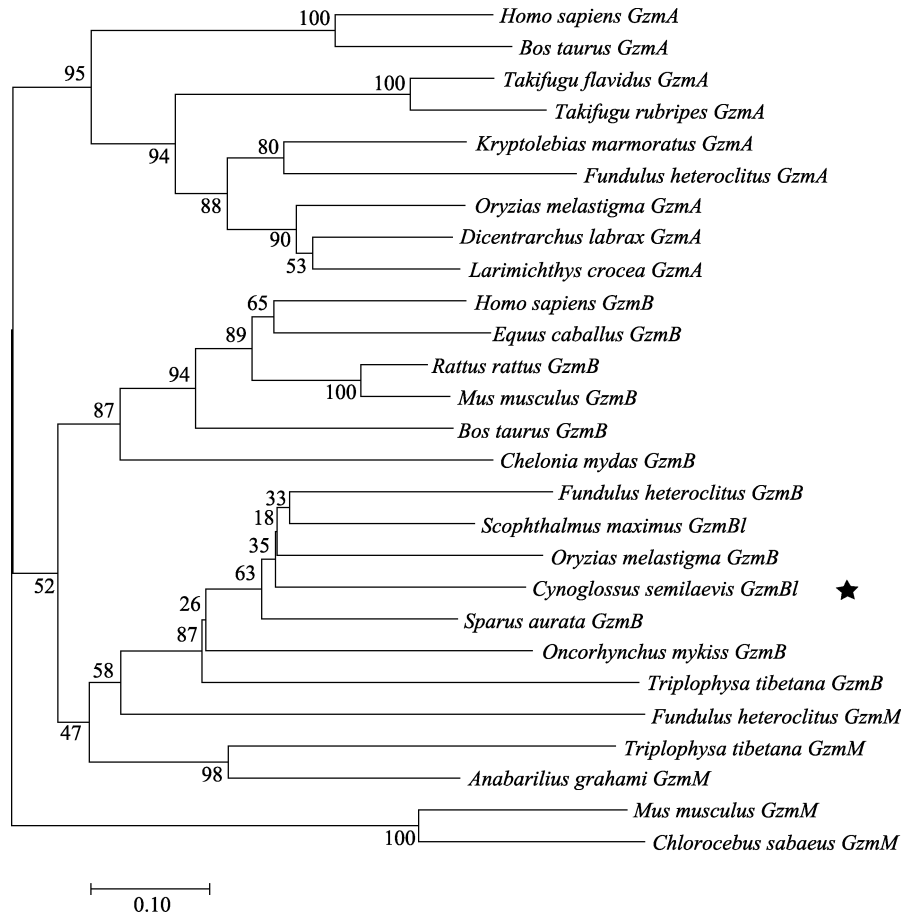


图 3 GzmB、GzmA 以及 GzmM 氨基酸序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of GzmB, GzmA and GzmM from various species

CsGzmBl 用黑色五角星表示。

CsGzmBl was marked with a black five-pointed star.

本研究使用的所有氨基酸序列登录号为: 人 GzmA (NP\_006135.2), 牛 GzmA (*Bos taurus*, XP\_019838691.1), 鲈鱼 GzmA (*Dicentrarchus labrax*, AIK66548.1), 红树林鲷 GzmA (*Kryptolebias marmoratus*, XP\_017267744.1), 青鳉 GzmA (XP\_024131649.1), 底鳉 GzmA (*Fundulus heteroclitus*, XP\_036000696.1), 大黄鱼 GzmA (TMS12193.1), 菊黄东方鲀 GzmA (*Takifugu flavidus*, TWW60312.1), 红鳍东方鲀 GzmA (*Takifugu rubripes*, XP\_029685142.1), 小鼠 GzmM (XP\_031205327.1), 绿猴 GzmM (*Chlorocephalus sabaesus*, XP\_037852248.1), 西藏高原鳉 GzmM (*Triplophysa tibetana*, KAA0712223.1), 底鳉 GzmM (*Fundulus heteroclitus*, JAR24158.1), 鳊白鱼 GzmM (*Anabarrilius grahami*, ROL48139.1), 人 GzmB (AAA75490.1), 牛 GzmB (ACI15823.1), 马 GzmB (XP\_001488563.1), 黑鼠 GzmB (*Rattus rattus*, XP\_032773918.1), 小鼠 GzmB (CAJ18480.1), 金头鲷 GzmB (AXK15893.1), 虹鳟 GzmB (XP\_021453743.2),

青鳉 GzmB (XP\_024142756.1), 半滑舌鲷 GzmBl (XP\_008327124.1), 高原鳉 GzmB (*Triplophysa tibetana*, KAA0715657.1), 底鳉 GzmB (*Fundulus heteroclitus*, XP\_035995441.1), 海龟 GzmB (EMP28509.1), 大菱鲆 GzmBl (XP\_035506996.1), 玛丽鱼 GzmBl (*Poecilia latipinna*, XP\_014907818.1), 南美石头鱼 GzmB (*Thalassophryne amazonica*, XP\_034036171.1), 斑点叉尾鲷 GzmB (XP\_017334488.1), 黄鳊 GzmBl (XP\_020450483.1), 大黄鱼 GzmB (XP\_019124463.2), 小丑鱼 GzmBl (XP\_023130983.1), 荫平鲷 (*Sebastes umbrosus*, XP\_037644834.1), 尖吻鲈 GzmBl (XP\_037644834.1), 剑尾鱼 GzmBl (XP\_023193185.1), 孔雀鱼 GzmB (XP\_008401229.1), 弹涂鱼 GzmB (XP\_033842823.1), 白沙鳉 GzmB (*Cyprinodon tularosa*, XP\_038131404.1)。

### 2.3 GzmB 的基因组结构

以 CsGzmB 基因的全长 cDNA 序列与半滑舌鲷全



基因组序列进行比对, 获得 *CsGzmBl* 的基因组 DNA 序列, 将之与 *CsGzmBl* 的 ORF 序列进行比较分析, 得到 *CsGzmBl* 的基因结构。*CsGzmBl* 基因由 1890 个碱基组成, 包括 5 个外显子与 4 个内含子。外显子-内含子边界均符合 AG/GT 拼接规则, 所有的 3'末端

受体位点具有共同的 AG 序列, 所有的 5'末端供体位点部位都有共同的 GT 序列。将半滑舌鲷与其他物种的 *GzmB* 基因组结构进行比较, 发现 *GzmB* 的基因组结构比较保守, 均是由 5 个外显子和 4 个内含子组成 (图 4)。

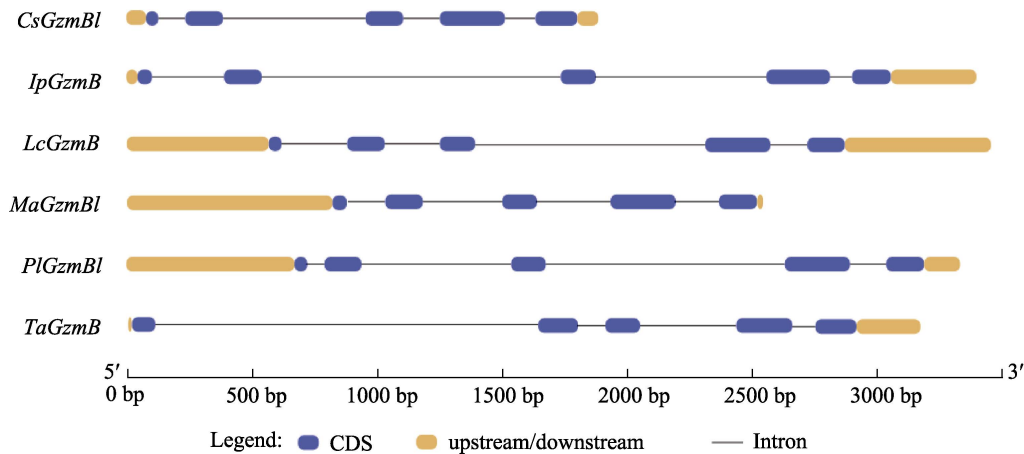


图 4 *CsGzmBl* 和其他物种 *GzmB* 基因的外显子-内含子结构比较

Fig.4 Comparison of the exon/intron structure of between the *CsGzmBl* and *GzmB* genes among vertebrates

外显子用蓝色的圆角矩形标注, 5'和 3'非编码区均用橙色的圆角矩形表示, 黑色的线代表内含子。不同物种 *GzmB* 基因的 mRNA 序列和基因组序列登录号:*CsGzmBl*:XM\_008328902.3,NC\_024322.1;斑点叉尾鲷:XM\_017478999.1,NC\_030425.1; 大黄鱼: XM\_019268918.2, NC\_040028.1; 黄鳝: XM\_020594827.1, NW\_018127904.1; 玛丽鱼: XM\_015052332.1, NW\_015113718.1; 南美石头鱼: XM\_034180280.1, NC\_047112.1

Exons are in blue rounded rectangles; 5'UTR and 3'UTR are in orange rounded rectangles. Lines indicate the introns. The mRNA and gene accession numbers of different species *GzmBs* are as follows: *CsGzmBl*: XM\_008328902.3, NC\_024322.1; *IpGzmB* (*Ictalurus punctatus GzmB*): XM\_017478999.1, NC\_030425.1; *LcGzmB* (*Larimichthys crocea GzmB*): XM\_019268918.2, NC\_040028.1; *MaGzmBl* (*Monopterus albus GzmBl*): XM\_020594827.1, NW\_018127904.1; *PlGzmBl* (*Poecilia latipinna GzmBl*): XM\_015052332.1, NW\_015113718.1; *TaGzmB* (*Thalassophryne amazonica GzmB*): XM\_034180280.1, NC\_047112.1

## 2.4 *CsGzmBl* 在不同组织中的表达模式

半滑舌鲷健康成鱼鳃、头肾、肝脏、肠、皮肤、脑、中肾、肌肉、脾脏共 9 个组织中 *CsGzmBl* 的表达情况如图 5 所示。从图 5 可以看出, *CsGzmBl* 在这些组织中呈现出不同的表达情况, 其中, 在脾脏中表达量最高, 在头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 在其他组织中表达量较低, 在肌肉中表达量最低。

## 2.5 哈维氏弧菌刺激后 *CsGzmBl* 基因的表达变化

哈维氏弧菌刺激后, 与对照组 0 h 相比, *CsGzmBl* mRNA 的表达水平在脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中均有不同程度的上调。如图 6 所示, 在脾脏、肠和鳃中, *CsGzmBl* 的表达水平仅在细菌感染 48 h 后有明显的上调趋势 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 在其他时间点无明显变化。在皮肤中, *CsGzmBl* mRNA 的表达量在细菌感染 72 h 后显著增加 ( $P < 0.05$ ), 在其余时间点

与对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在肝脏和肾脏中, 细菌感染后 96 h, *CsGzmBl* 的表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ ), 其余时间点与对照组相比也无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究通过 RACE 方法获得了 *CsGzmBl* 基因的 cDNA 全长, 并对其序列进行分析, 发现 *CsGzmBl* 基因具有一些保守的功能域或功能位点。*CsGzmBl* 具有一个序列为“His63Asp112Ser207”的催化三联体, 催化三联体是胰凝乳蛋白酶的典型特征, 是形成可实现精确三维定向的支架所必需的部分 (Branden *et al*, 1991), 在 *Gzm* 蛋白家族成员中高度保守 (Smyth *et al*, 1996), 如大西洋鳕 *GzmA/K*、尼罗罗非鱼 *Gzm* 及银鲫 *Gzm* 中均具有催化三联体“His57Asp102Ser195” (Matsuura *et al*, 2014; Praveen *et al*, 2006; Wernersson

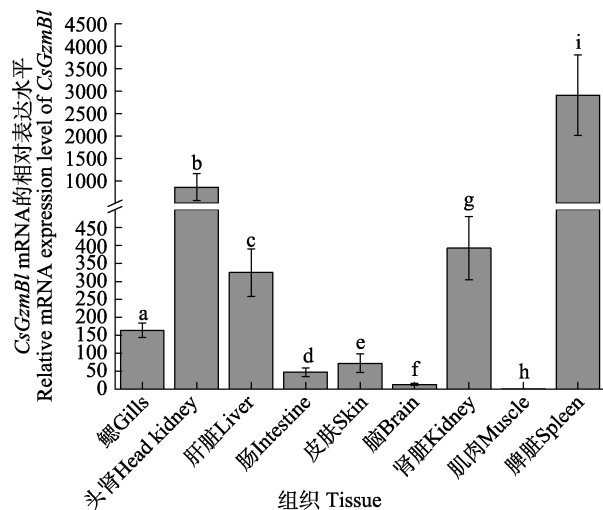


图 5 *CsGzmB1* mRNA 在健康半滑舌鲷成鱼不同组织中的表达水平

Fig.5 Expression of *CsGzmB1* mRNA in different tissues of healthy adult *C. semilaervis*

数据均以平均值±标准误表示( $n=3$ )。柱状图上方的不同字母表示各个组织之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

All data are shown as Mean±SE ( $n=3$ ). Different letters above the bars indicate significant difference at the level of  $P<0.05$ .

*et al*, 2006)。此外, *CsGzmB1* 蛋白还具有一个保守的前导肽 ED(GluAsp), 在携带翻译信息的酶转移到粗面内质网和胞外颗粒过程中起不可或缺的作用(Praveen *et al*, 2004)。大多数哺乳动物, 如马、人、大鼠及小鼠的 *GzmB* 蛋白的 N 末端都具有一个高度保守的序列“GlyGlu(EG)或 Glu-Glu(GG)”的前导肽(Caputo *et al*, 1993)。研究表明, *Gzm* 氨基酸激活的前肽后面 1~4 位(IIGG)与 9~16 位(PHSRPYMA)高度保守(Trapani, 2001; Piuko *et al*, 2007; Pham *et al*, 1999)。哺乳动物, 如人、大鼠, 小鼠及马 *Gzm* 蛋白中均具有这 2 个保守结构域, 其中, IIGG 结构域是前肽裂解激活蛋白酶所必需的(Smyth *et al*, 1995)。本研究中, *CsGzmB1* 前导肽后 1~4 位为“IVNG”, 类似于哺乳动物 *Gzm* 蛋白的“IIGG”, 第 10~16 位是保守的“PHSRPYMA”结构域。

本研究发现, 从哺乳类到爬行动物, 各个物种 *GzmB* 均具有 6 个保守的 Cys, 参与形成 3 个二硫键。*Gzm* 蛋白家族成员具有多个高度保守的 Cys, 这对 *Gzm* 蛋白加工过程中的正确折叠和激活至关重要(Praveen *et al*, 2006)。据报道, 斑点叉尾鲷、大西洋鳕及鲤 *GzmA/K* 均含有 8 个高度保守的 Cys, 共形成 4 个二硫键(Huang *et al*, 2010; Wernersson *et al*, 2006)。由此可见, *Gzm* 蛋白家族每个成员之间的保守性 Cys 数目不同。

Huang 等(2010)报道称, 鱼类 *Gzms* 与哺乳动物的 *GzmA/B/K* 关系更近, 可能是因为 *GzmA/B* 是更古老的祖先基因。因此, 推测 *GzmB* 在进化上处于更高地位, 而 *GzmM* 可能由 *GzmB* 进化而来。本研究选择 A 和 M 作为进化分析的组成部分, 而最终的进化分析发现, 鱼类的 *GzmM* 与 *GzmB* 聚在一起, 证实了此推测。本研究还发现, 所有物种的 *GzmB* 始终聚在一起, 符合 *GzmB* 的同源进化规则。基因结构比较发现, *CsGzmB1* 与其他鱼类 *GzmB* 基因均由 5 个外显子与 4 个内含子组成。据报道, *Gzm* 家族所有成员的基因结构极其保守, 如鲤 *GzmA/K*、斑马鱼(*Danio rerio*)*Gzm*、尼罗罗非鱼 *Gzm* 及人 *GzmA* 与 *GzmK* 基因均由 5 个外显子和 4 个内含子组成(Huang *et al*, 2010; Praveen *et al*, 2006)。本研究中, *CsGzmB1* 的基因结构符合外显子和内含子法则(Mount, 1982), 但与其他鱼类 *GzmB* 基因相比, *CsGzmB1* 基因的长度明显较短。以上结果表明, *CsGzmB1* 既具备 *Gzm* 家族的典型特征, 也具有 *GzmB* 的特点, 进化上与 *Gzms* 家族其他成员有明确区别, 因此, 该基因属于硬骨鱼类 *GzmB* 同源基因。

关于鱼类 *Gzms* 基因组织表达模式的研究十分有限, 仅在几种鱼中有报道。鲤中 *GzmA/K* 基因在脾脏、鳃及头肾中高表达(肾脏中最高), 其次是肾脏和肠, 在肝脏和皮肤及肌肉中表达量最低(Huang *et al*, 2010)。尼罗罗非鱼的 *Gzm* 仅在肾脏和血液中被检测到, 在肝脏、脾脏、鳃及肌肉中均未发现表达(Praveen *et al*, 2006)。在银鲫中, *Gzm* mRNA 在鳃和脾脏中表达量最高, 在肝脏中表达量最低(Matsuura *et al*, 2014)。虽然鱼类 *Gzm* 基因呈现出不同的组织表达模式, 但它总能在免疫相关组织中被检测到。本研究发现, *CsGzmB1* mRNA 在半滑舌鲷健康成鱼 9 个组织中呈现不同的表达水平, 其中, 在脾脏中表达量最高, 头肾、中肾、肝脏和鳃中表达量次之, 肌肉中表达量最低。综合表明, *CsGzmB1* 基因可能在半滑舌鲷先天性免疫中具有重要作用。

许多研究表明, *Gzms* 基因在病毒和细菌感染过程中发挥重要作用, 相关研究在哺乳动物中有大量报道。然而, 关于鱼类 *Gzms* 基因在细菌感染后的表达研究十分有限。在鲤中发现 *GzmA/K* 可以被 SVCV 病毒所诱导(Huang *et al*, 2010)。鲫鱼的 *Gzm* 基因可以被迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)所调节。本研究发现, 哈维氏弧菌感染后, *CsGzmB1* 基因在肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃及皮肤 6 个组织中均显著上调, 说明 *CsGzmB1* 参与半滑舌鲷的免疫防御作用, 但其具体的功能和作用机制尚不清楚, 还需进一步研究。

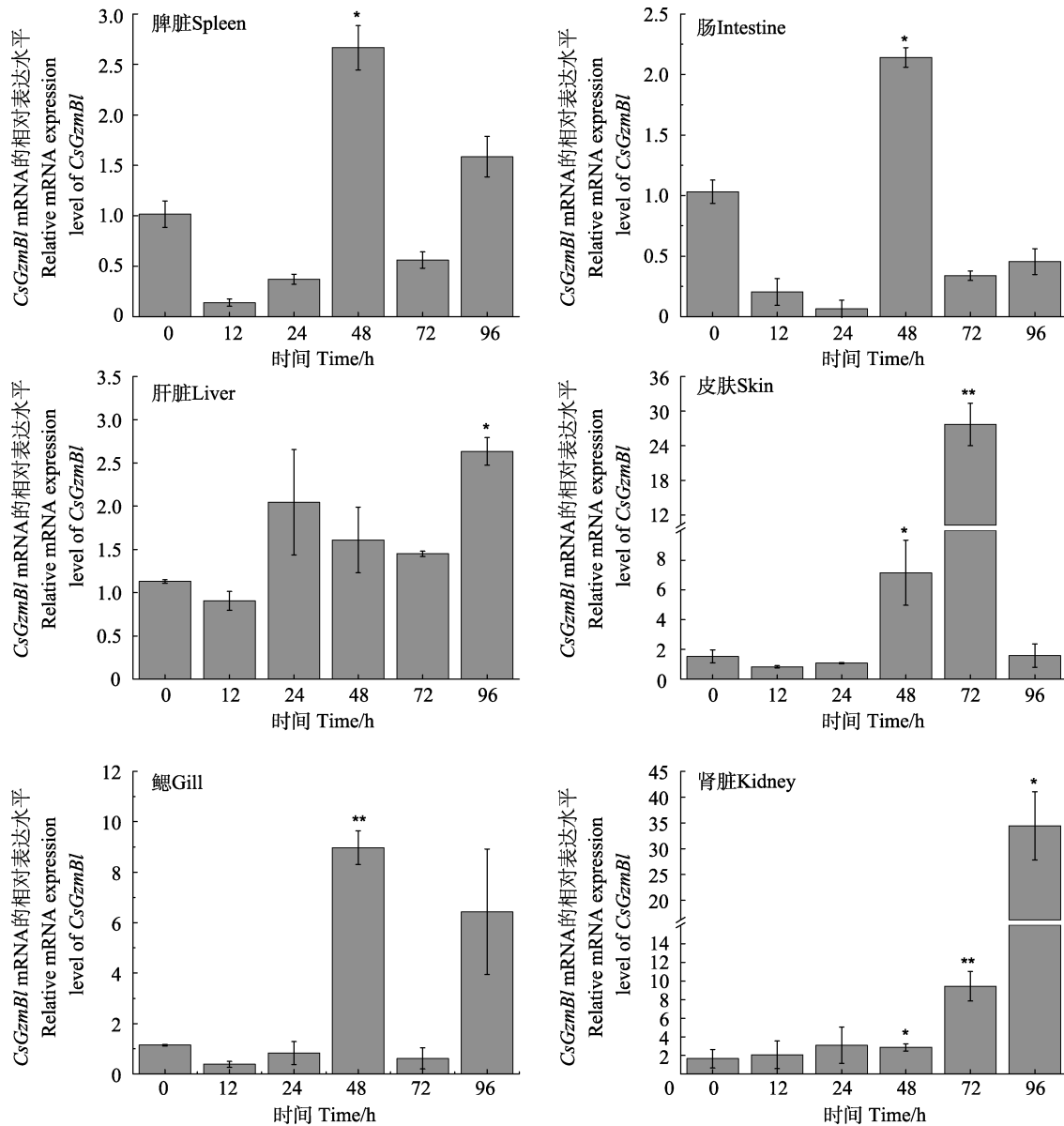


图6 哈氏弧菌感染后脾脏、肠、肝脏、皮肤、鳃和肾脏中 *CsGzmBl* mRNA 的表达情况  
Fig.6 Expression pattern of *CsGzmBl* mRNA in the liver, spleen, kidney, intestine, gills and skin after *V. harveyi* infection

样品取自感染后 0、12、24、48、72 及 96 h。数值以平均值±标准误表示( $n=3$ )。

星号表示显著性差异(\*\*  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$ )。

The samples are tested at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h after infection. All the data are shown as Mean±SE ( $n=3$ ).

The asterisk indicates a significant difference (\*\*  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$ ).

综上所述,本研究通过对 *CsGzmBl* 基因的克隆、序列特征描述以及表达模型分析,初步表明 *GzmBl* 参与半滑舌鳎免疫应答过程,为进一步研究 *GzmBl* 在半滑舌鳎抗病免疫中的作用机制奠定了基础。

### 参 考 文 献

BOIVIN W A, COOPER D M, HIEBERT P R, *et al.* Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease:

Challenging the dogma. *Laboratory Investigation*, 2009, 89(11): 1195–1220

BOLITHO P, VOSKOBOINIK I, TRAPANI J A, *et al.* Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19(3): 339–347

BOTS M, MEDEMA J P. Granzymes at a glance. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(24): 5011–5014

BRANDEN C, TOOZE J. Introduction to protein structure. New York: Garland Publishing, 1991

CAPUTO A, GARNER R S, WINKLER U, *et al.* Activation of

- recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(24): 17672–17675
- CHAVES-POZO E, VALERO Y, LOZANO M T, *et al.* Fish granzyme A shows a greater role than granzyme B in fish innate cell-mediated cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2579
- CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(46): 253–260
- CHEN S L. Progress in molecular breeding for disease-resistant marine fishes and its prospects. *Science and Technology Review*, 2004(9): 10–13 [陈松林. 海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望. *科技导报*, 2004(9): 10–13]
- CHEN Z Q, YAO Z X, LIN M. Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 764–771 [陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病病原研究. *水产学报*, 2012, 36(5): 764–771]
- DARMON A J, LEY T J, NICHOLSON D W, *et al.* Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(36): 21709–21712
- ESTÉBANEZ-PERPIÑÁ E, FUENTES-PRIOR P, BELORGEY D, *et al.* Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue. *Biological Chemistry*, 2000, 381(12): 1203–1214
- HUANG R, ZHONG S, LIU H, *et al.* Identification and characterization of common carp (*Cyprinus carpio* L.) granzyme A/K, a cytotoxic cell granule-associated serine protease. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(3): 388–398
- KLEIN J L, SHOWS T B, DUPONT B, *et al.* Genomic organization and chromosomal assignment for a serine protease gene (CSPB) expressed by human cytotoxic lymphocytes. *Genomics*, 1989, 5(1): 110–117
- LARIMER B M, WEHREBERG-KLEE E, DUBOIS F, *et al.* Granzyme B PET imaging as a predictive biomarker of immunotherapy response. *Cancer Research*, 2017, 77(9): 2318–2327
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- MATSUURA Y, YABU T, SHIBA H, *et al.* Identification of a novel fish granzyme involved in cell-mediated immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 499–507
- MOUNT S M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research*, 1982, 10(2): 459–472
- NANEH O, AVČIN T, ZAVEC A B. Perforin and human diseases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2014, 80: 221–239
- PHAM C T N, LEY T J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(15): 8627–8632
- PIUKO K, BRAVO I G, MÜLLER M. Identification and characterization of equine granzyme B. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 118(3/4): 239–251
- PRAVEEN K, EVANS D L, JASO-FRIEDMANN L. Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(4): 449–459
- PRAVEEN K, LEARY J H, EVANS D L, *et al.* Molecular characterization and expression of a granzyme of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Immunogenetics*, 2006, 58(1): 41–55
- SMYTH M J, MCGUIRE M J, THIA K Y T. Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. 1995, 154(12): 6299–6305
- SMYTH M J, O'CONNOR M D, TRAPANI J A. Granzymes: A variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 60(5): 555–562
- SUTTON V R, BRENNAN A J, ELLIS S, *et al.* Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates natural killer cell and cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity. *FEBS Journal*, 2016, 283(5): 947–961
- TRAPANI J A. Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology*, 2001, 2(12): 1–7
- TURNER C T, HIROYASU S, GRANVILLE D J. Granzyme B as a therapeutic target for wound healing. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2019b, 23(9): 745–754
- TURNER C T, LIM D, GRANVILLE D J. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix Biology*, 2019a, 75/76: 126–140
- WANG L, FAN C, XU W, *et al.* Characterization and functional analysis of a novel C1q-domain-containing protein in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 322–332
- WANG S Y, WANG L, CHEN Z F, *et al.* Cloning and expression analysis of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鲷多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 51–57]
- WEI M, XU W T, LI K M, *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of dctn5 in immune response of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 392–401
- WERNERSSON S, REIMER J, POORAFSHAR M, *et al.* Granzyme-like sequences in bony fish shed light on the

- emergence of hematopoietic serine proteases during vertebrate evolution. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(10): 901–918
- YU M J, SUN L M, CHEN Y D, *et al.* Cloning and expression of the c-Jun gene in immune response to pathogen challenge in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 31–39 [于孟君, 孙璐明, 陈亚东, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) c-Jun 基因的克隆及免疫应答分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 31–39]
- ZHOU Q, SU Z, LI Y, *et al.* Genome-wide association mapping and gene expression analyses reveal genetic mechanisms of disease resistance variations in *Cynoglossus semilaevis*. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1167
- ZHOU X, GAO F Y, LU M X. The progress of fish disease resistance breeding. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(3): 510–523 [周欣, 高风英, 卢迈新. 鱼类抗病性育种研究进展. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(3): 510–523]

(编辑 冯小花)

## Characterization and Expression Analysis of *Granzyme B* like Gene in Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

FU Xiaoqin<sup>1,2</sup>, WANG Na<sup>2</sup>, WANG Jialin<sup>2</sup>, CHEN Songlin<sup>1,2</sup>, ZHAO Fazhen<sup>1,2①</sup>

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

**Abstract** *Granzyme B* is an indispensable mediator of the immune inflammatory response, which can induce apoptosis of target cells by activating caspase 3. In this study, we cloned the full-length cDNA of *Cynoglossus semilaevis granzyme B*-like gene (*CsGzmBl*) and analyzed its sequence characteristics and expression levels. The full-length cDNA of *CsGzmBl* was 923 bp, containing a 49 bp 5'UTR, 94 bp 3'UTR, and 780 bp ORF regions encoding 259 amino acid proteins with 19 amino acid signal peptides. The genome structure of *CsGzmBl* is highly conserved and consists of five exons and four introns. The *CsGzmBl* protein possesses two N-terminal glycosylation sites, a catalytic triad “His63Asp112Ser207,” a “PHSRPYMA” domain, and six conserved cysteines. qRT-PCR indicated that *CsGzmBl* was expressed in different tissues of healthy *C. semilaevis* adults, with the highest expression in the spleen, followed by that in the head kidney, kidney, liver, and gills, with the lowest expression in muscle. After infection with *Vibrio harveyi*, *CsGzmBl* was up-regulated to varying degrees in six immune-related tissues (spleen, intestine, liver, skin, gills, and kidneys) at different time points compared to the control group at 0 h. These results indicate that *CsGzmBl* plays an important role in the immune response of *C. semilaevis* against *V. harveyi* infection.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; *Vibrio harveyi*; *GranzymeB*; Expression analysis

① Corresponding author: ZHAO Fazhen, Email: zhaofz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210510001

http://www.yykxjz.cn/

刘晓飞, 张爽爽, Hendriansyah Endri, 李英瑞, 苏琳, 李相前, 修云吉, 顾伟. 牙鲆半乳糖凝集素 6 基因的克隆、表达及功能研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 147-157

LIU X F, ZHANG S S, HENDRIANSYAH E, LI Y R, SU L, LI X Q, XIU Y J, GU W. Cloning, expression and function of *Galectin-6* from *Paralichthys olivaceus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 147-157

# 牙鲆半乳糖凝集素 6 基因的克隆、 表达及功能研究\*



刘晓飞<sup>1,2</sup> 张爽爽<sup>2</sup> Endri Hendriansyah<sup>1</sup> 李英瑞<sup>1,2</sup>  
苏琳<sup>2</sup> 李相前<sup>3</sup> 修云吉<sup>2</sup> 顾伟<sup>1①</sup>

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院 江苏 南京 210023;

2. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 山东 青岛 266109;

3. 淮阴工学院 江苏省益生制剂重点实验室 江苏 淮安 223003)

**摘要** 半乳糖凝集素 6 (*Galectin-6*) 是  $\beta$ -半乳糖苷结合凝集素家族的成员之一。本研究首次分离并鉴定了牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *Galectin-6* (*PoGalectin-6*), 分析了其分子特征和表达模式, 并对其免疫相关功能进行了研究。*PoGalectin-6* 基因的开放阅读框长为 1089 bp, 共编码 362 个氨基酸, 其中包含 2 个糖识别结构域 (CRDs)。同源序列比对和系统进化树分析显示, *PoGalectin-6* 与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) *Galectin-4* 的相似性为 80.9%。组织分布结果显示, *PoGalectin-6* 基因主要在肠组织中特异性表达。迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染后, *PoGalectin-6* 基因在肠组织中的表达显著升高, 感染后 12 h 表达量最高, 随后逐渐降低并恢复至正常水平。细菌结合实验证实, *PoGalectin-6* 重组蛋白 (r*PoGalectin-6*) 能够结合枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*), 但并不结合短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)。此外, r*PoGalectin-6* 以钙离子依赖的方式对短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌表现出明显的凝集作用。研究表明, *PoGalectin-6* 基因参与了由迟缓爱德华氏菌感染引起的免疫应答, 这一发现为探索 *Galectin-6* 在硬骨鱼类中的免疫功能奠定了基础。

**关键词** 糖凝集素 6; 牙鲆; 迟缓爱德华氏菌; 免疫应答

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0147-11

半乳糖凝集素 (galectins) 是一种能够体外结合  $\beta$ -半乳糖苷的可溶性凝集素, 其家族成员按分子结构特征可分为原型、嵌合型和串联重复型 (Thijssen *et al.*, 2015)。半乳糖凝集素广泛存在于动物中, 目前, 共

有 15 种半乳糖凝集素被分离、鉴定并命名, 其相关功能已在许多物种中被广泛研究, 包括真菌 (Butschi *et al.*, 2010)、刺胞动物门 (Hwang *et al.*, 2010)、昆虫 (Rao *et al.*, 2016)、线虫 (Takeuchi *et al.*, 2016)、软体动物 (Bai

\* 国家自然科学基金项目 (32002421) 资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (32002421)]. 刘晓飞, E-mail: lxf370784@163.com

① 通信作者: 顾伟, 副教授, E-mail: skywei426@sina.com

收稿日期: 2021-05-10, 收修改稿日期: 2021-06-04

*et al.*, 2018)、头索动物(Yu *et al.*, 2007)和尾索动物(Vizzini *et al.*, 2012)等。研究发现,半乳糖凝集素在生物体的许多生物过程中发挥作用,如细胞粘附(Ferragut *et al.*, 2019)、细胞凋亡(Liu *et al.*, 2011)、炎症反应(Nita-Lazar *et al.*, 2015)和肿瘤转移(Shatz-Azoulay *et al.*, 2020)等。

半乳糖凝集素 6 (*Galectin-6*)是一种典型的串联重复型半乳糖凝集素, *Galectin-6* 在动物体内的功能研究尚不全面。研究发现,埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)体内的 *Galectin-6* 能阻碍 cry11aa [苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)产生的一种晶体毒素,对埃及伊蚊有致命毒性]与碱性磷酸酶 1 (ALP1)和氨肽酶 N (APN2)结合,对埃及伊蚊体起到保护作用(Hu *et al.*, 2020)。对小鼠(*Mus musculus*) *Galectin-6* (*Lgals6*)研究发现, *Lgals6* 是一种新型的抗菌蛋白(antimicrobial proteins, AMPs),可能起到调节皮肤纤维化的作用,其表达水平受皮肤微生物组的影响(Natsuga *et al.*, 2016)。此外, Gitt 等(1998)研究发现, *Lgals6* 和小鼠 *Galectin-4* (*Lgals4*)具有高度的同源性,在小鼠消化道中, *Lgals6* 与 *Lgals4* 的表达模式几乎相同,且 *Lgals6* 和 *Lgals4* 在核酸水平和氨基酸水平的一致性分别高达 93%和 83%,暗示它们在小鼠体内可能具备相似的功能。研究表明, *Galectin-4* 参与炎症反应、肠上皮伤口愈合(Paolik *et al.*, 2008)和肠道中表达人类血型抗原的大肠杆菌(*Escherichia coli*)杀灭过程(Stowell *et al.*, 2010),但 *Galectin-6* 是否具有类似功能,还需要进一步验证。事实上, *Galectin-6* 可能有一些尚未证实的潜在功能。Houzelstein 等(2013)推测, *Galectin-6* 的潜在功能并不是由其表达模式的改变引起的,而可能是由其特异性结合新配体的独特蛋白结构引起的。

目前,有关 *Galectin-6* 的报道主要集中在哺乳动物中,而在硬骨鱼类中缺乏相关研究。本研究在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中发现一种 *Galectin-6* (*PoGalectin-6*),对 *PoGalectin-6* 的基因序列和氨基酸序列进行分析鉴定,构建 *PoGalectin-6* 与串联重复型 galectins (*Galectin-6*、*Galectin-4*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9*)的系统进化树,验证 *PoGalectin-6* 在免疫组织中的分布和表达水平,表达纯化重组 *PoGalectin-6* 蛋白用于细菌结合和凝集实验,可为进一步研究 *PoGalectin-6* 的相关功能奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

牙鲆购自山东烟台,平均体重为(120±10) g,平

均体长为(22±3) cm。健康牙鲆在 15℃水温海水循环养殖系统中暂养 7 d。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为本实验室保存菌种,经 16S rRNA 测序进行菌种鉴定。

### 1.2 样品处理和采集

随机取 9 条健康牙鲆进行组织取样,每 3 条鱼的肝、脾、肾、脑、鳃、肠、皮肤和肌肉组织混合作为 1 个生物学重复,样品在液氮中快速冷冻后转移至 -80℃保存,用于总 RNA 提取。

采用浸泡法对健康牙鲆进行迟缓爱德华氏菌( $6 \times 10^7$  CFU/mL)感染实验,感染 2 h 后转入海水循环养殖系统正常养殖。在感染之前,随机抽取 9 条健康牙鲆的肠组织作为对照(0 h),恢复养殖后的 2、8、12、24、48 和 72 h 分别取 9 条鱼的肠组织,按上述方法冷冻保存,留待实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 制备

根据 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, 美国)的说明书,进行组织的总 RNA 提取,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的完整性,用超微量分光光度计(Thermo Scientific, 中国)检测其纯度和浓度。用 PrimeScript™ RT reagent kit (TaKaRa, 日本)反转录合成 cDNA,反应体系: 2 μL 5× PrimeScript Buffer, 0.5 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 μL Oligo dT Primer, 0.5 μL Random 6 mers, Total RNA 用量为 500 μg,补充 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 10 μL。上述反应体系在 37℃条件下反转录 15 min,然后,于 85℃反应 5 s,使反转录酶失活。将 cDNA 在 -20℃冰箱保存备用。

### 1.4 *PoGalectin-6* 基因序列分析

利用 NCBI 网站 Blast 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *PoGalectin-6* 基因序列进行核苷酸同源性比对;利用 Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 ORF;使用 SMART (simple modular architecture research tool)在线软件分析 *PoGalectin-6* 蛋白结构域。

### 1.5 *PoGalectin-6* 同源序列比对与系统进化树构建

利用 NCBI 网站查询不同物种的串联重复型 galectins (*Galectin-6*、*Galectin-4*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9*)的氨基酸序列。采用 DNAMAN 软件对 *PoGalectin-6* (XP\_019943943.1)与硬骨鱼类 *Galectin-6* 和 *Galectin-4* 的氨基酸序列进行多重序列比对,包括斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*) *Galectin-6* (XP\_023009370.2)、白斑狗鱼(*Esox lucius*) *Galectin-6* (XP\_019900129.1)、

秀美花鲈(*Poecilia formosa*) Galectin-6 (XP\_016527155.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) Galectin-4 (AXR99075.1)、乌鳢(*Channa argus*) Galectin-4 (KAF3693285.1)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) Galectin-4 (XP\_025753881.1)。

利用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类串联重复型 galectins 的系统进化树, 包括上述硬骨鱼类 Galectin-6 和 Galectin-4 以及半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) Galectin-4 (XP\_008307038.1)、眼斑双锯鱼(*Amphiprion ocellaris*) Galectin-8 (XP\_023152887.1)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) Galectin-8 (ANN46245.1)、斑马拟丽鱼 Galectin-8 (XP\_004561164.1)、大西洋鲑(*Salmo salar*) Galectin-8 (NP\_001133778.1)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) Galectin-9 (ACO08221.1)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) Galectin-9 (NP\_001187343.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) Galectin-9 (XP\_010754381.2) 和乌鳢 Galectin-9 (KAF3692519.1)。

### 1.6 PoGalectin-6 基因 qRT-PCR 分析

根据 PoGalectin-6 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PoGalectin-6 特异性引物 (PoGalectin-6-qF 和 PoGalectin-6-qR), 以牙鲆 *EF1 $\alpha$*  基因作为内参, 引物序列见表 1。使用 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa, 日本) 试剂盒, qRT-PCR 按照说明书于 BioRad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为 10  $\mu$ L: 5  $\mu$ L TB Green Premix Ex Taq II (2 $\times$ ), 0.4  $\mu$ L 上游引物, 0.4  $\mu$ L 下游引物, 0.8  $\mu$ L 模板 cDNA, 3.4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 35 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 0.5 $^{\circ}$ C/cycle。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算 PoGalectin-6 基因的相对表达量, 每个样品设置 3 个重复。使用 SigmaPlot 11.0 软件作图以及单因素方差分析(one-way ANOVA),  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

### 1.7 重组 PoGalectin-6 的表达纯化

根据 PoGalectin-6 基因序列合成一对引物 PoGalectin-6-eF 和 PoGalectin-6-eR (表 1), 用于扩增 PoGalectin-6 基因。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L: 12.5  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Mix, 0.5  $\mu$ L 上游引物, 0.5  $\mu$ L 下游引物, 2  $\mu$ L 模板 cDNA, 9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 34 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 4 $^{\circ}$ C 冷却。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 结果进行检测, 检测结果无误后, 将 PCR 产物回收, 并利用超微量分光光度计检测其纯度和浓度。使用相同的限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Hand* III)对 PCR 产物和 *pet32a* 质粒进行处理, 使用 T4 DNA 连接酶将 PCR 产物与 *pet32a* 质粒连接, 构建 *pet32a-PoGalectin-6* 重组质粒。将重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 表达感受态细胞, 使用 0.5 mmol/L IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 4 h 诱导蛋白表达, 同时, 以未加 IPTG 诱导的细胞作为对照组, 通过超声破碎法提取 PoGalectin-6 重组蛋白(rPoGalectin-6)。将破碎后的菌液于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后, 收集沉淀进行变性及复性, 然后经 Ni-NTA 树脂纯化, 并利用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定。rPoGalectin-6 蛋白浓度通过 Bradford 法进行测定。

### 1.8 rPoGalectin-6 与微生物的亲合力检测

通过酶联免疫吸附法检测 rPoGalectin-6 对 3 株革兰氏阳性菌[枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)]及 3 种革兰氏阴性菌[杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)]的亲合力。上述细菌均取自本实验室保存菌种, 将上述细菌于磷酸盐缓冲液(PBS)中重悬至  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 各取 100  $\mu$ L 的细菌悬液置于 96 孔 EIA/RIA 板(康宁, 中国), 4 $^{\circ}$ C 下过夜培养。然后每孔

表 1 PoGalectin-6 基因克隆和荧光定量所用引物

Tab.1 Primers for PCR and qRT-PCR of PoGalectin-6 gene

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Application
PoGalectin-6-qF	ATCAGCCCCGTCTATGGACCT	qRT-PCR 扩增
PoGalectin-6-qR	ACTTTGTCCCAGCCGTCAAA	qRT-PCR 扩增
PoEF1 $\alpha$ -qF	CATGGTCGTGACCTTCGCTC	qRT-PCR 内参
PoEF1 $\alpha$ -qR	CTCGGGCATAGACTCGTGGT	qRT-PCR 内参
PoGalectin-6-eF	CCGGAATTCATGACCTTTGTTGCTCCTCCTG	PCR 扩增
PoGalectin-6-eR	CCCAAGCTTGAAGTGGATGTACGAGATCTGC	PCR 扩增



加入 250  $\mu\text{L}$  封闭缓冲液(5%脱脂奶粉溶于 PBST), 继续在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下封闭 1 h。用 PBS 将 rPoGalectin-6 稀释至终浓度分别为 0.1、1 和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以 PBS 作为对照, 各取 100  $\mu\text{L}$  rPoGalectin-6 加入孔中, 并在 22 $^{\circ}\text{C}$  下培养 1 h, 每个蛋白浓度均设置 3 个平行。接着将小鼠抗 His 抗体(全式金, 中国)按照 1:2000 的比例稀释至 5%脱脂奶粉中, 分别向每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  小鼠抗 His 抗体, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h。然后, 将羊抗鼠 IgG(全式金, 中国)按照 1:4000 的比例稀释至 5%脱脂奶粉中, 分别向每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  含 HRP 标签的羊抗鼠 IgG, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h。在上述每一步结束时, 均用 300  $\mu\text{L}$  PBST 洗涤 3 次。以上反应结束后, 分别向每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 溶液显色 5 min, 最后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 1 mol/L 硫酸终止反应, 在 450 nm 处测定吸光值。

### 1.9 rPoGalectin-6 与微生物的凝集活性检测

利用 2 株革兰氏阳性菌(短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌)和 2 株革兰氏阴性菌(杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌)检测 rPoGalectin-6 的细菌凝集活性, 上述细菌均取自本实验室保存菌种。将细菌培养至对数中期后重悬于 Tris 缓冲盐溶液(TBS)中至终浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL。实验组处理方法: 将 25  $\mu\text{L}$  rPoGalectin-6 蛋白(60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与 25  $\mu\text{L}$  各菌液在室温下混合均匀, 并加入 5  $\mu\text{L}$  浓度为 0.1 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 置于 200 r/min 摇床中培养 1 h。同时, 将 rPoGalectin-6 蛋白和细菌混合培养作为对照组, 验证无  $\text{Ca}^{2+}$  存在的情况下 rPoGalectin-6 蛋白的微生物凝集活性。在相同条件下, 用相同体积和浓度的牛血清白蛋白(BSA)代替 rPoGalectin-6 蛋白作为空白对照组。微生物凝集实验结果均在光学显微镜下观察得到。

## 2 结果

### 2.1 PoGalectin-6 基因序列分析和结构特征

通过 NCBI 网站对 PoGalectin-6 的核酸序列进行鉴定发现, PoGalectin-6 的 ORF 长 1089 bp, 共编码 362 个氨基酸(aa), 预测其分子量为 39.11 kDa, 理论等电点(pI)为 5.89。利用 SMART 软件对其氨基酸序列分析, 显示 PoGalectin-6 是一个串联重复型半乳糖凝集素, 在其 ORF 两端各有 1 个糖识别结构域(CRD), 长度分别为 127 aa 和 126 aa。2 个 CRD 之间通过一个长度为 65 aa 的富含甘氨酸的连接区域连接。此外, PoGalectin-6 的 2 个 CRD 均含有一个典型的  $\beta$ -半乳糖苷结合基序(HXNPR, X 代表任何氨基酸)(图 1)。

### 2.2 PoGalectin-6 的同源比对和系统进化分析

将 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类的 Galectin-6 和 Galectin-4 进行同源比对, 显示其相似性为 58.10%~80.90%。其中, PoGalectin-6 与大菱鲆 Galectin-4 的相似性最高, 为 80.90%; 与尼罗罗非鱼 Galectin-4 的相似性最低, 为 58.10%。将 PoGalectin-6 与上述 6 种串联重复型 galectins 进行多重序列比对, 结果显示, 不同硬骨鱼类的 Galectin-6 和 Galectin-4 的 2 个 CRD 并不保守, 但在每个 CRD 上都存在一段高度保守的氨基酸基序 HXNPR (X 代表任何氨基酸)(图 2)。

利用 MEGA 5.0 软件对 PoGalectin-6 与其他硬骨鱼类的串联重复型 galectins (Galectin-6、Galectin-4、Galectin-8 和 Galectin-9)的氨基酸序列比对, 构建了系统进化树(图 3)。系统进化树由两大分支组成, Galectin-6 和 Galectin-4 聚为一支, Galectin-8 和 Galectin-9 聚为一支。PoGalectin-6 在进化上与大菱鲆 Galectin-4 亲缘关系最为密切, 与其他物种的 Galectin-8 和 Galectin-9 亲缘关系较远。

### 2.3 PoGalectin-6 的组织分布

利用 qRT-PCR 方法分析 PoGalectin-6 在不同组织(肝、脾、肾、脑、肠、鳃、皮肤和肌肉)中的表达水平。结果显示, PoGalectin-6 在组织中的表达具有明显的特异性(图 4), PoGalectin-6 主要在牙鲆的肠组织中有大量表达。相对于肠组织中的表达量, 在脑、皮肤以及肌肉组织中表达量非常低, 而在肝、脾、肾和鳃组织中均不表达。

### 2.4 迟缓爱德华氏菌感染后 PoGalectin-6 在肠组织中的表达

迟缓爱德华氏菌感染牙鲆能够诱导 PoGalectin-6 在肠组织中的表达变化。在感染 0、2、8、12、24、48、72 h, PoGalectin-6 在肠组织中的表达水平如图 5 所示, PoGalectin-6 呈现出先升高后降低的表达趋势。其表达水平在感染后 12 h 呈现显著上调, 并达到峰值, 是 0 h 表达量的 4.2 倍。感染后 48 h 达到第 2 个峰值, 是 0 h 表达量的 2.4 倍, 随后 PoGalectin-6 表达水平下降, 并在感染后 72 h 恢复至正常水平。

### 2.5 重组 PoGalectin-6 蛋白的表达纯化

以 pet32a 为表达载体, 重组 PoGalectin-6 蛋白经镍柱分离纯化, 纯化的 rPoGalectin-6 蛋白包含来自 pet32a 载体质粒约 15 kDa 的标签蛋白和 39.11 kDa 的 PoGalectin-6 蛋白。重组蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分析(图 6), 在 55 kDa 处有条带, 与预测目的条带

大小基本一致。阴性对照和上清液中均未发现目的条带, 说明成功表达并分离纯化了 rPoGalectin-6 蛋白。

### 2.6 rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合能力

rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合实验验证了对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的结合能力。结果如图 7

所示, rPoGalectin-6 与微生物的结合能力与细菌种类有关, 其对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌、迟缓爱德华氏菌和创伤弧菌均表现出较强的结合能力, 且蛋白浓度越高, 其结合能力越强, 而 rPoGalectin-6 蛋白与短小芽孢杆菌并没有表现出明显的结合能力。

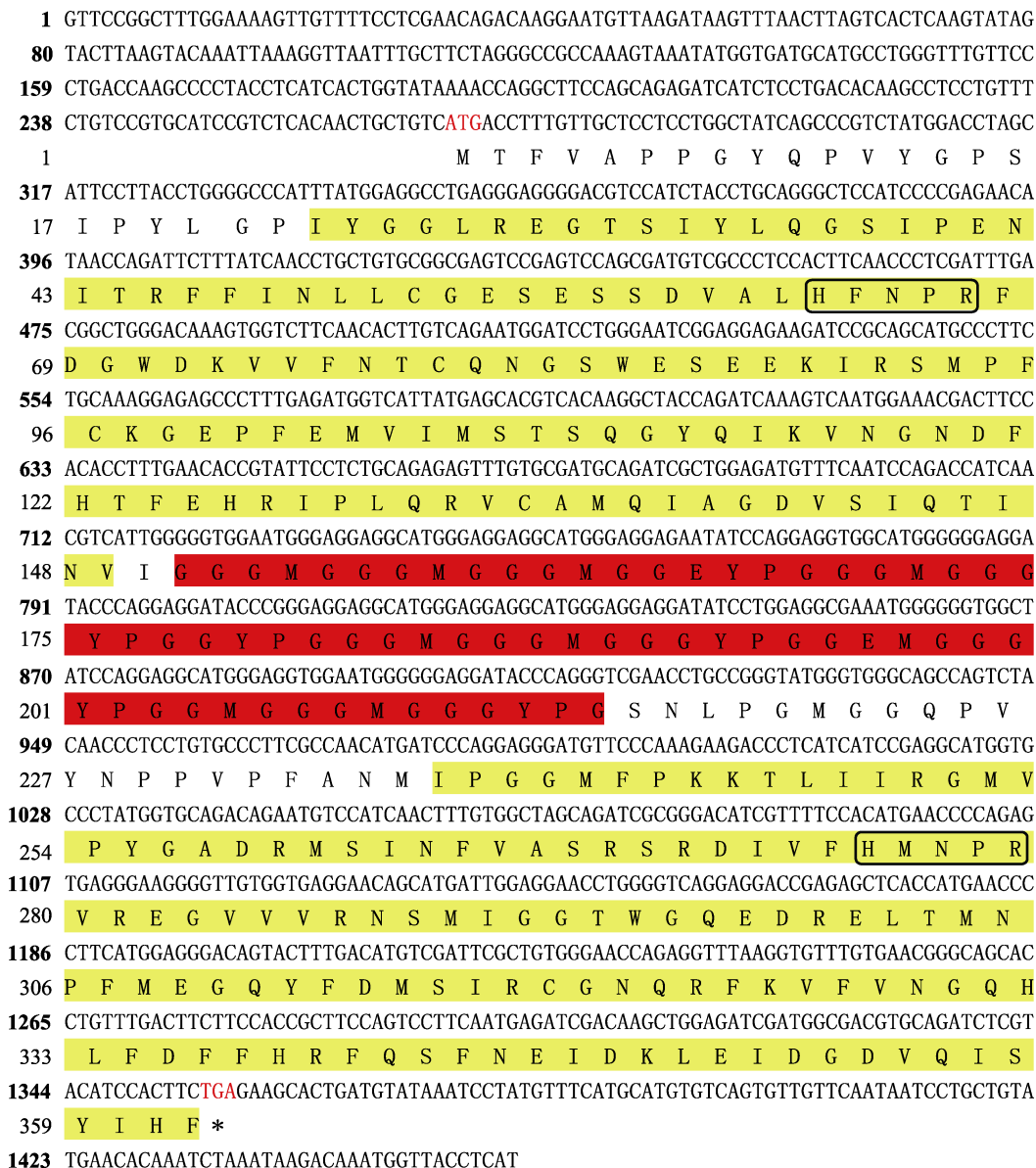


图 1 牙鲆 Galectin-6 ORF 序列和推测的氨基酸序列  
 Fig.1 The ORF and deduced amino acid sequences of PoGalectin-6

左边的数字代表核苷酸和推测的氨基酸序列。红色字体表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)。黄色阴影的氨基酸序列代表 2 个 CRD。红色阴影的氨基酸序列代表连接区域。黑框代表 CRD 中的保守基序 HXNPR(X 代表任何氨基酸)。  
 The numbers on the left represent the nucleotide and deduced amino acid sequences. Red font indicates the start codon (ATG) and the stop codon (TGA). The yellow shaded amino acid sequence represents two CRDs. The red shaded amino acid sequence represents the linker. The black boxes represent the conserved motifs HXNPR (X represents any amino acid) in the CRD.

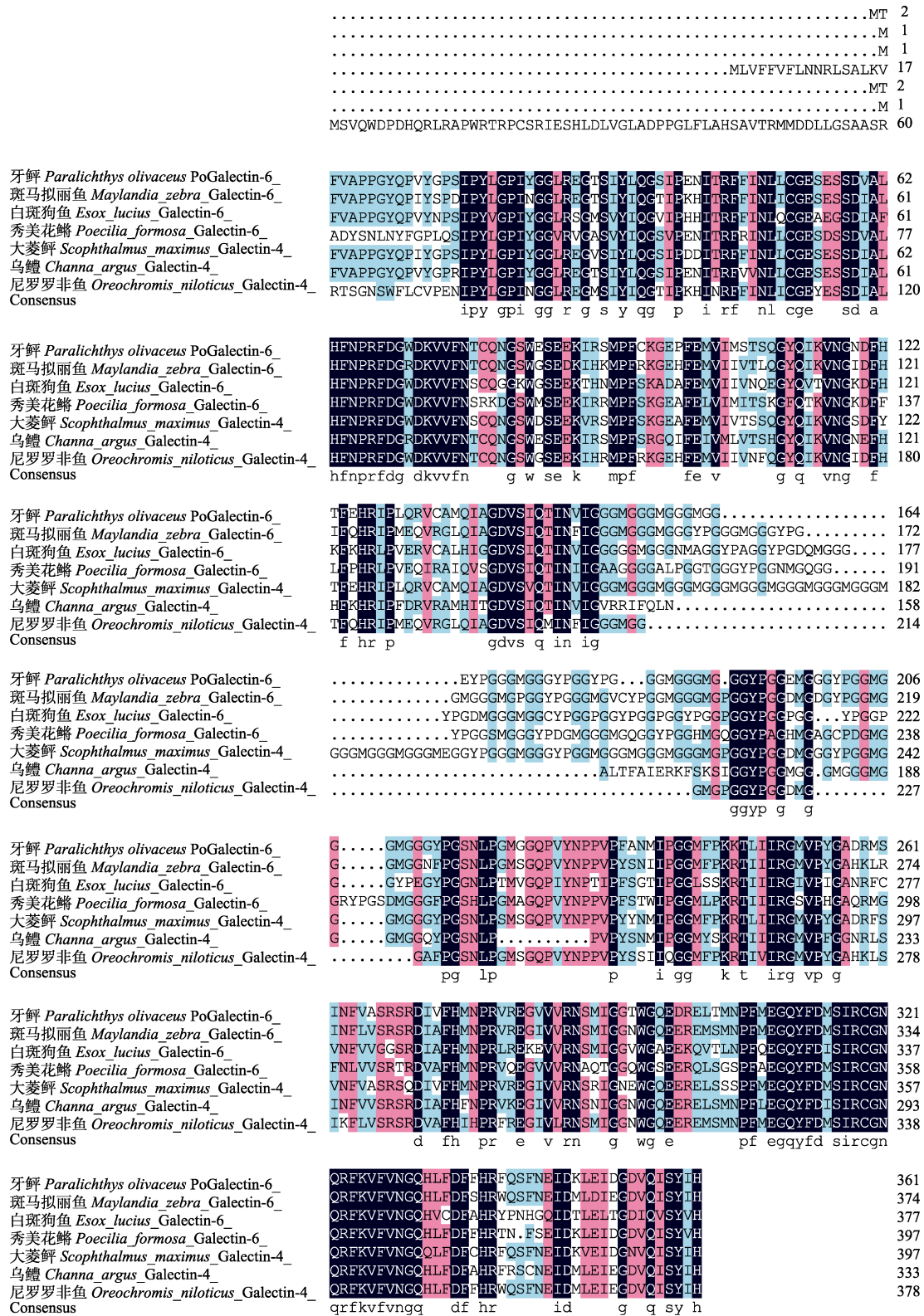


图 2 *PoGalectin-6* 多序列比对  
 Fig.2 Multiple sequence alignment of *PoGalectin-6*

氨基酸序列比对采用 DNAMAN 软件构建。红框代表 2 个 CRD。  
 黄框代表 CRDs 中的保守基序 HXNPR (X 代表任何氨基酸)。

The amino acid sequence alignment was constructed by the DNAMAN. Red boxes represent two CRDs.  
 The yellow boxes represent the conserved motifs HXNPR (X represents any amino acid) in CRDs.

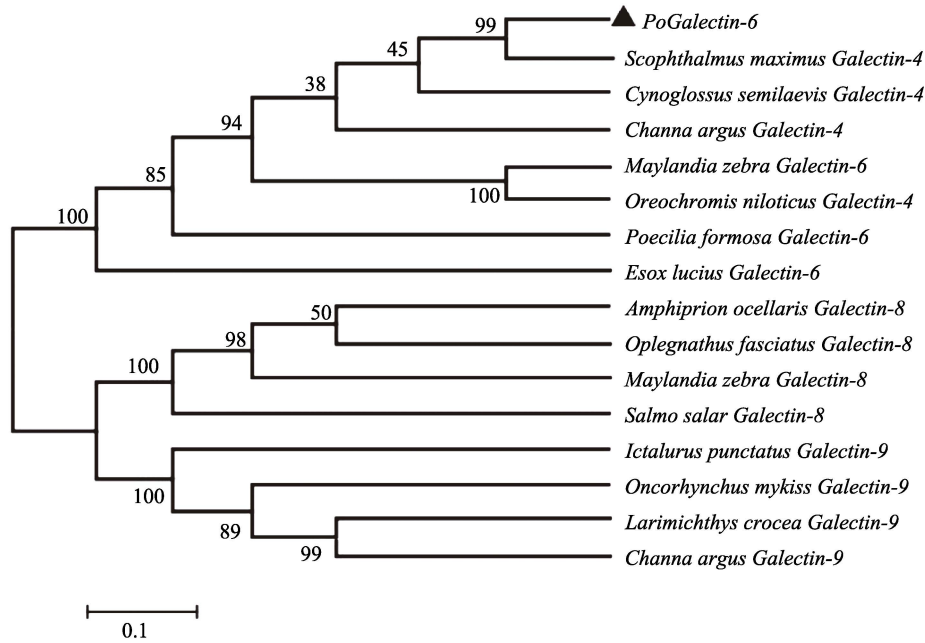


图 3 *PoGalectin-6* 与其他硬骨鱼类的串联重复型 galectins 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree showing the relationship between *PoGalectin-6* with tandem repeat galectins of other teleost

使用 MEGA 5.0 中的 neighbor-joining 方法构建系统进化树, 构建了 *PoGalectin-6* 和 *Galectin-4*、*Galectin-6*、*Galectin-8* 和 *Galectin-9* 等串联重复型 galectins 的系统进化树。

Phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm in MEGA 5.0. The phylogenetic trees of *PoGalectin-6* and other tandem repeats galectin was constructed, including *Galectin-4*, *Galectin-6*, *Galectin-8*, and *Galectin-9*.

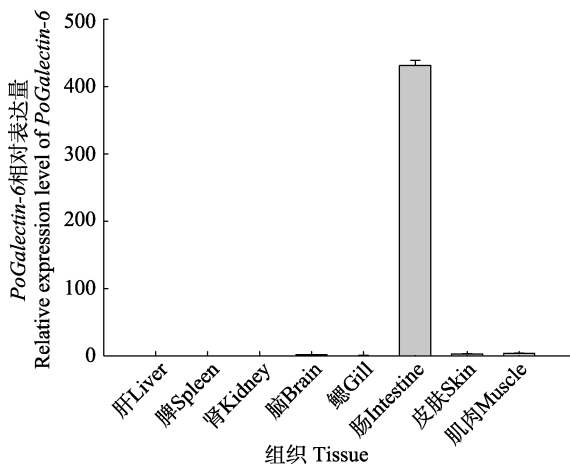


图 4 *PoGalectin-6* 在牙鲈正常组织中的相对表达量

Fig.4 The relative expression of *PoGalectin-6* gene in normal tissues of *P. olivaceus*

象, 这说明只有在  $Ca^{2+}$  存在的情况下, r*PoGalectin-6* 才能展现出较强的微生物凝集活性。

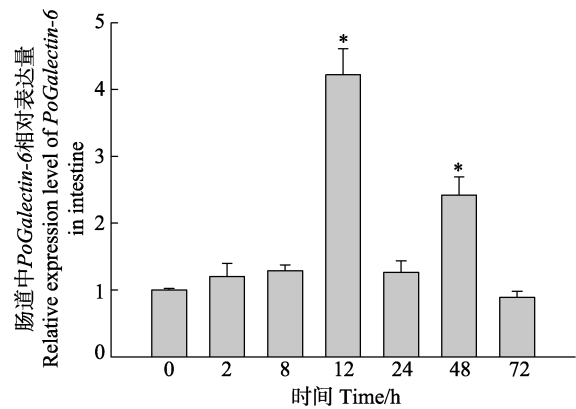


图 5 迟缓爱德华氏菌感染牙鲈后肠道中 *PoGalectin-6* 的表达水平

Fig.5 Expression level of *PoGalectin-6* in the intestine of *P. olivaceus* infected *E. tarda*

### 2.7 r*PoGalectin-6* 蛋白与微生物凝集活性

细菌凝集实验结果如图 8 所示, r*PoGalectin-6* 蛋白均能够显著凝集短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、杀鲑气单胞菌和迟缓爱德华氏菌。对照组中, BSA 并未展现出对细菌的凝集反应。此外, 在  $Ca^{2+}$  不存在的情况下, r*PoGalectin-6* 蛋白未表现出明显的细菌凝集现

以 0 h 时的表达水平为对照, 不同时间点(2、8、12、24、48 和 72 h)的表达量通过 qRT-PCR 获得。

\*代表显著性差异( $P < 0.05$ )。

The data determined by qRT-PCR at different time points (0, 2, 8, 12, 24, 48, and 72 h) compared with the 0 h time point respectively. The symbol \* represent  $P < 0.05$ .

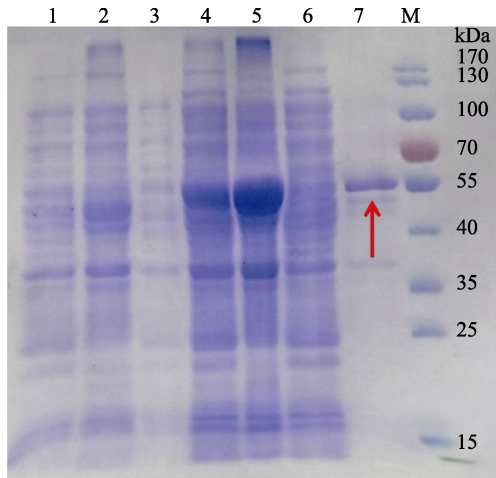


图 6 纯化 rPoGalectin-6 蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified rPoGalectin-6

M: 蛋白质 Marker; 1: 未诱导的细菌总提取物;  
2: 未诱导的细菌提取物沉淀;  
3: 未诱导的细菌提取液上清液; 4: 诱导的细菌总提取物;  
5: 诱导的细菌提取物沉淀; 6: 诱导的细菌提取液上清液;  
7: 纯化的 rPoGalectin-6 蛋白

Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: Total soluble cellular extract from negative control; Lane 2: Total precipitation cellular extract from negative control; Lane 3: total supernatant cellular extract from negative control; Lane 4: Total soluble cellular extract from the experimental group; Lane 5: Total precipitation cellular extract from the experimental group; Lane 6: Total supernatant cellular extract from the experimental group; Lane 7: Concentrated purified recombinant *PoGalectin-6*

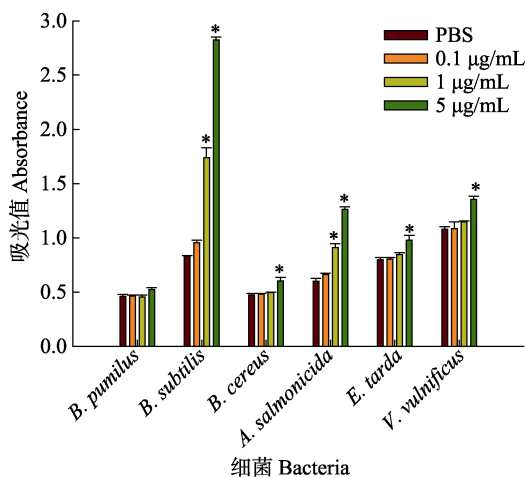


图 7 rPoGalectin-6 蛋白与微生物结合能力验证  
Fig. 7 Verification of bacterial binding capacity

\*代表与 PBS 组相比具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

\* indicates a significant difference compared with PBS ( $P < 0.05$ ).

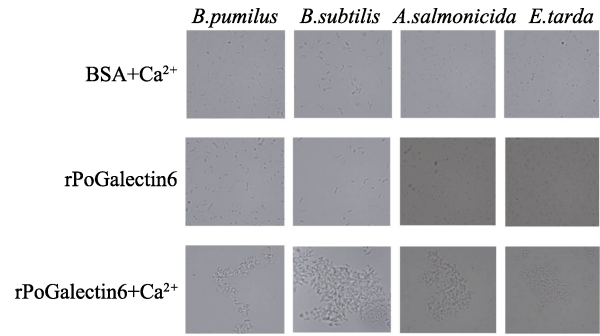


图 8 rPoGalectin-6 蛋白与微生物的凝集活性  
Fig. 8 Agglutinating activity of rPoGalectin-6 with microorganisms

### 3 讨论

半乳糖凝集素是一种具有保守 CRD 的可溶性凝集素，它们广泛存在于哺乳动物和昆虫体内，并在机体免疫过程中发挥重要作用。研究发现，在哺乳动物体内，半乳糖凝集素主要参与细胞粘附、生长调节和免疫等生物过程，尤其在疾病防控等方面起到关键作用(Oyanadel *et al*, 2018; Rao *et al*, 2016; Wdowiak *et al*, 2018)。虽然在哺乳动物中已经鉴定出 *Galectin-6*，但在硬骨鱼中尚无 *Galectin-6* 的相关研究，因此，其应对细菌感染的免疫功能尚不清楚。本研究通过分析 *PoGalectin-6* 的分子特征，探究其在体内发挥的相关功能，旨在为硬骨鱼类中 *Galectin-6* 的功能研究奠定基础。

本研究成功从牙鲆体内分离并鉴定了 *Galectin-6*，序列分析表明，*PoGalectin-6* 是一种标准的串联重复型半乳糖凝集素，它拥有 2 个能够特异性识别并结合糖的 CRD，每个 CRD 上都包含一个非常保守的糖结合基序(HXNPR，X 代表任何氨基酸)，CRD 之间是由 65 个氨基酸编码的富含甘氨酸的结合肽组成的连接区域。同源序列比对分析表明，*PoGalectin-6* 与大菱鲆 *Galectin-4* 相似性最高(80.90%)，在系统进化树上，*PoGalectin-6* 和 *Galectin-4* 分布在同一分支。同源序列比对和系统进化树实验结果证实，*PoGalectin-6* 与大菱鲆 *Galectin-4* 亲缘关系上更接近，这也与 Gitt 等(1998a)发现 *Lgals4* 和 *Lgals6* 高度相似的结论相一致。Gitt 等(1998b)是在研究小鼠 *Lgals4* 的过程中意外发现一个由 8 个外显子编码、具有 2 个 CRD 的新的串联重复型半乳糖凝集素，即 *Lgals6*。随后，将 *Lgals6* 与 *Lgals4* 进行比对分析发现，二者同源性非常高，不同之处在于，*Lgals6* 的 2 个 CRD 之间的连接区域相较于 *Lgals4* 缺少 24 个氨基酸。因此，Gitt 等(1998b)推测，连接区域长度的差异可能会

影响 CRD 间交联配体的功能活性, 进而导致小鼠 *Lgals6* 和 *Lgals4* 存在功能上的差异。这种现象在哺乳动物的 *Galectin-9* 中已有先例, 如哺乳动物肠道中的 *Galectin-9* 具有较长的连接区域, 而其他组织中的 *Galectin-9* 则具有较短的连接区域, 这表明连接区域的长度差异可能导致不同组织中 *Galectin-9* 的功能差异(Wada *et al*, 1997)。

为了明确 *PoGalectin-6* 是否在牙鲆机体免疫过程中发挥作用, 在迟缓爱德华氏菌感染牙鲆 72 h 内, 对 *PoGalectin-6* 的组织分布情况进行分析。结果显示, *PoGalectin-6* 主要在牙鲆肠组织中大量表达, 在其他组织中表达量非常低或基本不表达, 这与 Houzelstein 等(2013)发现的小鼠体内 *Lgals6* 仅在肠胃中有表达的结果一致。鉴于肠道是硬骨鱼体内能识别微生物并促进免疫排斥的主要粘膜相关淋巴组织(MALT)之一(Fermino *et al*, 2011), 且 *PoGalectin-6* 与 *Lgals6* 均在肠道组织中具有类似的表达分布, 因此, 对 *PoGalectin-6* 是否在牙鲆体内也作为抗菌蛋白在免疫中发挥重要作用进行进一步验证。攻毒实验显示, 迟缓爱德华氏菌感染牙鲆后 12 h 内, 肠组织内 *PoGalectin-6* 的表达量增加了 4 倍以上, 说明 *PoGalectin-6* 在迟缓爱德华氏菌入侵后参与了机体的免疫应答。

半乳糖凝集素作为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 可以直接与细菌和寄生虫表面的多聚糖相互作用, 在抵抗微生物感染的过程中起到调节免疫应答的作用(Shi *et al*, 2018)。微生物结合实验表明, rPoGalectin-6 能广泛识别并结合革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 暗示 *PoGalectin-6* 可能参与牙鲆对细菌感染的先天免疫防御机制。此外, rPoGalectin-6 对微生物的结合能力具有浓度依赖性, 即高浓度的 rPoGalectin-6 对细菌的结合能力更强。虽然 rPoGalectin-6 与细菌的结合能力已被证实, 但 rPoGalectin-6 与细菌的作用机制尚不清楚。*Galectin-6* 已被证明具有  $\beta$ -半乳糖苷结合活性(Gitt *et al*, 1998a), 然而, rPoGalectin-6 是否通过结合细菌表面的  $\beta$ -半乳糖苷进而展现出与细菌的亲合力还有待进一步研究。

凝集活性是半乳糖凝集素最重要的特性, 它们可以通过结合细胞表面的糖蛋白和糖复合物来凝集细胞。细菌凝集实验结果表明, rPoGalectin-6 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有凝集活性, 这意味着 rPoGalectin-6 可能作为一种粘连相关的蛋白质, 通过识别、结合以及凝集微生物, 在牙鲆的先天性免疫防御过程中发挥作用。在对凝集素凝集活性的研究中, 认为  $\text{Ca}^{2+}$  是 C 型动物凝集素发挥凝集活性的重要因素(Su *et al*, 2020), 相反, 半乳糖凝集素曾被认为是

不依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  的 S 型动物凝集素 (Hughes, 2001)。然而, 一些半乳糖凝集素确实表现出  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的凝集活性, 例如, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)半乳糖凝集素 *Galectin (EsGal)* (Wang *et al*, 2016)和大黄鱼 *Galectin-9 (LcGal9)* (Zhang *et al*, 2016)。这些结果表明, 非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的凝集活性可能不是半乳糖凝集素不可或缺的特征。 $\text{Ca}^{2+}$  在 rPoGalectin-6 凝集过程中的作用机制可借鉴巨噬细胞甘露糖受体第 4 个 CRD (CRD-4) 与单糖的结合机制(Mullin *et al*, 1997)。CRD-4 与甘露糖的结合由 2 个  $\text{Ca}^{2+}$  参与, 其中一个  $\text{Ca}^{2+}$  仅起到定位作用, 另一个  $\text{Ca}^{2+}$  则与 CRD-4 侧链的羰基氧原子形成配位键, 然后与甘露糖的羟基 3 或 4 结合形成三元络合物, 完成 CRD-4 与甘露糖的结合。因此,  $\text{Ca}^{2+}$  是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型凝集素白识别和结合碳水化合物过程中的一个重要因素, 这也解释了在没有  $\text{Ca}^{2+}$  存在的情况下, rPoGalectin-6 没有表现出理想的细菌凝集活性。

本研究识别并鉴定了 *PoGalectin-6*, 它主要在肠组织中大量表达, 并且经微生物刺激后, *PoGalectin-6* 在肠组织中的表达水平显著升高。在与细菌的互作实验中发现, rPoGalectin-6 具有较强的细菌结合能力和凝集活性。综上所述, *PoGalectin-6* 参与了由迟缓爱德华氏菌感染所引起的免疫应答, 为探索 *Galectin-6* 在硬骨鱼类中的免疫功能奠定了基础。

## 参 考 文 献

- BAI Y, NIU D, BAI Y, *et al*. Identification of a novel galectin in *Sinonovacula constricta* and its role in recognition of gram-negative bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 80: 1-9
- BUTSCHI A, TITZ A, WALT M A, *et al*. Caenorhabditis elegans N-glycan core beta-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(1): e1000717
- FERMINO M L, POLLI C D, TOLEDO K A, *et al*. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26004
- FERRAGUT F, CAGNONI A J, COLOMBO L L, *et al*. Dual knockdown of galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166), synergistically delays *in vivo* breast cancer growth. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 2019, 1866(8): 1338-1352
- GITT M A, COLNOT C, POIRIER F, *et al*. Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *Journal of Biological Chemistry*, 1998a, 273(5): 2954-2960

- GITT M A, XIA Y R, ATCHISON R E, *et al.* Sequence, structure, and chromosomal mapping of the mouse *Lgals6* gene, encoding galectin-6. *Journal of Biological Chemistry*, 1998b, 273(5): 2961–2970
- HOUZELSTEIN D, REYES-GOMEZ E, MAURER M, *et al.* Expression patterns suggest that despite considerable functional redundancy, galectin-4 and -6 play distinct roles in normal and damaged mouse digestive tract. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2013, 61(5): 348–361
- HU X, CHEN H, XU J, *et al.* Function of *Aedes aegypti* galectin-6 in modulation of Cry11Aa toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 162: 96–104
- HUGHES R C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 2001, 83(7): 667–676
- HWANG J S, TAKAKU Y, MOMOSE T, *et al.* Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18539–18544
- LIU F T, YANG R Y, SAEGUSA J, *et al.* Galectins in regulation of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2011, 705: 431–442
- MULLIN N P, HITCHEN P G, TAYLOR M E. Mechanism of  $Ca^{2+}$  and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(9): 5668–5681
- NATSUGA K, CIPOLAT S, WATT F M. Increased bacterial load and expression of antimicrobial peptides in skin of barrier-deficient mice with reduced cancer susceptibility. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(1): 99–106
- NATSUGA K, WATT F M. Galectin-6 is a novel skin anti-microbial peptide that is modulated by the skin barrier and microbiome. *Journal of Dermatological Science*, 2016, 84(1): 97–99
- NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, *et al.* Galectins regulate the inflammatory response in airway epithelial cells exposed to microbial neuraminidase by modulating the expression of SOCS1 and RIG1. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2 Pt A): 194–202
- OYANADEL C, HOLMES C, PARDO E, *et al.* Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(5): 557–574
- PACLIK D, LOHSE K, WIEDENMANN B, *et al.* Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14(10): 1366–1372
- RAO X J, WU P, SHAHZAD T, *et al.* Characterization of a dual-CRD galectin in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 60: 149–159
- SHATZ-AZOULAY H, VINIK Y, ISAAC R, *et al.* The animal lectin galectin-8 promotes cytokine expression and metastatic tumor growth in mice. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7375
- SHI W, XUE C, SU X Z, *et al.* The roles of galectins in parasitic infections. *Acta Tropica*, 2018, 177: 97–104
- STOWELL S R, ARTHUR C M, DIAS-BARUFFI M, *et al.* Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature Medicine*, 2010, 16(3): 295–301
- SU Y, LIU Y, GAO F, *et al.* A novel C-type lectin with a YPD motif from *Portunus trituberculatus* (PtCLec1) mediating pathogen recognition and opsonization. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 106: 103609
- TAKEUCHI T, ARATA Y, KASAI K I. Galactosebeta1-4fucose: A unique disaccharide unit found in N-glycans of invertebrates including nematodes. *Proteomics*, 2016, 16(24): 3137–3147
- THIJSSSEN V L, HEUSSCHEN R, CAERS J, *et al.* Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1855(2): 235–247
- VIZZINI A, PARRINELLO D, SANFRATELLO M A, *et al.* Inducible galectins are expressed in the inflamed pharynx of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 101–109
- WADA J, KANWAR Y S. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(9): 6078–6086
- WANG M Q, WANG L L, HUANG M M, *et al.* A galectin from *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing microbe agglutination and haemocytes encapsulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 55: 10–20
- WDOWIAK K, FRANCUZ T, GALLEGCO-COLON E, *et al.* Galectin targeted therapy in oncology: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 210
- YU Y, YUAN S, YU Y, *et al.* Molecular and biochemical characterization of galectin from amphioxus: Primitive galectin of chordates participated in the infection processes. *Glycobiology*, 2007, 17(7): 774–783
- ZHANG D L, LÜ C H, YU D H, *et al.* Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 167–178

## Cloning, Expression and Function of *Galectin-6* from *Paralichthys olivaceus*

LIU Xiaofei<sup>1,2</sup>, ZHANG Shuangshuang<sup>2</sup>, HENDRIANSYAH Endri<sup>1</sup>, LI Yingrui<sup>1,2</sup>,  
SU Lin<sup>2</sup>, LI Xiangqian<sup>3</sup>, XIU Yunji<sup>2</sup>, GU Wei<sup>1①</sup>

(1. College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210023, China;  
2. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;  
3. Jiangsu Provincial Key Construction Laboratory of Probiotics Preparation,  
Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu 223003, China)

**Abstract** Galectin-6 is a member of the  $\beta$ -galactoside-binding lectin family, which has been widely studied in mammals (e.g., *Lgals6*). *Galectin-6* has been cloned from several teleost fishes, such as *Maylandia zebra*, *Esox lucius*, and *Poecilia formosa*, but there are few studies on its function. In this study, we analyzed the molecular characteristics of Galectin-6 extracted from *Paralichthys olivaceus* (*PoGalectin-6*) and studied its immune-related functions. The full length of the open reading frame (ORF) of *PoGalectin-6* cDNA is 1089 bp, encoding 362 amino acids containing two carbohydrate recognition domains (CRDs). Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *PoGalectin-6* is highly similar to *Scophthalmus maximus Galectin-4* (approximately 80.9%). Tissue distribution experiments demonstrated that *PoGalectin-6* is specifically expressed in intestinal tissues. The expression level of *PoGalectin-6* in the intestine significantly increased after *Edwardsiella tarda* stimulation, and the highest expression level was observed at 12 h after infection. Recombinant *PoGalectin-6* (r*PoGalectin-6*) exhibited binding ability to gram-positive (*Bacillus subtilis*, and *B. cereus*) and gram-negative (*Aeromonas salmonicida*, *E. tarda*, and *Vibrio vulnificus*) bacteria. r*PoGalectin-6* showed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent agglutination activity against *B. pumilus*, *B. subtilis*, *A. salmonicida*, and *E. tarda*. This study suggests that *PoGalectin-6* may play an important role in the immune response against *E. tarda* infection, laying the foundation for exploring the immune functions of *Galectin-6* in teleosts.

**Key words** *Galectin-6*; *Paralichthys olivaceus*; *Edwardsiella tarda*; Immune response

① Corresponding author: GU Wei, E-mail: skywei426@sina.com



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210526001

http://www.yykxjz.cn/

王成强, 曹体宏, 李宝山, 王际英, 郝甜甜, 宋志东, 王晓艳, 孙永智. 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长性能、体组成及肠道部分生化指标的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 158–170

WANG C Q, CAO T H, LI B S, WANG J Y, HAO T T, SONG Z D, WANG X Y, SUN Y Z. Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on growth performance, body chemical composition and intestinal tract biochemical indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 158–170

## 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长性能、 体组成及肠道部分生化指标的影响\*



王成强 曹体宏 李宝山 王际英<sup>①</sup> 郝甜甜  
宋志东 王晓艳 孙永智

(山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006)

**摘要** 本实验以大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼[(39.69±0.25) g]为研究对象,探究由裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)和拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)组成的混合微藻替代鱼油对幼鱼生长性能、体组成、肠道消化水平及抗氧化能力的影响,以确定混合微藻替代鱼油的适宜比例。通过在基础饲料中添加不同比例的混合微藻,分别替代 0、25%、50%和 100%的鱼油,制成 4 组等氮等脂的实验饲料(分别命名为 D1、D2、D3 和 D4),每组饲料设 3 个重复,实验周期为 12 周。结果显示,随替代比例的提高,大菱鲂幼鱼的增重率(WGR)和饲料效率(FE)呈下降趋势,D1、D2 和 D3 组的特定生长率(SGR)和 FE 无显著性差异,但均显著高于 D4 组( $P<0.05$ );肝体比(HSI)在 D1 组达到最大值,且显著高于其他各组( $P<0.05$ );存活率(SR)和肥满度(CF)在各组之间无显著差异( $P>0.05$ )。随着混合微藻替代鱼油比例的升高,全鱼和肌肉粗脂肪含量呈先升高后降低的变化趋势,且 D4 组显著低于 D1 组( $P<0.05$ );大菱鲂幼鱼鱼体中 C20:4n-6 和 n-6 PUFA 含量显著升高,在 D4 组均达到最大值,且显著高于对照组( $P<0.05$ )。而 EPA、DHA 和 n-3 PUFA 含量随之显著下降,对照组(D1)含量显著高于其他各组( $P<0.05$ );肌肉中 C20:4n-6 和 DHA 含量在不同实验组间无显著性差异( $P>0.05$ ),EPA 和 n-3 PUFA 含量呈显著降低趋势( $P<0.05$ )。肠道脂肪酶活力在 D3 组达到最大值,显著高于对照组( $P<0.05$ ),肠道胰蛋白酶活力也是在 D3 组最高,但与对照组无显著性差异( $P>0.05$ )。与 D1 组相比,D3 组肠道中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)活力和补体 C3 含量均显著升高( $P<0.05$ )。肠道中超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和过氧化氢酶(CAT)活力随替代比例的提高呈先升高后降低的趋势,均在 D3 组达到最大值,显著高于 D1 组( $P<0.05$ ),而肠道中丙二醛(MDA)含量在不同实验组间并未表现出显著性差异( $P>0.05$ )。综上所述,混合微藻替代 50% 的鱼油并不会对大菱鲂幼鱼的生长性能产生负面影响,同时可以提高肠道的消化性能、抗氧化能力和非特异性免疫能力。

**关键词** 大菱鲂;裂壶藻;拟微绿球藻;生长性能;肠道生化指标

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0158-13

\* 山东省自然科学基金(ZR2019PC061; ZR2020QC205)和烟台市科技计划项目(2020MSGY067)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019PC061; ZR2020QC205), and Science and Technology Development Plan of Yantai (2020MSGY067)]. 王成强, E-mail: chengqiangwang@126.com

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

收稿日期: 2021-05-26, 收修改稿日期: 2021-06-18

近年来,受捕捞量等因素的影响,全球鱼油总产量呈显著下滑趋势(FAO, 2019),而水产饲料对鱼油的需求量却与日俱增,因此,探寻可以替代鱼油的合适脂肪源显得尤为重要。鉴于此,很多学者在鱼油替代方面做了大量研究工作,如用豆油、玉米油、亚麻籽油、棕榈油等植物油单一或混合替代鱼油。但由于植物油中饱和脂肪酸较多,缺少 n-3 高不饱和脂肪酸(n-3 LC-PUFA: 如 EPA、DHA 等),难以满足水生动物的营养需求,同时含有植物甾醇等抗营养因子(Cruz-Garcia *et al*, 2011),长期摄食会对机体的生长、抗病力、品质等方面产生不利影响。另外,研究表明,n-3 LC-PUFA 在对机体成长、抗炎症、抗病力、繁殖性能及心脑血管健康等方面都表现出积极作用(Tibaldi *et al*, 2015; Shahidi *et al*, 2018),而大部分海水鱼,除篮子鱼(*Siganus orarnin*)、鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)外,均不能合成 n-3 LC-PUFA,或合成量难以满足自身需求。

微藻作为海洋食物链的初级生产者,因其自身含有丰富脂类营养,特别是富含 n-3 LC-PUFA,在当前鱼油替代资源的开发中备受关注。一方面,微藻脂类中的大部分碳链为中长链的直链分子,且部分微藻中 EPA 和 DHA 的含量较高,常见种类如拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)的 EPA 为 30%左右,牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、紫球藻(*Porphyridium*)的 EPA 为 20%左右,裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)的 DHA 含量为 30%~45%,金藻(*Lsochrysis zhanjiangensis*)的 DHA 含量为 15%左右(吉红等, 2020);另一方面,同鱼油相比,微藻产量受季节波动较小,稳定性较高,同时,作为初级生产者具有更高的安全性(张继红等, 2016; Roy *et al*, 2015)。因拟微绿球藻和裂壶藻分别含有丰富的 EPA 和 DHA,所以当前许多有关微藻替代鱼油的研究集中在这两者上。在宝石鲈(*Scortum barcoo*) (Hoestenbergh *et al*, 2016)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Miller *et al*, 2007)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Sarker *et al*, 2016)等的研究中表明,裂壶藻部分或是完全替代鱼油不会对鱼体的生长性能和存活率产生负面影响,还可以增加肌肉的 DHA 含量,提高肌肉品质。另外,在欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的研究中表明,用拟微绿球藻替代 50%~100%的饲料鱼油时,实验鱼的生长和饲料利用率无明显变化(Qiao *et al*, 2014; Haas *et al*, 2016)。在大菱鲆幼鱼的实验中发现,添加 5.0%~7.5%的拟微绿球藻粉替代 16%~24%的鱼油,可以提高鱼体的抗氧化能力和免疫性能(胡冬雪, 2019)。

然而,在以往报道中,主要集中在单一微藻对鱼油替代的研究,而单一替代容易造成 DHA/EPA 比值的变化,难以平衡 n-3 HUFA 营养,并影响鱼类生理功能(Eryalcin *et al*, 2013)。另外,肠道作为鱼体的主要消化吸收器官,其功能的变化也是决定微藻能否被利用的关键,而先前在这一方面鲜有研究。本实验以我国北方主要养殖经济鱼类大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为研究对象,在课题组前期实验的基础上,将拟微绿球藻和裂壶藻比例混合,评估在大菱鲆饲料中这种混合微藻替代鱼油的可能性,并分析对生长、体组成、肠道抗氧化及免疫能力的影响,以期丰富微藻在鱼油替代中的理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料的配制

以鱼粉、大豆浓缩蛋白和酪蛋白为主要蛋白源,鱼油和豆油为主要脂肪源,并补充矿物质、维生素和诱食剂等配制基础饲料。在此基础上,分别用裂壶藻粉和拟微绿球藻的混合物(裂壶藻:拟微绿球藻=1:8.60)替代基础饲料中的鱼油,替代比例分别为 0、25%、50%和 100%,以豆油进行调平,制成 4 组等氮等脂的实验饲料(表 1)。4 组实验饲料分别命名为 D1、D2、D3 和 D4,其中 D1 组为对照组。实验原料及饲料脂肪酸组成情况见表 2。所有饲料原料均粉碎过 80 目筛,依据实验配方,按照配比从小到大逐级均匀混合,随后加入油脂与干粉充分混匀,再加入适量蒸馏水再次混合均匀,挤压制成硬颗粒饲料,50℃左右烘干后,置于通风干燥处备用。

### 1.2 实验用鱼及实验管理

实验用鱼购买于山东省莱州市海胜苗种有限公司,养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院室内循环水养殖实验室进行。将大菱鲆幼鱼先放置于养殖桶中,用对照组饲料暂养 10 d,使其适应养殖环境。实验正式开始前,将其饥饿 24 h,选取规格均匀、体色健康的大菱鲆幼鱼[平均体重为(39.69±0.25) g],随机放置于 12 个养殖桶内。每个桶内放置 30 尾幼鱼,每个实验组 3 个重复,养殖方式为循环水养殖,养殖实验周期为 12 周。实验期间每天在 07:30 和 16:30 饱食投喂 2 次,投喂 30 min 后排残饵并记录。水温控制在(16.5±1.0)℃,溶解氧(DO)>6.2 mg/L,盐度为 24.6~27.5, pH 为 7.6~8.0,氨氮和亚硝酸氮含量均<0.1 mg/L。

### 1.3 实验样品采集

养殖实验结束后,将鱼禁食 24 h,然后计数和称

表1 实验饲料配方及营养水平(干物质%)

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

原料 Ingredients	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
鱼粉 Fish meal	35.00	35.00	35.00	35.00
大豆浓缩蛋白 Soybean protein isolated	20.00	16.00	12.50	5.00
小麦粉 Wheat meal	15.00	15.00	15.00	13.00
谷朊粉 Gluten	5.00	5.00	5.00	5.00
酪蛋白 Casein	8.00	8.00	8.00	8.00
维生素预混料 Vitamin premix <sup>1</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 Mineral premix <sup>2</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50
其他成分 Other composition	4.25	4.25	4.25	4.25
鱼油 Fish oil	6.00	4.50	3.00	0.00
豆油 Soybean oil	0.00	0.46	0.93	1.86
拟微绿球藻 <i>Nannochloropsis</i> sp. <sup>3</sup>	0.00	5.59	11.18	22.36
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i> sp. <sup>4</sup>	0.00	0.65	1.30	2.60
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	4.25	3.05	1.34	0.43
营养组成 Proximate composition				
水分 Moisture	5.01	4.27	4.74	6.45
粗蛋白 Crude protein	50.76	50.67	50.96	51.46
粗脂肪 Crude lipid	10.69	10.27	10.72	10.34
粗灰分 Crude ash	10.35	10.50	10.75	10.21

注: 1: 维生素混合料(mg/kg or IU/kg 饲料): 维生素 A, 7500.0 IU; 维生素 D, 1500.0 IU; 维生素 E, 60.0 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 18.0 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 12.0 mg; 维生素 B<sub>2</sub>, 12.0 mg; 维生素 B<sub>6</sub>, 20.0mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.1 mg; 泛酸, 48.0 mg; 烟酰胺, 90.0 mg; 叶酸, 3.7mg; D-生物素, 0.2 mg; 肌醇, 60.0 mg; 维生素 C, 310.0 mg; 2: 矿物质混合料(mg/kg 饲料): 锌, 35.0 mg; 锰, 21.0 mg; 铜, 8.3 mg; 铁, 23.0 mg; 钴, 1.2 mg; 碘, 1.0 mg; 硒, 0.3 mg; 3: 拟微绿球藻: 粗蛋白, 9.55%; 粗脂肪, 25.46%; 青岛越洋进出口有限公司, 山东; 4: 裂壶藻: 粗蛋白, 44.50%; 粗脂肪, 18.25%; 烟台海荣生物科技有限公司, 山东。

Note: 1: Vitamin premix (mg/kg or IU/kg diet): Vitamin A 7500.0 IU, vitamin D 1500.0 IU, vitamin E 60.0 mg, vitamin K<sub>3</sub> 18.0 mg, vitamin B<sub>1</sub> 12.0 mg; vitamin B<sub>2</sub> 12.0 mg, vitamin B<sub>6</sub> 20.0 mg, vitamin B<sub>12</sub> 0.1 mg, pantothenate acid 48.0 mg, niacin 90 mg, folic acid 3.7 mg, D-biotin 0.2 mg, inositol 60.0 mg, vitamin C 310.0 mg; 2: Mineral premix (mg/kg diet): Zn 35.0 mg, Mn 21.0 mg, Cu 8.3 mg, Fe 23.0 mg, Co 1.2 mg, I 1.0 mg, Se 0.3 mg; 3: *Schizochytrium* sp. (% dry matter basis): Crude protein, 9.55%; Crude lipid, 25.46%; Qingdao Yueyang Import and Export Co. Ltd, Qingdao, China; 4: *Nannochloropsis* sp. (% dry matter basis): Crude protein, 44.50%; Crude lipid, 18.25%; Yantai Hairong Biotechnology Co. Ltd., Yantai, China.

总重。之后, 从每个养殖桶中随机取出 8 尾鱼, 测定每尾鱼的体长和体重, 其中 3 尾用于全鱼体成分分析, 放置于-20℃冰柜保存。另外 5 尾鱼, 先采用尾部静脉取血法取血, 取出血液 4℃静置 4 h, 经离心得到血清, 将血清转移到离心管后迅速放入液氮中。之后, 将采完血的大菱鲆进行解剖取样, 分别分离出肠道和肌肉等组织, 均放入离心管中后迅速转移到液氮中, 后转移到-80℃超低温冰箱中保存, 用于后期实验分析。

#### 1.4 测定指标及方法

##### 1.4.1 生长指标

存活率(survival rate, SR, %)= $100 \times N_t / N_0$ ;

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

饲料效率(feed efficiency, FE)= $(W_t - W_0) / F$ ;

蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER, %)= $100 \times (W_t - W_0) / (F \times P)$ ;

脂肪效率(lipid efficiency ratio, LER, %)= $100 \times (W_t - W_0) / (F \times L)$ ;

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)= $100 \times W_h / W_t$ ;

肥满度(condition factor, CF)= $100 \times W_t / L^3$ ;

式中,  $N_t$  为实验鱼末数量,  $N_0$  为实验鱼初数量,  $W_t$  为实验鱼末重(g),  $W_0$  为实验鱼初重(g),  $d$  为实验鱼养殖时间,  $F$  为总投饵量(g),  $P$  为饲料中蛋白质的含

表2 实验饲料及原料脂肪酸组成(%总脂肪酸)

Tab.2 Fatty acids composition of the experimental diets and raw materials (% total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acids	组别 Groups						
	鱼油 Fish oil	拟微绿球藻 <i>Nannochloropsis</i> sp.	裂壶藻 <i>Schizochytrium</i> sp.	D1	D2	D3	D4
C14:0	7.46	6.35	6.23	5.03	4.74	4.64	3.84
C16:0	18.91	31.32	22.42	19.73	20.56	20.96	22.34
C18:0	3.22	0.55	0.52	3.42	3.18	2.93	2.30
C20:0	0.69	0.11	0.10	0.47	0.35	0.32	0.15
ΣSFA <sup>1</sup>	30.29	38.33	29.27	28.65	28.82	28.84	28.62
C16:1n-7	8.84	21.33	0.11	5.72	6.27	6.81	7.59
C18:1n-9	13.20	6.15	0.27	12.68	12.02	11.49	9.81
C18:1n-7	2.98	1.31	//	2.73	2.46	2.30	1.74
C20:1n-7	2.43	//	//	2.26	1.85	1.63	0.97
C22:1n-9	0.20	//	1.01	4.05	3.54	3.10	2.31
ΣMUFA <sup>2</sup>	27.65	28.79	1.39	27.45	26.15	25.34	22.42
C18:2n-6	1.91	3.32	//	11.16	13.39	13.92	16.76
C18:3n-6	0.17	0.21	0.26	1.84	1.92	1.67	1.90
C20:3n-6	3.06	0.25	0.32	0.09	0.10	0.15	0.18
C20:4n-6	0.86	3.31	0.44	0.71	0.87	1.01	1.52
Σ n-6 PUFA <sup>3</sup>	6.01	7.09	1.02	13.79	16.28	16.74	20.37
C18:3n-3	1.16	1.52	//	1.48	1.74	1.90	2.34
EPA <sup>4</sup>	11.58	15.67	1.75	8.75	8.30	8.30	7.86
C22:5n-3	1.09	//	16.62	0.61	0.58	0.59	0.54
DHA <sup>5</sup>	10.92	//	42.64	8.69	8.37	8.22	7.83
Σ n-3 PUFA <sup>6</sup>	24.75	17.19	61.01	19.53	19.00	19.00	18.58
Σ PUFA <sup>7</sup>	30.76	24.28	62.03	33.32	35.28	35.75	38.94
Σ n-3/Σ n-6	4.12	2.42	59.81	1.42	1.17	1.13	0.91

注: 1: SFA: 饱和脂肪酸; 2: MUFA: 单不饱和脂肪酸; 3: n-6 PUFA: n-6 系列多不饱和脂肪酸; 4: EPA: C20:5n-3; 5: DHA: C22:6n-3; 6: n-3 PUFA: n-3 系列多不饱和脂肪酸; 7: PUFA: 多不饱和脂肪酸; 下同。

Notes: 1: SFA: Saturated fatty acids; 2: MUFA: Mono-unsaturated fatty acids; 3: n-6 PUFA: n-6 poly-unsaturated fatty acids; 4: EPA: Eicosapentaenoic acid (C20:5n-3); 5: DHA: Docosapentaenoic acid (C22:6n-3); 6: n-3 PUFA: n-3 poly-unsaturated fatty acid; 7: PUFA: Polyunsaturated fatty acids; the same as below.

量(%),  $L$  为饲料中脂肪含量(%),  $W_h$  为实验鱼肝脏重量,  $L$  为实验鱼末体长(cm)。

**1.4.2 实验样品及饲料常规营养指标分析** 实验样品及饲料水分测定采用 105 °C 烘干恒重法测定(GB/T 6435-2006), 粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-2006), 粗脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T 6433-2006), 粗灰分采用马弗炉 550 °C 失重法测定(GB/T 6438-2007), 脂肪酸含量测定参考 Mourente 等(1999)的气相色谱法并稍作修改, 利用高效气相色谱仪(SHIMADZU GC-2010, 日本)测得。

**1.4.3 肠道生理生化指标分析** 肠道中胰蛋白酶(trypsin)、脂肪酶(lipase)、淀粉酶(amylase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力

(total antioxidant capacity, T-AOC)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、溶菌酶(lysozyme, LZM)和补体 C3 (complement component 3, C3)均利用南京建成生物工程研究所生产的相应试剂盒测得。

### 1.5 数据统计分析

实验数据用平均值±标准误(Mean±SE)来表示, 用 SPSS 19.0 分析软件对实验数据进行单因素方差分析(one-Way ANOVA), 使用 Duncan's 检验方法对实验数据进行多重比较, 当  $P < 0.05$  时, 表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长性能及饲料利用的影响

由表 3 可知, 大菱鲂幼鱼的 WGR 和 FE 随着替代比例的升高呈下降趋势, 在 D1、D2 和 D3 组间无显著性差异( $P>0.05$ ), 而当混合微藻替代鱼油的比例达到 100% (D4 组)时, 实验鱼的 WGR 和 FE 显著低于其他各组( $P<0.05$ )。不同实验组间的 PER 和 LER 呈现与 FE 相同的变化趋势( $P<0.05$ )。各实验组大菱鲂幼鱼的 SR 均在 91.99%~100%之间, 不同实验组间无显著性差异( $P>0.05$ )。

随着替代比例的升高, 大菱鲂幼鱼的 HSI 呈下降趋势( $P<0.05$ ), D4 组幼鱼的 HSI 显著低于其他各实验

组( $P<0.05$ ), 而 D1 组幼鱼的 HSI 显著高于其他各实验组( $P<0.05$ )。另外, 各实验组幼鱼的 CF 在不同处理组间无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼鱼体和肌肉化学组成的影响

由表 4 可知, 当混合微藻替代鱼油的比例提高时, 鱼体粗脂肪含量呈先升高后降低的变化趋势, 当替代比例为 25% (D2 组)时, 鱼体粗脂肪含量最高(9.43%), 显著高于 D1 和 D4 组鱼体粗脂肪含量(8.71%和 8.43%)( $P<0.05$ ), 而与 D3 组(8.90%)无显著性差异( $P>0.05$ )。鱼体粗蛋白含量呈现与粗脂肪含量相反的变化趋势, 但不同实验组间无显著差异( $P>0.05$ )。同时, 全鱼的水分和粗灰分含量在不同实验组间均无显著性差异( $P>0.05$ )。

表 3 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长性能及饲料利用的影响

Tab.3 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on growth performance and feed utilization of juvenile turbot

指标 Parameters	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
初始体重 Initial weight/g	39.67±0.04	39.68±0.07	39.72±0.04	39.68±0.05
终末体重 Final weight/g	111.45±4.34 <sup>a</sup>	109.51±1.95 <sup>a</sup>	106.73±3.01 <sup>a</sup>	88.03±2.19 <sup>b</sup>
增重率 WGR/%	180.96±10.63 <sup>a</sup>	176.00±4.56 <sup>a</sup>	168.72±7.88 <sup>a</sup>	121.81±5.31 <sup>b</sup>
存活率 Survival rate/%	94.21±3.12	100.00±0	94.05±4.29	91.99±4.08
饲料效率 FE	1.19±0.01 <sup>a</sup>	1.13±0.01 <sup>a</sup>	1.12±0.02 <sup>a</sup>	0.93±0.03 <sup>b</sup>
蛋白质效率 PER/%	2.46±0.03 <sup>a</sup>	2.34±0.02 <sup>a</sup>	2.31±0.05 <sup>a</sup>	1.92±0.05 <sup>b</sup>
脂肪效率 LER/%	11.68±0.13 <sup>a</sup>	11.53±0.10 <sup>a</sup>	11.01±0.24 <sup>a</sup>	9.59±0.29 <sup>b</sup>
肝体比 HSI/%	1.17±0.02 <sup>a</sup>	1.10±0.04 <sup>b</sup>	1.10±0.01 <sup>b</sup>	1.01±0.01 <sup>c</sup>
肥满度 CF	3.37±0.05	3.33±0.03	3.41±0.02	3.33±0.02

注: 表格中同行肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

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

表 4 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼鱼体化学组成的影响(%干重)

Tab.4 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on body chemical composition of juvenile turbot (% dry weight)

指标 Parameters	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
全鱼 Whole fish				
水分 Moisture	77.40±0.21	77.25±0.10	77.37±0.21	77.62±0.32
粗蛋白 Crude protein	67.89±0.43	66.90±1.17	67.81±1.14	67.87±0.65
粗脂肪 Crude lipid	8.71±0.09 <sup>b</sup>	9.43±0.22 <sup>a</sup>	8.90±0.29 <sup>ab</sup>	8.43±0.12 <sup>b</sup>
粗灰分 Crude ash	15.60±0.33	15.48±0.30	15.41±0.32	15.37±0.33
肌肉 Muscle				
水分 Moisture	78.36±0.20	78.64±0.19	78.75±0.07	79.09±0.43
粗蛋白 Crude protein	89.55±0.30	89.88±0.82	90.51±0.13	90.81±0.30
粗脂肪 Crude lipid	1.64±0.06 <sup>ab</sup>	1.75±0.04 <sup>a</sup>	1.49±0.06 <sup>bc</sup>	1.38±0.05 <sup>c</sup>
粗灰分 Crude ash	5.76±0.04	5.77±0.04	5.74±0.05	5.70±0.02

肌肉粗脂肪含量呈现同全鱼粗脂肪含量相同的变化趋势,也是在替代比例为25%(D2组)时达到最大值(1.75%),显著高于D3和D4组(1.49%和1.38%),与D1组(1.64%)无显著性差异( $P>0.05$ )。随着饲料中混合微藻比例的升高,大菱鲂幼鱼肌肉中水分、粗蛋白和粗灰分含量均未发生显著性变化( $P>0.05$ )。

### 2.3 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼鱼体和肌肉脂肪酸组成的影响

表5、表6分别显示了混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼鱼体和肌肉脂肪酸组成的影响。研究表明,随着混合微藻替代鱼油比例的升高,大菱鲂幼鱼鱼体中SFA、MUFA、C20:4n-6和n-6 PUFA含量显著升高,在D4组均达到最大值,且显著高于对照组( $P<0.05$ )。而EPA、DHA和n-3PUFA含量随之显著下降,对照组(D1)含量显著高于其他各组( $P<0.05$ )。但饱和脂肪酸(C14:0、C16:0)和C18:3n-3含量在不同处理组间无

显著性差异( $P>0.05$ )。

另外,肌肉脂肪酸组成同鱼体有一些不同的变化,其肌肉中SFA、C20:4n-6和DHA含量在不同实验组间无显著性差异( $P>0.05$ )。随着混合微藻替代比例的提高,肌肉中单不饱和脂肪酸(C16:1n-7、C18:1n-9、C18:1n-7、C22:1n-9)、EPA和n-3 PUFA含量呈显著降低趋势( $P<0.05$ ),而n-6多不饱和脂肪酸(C18:2n-6、C20:3n-6和n-6PUFA)和PUFA含量呈显著升高的趋势( $P<0.05$ )。

### 2.4 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼肠道消化酶活力的影响

由表7可知,随着替代比例的升高,肠道脂肪酶活力呈先升高后降低的变化趋势,在D3组达到最大值,显著高于对照组( $P<0.05$ ),但与D2组、D4组无显著性差异( $P>0.05$ )。肠道胰蛋白酶活力也是在D3组最高,显著高于D2组( $P<0.05$ ),同D1、D4组无

表5 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼全鱼脂肪酸组成的影响(%总脂肪酸)  
Tab.5 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on whole fish body fatty acid composition of juvenile turbot (% total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acids	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
C14:0	4.18±0.12 <sup>b</sup>	4.33±0.20 <sup>ab</sup>	4.61±0.18 <sup>ab</sup>	4.85±0.22 <sup>a</sup>
C16:0	20.17±0.12 <sup>b</sup>	20.62±0.28 <sup>b</sup>	21.72±0.23 <sup>a</sup>	21.83±0.39 <sup>a</sup>
C18:0	4.57±0.28	4.66±0.16	4.71±0.08	4.57±0.28
C20:0	0.39±0.04	0.38±0.01	0.31±0.03	0.39±0.04
Σ SFA	29.30±0.31 <sup>b</sup>	29.99±0.32 <sup>ab</sup>	31.36±0.40 <sup>a</sup>	31.64±0.93 <sup>a</sup>
C16:1n-7	5.14±0.08 <sup>b</sup>	5.67±0.20 <sup>b</sup>	5.46±0.20 <sup>b</sup>	6.77±0.31 <sup>a</sup>
C18:1n-9	14.81±0.16 <sup>c</sup>	15.83±0.17 <sup>b</sup>	15.96±0.37 <sup>b</sup>	17.14±0.33 <sup>a</sup>
C18:1n-7	3.77±0.09 <sup>a</sup>	3.70±0.07 <sup>a</sup>	3.34±0.12 <sup>b</sup>	3.83±0.02 <sup>a</sup>
C20:1n-7	2.36±0.14 <sup>a</sup>	2.31±0.05 <sup>a</sup>	1.94±0.10 <sup>b</sup>	2.53±0.04 <sup>a</sup>
C22:1n-9	2.38±0.09 <sup>b</sup>	2.47±0.10 <sup>b</sup>	2.54±0.05 <sup>b</sup>	3.38±0.09 <sup>a</sup>
Σ MUFA	28.29±0.59 <sup>c</sup>	29.99±0.23 <sup>b</sup>	29.26±0.23 <sup>bc</sup>	33.66±0.70 <sup>a</sup>
C18:2n-6	12.44±0.26 <sup>b</sup>	10.70±0.43 <sup>c</sup>	12.63±0.54 <sup>b</sup>	14.56±0.13 <sup>a</sup>
C18:3n-6	1.78±0.18 <sup>a</sup>	2.09±0.07 <sup>a</sup>	1.75±0.09 <sup>a</sup>	1.26±0.16 <sup>b</sup>
C20:3n-6	0.15±0.01	0.10±0.02	0.11±0.03	0.19±0.04
C20:4n-6	0.71±0.07 <sup>c</sup>	0.51±0.05 <sup>d</sup>	0.96±0.07 <sup>b</sup>	1.63±0.02 <sup>a</sup>
Σ n-6 PUFA	15.08±0.23 <sup>b</sup>	13.39±0.54 <sup>c</sup>	15.45±0.53 <sup>b</sup>	17.65±0.24 <sup>a</sup>
C18:3n-3	0.88±0.11	0.81±0.06	1.11±0.15	1.06±0.18
EPA	3.32±0.11 <sup>a</sup>	2.54±0.05 <sup>b</sup>	2.36±0.08 <sup>bc</sup>	2.20±0.05 <sup>c</sup>
C22:5n-3	0.79±0.07	0.86±0.05	0.88±0.13	0.92±0.15
DHA	11.16±0.20 <sup>a</sup>	10.58±0.36 <sup>bc</sup>	10.01±0.11 <sup>c</sup>	8.89±0.25 <sup>c</sup>
Σ n-3 PUFA	16.16±0.26 <sup>a</sup>	14.80±0.42 <sup>b</sup>	14.36±0.03 <sup>b</sup>	13.06±0.18 <sup>c</sup>
Σ PUFA	31.24±0.13 <sup>a</sup>	28.19±0.55 <sup>c</sup>	29.82±0.54 <sup>b</sup>	30.72±0.19 <sup>ab</sup>
n-3/n-6 PUFA	1.07±0.03 <sup>a</sup>	1.11±0.06 <sup>a</sup>	0.93±0.03 <sup>b</sup>	0.74±0.02 <sup>c</sup>

表6 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼肌肉脂肪酸组成的影响(%总脂肪酸)

Tab.6 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on muscle fatty acid composition of juvenile turbot (% total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acids	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
C14:0	1.74±0.06 <sup>a</sup>	1.65±0.08 <sup>a</sup>	1.42±0.08 <sup>b</sup>	1.12±0.05 <sup>c</sup>
C16:0	21.33±0.04	21.63±0.18	21.92±0.28	21.89±0.26
C18:0	5.37±0.08 <sup>b</sup>	5.52±0.10 <sup>ab</sup>	5.69±0.10 <sup>a</sup>	5.74±0.02 <sup>a</sup>
C20:0	0.25±0.02 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.00 <sup>b</sup>
Σ SFA	28.70±0.05	29.04±0.19	29.25±0.30	28.91±0.23
C16:1n-7	2.07±0.08 <sup>a</sup>	2.01±0.13 <sup>ab</sup>	1.75±0.04 <sup>bc</sup>	1.54±0.05 <sup>c</sup>
C18:1n-9	10.55±0.14 <sup>a</sup>	10.30±0.10 <sup>a</sup>	9.85±0.12 <sup>b</sup>	9.30±0.15 <sup>c</sup>
C18:1n-7	2.55±0.03 <sup>a</sup>	2.44±0.02 <sup>b</sup>	2.30±0.05 <sup>c</sup>	1.92±0.02 <sup>d</sup>
C20:1n-7	1.38±0.02 <sup>a</sup>	1.25±0.03 <sup>b</sup>	1.08±0.05 <sup>c</sup>	0.75±0.01 <sup>d</sup>
C22:1n-9	0.95±0.06 <sup>a</sup>	0.95±0.06 <sup>a</sup>	0.68±0.06 <sup>b</sup>	0.47±0.02 <sup>c</sup>
Σ MUFA	17.48±0.27 <sup>a</sup>	16.94±0.31 <sup>a</sup>	15.69±0.29 <sup>b</sup>	13.97±0.25 <sup>c</sup>
C18:2n-6	9.54±0.24 <sup>d</sup>	10.90±0.16 <sup>c</sup>	11.64±0.18 <sup>b</sup>	14.62±0.20 <sup>a</sup>
C18:3n-6	1.04±0.05	1.03±0.04	0.94±0.08	0.93±0.02
C20:3n-6	0.11±0.01 <sup>b</sup>	0.13±0.01 <sup>a</sup>	0.13±0.01 <sup>ab</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>
C20:4n-6	1.93±0.07	1.90±0.05	1.93±0.10	2.14±0.04
Σ n-6 PUFA	12.62±0.16 <sup>d</sup>	13.97±0.12 <sup>c</sup>	14.65±0.17 <sup>b</sup>	17.84±0.16 <sup>a</sup>
C18:3n-3	0.69±0.02	0.72±0.04	0.71±0.03	0.77±0.02
EPA	7.96±0.05 <sup>a</sup>	6.93±0.02 <sup>b</sup>	6.29±0.09 <sup>c</sup>	4.61±0.03 <sup>d</sup>
C22:5n-3	0.67±0.03	0.71±0.06	0.70±0.02	0.71±0.03
DHA	22.84±0.35	22.37±0.51	23.22±0.24	23.15±0.36
Σ n-3 PUFA	32.15±0.36 <sup>a</sup>	30.73±0.52 <sup>b</sup>	30.93±0.18 <sup>ab</sup>	29.25±0.38 <sup>c</sup>
Σ PUFA	44.77±0.20 <sup>b</sup>	44.69±0.40 <sup>b</sup>	45.57±0.18 <sup>b</sup>	47.09±0.23 <sup>a</sup>
n-3/n-6 PUFA	2.55±0.06 <sup>a</sup>	2.20±0.06 <sup>b</sup>	2.11±0.03 <sup>b</sup>	1.64±0.03 <sup>c</sup>

表7 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼肠道消化酶活力的影响

Tab.7 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on digestive enzyme activities in intestinal tract of juvenile turbot

指标 Parameters	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
肠道淀粉酶 Amylase /(U/mg prot)	0.16±0.01	0.16±0.02	0.19±0.02	0.18±0.01
肠道脂肪酶 Lipase /(U/g prot)	8.26±0.15 <sup>b</sup>	8.52±0.04 <sup>ab</sup>	9.03±0.23 <sup>a</sup>	8.62±0.17 <sup>ab</sup>
肠道胰蛋白酶 Trypsin /(U/mg prot)	9697.76±1058.22 <sup>ab</sup>	9168.81±474.04 <sup>b</sup>	12 149.19±923.64 <sup>a</sup>	10 926.95±77.06 <sup>ab</sup>

显著性差异( $P>0.05$ )。同时,结果显示,大菱鲂幼鱼肠道淀粉酶活力在不同实验组无显著性差异( $P>0.05$ )。

## 2.5 混合微藻替代鱼油对大菱鲂幼鱼肠道抗氧化能力的影响

表8显示,混合微藻替代鱼油后,大菱鲂幼鱼肠道的抗氧化能力发生了较为显著的变化。肠道中SOD

活力随替代比例的提高呈先升高后降低的趋势,在D3组达到最大值,显著高于对照组( $P<0.05$ ),同D2组和D4组无显著性差异( $P>0.05$ )。同时,D3组肠道T-AOC和CAT活力显著高于其他各组,D1组和D2组的T-AOC活力无显著性差异,但均显著高于D4组。另外,肠道中MDA含量在不同实验组间并未表现出显著性差异( $P>0.05$ )。

## 2.6 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道部分生化指标的影响

由表9可知,混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道中ACP、AKP、LZM活力和补体C3含量均产生显著影响( $P<0.05$ )。ACP、LZM活力和补体C3含量均在D3组达到最大值,且均显著高于对照组( $P<0.05$ )。

其中,D3组ACP活力和补体C3含量也显著高于D2组和D4组( $P<0.05$ ),而D3组LZM活力同D2组和D4组无显著性差异( $P>0.05$ )。当替代比例达到100%时,肠道AKP活力出于最低值,显著低于其他各实验组( $P<0.05$ ),而D1组和D3组AKP活力显著高于其他实验组( $P<0.05$ ),且两组间并无显著性差异( $P>0.05$ )。

表8 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道抗氧化能力的影响

Tab.8 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on antioxidant capacity in intestinal tract of juvenile turbot

指标 Parameters	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
超氧化物歧化酶 SOD /(U/mg prot)	32.11±0.95 <sup>b</sup>	34.66±0.89 <sup>ab</sup>	37.37±0.39 <sup>a</sup>	34.70±0.87 <sup>ab</sup>
总抗氧化能力 T-AOC /(mmol/L)	7.53±0.13 <sup>b</sup>	7.47±0.07 <sup>b</sup>	7.96±0.14 <sup>a</sup>	6.00±0.05 <sup>c</sup>
过氧化氢酶 CAT /(U/g prot)	621.06±6.63 <sup>c</sup>	645.73±6.42 <sup>b</sup>	674.51±5.06 <sup>a</sup>	649.75±3.31 <sup>b</sup>
丙二醛 MDA /(nmol/mg prot)	0.99±0.04	1.00±0.07	1.04±0.05	1.05±0.06

表9 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道部分生化指标的影响

Tab.9 Effects of fish oil replacement by mixed microalgae on activity of ACP, AKP, LZM and C3 in intestinal tract of juvenile turbot

项目 Items	组别 Groups			
	D1	D2	D3	D4
酸性磷酸酶 ACP /(U/g prot)	476.73±4.36 <sup>b</sup>	477.19±4.31 <sup>b</sup>	534.35±7.15 <sup>a</sup>	434.29±10.32 <sup>c</sup>
碱性磷酸酶 AKP /(U/g prot)	547.67±4.53 <sup>a</sup>	517.56±6.07 <sup>b</sup>	544.18±4.27 <sup>a</sup>	497.65±5.77 <sup>c</sup>
溶菌酶 LZM /(U/mg prot)	95.44±3.44 <sup>b</sup>	113.47±8.17 <sup>ab</sup>	128.49±6.84 <sup>a</sup>	116.23±4.87 <sup>a</sup>
补体 C3 /(μg/mL)	10.52±0.07 <sup>bc</sup>	11.70±0.62 <sup>b</sup>	14.28±0.47 <sup>a</sup>	9.82±0.29 <sup>c</sup>

## 3 讨论

### 3.1 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼生长性能的影响

裂壶藻和拟微绿球藻因含有较高的 n-3 HUFA,且同鱼油的脂肪酸组成大体相似(吉红等, 2020),成为近年来鱼油替代的研究热点。本实验在课题组前期工作的基础上,将裂壶藻和拟微绿球藻进行一定比例的混合,用于替代饲料中不同比例鱼油。需要解释的是,本实验配方中使用大豆浓缩蛋白(5%~20%)进行营养素调平,这一添加量的变化在先前的研究中表明并不会对鱼体生长造成负面影响。如在海鲈(*Lateolabrax japonicus*)(向芳琴等, 2017)、珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)(Wang et al, 2020)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(冯建等, 2017)的研究中均表明,饲料中添加不超过20%的大豆浓缩蛋白对鱼体生长性能无显著性影响。本实验结果显示,替代比例在25%和50%时,大菱鲆幼鱼的WGR和FE均与对照组无显著性差异( $P>0.05$ ),这也进一步证实了利用微藻替代一定比例鱼油是可行的。这一结果与先前的不少研究结果类

似,如Haas等(2016)在欧洲鲈鱼中的研究表明,用拟微绿球藻和绿色巴夫藻(*Pauloca viridis*)替代50%~100%的鱼油时,对实验鱼的生长性能并未产生不良影响。杨帆(2018)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究中发现,饲料中添加3%破壁裂壶藻可以显著提高其SR、末均重和WGR,同时能显著降低饲料系数( $P<0.05$ )。Patterson等(2013)用拟微绿球藻和舟形藻饲喂红姑鱼(*Sciaenops ocellatus*)的研究中也得到了类似的实验结果。同时,刘宏超等(2016)进一步证实了适宜水平裂壶藻(0.8%~1.2%)能够对天津新鲤(*Cyprinus carpio* var.)的生长产生明显的促进作用。这些结果均表明,微藻作为水产动物的油源,在一定程度上可产生同鱼油一样的效果,使动物体获得较好的生长性能。

另外,本研究发现,当混合微藻(裂壶藻2.60%+拟微绿球藻22.36%)替代鱼油比例为100%时,大菱鲆幼鱼的生长受到明显抑制作用;同时,幼鱼的FE也显著低于其他各实验组( $P<0.05$ )。这同张燕等(2017)在星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)中的研究结果一致,用2.26%裂壶藻和14.15%拟微绿球藻全部替代鱼油时,幼鱼的特定生长率及FE显著低于全鱼油组



( $P < 0.05$ )。在凡纳滨对虾的实验中也得到类似结果,当饲料中添加 4.5%的破壁裂壶藻时,对虾的生长性能及 FE 呈明显下降趋势(杨帆, 2018)。产生这一结果的原因,可能是因为拟微绿球藻、裂壶藻等微藻具有较厚的细胞壁外壳,较高比例的添加使得鱼体不能将其充分消化吸收,造成了营养成分的流失,导致鱼体生长性能下降(赵书林等, 2017)。而 Qiao 等(2014)在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的实验中却表明,用裂壶藻(9.1%)和拟微绿球藻(13.6%)完全替代饲料中的鱼油时,牙鲆的生长性能和 FE 均无明显变化。Li 等(2009)研究报道,当饲料中添加 2%裂壶藻粉时,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的体增重和 FE 得到明显的提高。这一研究差异可能与实验鱼种类、规格、混合藻粉比例以及养殖策略等因素有关。

### 3.2 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼鱼体和组织化学组成的影响

微藻作为生态系统中的初级生产者,含有较高含量的 PUFA (特别是 n-3 PUFA)和氨基酸以及丰富的色素、维生素和矿物质,可满足鱼类生长,所以用微藻替代鱼油并不会对动物体的常规组成产生太大影响,这一结论在欧洲鲈鱼(Tibaldi *et al*, 2015)、长鳍鲷(*Seriola rivoliana*) (Kissinger *et al*, 2016)、牙鲆(Qiao *et al*, 2014)等研究中得到证实。同时,本研究表明,混合微藻替代鱼油后,大菱鲆幼鱼鱼体和肌肉的粗蛋白、水分及粗灰分含量均未发生显著性变化,仅对粗脂肪含量产生了影响,这也与之前的研究报道结论相一致。

值得注意的是,本研究中幼鱼鱼体和肌肉中粗脂肪含量在不同实验组间发生了显著性变化,特别是肌肉中粗脂肪含量。与对照组相比, D3 和 D4 组肌肉中粗脂肪含量较低,且 D4 组要显著低于对照组( $P < 0.05$ ),同时,全鱼中粗脂肪含量也在 D4 组最低。先前的研究已表明,微藻在促进水产动物脂质代谢方面效果显著。Van 等(2016)在鳕鱼(*Scortum barcoo*)中的研究发现,用 40%裂壶藻替代鱼油可以显著降低肌肉中脂肪含量。在大西洋鲑(Sprague *et al*, 2017)、星斑川鲷(张燕等, 2017)等研究中也得到了类似结论。产生这一结果的原因,可能是有以下两方面:一方面,微藻中的 n-3 HUFA,如裂壶藻中的 DHA,相比于鱼油中的 n-3 HUFA 可以更高效地在鱼体中沉积,进而促进了鱼体中脂质水解,降低了脂肪沉积(Xing *et al*, 2020);另一方面,由于 D3 和 D4 组中含有较高比例的拟微绿球藻,该藻中色素含量较高,约占干藻类生物量的 5%左右,而色素在机体内难以被消化吸收

(Lubian *et al*, 2002),同时也发现, D3 和 D4 组的 LER 要显著低于对照组,从而得知这 2 组中脂肪利用率较低,故脂肪沉积较少,这可能是造成这 2 组幼鱼脂肪沉积较少的另一原因。

通过分析鱼体和肌肉的脂肪酸组成发现,二者的脂肪酸组成在一定程度上反映饲料脂肪酸的组成特点与 Peng 等(2014)在关于大菱鲆脂肪酸营养方面的研究结论相似,也与以往微藻相关实验结论相一致,这也进一步表明微藻中的脂肪酸营养可以很好地被大菱鲆幼鱼所利用。本实验结果显示,全鱼中 C18:1n-9、C18:1n-7 和 MUFA 含量均呈现与饲料相反的变化趋势,这可能是由单不饱和脂肪酸作为能量的主要供应,在体内更容易被氧化提供能量,从而被优先利用(Karalazos *et al*, 2007)。而肌肉中的 MUFA 呈现与饲料组成相类似的变化趋势,这也暗示,单不饱和脂肪酸在不同组织中被利用的程度不同,也就造成了不同的沉积量。同时,全鱼和肌肉中的 C18:2n-6、C20:4n-6 以及 n-6 PUFA 含量变化趋势均呈现同饲料相一致,可能是因为对照组饲料中 C18:2n-6 含量已经较高,可以满足鱼体的正常生长需求,从而过剩的沉积到组织中,这与在尖吻重牙鲷(*Diplodus puntazzo*) (Piedecausa *et al*, 2007)的研究相一致。实验还发现,随替代比例的提高,全鱼和肌肉中 EPA 含量均显著降低,这是由 EPA 和 C20:4n-6 存在天然的竞争关系所造成的,ARA 可以在一定程度上抑制 EPA 竞争融入机体组织的能力(王成强等, 2016),从而出现了这一实验结果。肌肉中 DHA 含量在一定程度上得到了提高,这与全鱼 DHA 含量变化趋势相反,这也说明大菱鲆具有将 C18:3n-3 转化成 DHA 的能力,但不同部位合成能力不同,也就造成了不同组织对 DHA 沉积量有差异。同时,本实验结果表明,相比于全鱼,大菱鲆肌肉的脂肪酸组成能够更好地反映出饲料的脂肪酸组成。

### 3.3 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道消化酶指标的影响

肠道中的一系列消化酶(胰蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶等)可将摄入的食物进行分解、消化和吸收,保障机体的营养摄取,其酶活力的高低直接反映了机体的消化能力。本研究中,肠道脂肪酶和胰蛋白酶在不同实验组间具有显著的变化趋势,且在替代量为 50% 和 100%时均出现较高活力。这也表明,饲料中添加微藻可在一定程度上促进鱼体肠道消化功能。马季等(2020)研究表明,用微藻和大豆油替代鱼油后,大菱鲆幼鱼的淀粉酶、脂肪酶以及胰蛋白酶均显著高于对

对照组。而本研究中, 当替代量为 100% 时, 虽然消化酶活力也处于较高水平, 但与对照组无显著性差异, 可能是由于两项实验中微藻的总添加量不同而造成的结果差异。杨帆等(2013)在凡纳滨对虾的研究中证实, 3% 的破壁裂壶藻或未破壁裂壶藻均会提高肠道胰蛋白酶的 mRNA 的表达水平, 增强肠道的消化能力。微藻可以促进肠道消化酶的活力, 可能除了与含有较高比例的 n-3 HUFA 有关以外, 还与本身含有一定比例的蛋白和总糖相关(陈秀丽等, 2016)

### 3.4 混合微藻替代鱼油对大菱鲆幼鱼肠道抗氧化及非特异性免疫指标的影响

肠道作为水生动物的一种重要器官, 不仅是营养物质充分消化和吸收的保证, 也在免疫调节、黏膜屏障、信号识别和内源性活性分子产生中也扮演着重要的角色(NRC, 2011), 其抗氧化及免疫能力水平可以间接反映水生动物本身的免疫水平。SOD、T-AOC 等是反映机体抗氧化系统功能综合水平的主要指标, 是生物体内广泛存在的抗氧化酶, 可以有效清除活性氧自由基以保护机体组织免受损伤(Pastor *et al.*, 1988)。MDA 是反映机体细胞受自由基攻击的严重程度的主要指标, 是脂肪氧化的终产物之一。本研究中, 当混合微藻替代鱼油为 50% 时, 肠道 SOD 和 T-AOC 活力显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 这说明微藻可提高肠道的抗氧化能力。这可能主要是因为微藻中含有丰富的色素, 特别是类胡萝卜素和叶绿素, 这些色素是一种天然的抗氧化剂, 可在一定程度上保护细胞免受自由基的侵害, 增强机体的抗氧化水平, 保障机体健康(苏怡等, 2016)。刘宏超等(2016)在津新鲤中的研究也表明, 适量裂壶藻(0.8%~1.2%)在增强鱼体抗氧化能力方面具有显著的作用, 还可以显著降低血清中 MDA 含量, 进一步证实裂壶藻具有较强的清除机体自由基和减少脂质过氧化的能力。

AKP 及 ACP 是生物体内重要的代谢调控酶, 其本身不仅可以水解入侵的病原体, 且可以促进吞噬细胞的吞噬及降解作用, 在机体非特异性免疫反应中发挥重要作用(Gisbert *et al.*, 2018)。本研究中, 替代比例为 50% 时, ACP 活力显著升高, AKP 活力也处于较高水平, 这也说明添加一定水平的微藻, 可以增强大菱鲆幼鱼的非特异性免疫能力。这在 LZM 和补体 C3 的结果中也得到了验证, LZM 和补体 C3 均在机体非特异性免疫中发挥重要作用, 补体 C3 是体内重要的补体因子, 当机体免疫反应被抑制时, 其可以作为主要的补体来弥补; LZM 是吞噬细胞杀菌的物质基础, 能保护机体免受外源微生物的入侵(Saurabh

*et al.*, 2008), 从而对机体健康起到保护作用。本研究中, LZM 和补体 C3 同 ACP 呈现一致的变化趋势, 在替代量为 50% 时达到较高值, 这也进一步说明, 在此替代水平上, 大菱鲆幼鱼获得了较高的非特异性免疫能力。在凡纳滨对虾(杨帆, 2018)、星斑川鲷(张燕等, 2017)的实验均表明, 饲料中添加适量的裂壶藻等微藻可以提高体内 LZM 活力, 增强机体的抗病力。产生这一结果可能是因为微藻外层细胞壁含有丰富的多糖, 而微藻多糖中的活性物质在抗氧化、抗病毒及提升免疫力方面具有显著作用(李洁琼等, 2016)。

## 4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 用混合微藻(11.18% 拟微绿球藻+1.30% 裂壶藻)替代 50% 鱼油时, (39.69±0.25) g 大菱鲆幼鱼可以获得较佳的生长性能, 同时可以提高肠道消化酶活力、抗氧化及非特异性免疫能力, 增强肠道健康水平。本研究为混合微藻替代鱼油研究提供了一定的理论依据; 与此同时, 本研究也发现, 当单种微藻或混合微藻添加量过多时, 会引起鱼体生长、饲料利用以及免疫能力的降低。

## 参 考 文 献

- CHEN X L, MIN H Y, DENG P Y, *et al.* Application of the DHA-enriched *Schizochytrium* in animal husbandry. *Feed Expo*, 2016, 6(1): 28–31 [陈秀丽, 闵红艳, 邓蒲媛, 等. 富含 DHA 的裂殖壶菌作为饲料添加剂在动物生产中的应用. *饲料博览*, 2016, 6(1): 28–31]
- CRUZ-GARCIA, LS, BOURAOUI L, SAERA-VILA A, *et al.* Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 158(6): 391–399
- ERYALCIN K M, ROO J, SALEH R, *et al.* Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 2013, 44(2): 819–828
- FENG J, WANG P, HE J J, *et al.* Effect of replacing fish meal with soybean protein concentrate on growth, body composition, serum biochemical indices, and liver histology of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 268–277 [冯建, 王萍, 何娇娇, 等. 大豆浓缩蛋白替代鱼粉对大黄花鱼幼鱼生长、体成分、血清生化指标及肝组织学的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 268–277]
- GISBERT E, NOLASCO H, SOLOVYEV M. Towards the

- standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture*, 2018, 487(4): 102–108
- HAAS S, BAUER J L, ADAKLI A, *et al.* Marine microalgae *Pavlo vaviridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 1011–1021
- HU D X, MA J, ZHANG Y, *et al.* Effects of green alga *Nannochloropsis* meal on physiology and body fatty acid composition in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Fisheries Science*, 2019, 38(1): 1–9 [胡冬雪, 马季, 张燕, 等. 拟微绿球藻粉对大菱鲂幼鱼生理和脂肪酸组成的影响. *水产科学*, 2019, 38(1): 1–9]
- JI H, XIAO F F, XING J X, *et al.* Research progress on the application of microalgae resources in aquatic feed. *Feed Industry*, 2020, 41(16): 1–12 [吉红, 肖芬芬, 邢君霞, 等. 微藻资源在水产饲料中应用的研究进展. *饲料工业*, 2020, 41(16): 1–12]
- KARALAZOS V, BENDIKSEN E Å, DICK J R, *et al.* Effects of dietary protein, and fat level and rapeseed oil on growth and tissue fatty acid composition and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared at low water temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(4): 256–265
- KISSINGER K R, GARCÍA-ORTEGA A, TRUSHENSKI J T. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture*, 2016, 452(5): 37–44
- LI J Q, LIU H Q, YUAN S. Research progress of microalgae polysaccharide. *Modern Chemical Industry*, 2016(6): 60–62 [李洁琼, 刘红全, 袁莎. 微藻多糖的研究进展. *现代化工*, 2016(6): 60–62]
- LI M H, ROBINSON E H, TUCKER C S, *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(3/4): 232–236
- LI Q, CHEN G Q, FAN K W, *et al.* Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrids from Hongkong mangroves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(10): 4267–4672
- LIU H C, CHENG Z Y, ZHAI S L, *et al.* Effects of dietary *Schizochytrium* on the growth performance, serum nonspecific immunity indices, and disease resistance of *Cyprinus carpio* var. Jian. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 42–48 [刘宏超, 程镇燕, 翟胜利, 等. 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. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 42–48]
- LUBIAN L M, MONTERO O, MORENO-GARRIDO I, *et al.* *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae)* as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 2002, 12(3/4/5): 249–255
- MA J. Screening of attractants in fishmeal-free diet and effects of vegetable oil replacing fish oil on turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020, 52–53 [马季. 无鱼粉饲料中诱食剂的筛选及植物油替代鱼油对大菱鲂的作用效果. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020, 52–53]
- MILLER M R, NICHOLS P D, CARTER C G. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 148(2): 382–392
- MOURENTE G, TOCHER D R, DIAZ-SALVAGO E, *et al.* Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the artemia feeding stage. *Aquaculture*, 1999, 179(2): 291–307
- NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academic Press, 2011
- PASTOR A, MEDINA J, RAMO J D, *et al.* Determination of lead in treated crayfish *Procambarus clarkii*: Accumulation in different tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1988, 41(3): 412–418
- PATTERSON D, DONOVAN, GATLIN D M, *et al.* Valuation of whole and lipid- extracted algae meals in the diets of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 2013, 416-417: 92–98
- PENG M, XU W, MAI K, *et al.* Growth performance, lipid deposition and hepatic lipid metabolism related gene expression in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed diets with various fish oil substitution levels by soybean oil. *Aquaculture*, 2014, 433 (3): 442–449
- PIEDECAUSA M A, MAZÓN M J, GARCÍAGARCÍA B, *et al.* Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, 2007, 263(1/2/3/4): 211–219
- QIAO H, WANG H, SONG Z, *et al.* Effects of dietary fish oil replacement by microalgae raw materials on growth performance, body composition and fatty acid profile of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(6): 646–653
- ROY S S, PAL R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 2015, 68(1): 1–8
- SARKER P K, KAPUSCINSKI A R, LANOIS A J, *et al.* Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One*, 2016, 11(6): 156684
- SAURABH S, SAHOO P K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223–239

- SHAHIDI F, AMBIGAIPALAN P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(1): 345–381
- SPRAGUE M, BETANCOR M B, TOCHER D R. Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(11): 1599–1609
- SU Y, GAO B Y, ZHANG C W. An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture animals. *Breeding and Feed*, 2016(2): 17–25 [苏怡, 高保燕, 张成武. 微藻生物分子在动物和水产养殖饲料中的应用. *养殖与饲料*, 2016(2): 17–25]
- TIBALDI E, CHINI ZITTELLI G, PARISI G, *et al.* Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 2015, 440(7): 60–68
- VAN H S, FRANSMAN C, LUYTEN T, *et al.* *Schizochytrium* as a replacement for fish oil in a fishmeal free diet for jade perch, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite). *Aquaculture Research*, 2016, 47(6): 1747–1760
- WANG C Q, LIANG M Q, XU H G, *et al.* Requirement of arachidonic acid in adult Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 46–55 [王成强, 梁萌青, 徐后国, 等. 大规模鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)对饲料中花生四烯酸的需求量. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 46–55]
- WANG J X, LIANG D Z, YANG Q H, *et al.* The effect of partial replacement of fish meal by soy protein concentrate on growth performance, immune responses, gut morphology and intestinal inflammation for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 98: 619–631
- XIANG F Q. Effect of sea bass on growth, immune and intestinal flora by soy protein concentrate. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2017, 5–7 [向芳琴. 大豆浓缩蛋白对海鲈生长、免疫及肠道菌群的影响. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2017, 5–7]
- XING J, XIAO F, LUO X, *et al.* Effect of dietary *Schizochytrium* sp. oil as an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid source on growth performance, lipid metabolism and antioxidant status in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): A comparative study with fish oil. *Aquaculture Research*, 2020, 51: 4551–4564
- YANG F. Application of raffinose and *Schizochytrium* sp. in the feed of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Zhongshan University, 2018, 38–40 [杨帆. 棉籽糖和裂壶藻在凡纳滨对虾饲料中的应用研究. 中山大学硕士研究生学位论文, 2018, 38–40]
- ZHANG J H, REN D D, JIANG Y S, *et al.* Microalgae in aquaculture: A review to nutritional value and rotifers enrichment. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(20): 371–376 [张继红, 任丹丹, 姜玉声, 等. 微藻营养价值及其在水产生物营养强化中的应用. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 371–376]
- ZHANG Y, QIAO H J, LI B S, *et al.* Effects of replacement of fish oil by microalgae meals on growth performance, tissue proximate composition and biochemical indices of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1223–1233 [张燕, 乔洪金, 李宝山, 等. 微藻粉替代鱼油对星斑川鲷幼鱼生长、体组成和生理指标的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1223–1233]
- ZHAO S L, CAI S S, XIA M Y, *et al.* Different wall-breaking methods of *Schizochytrium*. *China Oils and Fats*, 2017, 42(1): 109–111 [赵书林, 蔡双山, 夏木阳, 等. 裂殖壶菌不同破壁方法的研究. *中国油脂*, 2017, 42(1): 109–111]

(编辑 陈 辉)

## Effects of Fish Oil Replacement by Mixed Microalgae on Growth Performance, Body Chemical Composition and Intestinal Tract Biochemical Indices of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*)

WANG Chengqiang, CAO Tihong, LI Baoshan, WANG Jiying<sup>①</sup>, HAO Tiantian,  
SONG Zhidong, WANG Xiaoyan, SUN Yongzhi

(Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai, Shandong 264006, China)

**Abstract** A 12-week feeding experiment was conducted to evaluate the effects of fish oil replacement by mixed microalgae on growth performance, body composition, digestive enzyme activities, and antioxidant indices in the intestinal tract of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [mean initial weight (39.69±0.25) g]. Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with graded contents of dietary fish oil replacement by mixed microalgae, 0, 25%, 50%, and 100%, designated D1, D2, D3, and D4, respectively. The results showed that weight growth rate (WGR) and feed efficiency (FE) decreased with an increasing replacement ratio; no significant differences were found between D1, D2, and D3 groups ( $P>0.05$ ), but all three had significantly higher values than the D4 group ( $P<0.05$ ). The D1 group showed the highest value of the hepatosomatic index (HSI), which was significantly higher than that in other groups ( $P<0.05$ ). With an increasing replacement ratio, the body and muscle crude lipid contents increased at first, and then decreased, being significantly higher in the D4 group than in the D1 group ( $P<0.05$ ). The C20:4n-6 and n-6 PUFA in the whole fish body reached their peaks in the D4 group ( $P<0.05$ ), with significantly higher values than those in the D1 group ( $P<0.05$ ). However, EPA, DHA, and n-3 PUFA significantly decreased in D4 ( $P<0.05$ ). The activities of lipase and trypsin in the intestinal tract reached their peaks in the D3 group. The activities of superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), and catalase (CAT) in the intestinal tract of the D3 group were significantly higher than those in the D1 group ( $P<0.05$ ). Additionally, the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and lysozyme (LZM), as well as the complement component 3 (C3) contents in the intestinal tract, showed the same tendency as SOD. The malondialdehyde (MDA) contents in the intestinal tract were not significantly different across the groups ( $P>0.05$ ). These results indicate that 50% fish oil replacement by mixed microalgae does not influence the growth performance of juvenile turbot, and may increase the digestive enzyme activities and antioxidant ability in the intestinal tract.

**Key words** *Scophthalmus maximus*; *Schizochytrium* sp.; *Nannochloropsis* sp.; Growth performance; Intestinal tract biochemical indices

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210317003

http://www.yykxjz.cn/

王林华, 沈南南, 江海仪, 欧阳乐飞, 张庆起, 胡广伟, 王攀攀, 高焕. 不同生物饵料组合对脊尾白虾幼体变态发育的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 171-179

WANG L H, SHEN N N, JIANG H Y, OUYANG L F, ZHANG Q Q, HU G W, WANG P P, GAO H. Effects of live food combinations on the metamorphosis and larval development of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 171-179

# 不同生物饵料组合对脊尾白虾幼体 变态发育的影响\*



王林华<sup>1</sup> 沈南南<sup>1</sup> 江海仪<sup>1</sup> 欧阳乐飞<sup>1</sup>  
张庆起<sup>4</sup> 胡广伟<sup>1,2,3</sup> 王攀攀<sup>1,2,3</sup> 高 焕<sup>1,2,3</sup>①

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

**摘要** 本研究以脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)幼体为研究对象,研究了牟氏角毛藻(*Chaeroeros moelleri*)、褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和卤虫(*Artemia salina*)无节幼体搭配投喂对脊尾白虾幼体的存活率(SR)、变态发育和消化酶的影响。结果显示,单一卤虫组的幼体变态发育速度最快,14 d内全部变态为仔虾,其他3组则需要15 d;单一卤虫组、牟氏角毛藻+卤虫组和轮虫+卤虫组的幼体变态为仔虾时的SR分别为84.33%、84.67%和83.00%,各组间差异不显著( $P>0.05$ );投喂牟氏角毛藻+轮虫+卤虫混合饵料组的幼体在Z<sub>5</sub>~P阶段大量死亡,变态为仔虾时的SR为35.67%。单一卤虫组投喂的脊尾白虾幼体的胃蛋白酶(1.94 U/mg prot)、脂肪酶(2.35 U/mg prot)和 $\alpha$ -淀粉酶(0.13 U/mg prot)活力在4个组中最高,牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的胃蛋白酶(0.08 U/mg prot)、脂肪酶(0.91 U/mg prot)和 $\alpha$ -淀粉酶(0.08 U/mg prot)活力在4个组中最低;牟氏角毛藻+卤虫组和轮虫+卤虫组的 $\alpha$ -淀粉酶活力均为0.12 U/mg prot,而轮虫+卤虫组幼体的脂肪酶(1.78 U/mg prot)和胃蛋白酶(0.39 U/mg prot)比牟氏角毛藻+卤虫组分别高0.35和0.04 U/mg prot。研究表明,在脊尾白虾育苗过程中,投喂卤虫无节幼体(3~5 ind./mL),能提高幼体SR和加快变态发育速度,同时,在养殖过程中加入一定的牟氏角毛藻可减缓养殖水体恶化的速度。

**关键词** 脊尾白虾; 生物饵料; 幼体发育指数; 消化酶

**中图分类号** S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0171-09

虾类养殖是我国渔业产业重要的经济支柱之一 是我国特有的三大养殖经济虾类之一,其在我国大陆  
(Zhao *et al*, 2007)。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 沿岸及朝鲜半岛西岸的浅海水域都有分布,其中,以

\* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”(2018YFD0901302)、江苏省优势学科建设工程资助项目和江苏海洋大学江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金(SH20191203)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901302); A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD), and Supported by Open-End Funds of Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment (SH20191203)]. 王林华, E-mail: 15150994028@139.com

① 通信作者: 高 焕, 教授, E-mail: huanmr@163.com

收稿日期: 2021-03-17, 收修改稿日期: 2021-05-07

我国黄、渤海地区产量最高(Li *et al.*, 2003)。由于其味道鲜美、繁殖能力强和适应范围广等特点,已经成为我国池塘单养和其他种类混养的对象之一(马鸿梅等, 2019)。脊尾白虾由于个体较小,相对抱卵量也少,目前,主要依靠自然纳苗、捕捞天然苗或投放亲虾自行繁殖苗种,在一定程度上制约了规模化人工养殖的发展(黄经献等, 2018)。目前,国内外关于脊尾白虾工厂化养殖报道较少,实现脊尾白虾规模化人工养殖必须突破全人工育苗的难关。

饵料是保证对虾幼苗正常生长发育的营养基础(陆开宏等, 2001)。生物饵料是经过筛选的优质饵料生物,经人工培育后,作为鱼、虾、蟹等经济水产动物幼体的饵料(成永旭, 2005)。在南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*) (梁华芳等, 2001)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) (夏晓飞等, 2011)、青蟹(*Scylla paramamosain*) (齐计兵, 2014)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (肖起珍等, 2017)等多种虾、蟹育苗中,都详细地研究了饵料对幼体变态发育的影响。关于饵料对脊尾白虾幼体变态发育影响的研究主要集中在摄食特点、饵料搭配对幼体发育的影响等方面,为脊尾白虾幼体阶段开口饵料的选择奠定一定的基础(黄经献等, 2018; 陆开宏等, 2001; 罗会明等, 1980; 陈建华等, 2017),但是关于生物饵料搭配对脊尾白虾幼体变态发育影响的研究还鲜有报道。牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)大小适宜、易消化、营养丰富,常用做对虾育苗的开口饵料(成永旭, 2005; 张翠英, 1982)。梁华芳等(2001)研究表明,牟氏角毛藻在南美白对虾蚤状幼体时期的饵料效果最好。褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和卤虫(*Artemia salina*)由于繁殖能力强、环境适应性广、营养丰富、大小适宜和易培养等优点,成为甲壳动物幼体培育中重要的生物饵料(黄旭雄, 2007; Suprayudi *et al.*, 2004)。本研究在牟氏角毛藻、轮虫和卤虫3种生物饵料搭配对脊尾白虾生长存活和变态发育的基础上,进一步研究了3种生物饵料搭配对脊尾白虾幼体消化酶的影响,以期丰富脊尾白虾幼体阶段生物饵料搭配的选择,为规模化全人工育苗发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

脊尾白虾亲虾取自江苏连云港市赣榆养殖池塘,平均体长为(5.33±1.15) cm,平均体重为(2.64±1.4) g,将胚胎发育同步的抱卵虾按每3尾/组分别暂养于5 L的透明养殖箱孵化,挑选趋光性强、活力好的幼体进

行实验。实验饵料牟氏角毛藻由江苏海洋大学海洋科学与水产学院藻种室提供,牟氏角毛藻扩培参考王玉(2020)的方法,取指数生长期的藻液用于实验。购买罐装卤虫卵于25℃充气孵化约24 h,静止5 min后取无节幼体用于实验。轮虫由江苏省海洋生物技术重点实验室提供,培养期间,投喂牟氏角毛藻。实验用水为人工配置的海水,盐度为25, pH为8.2。用于培养牟氏角毛藻和褶皱臂尾轮虫的海水经过煮沸,冷却后使用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 脊尾白虾幼体培育及收集** 实验在5 L的透明养殖箱中进行,根据预实验,设置4个实验组:A组为卤虫组;B组为牟氏角毛藻+卤虫组;C组为轮虫+卤虫组;D组为牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组。每组放100尾幼虾(蚤状幼体),设置3个重复。牟氏角毛藻密度设置参考梁华芳等(2001)的方法,轮虫密度设置参考罗会明等(1980)的方法,卤虫密度设置根据于天基(2014)的方法。培养条件为自然光照,盐度为25,温度为24℃~26℃,每2 d换1/3的水,每天15:00使用便携式pH(型号pH818)测试笔测量pH,采用奥克丹W-I型水产水质分析仪检测水体氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、亚硝酸盐氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)(检测试剂为奥克丹W-I型NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N试剂和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N试剂)。养殖水体中,pH为8.2~8.4, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N为0.01~0.18 mg/L、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N为0.002~0.016 mg/L,溶解氧(DO)>5 mg/L,养殖时间为Z<sub>1</sub>(蚤状幼体I期)~P(仔虾)期。每12 h调整1次饵料,使饵料的密度保持为初始密度。每天08:00统计幼体的存活率(survival rate, SR, %),采用体视显微镜(Nikon SME 1500, 日本)观察幼体变态发育情况,统计各发育时期幼体的数量。实验结束后(幼体全部变态为仔虾),仔虾饥饿6 h,使用30目网筛收集仔虾,用液氮速冻后,-80℃保存,用于测定消化酶(胃蛋白酶、脂肪酶和α-淀粉酶)活力,试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

**1.2.2 幼体发育指数和SR的计算** 各发育阶段SR根据Aguirre-Guzmán等(2001)的计算公式:

$$SR = \frac{Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 + Z_6 + P}{100} \times 100\%$$

式中,SR为存活率,100为实验前投放脊尾白虾幼体的数量,Z<sub>1</sub>、Z<sub>2</sub>…Z<sub>6</sub>分别表示脊尾白虾各期蚤状幼体存活的数量(尾),P为变态为仔虾的数量(尾)。

幼体发育指数(larval stage index, LSI)表示幼体发育的快慢,指数越大表示幼体发育速度越快,根据Millamena等(2000)的计算公式:

表1 饵料配方  
Tab.1 Bait formula (ind./mL)

组别 Groups	饵料投喂量 Feed amount		
	牟氏角毛藻 <i>C. muelleri</i>	轮虫 <i>B. plicatilis</i>	卤虫无节幼体 <i>A. salina</i>
A 组卤虫组 Group A <i>A. salina</i>	/	/	$Z_1\sim Z_3: 1.0$ $Z_3\sim Z_5: 3.0$ $Z_5\sim P: 5.0$
B 组牟氏角毛藻+卤虫组 Group B <i>C. muelleri</i> + <i>A. salina</i>	$1.5\times 10^5$ cell/mL	/	$Z_1\sim Z_3: 0.5$ $Z_3\sim Z_5: 1.5$ $Z_5\sim P: 2.5$
C 组轮虫+卤虫组 Group C <i>B. plicatilis</i> + <i>A. salina</i>	/	5.0~7.5	$Z_1\sim Z_3: 0.5$ $Z_3\sim Z_5: 1.5$ $Z_5\sim P: 2.5$
D 组牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组 Group D <i>C. muelleri</i> + <i>B. plicatilis</i> + <i>A. salina</i>	$1\times 10^5$ cell/mL	3.0~5.0	$Z_1\sim Z_3: 0.3\sim 0.4$ $Z_3\sim Z_5: 1.0$ $Z_5\sim P: 1.6\sim 1.7$

LSI =

$$\frac{Z_1 \times 1 + Z_2 \times 2 + Z_3 \times 3 + Z_4 \times 4 + Z_5 \times 5 + Z_6 \times 6 + P \times 7}{Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 + Z_6 + P}$$

式中, LSI 为幼体发育指数,  $Z_1$ 、 $Z_2$ …… $Z_6$  分别为脊尾白虾各期蚤状幼体存活的数量,  $P$  为变态仔虾的数量, 1、2、3、4、5、6、7 是脊尾白虾从蚤状幼体到仔虾期间分别赋予的一个值, 为幼体发育阶段。

**1.2.3 消化酶活力的测定** 样品解冻后, 采用吸水纸擦拭虾体表面多余的水分, 分别称取 0.1 g 的仔虾, 迅速置入 1.5 mL 的离心管中, 加入 0.9 mL 的生理盐水, 冰浴条件下, 匀浆制成浓度为 10% 的匀浆液, 4000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 待测。其中, 蛋白总量、脂肪酶和胃蛋白酶均采用浓度为 10% 的上清液测定,  $\alpha$ -淀粉酶用浓度为 2% 的上清液测定。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 26 软件分析数据, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行比较且差异显著时运用 Duncan's 多重比较,  $P < 0.05$  为差异显著, 并使用 Origin 2018 软件进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体 SR 的影响

不同饵料搭配对脊尾白虾幼体 SR 的影响见表 2。从表 2 可以看出, 牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的 SR 在  $Z_5\sim P$  阶段下降的最快, 投喂单一卤虫的脊尾白虾幼体在  $Z_1\sim Z_2$  期 SR 较其他 3 组相比更低; 轮虫+卤虫组的 SR 在  $Z_1\sim Z_2$  期最高, 各实验组间相比差异不显著 ( $P > 0.05$ )。卤虫组、牟氏角毛藻+卤虫组和轮虫+卤虫

组的幼体变态为仔虾的 SR 分别为 84.33%、84.67% 和 83.00%, 各组间相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组幼体在  $Z_5\sim P$  阶段大量死亡, 变态为仔虾时的 SR 为 35.67%, 且和其他 3 个实验组从第 12 天开始相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同饵料搭配对脊尾白虾 LSI 的影响

不同饵料搭配对各组 LSI 的影响见表 3。从表 3 可以看出, 从孵化后的第 2 天开始, 不同饵料组之间呈现一定差异。在  $Z_1\sim Z_2$  期间, 牟氏角毛藻+卤虫组幼体发育最快, 卤虫组发育最慢。轮虫+卤虫组与卤虫组、牟氏角毛藻+卤虫组 LSI 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。卤虫组在脊尾白虾幼体变态后期 LSI 最快, 幼体全部变为仔虾需要 14 d, 与其他 3 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); 其次分别是牟氏角毛藻+卤虫组、轮虫+卤虫组和牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组, 幼体变为仔虾需要 15 d。

### 2.3 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体消化酶的影响

不同饵料搭配下, 各实验组脊尾白虾幼体的  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶和胃蛋白酶活力见表 4。从表 4 可以看出, 卤虫组投喂脊尾白虾幼体的胃蛋白酶 (1.94 U/mg prot)、脂肪酶 (2.35 U/mg prot) 和  $\alpha$ -淀粉酶 (0.13 U/mg prot) 活力在 4 个组中最高, 且与其他 3 组相比显著差异 ( $P < 0.05$ )。牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的胃蛋白酶 (0.08 U/mg prot)、脂肪酶 (0.91 U/mg prot) 和  $\alpha$ -淀粉酶 (0.08 U/mg prot) 活力在 4 个组中最低; 牟氏角毛藻+轮虫组和轮虫+卤虫组的  $\alpha$ -淀粉酶活力均为 0.12 U/mg prot, 而轮虫+卤虫组幼体的脂肪酶 (1.78 U/mg prot) 和胃蛋白酶 (0.39 U/mg prot) 比牟氏角毛藻+卤虫组分别高 0.35 和 0.04 U/mg prot。



表 2 不同饵料搭配下脊尾白虾幼体存活率

Tab.2 Effects of different diet combinations on the survival rate of *E. carinicauda* larvae

孵化后天数 Days after incubation /d	幼体存活率 Survival rate /%			
	卤虫	牟氏角毛藻+卤虫	轮虫+卤虫	牟氏角毛藻+轮虫+卤虫
	<i>A. salina</i>	<i>C.muelleri</i> + <i>A. salina</i>	<i>B.plicatilis</i> + <i>A. salina</i>	<i>C.muelleri</i> + <i>B.plicatilis</i> + <i>A. salina</i>
1	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
2	95.33±3.51 <sup>a</sup>	96.33±3.06 <sup>a</sup>	98.00±1.73 <sup>a</sup>	97.67±2.08 <sup>a</sup>
3	93.33±3.21 <sup>a</sup>	91.33±8.96 <sup>a</sup>	93.00±5.57 <sup>a</sup>	94.33±3.21 <sup>a</sup>
4	91.67±2.89 <sup>a</sup>	89.00±10.39 <sup>a</sup>	91.00±6.00 <sup>a</sup>	93.00±4.36 <sup>a</sup>
5	87.33±8.62 <sup>a</sup>	87.33±10.69 <sup>a</sup>	88.00±6.00 <sup>a</sup>	92.00±4.36 <sup>a</sup>
6	87.00±8.54 <sup>a</sup>	87.00±10.44 <sup>a</sup>	88.00±6.00 <sup>a</sup>	91.33±4.04 <sup>a</sup>
7	86.67±8.50 <sup>a</sup>	87.00±10.44 <sup>a</sup>	87.00±5.57 <sup>a</sup>	91.33±4.04 <sup>a</sup>
8	86.67±8.50 <sup>a</sup>	86.33±10.79 <sup>a</sup>	86.33±6.50 <sup>a</sup>	91.33±4.04 <sup>a</sup>
9	86.00±8.54 <sup>a</sup>	85.67±11.93 <sup>a</sup>	85.67±7.02 <sup>a</sup>	91.33±4.04 <sup>a</sup>
10	85.33±8.50 <sup>a</sup>	85.33±11.59 <sup>a</sup>	85.00±6.56 <sup>a</sup>	90.67±4.62 <sup>a</sup>
11	84.67±8.62 <sup>a</sup>	85.00±11.36 <sup>a</sup>	84.67±6.03 <sup>a</sup>	71.00±12.53 <sup>a</sup>
12	84.67±8.62 <sup>b</sup>	85.00±11.36 <sup>b</sup>	84.33±6.51 <sup>b</sup>	59.67±11.07 <sup>a</sup>
13	84.33±8.74 <sup>b</sup>	84.67±11.15 <sup>b</sup>	83.33±7.09 <sup>b</sup>	39.00±13.00 <sup>a</sup>
14	84.33±8.74 <sup>b</sup>	84.67±11.15 <sup>b</sup>	83.00±6.56 <sup>b</sup>	35.67±11.02 <sup>a</sup>
15		84.67±11.15 <sup>b</sup>	83.00±6.56 <sup>b</sup>	35.67±11.02 <sup>a</sup>

注：同一行中不同上标的字母表示显著差异( $P<0.05$ )。下同。

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

表 3 不同饵料搭配下脊尾白虾幼体发育指数

Tab.3 Effects of different diet combinations on the larval stage index of *E. carinicauda*

孵化后天数 The days after incubation/d	幼体发育指数 Larval stage index			
	卤虫	牟氏角毛藻+卤虫	轮虫+卤虫	牟氏角毛藻+轮虫+卤虫
	<i>A. salina</i>	<i>C.muelleri</i> + <i>A. salina</i>	<i>B.plicatilis</i> + <i>A. salina</i>	<i>C.muelleri</i> + <i>B.plicatilis</i> + <i>A. salina</i>
1	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
2	1.89±0.01 <sup>a</sup>	2.21±0.01 <sup>c</sup>	1.97±0.04 <sup>b</sup>	2.00±0.01 <sup>b</sup>
3	2.51±0.02 <sup>a</sup>	2.86±0.05 <sup>c</sup>	3.00±0.01 <sup>d</sup>	2.75±0.04 <sup>b</sup>
4	3.01±0.02 <sup>a</sup>	3.00±0.03 <sup>a</sup>	3.49±0.04 <sup>b</sup>	3.00±0.01 <sup>a</sup>
5	3.78±0.05 <sup>a</sup>	3.93±0.06 <sup>b</sup>	3.91±0.06 <sup>b</sup>	3.69±0.03 <sup>a</sup>
6	4.01±0.06 <sup>a</sup>	3.98±0.05 <sup>a</sup>	4.03±0.05 <sup>a</sup>	3.94±0.04 <sup>a</sup>
7	4.58±0.02 <sup>c</sup>	4.69±0.02 <sup>d</sup>	4.41±0.07 <sup>b</sup>	4.22±0.03 <sup>a</sup>
8	4.99±0.07 <sup>b</sup>	4.97±0.05 <sup>b</sup>	4.98±0.03 <sup>b</sup>	4.82±0.10 <sup>a</sup>
9	5.31±0.07 <sup>c</sup>	5.2±0.02 <sup>b</sup> <sup>c</sup>	5.12±0.04 <sup>b</sup>	4.99±0.09 <sup>a</sup>
10	5.81±0.13 <sup>b</sup>	5.52±0.13 <sup>a</sup>	5.40±0.06 <sup>a</sup>	5.39±0.05 <sup>a</sup>
11	6.09±0.07 <sup>c</sup>	5.93±0.04 <sup>b</sup>	5.73±0.07 <sup>a</sup>	5.71±0.07 <sup>a</sup>
12	6.47±0.02 <sup>c</sup>	6.36±0.03 <sup>b</sup>	6.31±0.02 <sup>b</sup>	6.03±0.04 <sup>a</sup>
13	6.94±0.04 <sup>d</sup>	6.64±0.04 <sup>c</sup>	6.56±0.03 <sup>b</sup>	6.49±0.03 <sup>a</sup>
14	7.00±0.00 <sup>b</sup>	6.97±0.03 <sup>b</sup>	6.87±0.05 <sup>a</sup>	6.81±0.03 <sup>a</sup>
15		7.00±0.00 <sup>a</sup>	7.00±0.00 <sup>a</sup>	7.00±0.00 <sup>a</sup>

表 4 不同饵料搭配下脊尾白虾幼体消化酶活性

Tab.4 Effects of different diet combinations on the digestive enzymes activities of *E. carinicauda* larvae

消化酶指标 Digestive enzyme activity (U/mg prot)	组别 Groups			
	卤虫 <i>A. salina</i>	牟氏角毛藻+卤虫 <i>C. muelleri</i> + <i>A. salina</i>	轮虫+卤虫 <i>B. plicatilis</i> + <i>A. salina</i>	牟氏角毛藻+轮虫+卤虫 <i>C.muelleri</i> + <i>B. plicatilis</i> + <i>A. salina</i>
$\alpha$ -淀粉酶 $\alpha$ -Amylase	0.13±0.01 <sup>c</sup>	0.12±0.01 <sup>bc</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>
脂肪酶 Lipase	2.35±0.01 <sup>d</sup>	1.43±0.01 <sup>b</sup>	1.78±0.01 <sup>c</sup>	0.91±0.01 <sup>a</sup>
胃蛋白酶 Pepsase	1.94±0.01 <sup>d</sup>	0.35±0.01 <sup>b</sup>	0.39±0.01 <sup>c</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>

2.4 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体养殖水体的影响

不同饵料搭配对脊尾白虾养殖水体的影响见图 1。从图 1 可以看出, 卤虫组和轮虫+卤虫组养殖水体中,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度比牟氏角毛藻+卤虫组和牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组高, 卤虫组水体中,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度在第 7 天最高, 达到 0.18 mg/L。从图 2 可以看出, 卤虫组的  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度在第 7 天和第 11 天偏高, 分别为 0.091 和 0.097 mg/L, 轮虫+卤虫组水体中,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度在第

11 天达到 0.095 mg/L。从图 3 可以看出, 养殖期间, pH 在 8.20~8.35 之间波动。总体而言, 牟氏角毛藻+卤虫组和牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组水体中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度比其他 2 个组低。

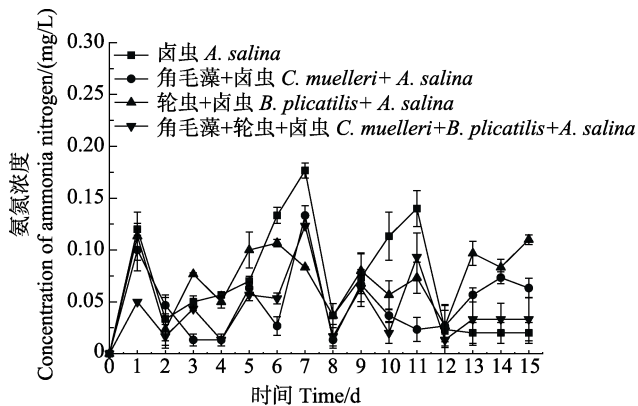


图 1 不同饵料搭配下脊尾白虾幼体养殖水体中氨氮浓度  
Fig.1 The ammonia nitrogen concentration of aquaculture water quality with different diet combinations

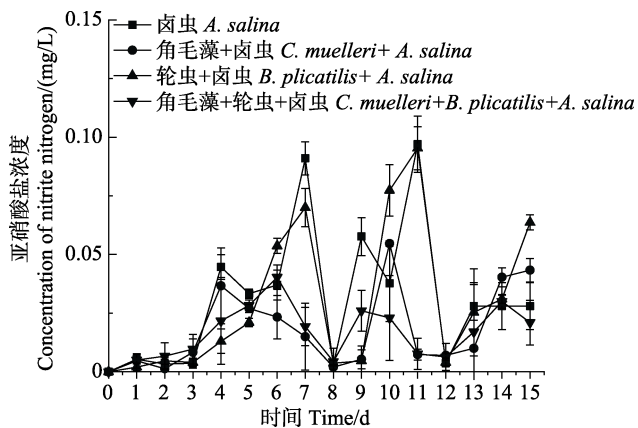


图 2 不同饵料搭配下脊尾白虾幼体养殖水体中  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度

Fig.2 The nitrite nitrogen concentration of aquaculture water quality with different diet combinations

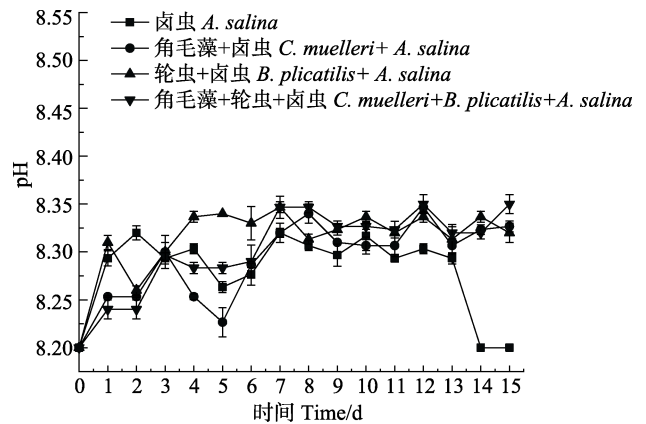


图 3 不同饵料搭配组养殖水体中 pH 值  
Fig.3 pH value of aquaculture water quality with different diet combinations

3 讨论

3.1 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体 SR 的影响

幼体培育是水生动物的繁殖重要阶段, 而开口饵料是影响其幼体生长和 SR 的关键因子(夏晓飞等, 2011; 陈建华等, 2017; 王维娜等, 2000)。与黄经献等(2018)使用卤虫无节幼体搭配牟氏角毛藻和配合饲料投喂脊尾白虾幼体 SR 为 22.5%相比, 本研究采用卤虫无节幼体搭配牟氏角毛藻投喂脊尾白虾幼体, 其幼体变态为仔虾时 SR 达 84.67%。在陆开宏等(2001)研究基础上, 本研究中, 卤虫无节幼体采用了 4 种搭配方式投喂脊尾白虾幼体。研究显示, 单一卤虫无节幼体的投喂量为 3~5 ind./mL, 效果最好。在罗会明等(1980)的研究基础上, 不仅研究了不同饵料搭配对脊尾白虾幼体 SR 的影响, 进一步比较了不同饵料搭配对脊尾白虾幼体变态发育速度的影响。与陈建华等(2017)研究不同的是本研究选用的 3 种饵料均为活体饵料, 牟

氏角毛藻、褶皱臂尾轮虫和卤虫无节幼体 3 种饵料的相互组合, 不仅测定了脊尾白虾溞状幼体阶段的 SR 和 LSI, 还测定了脊尾白虾仔虾 I 期的 3 种消化酶。

本研究结果表明, 各实验组脊尾白虾幼体的 SR 从  $Z_1$ ~P 阶段都明显呈阶梯式下降趋势, 单一卤虫投喂的幼体在  $Z_1$ ~ $Z_2$  期的 SR 与其他 3 个实验组相比最低, 这与罗会明等(1980)研究结果相一致。陆开宏等(2001)研究表明, 在脊尾白虾幼体  $Z_1$ ~ $Z_2$  期投喂单胞藻、轮虫的 SR 更高。脊尾白虾在  $Z_1$  前期的大颚只具有少数小齿, 第 1 和第 2 小颚内密生刚毛,  $Z_1$  前期适合滤食单细胞藻类, 而脊尾白虾幼体发育到  $Z_2$  期, 大颚上的小齿变尖且数量有所增多, 已有捕食浮游动物的能力, 说明单胞藻已经不适合  $Z_2$  之后的幼体培育(罗会明等, 1980; 陆开宏等, 2001)。卤虫组、牟氏角毛藻+轮虫组和轮虫+卤虫组的溞状幼体全部变为仔虾时, 脊尾白虾幼体的 SR 分别为 84.33%、84.67% 和 83.00%; 投喂牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的幼体在  $Z_5$ ~P 阶段大量死亡, 变态为仔虾时, SR 为 35.67%。这与陆开宏等(2001)的研究结果不一致, 推测其原因可能是投喂策略不一致。本研究中, 牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组从  $Z_1$ ~P 阶段, 3 种饵料的投喂数量为单一饵料投喂的 1/3, 牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组是分阶段分别投喂的, 即  $Z_1$  期投喂金藻(*Chrysophyta*),  $Z_2$ ~ $Z_3$  期投喂褶皱臂尾轮虫,  $Z_4$ ~ $Z_6$  期投喂卤虫无节幼体。本研究中, 牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的脊尾白虾幼体  $Z_5$ ~P 阶段的 SR 下降较多, 与其他 3 组相比差异显著。可能幼体发育到后期时, 口器已不适于滤食单细胞藻类, 而轮虫和卤虫的数量有限, 不能满足后期幼体仔虾发育的营养需求, 导致  $Z_5$ ~P 阶段的 SR 较其他 3 组最低。

### 3.2 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体变态发育的影响

本研究发现, 牟氏角毛藻+轮虫组在  $Z_1$ ~ $Z_2$  期间(孵化后前 2 d)脊尾白虾幼体发育最快, 卤虫组发育最慢, 这与罗会明等(1980)研究结果相一致。在虾、蟹养殖过程中, 不同阶段采用不同的饵料和适宜的饵料浓度, 来提高虾、蟹的生长速度和 SR(王维娜等, 2000)。脊尾白虾在  $Z_1$  期以植物性饵料为主, 而牟氏角毛藻+轮虫组比牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组中的植物性饵料更充足, 更能满足幼体从  $Z_1$  期变态为  $Z_2$  期的营养需求。卤虫组在脊尾白虾幼体变态后期发育速度最快, 幼体全部变为仔虾需要 14 d, 与其他 3 种饵料组相比差异显著; 其次是牟氏角毛藻+轮虫组、轮虫+卤虫组和牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组幼体变为仔虾需要 15 d。陈建华等(2017)研究表明, 单一卤虫投喂组幼体全部变态为仔虾需要 12 d, 与本研究结果不一

致, 推测可能是盐度不一致所导致。虾、蟹在蜕皮激素的作用下, 通过蜕皮来实现生长发育, 而蜕皮激素是胆固醇通过一系列复杂的生化反应合成(陈建华等, 2017; 梁俊平等, 2014)。虾、蟹自身不能合成胆固醇, 须从外界获取胆固醇来合成蜕皮激素以完成幼体变态发育(成永旭等, 1998)。陆开宏等(2001)研究表明, 卤虫无节幼体是脊尾白虾育苗的最佳饵料。本研究中, 卤虫组的变态发育比其他 3 个组更快, 可能是单一卤虫组的卤虫数量比其他 3 个组更充足, 能给脊尾白虾幼体提供更丰富的胆固醇以供幼体变态为仔虾。

### 3.3 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体消化酶的影响

虾类消化酶的活性与其饵料中各营养成分的种类和含量有密切关系(夏晓飞等, 2011)。本研究发现, 卤虫组的  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶、胃蛋白酶在 4 个组中最高, 而牟氏角毛藻+轮虫+卤虫组的 3 种酶在 4 个组中最低。夏晓飞等(2011)研究了不同开口饵料对克氏原螯虾幼虾消化酶活性的影响, 发现投喂卤虫无节幼体组, 幼虾的胃蛋白酶在脂肪酶和淀粉酶等 4 种消化酶中最高, 这与本研究结果不一致。本研究中, 4 个实验组的脂肪酶较其他 2 种酶含量较高, 可能主要是投喂的卤虫中含有较高的胆固醇, 卤虫生物量较多的一组生长发育更快, 说明脂肪酶在脊尾白虾幼体变态为仔虾时, 对卤虫的脂质消化吸收起到了重要作用, 从而促进了幼体的变态发育。甲壳动物的消化作用主要通过消化器官分泌胃蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等消化酶来分解蛋白质、脂肪和糖类等物质, 从而被吸收和利用, 而消化酶的活性与甲壳动物对营养物质的消化吸收、生长发育起着决定性作用(付监贵, 2017)。本研究中, 投喂卤虫组的幼体比其他实验组的幼体发育更快, 4 个组都投喂卤虫无节幼体, 而单一卤虫组投喂的卤虫生物量更丰富, 推测可能是摄食卤虫无节幼体较多的一组提高了脊尾白虾幼体的  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶、胃蛋白酶活性, 从而促进了脊尾白虾幼体的变态发育。淀粉酶的作用主要是分解淀粉和糖原(夏晓飞等, 2011), 4 个实验组中, 仔虾的  $\alpha$ -淀粉酶活性较低, 可能因为食物组成的淀粉含量在促进脊尾白虾幼体的生长方面并不起主导作用, 这与夏晓飞等(2011)和姜爱兰等(2020)研究结果一致。

### 3.4 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体养殖水体的影响

残饵、排泄物等通过微生物的作用以无机氮(DIN)和无机磷(DIP)的形式进入水体, 从而提高水体的富营养化(刘国锋等, 2018; 刘凯, 2016), 其中,  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  和  $\text{NO}_2^--\text{N}$  是影响水产养殖水体健康的主要含氮污染

物(王爱业等, 2008; Hu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011)。微藻可作为虾、蟹育苗的开口饵料, 同时, 还具有改善水质的作用(黄翔鹤等, 2008)。黄翔鹤等(2008)研究了牟氏角毛藻对对虾育苗水质及抗逆性的影响。结果表明, 牟氏角毛藻能降低养殖水体中的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  含量, 对水体中 pH 无显著影响, 与本研究结果相一致。本研究中, 卤虫组和轮虫+卤虫组养殖水体中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度比角毛藻+卤虫组和角毛藻+轮虫+卤虫组高; 卤虫组的  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度在第7天和第11天偏高。牟氏角毛藻能通过光合作用将水体的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  等化合物转变为磷脂等有机物, 从而去除水体中高浓度的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  等(黄翔鹤等, 2008), 因此, 在脊尾白虾幼体培育过程中, 添加角毛藻能减缓养殖水体恶化的速度。

在脊尾白虾育苗过程中, 投喂单一卤虫幼体变态发育较快, 但容易加速养殖水质的恶化。从每天检测的水质情况来看, 在脊尾白虾蚤状幼体养殖过程中, 添加牟氏角毛藻的组比没有添加的水体中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  稍低, 而未添加牟氏角毛藻的水体在养殖3~4 d后  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  易偏高。脊尾白虾幼体在  $Z_1$  期以植物性饵料为主, 而牟氏角毛藻能作为开口饵料有改善养殖水质的作用, 因此, 建议在脊尾白虾育苗过程中投喂卤虫无节幼体, 在  $Z_3$  期之前卤虫密度为 1 ind./mL; 在  $Z_3\sim Z_5$  期间, 卤虫密度为 3 ind./mL; 而  $Z_5$  期及之后, 卤虫密度为 5 ind./mL, 可提高幼体 SR 和加快变态发育速度。整个育苗过程中加入一定的牟氏角毛藻能减缓养殖水体恶化的速度。

## 参 考 文 献

- AGUIRRE-GUZMÁN G, VÁZQUEZ-JUÁREZ R, ASCENCIO F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four vibrio species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 78(4): 215–219
- CHEN J H, ZHANG Q Q, GAO H, *et al.* Effects of different diet combination on larval development of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 662–665 [陈建华, 张庆起, 高焕, 等. 不同饵料搭配对脊尾白虾幼体发育的影响. *水产科学*, 2017, 36(5): 662–665]
- CHENG Y X, DU N S, LAI W. Lipid composition in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* at different stages. *Current Zoology*, 1998, 44(4): 45–54 [成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成. *动物学报*, 1998, 44(4): 45–54]
- CHENG Y X. Biological feed cultivation. Beijing: China Agriculture Press, 2005 [成永旭. 生物饵料培养学. 北京: 中国农业出版社, 2005]
- FU J G. Studies on the feeding ecology of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) during early developmental stages and the development of larval digestive tract. Master's Thesis of Soochow University, 2017 [付监贵. 日本沼虾早期发育阶段摄食生态学及其幼体消化道发育的研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2017]
- HU H H, ZHANG J, CHEN W D. Competition of bloom-forming marine phytoplankton at low nutrient concentrations. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(4): 656–663
- HUANG J X, ZHAO B R, SUN X S, *et al.* Study on feeding strategy of larval stage of *Exopalaemon carinicauda*. *Scientific Fish Farming*, 2018(10): 26–27 [黄经献, 赵炳然, 孙祥山, 等. 脊尾白虾幼体阶段饵料投喂策略研究. *科学养鱼*, 2018(10): 26–27]
- HUANG X H, LI H, LI C L, *et al.* Effect of *Chaetoceros muelleri* on water quality and anti-stress ability of larval prawn. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2008, 28(6): 46–50 [黄翔鹤, 李活, 李长玲, 等. 牟氏角毛藻对对虾育苗水质及抗逆性的影响. *广东海洋大学学报*, 2008, 28(6): 46–50]
- HUANG X X. Nutrition in brine shrimp *Artemia*. *Fisheries Science*, 2007, 26(11): 628–631 [黄旭雄. 卤虫的营养. *水产科学*, 2007, 26(11): 628–631]
- JIANG A L, WANG X H, JIN Q, *et al.* Effects of different benthos baits on growth, activities of digestive enzyme, serum biochemical indicators and muscle compositions of *Procambarus clarkii*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2020, 32(1): 97–101 [姜爱兰, 王信海, 金倩, 等. 不同底栖饵料对克氏原螯虾生长、消化酶活性、血清生化指标及肌肉营养成分的影响. *江西农业学报*, 2020, 32(1): 97–101]
- LI J, GLIBERT P M, ALEXANDER J A, *et al.* Growth and competition of several harmful dinoflagellates under different nutrient and light conditions. *Harmful Algae*, 2011, 13: 112–125
- LI X Z, LIU R Y, LIANG X Q. The zoogeography of Chinese *Palaemonoidea* fauna. *Biodiversity Science*, 2003, 11(5): 393–406
- LIANG H F, LONG J Y, LIN X B, *et al.* The feeding effect of 5 species of unicellular algae to zoeae of *Penaeus vannamei*. *Marine Sciences*, 2001, 25(7): 9–21 [梁华芳, 龙建艺, 林小彬, 等. 5种单胞藻培育南美白对虾蚤状幼体的饵料效果. *海洋科学*, 2001, 25(7): 9–21]
- LIANG J P, LI J, LI J T, *et al.* Effects of salinity on spawning and larval development of *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(7): 2105–2113 [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 盐度对脊尾白虾亲虾抱卵及其子代生长发育的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(7): 2105–2113]
- LIU G F, XU P, WU T, *et al.* Present condition of aquaculture nitrogen and phosphorus environmental pollution and future development strategy. *Jiangsu Journal of Agricultural*

- Sciences, 2018, 34(1): 225–233 [刘国锋, 徐跑, 吴霆, 等. 中国水产养殖环境氮磷污染现状及未来发展思路. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 225–233]
- LIU K, FANG T, FENG Z H, *et al.* Research progress on algae treatment to aquaculture wastewater. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science)*, 2016, 25(1): 74–79 [刘凯, 方涛, 冯志华, 等. 藻类处理水产养殖废水的研究进展. 淮海工学院学报(自然科学版), 2016, 25(1): 74–79]
- LU K H, HUA J Q, CHEN X L. Studies on basal food for the zoea larva of *Palaemon carinicauda* during artificial rearing. *Journal of Oceanography of Huanghai Bohai Seas*, 2001, 19(4): 63–70 [陆开宏, 华建权, 陈贤龙. 人工培育脊尾白虾蚤状幼体的饵料基础研究. 黄渤海海洋, 2001, 19(4): 63–70]
- LUO H M, HUANG H Z. Investigation on the diet ingestion and absorption in the larva of *Palaemon (Expalaemon carinicauda)* Holthuis. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1980, 19(4): 100–107 [罗会明, 黄厚哲. 脊尾白虾幼体对饵料的摄食与吸收. 厦门大学学报(自然科学版), 1980, 19(4): 100–107]
- MA H M, WANG X Q, CAO M, *et al.* Research progress on culture of *Expalaemon carinicauda*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(16): 171–172, 175 [马鸿梅, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾养殖研究进展. 现代农业科技, 2019(16): 171–172, 175]
- MILLAMENA O M, QUINITIO E. The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated intact mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 2000, 181(1/2): 81–90
- QI J B. The research about application technology of food organism in *Scylla paramamosain* seed production in ponds. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [齐计兵. 饵料生物在青蟹池塘育苗中的应用技术研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- SUPRAYUDI M A, TAKEUCHI T, HAMASAKI K. Effects of Artemia enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, 2004, 70(4): 650–658
- WANG A Y, JI X Y, CHEN W M, *et al.* The effect of the nitrite nitrogen on the growth of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Safety and Environment*, 2008, 8(4): 12–15 [王爱业, 吉雪莹, 陈卫民, 等. 亚硝态氮对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长的影响. 安全与环境学报, 2008, 8(4): 12–15]
- WANG W N, WANG A L, HU J R, *et al.* Effect of the species and quantities of aquatic food organisms on the reproductive rate of shrimp and crab. *Journal of Hebei University(Natural Science)*, 2000, 20(4): 405–409 [王维娜, 王安利, 胡俊荣, 等. 水中饵料生物的种类和数量对虾蟹繁育率的影响. 河北大学学报(自然科学版), 2000, 20(4): 405–409]
- WANG Y. The Optimization of *Nannochloropsis oculata* culture conditions and its application in the cultivation of *Brachionus plicatilis*. Master's Thesis of Jiangsu Ocean University, 2020 [王玉. 微拟球藻培养条件优化及其在褶皱臂尾轮虫培养中的应用. 江苏海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- XIA X F, ZHENG X J, WANG Y F. The effects of different diets on the growth and development of *Procambarus clarkia* larvae. *Journal of Aquaculture*, 2011, 32(7): 16–21 [夏晓飞, 郑小婧, 王玉凤. 不同开口饵料对克氏原螯虾幼虾发育及消化酶活性的影响. 水产养殖, 2011, 32(7): 16–21]
- XIAO Q Z, DU X, LIU Q, *et al.* Effects of live bait on the growth and development of *Eriocheir sinensis*. *Journal of Biology*, 2017, 34(4): 33–37 [肖起珍, 杜雪, 刘青, 等. 不同活饵料对中华绒螯蟹大眼幼体生长发育的影响. 生物学杂志, 2017, 34(4): 33–37]
- YU T J. The growth and reproduction characteristics of ridgetail white prawn (*Palaemon carinicauda*) cultured in ponds. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014 [于天基. 池塘养殖脊尾白虾的生长与繁殖研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- ZHANG C Y. The effect of feeding *Chaetoceros moulinii* on the metamorphosis of prawn larvae. *Fisheries Science and Technology Information*, 1982(5): 18–20 [张翠英. 投喂牟氏牟氏角毛藻对对虾幼体变态的效果. 水产科技情报, 1982(5): 18–20]
- ZHAO Z Y, YIN Z X, WENG S P, *et al.* Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 520–534

(编辑 陈 严)

## Effects of Live Food Combinations on the Metamorphosis and Larval Development of *Exopalaemon carinicauda*

WANG Linhua<sup>1</sup>, SHEN Nannan<sup>1</sup>, JIANG Haiyi<sup>1</sup>, OUYANG Lefei<sup>1</sup>,  
ZHANG Qingqi<sup>4</sup>, HU Guangwei<sup>1,2,3</sup>, WANG Panpan<sup>1,2,3</sup>, GAO Huan<sup>1,2,3①</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang Jiangsu 222005, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang Jiangsu 222005, China; 3. Jiangsu Province's Agricultural Germplasm Resource Protection and Utilization Platform, Nanjing Jiangsu 210014, China; 4. Ganyu -jiixin Aquaculture Limited Company of Lianyungang, Lianyungang Jiangsu 222100, China)

**Abstract** *Exopalaemon carinicauda* is one of the special economic shrimp in China, which has become an important object of pond single breeding and mixed breeding in recent years. The ridgetail white prawn has good breeding prospects, however, due to its small size and relatively small spawn, it currently mainly relies on natural seedlings, catching natural seedlings or placing broodstock to propagate their own seed, which severely restricts the development of large-scale artificial aquaculture. To achieve large-scale artificial breeding of white shrimp, we must break through the difficulty of full artificial breeding, and the bait is the nutritional basis to ensure the normal growth and development of seedlings. Biological diet generally refers to various aquatic plants, animals and microorganisms that can be artificially cultivated and suitable for aquatic animals to eat. Compared with traditional feed, biological food has many advantages, such as easy to cultivate, fast reproduction, rich nutrition, and strong palatability, and can effectively enhance the disease resistance ability of breeding objects. At present, the commonly used biological food includes *Chaetoceros muelleri*, chlorella, microcytocosus, cyanobacteria, rotifer, *Artemia*, cladocera, copepod and amphipoda. In this study, we analyzed the survival rate, larval stage index, and digestive enzymes of *Exopalaemon carinicauda* larvae (Z<sub>1</sub>~P) fed live food, including group A (feeding only on *Artemia nauplii*), group B (*Chaetoceros muelleri* and *A. nauplii* mixed feeding), group C (*Brachionus plicatilis* and *A. nauplii* mixed feeding), and group D (*C. muelleri*, *B. plicatilis*, and *A. nauplii* mixed feeding). The results showed that group A had the highest metamorphic rate, and all individuals metamorphosed into larvae within 14 days, while the other three groups took 15 days. The survival rates of larvae metamorphosed into larval shrimp were 84.33%, 84.67%, and 83.00% for groups A, B, and C, respectively, and the differences among the three groups were not significant ( $P>0.05$ ). A large number of larvae during the Z<sub>5</sub>~P stage died in group D, and the survival rate was only 35.67%. Moreover, the activities of pepsin (1.94 U/mg prot), lipase (2.35 U/mg prot) and  $\alpha$ -amylase (0.13 U/mg prot) were the highest in group A, while the activities of pepsin (0.08 U/mg prot), lipase (0.91 U/mg prot) and  $\alpha$ -amylase (0.08 U/mg prot) were the lowest in group D. The activities of  $\alpha$ -amylase in groups B and C were 0.12. The activities of lipase (1.78 U/mg prot) and respectively (0.39 U/mg prot) in group C were 0.35 U/mg prot and 0.04 U/mg prot higher than those in group B. This study suggests that feeding *E. carinicauda* larvae with *A. nauplii* (3~5 ind./mL) is expected to increase the survival rate of larvae and accelerate metamorphosis during the nursery phases and supplementation with *C. muelleri* can alleviate the rate of deterioration in aquaculture water.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; Live food; Larval stage index; Digestive enzymes

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210421001

http://www.yykxjz.cn/

方成, 黎兰诗, 梁震宇, 成良峰, 戴习林. 不同浓度亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾生长与免疫功能的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 180-189

FANG C, LI L S, LIANG Z Y, CHENG L F, DAI X L. Changes in immune system and growth performance of *Litopenaeus vannamei* after 40-day challenge with different concentrations of nitrite. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 180-189

# 不同浓度亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾 生长与免疫功能的影响\*



方成 黎兰诗 梁震宇 成良峰 戴习林<sup>①</sup>

(上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室  
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306)

**摘要** 为阐明盐度为 5 条件下不同浓度亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长与免疫功能的影响, 本研究设置 5 个亚硝酸盐浓度组(0.50、0.90、1.70、3.20 和 6.00 mg/L)和对照组(0.05 mg/L), 检测分析了亚硝酸盐胁迫 40 d 后凡纳滨对虾免疫相关酶活性、丙二醛(MDA)含量以及免疫和生长相关基因表达的变化。结果显示, 凡纳滨对虾死亡率随亚硝酸盐浓度的增加而升高, 6.00 mg/L 浓度组体质量增长率(WGR)和体长增长率(LGR)均显著低于对照组( $P<0.05$ )。部分浓度组亚硝酸盐对凡纳滨对虾肝胰腺和血清中的免疫相关酶活性具有一定的诱导作用。其中, 当亚硝酸盐浓度高于 0.50 mg/L 时, 肝胰腺超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于对照组( $P<0.05$ ); 0.50、0.90 和 1.70 mg/L 浓度组的过氧化氢酶(CAT)活性显著高于对照组( $P<0.05$ ); 血清中 CAT 和 SOD 活性随亚硝酸盐浓度的增加均呈先降低后升高再降低的趋势; 0.90 mg/L 浓度组的肝胰腺和血清中酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性均显著高于对照组( $P<0.05$ )。MDA 含量变化无明显规律。此外, 血清中谷丙转氨酶(GPT)活性显著升高( $P<0.05$ )。实时荧光定量 PCR 结果显示, 除 0.50 mg/L 浓度组外, 其他浓度组的 *mn-sod* 和 *hsp70* 基因表达量显著升高( $P<0.05$ ); 各浓度组的 *cat*、*trx*、*tgase*、*trypsin* 和 *chitinase* 基因表达量显著低于对照组( $P<0.05$ )。经亚硝酸盐胁迫 40 d 后, 各浓度组凡纳滨对虾的生长和免疫功能均受到明显的阻遏作用。在盐度为 5 条件下, 为确保凡纳滨对虾的健康养殖, 亚硝酸盐浓度应控制在 0.50 mg/L 以内。

**关键词** 凡纳滨对虾; 亚硝酸盐; 酶活性; 环境胁迫

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0180-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国非常重要的水产经济动物, 自引入我国以来, 养殖规模不断扩大, 创造了巨大的经济价值。但养殖过程中出现的亚硝酸盐成为了制约凡纳滨对虾产业发展的重要

因素。亚硝酸盐是养殖水体中常见的化学物质。氨氮在亚硝化作用下变为亚硝酸盐, 之后通过硝化作用转变为硝酸盐。但硝化作用与亚硝化作用一般无法达到平衡, 因此, 亚硝酸盐容易在水体中积蓄。亚硝酸盐

\* 上海市虾类产业体系建设项目(沪农科[2014]第 5 号)资助 [This work was supported by Shanghai Shrimp Industry System Construction Project (Shanghai Agricultural Science [2014] No.5)]. 方成, E-mail: 2414100497@qq.com

① 通信作者: 戴习林, 教授, E-mail: xldai@shou.edu.cn

收稿日期: 2021-04-21, 收修改稿日期: 2021-06-18

可导致虾类生长和发育异常, 病菌易感性增加(Tseng *et al.*, 2004; 臧维玲等, 1996; Mallasen *et al.*, 2006), 并会造成一定程度的组织损伤。一定浓度的亚硝酸盐可使血淋巴与氧结合能力降低(Chen *et al.*, 1995), 最终导致虾窒息死亡。彭自然等(2004)研究发现, 凡纳滨对虾在含有亚硝酸盐的水体中养殖 14 d 后, 其生长和发育受到了明显抑制。胡义波等(2005)研究发现, 凡纳滨对虾经亚硝酸盐胁迫后体内血细胞减少, 细胞超微结构受到明显影响。吴中华等(1999)研究发现, 亚硝酸盐慢性胁迫条件下, 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)各个组织均受到不同程度的影响, 其中肝胰腺组织病变较为严重。Cheng 等(2000)研究发现, 斑节对虾(*Penaeus monodon*)经亚硝酸盐胁迫后, 肝胰腺和中肠中亚硝酸盐积累较多。Zhang 等(2015)研究发现, 在经氨氮和亚硝酸盐联合胁迫 24 h 后, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血淋巴中活性氧升高, 抗氧化酶活性受到影响。葛红星等(2014)研究发现, 凡纳滨对虾在不同浓度亚硝酸盐水体中暴露 20 d 后, 对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的易感性提高。总体而言, 一定浓度的亚硝酸盐可对凡纳滨对虾的免疫功能和生长造成较明显的阻遏作用。近年来, 关于亚硝酸盐的研究主要集中于亚硝酸盐对虾类的急性毒性影响, 主要研究短期亚硝酸盐胁迫后虾体内抗氧化酶活性、氧化损伤以及对病菌易感性的变化, 而较少有针对亚硝酸盐对凡纳滨对虾亚急性毒性的研究。本实验研究凡纳滨对虾在 5 个不同亚硝酸盐浓度的水体中养殖 40 d 后体内部分免疫相关酶活性、免疫和生长相关基因表达变化情况, 以期为亚硝酸盐亚急性胁迫对凡纳滨对虾的影响提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用虾取自上海申漕特种水产有限公司, 挑选健康、体长为(7.45±0.21) cm、体质量为(4.75±0.51) g 的凡纳滨对虾暂养于水泥池中。

### 1.2 亚硝酸盐亚急性胁迫实验

凡纳滨对虾暂养 1 周后开始实验。通过预实验得知, 凡纳滨对虾 96 h 半致死浓度(96h-LC<sub>50</sub>)约为 30 mg/L, 取该浓度的 20%为最高浓度并按等对数间距设置 5 个亚硝酸盐浓度, 分别为 0.50、0.90、1.70、3.20 和 6.00 mg/L。每个处理设 3 组平行, 每个平行放 30 尾虾。对照组亚硝酸盐浓度约为 0.05 mg/L。实

验在卤虫池中进行, 水体体积为 100 L, 每日换水 1/2。每日利用分光光度计测得水体中亚硝酸盐浓度, 并使用 10 g/L NaNO<sub>2</sub> 溶液控制水体中的亚硝酸盐浓度。

实验期间, 温度控制在 26℃~27℃, 盐度为 5, 总氨氮≤0.5 mg/L, 非离子氨≤0.02 mg/L, pH 控制在 7.8±0.2, 24 h 曝气。每日投喂 3 次人工饲料(鱼粉 23%、酵母粉 4%、大豆磷脂 4%、豆粕 20%、花生粕 7.4%等), 每日投喂量为虾体质量的 11%~16%。每日记录虾的死亡状况。养殖实验进行 40 d 后(取样前停饲 24 h), 每个平行取 3 尾虾的肝胰腺放入离心管中, 存放于-80℃冰箱, 用于酶活测定和 RNA 提取。另外, 使用 1 mL 注射器在第 2 腹肢基部抽取凡纳滨对虾的血淋巴, 并放入离心管中。血淋巴存于 4℃冰箱, 放置 24 h 后离心取上清液, 放置于-80℃冰箱, 用于酶活测定。

### 1.3 生长指标的测定

通过以下公式计算得到不同浓度感染组的死亡率(MR)、体质量增长率(WGR)和体长增长率(LGR)。

$$\text{死亡率(MR, \%)} = D_T / N_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{体质量增长率(WGR, \%)} = (W_T - W_0) / W_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{体长增长率(LGR, \%)} = (L_T - L_0) / L_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $N_0$  为初始数量;  $D_T$  为实验结束时死亡数量;  $W_0$  和  $W_T$  分别为初始平均体质量和实验结束时平均体质量;  $L_0$  和  $L_T$  分别为初始平均体长和实验结束时平均体长。

### 1.4 抗氧化酶、代谢酶活性和 MDA 含量的测定

采用超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、丙二醛(MDA)、谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)试剂盒(南京建成生物工程有限公司)测定凡纳滨对虾肝胰腺和血清的生理生化指标。

### 1.5 总 RNA 的提取

使用 RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(DP451)(北京天根生化科技有限公司)提取肝胰腺组织 RNA。采用核酸蛋白测定仪测定的 RNA 样品的 OD<sub>260 nm</sub> 和 OD<sub>280 nm</sub> 值, 确定其浓度, 并计算二者比值以确定 RNA 的纯度。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

### 1.6 反转录及引物设计

按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit



说明书(TaKaRa)将之前所提取的总 RNA 进行反转录,得到的 cDNA 存放于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。根据 NCBI 数据库中凡纳滨对虾 *mn-sod* (DQ005531)、*cat* (AY518322)、*hsp70* (AY645906)等基因的保守区域和  $\beta$ -actin 基因的序列设计特异性引物(表 1)。

表 1 实验中所用引物序列  
Tab.1 Sequences of the primers in this study

引物 Primer	序列 Sequences (5'~3')
<i>mn-sod</i> F	CTGGTCCGTTGCTTGGC
<i>mn-sod</i> R	CGCTCATTACGTTCTCCC
<i>cat</i> F	TCAGCGTTTGGTGGAGAA
<i>cat</i> R	GCCTGGCTCATCTTTATC
<i>hsp70</i> F	AGGAGACCGCTGAGGCTTAC
<i>hsp70</i> R	AGCACATTCAGACCCGAGAT
<i>trx</i> F	TTAACGAGGCTGGAAACA
<i>trx</i> R	AACGACATCGCTCATAGA
<i>tgase</i> F	TTAACGAGGCTGGAAACA
<i>tgase</i> R	AACGACATCGCTCATAGA
<i>trypsin</i> F	ACGGTCATCCTCTCCAAG
<i>trypsin</i> R	GTCCTCAATGTCGCTCTG
<i>chitinase</i> F	GGTCTCTACGCTCATCCTCTC
<i>chitinase</i> R	TCATCCACTACGGTCCATTCC
<i>ctsb</i> F	CCTCTGTGGTTTTGGATGTA
<i>ctsb</i> R	GATGCTGTATGCTTTGCCTC
$\beta$ -actin F	GCCCATCTACGAGGGATA
$\beta$ -actin R	GGTGGTCGTGAAGGTGTAG

### 1.7 荧光定量 PCR

使用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 Sequence Detection System 仪器,根据 SYBR<sup>®</sup> Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒说明书,对各组实验样品的目的基因和  $\beta$ -actin 基因 cDNA 进行定量测定。ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 Sequence Detection System 的具体反应程序设置为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。最后根据熔解曲线分析 PCR 产物质量。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法对各组样品测得的基因数据进行定量分析。

### 1.8 数据统计与分析

所有数据使用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用 SPSS 17.0 和 Excel 2010 分析数据,使用 Duncan's multiple range test 检验统计差异, $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾死亡率和生长的影响

由表 2 可知,凡纳滨对虾死亡率随亚硝酸盐浓度的增加而升高。各浓度组死亡率均显著高于对照组( $P<0.05$ ),6.00 mg/L 浓度组死亡率为最高( $P<0.05$ )。

凡纳滨对虾体质量增长率和体长增长率总体上随亚硝酸盐浓度的增加呈降低的趋势。6.00 mg/L 浓度组体质量增长率和体长增长率为最低,并显著低于对照组( $P<0.05$ ),其他浓度组体长增长率和体质量增长率组间无显著差异( $P>0.05$ )。

表 2 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾死亡率和生长的影响  
Tab.2 Effect of different concentrations of nitrite on growth performance and mortality rate of *L. vannamei*

浓度 Concentration (mg/L)	死亡率 MR/%	体质量增长率 WGR/%	体长增长率 LGR/%
0.05	1.67 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>	34.43 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	8.21 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
0.50	26.54 $\pm$ 4.60 <sup>b</sup>	25.33 $\pm$ 4.71 <sup>ab</sup>	6.32 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
0.90	33.33 $\pm$ 3.62 <sup>b</sup>	30.46 $\pm$ 6.31 <sup>a</sup>	6.15 $\pm$ 2.83 <sup>b</sup>
1.70	63.00 $\pm$ 3.73 <sup>c</sup>	20.13 $\pm$ 6.22 <sup>ab</sup>	5.42 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>
3.20	51.67 $\pm$ 2.78 <sup>c</sup>	26.42 $\pm$ 1.44 <sup>ab</sup>	7.05 $\pm$ 1.40 <sup>ab</sup>
6.00	75.00 $\pm$ 1.82 <sup>d</sup>	13.23 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>	5.21 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>

### 2.2 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

除 0.50 mg/L 浓度组外,其他浓度组血清中 SOD 和 CAT 活性均高于对照组,其中,SOD 和 CAT 活性分别在 3.20 和 0.90 mg/L 浓度组达到最高并显著高于对照组( $P<0.05$ )(图 1a、图 1b)。除 0.50 mg/L 浓度组外,其他浓度组肝胰腺 SOD 活性均高于对照组,0.90 mg/L 浓度组 SOD 活性为最高( $P<0.05$ )(图 1c)。如图 1d 所示,0.50、0.90 和 1.70 mg/L 浓度组肝胰腺 CAT 活性显著高于对照组( $P<0.05$ )。3.20 和 6.00 mg/L 浓度组 CAT 活性显著低于对照组,且各组间存在显著差异( $P<0.05$ )(图 1d)。

血清中 AKP 和 ACP 活性随亚硝酸盐浓度的增加总体呈升高的趋势,而在肝胰腺中则呈波动变化。3.20 mg/L 浓度组血清 AKP 和 ACP 活性达到最高( $P<0.05$ )(图 1e、图 1f)。而肝胰腺中 ACP 和 AKP 活性在 0.90 mg/L 浓度组为最高( $P<0.05$ )(图 1g、图 1h)。

MDA 含量总体呈波动变化,其中,3.20 mg/L 浓度组血清 MDA 含量显著高于对照组( $P<0.05$ ),其他浓度组与对照组无显著差异( $P>0.05$ )(图 1i)。除 0.50 mg/L

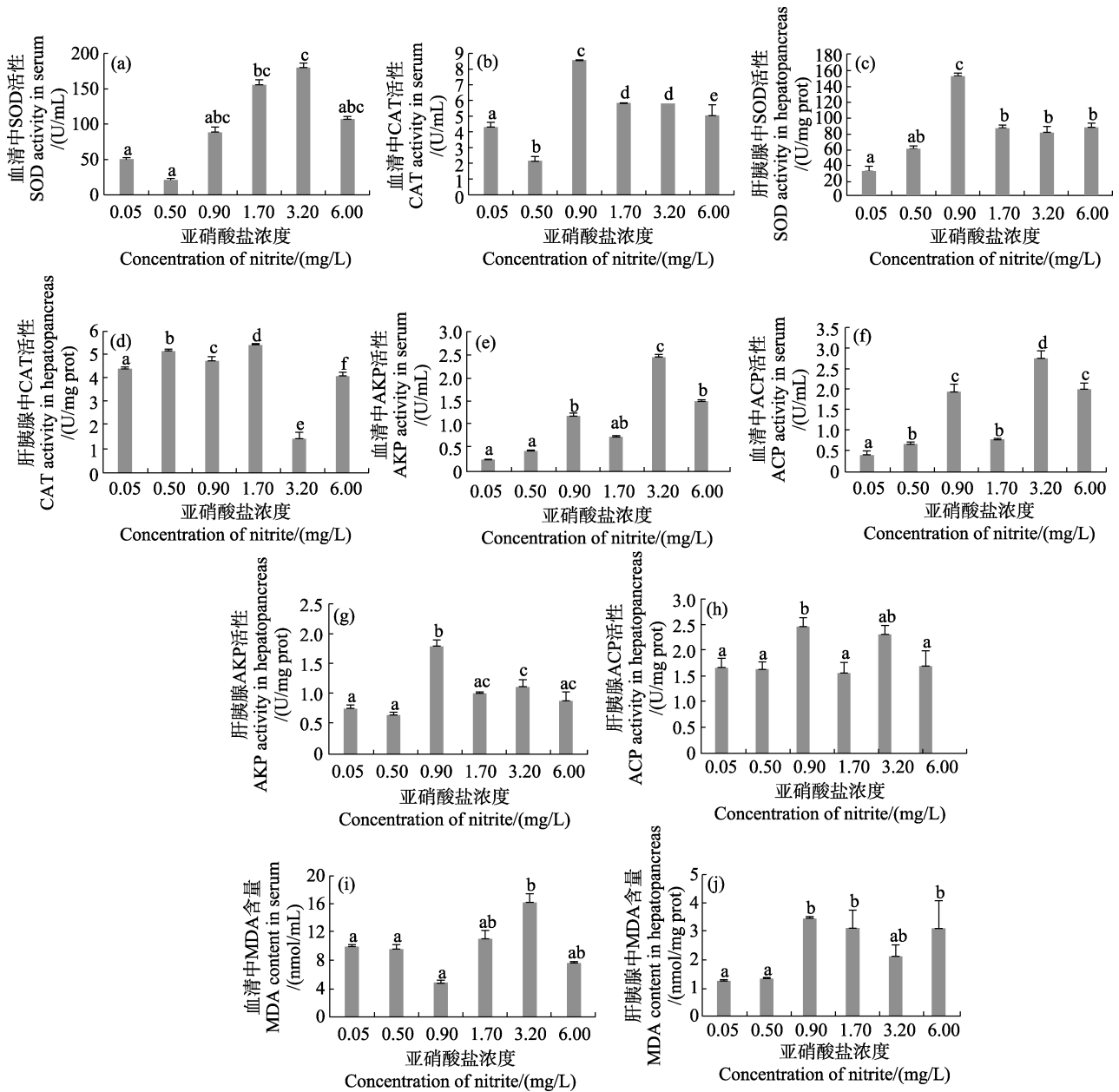


图 1 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of nitrite on antioxidant enzyme activity and MDA content of *L. vannamei*

不同字母代表存在显著差异( $P<0.05$ ), 下同。

Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

浓度组,其他浓度组肝胰腺 MDA 含量均高于对照组,其中,0.90、1.70 和 6.00 mg/L 浓度组显著高于对照组 ( $P<0.05$ ) (图 1j)。

### 2.3 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾代谢酶活性的影响

除 0.50 mg/L 浓度组外,其他浓度组 GPT 活性均显著高于对照组( $P<0.05$ )。各浓度组 GPT 活性无显著差异( $P>0.05$ )(图 2a)。3.20 和 6.00 mg/L 浓度组 GOT

活性显著高于其他浓度组( $P<0.05$ ),其他浓度组间无显著差异( $P>0.05$ )(图 2b)。

### 2.4 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾肝胰腺中免疫相关基因表达的影响

除 0.50 mg/L 浓度组外,其他浓度组 *mn-sod* 和 *hsp70* 基因表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。*mn-sod* 和 *hsp70* 基因表达量分别在 6.00 和 3.20 mg/L 浓度组达到最高( $P<0.05$ )(图 3a、图 3b)。*cat*、*trx* 和 *tgase* 基

因均随亚硝酸盐浓度的增加呈降低的趋势,各浓度组基因表达量均显著低于对照组( $P<0.05$ )(图 3c~图 3e)。

### 2.5 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾肝胰腺中生长相关基因表达的影响

*trypsin* 和 *chitinase* 基因表达量随亚硝酸盐浓度

的增加总体呈先降低后升高的趋势。各浓度组的 *trypsin* 基因表达量均显著低于对照组( $P<0.05$ ),且各浓度组无显著差异( $P>0.05$ )。6.00 mg/L 浓度组的 *chitinase* 基因表达量升高,并显著高于其他浓度组( $P<0.05$ )(图 4a、图 4b)。

*ctsb* 基因表达量随亚硝酸盐浓度的增加呈波动

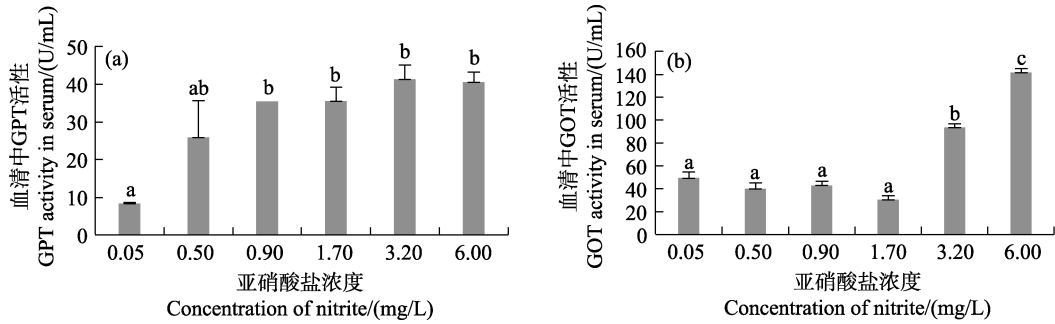


图 2 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾 GOT 和 GPT 酶活性的影响

Fig.2 Activity changes of GOT and GPT of *L. vannamei* after being challenged by different concentrations of nitrite

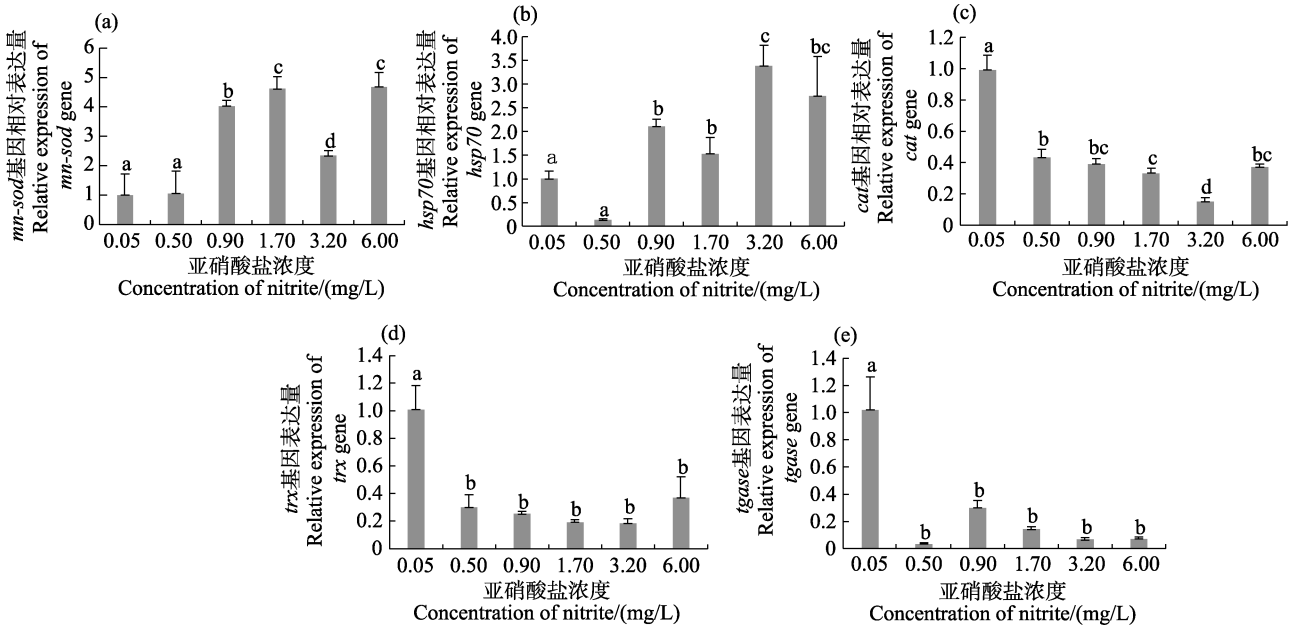


图 3 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾肝胰腺中免疫相关基因表达的影响

Fig.3 Changes of expression of immune-related genes in hepatopancreas of *L. vannamei* after being challenged by different concentrations of nitrite

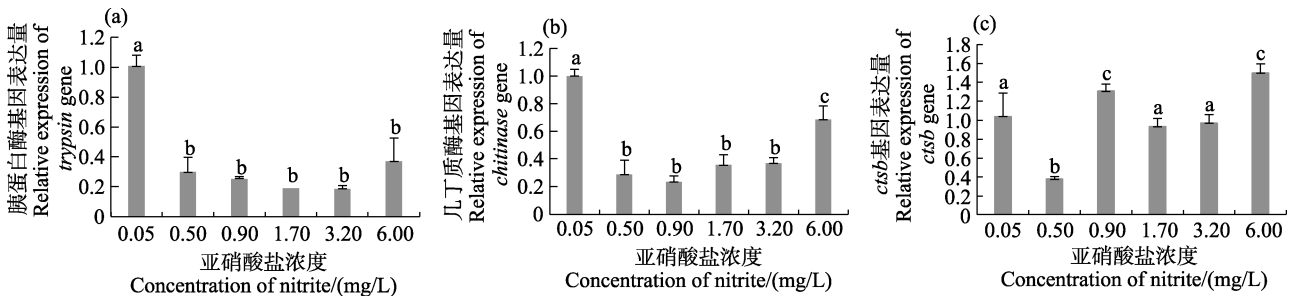


图 4 不同浓度亚硝酸盐对凡纳滨对虾肝胰腺中生长相关基因表达的影响

Fig.4 Changes of expression of growth-related genes in hepatopancreas of *L. vannamei* after being challenged by different concentrations of nitrite

变化, 0.50 mg/L 浓度组达到最低并显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。0.90 和 6.00 mg/L 浓度组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。1.70 和 3.20 mg/L 浓度组与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 4c)。

### 3 讨论

甲壳动物在受到 pH、重金属等环境因子胁迫时, 会发生生理功能紊乱和免疫功能下降(汪蕾等, 2016; Lyu *et al.*, 2014; 周萌等, 2015), 异物入侵会造成虾的氧化损伤(Kultz, 2005)并最终导致细胞功能出现障碍, 而抗氧化酶可帮助机体消除多余的自由基, 从而使机体免受氧化损伤。SOD 和 CAT 是凡纳滨对虾体内 2 种重要的抗氧化酶, 可协同清除自由基(洪美玲等, 2007)。Zhang 等(2015)对罗氏沼虾进行了氨氮和亚硝酸盐的联合急性胁迫实验, 当氨氮浓度为 0 mg/L 时, 随亚硝酸盐浓度的升高, 罗氏沼虾血清中 SOD 活性先降低后升高。葛红星等(2014)研究了不同浓度亚硝酸盐(2、4、6 和 10 mg/L)急性胁迫对凡纳滨对虾免疫相关酶活性的影响, 其中 6 和 10 mg/L 浓度组对各时间段的抗氧化酶活性有明显的抑制作用, 而其他浓度组不明显。本研究中, 除 0.50 mg/L 浓度组外, 其他浓度组 SOD 活性均显著升高, 其中 0.90 和 1.70 mg/L 浓度组 CAT 活性显著升高, 较高浓度组(3.20 和 6.00 mg/L) CAT 活性有一定程度的下降。这与上述研究结果不一致, 原因可能是当亚硝酸盐浓度较低时出现“毒性兴奋效应”, 而较高浓度的亚硝酸盐则超出抗氧化酶的正常调节范围。MDA 是脂质氧化过程中的产物(Liu *et al.*, 2011), 其含量可反映机体所受的氧化损伤程度。本研究肝胰腺中各浓度组 MDA 含量升高时, SOD 活性也相应升高, 说明机体中的抗氧化酶活性会随 MDA 含量的变化发生改变, 以便及时帮助机体清除自由基。ACP 和 AKP 是 2 种水解酶, 在去磷酸化过程中起重要作用, 且可参与机体解毒过程(何海琪等, 1992)。沈敏等(2019)研究发现, 高盐胁迫可使凡纳滨对虾体内的 ACP 活性显著升高, 而当盐度高于 45 后, ACP 活性降低。彭军辉等(2018)研究发现, ACP 和 AKP 活性随氨氮胁迫时间的增加先升高后降低。本研究中, AKP 与 ACP 活性总体呈升高的趋势, 未受到明显抑制, 原因可能是 AKP 和 ACP 仍在进行解毒作用且亚硝酸盐浓度没有超出 ACP 和 AKP 的正常调节范围。此外, GOT 和 GPT 活性可反映机体肝组织健康状态和功能, 肝胰腺功能与免疫、代谢等能力息息相关, 当对虾处于健康状态时, 血清中只有少量的转氨酶; 当虾肝组织受损

时, 肝细胞会向血淋巴中释放大量转氨酶(许宏庆等, 2006)。本研究中, 除 0.50 mg/L 浓度组外, 其他浓度组中的转氨酶活性均显著高于对照组, 说明肝胰腺功能可能受到明显影响。

肝胰腺是凡纳滨对虾重要的消化器官, 具有代谢、消化和免疫等重要功能(蒋昊, 2009), 因此, 肝胰腺是对虾受到环境胁迫后的重要研究对象。Wang 等(2009)研究发现, pH 胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺 *mn-sod* 基因的表达有诱导作用。本研究中, 除 0.50 mg/L 浓度组外, 其他浓度组肝胰腺 *mn-sod* 基因表达量均显著升高, 与 Wang 等(2009)的结果相似, 表明在亚硝酸盐胁迫 40 d 后, 肝胰腺中的 SOD 可能仍在发挥作用, 且随亚硝酸盐浓度的增加, *mn-sod* 基因表达量升高以增强抗氧化能力。Zheng 等(2016)研究发现, 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)肝胰腺中 *cat* 基因表达量在高浓度亚硝酸盐(20 mg/L)的影响下, 短时间会明显升高, 但随时间的增加, *cat* 基因表达量逐渐降低。本研究中, *cat* 基因表达量随亚硝酸盐浓度的增加显著降低, 原因可能是长时间的亚硝酸盐胁迫会对 *cat* 基因表达产生抑制作用, 从而减少 CAT 的产生。值得注意的是, CAT 酶量减少, 但部分浓度组活性仍较高, 造成该结果的原因有待研究。本研究中, *mn-sod* 基因表达量明显升高, 而 *cat* 基因则相反, 表明凡纳滨对虾在 SOD 活性方面对亚硝酸盐胁迫有较强适应性。

硫氧还蛋白(TRX)是具有氧化还原活性的蛋白质, 属于过氧化酶(PRX)家族。PRX 广泛存在于各种哺乳动物、植物和无脊椎动物中, 具有多种生理功能, 具有抗氧化、抗高温等功能(Radyuk *et al.*, 2003)。在无脊椎动物中, PRX 通过消除机体内  $H_2O_2$  来参与体内抗氧化反应。郭慧等(2017)研究发现, 亚硝酸盐胁迫能显著抑制凡纳滨对虾肝胰腺中 *trx* 基因的表达。本研究各浓度组的 *trx* 基因表达量均显著降低。说明在长时间的亚硝酸盐胁迫下, 肝胰腺中的 TRX 在抗亚硝酸盐胁迫过程中被不断消耗, 且基因表达受到抑制。

谷氨酰胺转移酶(TGASE)在对虾免疫功能中具有重要作用。Fagutao 等(2012)研究发现, 将日本对虾 *tgase* 基因沉默后, 虾体内的血细胞数量显著降低, 同时抗菌肽和溶菌酶的基因表达显著降低, 细菌总数升高; Yao 等(2019)研究发现, 凡纳滨对虾血蓝蛋白可与 TGASE 直接相互作用并调节其表达。以上研究表明, TGASE 参与对虾凝血过程。虾类受到异物入侵时, 血细胞会释放 TGASE 并形成血浆蛋白(Maningas *et al.*, 2008)。卢芷程(2018)则发现, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)可在短期内诱导 *tgase* 基因的表达, 而随

时间延长, *tgase* 基因表达量持续降低。说明长时间的环境胁迫会导致 *tgase* 基因表达受到抑制。这与本研究结果基本一致, 推测凡纳滨对虾的凝血功能可能受到一定程度的影响。

热休克蛋白(HSPs)作为一种分子伴侣, 可对各种外界刺激造成的细胞损伤进行自我修复, 并在虾类的应激反应和先天免疫系统中发挥重要作用(雷爱莹等, 2008)。当虾类机体内自由基达到一定数量并超出机体消除自由基的能力后, 热休克蛋白基因会被诱导表达。董学兴(2019)研究发现, 短期氨氮胁迫可诱导罗氏沼虾 *hsp70* 基因大量表达。本研究中, 除 0.50 mg/L 浓度组外, 其他浓度组 *hsp70* 基因表达量均显著高于对照组, 表明凡纳滨对虾体内自由基与抗氧化酶系统可能失衡, 热休克蛋白基因被诱导表达并参与机体修复。综上所述, 凡纳滨对虾总体上生理和免疫功能均受到抑制, 但在 SOD 活性方面表现出较强的适应性。

此外, 本研究发现, 亚硝酸盐会显著抑制凡纳滨对虾的生长。随着亚硝酸盐浓度的增加, 体质量增长率和体长增长率均呈降低的趋势, 与肖威等(2020)的结果一致。本研究检测的 4 种生长相关基因均与凡纳滨对虾的生长发育有非常密切的关系, 其中, 组织蛋白酶 B (CTSB)在脊椎动物中研究较多, 它参与多种生理功能, 如食物消化、免疫和蜕皮等过程(Wang *et al.*, 2008; Stephen *et al.*, 2012)。几丁质酶又被称为壳多糖, 是甲壳动物在蜕皮过程中最重要的酶之一。吕黎等(2011)报道, 几丁质酶在免疫方面起到一定作用。胰蛋白酶则具有消化食物和水解蛋白质的功能。本研究中, 各亚硝酸盐浓度组胰蛋白酶基因和几丁质酶基因均显著降低, 表明凡纳滨对虾的消化功能受到了抑制。虾类在遭受外界病原体或异物侵袭时, 体内的能量代谢会发生变化。由于外界环境的恶化, 体内稳态失衡, 细胞产生应激反应, 包括 DNA 和蛋白质损伤修复、细胞周期停滞或凋亡, 并从细胞的生长状态转型至细胞的修复状态(Kultz, 2005)。这些过程会消耗大量能量, 从而影响虾的生长。本研究中, 各浓度组胰蛋白酶基因和几丁质酶基因表达量显著降低, 可能与凡纳滨对虾体内大量能量参与免疫调控及维持渗透压平衡有关。李忠帅等(2021)研究发现, 亚硝酸盐可在凡纳滨对虾体内迅速积累并加快其能量代谢, 进一步说明亚硝酸盐抑制凡纳滨对虾生长的机制。郭慧等(2017)研究发现, 亚硝酸盐可显著诱导 *ctsb* 基因的表达, 之前郭慧等(2013)研究发现, CTSB 可能参与细胞凋亡。本研究中, *ctsb* 基因表达无明显规律, 可能因为该基因功能较复杂, 未来需要作进一步的研究。

## 4 结论

在亚硝酸盐浓度分别为 0.50、0.90、1.70、3.20 和 6.00 mg/L, 盐度为 5 的水体中养殖 40 d 后, 凡纳滨对虾各浓度组死亡率显著升高, 生长性能和免疫功能受到阻遏, 但在 SOD 活性方面表现出较强的适应性。各浓度组生长相关酶基因表达量显著降低, 凡纳滨对虾消化功能受到抑制。此外, 当亚硝酸盐浓度大于 0.9 mg/L 时, 凡纳滨对虾肝胰腺功能可能受到明显影响。在盐度为 5 条件下, 为保证凡纳滨对虾的健康养殖, 亚硝酸盐浓度应控制在 0.50 mg/L 以下。

## 参 考 文 献

- CHEN J C, CHENG S Y. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systems and Environmental Physiology*, 1995, 164(7): 530–535
- CHENG S Y, CHEN J C. Accumulation of nitrite in the tissues of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient nitrite after different time periods. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 39(2): 183–192
- DONG X X. Stress response of *Macrobrachium rosenbergii* to ammonia-N and its environmental effects in different culture patterns. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2019 [董学兴. 罗氏沼虾对氨氮的胁迫响应及其不同养殖模式的环境效应. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2019]
- FAGUTAO F F, MANINGAS M B, KONDO H, *et al.* Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 711–715
- GE H X, LI J, CHEN P, *et al.* Susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus*: The influence of environmental nitrite nitrogen. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 629–636 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 亚硝酸盐氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 629–636]
- GUO H, TAN C T, YOU L Y, *et al.* Effects of nitrite stress on gene expression of antioxidant enzymes, heat shock protein and cathepsin B in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(3): 117–122 [郭慧, 谭翠婷, 游林玉, 等. 亚硝酸盐胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶、热休克蛋白和组织蛋白酶 B 基因表达量的影响. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(3): 117–122]
- GUO H, XIAN J A, LI B, *et al.* Gene expression of apoptosis-related genes, stress protein and antioxidant enzymes in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*,

- 2013, 157: 366–371
- HE H Q, SUN F. Studies on the characteristics of acid and alkaline phosphatases in Chinese shrimp *Penaeus chinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1992, 23(5): 555–560 [何海琪, 孙凤. 中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究. 海洋与湖沼, 1992, 23(5): 555–560]
- HONG M L, CHEN L Q, GU S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412–418]
- HU Y B, WANG Y, JIANG N C. Effects of ammonia-N and nitrite-N on the hemocyte count and ultrastructure of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, 32(6): 691–697 [胡义波, 王玥, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾血细胞及超微结构的影响. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(6): 691–697]
- JIANG H. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to stresses. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2009 [蒋昊. 中国明对虾在胁迫条件下肝胰腺的差异蛋白质组学研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2009]
- KULTZ D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 2005, 67: 225–257
- LEI A Y, ZENG D G. Effects of compound Chinese herbal on the expression of heat stress protein 70 gene in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Southern Agriculture*, 2008, 39(6): 830–833 [雷爱莹, 曾地刚. 复方中草药对凡纳滨对虾热应激蛋白70基因表达的影响. 广西农业科学, 2008, 39(6): 830–833]
- LI Z S, MA S, SHAN H W, *et al.* Accumulation of nitrite and responses of energy metabolism exposed to nitrite stress in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1825–1834 [李忠帅, 马牲, 单洪伟, 等. 亚硝态氮胁迫下凡纳滨对虾体内亚硝态氮的积累与能量代谢响应. 水产学报, 2021, 45(11): 1825–1834]
- LIU L X, XI Q Y, YANG L, *et al.* The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 495–500
- LU Z C, XU L J, LU W Y, *et al.* Effects of *Vibrio alginolyticus* on hemocytes toxicity, apoptosis and immune-related genes in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(12): 2559–2565 [卢芷程, 许鑫佳, 卢文字, 等. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾血细胞毒性及细胞凋亡和免疫相关基因的影响. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2559–2565]
- LÜ L, NING Q J. Research progress on the structure and function of chitinase gene in crustacean. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(6): 457–459 [吕黎, 宁黔冀. 甲壳动物几丁质酶基因结构与功能的研究进展. 生理科学进展, 2011, 42(6): 457–459]
- LYU K, ZHU X X, CHEN R, *et al.* Molecular cloning of manganese superoxide dismutase gene in the cladoceran *Daphnia magna*: Effects of microcystin, nitrite, and cadmium on gene expression profiles. *Aquatic Toxicology*, 2014, 148(1): 55–64
- MALLASEN M, WAGNER C V. Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1292–1298
- MANINGAS M, KONDO H, HIRONO I, *et al.* Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Molecular Immunology*, 2008, 45(5): 1269–1275
- PENG J H, CHEN L Y, CHENG C H, *et al.* Acute toxicity of ammonia nitrogen to *Scylla paramamosain* and its influence on immune factors in serum. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 114–121 [彭军辉, 陈丽英, 程长洪, 等. 氨氮对拟穴青蟹的急性毒性及其血清免疫相关酶活力的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 114–121]
- PENG Z R, ZANG W L, GAO Y, *et al.* Toxic effects of ammonia and nitrite on *Penaeus vannamei* juvenile. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(3): 274–278 [彭自然, 臧维玲, 高杨, 等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 274–278]
- RADYUK S N, SOHAL R S, ORR W C. Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or cell death in response to different stressors: Over- and under- expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells. *Biochemical Journal*, 2003, 371(3): 743–752
- SHEN M, ZHAO Y C, LING T, *et al.* Effects of high-salt abrupt on growth and related enzyme activities in *Litopenaeus vannamei*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(1): 204–209 [沈敏, 赵玉超, 凌涛, 等. 高盐突变对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长性能及相关酶活力的影响. 海洋与湖沼, 2019, 50(1): 204–209]
- STEPHEN A, ROJO L, ARAUJO-BERNAL S, *et al.* Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(1): 32–40
- TSENG I T, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(4): 325–333
- WANG L, ZHANG X X, ZHENG P H, *et al.* Effects of sulfide stress on expressions of antioxidant enzymes in *Litopenaeus vannamei* haemocytes. *Sichuan Journal of Zoology*, 2016, 35(6): 884–888 [汪蕾, 张秀霞, 郑佩华, 等. 硫化物胁迫对凡纳滨对虾血细胞抗氧化酶基因表达的影响. 四川动物, 2016, 35(6): 884–888]
- WANG W N, ZHOU J, WANG P, *et al.* Oxidative stress, DNA

- damage and antioxidant enzyme gene expression in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 150(4): 428–435
- WANG X M, LIU B Z, WANG G D, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of cathepsin B in nutrient metabolism during larval development in *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 2008, 282(1/2/3/4): 41–46
- WU Z H, LIU C B, LIU C R, *et al.* Histopathological research on chronic poisoning of *Penaeus chinensis* by nitrite and ammonia. *Journal of Central China Normal University (Natural Sciences)*, 1999, 33(1): 119–122 [吴中华, 刘昌彬, 刘存仁, 等. 中国对虾慢性亚硝酸盐和氨中毒的组织病理学研究. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 33(1): 119–122]
- XIAO W, SHAN H W, MA S, *et al.* Effects of chronic nitrite stress on body composition and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 74–81 [肖威, 单洪伟, 马牲, 等. 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 74–81]
- XV H Q, CUI Y H, LI J, *et al.* Effects of cadmium on some biochemical indexes in the serum of *Procambarus clarkii*. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(5): 6–7, 20 [许宏庆, 崔勇华, 李晶, 等. 镉对克氏原螯虾血清中部分生化指标的影响. *水利渔业*, 2006, 26(5): 6–7, 20]
- YAO D, WANG Z, WEI M, *et al.* Analysis of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin interacting proteins reveals its role in hemolymph clotting. *Journal of Proteomics*, 2019, 201: 57–64
- ZANG W L, JIANG M, ZHANG J D, *et al.* The toxic effects of  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NH}_3$ -N on *Macrobrachium rosenbergii* larva. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1996, 5(1): 15–22 [臧维玲, 江敏, 张建达, 等. 亚硝酸盐和氨对罗氏沼虾幼体的毒性. *上海水产大学学报*, 1996, 5(1): 15–22]
- ZHANG Y F, YE C X, WANG A L, *et al.* Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater pawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*, 2015, 24: 1601–1610
- ZHENG J B, MAO Y, SU Y Q, *et al.* Effects of nitrite stress on mRNA expression of antioxidant enzymes, immune-related genes and apoptosis-related proteins in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 58: 239–252
- ZHOU M, WU Z H, LIANG R S, *et al.* Biochemical and cellular immunological responses of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* to cold shock. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 24: 134–139 [周萌, 吴灶和, 梁日深, 等. 急性降温对凡纳滨对虾血液生化指标及细胞免疫指标的影响. *广东农业科学*, 2015, 24: 134–139]

(编辑 马瑾艳)

## Changes in Immune System and Growth Performance of *Litopenaeus vannamei* after 40-Day Challenge with Different Concentrations of Nitrite

FANG Cheng, LI Lanshi, LIANG Zhenyu, CHENG Liangfeng, DAI Xilin<sup>①</sup>

(Shanghai Ocean University, National Experimental Teaching Demonstration Center of Fisheries Science, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Aquatic Animal Genetic Breeding Center Shanghai Collaborative Innovation Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract** After 40 days of exposure to different concentrations of nitrate at a salinity of 5, the effect of nitrite on the immune system and growth performance of *Litopenaeus vannamei* was explored to provide a theoretical basis for constraining the effect of nitrite subacute stress on the species. Five nitrite concentration groups (0.50, 0.90, 1.70, 3.20, and 6.00 mg/L) and a control group (0.05 mg/L) were used in this experiment. Furthermore, we detected the activity of immune-related enzymes, malondialdehyde (MDA) content, and relative expression of immune- and growth-related genes. Results showed that the mortality rate of *L. vannamei* increased with an increasing nitrite concentration, and the weight gain rate (WGR) and length gain rate (LGR) in the 6.00 mg/L group were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), and alkaline phosphatase (AKP) in the serum and hepatopancreas increased under the influence of nitrite in 0.90 and 3.20 mg/L groups. The activity of SOD in the hepatopancreas was significantly higher than those in the control group when the concentration was higher than 0.50 mg/L ( $P<0.05$ ). CAT activities in the 0.50, 0.90, and 1.70 mg/L groups were significantly higher than those in the control group. The activity of SOD and CAT in the serum first decreased, then increased, and then decreased again with an increasing concentration of nitrite. The activities of AKP and ACP in the serum and hepatopancreas in the 0.90 mg/L group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). There was no obvious change in MDA content across groups. In addition, serum glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity was significantly higher in the serum than in the control group ( $P<0.05$ ). The results of quantitative real-time PCR showed that the relative expression of *mn-sod* and *hsp70* genes in the hepatopancreas was significantly higher than that in the control group, except in the 0.50 mg/L concentration group ( $P<0.05$ ). The relative expression of *cat*, *trx*, *tgase*, *trypsin*, and *chitinase* genes in the hepatopancreas was significantly lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). After 40 days of challenge with different concentrations of nitrite, the growth and immune function of *L. vannamei* clearly diminished. The concentration of nitrite should be controlled below 0.50 mg/L in the production process at a salinity of 5 to ensure the healthy farming of *L. vannamei*.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Nitrite; Enzyme activity; Environmental stress

<sup>①</sup> Corresponding author: DAI Xilin, E-mail: xldai@shou.edu.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210310001

http://www.yykxjz.cn/

谢彬, 林志华, 何琳. 颗粒浓度对文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔保留效率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 190-198  
XIE B, LIN Z H, HE L. Effects of particle concentration on the retention efficiency of *Meretrix meretrix*, *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes philippinarum*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 190-198

# 颗粒浓度对文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔保留效率的影响\*



谢彬<sup>1,2</sup> 林志华<sup>2,3</sup> 何琳<sup>2①</sup>

(1. 宁波大学海洋学院 浙江 宁波 315100; 2. 浙江万里学院生物与环境学院  
浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江 宁波 315100;  
3. 浙江万里学院 宁海海洋生物种业研究院 浙江 宁波 315100)

**摘要** 本研究通过在养殖水体中添加底泥或单胞藻调节悬浮颗粒浓度,研究了悬浮物数量浓度和质量浓度变化对文蛤(*Meretrix meretrix*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)保留效率的影响。结果显示,文蛤、硬壳蛤及菲律宾蛤仔的保留效率分别在粒径为 8、6 和 6  $\mu\text{m}$  时达到最大值,分别为 51.1%、59.6%和 62.6%。随着数量浓度的增加,文蛤在低( $4.32 \times 10^7$  cells/L)、中( $5.27 \times 10^7$  cells/L)、高( $6.65 \times 10^7$  cells/L) 3 个数量浓度下保留效率达到最大值时的最小粒径逐渐增大,分别为 9、13 和 14  $\mu\text{m}$ ,保留效率最大值分别降至 49.7%、33.4%和 26.2%;与文蛤相似,菲律宾蛤仔保留效率达到最大值时的最小粒径也分别增大至 9、12 和 14  $\mu\text{m}$ ,但最大保留值无明显变化;硬壳蛤保留效率的最大值保持不变,但达到最大值时的最小粒径略有增大,分别为 8、9 和 10  $\mu\text{m}$ 。随质量浓度的增加,文蛤和菲律宾蛤仔在低(5.7 mg/L)、中(11.8 mg/L)、高(23.3 mg/L) 3 个质量浓度下的保留效率最大值和达到最大值时的最小粒径均无明显变化;硬壳蛤保留效率最大值显著降低,分别为 60.7%、27.6%和 25.5%,但保留效率达到最大值时的最小粒径保持不变。研究表明,文蛤和菲律宾蛤仔的保留效率对食物颗粒数量浓度变化更敏感,而硬壳蛤的保留效率受质量浓度变化影响较大。

**关键词** 悬浮颗粒浓度;保留效率;文蛤;硬壳蛤;菲律宾蛤仔

中图分类号 S968.31 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0190-09

滤食性贝类通过鳃丝和其上纤毛的组合运动将流过鳃部的水中的颗粒物保留下来,被截留下来的颗粒与流过鳃部水中颗粒的比值称为保留效率(retention efficiency)。颗粒保留效率在研究滤食性贝类的营养需求和能量收支时是非常重要的,鳃输送的

水量和颗粒保留效率决定了贝类可利用的食物量。近年来,贝类养殖产业发展迅速,但存在无序放苗、超容量养殖等问题(侯兴等, 2021)。养殖容量是保障贝类养殖绿色可持续发展的重要依据,颗粒保留效率是评估贝类养殖容量的重要参数之一。一些以能量转化

\* 浙江省重点研发计划项目(2019C02054)、宁波市科技富民项目(2015C10008)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系共同资助 [This work was supported by Focus on Research and Development Projects in Zhejiang Province (2019C02054), Ningbo Science and Technology and Enriching Project (2015C10008), China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 谢彬, E-mail: 1660654011@qq.com

① 通信作者:何琳,副教授, E-mail: hlwithyou@qq.com

收稿日期: 2021-03-10, 收修改稿日期: 2021-05-06

为基础的贝类养殖容量估算模型(方建光等, 1996; Officer *et al*, 1982; Dame *et al*, 1997)需要测定滤水率(潘鲁青等, 2002), 而实际中常以清滤率(董世鹏等, 2020; 林元烧等, 2003)来替代滤水率。只有当贝类对滤过水体中颗粒物的保留效率为 100%时, 清滤率才完全等于滤水率, 否则清滤率总是小于滤水率。因此, 可以认为颗粒保留效率决定了养殖容量估算模型参数的准确性, 在养殖容量估算过程中至关重要。

保留效率并不是一成不变的, 也可能受多种环境因子的影响, 特别是与水体中悬浮颗粒物数量以及质量浓度之间的关系尚不完全清楚。数量浓度表示单位体积的水体中所含悬浮颗粒物的数量, 而质量浓度是表示单位体积的水体中所含有机颗粒物的质量。Stenton-Dozey 等(1992)研究发现, 岩池蛤(*Venerupis corrugatus*)保留效率受潮汐影响, 在低潮期对 5~9  $\mu\text{m}$  颗粒的保留率最大, 而在高潮期对 8~13  $\mu\text{m}$  颗粒的保留率最大, 这与颗粒物有机含量变化规律相一致。Maurice (1985)研究报道, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)对粒径>6  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率达到 100%。Barillé 等(1992)研究认为, 长牡蛎保留效率受悬浮颗粒数量浓度影响, 而不受质量浓度的影响。相反, 美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的保留效率只受颗粒食物质量浓度的影响(Palmer *et al*, 1980)。相比之下, 悬浮颗粒物数量浓度和质量浓度均能影响栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的保留效率(Zhang *et al*, 2010)。另有研究显示, 食物颗粒数量浓度增大也会对欧洲食用牡蛎(*Ostrea edulis*)的保留效率产生负面影响(Wilson, 1983)。同时, 有研究认为, 贝类的保留效率与食物颗粒浓度之间没有相关性(Davids, 1964; Hildreth *et al*, 1980)。Lucas 等(1987)比较了生长在不同颗粒浓度环境中紫贻贝(*Mytilus edulis*)的保留效率, 结果显示, 2 个种群的保留效率相同。Zhang 等(2010)研究也表明, 食物颗粒质量浓度波动对紫贻贝的保留效率无明显影响。这些研究表明, 滤食性贝类只能 100%保留特定大小的颗粒, 但不同贝类所能 100%保留的颗粒略有不同, 且对颗粒浓度变化的响应趋势存在很大差异, 尚无一致的规律。

文蛤(*Meretrix meretrix*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是我国沿海地区养殖规模和产量最大的沙质底埋栖型经济贝类。目前, 关于它们的保留效率以及对颗粒食物浓度变化的响应情况尚未见报道。本研究运用流水法测定了文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔对自然海水中不同粒径颗粒物的保留效率, 以及对颗粒质量浓度和数量浓度变化的短期响应趋势, 为滤水率的计算提供更可

靠的计算指标, 从而可以更准确地评估养殖容量。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验生物(菲律宾蛤仔、文蛤和硬壳蛤)购自宁波路林水产品批发市场, 平均壳长分别为(34.0 $\pm$ 2.2), (40.5 $\pm$ 1.3)和(42.8 $\pm$ 2.3) mm。清除表面附着物后, 将其放入 25 $^{\circ}\text{C}$  循环水养殖系统中暂养 2 d, 用于不同条件下保留效率的测定。

自然海水取自宁波市科技创新基地外, 象山港水域, 盐度为 21.0~21.5, 为避免抽水过程中带来的沉积再悬浮颗粒的干扰, 经缓冲槽沉淀 12 h 后再注入蓄水槽。

### 1.2 实验方法

在贝类养殖区域, 悬浮颗粒浓度通常会随着季节变化而改变, 同时, 也极易受到一些外界因素的影响(如暴雨、潮汐等)。为模拟悬浮颗粒浓度条件变化对贝类保留效率的影响, 本实验分为 3 组, 包括了自然海水(natural seawater, NSW), 自然海水+单胞藻(NSW+algae), 自然海水+表层底泥(NSW+silt)。在自然海水中, 通过添加球等鞭藻(*Isochrysis galbana*)调节颗粒的质量浓度, 添加底泥(滩涂区域表层 2 cm 淤泥)调节颗粒的数量浓度(Barillé *et al*, 1992; Zhang *et al*, 2010), 其中, 金藻的直径为 4.4~7.1  $\mu\text{m}$ , 底泥颗粒的直径为 2~20  $\mu\text{m}$ 。根据单胞藻的添加量, 质量浓度可分为低、中、高 3 个浓度级别, 分别用 low-algae、mid-algae 和 high-algae 表示; 根据底泥的添加量, 数量浓度也分为低、中、高 3 个浓度级别, 分别用 low-silt、mid-silt 和 high-silt 表示。流水装置和流水槽参照董世鹏等(2020)进行设计(图 1)。每组设置 15 个流水槽(体积 20 cm $\times$ 5 cm $\times$ 10 cm), 流量设为 1.3 L/h, 其中 10 个实验组, 每个水槽放置 1 只实验贝类; 5 个空白组, 不放实验贝类。各实验组悬浮颗粒的质量浓度和数量详细情况见表 1。质量浓度指标为叶绿素 *a* 的浓度( $C_{\text{Chl.}a}$ )和有机含量[悬浮有机颗粒物浓度(POM)和总悬浮颗粒物浓度(TPM)比, POM/TPM], 3 个质量浓度级别颗粒的叶绿素 *a* 浓度和有机含量分别为 39.3、98.2 和 154.9  $\mu\text{g/L}$ , 25.11%、35.18%和 59.15%; 数量浓度指标为 TPM 和 POM, 3 个数量浓度级别颗粒的 TPM 和 POM 分别为 31.1、56.4 和 79.0 mg/L, 7.4、8.3 和 9.5 mg/L。

为避免生物节律对实验结果的影响, 实验时间一致, 为 07:00~11:00。实验开始时, 选取摄食正常的

个体放入流水槽,为了防止水流、朝向对其摄食行为的影响(Eckman *et al*, 1989),贝类放置的位置、朝向一致,并将流水槽设置在 25℃ 恒温水浴中。实验生物放入水槽中适应 1 h 直到正常摄食,之后每隔 1 h 取 50 mL 流水槽出水处水样(水槽内的水体 1 h 可全部完成替换),共进行 3 次重复取样。使用便携式颗粒计数器(PAMAS S40, 德国)测定颗粒物浓度,该仪器能检测水样中不同粒径颗粒的数量,以此计算不同粒径颗粒的保留效率。

$C_{Chl.a}$  测定采用浮游植物分类荧光仪 Phyto-PAM (Walz, 德国)。TPM 和 POM 的测定方法:将 GF/C 玻璃纤维滤纸(Whatman1822-055, 孔径为 1.2  $\mu\text{m}$ )在 450℃ 条件下灼烧至恒重(6 h),使用电子天平(Sartorius, 精度为 0.1 mg, 德国)称重,记为  $W_0$  (mg);取 300 mL 水样,用经 450℃ 灼烧 6 h 的玻璃纤维滤纸进行抽滤,并用 0.5 mol/L 的甲酸铵漂洗(10 mL),然后,在 60℃ 烘箱中烘干至恒重(48 h)后称重,记为  $W_{60}$  (mg);经 450℃ 灼烧 6 h 后再次称重,记为  $W_{450}$ 。TPM 和 POM 计算公式为:

$$\text{TPM} = W_{60} - W_0$$

$$\text{POM} = W_{450} - W_{60}$$

保留效率(retention efficiency, RE)的计算公式(Cranford *et al*, 1992)为:

$$\text{RE} (\%) = 100\% \times [1 - (C_2/C_1)]$$

式中,  $C_1$  和  $C_2$  分别为空白组和实验组出水处水体中某一粒径悬浮颗粒物的浓度(cells/mL)。

标准保留效率(standardizing retention efficiency, REs)为在一定的粒径范围内,将保留效率最大值视为贝类能够 100% 保留,某一粒径悬浮颗粒物的保留效率与最大值的比值称为标准保留效率(Eckman *et al*,

1989)。

清滤率(clearance rate, CR)的计算公式有 2 种,在流水中采用 Walen (1972)的公式:

$$\text{CR} = F \times [1 - (C_2/C_1)]$$

式中,  $F$  为水槽中水的流速,  $C_1$  和  $C_2$  分别为水槽入水口和出水口处的饵料浓度。由此可得,清滤率的计算公式也可表示为:

$$\text{CR} = F \times \text{RE}$$

## 2 结果

自然海水、自然海水+单胞藻和自然海水+表层底泥各组的质量浓度和数量浓度的详细情况见表 1。如表 1 所示,通过添加不同量的球等鞭金藻来调节悬浮

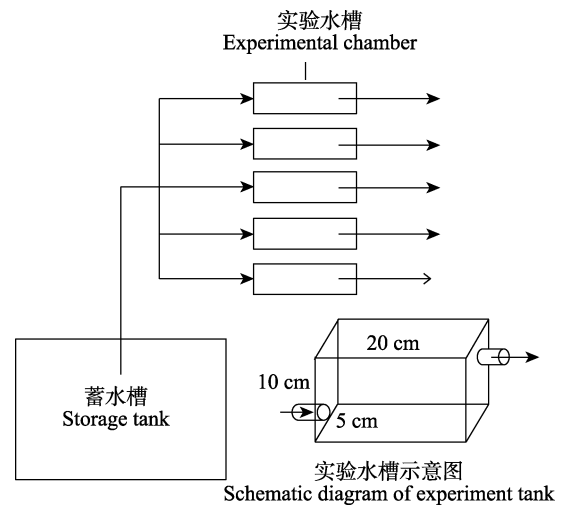


图 1 流水系统模拟图

Fig.1 Schematic diagram of the flow-through experiment system

表 1 各实验组的颗粒食物的质量浓度和数量浓度参数

Tab.1 Summary of dietary characteristics during each measurement of retention efficiencies

实验组 Groups	总悬浮颗粒物浓度 TPM/(mg/L)	悬浮有机颗粒物浓度 POM/(mg/L)	颗粒数量 Particle number/(cells/L)	叶绿素 a 浓度 $C_{Chl.a}$ /( $\mu\text{g/L}$ )	有机含量 POM/TPM /%
低质量浓度 Low-algae	22.7±0.8	5.7±1.2	$3.92 \times 10^7$	39.3	25.11
中质量浓度 Mid-algae	33.7±0.9	11.8±1.2	$4.52 \times 10^7$	98.2	35.18
高质量浓度 High-algae	39.4±2.3	23.3±1.6	$5.43 \times 10^7$	154.9	59.15
自然海水 NSW	21.9±0.6	5.3±0.7	$3.75 \times 10^7$	37.6	24.39
低数量浓度 Low-silt	31.1±2.5	7.4±0.4	$4.32 \times 10^7$	36.2	23.93
中数量浓度 Mid-silt	56.4±0.6	8.3±0.7	$5.27 \times 10^7$	36.8	14.72
高数量浓度 High-silt	79.0±2.3	9.5±0.5	$6.65 \times 10^7$	33.7	12.03

颗粒的质量浓度,其悬浮有机颗粒物浓度和有机含量显著增加( $P<0.05$ ),同时,数量浓度无显著变化( $P>0.05$ );通过添加不同量的底泥来调节悬浮颗粒的数量浓度,其数量浓度显著增加( $P<0.05$ ),有机颗粒物浓度基本保持不变,但有机含量显著降低( $P<0.05$ )。各组别的悬浮颗粒分布情况如图 2 所示,粒径 $>20\ \mu\text{m}$ 的颗粒的数量非常少。在自然海水中,颗粒浓度一般随粒径增大而逐渐减小,但直径为  $4\ \mu\text{m}$  颗粒的浓度高于粒径为  $3\ \mu\text{m}$  的颗粒。不同数量浓度条件下的颗粒分布规律与自然海水中颗粒分布规律相似,添加底泥能够增加  $2\sim 19\ \mu\text{m}$  范围内所有颗粒的浓度;添加单胞藻调节食物颗粒质量浓度仅能改变  $4\sim 8\ \mu\text{m}$  颗粒的浓度,对其他直径颗粒的浓度几乎没有影响。

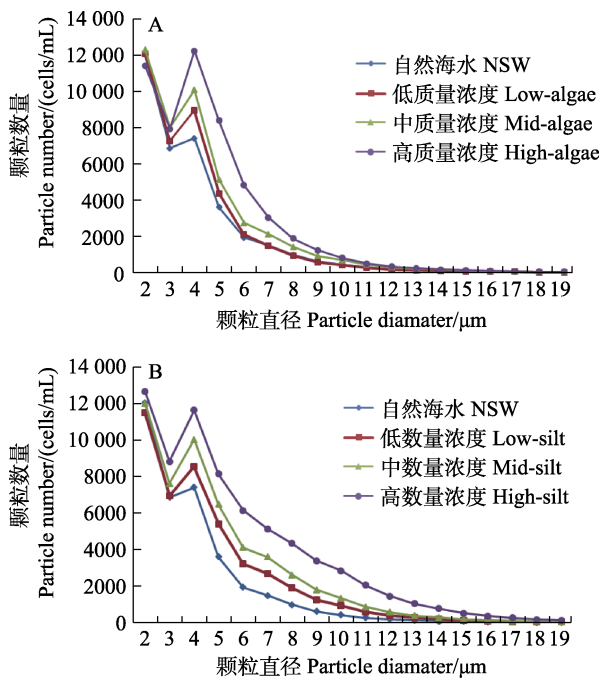


图 2 自然海水+单胞藻和自然海水+底泥各组别的粒径分布情况

Fig.2 Particle size frequency distribution in different experimental diets

A: 自然海水+单胞藻; B: 自然海水+底泥  
A: NSW+algae; B: NSW+silt

### 2.1 自然海水中文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔的保留效率

在自然海水中,文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔的保留效率随颗粒粒径的增大逐渐增加,分别在粒径为  $8\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$  和  $6\ \mu\text{m}$  时,保留效率达到最大值,最大保留效率分别为  $51.1\%$ 、 $59.6\%$  和  $62.6\%$ ,且不再随颗粒的增大而增加。与其他 2 种贝类相比,菲律宾蛤仔对小

颗粒悬浮物的保留效率较高,其对直径  $2\ \mu\text{m}$  颗粒的保留效率为  $26.7\%$ ,相对应的标准保留效率(REs)为  $42.9\%$ ,文蛤和硬壳蛤对  $2\ \mu\text{m}$  颗粒的保留效率分别为  $9.9\%$  和  $14.6\%$ ,REs 分别为  $18.8\%$  和  $24.4\%$ ;对于粒径  $4\ \mu\text{m}$  的颗粒,文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔对其保留率分别为  $29.5\%$ 、 $42.3\%$  和  $49.4\%$ ,相对应的 REs 分别为  $55.9\%$ 、 $70.7\%$  和  $79.4\%$  (图 3)。

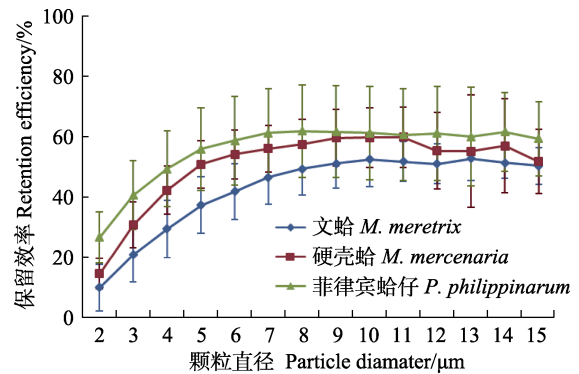


图 3 文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔在自然海水中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig.3 Retention efficiency of *M. meretrix*, *M. mercenaria* and *R. philippinarum* for different particle sizes in natural seawater (NSW)

### 2.2 文蛤在不同颗粒食物条件下的保留效率

文蛤在不同数量浓度和质量浓度条件下的保留效率分别见图 4 和图 5。结果显示,文蛤的保留效率因数量浓度和质量浓度的改变而发生相应的变化。随着数量浓度的增加,文蛤的保留效率逐渐减小,其中  $2\ \mu\text{m}$  颗粒的保留效率由自然海水中的  $9.9\%$  降至添加底泥组的  $-7.8\%\sim -3.9\%$ 。自然海水+底泥实验组中 low-silt、mid-silt 及 high-silt 3 个数量浓度的最大保留效率由自然海水中的  $51.3\%$  分别降至  $49.7\%$ 、 $33.8\%$

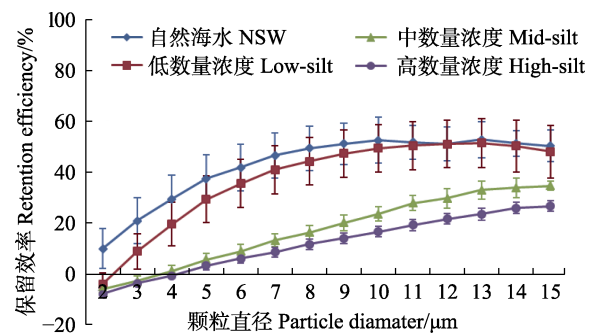


图 4 文蛤在自然海水+底泥实验组 3 个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig.4 Retention efficiency of *M. meretrix* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-silt)

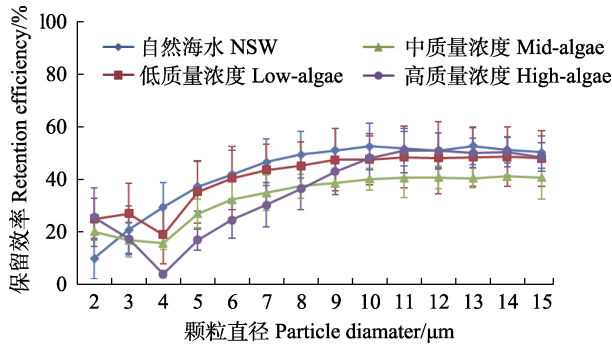


图5 文蛤在自然海水+单胞藻实验组3个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig.5 Retention efficiency of *M. meretrix* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-algae)

和26.2%。同时,保留效率达到最大值时的颗粒粒径也由自然海水中的8  $\mu\text{m}$  分别增至9、13和14  $\mu\text{m}$ 。

在自然海水+单胞藻实验组的 low-algae 条件下,悬浮颗粒的数量浓度和质量浓度变化较小,但保留效率变化明显。与自然海水组相比,文蛤的最大保留效率基本保持不变(由自然海水组的51.3%降为47.8%),达到保留效率最大值的颗粒粒径也由8  $\mu\text{m}$  略微增大至9  $\mu\text{m}$ ;此外,在颗粒粒径为4  $\mu\text{m}$  处有一小的低值,其标准保留效率为39.1%。

在 mid-algae 条件下,悬浮颗粒的质量浓度指标显著增加,  $C_{\text{Chl.}a}$  由自然海水中的37.6  $\mu\text{g/L}$  增至98.6  $\mu\text{g/L}$ ,有机含量也由22.86%增至33.81%。文蛤保留效率的响应趋势与 low-algae 组相近,颗粒粒径为4  $\mu\text{m}$  处仍有一低值,标准保留效率为38.2%;不同之处在于,保留效率最大值略有降低,由47.8%降至40%,保留效率达到最大值时的颗粒粒径由9  $\mu\text{m}$  增至10  $\mu\text{m}$ 。

在 high-algae 条件下,悬浮颗粒的数量浓度也明显提高,数量浓度指标 TPM 由21.9  $\text{mg/L}$  升至45.8  $\text{mg/L}$ 。文蛤对粒径4  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率显著降低( $P < 0.05$ ),有非常明显的谷值(图4),保留效率为4%,相对应的标准保留效率仅为7.8%,达到保留效率最大值的颗粒粒径继续增大到11  $\mu\text{m}$ ,但保留效率最大值无显著变化( $P > 0.05$ ),最大保留率为50.6%。

### 2.3 硬壳蛤在不同颗粒食物条件下的保留效率

硬壳蛤在自然海水+底泥组和自然海水+单胞藻组的保留效率分别见图6和图7。在添加底泥条件下,硬壳蛤的保留效率随颗粒粒径的增大而逐渐增大,达到峰值后随颗粒的继续增大而逐渐减小, low-silt、mid-silt 和 high-silt 3个浓度下硬壳蛤保留效率的最大值无显著差异( $P > 0.05$ ),分别为57.4%、58.2%和

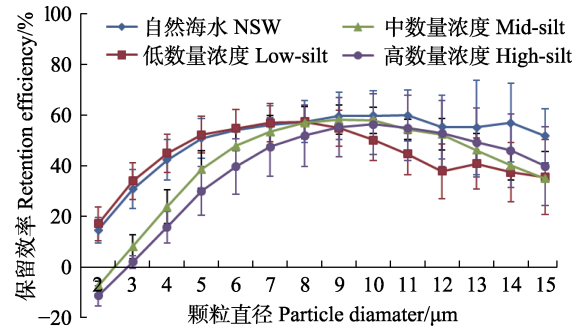


图6 硬壳蛤在自然海水+底泥实验组3个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig.6 Retention efficiency of *M. mercenaria* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-silt)

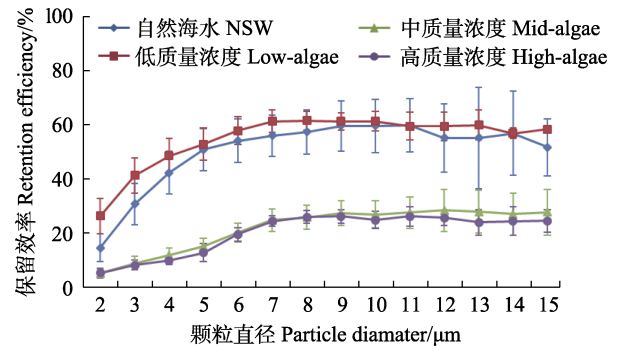


图7 硬壳蛤在自然海水+单胞藻实验组3个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig.7 Retention efficiency of *M. mercenaria* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-algae)

56.4%,相对应的保留效率达到最大时的颗粒粒径分别为8、9和10  $\mu\text{m}$ 。硬壳蛤在不同质量浓度条件下的保留效率的差异在于小颗粒物的保留率随底泥添加量的增加而降低,例如, mid-silt 实验组和 high-silt 实验组中粒径2  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率由 low-silt 实验组的17.1%分别降至-7.7%和-11.2%。

硬壳蛤的保留效率受质量浓度影响较大,随单胞藻添加量的增加,其保留效率最大值显著降低( $P < 0.05$ )。low-algae 实验组保留效率最大值为60.7%,而 mid-algae 实验组保留效率最大值骤降至27.6%, high-algae 实验组保留效率的最大值与 mid-algae 实验组相近,为25.5%。但3个浓度级别下保留效率达到最大值时的颗粒粒径相同,均为7  $\mu\text{m}$ 。另外,在任何浓度条件下,硬壳蛤的保留效率在达到最大值之前都随颗粒增大而增大,不存在谷值。

### 2.4 菲律宾蛤仔在不同颗粒食物条件下的保留效率

菲律宾蛤仔的保留效率对数量浓度变化的响应趋势与文蛤相似,随数量浓度的增加,小颗粒物的保

留效率逐渐减小,保留效率达到最大值时的颗粒粒径逐渐增大, low-silt、mid-silt 和 high-silt 3 个实验组保留效率达到最大值时的颗粒粒径分别为 9、12 和 14  $\mu\text{m}$ 。不同之处在于, 菲律宾蛤仔保留效率的最大值不随数量浓度变化而改变, 分别为 56.4%、59.8%和 55.0% (图 8)。

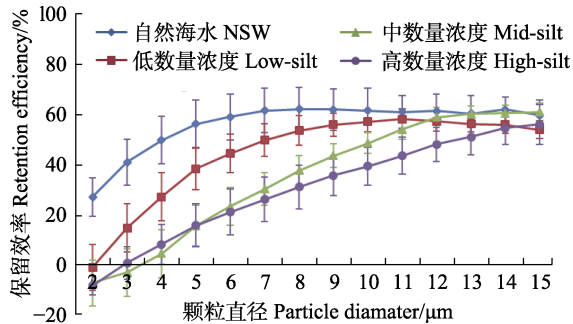


图 8 菲律宾蛤仔在自然海水+底泥实验组 3 个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig. 8 Retention efficiency of *R. philippinarum* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-silt)

菲律宾蛤仔的保留效率也因质量浓度的变化发生一定的改变, 主要体现在对小颗粒物的保留效率方面。例如, 随质量浓度的增加, 粒径 2~3  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率不断增加, low-algae、mid-algae 和 high-algae 实验组的保留效率分别为 55%、60%和 67%, 其中 high-algae 实验组中粒径 3  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率已经接近保留效率最大值 (REs 为 88%)。然而, 保留效率并不随颗粒的增大而逐渐增大, 在粒径 4~5  $\mu\text{m}$  处会出现一个谷值, 这一点与文蛤非常相似, 不同的是菲律宾蛤仔在 high-algae 实验组中的谷值点在 5  $\mu\text{m}$  处, 当然粒径 4  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率也非常低, 与 5  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率无显著差异 ( $P>0.05$ , 图 9)。质量浓度的

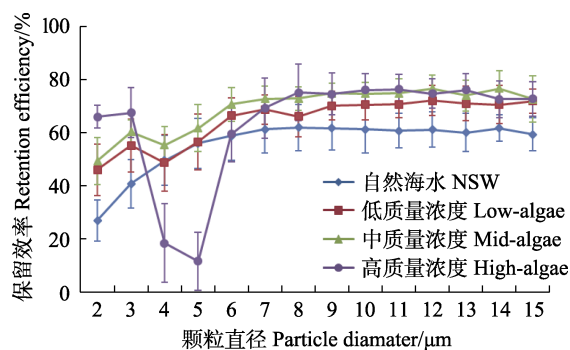


图 9 菲律宾蛤仔在自然海水+单胞藻实验组 3 个浓度级别中对不同粒径颗粒的保留效率

Fig. 9 Retention efficiency of *R. philippinarum* for different particle sizes in three experimental diets (low-, mid- and high-algae)

改变对菲律宾蛤仔保留效率达到最大值时的颗粒粒径影响并不明显, 分别为 7、7 和 8  $\mu\text{m}$ 。

### 3 讨论

研究发现, 滤食性贝类会因水体中悬浮颗粒物数量浓度和质量浓度(有机含量)的波动而改变他们的摄食行为。为适应水体中颗粒浓度的变化, 不同物种对摄食过程有不同的调控机制, 包括调节摄食的持续时间和速率、产生假粪、选择性摄食及改变保留效率等 (Hawkins *et al.*, 1990; Bayne *et al.*, 1993)。

本研究结果显示, 悬浮颗粒数量浓度变化能够显著地影响文蛤和菲律宾蛤仔的保留效率, 而质量浓度变化对它们保留效率的影响较小, 与长牡蛎、紫贻贝相似 (Barillé *et al.*, 1993; Riisgård, 1988)。随着数量浓度的增加, 保留效率最大值逐渐降低, 并且达到最大值时的颗粒粒径也增大。不仅如此, 文蛤和菲律宾蛤仔对小颗粒的保留效率也逐渐减小, 甚至为负值。宋强等 (2006) 研究表明, 沉积再悬浮颗粒形成的高浓度浊液会对滤食性贝类的摄食行为产生一定的负面影响, 其中包括了滤水率和摄食率等。Jørgensen (1974) 研究也发现, 贻贝对 1.1~2.8  $\mu\text{m}$  颗粒常出现负保留的现象, 这是一种非正常状态, 可能有点原因: (1) 在摄食过程中, 纤毛摆动将大颗粒拍碎而产生了更多的小颗粒。(2) 高浓度的悬浮颗粒刺激贝类产生大量的假粪, 使测定的颗粒物中包含了假粪颗粒, 影响了数据的测定和数值的计算。

另外, 虽然悬浮颗粒质量浓度变化对文蛤和菲律宾蛤仔的保留效率的影响较小, 但自然海水+单胞藻实验组中的 4~5  $\mu\text{m}$  颗粒的保留效率仍出现明显的谷值, 同时, 保留效率达到最小值的最小粒径也移动到更大的尺寸。保留效率出现谷值很可能是因为添加单胞藻导致粒径 4~5  $\mu\text{m}$  颗粒的数量大幅度上升, 从而导致了保留效率的降低, 也恰好证明了颗粒数量浓度增加将会导致保留效率降低。悬浮颗粒数量浓度增加导致贝类保留效率降低, 意味着当养殖水体中某一微藻或某些粒径相近的颗粒食物的数量超过一定浓度时, 贝类只能保留一部分颗粒, 其余颗粒随水流排出无法被利用, 浓度过高甚至会抑制贝类的摄食。生产中, 可通过增加饵料丰度、循环利用含有高浓度食物颗粒的水体等方法来促进贝类生长、提高养殖效益。

相比之下, 硬壳蛤对悬浮颗粒质量浓度变化更加敏感, 不仅小颗粒的保留效率因颗粒浓度而改变, 最大保留效率也随浓度变化而改变, 但保留效率达到最大值时的颗粒粒径保持不变。因为一些双壳贝类可能

通过调整摄食行为来适应环境中食物颗粒浓度的变化以满足生长需求(Bayne *et al.*, 1987)。一方面, 当悬浮颗粒浓度较低时, 贝类会增强过滤能力以满足能量需求; 另一方面, 可能为了避免过量摄食, 高浓度下贝类会减小滤水量或保留效率。为满足不同时期的能量需求, 贝类可能通过调整鳃的形态结构来影响保留效率。Honkoop 等(2003)研究发现, 长牡蛎鳃的形态在较长的时间尺度内随时间而变化, 而悬浮颗粒浓度也随时间而变化。Barillé 等(2000)研究也发现, 法国大西洋沿岸高浊度地区的牡蛎比低浊度地区的牡蛎有更少的纤毛和更大的唇瓣。可能正是这种鳃的形态可塑性使贝类具有通过改变保留效率来适应环境中悬浮颗粒浓度变化的能力。本研究中, 硬壳蛤的保留效率对食物颗粒浓度变化做出的反应与文蛤和菲律宾蛤仔完全不同, 也可能是三者鳃结构的差异所导致的。

在常用的滤水率测定方法中, 必须考虑贝类对食物颗粒的保留效率, 以便增加实验结果的可靠性。Williams (1982)研究证明, 颗粒保留效率达到 100% 时的粒径是计算滤水率十分重要的参数, 取不同粒径值, 计算的滤水率有显著差异。本研究也发现, 文蛤、硬壳蛤和菲律宾蛤仔 3 种贝类取不同粒径保留值计算得到的滤水率存在显著差异。例如, 在自然海水中, 文蛤以粒径为 2  $\mu\text{m}$  和大于 8  $\mu\text{m}$  颗粒(保留效率已达到最大值)的保留效率计算的滤水率分别为 0.13 和 0.66 L/h, 相差 5 倍; 硬壳蛤和菲律宾蛤仔取不同粒径保留值计算的滤水率之间的差距也可达到 2~4 倍。因此, 在测定滤水率时, 不能以全部悬浮颗粒的浓度变化作为计算指标, 应当以保留效率最大的颗粒的浓度变化作为计算指标, 更能反映滤水率的真实情况。然而, 实验贝类的保留效率达到最大值时的颗粒粒径因悬浮颗粒质量浓度或数量浓度的变化而改变, 变化幅度在 6~14  $\mu\text{m}$  内, 故悬浮颗粒浓度变化会对滤水率的计算产生较大的影响, 应根据颗粒浓度变化选择合适的颗粒用于测定滤水率。

在基于滤水率的贝类养殖容量估算模型中, 滤食性贝类滤水率的测定至关重要。若以清滤率直接替代滤水率或由于计算指标选择不合理导致的滤水率偏小, 估算的养殖容量将会偏大。例如, 李磊等(2014)利用方建光贝类养殖容量估算模型、营养动态模型和 Tait 沿岸海域能流分析模型估算了文蛤在滩涂的养殖容量, 数据显示, 方建光贝类养殖容量估算模型的结果显著高于其他 2 种模型, 分别为 34 623.90、15 528.45 和 25 949.10  $\text{kg}/\text{hm}^2$ , 且由于浮游动物对初级生产力的消耗, 方建光模型估算出来的贝类养殖容量数值偏大。当然, 这也并不意味着其他 2 种模型估算的结果

就十分准确。杨淑芳等(2016)利用营养动态模型、Tait 沿岸海域能流分析模型估算的菲律宾蛤仔的养殖容量同样大于实际养殖容量。因此, 在测定模型参数时, 应充分考虑食物颗粒的保留效率对测定滤水率的影响, 通过提高滤水率测定方法的客观性和准确性对养殖容量估算模型进行修正, 提升养殖容量评估方法的准确性和适用性。

## 参 考 文 献

- BARILLÉ L, HAURE J, COGNIE B, *et al.* Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, 57(4): 837–843
- BARILLÉ L, PROU J, HÉRAL M, *et al.* No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1993, 171(1): 91–106
- BARILLÉ L, PROU J, HÉRAL M, *et al.* Retention efficiency in oyster *Crassostrea gigas* exposed to variable food quantity and quality. *Ifremer*, 1992, 8: 57–87
- BAYNE B L, HAWKINS A J S, NAVARRO E. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1987, 111(1): 1–22
- BAYNE B L, IGLESIAS J I P, HAWKINS A J S, *et al.* Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: Responses to variations in quantity and organic content of the seston. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1993, 73(4): 813–829
- Cranford P J, Gordon Jr D C. The influence of dilute clay suspensions on sea scallop (*Placopecten magellanicus*) feeding activity and tissue growth. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1992, 30: 107–120
- DAME R F, PRINS T C. Bivalve carrying capacity in coastal ecosystems. *Aquatic Ecology*, 1997, 31(4): 409–421
- DAVIDS C. The influence of suspensions of microorganisms of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Netherlands Journal of Sea Research*, 1964, 2(2): 233–249
- DONG S P, LIN F, JIANG W W, *et al.* Estimation of carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay based on spatial and temporal distribution of chlorophyll *a*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 100–107 [董世鹏, 蔺凡, 姜妮妮, 等. 基于叶绿素 *a* 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 100–107]
- Eckman J E, Peterson C H, Cahalan J A. Effects of flow speed, turbulence, and orientation on growth of juvenile bay

- scallops *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1989, 132(2): 123–140
- FANG J G, KUANG S H, SUN H L, *et al.* Study on the carrying capacity of Sanggou Bay for the culture of scallop *Chlamys farreri*. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 18–31 [方建光, 匡世煥, 孙慧玲, 等. 桑沟湾栉孔扇贝养殖容量的研究. *海洋水产研究*, 1996, 17(2): 18–31]
- HAWKINS A J S, NAVARRO E, IGLESIAS J I P. Comparative allometries of gut-passage time, gut content and metabolic faecal loss in *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*. *Marine Biology*, 1990, 105(2): 197–204
- HILDRETH D I, MALLET A. The effect of suspension density on the retention of 5  $\mu\text{m}$  diatoms by the *Mytilus edulis* gill. *Biological Bulletin*, 1980, 158(3): 316–323
- HONKOOP P J C, BAYNE B L, DRENT J. Flexibility of size of gills and palps in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) and the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 282(1/2): 113–133
- HOU X, GAO Y P, DU M R, *et al.* Temporal and spatial variation in phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 18–27 [侯兴, 高亚平, 杜美荣, 等. 桑沟湾浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 18–27]
- JØRGENSEN B C. On gill function in the mussel *Mytilus edulis* L.. *Ophelia*, 1974, 13(1/2): 187–232
- LI L, JIANG M, SHENG X Q, *et al.* Culture capacity of *Meretrix meretrix* in mud flats of Rudong, Jiangsu province. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(5): 752–756 [李磊, 蒋玫, 沈新强, 等. 江苏如东滩涂文蛤养殖区养殖容量. *海洋环境科学*, 2014, 33(5): 752–756]
- LIN Y S, CAO W Q, LUO W X, *et al.* Experimental studies on filtration rates in four species of suspension feeding bivalves. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(1): 86–92 [林元烧, 曹文清, 罗文新, 等. 几种主要养殖贝类滤水率的研究. *海洋学报*, 2003, 25(1): 86–92]
- LUCAS M I, NEWELL R C, SHUMWAY S E, *et al.* Particle clearance and yield in relation to bacterioplankton and suspended particulate availability in estuarine and open coast populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 1987, 36(3): 215–224
- MAURICE H. Evaluation of the carrying capacity of molluscan shellfish ecosystems. International seminar for research on planning and development aids to the shellfish industry. International Seminar in La Rochelle (France), 1985, 297–318
- OFFICER C B, SMAYDA T J, MANN R. Benthic filter feeding: A natural eutrophication control. *Marine Ecology Progress Series*, 1982, 9(2): 203–210
- PALMER R E, WILLIAMS L G. Effect of particle concentration on filtration efficiency of the bay scallop *Argopecten irradians* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Ophelia*, 1980, 19(2): 163–174
- PAN L Q, FAN D P, MA S, *et al.* Influence of environmental factors on the filtration rate of *Sinonovacula constricta*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 226–230 [潘鲁青, 范德朋, 马牲, 等. 环境因子对缢蛭滤水率的影响. *水产学报*, 2002, 26(3): 226–230]
- RIISGÅRD H. Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast American bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, 1988, 45(3): 217–223
- SONG Q, FANG J G, LIU H, *et al.* Studies on the effects of suspended sediment on the feeding physiology of three suspension-feeding bivalves. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(4): 21–28 [宋强, 方建光, 刘慧, 等. 沉积再悬浮颗粒物对3种滤食性贝类摄食生理的影响. *海洋水产研究*, 2006, 27(4): 21–28]
- STENTON-DOZEY J M E, BROWN A C. Clearance and retention efficiency of natural suspended particles by the rock-pool bivalve *Venerupis corrugatus* in relation to tidal availability. *Marine Ecology Progress Series*, 1992, 82(2): 175–186
- WALEN P R. The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1972, 52(2): 345–374
- WILLIAMS L G. Mathematical analysis of the effects of particle retention efficiency on determination of filtration rate. *Marine Biology*, 1982, 66(2): 171–177
- WILSON J H. Retention efficiency and pumping rate of *Ostrea edulis* in suspensions of *Isochrysis galbana*. *Marine Ecology Progress Series*, 1983, 12(1): 51–58
- YANG S F, ZHANG L, YAN X Z. Estimation of carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) culture pond in Houhai reclamation area of Putian City, China. *Environmental Science Survey*, 2016, 35(6): 30–34 [杨淑芳, 张磊, 阎希柱. 莆田后海垦区菲律宾蛤仔养殖池养殖容量的估算. *环境科学导刊*, 2016, 35(6): 30–34]
- ZHANG J H, FANG J G, LIANG X M. Variations in retention efficiency of bivalves to different concentrations and organic content of suspended particles. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 10–17



## Effects of Particle Concentration on the Retention Efficiency of *Meretrix meretrix*, *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes philippinarum*

XIE Bin<sup>1,2</sup>, LIN Zhihua<sup>2,3</sup>, HE Lin<sup>2①</sup>

(1. College of Marine Sciences, NingBo University, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang Province, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 3. Ninghai Institute of Mariculture Seeds Industry, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

**Abstract** In this study, the retention efficiency (RE) of *Meretrix meretrix*, *Mercenaria mercenaria*, and *Ruditapes philippinarum* were measured by adding sediment or unicellular algae to adjust the concentration of suspended particles. The results showed that in natural seawater, the RE of *M. meretrix*, *M. mercenaria*, and *R. philippinarum* reached maximum retention when the particle sizes were 8  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , and 6  $\mu\text{m}$ , which were 51.1%, 59.6%, and 62.6%, respectively. With an increase in particle number concentration, the minimum particle sizes for maximal retention in *M. meretrix* shifted to approximately 9  $\mu\text{m}$ , 13  $\mu\text{m}$ , and 14  $\mu\text{m}$  in low ( $4.32 \times 10^7$  cells/L), mid ( $5.27 \times 10^7$  cells/L) and high ( $6.65 \times 10^7$  cells/L) particle number concentration, respectively. The relative standardized RE decreased to 49.7%, 33.4%, and 26.2%. As in *M. meretrix*, the minimum particle sizes for maximal retention in *R. philippinarum* shifted from 6  $\mu\text{m}$  to 9  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , and 14  $\mu\text{m}$  with the change in particle number concentration, but the change in maximal retention was not significant. The change in maximal retention in *M. mercenaria* was not significant; however, the minimum particle sizes for maximal retention shifted to approximately 8  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , and 10  $\mu\text{m}$ , respectively. With the increase in particle concentration, the change in maximal retention and minimum particle size for maximal retention was not significant in three different particle concentration, low (5.7 mg/L), mid (11.8 mg/L) and high (23.3 mg/L), retention of *M. mercenaria* changed significantly, 60.7%, 27.6%, and 25.5%, respectively. The results indicate that the RE of *M. meretrix* and *R. philippinarum* were more sensitive to particle concentration, while the RE of *M. mercenaria* was more sensitive to organic content.

**Key words** Suspended particle concentration; Retention efficiency; *Meretrix meretrix*; *Mercenaria mercenaria*; *Ruditapes philippinarum*

① Corresponding author: HE Lin, E-mail: hlwithyou@qq.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210514002

http://www.yykxjz.cn/

李晋祯, 郑惠娜, 任鼎鼎, 杨文, 曹文红, 林海生, 秦小明, 章超桦. 2 种塔形马蹄螺肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 199–207

LI J Z, ZHENG H N, REN D D, YANG W, CAO W H, LIN H S, QIN X M, ZHANG C H. Analysis and quality evaluation of nutrient components in the muscles of *Tectus pyramis*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 199–207

## 2 种塔形马蹄螺肌肉营养成分分析与品质评价\*

李晋祯<sup>1</sup> 郑惠娜<sup>1,2,3,4</sup> 任鼎鼎<sup>1</sup> 杨文<sup>1</sup> 曹文红<sup>1,2,3,4</sup>  
林海生<sup>1,2,3,4</sup> 秦小明<sup>1,2,3,4</sup> 章超桦<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学深圳研究院 广东 深圳 518108;  
3. 国家贝类加工技术研发分中心(湛江) 广东省水产品加工与安全重点实验室 广东省海洋生物制品工程实验室  
广东 湛江 524088; 4. 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 大连工业大学 辽宁 大连 116034)

**摘要** 为分析深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺(*Tectus pyramis*)的营养成分与品质,采用国标法检测了 2 种塔形马蹄螺肌肉的基本营养成分、氨基酸组成、脂肪酸组成及部分矿物元素含量,氨基酸评价采用氨基酸评分、化学评分和必需氨基酸指数方法。结果显示,海南琼海捕捞的塔形马蹄螺肌肉灰分含量显著高于深圳大鹏湾海域,其他基本营养成分无显著差异( $P>0.05$ );深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺肌肉总氨基酸含量分别为(18.45±0.13)和(18.83±0.03) g/100g,必需氨基酸含量均高于 27%,支链氨基酸含量超过 13%,鲜味氨基酸含量为 55%。2 种塔形马蹄螺肌肉多不饱和脂肪酸含量均>48%,其中,深圳大鹏湾塔形马蹄螺亚油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)含量显著高于海南琼海海域,且 DHA+EPA 含量高达 11.79%。检测的 3 种矿物元素中,含量最高的均是常量元素钙(Ca),微量元素铁(Fe)次之,最低的是微量元素锌(Zn),且海南琼海塔形马蹄螺肌肉的 Ca 和 Zn 含量显著高于深圳大鹏湾海域。研究表明,2 种塔形马蹄螺蛋白含量高,多不饱和脂肪酸含量丰富,肌肉营养价值高,具有很大的开发潜力,研究数据为进一步开发利用岛礁海域新型螺类食品提供参考。

**关键词** 塔形马蹄螺; 营养组分; 氨基酸; 脂肪酸; 矿物元素; 品质评价

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0199-09

塔形马蹄螺(*Tectus pyramis*)是一种珍贵的海洋软体动物,属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目

(Archaeogastropoda)、马蹄螺科(Trochidae) (Shi *et al.*, 2019),广泛分布于中国深圳大鹏湾、海南琼海、西沙和南沙群岛的珊瑚礁生态系统中(黄景等, 2020),

\* 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2021 KJ146)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目、深圳市大鹏新区科技创新和产业发展专项资金资助项目(KJYF202101-07)和国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2020YFD091102)共同资助 [This work was supported by the Guangdong Province Modern Agricultural Industry Technology System Innovation Team Construction Project (2021KJ146), China Agriculture Research System of MOF and MARA, Special Funds for Science Technology Innovation and Industrial Development of Shenzhen Dapeng New District (KJYF202101-07), and the National Key Research and Development Program “Blue Granary Technology Innovation” Key Special Project (2020YFD091102)]. 李晋祯, E-mail: lijzgdou@163.com

① 通信作者: 郑惠娜, 教授, E-mail: zhenghn@gdou.edu.cn

收稿日期: 2021-05-14, 收修改稿日期: 2021-06-07

以藻类为食,主要生活在暖水区潮间带下区至海水深度约 10 m 的浅海岩石或珊瑚礁上(李芳远等, 2008)。塔形马蹄螺肌肉肉质鲜美,营养价值高,其贝壳可作装饰,贝壳粉可作药用或喷漆辅料(陈傅晓等, 2015)。塔形马蹄螺是南方沿海重要的经济贝类,在水产养殖和礁石生态系统中都发挥着重要作用。

近年来,塔形马蹄螺研究主要集中在群体遗传结构及多样性(黄景等, 2020)、生殖系统组织学(李芳远等, 2008)、食性分析(周天成等, 2020)等方面,对其营养成分分析及品质评价尚未见报道。国内仅见海南省海洋与渔业科学院一直进行的塔形马蹄螺人工育苗相关研究,但关于塔形马蹄螺的人工催产、苗种繁殖、生长发育等技术仍待进一步优化及完善(陈傅晓等, 2015)。此外,深圳大鹏湾的海域渔业资源非常丰富,是深圳市目前最重要的海水增殖区之一(庄晓珊等, 2018)。本研究团队在深圳大鹏湾和海南琼海 2 个不同的海域珊瑚礁附近发现塔形马蹄螺资源,为了进一步的合理开发利用,本研究通过对深圳大鹏湾和海南琼海的塔形马蹄螺肌肉进行营养成分分析及品质评价比较,分析 2 种不同海域塔形马蹄螺的营养价值,以期为进一步开发利用岛礁螺类海洋食品提供参考,同时,对塔形马蹄螺水产养殖产业起到积极的促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

塔形马蹄螺分别于广东省深圳大鹏湾和海南省琼海 2 个海域的珊瑚礁上采集,采样时间为 2020 年 10 月,采样个体高约 5.7~6.0 cm,宽约 5.0~5.5 cm,样品冰鲜状态下运至广东海洋大学国家贝类加工技术研发分中心(湛江),用蒸馏水清洗去壳后的肌肉,置于-80℃冰鲜贮藏备用。

### 1.2 营养成分的测定

根据食品安全国家标准方法对塔形马蹄螺肌肉基本营养成分进行测定,其中,水分含量根据 GB 5009.3-2016 中直接干燥法进行测定,粗灰分含量根据 GB 5009.4-2016 中的食品中总灰分的测定进行,粗蛋白含量根据 GB 5009.4-2016 中凯氏定氮法进行测定,粗脂肪含量根据 GB 5009.6-2016 中的酸水解法进行测定,总糖含量根据 GB 5009.8-2016 中酸水解-莱因-埃农氏法进行测定。

氨基酸组成及含量参考 GB 5009.124-2016 中的酸水解法,使用氨基酸分析仪(日立 LA8080,日本)

测定肌肉中 16 种氨基酸含量。脂肪酸组成及含量参考 GB 5009.168-2016 中的外标法,使用安捷伦气相色谱仪(Agilent GC 7820A)测定肌肉中 16 种脂肪酸含量。矿物元素参考 GB 5009.268-2016,其中,微量元素 Fe 和 Zn 含量使用安捷伦电感耦合等离子体质谱仪(Agilent 7900 型 ICP-MS)进行测定,常量元素 Ca 含量使用电感耦合等离子体发射光谱仪(Agilent 725 型 ICP-OES)。

### 1.3 塔形马蹄螺肌肉氨基酸品质评价方法

氨基酸的品质评价根据联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)提出的氨基酸计分模式以及中国预防医学科学营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白模式进行(邹朝阳等, 2019)。氨基酸评分(amino acid score, AAS)、化学评分(chemical score, CS)和必需氨基酸指数(EAAI)根据公式(1)、(2)、(3)进行计算。

$$AAS = \frac{aa}{AA(FAO/WHO)} \quad (1)$$

$$CS = \frac{aa}{AA(egg)} \quad (2)$$

EAAI =

$$\sqrt[n]{\left(\frac{aa_1}{AA(egg)_1} \times 100\right) \left(\frac{aa_2}{AA(egg)_2} \times 100\right) \cdots \left(\frac{aa_n}{AA(egg)_n} \times 100\right)} \quad (3)$$

式中, aa 为马蹄螺肌肉每克蛋白质某种氨基酸含量(mg/g), AA(FAO/WHO)为 FAO/WHO 标准模式中对应 aa 的同种氨基酸含量(mg/g), AA(egg)为全鸡蛋蛋白中对应 aa 的同种氨基酸含量(mg/g), n 为参与计算的必需氨基酸总个数, aa<sub>n</sub> 为马蹄螺肌肉每克蛋白质各种必需氨基酸含量(mg/g), AA(egg)<sub>n</sub> 为全鸡蛋蛋白中相对应的必需氨基酸含量(mg/g)。

### 1.4 数据统计

采用 Excel 2019 软件进行数据统计,结果使用平均值±标准差(Mean±SD)表示,两组间的显著性差异分析采用 SPSS 26.0 软件独立样本 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 基本营养成分

由表 1 可知,海南琼海采集的塔形马蹄螺肌肉灰分含量显著高于深圳大鹏湾采集的( $P < 0.05$ ),肌肉中粗蛋白含量略高于深圳大鹏湾采集的( $P < 0.05$ ),水分含量和粗脂肪含量与深圳大鹏湾区采集的样品相比无显著性差异( $P > 0.05$ ),2 种海湾采集的马蹄螺肌肉

中的总糖含量均低于 0.24%。

### 2.2 氨基酸组成及营养价值评价

在深圳大鹏湾、海南琼海 2 个不同海域采集到的塔形马蹄螺肌肉中, 均能检测出 16 种氨基酸(表 2), 氨基酸总含量分别为(18.45±0.13)和(18.84±0.03) g/100 g, 总必需氨基酸含量分别占总氨基酸含量的 27.53%和 28.63%, 2 种塔形马蹄螺肌肉的亮氨酸含量既是必需氨基酸中含量最高的, 也是支链氨基酸中含量最高的, 且总支链氨基酸分别占总氨基酸含量的均高于 13%, 总鲜味氨基酸含量均占总氨基酸含量的 55%以上。在测定的 16 种氨基酸中, 深圳大鹏湾和海南琼海的塔形马蹄螺肌肉中谷氨酸含量最多, 分别为(3.15±0.03)和(3.28±0.02) g/100 g, 而组氨酸的含量最低。

按照氨基酸评分标准, 将表 2 中的氨基酸含量换算成每克蛋白质中氨基酸含量(mg/g), 如表 3 所示, 深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺肌肉中 EAA 的 AAS、CS 和 EAAI 相接近。根据 AAS 和 CS 可以得知, 2 种塔形马蹄螺肌肉中苏氨酸评分最高, 其中

AAS 均>1, CS 均>0.85, 而 2 种马蹄螺肌肉的第一限制氨基酸都是苯丙氨酸+酪氨酸, 第二限制氨基酸都是蛋氨酸+半胱氨酸, 其他氨基酸得分较为均衡。

表 1 2 种塔形马蹄螺肌肉中常规营养成分含量比较(湿基, %)

Tab.1 Comparison of the contents of basic nutrients in the muscle of two species of *T. pyramis* (wet basis, %)

营养成分 Basic nutrients/%	塔形马蹄螺肌肉 Muscle of <i>T. pyramis</i>	
	深圳大鹏湾 Mirs Bay	海南琼海 Qionghai
粗蛋白 Crude protein	19.13±0.21	20.14±0.81
粗脂肪 Crude fat	0.70±0.01	0.72±0.02
粗灰分 Crude ash	1.60±0.02	2.28±0.38*
水分 Moisture	75.94±0.12	75.60±0.35
总糖 Total carbohydrate	<0.24	<0.24

注: 同行数据肩标\*表示差异显著(P<0.05), 下同。

Note: \*Superscript asterisk in the same line indicate significant differences (P<0.05), the same as below.

表 2 2 种塔形马蹄螺肌肉中氨基酸组成及含量比较

Tab.2 Comparison of amino acid composition and content in muscle of two species of *T. pyramis*

营养学分类 Nutritional classification	氨基酸组成 Composition of amino acids	氨基酸含量 Amino acid content/(g/100 g)	
		深圳大鹏湾 Mirs Bay	海南琼海 Qionghai
必需氨基酸 Essential amino acid	苏氨酸 Thr	0.79±0.02	0.81±0.01
	缬氨酸 Val <sup>##</sup>	0.66±0.01	0.69±0.01*
	蛋氨酸 Met	0.36±0.03	0.41±0.01*
	异亮氨酸 Ile <sup>##</sup>	0.58±0.01	0.61±0.01*
	亮氨酸 Leu <sup>##</sup>	1.20±0.02	1.29±0.02*
	苯丙氨酸 Phe	0.54±0.00	0.57±0.01*
	赖氨酸 Lys	0.97±0.03	1.02±0.03
条件必需氨基酸 Conditionally essential amino acid	组氨酸 His	0.26±0.01*	0.22±0.01
	精氨酸 Arg <sup>#</sup>	1.81±0.01	1.83±0.00*
非必需氨基酸 Nonessential amino acid	天冬氨酸 Asp <sup>#</sup>	1.87±0.02	1.94±0.02*
	丝氨酸 Ser	0.98±0.03	0.97±0.00
	谷氨酸 Glu <sup>#</sup>	3.15±0.03	3.28±0.02*
	甘氨酸 Gly <sup>#</sup>	2.34±0.01	2.25±0.09
	丙氨酸 Ala <sup>#</sup>	1.23±0.01	1.24±0.00
	酪氨酸 Tyr	0.55±0.01	0.56±0.01
	脯氨酸 Pro	1.21±0.02	1.17±0.04
总氨基酸 TAA		18.45±0.13	18.83±0.03*
总必需氨基酸 EAA		5.08±0.04	5.39±0.09*
总鲜味氨基酸 DAA		10.39±0.04	10.53±0.06*
总支链氨基酸 BCAA		2.43±0.03	2.59±0.04*

注: #为鲜味氨基酸, ##为支链氨基酸。

Note: # is delicious amino acids, ## is branched-chain amino acids.

表3 2种塔形马蹄螺肌肉中AAS、CS、EAAI比较  
Tab.3 Comparison of AAS, CS, and EAAI in muscle of two species of *T. pyramis*

类型 Types	评分指标 Scoring index	必需氨基酸 Essential amino acid						
		Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Phe+Tyr	Thr	Val
联合国粮农组织/世界卫生组织 FAO/WHO	含量 Content /(mg/g)	40.00	70.00	55.00	35.00	60.00	40.00	50.00
全鸡蛋蛋白质 Egg protein	含量 Content /(mg/g)	54.00	86.00	70.00	57.00	93.00	47.00	66.00
深圳大鹏湾塔形马蹄螺 <i>T. pyramis</i> in Mirs Bay	蛋白质中的氨基酸含量 Amino acid content in protein /(mg/g)	30.32	62.73	50.71	18.82	28.23	41.30	34.50
	氨基酸评分 AAS	0.76	0.90	0.92	0.54 <sup>##</sup>	0.33 <sup>#</sup>	1.03	0.69
	化学评分 CS	0.56	0.73	0.72	0.33 <sup>##</sup>	0.30 <sup>#</sup>	0.88	0.52
	必需氨基酸指数 EAAI				54.15			
海南琼海塔形马蹄螺 <i>T. pyramis</i> in Qionghai	蛋白质中的氨基酸含量 Amino acid content in protein /(mg/g)	30.29	64.05	50.65	20.36	28.30	40.22	34.26
	氨基酸评分 AAS	0.76	0.92	0.92	0.58 <sup>##</sup>	0.47 <sup>#</sup>	1.01	0.69
	化学评分 CS	0.56	0.74	0.72	0.36 <sup>##</sup>	0.30 <sup>#</sup>	0.86	0.52
	必需氨基酸指数 EAAI				54.67			

注: #为第一限制性氨基酸, ##为第二限制性氨基酸。

Note: # is first limiting amino acid, ## is second limiting amino acid.

### 2.3 脂肪酸组成

从表4可以得知, 2种塔形马蹄螺肌肉中均检测出16种脂肪酸, 脂肪酸的组成中含有5种饱和脂肪酸(SPF)、2种单不饱和脂肪酸(MUFA)和9种多不饱和脂肪酸(PUFA)。在2种塔形马蹄螺肌肉脂肪酸组成中, C16:0既是SPF中含量最高的, 也是总脂肪酸含量最高的, C16:0含量为海南琼海塔形马蹄螺>深圳大鹏湾塔形马蹄螺( $P<0.05$ )。C18:1是MUFA中含量最高, C18:1含量为深圳大鹏湾塔形马蹄螺>海南琼海塔形马蹄螺( $P<0.05$ )。C20:4是PUFA中含量最高的, C20:4含量为海南琼海塔形马蹄螺>深圳大鹏湾塔形马蹄螺( $P<0.05$ )。此外, 深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺肌肉PUFA分别占总脂肪酸的49.72%和48.25%, EPA分别占PUFA的9.07%和6.32%, DHA分别占PUFA的2.73%和1.53%, EPA+DHA含量为深圳大鹏湾塔形马蹄螺>海南琼海塔形马蹄螺( $P<0.05$ )。

### 2.4 主要矿物元素含量

由图1可知, 2种不同海湾捕捞的塔形马蹄螺肌肉所含的3种主要矿物元素中, 含量最高的均是常量元素Ca, 微量元素Fe次之, 最低的是微量元素Zn。其中, 深圳大鹏湾塔形马蹄螺肌肉的Ca含量显著高于海南琼海塔形马蹄螺( $P<0.05$ ); 深圳大鹏湾塔形马蹄螺肌肉的Zn含量显著低于海南琼海塔形马蹄螺( $P<0.05$ ); 深圳大鹏湾塔形马蹄螺肌肉的Zn含量显著高于海南琼海塔形马蹄螺( $P<0.05$ )。

表4 2种塔形马蹄螺肌肉中脂肪酸含量比较

Tab.4 Comparison of fatty acid content in muscle of two species of *T. pyramis*

脂肪酸组成 Fatty acid composition	脂肪酸含量 Fatty acid content /(mg/100 g)	
	深圳大鹏湾 Mirs Bay	海南琼海 Qionghai
豆蔻酸 C14:0	10.40±0.00*	9.84±0.16
十五烷酸 C15:0	6.11±0.01	7.83±0.10*
棕榈酸 C16:0	144.50±0.50	153.50±2.50*
十七烷酸 C17:0	24.20±0.10	25.35±0.35*
硬脂酸 C18:0	56.75±0.15*	53.20±1.10
棕榈一烯酸 C16:1	6.61±0.01	4.84±0.15
油酸 C18:1 n-9	81.65±0.45*	75.45±1.15
亚油酸 C18:2 n-6	23.90±0.20*	18.95±0.35
α-亚麻酸 C18:3 n-3	7.94±0.11*	4.80±0.08
二十碳二烯酸 C20:2	3.50±0.01	3.69±0.10*
二十二碳二烯酸 C22:2	57.55±0.35*	52.65±1.25
花生四烯酸 C20:4 n-6	110.50±1.50	119.00±2.00*
二十二碳四烯酸 C22:4	36.00±0.40	42.40±0.08*
二十碳五烯酸 EPA C20:5 n-3	29.60±0.50*	19.45±0.25
二十二碳五烯酸 DPA C22:5 n-3	47.60±0.77	42.05±0.85*
二十二碳六烯酸 DHA C22:6 n-3	8.90±0.15*	4.70±0.08
饱和脂肪酸 SFA	241.96±0.75	249.72±4.21*
单不饱和脂肪酸 MUFA	88.26±0.44*	80.29±1.30
多不饱和脂肪酸 PUFA	326.49±3.92*	307.69±11.07

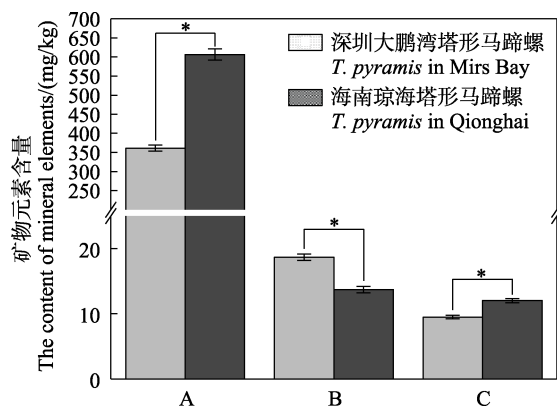


图1 2种塔形马蹄螺肌肉中矿物元素含量比较

Fig.1 Comparison of the contents of mineral elements in the muscle of two species of *T. pyramis*

A: 钙; B: 铁; C: 锌; 同种矿物元素中  
\*表示差异显著( $P < 0.05$ )。

A: Calcium; B: Iron; C: Zinc; \* in the same mineral elements indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 基本营养成分分析

肌肉作为塔形马蹄螺的可食用部位,其粗蛋白和粗脂肪含量及种类是螺类品质评价的重要因素。本研究测得2种马蹄螺的肌肉粗蛋白、粗脂肪含量均高于管角螺(*Hemifusus tuba* Gmelin)(周爽男等, 2018)、香螺(*Neptunea arthritica cumingii*)(郝振林等, 2016)、中华园田螺(*Cipangopaludina cathayensis*)(薛飞等, 2021),与海水经济贝类扁玉螺(*Nevertia didyma* Roding)(刘慧慧等, 2013)较为接近。粗蛋白含量均高于岩扇贝(*Crassadoma gigantea*)、虾夷扇贝(*Patiopecten yessoensis*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)4大海水经济贝类,而粗脂肪含量均低于四者(曹善茂等, 2016)。鸡蛋是公认的优质蛋白质健康食品,其蛋白质含量为12.84%,因此,鸡蛋是优质营养成分的对照品(葛庆联等, 2013)。本研究中的2种塔形马蹄螺肌肉粗蛋白含量均高于鸡蛋。蛋白质数量丰富、质量良好的食物有畜、禽、鱼、肉、奶类、大豆等,其蛋白质含量一般为10%~20%(孙远明等, 2010),深圳大鹏湾和海南琼海马蹄螺肌肉粗蛋白含量分别占总营养组成的19.13%和20.14%,属良好的蛋白质来源。此外,2种塔形马蹄螺具有海洋经济贝类高蛋白、低脂肪的营养特点,且营养丰富,是人类摄取海洋水产蛋白的优质来源。

#### 3.2 氨基酸组成及营养价值评价

氨基酸组成及含量是决定优质蛋白质的重要因

素之一,氨基酸可分为必需氨基酸、条件必需氨基酸和非必需氨基酸。在深圳大鹏湾和海南琼海捕捞的塔形马蹄螺肌肉中,Leu和Lys必需氨基酸含量接近FAO/WHO标准模式推荐的含量,且Thr必需氨基酸含量大于FAO/WHO标准模式推荐的含量。支链氨基酸是指在 $\alpha$ -碳原子上含有分支脂肪烃链的中性氨基酸,包括Leu、Ile和Val的一类必须氨基酸(Loftfield *et al.*, 1956),具有合成机体蛋白质、诱导细胞凋亡(Silva *et al.*, 2017)、预防肝损伤(Eguchi *et al.*, 2021)、抑制巨噬细胞吞噬活性(Bonvini *et al.*, 2021)等生理功能。深圳大鹏湾与海南琼海塔形马蹄螺肌肉的总支链氨基酸只占总氨基酸含量的13.17%和13.75%,但占总必需氨基酸含量的47.83%和48.02%,说明2种马蹄螺氨基酸的营养价值丰富,必需氨基酸含量丰富,是人类补充优质氨基酸的重要来源。

Leu作为支链氨基酸中唯一的生酮氨基酸,对海洋动物的营养支持及生理作用至关重要(张圆等, 2020),作为一种功能性氨基酸,其在机体内参与蛋白质合成、能量代谢和葡萄糖平衡等多种生理活动(Lynch *et al.*, 2014),与海洋动物的生长密切相关。Lys是谷物中第一限制氨基酸,长期以谷物为主食的膳食者会造成赖氨酸缺乏,不利于人体对蛋白质的利用率,进而导致食欲衰退、代谢紊乱、多种酶活性降低等(高娅俊等, 2015)。而2种塔形马蹄螺肌肉的Leu、Lys含量丰富,AAS评分均超过0.90,CS评分均超过0.70,可促进人体的生理活动,提高人体对蛋白质利用率。

水产动物所具有的鲜味氨基酸可使其呈现出独特的风味。在深圳塔形马蹄螺和海南塔形马蹄螺肌肉检测出的5种鲜味氨基酸,分别占总氨基酸含量的56.29%和55.90%,2种马蹄螺的鲜味氨基酸含量比较接近,但均高于中华园田螺(48.12%)(薛飞等, 2021)、西施舌(*Coelomactra antiquata*)(44.77%)(孟学平等, 2007)、栉孔扇贝((41.44%)(李晓英等, 2010)和莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*)(25.02%)(王峥等, 2020)。由此可知,2种塔形马蹄螺的鲜味氨基酸总量较高,味道鲜美,食用价值较高。

经过氨基酸的品质评价,得知2种塔形马蹄螺对人体营养吸收的主要限制氨基酸为Phe、Tyr、Met和Cys,在塔形马蹄螺食品加工工业中,可以针对性添加这些限制氨基酸,以完善该水产食品的营养价值。

#### 3.3 脂肪酸组成及营养价值评价

由于饱和脂肪酸的摄入,肥胖已成为发达国家以

及越来越多的发展中国家的一种普遍现象,肥胖是多种疾病的危险因素,如糖尿病、心血管病、脂肪性肝炎、某些癌症以及精神健康疾病等(Sergi *et al*, 2020)。深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺肌肉含有 5 种饱和脂肪酸(SFA),分别占总脂肪酸 36.84%和 39.16%,均低于中华园田螺的饱和脂肪酸含量(43.80%)(薛飞等, 2021),与大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)(35.33%)(周胜杰等, 2021)相接近,但高于黑尾近红鲷(*Ancherythroculter nigrocauda*)(23.06%)和翘嘴鲷(*Erythroculter ilishaeformis*)(24.38%)(王贵英等, 2021)。尽管塔形马蹄螺肌肉饱和脂肪酸高于一些鱼类,但其粗脂肪含量均低于 0.75%,脂肪酸总量较低,可以在减少脂肪酸尤其是饱和脂肪酸摄入的同时补充蛋白质。

亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸是人体必需脂肪酸,其可以合成花生四烯酸、EPA、DHA,但由于在合成过程中存在竞争抑制作用,合成量远小于机体生理需要(孙远明等, 2010),因此,需要从食物中获得足够的必需脂肪酸。此外,在膳食中缺乏 PUFA 会导致自闭症、注意力缺陷或多动症等神经发育障碍的发生(Martins *et al*, 2020),而富含 DHA 和 EPA 的 PUFA 具有防治心血管疾病、预防糖尿病、抗癌症等多种生理活性(Manson *et al*, 2019; Mozaffari *et al*, 2020)。深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺肌肉 PUFA 分别占总脂肪酸的 49.72%和 48.25%,其中, DHA+EPA 占总脂肪酸含量 11.79%和 7.85%,较黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)(21.17%)低(王霞等, 2019),但远高于鲫鱼(*Carassius auratus*)(4.17%)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)(3.21%)等淡水草鱼(盛晓风等, 2016),这是因为海洋动物的脂质在低温下具有流动性,富含 PUFA 和非三酰甘油,与陆生动物的脂质差异较大(章超桦等, 2018),PUFA 中的 DHA 和 EPA 含量高于淡水动物,甚至相同物种在海水环境中养殖,其 PUFA 含量也显著高于淡水环境养殖(许建和等, 2010)。由此可见,2 种塔形马蹄螺的 PUFA 是优质膳食的脂肪酸,是人们补充 EPA、DHA 的理想选择。

### 3.4 主要矿物元素含量

矿物元素是构成机体组织的重要物质,基于在体内的含量和人体需要量的不同,可分为人体必需的常量元素和微量元素(孙远明等, 2010)。常量元素 Ca 对人体的健康发育有着重要的作用,参与骨骼矿化、神经元传递、细胞内信号传导等生理功能(Beggs *et al*, 2017)。微量元素可参与人体新陈代谢及各种生命活动,是人体所必需的营养元素(王继隆等, 2019),也是人体需求量最多的微量元素(刘胜男等, 2021)。2 种

塔形马蹄螺肌肉含量最高的常量元素均为 Ca,微量元素均为 Fe。与深圳大鹏湾塔形马蹄螺相比,海南琼海塔形马蹄螺肌肉中的 Ca 和 Zn 含量较高。研究表明,2 种塔形马蹄螺肌肉中矿物元素含量丰富,能较好的满足人体对矿物元素的需要。

## 4 结论

综上所述,深圳大鹏湾和海南琼海塔形马蹄螺在主要的营养成分、氨基酸组成及含量、脂肪酸组成及含量上虽有所差异,但 2 种塔形马蹄螺粗蛋白含量均较高、粗脂肪含量较低,具有海洋经济贝类的营养组成特点,氨基酸组成全面且均衡,其中 5 种鲜味氨基酸含量均高于 55%,味道鲜美,在较低含量的脂肪中 EPA+DHA 占比高,可食用价值高,具有规模化养殖与产品开发的潜力。

## 参 考 文 献

- BEGGS M R, ALEXANDER R T. Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(8): 840–849
- BONVINI A, ROGERO M M, COQUEIRO A Y, *et al*. Effects of different branched-chain amino acids supplementation protocols on the inflammatory response of LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Amino Acids*, 2021, 53(4): 597–607
- CAO S M, WANG H, CHEN W, *et al*. Analysis, evaluation and comparison of nutritive composition in rock scallop *Crassadoma gigantean* with three Chinese scallops. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(5): 544–550 [曹善茂, 王昊, 陈炜, 等. 岩扇贝闭壳肌营养成分的分析及与中国 3 种扇贝的比较. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(5): 544–550]
- CHEN F X, PU L Y, ZENG G Q, *et al*. Study on the induced breeding techniques of *Trochus pyramis* Born. *Fishery Modernization*, 2015, 42(6): 11–15 [陈傅晓, 蒲利云, 曾关琼, 等. 塔形马蹄螺人工繁育技术研究. *渔业现代化*, 2015, 42(6): 11–15]
- EGUCHI A, IWASA M, TAMAI Y, *et al*. Branched-chain amino acids protect the liver from cirrhotic injury via suppression of activation of lipopolysaccharide-binding protein, toll-like receptor 4, and signal transducer and activator of transcription 3, as well as *Enterococcus faecalis* translocation. *Nutrition*, 2021, 86: 111194
- GAO Y J, ZHANG X, Deng J M. Research progress in lysine requirement for fish. *Feed Industry*, 2015, 36(24): 35–39 [高娅俊, 张曦, 邓君明. 鱼类赖氨酸营养生理研究进展. *饲料工业*, 2015, 36(24): 35–39]
- GE Q L, GAO Y S, PU J H, *et al*. Comparison of some nutrition

- constituents of eggs from different breeds. *China Poultry*, 2013, 35(11): 28–30, 36 [葛庆联, 高玉时, 蒲俊华, 等. 不同品种鸡蛋部分营养成分比较分析. *中国家禽*, 2013, 35(11): 28–30, 36]
- HAO Z L, WANG Y, YU Y Y, *et al.* Analysis and evaluation of nutritive composition in the muscle of neptunea *Arthritica cumingii* crosse (Gastropoda: Buccinidae). *Journal of Dalian University*, 2016, 37(6): 66–70 [郝振林, 王煜, 于洋洋, 等. 香螺肌肉营养成分分析及评价. *大连大学学报*, 2016, 37(6): 66–70]
- HUANG J, OU Z K, Guang W, *et al.* Genetic structure and diversity analysis of three natural populations of *Tectus pyramis* based on specific locus amplified fragment sequencing. *Journal of Tropical Oceanography*, 2020, 39(5): 1–18 [黄景, 欧泽奎, 刘文广, 等. 基于 SLAF 测序分析 3 个塔形马蹄螺群体的遗传结构和多样性. *热带海洋学报*, 2020, 39(5): 1–18]
- LI F Y, FENG Y Q, WU H L, *et al.* Histological studies on reproductive system of male in *Trochus pyramis* Born. *Journal of Hainan University (Natural Science)*, 2008(2): 153–156 [李芳远, 冯永勤, 吴洪流, 等. 塔形马蹄螺雄性生殖系统的组织学研究. *海南大学学报(自然科学版)*, 2008(2): 153–156]
- LI X Y, LI Y, ZHOU S Q, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition in two freshwater fingersnails. *Food Science*, 2010, 31(13): 276–279 [李晓英, 李勇, 周淑青, 等. 两种淡水螺肉的营养成分分析与评价. *食品科学*, 2010, 31(13): 276–279]
- LIU H H, XU M Y, WU C W. Evaluation of nutritional composition in *Nevertia didyma* and *Natica vitellus* from Zhoushan Sea area. *Food Science*, 2013, 34(5): 228–231 [刘慧慧, 徐梅英, 吴常文. 舟山海域扁玉螺和玉螺食用价值评估. *食品科学*, 2013, 34(5): 228–231]
- LIU S N, WANG S Y, CAO R, *et al.* Nutritional composition analysis and quality evaluation of different sizes of *Ammodytes personatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(1): 188–194 [刘胜男, 王善宇, 曹荣, 等. 不同规格玉筋鱼的营养分析与评价. *渔业科学进展*, 2022, 43(1): 188–194]
- LOFTFIELD R B, HARRIS A. Participation of free amino acids in protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 219(1): 151–59
- LYNCH C J, ADAMS S H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, 2014, 10(12): 723–736
- MANSON J E, COOK N R, LEE I M, *et al.* Marine n-3 fatty acids and prevention of cardiovascular disease and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 380(1): 23–32
- MARTINS B P, BANDARRA N M, FIGUEIREDO-BRAGA M. The role of marine omega-3 in human neurodevelopment, including autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(9): 1431–46
- MENG X P, GAO R C, DONG Z G, *et al.* Analysis and evaluation of nutritive composition in edible part of *Coelomactra antiquata*. *Marine Sciences*, 2007, 31(1): 17–22 [孟学平, 高如承, 董志国, 等. 西施舌营养成分分析与评价. *海洋科学*, 2007, 31(1): 17–22]
- MOZAFFARI H, DANESHZAD E, LARIJANI B, *et al.* Dietary intake of fish, n-3 polyunsaturated fatty acids, and risk of inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(1): 1–17
- SERGI D, WILLIAMS L M. Potential relationship between dietary long-chain saturated fatty acids and hypothalamic dysfunction in obesity. *Nutrition Reviews*, 2020, 78(4): 261–277
- SHENG X F, SUN X J, DING H Y, *et al.* Analysis and evaluation of the nutritional composition in seven cultured fresh water fishes. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(3): 359–363 [盛晓风, 孙晓杰, 丁海燕, 等. 七种养殖淡水鱼类肌肉营养组成及对比研究. *食品工业科技*, 2016, 37(3): 359–363]
- SHI Y, XU M, HUANG J, *et al.* Transcriptome analysis of mantle tissues reveals potential biomineralization-related genes in *Tectus pyramis* Born. *Comparative Biochemistry And Physiology, Part D, Genomics Proteomics*, 2019, 29: 131–44
- SILVA L S, POSCHET G, NONNENMACHER Y, *et al.* Branched-chain ketoacids secreted by glioblastoma cells via MCT1 modulate macrophage phenotype. *Embo Reports*, 2017, 18(12): 2172–2185
- SUN Y M, HE Z Q. *Food nutrition*. Beijing: China Agriculture University Press, 2010 [孙远明, 何志谦. *食品营养学*. 北京: 中国农业大学出版社, 2010]
- WANG G Y, YU Y L, HE L, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition for the juvenile hybrid F<sub>1</sub>. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(2): 72–80 [王贵英, 喻亚丽, 何力, 等. 杂交鮠“先锋 1 号”肌肉营养成分分析及品质评价. *淡水渔业*, 2021, 51(2): 72–80]
- WANG J L, LIU W, Li P L, *et al.* Evaluation of nutritive quality and nutrient components in the muscles of wild and farmed chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(2): 126–132 [王继隆, 刘伟, 李培伦, 等. 野生和养殖大麻哈鱼肌肉营养成分与品质评价. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(2): 126–132]
- WANG X, LIN W L, LI L H, *et al.* Content and composition of fatty acids in six kinds of perciformes marine fish by gas chromatography—Mass spectrometry. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(21): 250–255 [王霞, 林婉玲, 李来好, 等. 气相色谱—质谱法分析六种鲈形目海水鱼脂肪含量和脂肪酸组成. *食品工业科技*, 2019, 40(21): 250–255]
- WANG Z, LIU C L, ZHAI J M, *et al.* Analysis and evaluation of



- muscle nutrition of *Sepioteuthis lessoniana*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 102–109 [王峥, 刘长琳, 翟介明, 等. 莱氏拟乌贼肌肉营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 102–109]
- XU J H, XU J T, LIN Y J, *et al.* Fatty acid composition of the muscle of *Lateolabrax japonicus* (Cuvier) grown in seawater and freshwater. Food Science, 2010, 31(14): 209–211 [许建和, 徐加涛, 林永健, 等. 海水和淡水养殖花鲈肌肉脂肪酸组成和含量分析. 食品科学, 2010, 31(14): 209–211]
- XUE F, HUANG K, SU Z J, *et al.* Analysis and evaluation of amino acids, fatty acids and safety of heavy metals in *Cipangopaludina cathayensis*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(1): 180–187 [薛飞, 黄凯, 宿志健, 等. 中华圆田螺氨基酸、脂肪酸营养价值与重金属安全性评价. 渔业科学进展, 2022, 43(1): 180–187]
- ZHANG C H, XUE C H. Aquatic food science. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2018 [章超桦, 薛长湖. 水产食品学. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- ZHANG Y Y, WANG L S. Research progress of leucine nutrition in aquatic animals. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(12): 5516–5523 [张圆圆, 王连生. 水产动物亮氨酸营养研究进展. 动物营养学报, 2020, 32(12): 5516–5523]
- ZHOU S J, YANG R, YU G, *et al.* Muscle composition determination and nutrition evaluation of three tuna species near Meiji Reef. South China Fisheries Science, 2021, 17(2): 51–59 [周胜杰, 杨蕊, 于刚, 等. 美济礁附近海域 3 种金枪鱼肌肉成分检测与营养评价. 南方水产科学, 2021, 17(2): 51–59]
- ZHOU S N, JIANG M W, JIANG X M, *et al.* Effects of dietary betaine on feeding, growth performance, tissue nutritional components and digestive enzyme activities of *Hemifusus tuba* Gmelin. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(8): 3319–3328 [周爽男, 江茂旺, 蒋霞敏, 等. 饲料中添加甜菜碱对管角螺摄食、生长性能、组织营养成分和消化酶活性的影响. 动物营养学报, 2018, 30(8): 3319–3328]
- ZHOU T C, HU S M, LIN X Z, *et al.* Study on the feeding habits of *Tectus pyramis* in the coral reef ecosystem based on 18S rDNA barcoding. Marine Sciences, 2020, 44(2): 99–107 [周天成, 胡思敏, 林先智, 等. 基于 18S rDNA 条形码技术的珊瑚礁区塔形马蹄螺(*Tectus pyramis*)食性分析. 海洋科学, 2020, 44(2): 99–107]
- ZHUANG X S, HUAN Q L, PENG Y, *et al.* Spatial and temporal distribution of dissolved oxygen in the coastal waters of eastern Shenzhen. Journal of Tropical Oceanography, 2018, 37(5): 98–105 [庄晓珊, 桓清柳, 彭莹, 等. 深圳东部近岸海域溶解氧的时空分布特征. 热带海洋学报, 2018, 37(5): 98–105]
- ZOU Z Y, ZHAO F, WANG Z, *et al.* Analysis and evaluation of nutrition and texture quality in different parts of turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 186–195 [邹朝阳, 赵峰, 王志, 等. 大菱鲆不同部位营养与质构品质分析评价. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 186–195]

(编辑 陈 辉)

## Analysis and Quality Evaluation of Nutrient Components in the Muscles of *Tectus pyramis*

LI Jinzhen<sup>1</sup>, ZHENG Huina<sup>1,2,3,4</sup>①, REN Dingding<sup>1</sup>, YANG Wen<sup>1</sup>, CAO Wenhong<sup>1,2,3,4</sup>,  
LIN Haisheng<sup>1,2,3,4</sup>, QIN Xiaoming<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Chaohua<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China;

2. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen, Guangdong 518108, China;

3. National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 4. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

**Abstract** To analyze the nutritional composition and quality of *Tectus pyramis* in Mirs Bay and Qionghai in Hainan, the basic nutritional composition, amino acid composition, fatty acid composition, and some mineral elements in their muscle tissues were determined by the national standard method. Amino acid score, chemical score, and the essential amino acid index were used to evaluate the amino acids. The results showed that the ash content of the muscle of *T. pyramis* caught in Qionghai was significantly higher than that caught from Mirs Bay, but there was no significant difference in other basic nutrients ( $P>0.05$ ). Total amino acid contents in the muscle tissue for individuals caught from Mirs Bay and Qionghai in Hainan were  $(18.45\pm 0.13)$  g/100 g and  $(18.83\pm 0.03)$  g/100 g, respectively; in both groups, the essential amino acid content was more than 27%, branched-chain amino acid content was more than 13%, and delicious amino acid content was 55%. The content of polyunsaturated fatty acids in the muscles was more than 48%. The contents of linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in Mirs Bay were significantly higher than those in Qionghai, and the DHA+EPA content was as high as 11.79%. Among the mineral elements detected, the content of calcium and trace element iron was the highest in the two kinds of *T. pyramis*, followed by trace element zinc. The calcium and zinc contents in the muscles of *T. pyramis* in Qionghai were significantly higher than those in Mirs Bay. In conclusion, *T. pyramis* have a high protein content, rich polyunsaturated fatty acids, and high muscle nutritional value, with a great potential for development. These data provide a reference for the further development and utilization of new snail food in island and reef waters.

**Key words** *Tectus pyramis*; Nutrient components; Amino acid; Fatty acid; Mineral elements; Quality evaluation

① Corresponding author: ZHENG Huina, E-mail: zhenghn@gdou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210406001

http://www.ykxjz.cn/

朱鑫海, 张紫瑞, 周丽颖, 汤环宇, 敖士齐, 周一凡, 高晓建, 姜群, 张晓君. 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌头肾转录组分析. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 208–217

ZHU X H, ZHANG Z R, ZHOU L Y, TANG H Y, AO S Q, ZHOU Y F, GAO X J, JIANG Q, ZHANG X J. Transcriptomic analysis of the head kidney of *Siniperca chuatsi* infected with *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 208–217

## 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌头肾转录组分析\*

朱鑫海 张紫瑞 周丽颖 汤环宇 敖士齐 周一凡  
高晓建 姜群 张晓君<sup>①</sup>

(扬州大学动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)



**摘要** 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是严重危害翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)养殖生产的主要病原之一,为揭示嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后宿主基因表达水平的变化,筛选免疫相关基因,解析翘嘴鲌应答病原细菌感染的分子机制,本研究以病原嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌,于感染 24 h 后,采集感染组与对照组翘嘴鲌头肾组织,采用 Illumina HiSeq 2000 进行了 RNA-Seq 分析,原始数据拼接后组装共获得 53 040 个单基因(unigene)。基因差异表达分析结果显示,感染组和未感染组翘嘴鲌存在 526 个差异表达基因,包括 254 个上调基因和 272 个下调基因,其中,免疫相关的显著上调的差异基因主要有炎症和免疫原性细胞因子白介素、补体系统、MHC I 型抗原提呈、溶菌酶、丝氨酸蛋白酶抑制因子、泛素蛋白连接酶等。GO 富集分析发现,差异基因主要涉及免疫应答反应和炎症反应等,经 KEGG 富集分析显示,89 个通路富集显著,免疫相关的代谢通路主要有内吞作用和吞噬体等。此外,实时荧光定量 PCR 验证结果表明,所选取 7 个差异表达免疫相关基因与 RNA-seq 结果具有相似的表达趋势。本研究为揭示翘嘴鲌对病原微生物感染的防御分子机制奠定了理论基础。

**关键词** 翘嘴鲌;嗜水气单胞菌;转录组;差异表达基因

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0208-10

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)隶属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、鲌属(*Siniperca*)。其肉味鲜美,营养丰富,具有很高的经济价值,是我国传统名贵鱼类之一,也是我国淡水养殖业重要的养殖品种(Chen *et al.*, 2021)。近年来,随着鲌鱼养殖规模的扩大及水环境的恶化,鲌鱼产业面临着严峻的病害问题,在病毒性疾病严重制约鲌鱼养殖业发展的同时,细菌病害也日趋严重。研究表明,可引起鲌鱼大规模死亡的细菌病原主要包括柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)(陈昌福等,

1995)、柱状屈挠杆菌(*Flavobacterium columnare*)(黄文芳等,1999)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)(顾天钊等,2000)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)(安伟等,2014)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)(高金伟等,2016)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)(吴勇亮等,2018)等,可引起翘嘴鲌烂鳃、鳍背部明显充血、皮肤溃烂等病症。此外,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是近年来引起翘嘴鲌发生败血症并造成大量死亡的主要病原(张悦等,2017),感染之后可导

\* 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(18)2012)资助 [This work was supported by Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(18)2012)]. 朱鑫海, E-mail: 18761046291@163.com

<sup>①</sup> 通信作者: 张晓君, E-mail: zxj9307@163.com

收稿日期: 2021-04-06, 收修改稿日期: 2021-06-01

致鳊鱼鳃小片呼吸上皮细胞肿胀变性,坏死脱落,鳃细胞、肝脏细胞、脾脏细胞和肾小管上皮细胞排列松散紊乱、严重肿大,出现大量空泡、坏死(Chen *et al.*, 2018)。

嗜水气单胞菌广泛分布于各种淡水水域,宿主范围十分广泛,是淡水鱼类最为常见的重要病原菌(秦莉等, 2014),也是一种典型的人-兽-鱼共染的病原菌(王艺等, 2019),可引起人胃肠道感染、胃肠道外感染及败血症等(张曼等, 2020; 李小艳等, 2020)。该菌对鳊鱼的危害颇为严重,感染后可引起肝、脾、肾等组织产生免疫反应,以抵御细菌感染。头肾作为鱼类重要的造血器官和免疫器官,其中的巨噬细胞与 B 淋巴细胞共同介导和参与免疫反应,维护鱼类的机体健康(田敬云等, 2005)。高通量测序技术(RNA-seq)能获得特定条件下生物体细胞或组织的所有转录本信息(曹梅等, 2021),被广泛应用于分析病菌感染宿主后的免疫应答。嗜水气单胞菌是危害鳊鱼养殖生产的主要病原,该菌感染鳊鱼引起的免疫反应却少有报道。因此,本研究利用 RNA-seq 技术对嗜水气单胞菌感染翘嘴鳊后进行转录组分析,筛选翘嘴鳊免疫相关的差异表达基因,开展 GO (gene ontology)分子功能注释和 KEGG 通路富集分析,并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对随机选取的 *IL-6* 等 7 个与免疫相关的差异表达基因(DEGs)进行相对定量分析,以期获得可能参与免疫反应的候选基因和调控通路,从而为解析翘嘴鳊免疫应答提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鳊鱼与菌株

健康翘嘴鳊由江苏扬州市董氏特种水产有限公司提供,体重为(130±5) g。实验前,于水温为(26±2)℃的淡水循环养殖系统中暂养 1 周,以适应实验环境。

实验用嗜水气单胞菌 G3 菌株分离于发病翘嘴鳊,由本实验室保存(张悦等, 2017)。实验挑取纯培养菌株接种于 LB 培养液培养 16 h, 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液,用 pH 7.2 的无菌 PBS 缓冲液重悬菌体,并将菌悬液浓度调至  $2.3 \times 10^6$  CFU/mL。

### 1.2 人工感染实验

将健康的翘嘴鳊分为感染组与对照组。感染组每尾腹腔注射 100  $\mu$ L 嗜水气单胞菌悬浮液,对照组按同样方式和剂量注射无菌 PBS 缓冲液。注射 24 h 后,每组随机挑选 3 尾,取出头肾组织,于液氮中备用。

### 1.3 RNA 提取、cDNA 文库构建和转录组测序

采用 Trizol 法提取感染组与对照组翘嘴鳊头肾组织总 RNA,设置 3 个重复, RNA 样品使用 DNase I 去除基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶初步评价 RNA 质量,并分别使用 NanoPhotometer<sup>®</sup> 分光光度计、Agilent 2100 生物分析仪进行 RNA 的纯度、浓度及完整性检测。使用 poly-Toligo-attached 磁珠纯化 mRNA,并利用随机引物和反转录酶合成第 1 条 cDNA; 第 2 条 cDNA 由 DNA 聚合酶 I、RNase H、dNTPs 合成; cDNA 片段通过 AMPure XP 系统进行纯化,PCR 扩增获得 cDNA 文库;最后,在 Illumina Hiseq 2000 平台上测序。

### 1.4 转录组 *denovo* 组装和基因注释

将 Illumina Hiseq 高通量测序平台测得的原始数据去除接头(adapter)、包含 ploy-N 和低质量 reads 质控后,用软件 Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)进行序列拼接得到 unigene,使用 BLAST 算法 ( $E$ -value $<10^{-5}$ )对组装的 Unigene 序列进行遗传相似性比较,以进行蛋白质功能注释,包括 GO、COG (clusters of orthologous groups)、KOG (eukaryotic orthologous groups)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)、Nr (non-redundant)、Swiss-Prot、Pfam 和 EggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups)数据库。

### 1.5 基因差异表达分析

通过 DESeq 软件对测序数据进行比对分析,并将错误发现率(false discovery rate, FDR)作为筛选差异表达基因(DEGs)的指标,筛选的标准是 Fold Change $\geq 2$ 且 FDR $<0.01$ ,将筛选出的 DEG 通过 GO 数据库进行 Pathway 注释并筛选富集 GO 条目和 Pathway 显著性筛选。

### 1.6 荧光定量 PCR 验证

利用 qRT-PCR 检测 7 个选择的免疫相关基因,以进一步验证转录组测序的准确性。采用 Primer Premier 5 设计特异性引物并合成,引物序列见表 1。qRT-PCR 反应体系共 20  $\mu$ L,其中,正反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L、2 $\times$ SuperMix 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L、稀释的 cDNA 模板 1  $\mu$ L。反应程序:94℃, 5 min; 94℃, 10 s; 60℃, 30 s; 72℃, 15 s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量。

## 2 结果

### 2.1 测序数据及质量情况

利用 Illumina HiSeq 2000 对翘嘴鲈头肾组织进行测序, 拼接共获得 53 040 个的 unigene, 平均长度为 1236 bp, N50 为 2319 bp, 长度为 300~500 bp 的 unigenes 有 21 667 个, 约为全部 unigenes 的 40.85%。GC 含量区间为 48.23%~50.59%, Q30 $\geq$ 93.87% (表 2)。测序数据与拼接结果比对显示, 6 个样本中能定位到组装转录本上的 clean reads 所占的百分比在 71.86%~77.44%之间。

### 2.2 unigene 功能注释

将 unigene 与 GO、COG、KOG、KEGG、Nr、Swiss-Prot、Pfam 和 EggNOG 共 8 个数据库进行比对并注释, 共有 21 693 条 unigene 被注释(表 3)。

### 2.3 差异表达基因筛选

翘嘴鲈感染嗜水气单胞菌 24 h 后的头肾组织的转录组文库与对照组比较分析。结果显示, 翘嘴鲈头

表 1 qRT-PCR 所用引物

Tab.1 Primers for qRT-PCR

基因 Genes	引物序列 Primers sequences (5'~3')	产物长度 Product length/bp
内参 <i><math>\beta</math>-actin</i>	F: GGAGAAGCTGTGGTACGTCG R: GTTGTAGGTGGTCTCGTGGA	202
白介素 <i>IL-6</i>	F: GGCTTCATCACCCAATACAGC R: ATCACTGCTGATGTACAAGGC	193
白介素 <i>IL-8</i>	F: TGAAGATCAAGAAGGGCCGA R: GATTCCTGGCATGACGGCT	153
白介素 <i>IL-17</i>	F: TGCACCACCCAGAACTTAGC R: TCATCGTCTGCCACAGGTA	178
凝集素 <i>Lectin</i>	F: GAGCACTGTTGTCTGGACG R: AGCTGTATCAGTGTCTTTATGGGG	198
热休克蛋白 <i>HSP60</i>	F: AGGAAGGAGGCAGAATCGTG R: ACAACGAGAAACCCTCCAC	136
热休克蛋白 <i>HSP70</i>	F: TCATCTGACAGCTTACCGCC R: CCAGAACCGTCTGACACCTG	180
热休克蛋白 <i>HSP90</i>	F: TCCCAACAAAGAGGAACGCA R: CCCACACCAAACCTGACCGAT	168

表 2 样品测序数据与组装结果统计

Tab.2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

样本 Samples	读数 Read number	总碱基数 Base number	有效测序量 Clean reads	比对数目 Mapped reads	比对效率 Mapped ratio	GC 含量 GC content	Q30
Control-1	27 824 820	8 300 028 302	27 824 820	19 995 841	71.86%	48.23%	93.87%
Control-2	26 356 161	7 861 607 300	26 356 161	19 102 073	72.48%	49.38%	94.28%
Control-3	25 730 272	7 685 096 012	25 730 272	19 386 437	75.34%	49.92%	94.49%
AH-1	24 077 789	7 193 984 494	24 077 789	18 644 857	77.44%	50.59%	95.03%
AH-2	22 261 061	6 621 650 712	22 261 061	16 336 202	73.38%	49.72%	94.64%
AH-3	23 469 406	7 009 077 458	23 469 406	17 871 908	76.15%	50.51%	94.98%

注: Control-1、Control-2、Control-3 为对照组; AH-1、AH-2、AH-3 为实验组。

Note: Control-1, Control-2, Control-3 were control groups; AH-1, AH-2, AH-3 were experimental groups.

表 3 Unigene 注释统计

Tab.3 Summary of unigenes annotation

注释数据库 Anno database	注释数目 Annotated number	比率 Rate/%	300 $\leq$ 长度<1000 300 $\leq$ Length<1000	长度 $\geq$ 1000 Length $\geq$ 1000
COG_Annotation	5401	24.90	1499	3902
GO_Annotation	12 675	58.43	4588	8087
KEGG_Annotation	13 377	61.67	4378	8999
KOG_Annotation	13 662	62.98	4027	9635
Pfam_Annotation	15 350	70.76	4149	11 201
Swissprot_Annotation	17 904	82.53	5454	12 450
eggNOG_Annotation	20 043	92.39	6858	13 185
Nr_Annotation	21 576	99.46	7911	13 665
All_Annotated	21 693	-	8000	13 693

肾组织差异表达基因(DEGs)有 526 个, 其中, 差异表达上调基因有 254 个, 差异表达下调基因有 272 个(图 1)。此外, 翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌后免疫相关的主要差异表达基因显示, 上调表达的基因主要有炎症和免疫原性细胞因子白介素(*IL-8*、*IL-6*、*IL-17*)、补体系统(*CRI*)、MHC I 型抗原提呈(*MHC I*)、抗菌肽溶

菌酶(*Lys*)、丝氨酸蛋白酶抑制因子(*Serpin*)、泛素蛋白连接酶(*E3*)等(表 4), 说明这些免疫相关基因参与到抵抗嗜水气单胞菌入侵的途径中, 对翘嘴鲌起到免疫保护作用。

### 2.4 差异表达基因的 GO 功能分类分析

为进一步探究病原嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后差异表达基因的功能, 对差异表达基因进行 GO 功能注释(图 2)。显著富集 GO 条目主要涉及生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF), 分别为 22、17 和 23 个。细胞组分富集最显著的为细胞、细胞组分、生物膜和生物膜组分; 分子功能类富集最显著的为结合和催化活性; 生物学过程类富集最显著的为细胞过程和单个有机体过程。此外, 大量差异表达基因富集至与免疫相关的条目, 如免疫系统过程、对刺激的反应、抗氧化活性等。

### 2.5 差异基因 KEGG 富集分析

共富集到 89 个代谢通路, 选取前 20 位显著富集通路进行 KEGG 富集分析, 发现与免疫相关的代谢通路主要有内吞作用(endocytosis)、吞噬体(phagosome)、TGF-beta 信号通路(TGF-beta signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)等(图 3)。内吞作用代谢通路如图 4 所示, 表明嗜水

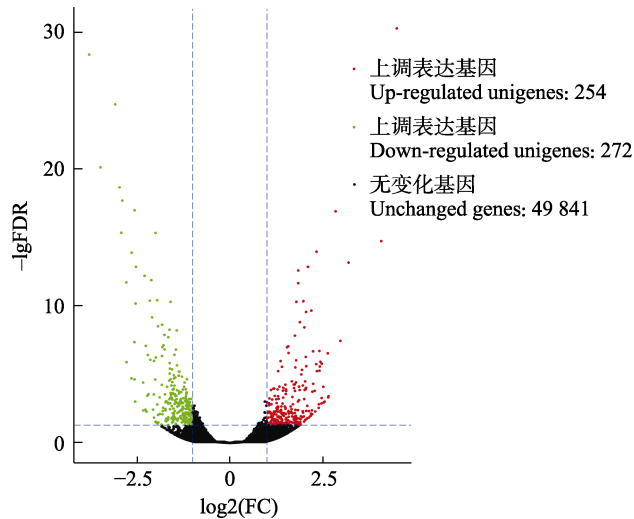


图 1 对照组和实验组差异表达基因火山图

Fig.1 Volcano plot of differentially expressed genes comparing control and infection groups

x 轴表示 fold change, y 轴表示差异表达的显著性。  
The x-axis represents fold change, the y-axis indicates significance of differential expression.

表 4 感染嗜水气单胞菌后差异表达的上调的主要免疫相关基因  
Tab.4 Up-regulated immune-related DEGs after *A. hydrophila* infection

基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	基因描述 Gene description	上调倍数 Increase multiple
白介素 <i>IL-8</i>	c75060.graph_c4	Interleukin-8	1.57
白介素 <i>IL-6</i>	c60619.graph_c0	Interleukin-6	2.05
白介素 <i>IL-17</i>	c74146.graph_c0	Interleukin 17	2.08
溶菌酶 <i>Lys</i>	c66833.graph_c0	Lysozyme	1.22
补体系统 <i>CRI</i>	c66684.graph_c0	Complement receptor type 1	2.42
MHCI 型抗原提呈 <i>MHCI</i>	c75121.graph_c0	Antigen processing and presentation	1.93
丝氨酸蛋白酶抑制因子 <i>Serpin</i>	c71188.graph_c0	Serine protease inhibitor	1.13
泛素蛋白连接酶 <i>E3</i>	c48937.graph_c0	E3 ubiquitin-protein ligase	1.78
B 型受体蛋白 <i>EPHB5</i>	c68078.graph_c0	Ephrin type-B receptor 5	1.74
G 蛋白偶联受体 <i>GPR142</i>	c67158.graph_c0	G-protein coupled receptor 142	2.40
半乳糖凝集素相关蛋白 <i>Lgals1-b</i>	c57980.graph_c0	Galectin-related protein B	1.88
黑素曲霉素 <i>Mreg</i>	c68041.graph_c0	Melanoregulin	1.91
转化生长因子 <i>TGFB3</i>	c56868.graph_c0	Transforming growth factor beta-3	2.17
碳酸酐酶 <i>Cahz</i>	c74871.graph_c2	Carbonic anhydrase	1.98

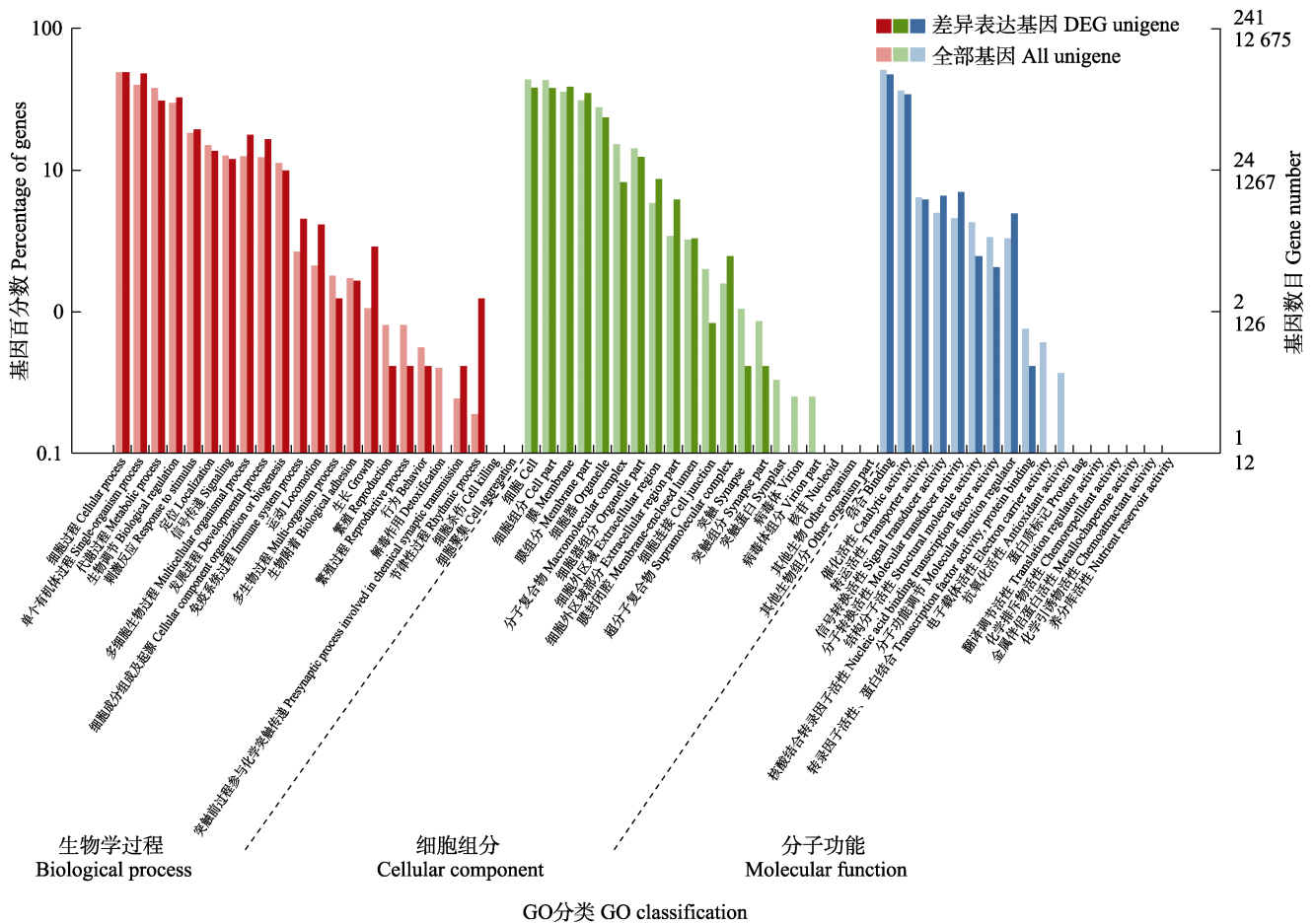


图 2 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌实验组与对照组表达差异基因 GO 分析  
 Fig.2 GO enrichment analysis of the differential expression genes between the infection and control groups

气单胞菌感染翘嘴鲌后引起 *TGFβ*、*dynaminn*、*ArfGAP*、*Arp2/3* 和 *caveolin* 等参与内吞作用的相关基因显著上调，而 *TGFβR*、*GPCR* 和 *Hsc70* 等参与内吞作用的相关基因显著下调；吞噬体代谢通路(图 5)表明，嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后引起 *avβ3*、*MR* 和 *TUBB* 等参与吞噬作用的相关基因显著上调，而 *IG* 和 *CALR* 等参与吞噬作用的相关基因显著下调。

2.6 免疫相关基因 qRT-PCR 验证

为了进一步验证 RNA-seq 数据的准确性，选择免疫相关基因 *IL-6*、*IL-8*、*IL-17*、*Lectin*、*HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 进行 qRT-PCR 分析。结果显示，翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌 24 h 后，免疫相关基因的荧光定量表达结果与转录组测序结果一致(图 6)，此结果验证了转录组测序数据的可靠性。

3 讨论

翘嘴鲌在养殖过程中遭受多种病原的感染，其中，嗜水气单胞菌感染会造成翘嘴鲌出血性败血症，

严重损伤肾脏、肝脏及脾脏等组织，造成坏死和解体等病理变化(Chen *et al.*, 2018)。本研究通过对嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌头肾组织的转录本进行分析，挖掘免疫应答基因，为揭示翘嘴鲌抗嗜水气单胞菌感染的分子机制提供理论依据。目前，高通量测序技术在嗜水气单胞菌感染水产养殖动物后的宿主免疫反应研究中得到了广泛应用。Xu 等(2021)利用高通量测序技术比较了嗜水气单胞菌感染和未感染的黄鳍(*Monopterus albus*)脾脏组织中基因表达差异，其中，上调表达基因有 928 个，下调表达基因有 573 个。Yuan 等(2021)利用高通量测序技术比较了嗜水气单胞菌感染和未感染的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)脾脏组织中基因表达差异，其中，上调表达基因有 1748 个，下调表达基因有 2120 个。Luo 等(2018)利用转录组测序技术检测嗜水气单胞菌感染的长江鲟(*Acipenser dabryanus Dumeril*)，结果显示，在感染的头肾组织中共检测到 1728 个 DEGs，其中，980 个上调表达基因和 748 个下调表达基因。本研究中，高通量测序结果显示，嗜水气单胞菌感染后，翘嘴鲌头肾组织存在

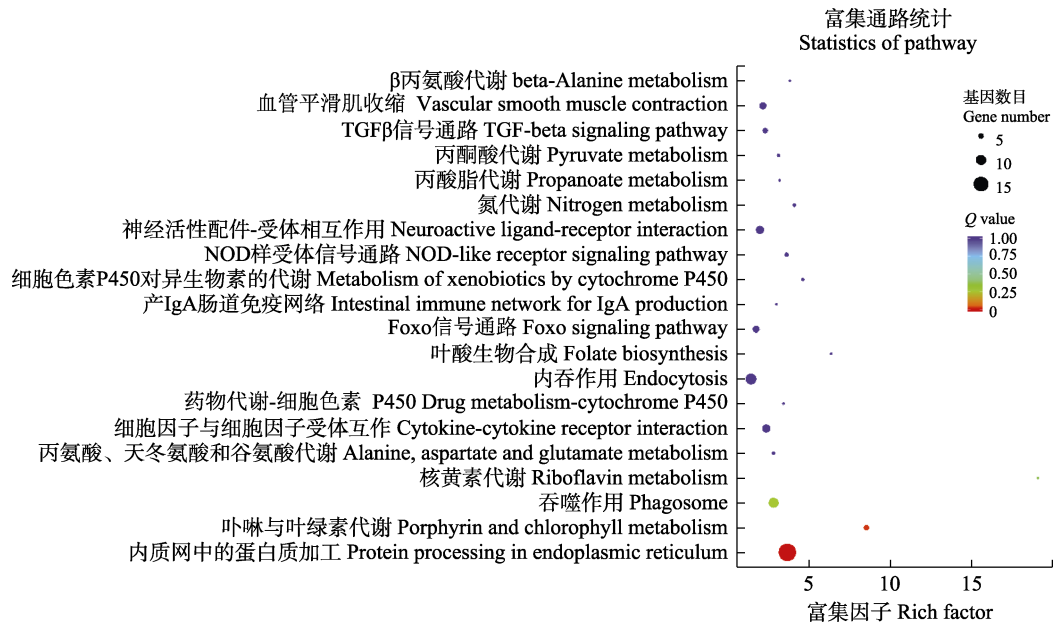


图 3 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲈实验组与对照组表达差异基因 KEGG 通路富集分析  
Fig.3 KEGG pathway enrichment analysis of the differential expression genes between the infection and control groups

图中每个圆表示 1 个 KEGG 通路。  
Circle in the figure represents a KEGG pathway.

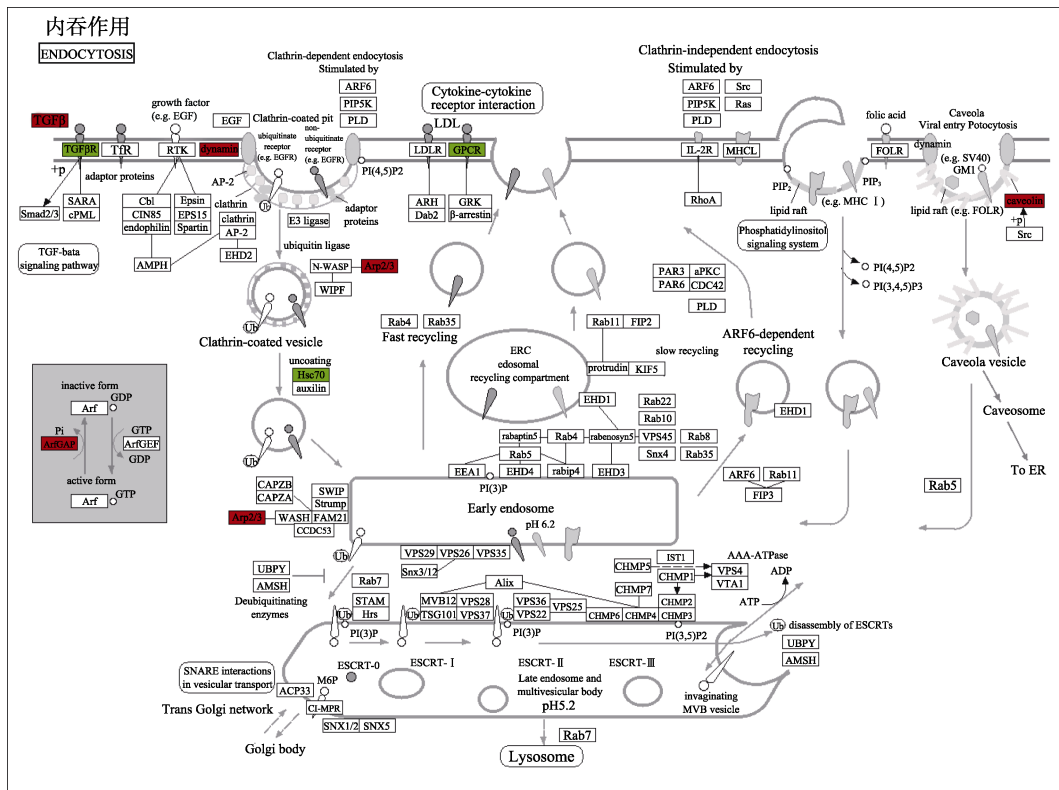


图 4 内吞作用的信号通路

Fig.4 Pathway map of the endocytosis pathway in KEGG

基因表达上调和下调分别用红色和绿色方框表示，下同。

The red boxes represent genes up-regulating, the green boxes represent genes down-regulating. The same as below.



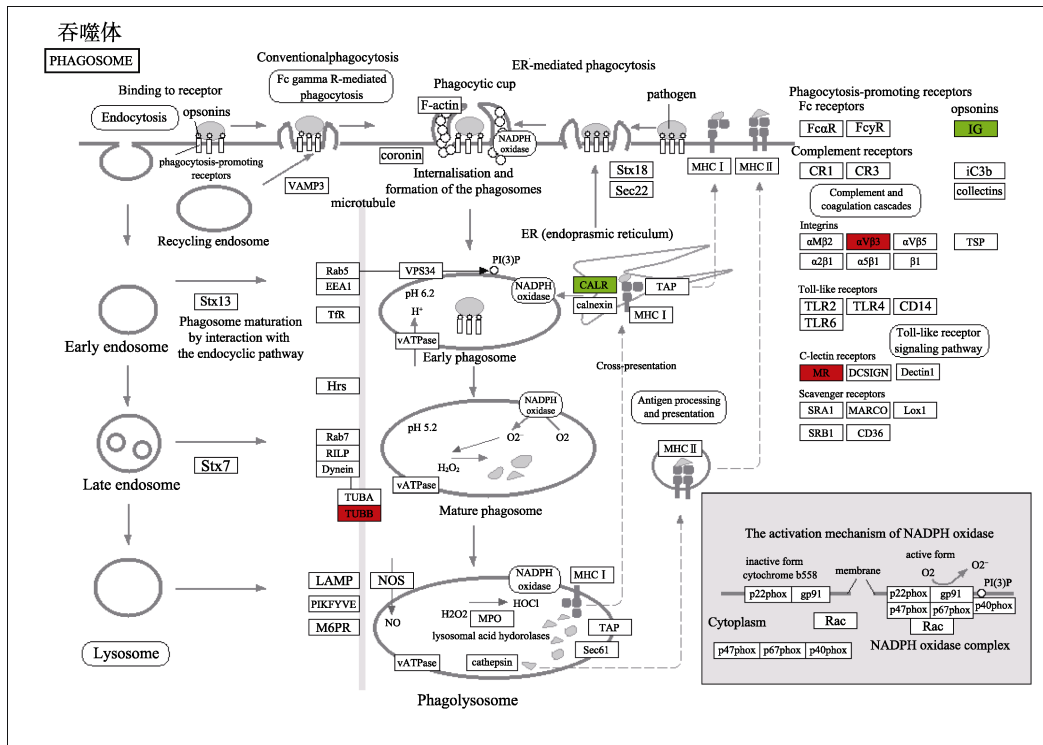


图 5 吞噬体的信号通路  
Fig.5 Pathway map of the phagosome pathway in KEGG

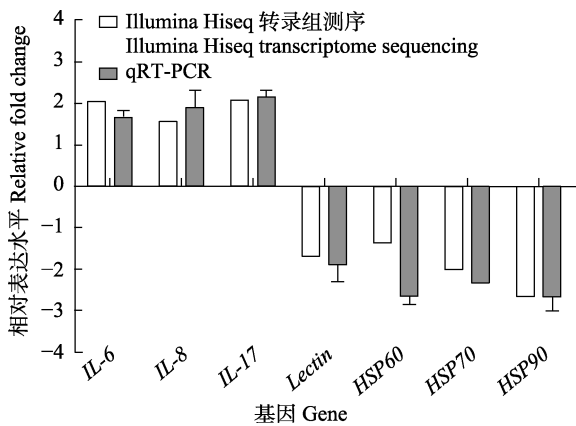


图 6 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后  
差异表达基因 qRT-PCR 分析

Fig.6 Comparative analysis of qRT-PCR of differentially expressed genes of *S. chuatsi* infected with *A. hydrophila*

526 个差异表达基因，其中，差异表达上调基因有 254 个，差异表达下调基因有 272 个，大量基因都与炎症、免疫、防御反应相关，这可能与嗜水气单胞菌在翘嘴鲌体内大量复制和宿主抵抗细菌感染有关，表明嗜水气单胞菌进入翘嘴鲌体内后，可诱导机体的非特异性免疫应答反应。

病原生物感染水生动物后获得大量差异表达基因，为分析宿主免疫应答方式和免疫防御提供了数据支持(刘文静等, 2013)。本研究发现，嗜水气单胞菌

感染翘嘴鲌后，白介素 *IL-8*、*IL-6*、*IL-17*、补体系统受体 *C1R*、抗原提呈 *MHC I*、溶酶体 *Lys*、丝氨酸蛋白酶抑制因子 *Serpin* 和泛素蛋白连接酶 *E3* 等免疫相关基因表达显著上调，说明这些基因在感染中参与应答反应。其中，白介素 *IL* 是参与炎症反应，免疫调节，刺激 T 细胞、B 细胞增殖等免疫应答的关键因子 (McBeath *et al*, 2007)。类似的研究发现，大西洋鲑 (*Salmo salar*) 在接种杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 疫苗后，*IL-8* 在其肝脏和肾脏中的表达显著升高 (Fast *et al*, 2007)。斑马鱼 (*Danio rerio*) 在接种迟缓爱德华氏菌减毒疫苗后，*IL-8* 基因出现明显的上调表达 (Yang *et al*, 2013)。MHC 分子属于免疫蛋白超家族，包括 MHC I 类分子和 MHC II 类分子，MHC I 类主要组织相容性复合抗原的功能是呈递细胞内病原产生的肽给 CD8<sup>+</sup> T 细胞，诱导 T 细胞活化并杀死靶细胞。费超 (2013) 研究发现，用减毒鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 注射斑马鱼能有效激发 *MHC I* 和 *MHC II* 免疫应答。溶菌酶基因在先天性免疫系统中充当着重要角色，负责抵抗病原微生物的入侵。Zhang 等 (2018) 研究发现，加州鲈 (*Micropterus salmoides*) 感染嗜水气单胞菌后，*lysozyme* 表达量显著提高。

为更好地了解病原宿主之间的免疫应答及由细菌感染引起的一系列免疫反应的分子机制，本研究对

嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌后头肾组织差异表达基因进行GO富集和KEGG富集分析。GO富集分析显示,显著富集与免疫相关的GO条目有免疫系统过程、对刺激的反应、抗氧化活性等,说明嗜水气单胞菌感染翘嘴鲌,导致宿主产生强烈的免疫应答反应。KEGG富集分析显示,显著富集的免疫相关通路有内吞作用和吞噬体。内吞作用是细胞外物质通过质膜的变形运动进入胞内的过程,也是病原感染细胞的常见感染途径,在病原感染宿主细胞的早期发挥作用(Mayor *et al.*, 2007);从内吞作用通路可以看出(图4),显著上调基因(*TGF $\beta$* 、*dynamin*、*ArfGAP*、*Arp2/3*和*caveolin*)参与了网格蛋白(clathrin)介导的内吞途径,而发动蛋白(dynamin)是该内吞途径重要的蛋白,在网格蛋白介导的内吞过程中发挥“剪刀”的作用,将网格蛋白包被小窝与质膜分离(彭镜等, 2011);显著下调基因(*TGF $\beta$ R*、*GPCR*和*Hsc70*)也参与了网格蛋白介导的内吞途径,并且G蛋白偶联受体(GPCR)信号通路受到了以 $\beta$ 抑制蛋白( $\beta$ -arrestion)为主的一系列辅助蛋白的负调节(殷琳等, 2019)。此外,吞噬作用在鱼类抵御病原细菌感染过程中发挥重要作用,对入侵的外源物质进行吞入和破坏(Zhao *et al.*, 2016; 王超等, 2020)。吞噬过程主要分3个步骤:首先,病原细菌黏附到吞噬细胞表面;其次,抗原受体复合物通过内吞途径形成吞噬体;最后,病原在吞噬体内被消除(Gotthardt *et al.*, 2002; 邵光富等, 2013; Keller *et al.*, 2017)。从吞噬体通路可以看出(图5),上调表达基因(*av $\beta$ 3*、*MR*和*TUBB*)在病原识别到加工、运输、呈递中发挥重要作用,吞噬细胞表面的受体(*av $\beta$ 3*和*MR*)首先识别病原,之后形成吞噬体,再通过微管蛋白(*TUBB*)等细胞骨架成分转运至溶酶体,微管蛋白在吞噬作用中起着重要作用(Gunning *et al.*, 2015)。

综上所述,本研究利用RNA-seq技术分析了翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌后的应答反应,获得多个显著差异表达基因,这些差异表达基因参与了重要的信号通路,尤其是免疫信号通路。研究结果为揭示翘嘴鲌感染嗜水气单胞菌的应答机制提供参考,为嗜水气单胞菌引起翘嘴鲌细菌性败血症的防治提供理论基础。

## 参 考 文 献

- AN W, XIAO Y, GAO X H, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Pseudomonas fluorescens* from *Siniperca chuatsi*. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(5): 760–765 [安伟, 肖雨, 高晓华, 等. 鳊源致病性荧光假单胞菌的分离与鉴定. 动物学杂志, 2014, 49(5): 760–765]
- CAO M, WANG X Q, QING C X, *et al.* Transcriptome analysis of *Palaemon carinicauda* subjected to hypoxic stress. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 112–123 [曹梅, 王兴强, 秦传新, 等. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 112–123]
- CHEN C F, SHI W Z, LI J, *et al.* A preliminary study on the immune response against *Cytophaga columnaris* of mandarin fish (*Siniperca chuatsi* B.). Journal of Huazhong Agricultural University, 1995, 14(4): 377–380 [陈昌福, 史维舟, 李静, 等. 翘嘴鲌对柱状嗜纤维菌免疫反应的初步研究. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 377–380]
- CHEN K, ZHANG Z, LI J, *et al.* Different regulation of branched-chain amino acid on food intake by TOR signaling in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). Aquaculture, 2021, 530: 735792
- CHEN N, JIANG J J, GAO X J, *et al.* Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 83: 410–415
- FAST M D, JOHNSON S C, JONES S R M. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ -1, TNF $\alpha$ -1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 2007, 22: 403–407
- FEI C. Zebrafish model-based transcription profiles of immune-related genes in responding to infection with wild type and attenuated strains of *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda*. Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2013, 46–48 [费超. 斑马鱼为动物模型对鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌野生株和减毒株感染应答的转录分析. 华东理工大学硕士学位论文, 2013, 46–48]
- GAO J W, LIANG L G, WANG Y B, *et al.* Identification and susceptibility test of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from *Siniperca chuatsi*. Microbiology China, 2016, 43(12): 2686–2692 [高金伟, 梁利国, 王亚冰, 等. 鳊源致病性维氏气单胞菌的鉴定及药敏试验. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2686–2692]
- GOTTHARDT D, WARNATZ H J, HENSCHEL O, *et al.* High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. Molecular Biology of the Cell, 2002, 13(10): 3508–3520
- GU T Z, LU C P, CHEN H Q. Invasion of an *Acinetobacter baumannii* strain isolated from mandarin fish. Chinese Journal of Veterinary Science, 2000, 20(5): 468–470 [顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌鳊鱼分离株的侵袭特性. 中国兽医学报, 2000, 20(5): 468–470]
- GUNNING P W, GHOSH DASTIDER U, WHITAKER S, *et al.* The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. Journal of Cell Science, 2015, 128(11): 2009–2019
- HUANG W F, LI H Y, ZHANG J Y. The pathogen of bacterial

- gill disease in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Microbiology China*, 1999, 26(4): 246–250 [黄文芳, 李海燕, 张剑英. 翘嘴鳊烂鳃病原的研究. *微生物学通报*, 1999, 26(4): 246–250]
- KELLER S, BERGHOFF K, KRESS H. Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17068
- LI X Y, LI Z Q, WANG Y Q, *et al.* Construction of *Aeromonas hydrophila* *acrA* deficient strain and determination of its physiological function. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(11): 63–69 [李小艳, 李泽琦, 汪玉倩, 等. 嗜水气单胞菌 *acrA* 缺失菌株的构建及其生理功能的测定. *生物技术通报*, 2020, 36(11): 63–69]
- LIU W J, YANG L S, LI X L, *et al.* Cloning and mRNA expression analysis of *Relish* gene in *Penaeus monodon* following immune stimulation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 50–60 [刘文静, 杨丽诗, 李晓兰, 等. 斑节对虾 *Relish* 基因的克隆及免疫刺激对其 mRNA 表达水平的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 50–60]
- LUO K, DI J, HAN P P, *et al.* Transcriptome analysis of the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) head kidney response to *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 83: 249–261
- MAYOR S, PAGANO R E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 603–612
- MCBEATH A J A, SNOW M, SECOMBES C J, *et al.* Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 230–241
- PENG J, WU L, ZHANG C L, *et al.* The functional domain of Dynamin- I and its role in the endocytosis of synaptic vesicles. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(2): 121–124 [彭镜, 吴蕾, 张慈柳, 等. Dynamin- I 的功能结构域及其在突触囊泡内吞过程中的作用. *生理科学进展*, 2011, 42(2): 121–124]
- QING L, YIN J G, ZHANG W, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from *Esox lucius* around Urumqi in Xinjiang. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 40–45 [秦莉, 殷建国, 张薇, 等. 白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 40–45]
- TAI G F, YAN Q P, XU X J, *et al.* Establishment of quantitative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 68–74 [邵光富, 鄢庆彬, 徐晓津, 等. 鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的建立. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 68–74]
- TIAN J Y, XIE H X, YAO W J, *et al.* Ontogenetic development of the pronephros and the distribution of B-lymphocytes in adult pronephros of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(3): 440–446 [田敬云, 谢海侠, 姚卫建, 等. 鳊鱼头肾的组织发生及成鱼头肾 B 淋巴细胞的分布. *动物学报*, 2005, 51(3): 440–446]
- WANG C, ZHANG L G, WU M M, *et al.* Important role of phagocytosis in the defense of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 346–354 [王超, 张龙岗, 吴蒙蒙, 等. 吞噬作用在尼罗罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌感染过程中的重要作用. *中国水产科学*, 2020, 27(3): 346–354]
- WANG Y, LIU W Z, FU S Z, *et al.* Etiology and genomic characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1181–1191 [王艺, 刘文珍, 傅松哲, 等. 一株从草鱼中分离的嗜水气单胞菌的病原学及基因组特征. *水产学报*, 2019, 43(4): 1181–1191]
- WU Y L, MIAO P F, YU H, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Edwardsiella tarda* in *Siniperca chuatsi*. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(4): 794–799 [吴勇亮, 苗鹏飞, 于辉, 等. 鳊鱼致病性迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及药敏试验. *南方农业学报*, 2018, 49(4): 794–799]
- XU D D, HAN P P, XIA L H, *et al.* A comparative transcriptome analysis focusing on immune responses of Asian swamp eel following infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2021, 539: 736655
- YANG D H, LIU Q, NI C S, *et al.* Gene expression profiling in live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: Insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 132–141
- YIN L, CHEN X, YANG X Y, *et al.* Mechanisms of  $\beta$ -arrestin-biased GPCR signal transduction and advances in drug research. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(1): 66–72 [殷琳, 陈熙, 杨秀颖, 等. 偏向  $\beta$ -抑制蛋白的 GPCR 信号传导机制及药物研究进展. *药科学报*, 2019, 54(1): 66–72]
- YUAN X Y, ZHANG X T, XIA Y T, *et al.* Transcriptome and 16S rRNA analyses revealed differences in the responses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to early *Aeromonas hydrophila* infection and immunization. *Aquaculture*, 2021, 541: 736759
- ZHANG C N, ZHANG J L, LIU M, *et al.* Molecular cloning, expression and antibacterial activity of goose-type lysozyme gene in *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 82: 9–16
- ZHANG M, WANG Z G, GAO F, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Aeromonas hydrophila* from *Pseudocrossocheilus bamaensis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(9): 2051–2060 [张曼, 王振光, 高峰,

- 等. 巴马拟缨鱼源嗜水气单胞菌分离鉴定及其致病力分析. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2051–2060]
- ZHANG Y, GAO X J, YE J M, *et al.* Molecular characterization and establishment of LAMP detection method of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from *Siniperca chuatsi*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(6): 1225–1231 [张悦, 高晓建, 叶金明, 等. 翘嘴鲈病原嗜水气单胞菌分子特征及 LAMP 检测方法的建立. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1225–1231]
- ZHAO L J, TU J G, ZHANG Y L, *et al.* Transcriptomic analysis of the head kidney of topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 57: 413–418

(编辑 马瑾艳)

## Transcriptomic Analysis of the Head Kidney of *Siniperca chuatsi* Infected with *Aeromonas hydrophila*

ZHU Xinhai, ZHANG Zirui, ZHOU Liying, TANG Huanyu, AO Shiqi, ZHOU Yifan, GAO Xiaojian, JIANG Qun, ZHANG Xiaojun<sup>①</sup>

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract** *Aeromonas hydrophila* is one of the main pathogens seriously endangering mandarin fish farming and production. In order to explore the changes in host gene expression levels in *A. hydrophila* infection, screen for immune-related genes, and analyze the molecular mechanism of *Siniperca chuatsi* infected with *Aeromonas hydrophila* in response to pathogenic bacterial infection. The head kidney tissues of the infected and control groups were collected 24 h after inoculation and used for mRNA extraction, and transcriptome sequencing was performed using high-throughput sequencing technology. A total of 53 040 single genes (unigenes) were obtained from the original sequencing data through de novo assembly. The results of gene differential expression analysis showed that there were 526 differentially expressed genes, of which 254 were upregulated and 272 were down-regulated in the infected and control groups. Among the differentially expressed genes, several key genes involved in the immune response, such as interleukin-8, interleukin-6 receptor, interleukin 17 receptor, lysozyme, complement receptor type 1, antigen processing and presentation, serine protease inhibitor, and E3 ubiquitin-protein ligase were present. Gene ontology analysis revealed that the different genes were mainly involved in immune response and inflammation. A KEGG analysis showed that there were 89 significantly enriched and immune-related metabolic pathways mainly involved with endocytosis and phagosomes. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) verification was performed on seven DEGs, and the results showed that RT-qPCR was consistent with RNA-Seq analysis. These results lay a theoretical foundation for a follow-up study of gene function and in-depth exploration of the molecular defense mechanism of *S. chuatsi* against pathogenic microorganism infection.

**Key words** *Siniperca chuatsi*; *Aeromonas hydrophila*; Transcriptome; Different expression gene

① Corresponding author: ZHANG Xiaojun, E-mail: zxj9307@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210422001

http://www.yykxjz.cn/

李英瑕, 徐婷婷, 刘爽, 万晓媛, 张庆利. 虾肝肠胞虫(EHP)现场快速高灵敏度检测试剂盒的性能评价研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 218–225

LI Y X, XU T T, LIU S, WAN X Y, ZHANG Q L. Validation of a highly sensitive kit for the rapid detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in field. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 218–225

# 虾肝肠胞虫(EHP)现场快速高灵敏度 检测试剂盒的性能评价研究\*



李英瑕<sup>1,2</sup> 徐婷婷<sup>2</sup> 刘爽<sup>2</sup> 万晓媛<sup>2</sup> 张庆利<sup>2①</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 近年来, 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)流行使我国养殖对虾遭受严重经济损失, 现场快速检测是 EHP 防控的重要技术保证。本研究对本实验室研发的 EHP 现场快速检测试剂盒的分析特异性(ASp)、分析灵敏度(ASe)、诊断特异性(DSp)、诊断灵敏度(DSe)、重复性和稳定性 6 项性能参数开展了系统评估。ASp 测试显示, 该试剂盒与对虾白斑综合征病毒(WSSV)、偷死野田村病毒(CMVN)、虾血细胞虹彩病毒(SHIV)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*VP<sub>AHPND</sub>*)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)等 5 种对虾常见病原及健康对虾无交叉反应; ASe 测试显示, 该试剂盒检测下限为  $10^1$  copies/反应; 以 EHP TaqMan RT-qPCR 方法为标准, 比较了试剂盒对 298 份临床样品的测试结果, 试剂盒的 DSp 为 99.2%、DSe 为 91.7%; 试剂盒对 EHP 阴性样品及强阳性样品的检测重复率为 100%, 弱阳性样品检测重复率为 95.8%; 试剂盒在  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $-40^{\circ}\text{C}$  条件下分别可保存 7 个月和 12 个月以上。研究表明, 本实验室研制的 EHP 现场快速检测试剂盒具操作简便、快速、灵敏度高、特异性强、重复性好和稳定性强等优点, 可满足对虾养殖现场对 EHP 的高灵敏度检测。

**关键词** 虾肝肠胞虫; 环介导等温扩增; 试剂盒; 现场快速检测; 性能参数评价

**中图分类号** S945.1+9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0218-08

微孢子虫感染对虾肝胰腺最早发现于马来西亚养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*)中(Anderson *et al.*, 1989)。Hudson 等(2001)报道, 日本对虾(*Penaeus japonicus*)中也存在微孢子虫感染。Chayaburakul 等(2004)发现, 泰国养殖斑节对虾生长缓慢可能与包括

微孢子虫在内的多种病原有关。Tourtip 等(2009)将感染对虾肝胰腺的一类微孢子虫正式命名虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)。此后, 越南、印度尼西亚、印度、中国、委内瑞拉等国家养殖对虾中都相继检出 EHP (Jaroenlak *et al.*, 2018)。近年来, EHP

\* 国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39; 2021XT0602)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项目(20603022020005)共同资助 [This work was supported by National R&D Program of China (2017YFC1404503), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39; 2021XT0602), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020005)].  
李英瑕, E-mail: 18754809158@163.com

① 通信作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-22, 收修改稿日期: 2021-06-01

在我国养殖对虾中流行率居高不下,已成为危害我国养殖对虾的重要病原之一(农业农村部渔业渔政管理局等, 2020)。

EHP 在分类上属微孢子纲(Microsporea)、肠胞虫科(Enterocytozoonidae)、肠胞虫属(*Enterocytozoon*) (Sprague *et al*, 1992; Tourtip *et al*, 2009)。对虾感染 EHP 后生长缓慢,但通常不会发生死亡(Biju *et al*, 2016; 黄健等, 2016; 姜宏波等, 2020); EHP 感染对虾早期可正常摄食、无明显病症(Remany *et al*, 2017), 感染 2~3 个月后才出现摄食减少、生长缓慢甚至停止生长等现象(胡吉卉等, 2020; Aranguren *et al*, 2017), 给对虾养殖产业造成极大的经济损失(宋增磊等, 2019)。目前,尚无商品化药物可有效杀灭对虾体内的 EHP, 对虾养殖过程中开展 EHP 早期检测或监测, 阻断其进入养殖系统极为重要。EHP 直径仅为 1  $\mu\text{m}$ , 用光镜直接观察和确认较为困难(Tourtip *et al*, 2009), 而 EHP 的组织学检测法流程繁琐、耗时长, 且极易漏诊。分子生物学方法更适用于 EHP 检测, 目前最常用的方法为套式 PCR 和荧光定量 PCR 法, 但这 2 种方法需要基因扩增仪等精密仪器, 限制了其在基层养殖现场的应用。

作者前期利用环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术建立了 EHP 的现场快速检测法, 开发制备了其现场检测试剂盒。为系统测试该检测试剂盒的检测性能参数, 本研究参照世界动物卫生组织(OIE)《水生动物诊断手册》、农业农村部公告第 683 号和质检行业标准等规范性文件要求, 对试剂盒的分析特异性(analytical specificity, ASp)、分析灵敏度(analytical sensitivity, ASe)、诊断特异性(diagnostic sensitivity, DSe)、诊断灵敏度(diagnostic specificity, DSp)、重复性和稳定性等性能开展了系统测试和评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原阳性样品及实验动物

虾肝肠胞虫(EHP)、偷死野田村病毒(CMVN)、白斑综合征病毒(WSSV)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp*<sub>AHPND</sub>)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)和虾血细胞虹彩病毒(SHIV)等病原阳性核酸由作者实验室制备保存。

2019 年 10 月从山东省海阳市某养殖场购入健康凡纳滨对虾活虾 250 尾, 经 TaqMan 探针荧光定量 PCR (TaqMan-qPCR)方法检测显示为 EHP 阴性。从

山东省潍坊某养殖场采集典型生长缓慢症状凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)样品, 其中 48 份样品经 TaqMan-qPCR 法(Liu *et al*, 2018)检测为 EHP 阳性, 将其作为 EHP 阳性病料样品。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器: ABI VERITI 96-Wel 梯度 PCR 仪(美国, 加利福尼亚), BIO-Rad CFX 实时荧光定量 PCR 仪(美国, 加利福尼亚); Eppendorf 离心机(德国, Saxony), 博日恒温金属浴(中国, 杭州), 佳能 70D 照相机(日本, 大分县)。

主要试剂: FIP/BIP/F3/B3/LF/LB 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司], Ex Taq 酶, 10 $\times$ Isothermal Amplification Buffer, MgSO<sub>4</sub>, Betaine(Sigma, 美国), dNTPs (索莱宝, 中国, 北京)以及 *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA Polymerase (NEB, 美国), TIANGEN (中国, 北京)海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa (中国, 大连)质粒小提取试剂盒。

### 1.3 组织样品 DNA 提取

对 1.1 中的 298 份样品进行编号, 每尾对虾用医用刀片切取鳃与肝胰腺组织 60 mg, 将样品均分为两份: 一份为检测样品, 按海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒制备组织 DNA, 溶解于 60  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液(TE)中, Thermo NanoDrop 2000c 测定核酸浓度, 并保存于-40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中; 另一份样品同上编号, 用冻存管保存, 用于 EHP 诊断灵敏度和诊断特异性测试。

### 1.4 EHP 靶基因重组质粒标准品制备

为比较检测试剂盒和 TaqMan-qPCR 检测的灵敏度, 用试剂盒的 2 条外引物(表 1 F3 和 B3)对 EHP 阳性核酸进行 PCR 扩增, 获得包含有 EHP 靶基因的目标片段, 按照李小平(2018)的方法构建含 EHP 片段的重组质粒。TaKaRa 质粒提取试剂盒提取重组质粒 DNA, NanoDrop 2000c 测定重组质粒 DNA 浓度, 质粒置于-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按下列公式计算质粒拷贝数:

拷贝数=6.02 $\times 10^{23}$  拷贝数/摩尔 $\times$ (质粒浓度)/(含插入片段的质粒长度 $\times 660$ )。

适量 1 $\times$ TE 缓冲液对已知拷贝数的 EHP 阳性质粒 DNA 进行 10 倍浓度梯度稀释, 制备浓度为 5.05 $\times 10^0$ ~5.05 $\times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  EHP 阳性质粒标准品, -80 $^{\circ}\text{C}$  保存, 用于分析灵敏度测定。

扩增 EHP 靶基因片段的 PCR 反应体系: 2 $\times$  Reaction buffer 12.5  $\mu\text{L}$ ; EHP-F1 (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ ; EHP-R1 (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ ; 无菌双蒸水 10  $\mu\text{L}$ ; PCR

表1 EHP-LAMP引物序列  
Tab.1 EHP-LAMP primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
FIP	CGTTTGGTTCGACAGTCCAATTTTTATGAGTAACAATATAAAACATGA
BIP	GAGGCGTCACAGAAGTAGACATTTTCCCGTATTCTCAATGTCTACAC
F3	GTGCAATTTAATAGGAGAACATC
B3	GAATGGTAAGCTCCCCAC
LF	CGTGAGAATAGTCAGTT
LB	ACATACACCTATCATCCCGGAAG

反应程序：94℃变性 5 min；30 个循环：94℃ 30 s，59℃ 30 s，72℃ 30 s；72℃延伸 5 min。

### 1.5 EHP 检测试剂盒检测流程

EHP 现场快速检测试剂盒按以下步骤开展样品检测：

(1)样品采集：将待测对虾样品置于无菌培养皿中，用医用刀片切取黄豆粒大小的肝胰腺组织，放入试剂盒的样品采集管中，快速将组织样品研磨成浆状，将采样用膜片放入浆状样品中充分浸润，随后把膜片转移到采样用膜片小管中。

(2)膜片处理：向采样用膜片小管内加入 30 μL 试剂盒提供的 A 液，轻轻搅动膜片 10 s 后，将采样用膜片转移至装有漂洗液的管内震荡漂洗 1 min，然后将漂洗完的采样用膜片和试剂盒提供的阴性对照膜片、阳性对照膜片转移至核酸变性管内，95℃保温 3 min，取出置于室温冷却 2 min。

(3)扩增反应：将上述变性冷却后的膜片转移到对应编号的核酸检测管内，在 63℃条件下保温 60 min 进行扩增反应。

(4)检测管显色：将检测管置于 95℃的金属浴中保温 3 min，然后取出检测管，将其迅速上下用力甩动 10 s，使检测管内盖上预置的核酸染料融化并与检测管内的反应液充分混匀。

(5)结果判定：待检测管温度降至室温后，将其放置于黑色背景下观察颜色；加入阴性膜片的检测管为橙红色，加入阳性膜片的反应管为荧光绿色，根据试剂盒自带的比色卡判断样品的检测结果。

### 1.6 EHP 检测试剂盒性能参数评价

**1.6.1 分析特异性(ASp)测试** 随机选取 4 套同一批制成的 EHP 现场快速高灵敏检测试剂盒，分别检测 EHP、CMNV、WSSV、V<sub>PAHPND</sub>、SHIV 和 IHNV 的阳性核酸样品，每份样品做 3 个重复。具体检测方法：各取 1 μL 上述阳性核酸样品直接加入检测管内，63℃金属浴中保温 60 min 后显色，评估试剂盒的 ASp。



图1 EHP 现场快速检测试剂盒  
Fig.1 High sensitive kit for rapid detection of EHP in field

**1.6.2 分析灵敏度(ASe)测试** 为了测试 EHP 现场快速高灵敏检测试剂盒检测 EHP 标准质粒样品的分析灵敏度，以  $5.05 \times 10^0 \sim 5.05 \times 10^7$  copies/μL 的 EHP 阳性质粒标准品为模板，分别采用试剂盒(同一批制作的试剂盒随机选取 20 套)及套式 PCR 方法进行 ASe 测试。试剂盒检测的具体流程为：将  $5.05 \times 10^0 \sim 5.05 \times 10^7$  copies/μL 的 EHP 阳性质粒标准品在 95℃预变性 5 min，然后取 1 μL 加入试剂盒检测管，将检测管放入 63℃金属浴中保温 60 min 进行显色反应。 $5.05 \times 10^7 \sim 5.05 \times 10^3$  copies/μL 及  $5.05 \times 10^0$  copies/μL 的 EHP 阳性质粒标准品设置 3 个重复， $5.05 \times 10^2 \sim 5.05 \times 10^1$  copies/μL EHP 阳性质粒标准品设置 10 个重复。ASe 的检测结果根据 50%平行样品检出阳性结果的最低 EHP 阳性质粒标准品浓度来决定。

### 1.6.3 诊断特异性(DSp)和诊断灵敏度(DSe)测试

根据 OIE《水生动物诊断手册》1.2 章“感染性疫病诊断分析验证的原理和方法”中关于若拟使 DSp 和 DSe 测试的可靠性在“95%以上置信区间、允许误差 2%范围”内，需要利用试剂盒和参比方法对 279 份或以上临床样品进行逐个检测并对比的要求。本研究利用 EHP 现场快速高灵敏检测试剂盒和已报道的 EHP TaqMan-qPCR 法对 298 份临床样品进行对比测

试, 然后根据试剂盒检测与 TaqMan-qPCR 检测的结果, 利用根据计算公式:  $DSp = \frac{\text{试剂盒阴性数}}{\text{试剂盒阴性数} + \text{试剂盒假阳性数}} \times 100\%$ ,  $DSe = \frac{\text{试剂盒阳性数}}{\text{试剂盒阳性数} + \text{试剂盒假阴性数}} \times 100\%$ , 对 EHP 检测试剂盒的 DSp 和 DSe 进行评估。

**1.6.4 重复性实验** 用 EHP TaqMan-PCR 法检测患病对虾临床组织样品 DNA, 根据检测结果确定“在 30 个循环内起峰的临床组织样品作为 EHP 强阳性样品”、“在 30~35 个循环内起峰的临床组织样品作为 EHP 弱阳性样品”、“在 39 个循环内未起峰的临床组织样品作为 EHP 阴性样品”(Liu *et al.*, 2018), 并利用上述 3 类临床组织样品对 EHP 的现场快速高灵敏检测试剂盒进行重复性测试。利用上述 3 类临床组织样品对同一批次生产的 EHP 检测试剂盒进行批内重复性测试, 利用上述 3 类临床组织样品对 3 个批次生产的 EHP 检测试剂盒进行批次间重复性测试。将 EHP 检测试剂盒的采样用膜片分别浸润于待测的 3 类临床组织样品匀浆液中, 然后按照试剂盒说明书要求进行膜片漂洗和变性处理, 最后, 将每类临床组织样品浸润的膜片(EHP 强阳性、弱阳性、阴性)置于 8 个 EHP 检测管中进行扩增, 扩增结束后观察检测管显色情况, 并根据试剂盒提供的比色卡统计记录检测结果情况: 检测管中荧光绿色信号强度为比色卡中 3 个以上“+”, 判为强阳性; 检测管中荧光绿色信号强度为比色卡中 1~2 个“+”, 判为弱阳性; 检测管中荧光绿色信号强度为比色卡中“-”, 判为阴性。

**1.6.5 稳定性测试** 抽取 3 个批次生产的试剂盒, 每个批次的试剂盒均分为 2 组分别进行稳定性测试。2 组稳定性测试实验为: 第 1 组试剂盒全程在  $-40^{\circ}\text{C}$  储存, 前 12 个月每 4 个月抽检 1 次; 第 2 组试剂盒全程在  $-20^{\circ}\text{C}$  储存, 每月抽检 1 次, 每次抽检同一批试剂盒中的 3 个检测管。为了保证测试的可靠性和可比性, 采用  $5.05 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{L}$  的 EHP 阳性质粒标准品作为模板用于 EHP 检测试剂盒的稳定性测试。测试过程中, 根据反应后 EHP 检测管显色与试剂盒内标准比色卡的比对结果判断 EHP 试剂盒内扩增体系是否有效。

## 2 结果

### 2.1 分析特异性(ASp)测试结果

当利用 WSSV、 $Vp_{AHPND}$ 、CMNV、IHHNV 和 SHIV 等 5 种病原的阳性核酸样品进行测试时, 本研究 EHP 检测试剂盒的检测管均显示为橙红色, 判断为 EHP 阴性; 3 份 EHP 阳性核酸样品经检测, 其检测管均显

示为绿色, 判断为 EHP 阳性。上述结果表明, 本研究的 EHP 检测试剂盒与上述 5 种对虾病原核酸均无交叉反应(图 2)。

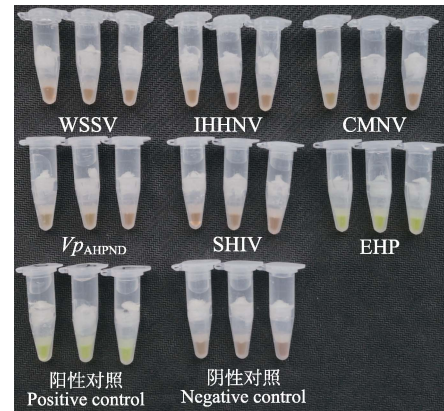


图 2 EHP 检测试剂盒的 ASp 测试结果  
Fig.2 The result of analytical specificity of the EHP detection kit

### 2.2 分析灵敏度(ASe)测试结果

利用 EHP 检测试剂盒与 TaqMan-qPCR 方法对 EHP 阳性质粒标准品的 10 倍梯度稀释液( $5.05 \times 10^0 \sim 5.05 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ )分别进行检测, 依据检测结果判定 EHP 的检测试剂盒相比于 TaqMan-qPCR 方法的分析灵敏度(ASe)。测试结果显示, 当检测管中加入  $10^3 \sim 10^7$  拷贝的 EHP 阳性质粒标准品时, 检测管显色后均为亮绿色, 颜色亮度均在比色卡“+++”阳性显色亮度以上; 当检测管中加入  $10^2$  拷贝的 EHP 阳性质粒标准品时, 检测管显示的绿色亮度在比色卡“++”水平; 当检测管中加入  $10^1$  拷贝的 EHP 阳性质粒标准品时, 检测管显示的绿色亮度处于比色卡“++”~“+”水平, 但 EHP 检测试剂盒对  $10^1$  拷贝 EHP 阳性质粒标准品的检出率为 50%; 另外, 试剂盒检测  $10^0$  拷贝 EHP 阳性质粒标准品时, 其显色为橙色, 检测结果判定为阴性。综合上述结果, EHP 检测试剂盒的 ASe 为  $10^1 \text{ copies}/\text{反应}$ (图 3)。

### 2.3 诊断特异性(DSp)和诊断灵敏度(DSe)测试结果

利用 EHP TaqMan-qPCR 方法对 298 份临床样品进行检测分析, 检测结果显示, 其中 48 份样品为 EHP 阳性、250 份样品为 EHP 阴性。利用 EHP 检测试剂盒对上述临床样品进行检测的结果显示, 48 份 TaqMan-qPCR 方法检测为阳性的临床样品中 44 份为 EHP 检测试剂盒测试的阳性、4 份为阴性, 250 份 TaqMan-qPCR 方法检测为阴性的临床样品中 2 份为 EHP 检测试剂盒测试的阳性、248 份为阴性。计算得



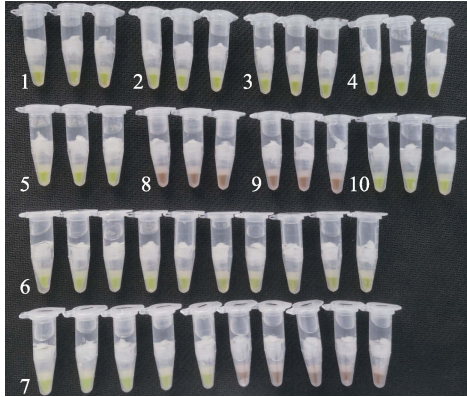


图3 EHP的检测试剂盒相比于TaqMan-qPCR检测方法 ASe测试结果

Fig.3 Comparison of analytical sensitivity of EHP TaqMan-qPCR and the EHP detection kit

1~8:  $5.05 \times 10^7$ ,  $5.05 \times 10^6$ ,  $5.05 \times 10^5$ ,  $5.05 \times 10^4$ ,  $5.05 \times 10^3$ ,  $5.05 \times 10^2$ ,  $5.05 \times 10^1$ ,  $5.05 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L;  
9: Negative control; 10: Positive control.

出,该EHP检测试剂盒相比于EHP TaqMan-qPCR方法的DSp为99.2%,DSe为91.7%(表2)。

#### 2.4 重复性测试结果

利用3个批次生产的EHP检测试剂盒分别测试经TaqMan-qPCR方法鉴定为阴性、弱阳性和强阳性的3组匀浆的对虾组织样品,每组测试8个检测管。测试结果显示,对于阴性样品和强阳样品,EHP检测

试剂盒的批内及批间检测管重复性均为100%;对于弱阳性样品,3个批次检测试剂盒的批内重复性依次为100%、87.5%和100%,3个批间检测试剂盒的重复性为95.8%(表3)。

#### 2.5 稳定性测试结果

对保存于不同温度条件下的EHP检测试剂盒的测试结果显示(图4、图5),EHP检测试剂盒在 $-20^{\circ}\text{C}$ 条件下保存7个月时均能够检测出含 $10^5$  copies/ $\mu$ L的EHP阳性质粒标准品,显色亮度相当于试剂盒比色卡上“+++”阳性绿色荧光强度;EHP检测试剂盒在 $-40^{\circ}\text{C}$ 条件下保存12个月时均能够检测出含 $10^5$  copies/ $\mu$ L的EHP阳性质粒标准品,显色亮度相当于试剂盒比色卡上“+++”阳性绿色荧光强度。因此,EHP试剂盒在 $-20^{\circ}\text{C}$ 条件下的保存期至少为7个月,在 $-40^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存期至少为12个月。

### 3 讨论

本研究对作者实验室前期研发的EHP现场快速高灵敏检测试剂盒的6个性能参数进行了测试和评估。特异性测试结果表明,该试剂盒能特异性地扩增EHP,具有很高的特异性;ASe测试结果表明,该试剂盒的检测管最低可检测 $10^1$  copies/反应的目标核酸,具有较高的灵敏度。本研究中,EHP检测试剂盒的ASe

表2 试剂盒对不同状态样品检测结果

Tab.2 The detecting results of different samples

项目 Items	参考样品数 Number of reference samples	
	TaqMan-qPCR 确认的阳性样品(48) Positive samples confirmed by TaqMan-qPCR (48)	TaqMan-qPCR 确认的阴性样品(250) Negative samples confirmed by TaqMan-qPCR (250)
EHP 检测试剂盒测试为阳性 Detected EHP positive of kit	44	2
EHP 检测试剂盒测试为阴性 Detected EHP negative of kit	4	248
结果计算 Calculation result	DSe=91.7%	DSp=99.2%

表3 EHP检测试剂盒的重复性测试结果

Tab.3 The repeatability test result of the EHP detection kit

生产批次 Production batch	阴性样品 Samples confirmed as negative	弱阳性样品 Samples confirmed as weak positive	强阳性样品 Samples confirmed as strong positive
20191128	8 : 0 : 0	0 : 3 : 5	0 : 0 : 8
20191204	8 : 0 : 0	1 : 2 : 5	0 : 0 : 8
20191206	8 : 0 : 0	0 : 2 : 6	0 : 0 : 8

注:数据结果为试剂盒检测的样本数,表示为阴性数:弱阳性数:强阳性数。

Note: The results are the numbers of samples detected using the kit and display in the way: Number of negatives : Number of weak positives : Number of strong positives.

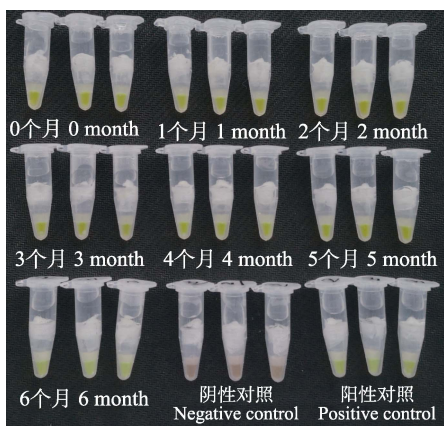


图4  $-20^{\circ}\text{C}$  储存条件下试剂盒的稳定性测试结果  
Fig.4 The stability test result of EHP detection kit stored at  $-20^{\circ}\text{C}$

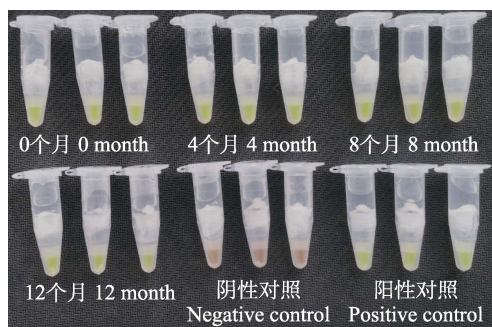


图5  $-40^{\circ}\text{C}$  储存条件下试剂盒的稳定性测试结果  
Fig.5 The stability test result of EHP detection kit stored at  $-40^{\circ}\text{C}$

比马芳等(2016)评估的基于等温扩增技术的 WSSV 现场快速高灵敏度检测试剂盒 ASe ( $10^2$  copies/反应)略高。在开展 EHP 现场快速高灵敏检测试剂盒 ASp 和 ASe 测试过程中,为提高测试结果的可靠性与可信度,本研究根据 OIE《水生动物诊断手册》要求,利用 EHP 检测试剂盒对 298 份临床样品进行了测试分析,与 EHP TaqMan RT-qPCR 方法相比,该试剂盒的 DSp 为 99.2%、DSe 为 91.7%,表现出了优异的诊断性能。从总体上看,本研究 EHP 检测试剂盒诊断性能与参比的 EHP TaqMan RT-qPCR 基本相当,能较好地满足现场快速和高灵敏检测 EHP 的需要。

检测试剂盒生产过程中相同批次/不同批次产品间诊断性能的稳定性,即不同试剂盒检测同类样本的可重复性,对于保障用户使用过程中检测结果的可靠性非常重要。本研究对 EHP 检测试剂盒可重复的测试结果表明,对于阴性样品和强阳样品,试剂盒的批内及批间检测管的重复性均为 100%,表现稳定;对于弱阳性样品,3 个生产批次试剂盒批内的重复性依次为 100%、87.5%和 100%,推测这是由于该试剂盒

检测灵敏度略低于用于样品分类(强阳性、弱阳性和阴性)的 TaqMan RT-qPCR 方法所导致的,上述研究中该试剂盒 DSe 为 91.7% (与 DSp 相比未超过 99%)也从侧面佐证了这一点。对不同批次 EHP 检测试剂盒的重复性测试发现,3 个检测试剂盒批次间,EHP 检测管检测结果的可重复性为 95.8%,性能表现稳定。分析上述结果可以得出,EHP 检测试剂盒具有良好的可重复性。

水产病原检测试剂盒从生产到现场使用一般需要经历生产存储、运输、分销商存储以及用户存储等多个环节。因此,具备良好的存储稳定性也是一款病原检测试剂盒必须满足的条件之一。本研究开展的 EHP 检测试剂盒的稳定性测试结果显示,在  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下存储 7 个月,在  $-40^{\circ}\text{C}$  条件下存储 12 个月,试剂盒的检测性能仍能够保持有良好的稳定性。这说明,该试剂盒在  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $-40^{\circ}\text{C}$  的条件下储藏均能够满足实际生产、分销等过程对较长仓储期限的需要。

综上所述,本研究开发的 EHP 现场快速高灵敏度检测试剂盒不仅具有操作简便、无需复杂设备即可使用的优点,同时其特异性、灵敏度、重复性和稳定性等性能参数均表现优良,可为对虾 EHP 的现场诊断提供快速、灵敏、简捷的检测技术,有助于提高对虾养殖企业或对虾疫病检测基层单位对 EHP 的检测能力,具有较高的实际应用价值。

## 参 考 文 献

- ANDERSON I G, SHARIFF M, NASH G. A hepatopancreatic microsporidian in pond-reared tiger shrimp, *Penaeus monodon*, from Malaysia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 53(2): 278-280
- ARANGUREN L F, HAN J E, TANG K F J. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2017, 471: 37-42
- BIJU N, SATHIYARAJ G, RAJ M, et al. High prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimps *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* sampled from slow growth ponds in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(3): 225-230
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2020*. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- CHAYABURAKUL K, NASH G, PRATANPIPAT P, et al.

- Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89–96
- HU J H, LI Z M, DUAN J C, *et al.* Advances in epidemiological studies of *Enterocytozoon hepatopenaei* cysts in shrimp. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(11): 1–4, 10 [胡吉卉, 李正民, 段健诚, 等. 虾类肝肠胞虫流行病学研究进展. *水产养殖*, 2020, 41(11): 1–4, 10]
- HUANG J, ZENG L B, DONG X, *et al.* Trend analysis and policy recommendation on aquatic biosecurity in China. *Engineering Science*, 2016, 18(3): 15–21 [黄捷, 曾令兵, 董宣, 等. 水产生物安保发展趋势与政策建议. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 15–21]
- HUDSON D A, HUDSON N B, PYECROFT S B. Mortalities of *Penaeus japonicus* prawns associated with microsporidian infection. *Australian Veterinary Journal*, 2001, 79(7): 504–505
- JAROENLAK P, BOAKYE D W, VANICHVIRIYAKIT R, *et al.* Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Parasites and Vectors*, 2018, 11(1): 177
- JIANG H B, CHEN Y W, CHEN Q J. Research progress of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2020, 51(3): 370–376 [姜宏波, 陈裕文, 陈启军. 虾肝肠胞虫病的研究进展. *沈阳农业大学学报*, 2020, 51(3): 370–376]
- LI X P. Establishment and application of nucleic acid detection techniques for two emerging shrimp viruses. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [李小平. 两种对虾新发病毒核酸检测技术的建立及应用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LIU Y M, QIU L, SHENG A Z, *et al.* Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 151: 191–196
- MA F, ZHANG Q L, WANG X Y, *et al.* Validation of the LAMP-based high sensitive detection kit for rapid use on field for white spot syndrome virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(4): 316–321 [马芳, 张庆利, 万晓媛, 等. 基于 LAMP 技术的对虾白斑综合征病毒现场快速高灵敏度检测试剂盒的评价. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(4): 316–321]
- REMANY M C, CYRIAC D, RAJU P K K V, *et al.* Haematological parameters as predictive indicators of stress induced mortality in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during transboundary shipment. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 2017, 46(7): 1440–1446
- SONG Z L, DONG X, ZHAO R H, *et al.* Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 122–132 [宋增磊, 董宣, 赵若恒, 等. 基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 122–132]
- SPRAGUE V, BECNEL J J, HAZARD E I. Taxonomy of phylum microspora. *Critical Reviews in Microbiology*, 1992, 18(5/6): 285–395
- TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29

(编辑 马瑾艳)

## Validation of a Highly Sensitive Kit for the Rapid Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Field

LI Yingxia<sup>1,2</sup>, XU Tingting<sup>2</sup>, LIU Shuang<sup>2</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>2</sup>, ZHANG Qingli<sup>2①</sup>

(1. National Experimental Teaching Demonstration Centre for Aquatic Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) has caused serious losses in shrimp aquaculture in China in recent years. For cultured shrimp, disease prevention cannot be carried out by vaccination because of the lack of specific immune mechanisms. The most effective measure to prevent disease outbreaks is to conduct on-site rapid pathogen detection as far as possible for relatives or seedlings or to carry out on-site detection early in the onset of shrimp, timely detection, and identification of pathogens. There is, therefore, an urgent demand for rapid detection techniques and kits for controlling and preventing EHP. A novel, highly sensitive kit, developed in our laboratory, can achieve rapid detection of EHP in the field by optimizing the three steps of tissue nucleic acid extraction, nucleic acid amplification, and nucleic acid detection, and provide a practical solution for early rapid screening and detection of shrimp EHP disease. To validate the newly developed highly sensitive kit for rapid EHP detection in the field, a systematic evaluation of the six performance parameters of the kit was carried out in this study. The analytical specificity results showed that the kit did not cross-react with the DNA/RNA extracted from healthy shrimp or shrimp infected with five other pathogens, including WSSV, CMNV, SHIV, *Vp<sub>AHPND</sub>*, and IHNV. The analytical sensitivity analysis showed that the detection limit was 10<sup>1</sup> copies/μL with shrimp DNA preparation. The diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were determined to be 91.7% and 99.2%, respectively, in tests of 298 clinical samples, in comparison with the TaqMan qPCR protocol of EHP. The repeatability was 100% for strongly positive and negative samples and 95.8% for weakly positive samples. The period of validity of the kit was tested and found to be over 7 months at -20°C storage and over 12 months at -40°C. The study results demonstrated that the kit is a simple, sensitive, specific, and accurate tool for the rapid detection of EHP in practical applications.

**Key words** EHP; LAMP; Kit; On-site rapid detection; Performance parameter evaluation

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210420002

http://www.yykxjz.cn/

王仁宝, 王一婷, 张惠芬, 宋晓玲, 万晓媛, 谢国驹, 史成银. 口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护效果. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 226–233

WANG R B, WANG Y T, ZHANG H F, SONG X L, WAN X Y, XIE G S, SHI C Y. Protective effects of oral specific egg yolk immunoglobulins (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 226–233

## 口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾 抗 WSSV 感染的免疫保护效果\*



王仁宝<sup>1,2</sup> 王一婷<sup>1,3</sup> 张惠芬<sup>1,3</sup> 宋晓玲<sup>1</sup>  
万晓媛<sup>1</sup> 谢国驹<sup>1</sup> 史成银<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023)

**摘要** 为探讨特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的免疫保护机制及效果,本研究以添加不同剂量 WSSV 卵黄抗体制剂(0、0.2%和 0.5%)的饲料投喂凡纳滨对虾幼虾,免疫 28 d 后使用 WSSV 进行人工感染,测定感染对虾的肝胰腺免疫酶活力和免疫基因表达水平,以及感染后 14 d 内对虾的存活率。结果显示, WSSV 感染 3 d 后,与未添加卵黄抗体制剂的对照组相比,0.2%免疫组对虾肝胰腺的超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力显著升高,酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活力显著降低,热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)表达水平显著升高,凝集素基因(*lectin*)和  $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因( $\beta$ -*GBP-HDL*)表达水平显著降低;0.5%免疫组对虾肝胰腺的 SOD 活力显著升高,ACP 和 AKP 活力显著降低,*Hsp70* 基因表达水平显著升高, $\beta$ -*GBP-HDL* 基因表达水平显著降低。人工感染实验结果显示, WSSV 感染 14 d 后,0.2%和 0.5%免疫组对虾的存活率分别为 48.89%和 87.78%,均显著高于对照组(存活率为 0),且 0.5%免疫组对虾存活率显著高于 0.2%免疫组。特异性卵黄抗体制剂能在一定程度上改变发病的进程,延迟对虾的发病和死亡时间,提高同期存活率。研究表明,口服特异性卵黄抗体制剂可以调节对虾肝胰腺免疫酶活力和免疫基因表达水平,显著提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力。本研究为卵黄抗体抗 WSSV 感染机制的研究提供了参考,也为在生产上使用卵黄抗体防控 WSSV 感染提供了科学依据。

**关键词** 卵黄抗体; 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒; 免疫酶活力; 免疫基因表达; 抗病力

**中图分类号** S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0226-08

\* 农业农村部农业国际合作交流项目、国家自然科学基金(31802342)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39)共同资助 [This work was supported by Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Natural Science Foundation of China (31802342), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39)]. 王仁宝, E-mail: wangrenbaovip@163.com

① 通信作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-20, 收修改稿日期: 2021-06-07

白斑综合征是由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的水生动物重大传染病,是我国一类动物疫病。该病自 20 世纪 90 年代初暴发后,给我国蓬勃发展的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖造成了毁灭性打击,并迅速扩散至亚洲、美洲和地中海周边等主要的对虾养殖国家和地区,成为全球性的养殖对虾流行病。WSSV 的宿主范围极广,可感染几乎所有的水生十足目(Decapoda)甲壳类(OIE, 2016)。1997 年起,世界动物卫生组织(OIE)将白斑综合征列入疫病名录,在国际贸易中需进行重点检疫和防控。

近年来,免疫增强剂、中草药、益生菌和水产疫苗等一系列环境友好型的制剂或药物被应用于防治白斑综合征(周进等, 2003; Citarasu, 2009; 孙博超等, 2019)。卵黄抗体(immunoglobulin of yolk, IgY)是鸟类主要的免疫球蛋白,经抗原刺激的母鸡会产生特异性的 IgY,并在卵黄中大量累积。IgY 能与抗原特异性结合,通过中和作用保护机体(Warr *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2011)。IgY 化学性质稳定,生产成本低、收集和纯化过程操作方便,且符合动物福利,作为传统疫苗的替代品已被越来越多地应用于水产养殖疾病防控中。袁雪梅等(2020)研究发现,特异性卵黄抗体对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)弹状病毒具有明显的中和作用。Qin 等(2018)研究发现,特异性卵黄抗体可促进团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的感染。Gao 等(2016)研究发现,特异性卵黄抗体可提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)感染的的能力。在使用特异性卵黄抗体防控白斑综合征方面, Lu 等(2009)研究发现,其制备的 WSSV 卵黄抗体投喂克氏原螯虾(*Procambarus clarkiaii*),可显著降低 WSSV 攻毒后虾的死亡率。Fu 等(2010)研制了 WSSV 卵黄抗体,分析了其生理生化特性,投喂中国明对虾后可显著提高 WSSV 攻毒对虾的存活率。韦嵩等(2009)研究发现,口服特异性卵黄抗体可提高凡纳滨对虾免疫酶活力,并增强对虾抗 WSSV 感染的能力。但目前的研究多以特异性卵黄抗体的制备、生理生化特性分析和应用效果评价为主,较少涉及卵黄抗体对对虾非特异性免疫功能的影响,尚未见有口服卵黄抗体对 WSSV 感染后对虾免疫酶活力及免疫基因表达水平影响的研究。

本研究将不同剂量的 WSSV 卵黄抗体添加到饲料中投喂凡纳滨对虾幼虾,28 d 后用 WSSV 人工感染免疫对虾,测定对虾肝胰腺的免疫酶活力及免疫基因表达水平,以及感染后 14 d 内对虾的存活率,探

讨特异性卵黄抗体对 WSSV 感染对虾的免疫力和免疫保护效果,以期在生产上使用特异性卵黄抗体防控 WSSV 提供依据,也为卵黄抗体抗对虾病毒机制的研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用凡纳滨对虾购自山东日照某水产养殖公司,体色光亮,活力旺盛,食欲良好,无明显病症,平均体重为(1.26±0.10) g。实验对虾养殖在含 150 L 过滤海水的圆柱形塑料桶中,盐度为 30。实验前,参照 Durand 等(2002)的方法,使用实时荧光定量 PCR (qPCR)检测 WSSV,确认为阴性。

实验期间投喂自制饲料。基础饲料配方:鱼粉 35%、豆粕 28%、面粉 26.1%、谷朊粉 2%、鱼油 2%、虾粉 2%、磷脂 1.5%、Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1.5%、胆碱 1%、维生素混合物 0.3%、矿物质混合物 0.5%、维生素 C 0.1%。维生素混合物和矿物质混合物的组成见张婷婷等(2017)。在基础饲料配方中分别添加 0.2%和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂,配制成 0.2%和 0.5%免疫组饲料。基础饲料和 2 种免疫组饲料均用小型饲料机制成直径为 3~4 mm、长度为 3~5 mm 的颗粒饲料,置于 55℃鼓风干燥箱中 6 h,烘干后分装,4℃保存。WSSV 卵黄抗体制剂由韩国 AD BIOTECH 有限公司惠赠。

WSSV 人工感染实验所用毒种为患白斑综合征的病虾,由依托于中国水产科学研究院黄海水产研究所的世界动物卫生组织(OIE)白斑综合征参考实验室提供,经 PCR 检测呈 WSSV 强阳性。取病虾头胸部去除肝胰腺后,剪碎、混合作为感染实验用对虾病料,分成小份,-80℃保存备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 WSSV 卵黄抗体免疫实验** 免疫实验开始前,将实验对虾暂养 1 周。待对虾稳定后,选取 480 尾大小均一、活力良好的对虾,随机分为 3 个组(2 个免疫组,1 个对照组),每组 160 尾虾。免疫组分别投喂 0.2%和 0.5%免疫组饲料,对照组投喂基础饲料,持续投喂 28 d。实验期间,连续充气,水温控制在(28±2)℃。每天投喂 3 次,日投喂量约为对虾体重的 5%。24 h 换水 1 次,换水量为养殖水体的 1/3。

**1.2.2 WSSV 人工感染实验** 免疫实验 28 d 后,对 0.2%免疫组、0.5%免疫组和对照组的对虾进行 WSSV 人工感染实验。每组各取 120 尾对虾,分别随机分入 4 个桶中,每桶 30 尾对虾。通过 WSSV 人工感染预

实验确定本批对虾病料有效感染剂量为 0.07 g/尾。人工感染前 12 h 停食,次日上午投喂-80℃保存的对虾病料。每天记录对虾的死亡情况,及时捞出死虾,使用 qPCR 方法检测濒死对虾体内的 WSSV (Durand *et al.*, 2002)。14 d 后结束人工感染实验,统计各组对虾的存活率,计算 WSSV 卵黄抗体对凡纳滨对虾的相对免疫保护率(relative percentage of survival, RPS)。感染实验期间,养殖管理同 1.2.1,各实验组继续投喂相应的免疫饲料或基础饲料。

**1.2.3 肝胰腺样品的采集** 人工感染 3 d 后,每个实验组各取 3 尾对虾,取肝胰腺组织分成 2 份,置于液氮中速冻,然后,转移至-80℃冰箱中保存,分别用于测定免疫酶活力和免疫基因表达水平。

**1.2.4 肝胰腺免疫酶活力测定** 准确称取各实验组肝胰腺组织,加入等质量的预冷 0.85% NaCl 溶液,混合后用组织研磨器 6000~8000 r/min 匀浆。然后加入 9 倍质量的预冷 0.85% NaCl 溶液,混匀后,4℃ 2700 r/min 离心 5 min,取上清液进行检测。

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,分别测定样品的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)活力及总蛋白浓度,具体操作按试剂盒说明书进行。酚氧化酶(PO)活力测定参考雷质文等(2001)的方法进行,操作步骤:在酶标板中加入 200 μL 的 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾盐缓冲液、10 μL 的 0.01 mol/L 的 L-多巴(L-dopa)及 10 μL 肝胰腺上清液,于室温下混匀,在 490 nm 波长下每间隔 2 min 读取吸光值。在本实验条件下,每分钟每克蛋白吸光值增加 0.001 定义为 1 个活力单位(U/g prot)。

**1.2.5 肝胰腺免疫基因表达水平测定** 使用逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)方法测定肝胰腺免疫基因表达水平。凡纳滨对虾免疫基因的检测引物信息见表 1。用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 提取对虾肝胰腺样品总 RNA,用 Nanodrop 2000c (Thermo, 美国)测定 RNA 的质量及浓度。采用一步法反转录试剂盒(全式金),按试剂盒说明书合成 cDNA,保存于-20℃备用。

表 1 凡纳滨对虾免疫基因表达水平检测用引物  
Tab.1 Primers for detection of immune gene expression level in *L. vannamei*

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	基因检索号 GenBank No.
<i>Hsp70</i>	Hsp70-F	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	EF495128
	Hsp70-R	GGTCACGTCCAACAGCAAC	
<i>lectin</i>	lectin-F	TCAGAACTGCCTTGCGATCAC	DQ871245
	lectin-R	CACGCCATTTGCTCATCCA	
$\beta$ -GBP-HDL	$\beta$ -GBP-F	ACGAGAACGGACAAGAAGTG	AY249858
	$\beta$ -GBP-R	TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	
$\beta$ -actin	$\beta$ -actin-F	CCACGAGACCACCTACAAC	AF300705
	$\beta$ -actin-R	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	

使用 TaKaRa 公司的 TB Green Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒,以内参基因( $\beta$ -actin)为参比,测定样品的热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)、凝集素基因(*lectin*)和  $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因( $\beta$ -GBP-HDL)的表达水平,具体操作方法参照试剂盒说明书。

PCR 反应总体积为 25 μL,包括 2×TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), DEPC 处理水 9.5 μL。PCR 反应程序: 95℃, 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。

**1.2.6 数据处理与分析** 对肝胰腺免疫基因表达水平的 RT-qPCR 实验结果,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析。采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),以 Duncan's 多重比较进行不同处理间的显著性分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 WSSV 感染凡纳滨对虾的肝胰腺免疫酶活力

用 WSSV 卵黄抗体免疫 28 d 后,采用投喂的方式,使用含 WSSV 的对虾病料对各实验组凡纳滨对虾进行人工感染。感染 3 d 后,各组凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活力测定结果显示,0.2%和 0.5%免疫组 SOD 活力均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),0.2%和 0.5%免疫组差异不显著(图 1A)。0.2%免疫组 PO 活力显著高于 0.5%免疫组和对照组( $P < 0.05$ ),0.5%免疫组与对照组差异不显著(图 1B)。0.2%免疫组和 0.5%免疫组 ACP 和 AKP 活力均显著低于对照组( $P < 0.05$ ),0.2%免疫组和 0.5%免疫组差异不显著(图 1C、图 1D)。

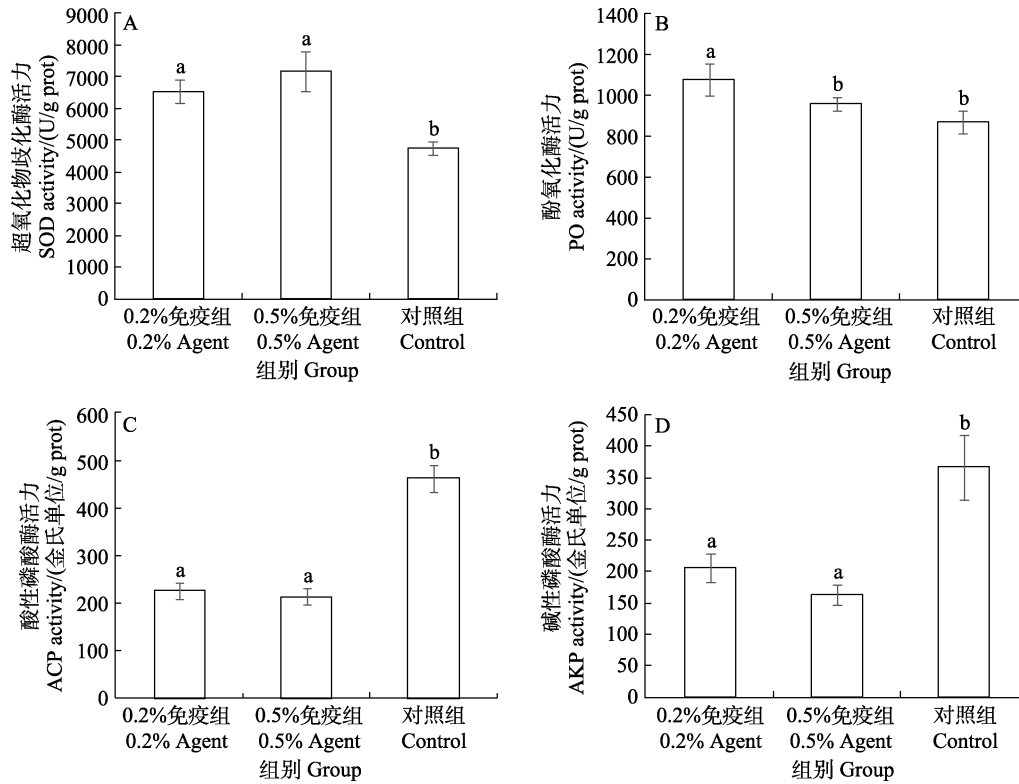


图 1 WSSV 卵黄抗体制剂对人工感染后凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活力的影响

Fig.1 Effects of WSSV IgY agent on the activity of immune enzymes in the hepatopancreas of *L. vannamei* after WSSV infection

同一免疫酶不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )。

Different letters in the same immune enzyme mean significant difference ( $P<0.05$ ).

## 2.2 WSSV 感染凡纳滨对虾的肝胰腺免疫基因表达水平

经 WSSV 卵黄抗体免疫 28 d, 再用含 WSSV 的对虾病料人工感染 3 d 后, 各组凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平测定结果显示, 0.2% 和 0.5% 免疫组 *Hsp70* 表达水平均显著高于对照组( $P<0.05$ ), 且 0.5%

免疫组显著高于 0.2% 免疫组( $P<0.05$ )(图 2A)。0.5% 免疫组和对照组 *lectin* 表达水平均显著高于 0.2% 免疫组( $P<0.05$ )(图 2B)。0.2% 和 0.5% 免疫组  $\beta$ -*GBP-HDL* 表达水平均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 且 0.5% 免疫组显著低于 0.2% 免疫组(图 2C)( $P<0.05$ )。

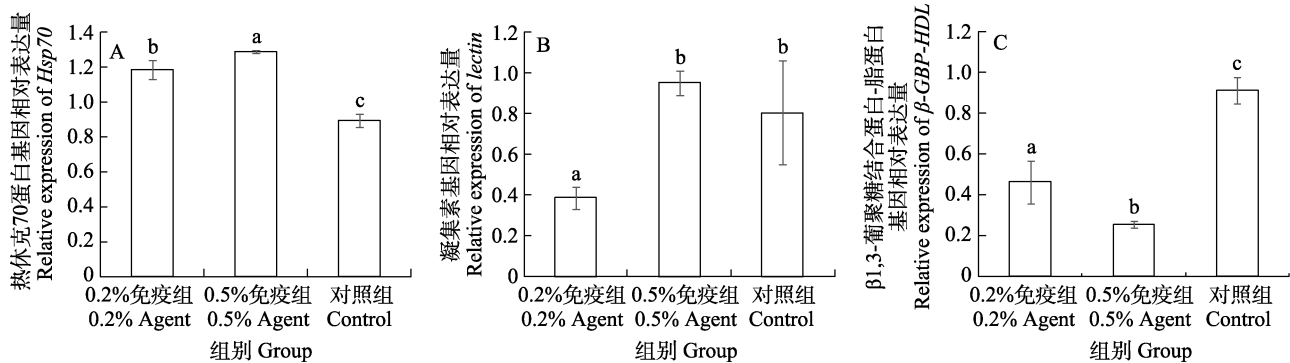


图 2 WSSV 卵黄抗体制剂对人工感染后凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平的影响

Fig.2 Effects of WSSV IgY agent on the expression of immune genes in the hepatopancreas of *L. vannamei* after WSSV infection

同一基因不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )。

Different letters in the same immune gene mean significant difference ( $P<0.05$ ).



### 2.3 WSSV 感染凡纳滨对虾的存活率

用含 WSSV 卵黄抗体制剂的饲料投喂 28 d 后, 使用含 WSSV 的对虾病料对各实验组凡纳滨对虾进行人工感染。感染后第 2 天, 对照组对虾即开始大量死亡, 死亡率为 15.73%; 而 0.2% 免疫组对虾仅有极少量死亡, 死亡率为 2.22%, 0.5% 免疫组对虾无死亡。感染后的第 7 天, 对照组对虾全部死亡, 此时, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的累积死亡率分别为 32.22% 和 3.33%, 均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。感染后的前 10 d, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的存活率差异不显著, 但均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。感染后第 11—14 天, 0.2% 免疫组对虾仍持续死亡, 而 0.5% 免疫组对虾几乎不再死亡, 此时, 0.5% 免疫组存活率显著高于 0.2% 免疫组 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

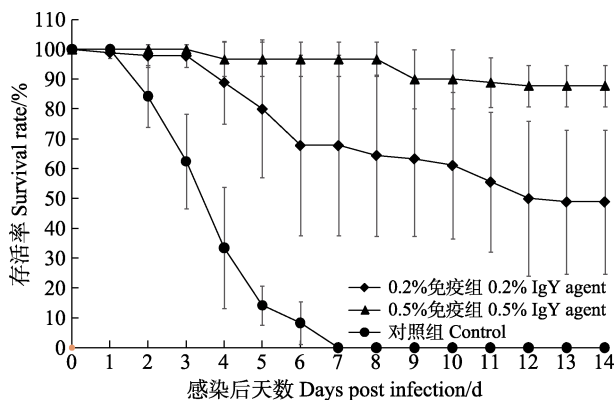


图 3 WSSV 投喂感染后各组凡纳滨对虾的存活率

Fig.3 Survival rate of *L. vannamei* after WSSV infection

WSSV 投喂感染前及感染期间, 0.2% 和 0.5% 免疫组分别投喂添加有 0.2% 和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂的饲料, 对照组投喂基础饲料。

Before and during WSSV infection, the 0.2% and 0.5% IgY agent groups were fed diet containing 0.2% and 0.5% WSSV IgY agent, respectively. The control group was fed basic diet.

人工感染实验结束时(攻毒后第 14 天), 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的存活率分别为 48.89% 和 87.78%, 均显著高于对照组(存活率为 0) ( $P < 0.05$ ), 且 0.5% 免疫组显著高于 0.2% 免疫组 ( $P < 0.05$ )。添加 0.2% 和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾的相对免疫保护率分别为 48.89% 和 87.78%。死亡对虾的 WSSV qPCR 检测结果均呈强阳性。显然, WSSV 卵黄抗体制剂能够在一定程度上改变疾病的历程, 延迟对虾的发病和死亡时间, 提高同期存活率, 显著提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力。

## 3 讨论

### 3.1 特异性卵黄抗体对感染 WSSV 对虾的肝胰腺免疫酶活力的影响

对虾的免疫系统以非特异性为主, 主要包括细胞免疫和体液免疫。细胞免疫包括血细胞的吞噬、包裹化及结节的形成, 而体液免疫则包括酚氧化酶原激活系统、凝集素的凝集作用、溶血素的产生和一系列抗菌肽和抗病毒多肽的形成 (Bachere *et al*, 2004; Vazquez *et al*, 2009)。ACP、AKP、SOD、PO 是对虾体内重要体液免疫因子, 其在抵抗 WSSV 的过程中具有重要作用 (韦嵩等, 2009; Kumaran *et al*, 2018)。陈辉辉等 (2017) 先用复方中草药投喂凡纳滨对虾, 再用 WSSV 攻毒, 0—96 h 内对虾的 AKP 和 ACP 活力呈先上升后下降的趋势。本研究结果显示, 使用 WSSV 攻毒 3 d 后, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的 ACP 和 AKP 活力均显著低于对照组, 与上述研究结果相一致。推测该现象可能与 WSSV 感染后对虾为抵御病毒入侵而进行免疫调节有关。韦嵩等 (2009) 研究口服 WSSV 卵黄抗体后、使用 WSSV 攻毒前凡纳滨对虾血清的免疫酶活力, 结果表明, WSSV 卵黄抗体可提高凡纳滨对虾血清的 PO 和 SOD 活力, 增强对虾抗 WSSV 的能力。但上述研究缺少 WSSV 攻毒后凡纳滨对虾免疫酶活力的数据, 也未测定对虾免疫相关基因表达水平的变化。本研究测定了 WSSV 攻毒后免疫凡纳滨对虾的免疫力数据, 为深入分析特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护机制提供了参考。Rajesh Kumar 等 (2008) 使用 DNA 疫苗免疫斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 免疫组对虾的 PO 和 SOD 活力显著升高, 攻毒后, 免疫组对虾存活率显著高于对照组, 推测这些免疫因子可能参与抵抗 WSSV。本研究也发现, 0.2% 和 0.5% 免疫组的 SOD 活力均显著高于对照组, 0.2% 免疫组 PO 活力显著高于 0.5% 免疫组和对照组。这表明 WSSV 卵黄抗体有效激活了凡纳滨对虾的抗氧化防御系统, 提高了机体吞噬和清除病原体的能力, 从而增强了对虾的抗病毒能力。

### 3.2 特异性卵黄抗体对感染 WSSV 对虾的肝胰腺免疫基因表达水平的影响

热休克蛋白 70 在甲壳类动物天然免疫和应对病原体感染中发挥着重要作用 (Pockley *et al*, 2008), *Hsp70* 表达水平与应激耐受能力呈正相关 (张红波等, 2009)。王春迪等 (2016) 研究表明, 在水体中添加蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) PC46 可提高凡纳滨对虾抗

WSSV 感染能力, 益生菌处理组的 *Hsp70* 表达量在 WSSV 感染后呈显著上调趋势。与上述研究类似, 本研究中, 0.2%和 0.5%免疫组 *Hsp70* 表达水平均显著高于对照组, 表明 WSSV 卵黄抗体能提高对虾抗 WSSV 的能力。凝集素在对虾抵御细菌和病毒感染方面发挥着重要作用, 可作为对虾抗病毒和细菌感染的潜在生物标志物(Liu *et al.*, 2007)。Ma 等(2007)研究发现, 凡纳滨幼虾感染 WSSV 后, 肝胰腺中的 *lectin* 表达水平相比于对照组在最初的 2 h 下降, 4 h 后升到更高的水平。本研究中, 0.5%免疫组 *lectin* 表达水平高于对照组, 但差异不显著; 0.2%免疫组 *lectin* 表达水平显著低于对照组。推测 WSSV 卵黄抗体可以调节 *lectin* 的表达水平, 其具体调节机制还需进一步研究。 $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白在激活酚氧化酶原系统和凝结过程中起着重要作用, 是甲壳动物对抗病毒感染的一个重要免疫因子。本研究结果显示, WSSV 攻毒后, 0.2%和 0.5%免疫组  $\beta$ -GBP-HDL 基因的相对表达水平均显著低于对照组, 与 ACP 和 AKP 活力具有相似的变化趋势。推测虾体感染病毒后, 这些免疫因子在抗原识别和免疫系统激活阶段发挥作用, 因过度消耗而下降, 但仍需进一步研究口服 WSSV 卵黄抗体后对虾免疫因子的动态变化予以证实。

### 3.3 特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的保护效果

研究表明, 口服 0.05%~1% WSSV 卵黄抗体均可显著提高虾类抗 WSSV 感染的能力(Lu *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2010; 韦嵩等, 2009)。本研究结果显示, 添加 0.2%和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾均有显著的保护作用, 其相对免疫保护率分别为 48.89%和 87.78%, 0.5%添加量的保护效果更好。此外, 本研究发现, 使用 WSSV 卵黄抗体免疫凡纳滨对虾, 还能在一定程度上改变白斑综合症的发病进程, 延迟免疫对虾的发病和死亡时间, 提高同期存活率, 这与韦嵩等(2009)的研究结果相类似。推测卵黄抗体具有双重抗病机制, 一方面可以与病原特异性结合, 起到中和特定病原的作用(Gadde *et al.*, 2015); 另一方面可以刺激非特异性免疫系统, 增强机体的抗病能力(Zhen *et al.*, 2008)。由此可见, 特异性卵黄抗体可有效地用于动物的被动免疫, 在疾病控制方面具有极大的潜力。

综上所述, 本研究报道了口服特异性卵黄抗体对 WSSV 感染后的对虾肝胰腺中的 4 种免疫酶活力和 3 种免疫基因表达水平的影响, 表明在饲料中添加 WSSV 卵黄抗体制剂, 可增强凡纳滨对虾的非特异性免疫机

能和抗 WSSV 感染的能力, 显著提高感染对虾的存活率。研究结果为卵黄抗体抗 WSSV 感染机制的研究提供了参考, 也为在生产上使用卵黄抗体防控 WSSV 感染提供了科学依据。特异性卵黄抗体作为一种环境友好的新型免疫制剂能激活和调节凡纳滨对虾免疫系统, 在防控对虾白斑综合征方面具有极大的潜在价值。

**致谢:** 本研究使用的自制对虾饲料由中国水产科学研究院黄海水产研究所梁萌青老师协助制作, 人工感染用对虾病料由中国水产科学研究院黄海水产研究所杨冰老师提供, 在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- BACHERE E, GUEGUEN Y, GONZALEZ M, *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 149-168
- CHEN H H, TU C L, TANG Y, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on immune activities of *Litopenaeus vannamei* after infected with white spot syndrome virus. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2017, 56(5): 686-692 [陈辉辉, 涂晨凌, 唐杨, 等. 复方中草药对白斑综合征病毒感染下凡纳滨对虾免疫活性的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2017, 56(5): 686-692]
- CITARASU T. Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 2009, 18(3): 403-414
- DURAND S V, LIGHTNER D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381-389
- FU L L, WANG Y B, LI J R, *et al.* Protection of *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) against the white spot syndrome virus using specific chicken egg yolk immunoglobulins by oral delivery. *Aquaculture Research*, 2010, 41(12): 1806-1816
- GADDE U, RATHINAM T, LILLEHOJ H S. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases - A review. *Animal Health Research Reviews*, 2015, 16(2): 163-176
- GAO X J, ZHANG X J, LIN L, *et al.* Passive immune-protection of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-*Vibrio* egg yolk (IgY)- encapsulated feed. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 723
- KUMARAN T, THIRUMALAIKUMAR E, LELIN C, *et al.* Physicochemical properties of anti *Vibrio harveyi* egg yolk antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 349-362

- LEI Z W, HUANG J, YANG B, *et al.* Immune factors in haemolymph supernatant of *Penaeus chinensis* infected by WSSV. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 46–51 [雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 46–51]
- LIU Y C, LI F H, DONG B, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (*Fclectin*) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 598–607
- LU Y, LIU J, JIN L, *et al.* Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkiaii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(3): 750
- MA T H T, TIU S H K, HE J G, *et al.* Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 430–437
- OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 7th Edition. Paris: OIE, 2016, 186–199
- QIN Z D, BABU V S, LI N Q, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 26–34
- POCKLEY A G, MUTHANA M, CALDERWOOD S K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(2): 71–79
- RAJESH KUMAR S, ISHAQ AHAMED V P, SARATHI M, *et al.* Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 467–478
- SUN B C, YANG Y K, LI Y H, *et al.* Effects of single or mixed *Bacillus* on WSSV infection and immune-related gene expression in *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 113–121 [孙博超, 杨运楷, 李玉宏, 等. 饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病毒感染能力及抗病基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 113–121]
- VAZQUEZ L, ALPUCHE J, MALDONADO G, *et al.* Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 2009, 15(3): 179–188
- WANG C D, SONG X L, ZHANG X J, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 146–155 [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 146–155]
- WARR G W, MAGOR K E, HIGGINS D A. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 1995, 16(8): 392–398
- WEI S, SONG X L, LI H B, *et al.* Effects of Ig-guard (shrimp) on immunity-related enzyme activities and WSSV resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 112–118 [韦嵩, 宋晓玲, 李海兵, 等. 白斑综合症病毒卵黄抗体对凡纳滨对虾免疫相关酶活力和抗病毒能力的影响. *水产学报*, 2009, 33(1): 112–118]
- XU Y P, LI X Y, JIN L J, *et al.* Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 860–868
- YUAN X M, LÜ S J, SHI W D, *et al.* Isolation and egg-yolk antibody preparation of *Micropterus salmonides* rhabdovirus. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 151–157 [袁雪梅, 吕孙建, 施伟达, 等. 大口黑鲈弹状病毒的分离培养及其卵黄抗体的制备. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 151–157]
- ZHANG H B, WAN Y T, WANG L Z, *et al.* The protection and regulation of *Hsp70* in cellular stress response. *China Practical Medicine*, 2009, 14(4): 228–229 [张红波, 万亚涛, 王莲哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用. *中国实用医药*, 2009, 14(4): 228–229]
- ZHANG T T, CHEN X R, LIANG M Q, *et al.* Effects of different protein hydrolysates on growth performance and non-specific immunity of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 96–105 [张婷婷, 陈效儒, 梁萌青, 等. 不同蛋白水解物对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)生长性能及非特异性免疫的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 96–105]
- ZHEN Y H, JIN L J, GUO J, *et al.* Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 126–133
- ZHOU J, HUANG J, SONG X L. Applications of immunostimulants in aquaculture. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(4): 70–79 [周进, 黄健, 宋晓玲. 免疫增强剂在水产养殖中的应用. *海洋水产研究*, 2003, 24(4): 70–79]

## Protective Effects of Oral Specific Egg Yolk Immunoglobulins (IgY) against White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

WANG Renbao<sup>1,2</sup>, WANG Yiting<sup>1,3</sup>, ZHANG Huifen<sup>1,3</sup>, SONG Xiaoling<sup>1</sup>,  
WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, XIE Guosi<sup>1</sup>, SHI Chengyin<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao, Shandong 266071, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China)

**Abstract** The aim of this study was to explore the immunoprotective mechanism and protective effects of oral specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Different doses of WSSV IgY agent (0, 0.2%, and 0.5%) were added to shrimp feeds and administered to juvenile *L. vannamei* for 28 days. The survival rate of juveniles was measured within 14 days of artificial infection with WSSV. The activity of immune enzymes and the relative expression levels of immune genes in shrimp hepatopancreas were measured after 3 days of WSSV infection. The results showed that compared with the control group without IgY, the 0.2% IgY agent group showed significantly higher enzyme activity by superoxide dismutase (SOD) and phenoloxidase (PO), and significantly lower enzyme activity by acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP). The relative expression level of heat shock protein 70 gene (*Hsp70*) also significantly increased, while the relative expression levels of lectin gene (*lectin*) and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein-lipoprotein gene ( *$\beta$ -GBP-HDL*) significantly decreased in the 0.2% IgY agent group. SOD activity significantly increased while PO activity did not change significantly, while ACP and AKP activities decreased in the 0.5% IgY agent group. The relative expression level of *Hsp70* also significantly increased, and the relative expression level of *lectin* did not significantly change, while the relative expression level of  *$\beta$ -GBP-HDL* significantly decreased in the 0.5% IgY agent group. The artificial infection results showed that after 14 days of WSSV infection, the survival rates of shrimp in the 0.2% and 0.5% IgY agent groups, and the control group were 48.89%, 87.78%, and 0, respectively. The survival rate of shrimp in the 0.2% and 0.5% IgY agent groups was significantly higher than that in the control group, and the survival rate of shrimp in the 0.5% IgY agent group was also significantly higher than that in the 0.2% IgY agent group. Specific IgY agents can change the course of a disease, delay disease onset and death of immune shrimp, and significantly improve the survival rate of shrimp over a certain period. The results showed that oral specific IgY agents could affect the activity of immune enzymes and the expression level of immune genes in the hepatopancreas of *L. vannamei*, significantly improving their ability to resist WSSV infection. This study provides a basis for the application of IgY agents in the prevention and control of WSSV infection, and also provides a reference for research on the anti-WSSV infection mechanism of IgY agents.

**Key words** Immunoglobulin of yolk (IgY); *Litopenaeus vannamei*; White spot syndrome virus (WSSV); Immune enzyme activity; Immune gene expression; Disease resistance

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210427001

http://www.yykxjz.cn/

陈钰莹, 韩怡静, 刘相全, 何金霞, 杨顶珑. 皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白在免疫防御中的作用. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 234-242

CHEN Y Y, HAN Y J, LIU X Q, HE J X, YANG D L. A peptidoglycan recognition protein (PGRP) from *Haliotis discus hannai*: Possible roles in antibacterial properties. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 234-242

# 皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白在免疫防御中的作用\*



陈钰莹<sup>1,2,3</sup> 韩怡静<sup>3</sup> 刘相全<sup>2</sup> 何金霞<sup>2</sup> 杨顶珑<sup>3①</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006; 3. 中国科学院烟台海岸带研究所 山东 烟台 264003)

**摘要** 本研究从皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中鉴定并克隆了一种肽聚糖识别蛋白(PGRP), 命名为 HdPGRP。HdPGRP 的 cDNA 全长为 1467 bp, 共编码 354 个氨基酸, 其中含有 1 个信号肽(1~18 氨基酸)、1 个 SH3b 结构域(93~160 氨基酸)、1 个 PGRP 结构域(179~322 氨基酸)和 1 个 Ami\_2 结构域(191~332 氨基酸)。此外, 在 HdPGRP 序列中发现了 4 个保守的 Zn<sup>2+</sup>结合位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup> 和 C<sup>330</sup>)以及 5 个保守的酰胺酶催化位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup>、T<sup>328</sup> 和 C<sup>330</sup>)。经多序列比对和系统发育树分析, 表明 HdPGRP 属于短型 PGRP 家族成员。在健康鲍鱼中, *hdpgpr* 主要在肝胰腺中表达, 其次依次在血细胞、外套膜和鳃中。在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激后, 血细胞中的 *hdpgpr* 表达量在 72 h 内呈现先上升后下降的趋势, 在 24 h 表达量达到最高。SDS-PAGE 结果显示, 重组 HdPGRP (rHdPGRP)的分子量为 30 kDa。rHdPGRP 表现为 Zn<sup>2+</sup>依赖酰胺酶活性, 可催化降解不溶性肽聚糖。此外, rHdPGRP 对革兰氏阳性菌藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)具有显著的抑制作用, 且这种抑制作用可能与其酰胺酶活性有关。本研究表明, HdPGRP 在机体抵御入侵细菌等免疫防御中起重要作用。

**关键词** 皱纹盘鲍; 肽聚糖识别蛋白; 免疫防御

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)04-0234-09

免疫识别是先天免疫的第一道防线, 通过模式识别蛋白(pattern recognition proteins, PRPs)结合微生物表面高度保守的病原相关分子结构, 如细菌中的脂多糖、肽聚糖, 真菌中的  $\beta$ -1,3-葡聚糖以及病毒双链 RNA 等(Huang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Rout *et al.*, 2020)。目前, 已在无脊椎动物中鉴定出肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、C1q 结构域蛋白、NOD2、革兰氏阴性菌结合蛋白、含硫酯键蛋白、Toll 样受体、脂多糖和(或) $\beta$ -1,3 葡聚糖结

合蛋白和清道夫受体等多种 PRPs, 它们对入侵病原微生物的免疫识别及应答起重要作用(曹丹丹等, 2018; Wang *et al.*, 2013; Gerdol *et al.*, 2015)。

PGRPs 首次在家蚕(*Bombyx mori*)的血淋巴和角质层中被鉴定, 它能特异性结合肽聚糖, 并触发酚氧化酶级联反应(Li *et al.*, 2020)。随后, 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中成功克隆出 PGRP 后, 其他无脊椎动物的 PGRPs 也相继被鉴定克隆(Hu *et al.*, 2020)。在结构上, PGRP 包含一个保守的肽聚糖结合

\* 国家自然科学基金(41806196)、山东省自然科学基金(ZR2019BD022)和烟台市科技发展计划(2020MSGY066)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41806196), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019BD022), Yantai Science and Technology Development Project (2020MSGY066)]. 陈钰莹, E-mail: c19121695907@163.com

① 通信作者: 杨顶珑, 副研究员, E-mail: dlyang@yic.ac.cn

收稿日期: 2021-04-27, 收修改稿日期: 2021-06-15

2型酰胺酶结构域,也被称为PGRP结构域,它能够水解N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic)和L-丙氨酸(L-alanine)之间的酰胺键,以达到抗菌目的(Zaidman-Rémy *et al*, 2006; Mellroth *et al*, 2006)。根据PGRPs分子量及结构的不同,可将其分为短型(PGRP-S)、中间型(PGRP-I)和长型(PGRP-L)3类(Dziarski, 2004)。PGRPs在抵御病原菌的先天免疫中具有多种功能,其中,识别并结合细菌肽聚糖是其最基本的功能(Yang *et al*, 2010)。另外,PGRPs可作为免疫识别蛋白激活免疫通路(Wei *et al*, 2018),通过诱导细菌的氧化应激、硫醇应激和金属应激等作为直接杀菌剂(Kashyap *et al*, 2014; Hu *et al*, 2020),此外,PGRPs可作为调理素来诱导凝集或吞噬作用(Coteur *et al*, 2007; Yang *et al*, 2019)。

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国重要的海水养殖经济贝类,主要分布在辽东半岛和山东半岛(姜向阳等, 2021)。自20世纪80年代以来,由于病原菌入侵,尤其是弧菌的感染造成人工养殖和野生鲍鱼出现大规模死亡,其中鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)通过产生热稳定和热不稳定的毒素使宿主发病,导致全球鲍鱼产量大幅下降(王瑞旋等, 2006; 何婷婷, 2018; 吴富村等, 2020)。因此,研究免疫相关分子的特性对鲍鱼养殖业的疾病控制和健康管理具有重要意义。迄今为止,已在软体动物中鉴定出100多种PGRPs,如大竹蛭(*Solen grandis*)中的SgPGRP-S1(Wei *et al*, 2018),仿刺参(*Apostichopus japonicus*)中的AjPGRP-S(Hu *et al*, 2020)。然而,目前对鲍鱼中PGRP功能的认识还很有限。本研究从皱纹盘鲍中鉴定了一种PGRP(命名为HdPGRP),并对其组织分布、入侵病原菌时的转录表达模式、抗菌活性等进行研究,以更好地了解鲍鱼对病原体入侵的免疫应答反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 鲍鱼选取及细菌刺激

选取平均壳长为60 mm的皱纹盘鲍,在海水中驯养1周(20°C~22°C),将300只鲍鱼平均分为6组。其中3组分别用鳃弧菌( $1 \times 10^7$  CFU/mL)进行浸泡刺激,每组分别在0、3、6、12、24、48和72 h时随机选6个个个体抽取血淋巴,2600 r/min离心10 min,获得血细胞。另外3组为对照组,每组随机选取6个个个体,取血细胞、外套膜、鳃、肝胰腺和肌肉进行*hdpgpr*的组织特异性表达分析。

### 1.2 总RNA的提取及cDNA的合成

使用TRIzol (Invitrogen, 美国)从鲍鱼血细胞、外套膜、鳃、肝胰腺和肌肉中提取总RNA,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量后,用2 μg总RNA和0.5 mmol/L Oligo (dT) 70°C热变性5 min后逆转录合成cDNA。反应体系(25 μL):已完成变性的RNA,5 μL dNTPs,1 μL RNase抑制剂(Promega, 美国),1 μL M-MLV逆转录酶(Promega, 美国)以及5 μL 5×M-MLV反应缓冲液,加无RNA酶水至25 μL。

### 1.3 *hdpgpr*基因的克隆

通过对本实验室构建的皱纹盘鲍cDNA文库中EST序列进行BLAST分析,得到皱纹盘鲍肽聚糖识别蛋白的EST序列。以P1、P2为正向引物(表1),Oligo (dT)为反向引物,进行巢式PCR扩增*hdpgpr*的3'端。步骤如下:加入聚合酶延长变性(94°C 5 min);94°C 50 s,58°C 45 s,72°C 30 s,35次循环扩增;PCR产物经凝胶纯化后,连接到pMD18-T载体(TaKaRa, 大连)进行测序。将原始EST序列与扩增片段重叠得到*hdpgpr*的全长cDNA。

表1 实验所用引物

Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
P1	AAGCCCCTTCTTCCATTGTT	3' RACE
P2	CTACGCATTCATCCACCACG	3' RACE
P3	CGTGAAACTCGCCATACTCCG	Real-time PCR
P4	CGCCGATGACGAAACTGTAGCC	Real-time PCR
P5	CACGGGTATTGTTCTGGACTCTG	$\beta$ -actin
P6	ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCACGTC	$\beta$ -actin
P7	ACATTGACTGTGTCTGCGCCAC	基因重组
P8	TCACTATTTTGTGCTTGGGATGACAGG	基因重组
dT	GGCCACGCGTCTGACTAGTACT <sub>17</sub>	Oligo (dT)

#### 1.4 生物信息学分析

用 BLAST 算法对 *hdpgpr* 的 cDNA 序列进行分析, 并通过 ExPASy (expert protein analysis system) 推导出蛋白序列进行分析。使用 SMART (simple modular architecture research tool) 预测蛋白结构域。采用 ClustalW 软件进行多序列比对。利用 MEGA 4.0 软件的邻位连接(neighbor-joining, NJ)算法构建系统发育树(重复 1000 次)。

#### 1.5 *hdpgpr* mRNA 的转录表达

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 *hdpgpr* mRNA 的转录表达。用基因特异性引物(P3、P4, 表 1) 扩增 *hdpgpr* 片段,  $\beta$ -actin 作为内参基因, 以 1.2 所合成的 cDNA 为模板, 使用 7500 Fast Real-time PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行 qRT-PCR。反应程序: 94°C, 5 min 变性; 94°C 50 s, 60°C 60 s, 72°C 50 s 循环 40 次, 72°C 延伸 10 min。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 *hdpgpr* mRNA 的相对表达水平(Livak *et al.*, 2001)。所有数据以 mRNA 相对表达量的平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ) 表示, 采用 SPSS 16.0 软件对所得数据进行统计学分析,  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

#### 1.6 HdPGRP 的重组表达

用一对特异性引物(P7 和 P8, 表 1) 扩增 *hdpgpr*, 然后将 PCR 产物克隆到 pEASY-blunt E1 表达载体 (Transgen Biotech, 中国)。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中表达重组质粒, 经 IPTG 诱导后, 用 15% SDS-PAGE 检测蛋白表达结果。重组蛋白 HdPGRP (rHdPGRP) 用  $Ni^{2+}$  螯合 Sepharose 柱纯化, 然后用梯度尿素-TBS 甘油缓冲液(10%甘油, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 透析复性。用 BCA 法测定重组蛋白的浓度 (Smith *et al.*, 1985)。

#### 1.7 酰胺酶活性

参照 Mellroth 等(2003)的方法测定 rHdPGRP 对肽聚糖的相对酶活性。将不溶于水的肽聚糖(来自金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 1 mg/mL) 分别溶解于 HEPES 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl), HEPES-ZnCl<sub>2</sub> 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>) 和 HEPES-ZnCl<sub>2</sub> EDTA 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L EDTA) 并加入 rHdPGRP (50  $\mu$ g/mL),

其中以 PBS 缓冲液作为阴性对照。在 120 min 内每隔 15 min 检测 OD<sub>540 nm</sub> 值。

#### 1.8 rHdPGRP 的抑菌活性

将藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 培养至对数期, 用培养基稀释至  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL。在 100  $\mu$ L 的细菌悬液中加入 rHdPGRP (终浓度为 100  $\mu$ g/mL), 设含 10 mmol/L ZnCl<sub>2</sub> 和不含 ZnCl<sub>2</sub> 2 组。无 rHdPGRP 的细胞悬液作为阴性对照。220 r/min, 37°C 振荡培养, 每隔 1 h 测定 OD<sub>600 nm</sub> 值。

## 2 结果

### 2.1 *hdpgpr* 的 cDNA 克隆及序列分析

*hdpgpr* 的 cDNA 全长为 1467 bp, 共编码 354 个氨基酸, 在 GenBank 数据库中编号为 MZ150581。通过 ExPASy 分析, HdPGRP 含有 1 个糖基化位点(N<sup>133</sup>), 用 SMART 软件预测, HdPGRP 含有 1 个信号肽(1~18 氨基酸)、1 个 SH3b 结构域(93~160 氨基酸)、1 个 PGRP 结构域(179~322 氨基酸) 和 1 个 Ami\_2 结构域(191~332 氨基酸) (图 1), 说明 HdPGRP 可能分泌到细胞外识别并结合肽聚糖。多序列比对分析结果表明, HdPGRP 与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (58%, XP\_034310518) 和光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) (55%, NP\_001298227) 的 PGRPs 之间具有高度相似性, 且 HdPGRP 有 4 个保守的 Zn<sup>2+</sup> 结合位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup> 和 C<sup>330</sup>) 以及 5 个保守的酰胺酶催化位点(H<sup>209</sup>、Y<sup>255</sup>、H<sup>318</sup>、T<sup>328</sup> 和 C<sup>330</sup>) (图 2)。采用 MEGA 4.0 软件的邻接法构建的系统发育树显示, PGRPs 分为 3 个分支: 短型 PGRPs (PGRP-S)、中长型 PGRPs (PGRP-I) 和长型 PGRPs (PGRP-L), HdPGRP 与太平洋牡蛎等其他海洋无脊椎动物的 PGRPs 聚于短型 PGRPs (图 3)。

### 2.2 *hdpgpr* 的组织表达及在鳗弧菌刺激后血细胞中的表达

利用 qRT-PCR 技术对鲍鱼各组织中 *hdpgpr* 转录表达进行分析。*hdpgpr* 在所有被检测的组织中均有表达, 其中, *hdpgpr* 主要分布于肝胰腺, 其次为血细胞、外套膜和鳃, 在肌肉中表达量最低(图 4)。在鳗弧菌刺激后, 血细胞中 *hdpgpr* 表达量在 3—48 h 内显著升高 ( $P < 0.01$ ), 并在 24 h 时达到最大值, 是对照组的 9.4 倍 ( $P < 0.01$ ), 随后, *hdpgpr* 表达量下降, 在 72 h 时, *hdpgpr* 水平与对照组相比无显著差异, 说明 *hdpgpr* 表达恢复至正常水平(图 5)。

```

1 CTTCAATTGAGCTGGGACTCGCTGAAGATGTCCTAGTATTGTCTCCCTTGCTCTGGCACTCAGCAGTCCGGCA
      M S L V I V S L V L A L S S P A
76 TGGACAGCTCCAGCTAGCCAGTGCATGTGCGTCTGTAGACTGTGATTGAGCGGGTATTCGGTCCCAGGAC
17 W T A P A S Q C A C A S V D T V I E R V F G S Q D
151 AACAGTTTGGGACTCAGTCCCCGAGTTGTCTCCCGTATCAAGGAGACCAGAAGGCCATCAATGACGGTCCG
42 N S F G T L S S P S C L P Y Q G D Q K A I N D G R
226 ATATACGCCCATGTGTGTATCAGGACAGAGTGCCTGGTGTGACGTCTGATATCTACATCAAGAATTGTCAT
67 I Y A H V L Y Q G Q S A W L L T S D I Y I K N C H
301 GAAACATTCGACTGTGTCTGCGCCACGGTGCAGTGTCTTGTGACTGGATATGAAACCGGAAGTACTACAATG
92 E T F D C V C A T A A V D V L T G Y G T G S T T M
376 ACGACCTTGACCTCCGGTCAGTGTGTGACCTTGACGGGAAGACGTACAACCTCACTGCAGGGACTGGATACAA
117 T T L T S G Q C V T L Q G K T Y N S T A G T W I Q
451 GTCACGCCAACAAAGTCCGGATGGATTAAGAAAGGAATGTTGTGTTCCATGAGAATTGTGGAGGCCATTCA
142 V N A N N K V G W I K K G N V V F H E N C G G H S
526 CAAGCCCTTCTTCCATTGTTCAACTGCCCGGATGTCTAAAATCATAACACGTGCAGAGTGGGGAGCACGTGCA
167 Q A P S S I V Q L P G C P K I I T R A E W G A R A
601 CCAAGCACTTACACGTGAAACTCGCCATACTCCGTACTACGCATTCATCCACCACGGTGCAGACAGGCTGT
192 P S T S H V K L A H T P Y Y A F I H H G A T A G C
676 TATACACGAGAAGAATGTGTCAGGATGATACAGAGCTATCAGAACTTTCATGGACGGACACGGCTGGTCCGAC
217 Y T R E E C V R M I Q S Y Q N F H M D G H G W S D
751 ATCGGCTACAGTTTCGTATCGCGGAGGACGGCAACGTGTACGAGGGCGTGGCTGGGATGCTGTGGGGCACAC
242 I G Y S F V I G E D G N V Y E G R G W D A V G A H
826 ACCTACAACACAGTACAGGACTGGGTTCTGCGTCATTGGAACTTCATGCAGCGTCTCCACGCCAGGGC
267 T Y N Y N S R G L G F C V I G N F M Q R L P R Q A
901 GCAGGGATGTCTCCAGAAGATTATAGCTGCGGGTACGCAACGGCAAACTGACGTCCAGTACAGATGCTT
292 A R D V L Q K I I A C G V S N G K L T S T Y T M L
976 GGCCACCGGGACGTGGTGTGCATCAGGCTACGTCTTGTCCAGGGATATGTTCTATGCCCTACACAGAAC
317 G H R D V G A A S G S T S C P G D M F Y A L I Q N
1051 TGGCCCCATTATAACGCGCTGTACCCAAAGCACAAAATAGAAACAATTCAAGATATTAGCAATAAACATATC
342 W P H Y N A P V I P S T K *
1126 TGATATATTTACATATTTAAAGAATGTCGACTTTTTAAATCTTTTTCATCCCATTTGGCTTATGCATCAT
1201 AATTATTTAAATGATTTAAGGCAGCATGGACTATTAATAGCAGCATGTATCAACTATTTCTTATTAATTTCTTC
1276 TTGATCCCAATCACATGATTTACAAAACATATAAAATATATATCTTTATCATTATCTGCGTTTTCATGTTATT
1351 TTACCATATTTAGTCATACAGTACATCCAAAATGTATACATATGTCAATATGTCCTGCACAACGTTTATTTTCAT
1426 CACTACATCAACTACACTCTTAAAAA

```

图 1 HdPGRP 核酸及推导的氨基酸序列

Fig.1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of HdPGRP

加粗: 起始密码子和终止密码子; 方框: 糖基化位点; 下划线: 信号肽; 深灰色阴影: SH3b 结构域; 波浪线: PRGP 结构域; 浅灰色阴影: Ami\_2 结构域。

Bold: Initial codon and termination codon; Box: Glycosylation sites; Underline: Signal peptide; Dark grey shadow: SH3b domain; Wave line: PRGP domain; Light gray shadow: Ami\_2 domain.

### 2.3 rHdPGRP 蛋白的制备

用 IPTG 对含 HdPGRP 重组质粒的表达菌株 BL21(DE3)进行诱导表达, SDS-PAGE 显示, 位于 30 kDa 处出现 1 条与预期重组蛋白大小一致的条带。经  $\text{Ni}^{2+}$  螯合琼脂糖柱纯化并复性后的 rHdPGRP 蛋白条带单一, 约 30 kDa (图 6)。

### 2.4 酰胺酶和抗菌活性测定

酰胺酶活性是 PGRP 水解不溶性肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸和 L-丙氨酸之间肽键, 从而降解肽聚糖的一种活性。结果显示, 在  $\text{Zn}^{2+}$  存在的情况下, rHdPGRP 对肽聚糖显示出较高的降解活性, 在 120 min 内  $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$  从 0.268 降到 0.142。与含  $\text{Zn}^{2+}$  组相比, 不含  $\text{Zn}^{2+}$  组



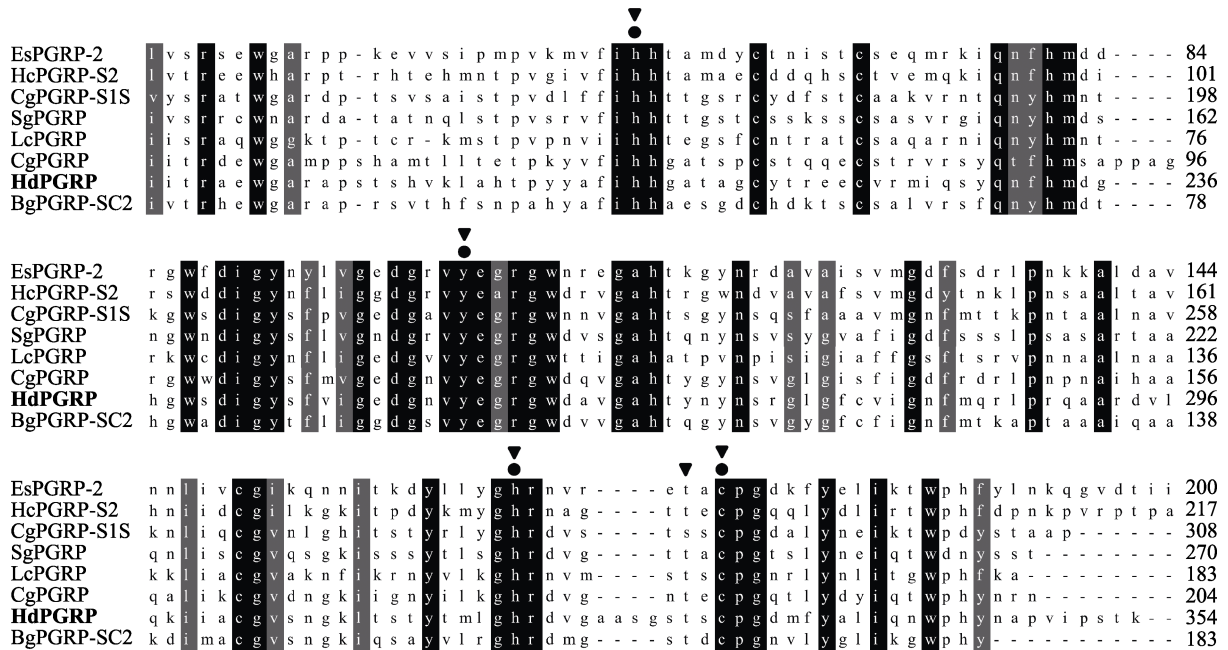


图 2 HdPGRP 与其他物种中 PGRPs 的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignments of HdPGRP with PGRPs in other animals

PGRPs 来源及 GenBank 登录号如下：夏威夷短尾鲷(EsPGRP-2, AAY27974)、三角帆蚌(HcPGRP-S2, AHK22786)、太平洋牡蛎(CgPGRP-S1S, BAG31896; CgPGRP, XP\_034310518)、大竹蛭(SgPGRP, AEW43446)、豹蛙(LcPGRP, PIO34231)、光滑双脐螺(BgPGRP, NP\_001298227)。圆形：Zn<sup>2+</sup>结合位点；三角形：酰胺酶催化位点。

The PGRPs source and GenBank number are as follows: *Euprymna scolopes* (EsPGRP-2, AAY27974), *Hyriopsis cumingii* (HcPGRP-S2, AHK22786), *Crassostrea gigas* (CgPGRP-S1S, BAG31896; CgPGRP, XP\_034310518), *Solen grandis* (SgPGRP, AEW43446), *Lithobates catesbeianus* (LcPGRP, PIO34231), *Biomphalaria glabrata* (BgPGRP, NP\_001298227). Round: Zn<sup>2+</sup> binding site; Triangle: Amidase catalytic site.

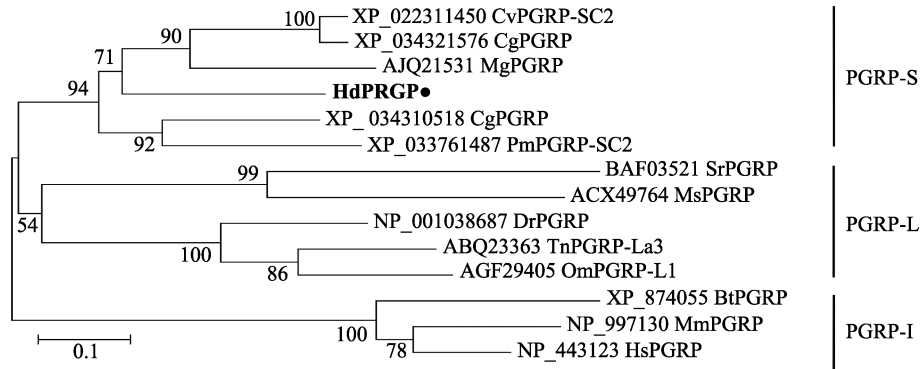


图 3 HdPGRP 的 N-J 进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of HdPGRP

利用 MEGA 4.0 软件，采用邻接法构建系统发育树，重复 1000 次。PGRPs 来源及 GenBank 登录号如下：美洲牡蛎 (CvPGRP-SC2, XP\_022311450)、太平洋牡蛎(CgPGRP-SC2, XP\_034321576; CgPGRP, XP\_034310518)、紫贻贝(MgPGRP-C, AJQ2153)、欧洲扇贝(PmPGRP-SC2, XP\_033761487)、印度蚕(SrPGRP, BAF03521)、烟草天蛾(MsPGRP, ACX49764)、斑马鱼(DrPGRP, NP\_001038687)、黑斑鲷(TnPGRP-La3, ABQ23363)、虹鳟(OmPGRP-L1, AGF29405)、牛(BtPGRP-4, XP\_874055)、鼠(MmPGRP-3, NP\_997130)、人(HsPGRP-3, NP\_443123)。

Using MEGA 4.0 software, the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method and repeated 1000 times. The PGRPs source and GenBank number are as follows: *Crassostrea virginica* (CvPGRP-SC2, XP\_022311450), *Crassostrea gigas* (CgPGRP-SC2, XP\_034321576; CgPGRP, XP\_034310518), *Mytilus galloprovincialis* (MgPGRP-C, AJQ2153), *Pecten maximus* (PmPGRP-SC2, XP\_033761487), *Samia ricini* (SrPGRP, BAF03521), *Manduca sexta* (MsPGRP, ACX49764), *Danio rerio* (DrPGRP, NP\_001038687), *Tetraodon nigroviridis* (TnPGRP-La3, ABQ23363), *Oncorhynchus mykiss* (OmPGRP-L1, AGF29405), *Bos taurus* (BtPGRP-4, XP\_874055), *Mus muscu* (MmPGRP-3, NP\_997130), *Homo sapiens* (HsPGRP-3, NP\_443123).

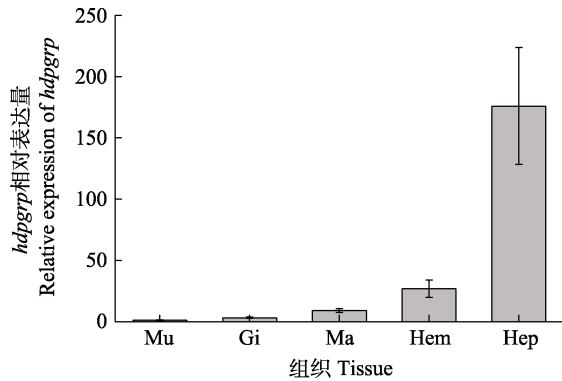


图 4 不同组织中 *hdpgrp* 的相对表达量(平均值±标准差, n=6)

Fig.4 Relative expression levels of *hdpgrp* in different tissues (Mean±SD, n=6)

Mu: 肌肉; Gi: 鳃; Ma: 外套膜; Hem: 血细胞; Hep: 肝胰腺。  
Mu: Muscle; Gi: Gills; Ma: Mantle;  
Hem: Hemocytes; Hep: Hepatopancreas.

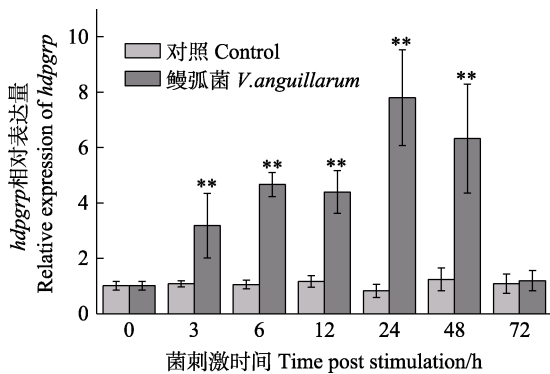


图 5 鳃弧菌刺激后血细胞中 *hdpgrp* 的相对表达量(平均值±标准差, n=6)

Fig.5 Relative expression levels of *hdpgrp* in hemocytes after *V. anguillarum* stimulation (Mean±SD, n=6)

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

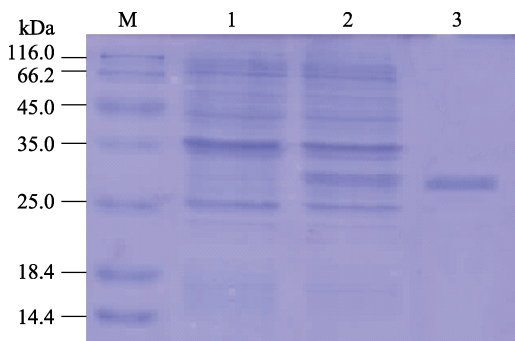


图 6 rHdPGRP 的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of rHdPGRP

泳道 M: 标准蛋白分子量标记物; 泳道 1: 阴性对照(未诱导); 泳道 2: 诱导大肠杆菌表达 rHdPGRP; 泳道 3: 纯化的 rHdPGRP。

Lane M: Marker; Lane 1: rHdPGRP in *E. coli* without induction; Lane 2: Induced rHdPGRP in *E. coli*; Lane 3: Purified rHdPGRP.

和  $Zn^{2+}$ -EDTA 组的 rHdPGRP 对肽聚糖的降解活性明显降低(图 7)。表明 rHdPGRP 的酰胺酶活性是  $Zn^{2+}$  依赖型。rHdPGRP 对革兰氏阳性菌藤黄微球菌的抑制实验显示, 在  $Zn^{2+}$  存在情况下, 经 rHdPGRP 孵育后, 藤黄微球菌的生长被强烈抑制(图 8), 然而, 在无  $Zn^{2+}$  的情况下, rHdPGRP 对其生长的抑制作用减弱(图 8)。

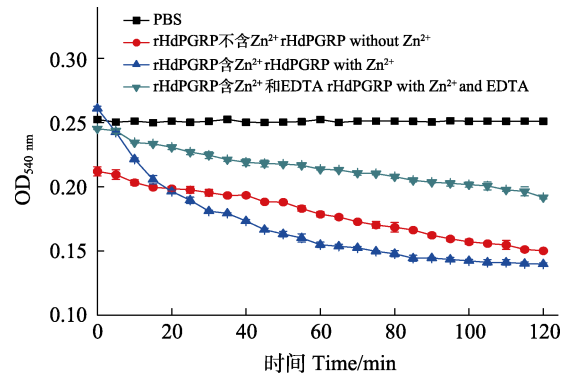


图 7 rHdPGRP 的酰胺酶活性

Fig.7 Amidase activity of rHdPGRP

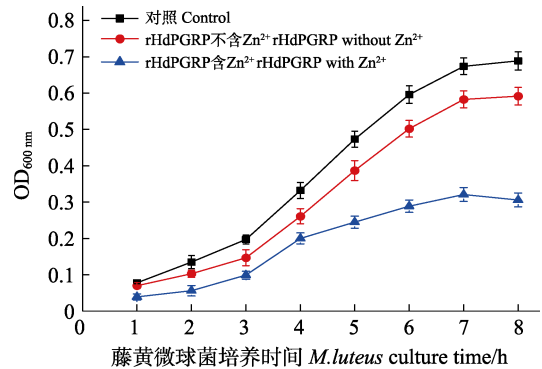


图 8 rHdPGRP 的抗菌活性(平均值±标准差, n=3)

Fig.8 Antibacterial activity of rHdPGRP (Mean±SD, n=3)

### 3 讨论

皱纹盘鲍作为一种海洋无脊椎动物, 被认为缺乏复杂的适应性免疫, 它们主要由先天免疫发挥机体防御, 需要通过一些模式识别蛋白来识别异己, 进而抵御外界病原菌的入侵。PGRP 作为特异性识别肽聚糖的模式识别蛋白, 在抵御以肽聚糖为细胞壁主要成分的微生物的免疫反应中发挥重要作用(Wei *et al*, 2018; Yang *et al*, 2019; 杨嘉龙, 2011)。本研究从皱纹盘鲍中鉴定了一种 PGRP, 并对其在组织中的分布情况、病原菌入侵时转录表达模式以及抗菌活性进行了研究。

多序列比对结果显示, HdPGRP 与其他软体动物的 PGRPs 具有高度的相似性, PGRP 结构域与噬菌体

的 T3 溶菌酶同源, 表明 HdPGRP 具有抗菌和凝集作用。此外, HdPGRP 中还发现了 SH3b 结构域, 在细菌蛋白中发现的 SH3 结构域同源物能介导不同的生理过程, 如增加局部蛋白浓度, 改变其亚细胞位置, 并介导大型多蛋白复合物的组装(Huang *et al.*, 2019; Morton *et al.*, 1994)。这些结构特征表明, HdPGRP 可能具有细菌识别和清除的效应功能。值得注意的是, 在软体动物中发现的 PGRPs 均为短型, 说明软体动物 PGRPs 介导的免疫防御机制可能与非软体动物不同。

鲍鱼属于半开放循环系统, 易受到多种微生物的侵入。在本研究中, 尽管 *hdprp* 在所测组织中均有表达, 但在不同组织其表达量完全不同, 表现出一定的组织特异性。与三角帆蚌的 *pgrps* 类似(Huang *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2014), *hdprp* 主要在皱纹盘鲍肝胰腺中表达, 而在日本盘鲍(*Haliotis discus discus*)中发现的另一种短型 *pgrp* 主要在血淋巴中表达(Premachandra *et al.*, 2014)。类似地, 在太平洋牡蛎中, *cgprp-s11* 和 *cgprp-s3* 分别在外套膜和消化盲囊中的表达量最高(Itoh *et al.*, 2008)。在大竹蛭中, *sgprp-s1* 主要在肌肉和肝胰腺中表达, 而 *sgprp-s2* 主要在鳃和外套膜中表达(杨顶珑, 2014)。不同病原菌引发的病害不同, *pgrps* 在不同的组织中选择性表达, 表明 PGRPs 有可能针对不同病原菌进行特异性识别。鳃弧菌作为皱纹盘鲍的一种重要致病菌, 通过产生热稳定和热不稳定的毒素使宿主发病(王瑞旋等, 2006), 在鳃弧菌刺激后, 血细胞中 *hdprp* 的表达显著升高, 并在 24 h 时达到最高, 可能是鳃弧菌细胞壁中的肽聚糖被 PGRP 识别, 进行信号传递并触发免疫反应(Hu *et al.*, 2020)。

PGRPs 具有酰胺酶活性, 通过水解连接 L-丙氨酸和 N-乙酰胞壁酸之间的酰胺键降解肽聚糖, 防止细菌过度激活免疫系统(Zaidman-Rémy *et al.*, 2006; Premachandra *et al.*, 2014; 杨嘉龙, 2011)。前期研究表明, 存在 4 个保守的  $Zn^{2+}$  结合残基是 PGRP 酰胺酶活性能够被激活的前提(Hu *et al.*, 2020), 与此相一致的是, HdPGRP 也鉴定出 4 个保守的  $Zn^{2+}$  结合位点( $H^{210}$ 、 $Y^{255}$ 、 $H^{318}$  和  $C^{330}$ )。在  $Zn^{2+}$  存在的情况下, 肽聚糖被 rHdPGRP 显著降解, 这与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) (Yang *et al.*, 2010) 和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的酰胺酶活性一致(Yang *et al.*, 2019)。研究表明, PGRPs 通过酰胺酶活性降解细胞壁上的肽聚糖, 细胞壁的损伤抑制细菌的生长, 从而发挥一定的抗菌作用(Hu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2003)。藤黄微球菌作为革兰氏阳性菌, 其细胞壁成分主要为肽聚糖, 本研究发现, rHdPGRP 在  $Zn^{2+}$  的作用下显著抑制藤黄微球菌的生长, 这表明 HdPGRP 对藤黄微球

菌的抑菌活性是通过酰胺酶活性实现的。

## 4 结论

本研究在皱纹盘鲍中鉴定了一种新的模式识别蛋白(HdPGRP), 对其在免疫防御中的作用进行了初步研究。HdPGRP 在进化及结构上较为保守, 具有保守的  $Zn^{2+}$  结合位点和酰胺酶催化位点。*hdprp* 在血细胞及各组织中均有表达, 血细胞中的 *hdprp* 能够响应鳃弧菌刺激显著上调, 表明其可能参与皱纹盘鲍抗细菌免疫防御。此外, 证实了 HdPGRP 具有酰胺酶活性, 对微生物病原菌具有一定的抗菌活性。这些结果为了解 HdPGRP 的功能特性及其在皱纹盘鲍免疫防御机制中的作用提供了基础依据。

## 参 考 文 献

- CAO D D, LIU J X, WANG Z G, *et al.* Expression analysis and functional characterization of *NOD2* in the resistance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 53–64 [曹丹丹, 刘金相, 王志刚, 等. 牙鲆 *NOD2* 基因的表达分析及在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 53–64]
- COTEUR G, MELLROTH P, LEFORTERY C D, *et al.* Peptidoglycan recognition proteins with amidase activity in early deuterostomes (Echinodermata). *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31(8): 790–804
- DZIARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 877–886
- GERDOL M, VENIER P. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 17–38
- HE T T. Comparative study on immunological responses of Pacific abalone and its hybrids with green abalone under *Vibrio harveyi* stress. Master's Thesis of Xiamen University, 2018 [何婷婷. 哈维氏弧菌胁迫下不同规格皱纹盘鲍和绿盘鲍免疫应答研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2018]
- HU Z G, CAO X B, GUO M, *et al.* Identification and characterization of a novel short-type peptidoglycan recognition protein in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 99: 257–266
- HUANG Y, PAN J L, LI X G, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a short peptidoglycan recognition protein from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 86: 571–580
- ITOH N, TAKAHASHI K G. Distribution of multiple

- peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(4): 409–417
- JIANG X Y, YU G L, SONG X K, *et al.* Survey and evaluation of the Qianliyan national aquatic germplasm reserve. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 1–7 [姜向阳, 于广磊, 宋秀凯, 等. 千里岩海域国家级水产种质资源保护区现状调查与评价. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 1–7]
- KASHYAP D R, ROMPCA A, GABALLA A, *et al.* Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. PLOS Pathogens, 2014, 10(7): e1004280
- LI X, YUAN S, SUN Z S, *et al.* Gene identification and functional analysis of peptidoglycan recognition protein from the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Fish and Shellfish Immunology, 2020, 106: 1014–1024
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- MELLROTH P, KARLSSON J, STEINER H. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(9): 7059–7064
- MELLROTH P, STEINER H. PGRP-SB1: An *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase with antibacterial activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 350(4): 994–999
- MORTON C J, CAMPBELL I D. SH3 Domains: Molecular 'Velcro'. Current Biology, 1994, 4(7): 615–617
- PREMACHANDRA H K A, ELVITIGALA D A S, WHANG I, *et al.* Identification of a novel molluscan short-type peptidoglycan recognition protein in disk abalone (*Haliotis discus discus*) involved in host antibacterial defense. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 99–107
- ROUT A K, PARAMANIK S, DEHURY B, *et al.* Elucidating the molecular interaction of zebrafish (*Danio rerio*) peptidoglycan recognition protein 2 with diaminopimelic acid and lysine type peptidoglycans using in silico approaches. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020, 38(12): 3687–3699
- SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76–85
- TAO Y, YANG Z Y, ZHANG X, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression of the peptidoglycan recognition protein gene HcPGRP1 and its isoform HcPGRP1a from the freshwater mussel *Hyriopsis cumingi*. Genetics and Molecular Biology, 2014, 37(3): 508–517
- WANG R X, XU L W, FENG J, *et al.* Advances in studies on diseases caused by microorganisms of abalone. Transactions of Oceanology and Limnology, 2006, 90(2): 117–124 [王瑞旋, 徐力文, 冯娟, 等. 鲍类微生物性疾病研究进展. 海洋湖沼通报, 2006, 90(2): 117–124]
- WANG X W, WANG J X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 981–989
- WANG Z M, LI X N, COCKLIN R R, *et al.* Human peptidoglycan recognition protein-L is an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(49): 49044–49052
- WEI X M, YANG D L, LI H Y, *et al.* Peptidoglycan recognition protein of *Solen grandis* (SgPGRP-S1) mediates immune recognition and bacteria clearance. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 73: 30–36
- WU F C, QUE H Y, ZHANG G F. History, current status, and future development of the Pacific abalone seed release and sea ranching in China. Marine Sciences, 2020, 44(8): 56–68 [吴富村, 阙华勇, 张国范. 我国皱纹盘鲍底播增殖历史、现状及未来发展趋势. 海洋科学, 2020, 44(8): 56–68]
- YANG D L, HAN Y J, LIU Y L, *et al.* A peptidoglycan recognition protein involved in immune recognition and immune defenses in *Ruditapes philippinarum*. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 88: 441–448
- YANG D L. Study on the immune defense functions of peptidoglycan recognition protein in razor clam (*Solen grandis*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [杨顶珑. 大竹蛭肽聚糖识别蛋白的免疫防御功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- YANG J L, WANG W, WEI X M, *et al.* Peptidoglycan recognition protein of *Chlamys farreri* (CfPGRP-S1) mediates immune defenses against bacterial infection. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(12): 1300–1307
- YANG J L. Study on the mechanism of immune response mediated by key pattern recognition receptors in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 [杨嘉龙. 栉孔扇贝关键模式识别受体介导的免疫应答机制研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011]
- ZAIDMAN-RÉMY A, HERVÉ M, POIDEVIN M, *et al.* The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity, 2006, 24(4): 463–473

## A Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) from *Haliotis discus hannai*: Possible Roles in Antibacterial Properties

CHEN Yuying<sup>1,2,3</sup>, HAN Yijin<sup>3</sup>, LIU Xiangquan<sup>2</sup>, HE Jinxia<sup>2</sup>, YANG Dinglong<sup>3①</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai, Shandong 264006, China; 3. Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

**Abstract** In this study, peptide PGRP (designated HdPGRP) was identified and characterized from the abalone *Haliotis discus hannai*. Multiple alignments and phylogenetic analyses strongly suggested that HdPGRP is a new member of the PGRP superfamily and belongs to the short PGRP family, similar to peptides from other marine mollusks. The full length of HdPGRP is 1467 bp, encoding a polypeptide of 354 amino acids (aa) with a signal peptide (1~18 aa), an SH3b domain (93~160 aa), a typical PGRP domain (179~322 aa), and an Ami\_2 domain (191~322 aa). In addition, four conserved Zn<sup>2+</sup>-binding sites (H<sup>209</sup>, Y<sup>255</sup>, H<sup>318</sup>, and C<sup>330</sup>) and five conserved amide-catalysis sites (H<sup>209</sup>, Y<sup>255</sup>, H<sup>318</sup>, T<sup>328</sup>, and C<sup>330</sup>) were found in the HdPGRP sequence. In abalone, *hdprp* exhibited different tissue expression patterns, and was strongly expressed in the hepatopancreas, moderately expressed in hemocytes, mantle, and gills, and slightly expressed in muscle. *Vibrio anguillarum* is one of the main pathogens of *H. discus hannai*; after *V. anguillarum* infection, expression of *hdprp* in hemocytes showed a trend of first increasing and then decreasing, reaching a maximum at 24 h. Subsequently, expression of HdPGRP decreased, and there was no significant difference compared with the control group at 72 h, demonstrating that expression of HdPGRP had returned to normal levels. SDS-PAGE results showed that recombinant HdPGRP (rHdPGRP) has a molecular mass of 30 kDa, which is in line with the value predicted for HdPGRP. PGRPs usually have amidase activity, degrading peptidoglycan by hydrolyzing the amide bond that links peptide units to muramic acid residues of glycan strands. rHdPGRP exhibited Zn<sup>2+</sup>-dependent amidase activity and catalyzed the degradation of insoluble peptidoglycan. In addition, rHdPGRP exhibited significant antibacterial activity against the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* in the logarithmic phase in the presence of Zn<sup>2+</sup>, indicating that the antibacterial activity of HdPGRP might be dependent on amidase activity. In summary, HdPGRP plays an important role in PGRP-mediated antibacterial mechanisms, especially for eliminating invading bacteria.

**Key words** *Haliotis discus hannai*; Peptidoglycan recognition protein; Immune response

① Corresponding author: YANG Dinglong, E-mail: dlyang@yic.ac.cn

# 《渔业科学进展》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 包振民 BAO Zhenmin 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	叶乃好 YE Naihao	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰) REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李军(美) LI Jun	李纯厚 LI Chunhou
李健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng	张国范 ZHANG Guofan
陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美) CHEN Yong	邵长伟 SHAO Changwei	林洪 LIN Hong
周永灿 ZHOU Yongcan	单秀娟 SHAN Xiujuan	赵宪勇 ZHAO Xiaoyong	俞志明 YU Zhiming
秦启伟 QIN Qiwei	秦松 QIN Song	徐跑 XU Pao	徐皓 XU Hao
黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	崔利锋 CUI Lifeng	董云伟 DONG Yunwei
解绶启 XIE Shouqi	谭志军 TAN Zhijun	薛长湖 XUE Changhu	薛清刚 XUE Qinggang

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 孔杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

## 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第43卷 第4期 2022年8月

## PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.43 No.4 Aug. 2022

主管单位 中华人民共和国农业农村部  
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yykxjz.cn

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主编 金显仕

印刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

Published by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580  
http://www.yykxjz.cn; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch  
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading  
Corporation

P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定价: 40.00元



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869



9 772095 986224

08 >