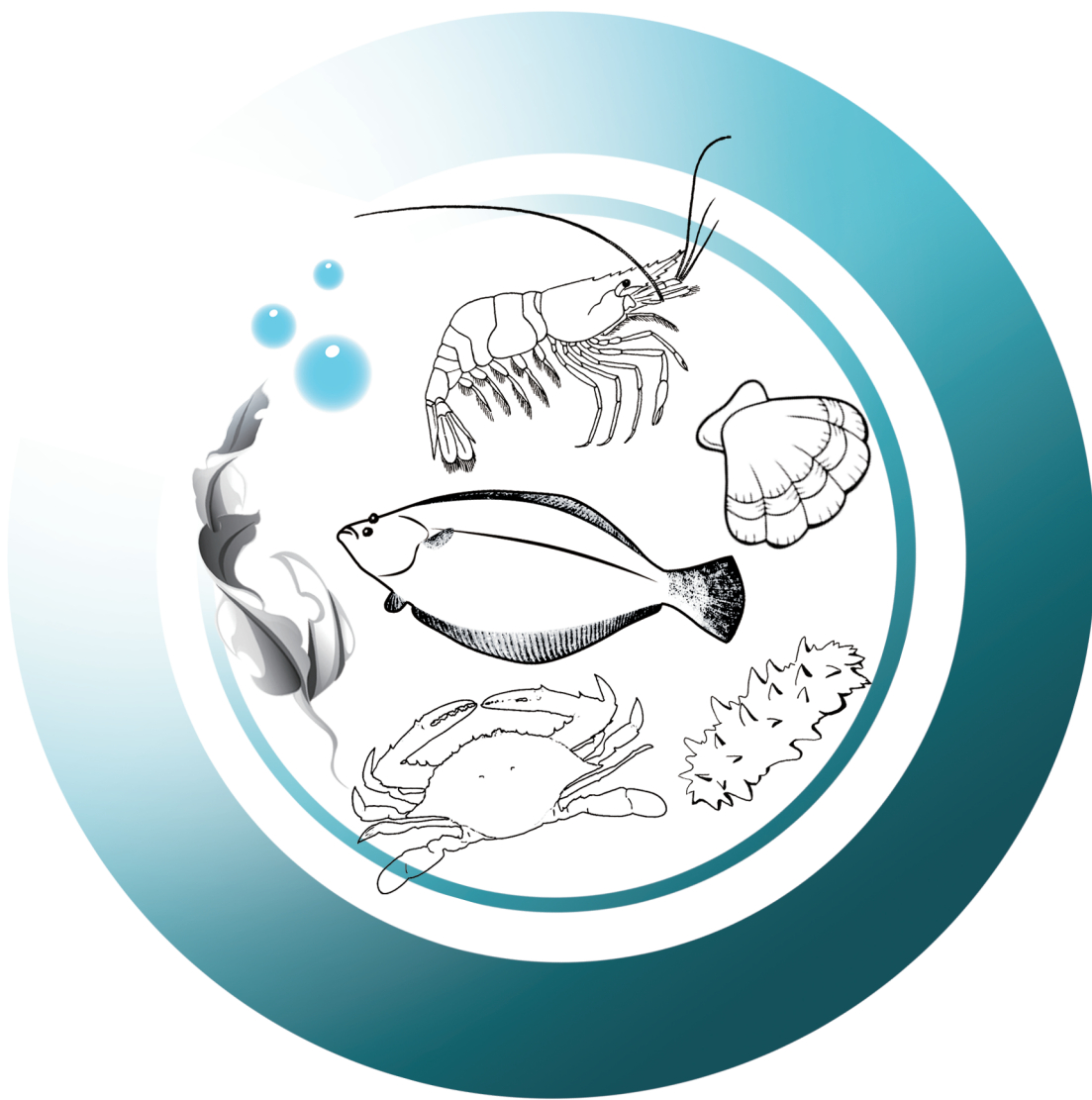


# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第44卷 VOL.44 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 44 卷 第 4 期

2023 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：海草床修复与保护

- 海草有性繁殖成花诱因研究进展与展望.....杜建国 陈炜霖 邱广龙 张 涵 陈 彬 胡文佳 郭玉清 (1)
- 荣成天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游生物的时空变化特征.....路 加 郭 栋 余思焜 李文涛 张沛东 (12)
- 赤霉素和弱酸对鳗草种子萌发和生理特性的影响.....于 兵 杨启文 张彦浩 李洪辰 张沛东 (26)
- 不同水体浊度对鳗草存活、生长和生理的影响.....李艳平 张彦浩 吴晓晓 李文涛 张沛东 (35)

### 专栏：黄条鲮生长发育的生理生态适应

- 黄条鲮胚胎发育和早期仔鱼生长的温盐适应特性.....徐永江 崔爱君 姜 燕 王 滨 周鹤庭 柳学周 刘新富 (45)
- 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性.....方 璐 徐永江 崔爱君 姜 燕 王 滨 周鹤庭 柳学周 (55)
- 黄条鲮白介素-1 $\beta$  基因克隆及其免疫应答分析.....王 琳 王 滨 徐永江 关长涛 (64)
- 黄条鲮 *npv* 基因克隆及其对饥饿再投喂的应答特性.....邱夏君 王 滨 徐永江 崔爱君 姜 燕 (74)
- 黄条鲮 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 基因克隆、表达及其生长调控作用.....张文静 徐永江 崔爱君 王 滨 姜 燕 王开杰 周鹤庭 (84)

### 研究论文

- 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场时空分布及其最适环境特征.....杨 超 张 衡 韩海斌 赵国庆 石永闯 徐 博 蒋沛雯 严云志 葛雅丽 (99)
- 牡蛎-海参筏式综合养殖可行性研究.....黄俊杭 房景辉 方建光 于瑞海 郑小东 毛玉泽 蒋增杰 (111)
- 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素.....裴泓霖 谭八梅 王 萃 夏兴龙 郝振林 丁 君 常亚青 (121)
- 军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用.....马 騫 吴雨薇 王刘永 赵晓龙 周启苓 陈 刚 黄建盛 (135)
- 拟赤梢鱼卵巢早期发育与 *sox3* 基因 cDNA 克隆及表达分析.....王 雨 徐 伟 杨 建 耿龙武 张宇婷 (145)
- 缢蛏 Toll 样受体家族基因全基因组水平鉴定及其在弧菌刺激下的表达分析.....杜博博 姚 璐 李治平 董迎辉 任建峰 (155)
- 低氧胁迫下中华圆田螺的肝脏转录组学分析.....殷丽坤 黄 凯 于 凯 宿志健 郭睿婕 杨旭红 吴耀庭 (167)
- 秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色、光照强度及光色的选择行为.....张 林 兰开勇 宋荣群 熊冬梅 李瑞娇 李军文 姜海波 邵 俭 (179)
- 2 种饵料模式对稻田养殖中华绒螯蟹幼蟹养殖性能和生理代谢的影响.....杨帅帅 朱筛成 张冬冬 潘祯祥 李嘉尧 吴旭干 郑善玉 (188)
- 叶尔羌高原鳅耳石形态探究及群体判别分析.....王新月 陈生熬 王程欣 瞿方泽 常德胜 许 豪 李大鹏 (201)
- 海带孢子囊发育过程中的形态结构与生理生化变化研究.....刘 义 梁洲瑞 张朋艳 袁艳敏 吴宇坤 段茂宏 刘福利 戴宏亮 (212)
- 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种 PCR 检测方法的建立.....刘静静 李贵阳 晋怀远 高 晔 王会林 李 杰 (223)
- 2 种乌贼肌肉的营养成分及品质评价.....贾俊琦 张 悦 廖月琴 林慧敏 (234)
- 甲壳类水产品中氨基脲的来源及生成机理研究进展.....陈胜军 高芳芳 王 迪 冯 阳 邓建朝 潘 创 赵永强 李春生 (244)



# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.44 No.4 August 2023

### Special Topic: Restoration and Conservation in Seagrass Ecosystems

- Research Progress and Prospects of Flowering Induction for Seagrass Sexual Reproduction ..... (1)  
..... DU Jianguo, CHEN Weilin, QIU Guanglong, ZHANG Han, CHEN Bin, HU Wenjia, GUO Yuqing  
Spatial-Temporal Variation of Characteristics of Plankton in a Seagrass Bed and an Adjacent Area of Bare Sand in Swan Lake, Rongcheng, China ..... (12)  
..... LU Jia, GUO Dong, YU Sitian, LI Wentao, ZHANG Peidong  
Effects of Gibberellin and Weak Acid on Seed Germination and Physiological Characteristics of the Eelgrass *Zostera marina* ..... (26)  
..... YU Bing, YANG Qiwen, ZHANG Yanhao, LI Hongchen, ZHANG Peidong  
Effects of Different Water Turbidity Levels on the Survival, Growth and Physiology of the Eelgrass *Zostera marina* ..... (35)  
..... LI Yanping, ZHANG Yanhao, WU Xiaoxiao, LI Wentao, ZHANG Peidong

### Special Topic: Physiological and Ecological Adaption of Yellowtail Kingfish Growth

- The Ecological and Physiological Responses of Embryonic Development and Early Larval Growth of *Seriola aureovittata* to Temperature and Salinity ..... (45)  
..... XU Yongjiang, CUI Aijun, JIANG Yan, WANG Bin, ZHOU Heting, LIU Xuezhou, LIU Xinfu  
Molecular Cloning and Temporal Expression Pattern of *hsp70* Gene During the Early Life Stages of *Seriola aureovittata* ..... (55)  
..... FANG Lu, XU Yongjiang, CUI Aijun, JIANG Yan, WANG Bin, ZHOU Heting, LIU Xuezhou  
Two Putative Interleukin-1 beta Molecules Involved in the Immune Response of *Seriola aureovittata* ..... (64)  
..... WANG Lin, WANG Bin, XU Yongjiang, GUAN Changtao  
Molecular Cloning and Characterization of *npv* Gene and Its Response to Starvation-Refeeding Strategy in *Seriola aureovittata* ..... (74)  
..... QIU Xiajun, WANG Bin, XU Yongjiang, CUI Aijun, JIANG Yan  
Molecular Cloning, Expression Profiles of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 (*igfbp-1*) and *igfbp-2* and their regulation effects on growth of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*) ..... (84)  
..... ZHANG Wenjing, XU Yongjiang, CUI Aijun, WANG Bin, JIANG Yan, WANG Kaijie, ZHOU Heting

### Research Article

- Spatio-Temporal Distribution of *Sardinops sagax* in the North Pacific: Optimal Environmental Characteristics ..... (99)  
..... YANG Chao, ZHANG Heng, HAN Haibin, ZHAO Guoqing, SHI Yongchuang, XU Bo, JIANG Peiwen, YAN Yunzhi, GE Yali  
Feasibility of Integrated Oyster-Sea Cucumber Raft Culture ..... (111)  
..... HUANG Junhang, FANG Jinghui, FANG Jianguang, YU Ruihai, ZHENG Xiaodong, MAO Yuze, JIANG Zengjie  
Composition of the Bacterial Community in the Sediment of Ponds for Culturing Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*): Influence of Environmental Factors During Ice-Melting Period ..... (121)  
..... PEI Honglin, TAN Bamei, WANG Luo, XIA Xinglong, HAO Zhenlin, DING Jun, CHANG Yaqing  
Screening and Characterization of Polymorphic SSR Markers Based on Whole Genome Sequencing of Cobia (*Rachycentron canadum*) ..... (135)  
..... MA Qian, WU Yuwei, WANG Liuyong, ZHAO Xiaolong, ZHOU Qiling, CHEN Gang, HUANG Jiansheng  
Early Ovary Development, *sox3* Gene cDNA Cloning and Expression Analysis of *Pseudaspius leptocephalus* ..... (145)  
..... WANG Yu, XU Wei, YANG Jian, GENG Longwu, ZHANG Yuting  
Genome-Wide Identification of Toll-Like Receptor Family Genes in *Sinonovacula constricta* and Their Expression in Response to *Vibrio parahaemolyticus* Infection ..... (155)  
..... DU Bobo, YAO Lu, LI Zhiping, DONG Yinghui, REN Jianfeng  
Transcriptome Analysis of Liver Tissue of *Cipangopaludina cathayensis* Under Hypoxic Stress ..... (167)  
..... YIN Likun, HUANG Kai, YU Kai, SU Zhijian, GUO Ruijie, YANG Xuhong, WU Yaoting  
Selective Behavior of Juvenile *Brachymystax tsinlingensis* Depends on Substrate Color, Light Intensity, and Light Color ..... (179)  
..... ZHANG Lin, LAN Kaiyong, SONG Rongqun, XIONG Dongmei, LI Ruijiao, LI Junwen, JIANG Haibo, SHAO Jian  
Effects of Two Feeding Modes on the Culture Performance and Physiological Metabolism of Juvenile Chinese Mitten Crabs (*Eriocheir sinensis*) Reared in Rice Fields ..... (188)  
..... YANG Shuaishuai, ZHU Shaicheng, ZHANG Dongdong, PAN Zhenxiang, LI Jiayao, WU Xugan, ZHENG Shanyu  
Otolith Morphology and Population Discrimination of *Triplophysa yarkandensis* ..... (201)  
..... WANG Xinyue, CHEN Sheng'ao, WANG Chengxin, ZI Fangze, CHANG Desheng, XU Hao, LI Dapeng  
The Morphological Structure, Physiological and Biochemical Changes During Sorus Development of *Saccharina japonica* ..... (212)  
..... LIU Yi, LIANG Zhouhui, ZHANG Pengyan, YUAN Yanmin, WU Yukun, DUAN Maohong, LIU Fuli, DAI Hongliang  
Development of a PCR Method to Detect the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* ..... (223)  
..... LIU Jingjing, LI Guiyang, JIN Huaiyuan, GAO Ye, WANG Huilin, LI Jie  
Evaluation of the Nutritional Composition and Quality of Muscles in Two Cuttlefish Species ..... (234)  
..... JIA Junqi, ZHANG Yue, LIAO Yueqin, LIN Huimin  
Progress on the Origin and Formation Mechanism of Semicarbazide in Crustacean Aquatic Products ..... (244)  
..... CHEN Shengjun, GAO Fangfang, WANG Di, FENG Yang, DENG Jianchao, PAN Chuang, ZHAO Yongqiang, LI Chunsheng

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221229001

http://www.yykxjz.cn/

杜建国, 陈炜霖, 邱广龙, 张涵, 陈彬, 胡文佳, 郭玉清. 海草有性繁殖成花诱因研究进展与展望. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 01-11

DU J G, CHEN W L, QIU G L, ZHANG H, CHEN B, HU W J, GUO Y Q. Research progress and prospects of flowering induction for seagrass sexual reproduction. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 01-11

# 海草有性繁殖成花诱因研究进展与展望\*



杜建国<sup>1,2,3</sup> 陈炜霖<sup>1,2</sup> 邱广龙<sup>4</sup> 张涵<sup>2</sup>  
陈彬<sup>2</sup> 胡文佳<sup>2</sup> 郭玉清<sup>1①</sup>

(1. 集美大学水产学院 福建 厦门 361021;

2. 自然资源部海洋生态保护与修复重点实验室 自然资源部第三海洋研究所 福建 厦门 361005;

3. 厦门海洋职业技术学院 福建 厦门 361100

4. 广西海洋科学院(广西红树林研究中心) 广西红树林保护与利用重点实验室 广西 北海 536000)

**摘要** 海草是一类生活在热带至温带浅海、完全适应海洋环境的沉水被子植物的总称。海草床作为连接珊瑚礁与红树林的纽带,具有重要的生态功能与经济价值。近年来,随着人们对海草认识的不断加深,海草的有性繁殖行为逐渐受到关注,而成花诱导是海草从营养生长向生殖生长过渡的重要环节。本文综述了海草有性繁殖中成花诱因的研究进展,探讨了温度、光照、盐度等相关因子对海草成花诱导的影响,分析了海草响应外界环境刺激与内源信号启动开花途径可能集中在光周期途径、春化途径和自发途径上。建议未来海草床保护修复工作应加强对海草有性生殖行为的研究,明确不同海域海草的集中开花和结果时间,对海草床生态系统的修复与保护具有重要意义。

**关键词** 海草; 有性繁殖; 成花诱导; 开花途径

中图分类号 Q948.8 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0001-11

海草(Seagrass)是一类生活在热带至温带浅海、完全适应海洋环境的沉水被子植物的总称(Unsworth *et al.*, 2022; 张沛东等, 2020)。海草生态系统作为连接珊瑚礁与红树林生态系统的纽带,在改善水质、提供育幼场、保护海岸带、提供蓝碳、缓解气候变化等方面有着重要贡献(Macreadie *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020a, b),海草也为鱼类、海龟、儒艮等海洋生物直接或间接提供食物来源(黄小平等, 2006; Du *et al.*, 2016、2019)。但是,自20世纪80年代以来,由于全球气候变化以及区域性围填海、破坏性挖捕、水体富营养化等人为活动影响,全球海草面积减少约29%,并正以每年1%~7%的速度继续减少(Waycott *et al.*, 2009;

Unsworth *et al.*, 2022)。与此同时,我国海草床也面临着不断退化的风险(郑凤英等, 2013; Hu *et al.*, 2021)。截至2020年,我国海草床总面积约为 $2.6 \times 10^4 \text{ hm}^2$ ,近岸海域超过80%的海草床已经消失(于硕等, 2022)。以海南岛为例,2009—2019年期间,黎安港海草床面积减少约 $114 \text{ hm}^2$ ,占黎安港海草床总面积的55%(吴钟解等, 2014; 陈石泉等, 2020);2016—2020年新村港海草床面积减少约 $79 \text{ hm}^2$ ,约占新村港海草床总面积的16%(Li *et al.*, 2022)。此外,海南岛其他海草床的面积、盖度、密度、生物量也有所降低。分布在中国北方的温带海草床,其面积、种类、生物量等也存在着不同程度的下降(刘伟妍等, 2017)。

\* 国家自然科学基金(42176153、41676096)和自然资源部项目(HR04-210705)共同资助。杜建国, E-mail: dujianguo@tio.org.cn

① 通信作者: 郭玉清, 教授, E-mail: guoyuqing@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-12-29, 收修改稿日期: 2023-04-07

为了缓解海草床面临的威胁,了解海草的繁殖特性并积极开展海草床保护修复工作尤为重要(Du *et al.*, 2023)。海草的繁殖方式分为无性繁殖与有性繁殖,其中,无性繁殖主要以克隆生长的方式(张沛东等, 2020),有性繁殖则包括了植株开花、传粉、受精、种子发育等过程,少部分海草还具有胎生和假胎生行为(Kuo *et al.*, 1990; Ballesteros *et al.*, 2005)。当前对海草床的修复大多基于其克隆生长的繁殖模式,虽然这种方式生育成本低、个体存活率高,但易造成海草遗传多样性降低,一旦环境超过某种优势海草的抵抗阈值,便易造成海草床大面积的退化。相比之下,基于海草有性繁殖开展的修复工作能够维持海草床种群遗传多样性、建立当地新的海草斑块,基于此构建的土壤种子库也有利于海草床干扰后快速恢复(邱广龙等, 2022)。成花过程是海草有性繁殖的关键阶段,包括成花诱导、花发育和开花 3 个过程(周琴等, 2018)。其中,成花诱导是海草从营养生长向生殖生长过渡的重要环节,也是成花过程中最关键的步骤(宋杨等, 2014)。当前对海草成花诱导的机制与影响因素大多停留在野外观测与记录阶段,但基于有性繁殖的海草床修复方式已被公认为是较好的海草床修复方式。本文综述了近年来国内外关于海草成花记录与研究的相关文献,概述了影响海草成花的环境因素,拟为海草床监测、评估与修复提供理论参考。

## 1 海草有性繁殖特点

海草的有性繁殖具有以下几个特点:(1)有性繁

殖具有策略性:海草为雌雄同株或雌雄异株(表 1)(Ackerman, 2007)。Cox 等(1988)调查发现,龟裂泰来草(*Thalassia testudinum*)雄花与雌花比例为 60:1,这可能是因为在海洋环境中,花粉易因接收不足而产生花粉限制,以及产生雄花所需能量远低于产生雌花和果实的能量(van Tussenbroek *et al.*, 2010、2016a)。海草的雌性器官成熟的先后不同,海草可以通过这种方式促进异交,保证基因的多样性(Ruckelshaus, 1995; Ackerman, 2007; Entrambasaguas *et al.*, 2017)。(2)授粉方式独特:与陆生植物不同,海草的花小且构造上大多退化(柯智仁, 2004)。部分海草产丝状花粉,这种花粉形态更有利于在海水动态流动的状态情况下进行水上或水下授粉(表 1)(Cox, 1983; Ackerman, 2007)。此外,花粉的释放、运输、捕获受到水流与海草冠层之间相互作用的影响(Ackerman, 2002)。之前观点普遍认为,海草授粉仅通过海水流动进行,海洋生物不参与海草的授粉过程,但 van Tussenbroek 等(2016b)通过室内实验发现,在夜间没有水流的情况下,无脊椎动物在花朵附近觅食时,黏性的花粉粒会附着在无脊椎动物身上,当其靠近雌花柱头时被捕获并成功授粉。(3)海草植株的成熟时间较长:海草具有一年生与多年生的生长形式,不同的生长形式对海草群落的生物多样性与遗传多样性具有重要的贡献(邱广龙等, 2022)。在对菲律宾的海草床调查中发现,圆叶丝粉草(*Cymodocea rotundata*)与泰来草(*Thalassia hemprichii*)开花率分别为 5.6%和 17.0%,且开花株年龄皆为 0.5 年以上(Duarte *et al.*, 1997),而鳗草(*Zostera marina*)的开花株

表 1 不同属海草有性生殖特性

Tab.1 Selected reproductive characters in seagrass genera

属名 Genus	授粉方式 Pollination mode	雌雄同株/雌雄异株 Dicliny	花粉 Pollen
丝粉草属 <i>Cymodocea</i>	水下 Submarine	雌雄异株 Dioecious	丝状 Filiform
二药草属 <i>Halodule</i>	水下 Submarine	雌雄异株 Dioecious	丝状 Filiform
针叶草属 <i>Syringodium</i>	水下 Submarine	雌雄异株 Dioecious	丝状 Filiform
全楔草属 <i>Thalassodendron</i>	水下 Submarine	雌雄异株 Dioecious	丝状 Filiform
海菖蒲属 <i>Enhalus</i>	水面 Surface	雌雄异株 Dioecious	球状 Spherical
喜盐草属 <i>Halophila</i>	水下 Submarine	雌雄同株、雌雄异株 Monoecious and dioecious	椭圆状 Ellipsoidal
泰来草属 <i>Thalassia</i>	水下 Submarine	雌雄异株 Dioecious	球状 Spherical
川蔓草属 <i>Ruppia</i>	水面 Surface	雌雄同株 Monoecious	丝状 Filiform
虾形草属 <i>Phyllospadix</i>	水下、水面 Submarine and surface	雌雄异株 Dioecious	丝状 Filiform
鳗草属 <i>Zostera</i>	水下、水面 Submarine and surface	雌雄同株 Monoecious	丝状 Filiform

注: 改自 Ackerman (2007)。Note: Adapted from Ackerman (2007).

年龄均为1年以上(Duarte *et al.*, 1997; Blok *et al.*, 2018)。(4)受多因素影响: 海草有性生殖行为不仅受单一因素影响, 而是多种因素共同作用的结果。研究表明, 温度(McMillan, 1980; Qin *et al.*, 2020a)、光照(Collier *et al.*, 2012; Olesen *et al.*, 2017)、盐度(Fernández *et al.*, 1999; Ankel *et al.*, 2021)、水深(Cox, 1988; Tongkok *et al.*, 2017)、营养盐(Smith *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2017)等相关因素均会对海草有性生殖造成影响。

## 2 海草成花的研究趋势分析

### 2.1 研究数量趋势

本研究基于文献计量手段对海草成花研究发展趋势进行了分析与归纳总结。研究选择了美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information, ISI)的Web of Science 核心合集的 SCIE 数据库为检索源, 选择已发表的国际期刊作为研究对象。以“seagrass flowering”作为检索关键词, 共检索出相关文献 300 篇。从 2008—2021 逐年文献发表数量上看, 海草成花相关文献整体呈增长趋势, 并在近年来逐渐得到更多的关注(图 1)。

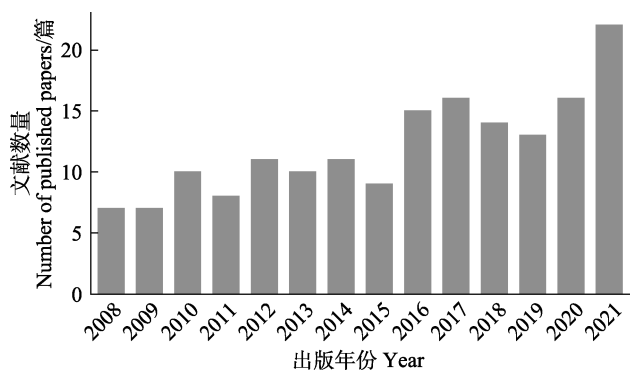


图 1 在 Web of science 检索 2008—2021 年关键词“seagrass flowering”文献数量

Fig.1 Number of literatures searched for the keyword “seagrass flowering” from 2008 to 2021 in Web of Science

### 2.2 海草有性繁殖与成花研究热点分析

高频关键词反映了该研究领域的热点主题与发展方向。利用 VOSviewer (Version 1.6.18) 软件中的聚类算法对高频关键词进行统计和共现分析, 并构建共现网络(图 2)。结果显示, 1991—2022 年关于海草有性繁殖研究的高频关键词依次包括种群、发育、种子、遗传多样性、动力学、成花和发芽等。对出现频率>3 的关键词(共有 204 个)进行共现分析, 通过关键词共现关系聚类, 近 32 年来, 海草有性繁殖领域的研究

热点主题可归纳为相关因子研究、种群遗传研究、种群保护研究。3 个研究主题之间存在交叉联系。

本研究对海草成花研究热点进一步进行筛选, 并对高频关键词进行统计和共现分析, 并构建共现网络(图 3)。结果显示, 从 1991—2022 年关于海草成花研究的高频关键词依次包括种子、生物量、授粉、花粉、气候变化、物候、营养物、光、食草活动、幼苗、季节性、温度、沉积物和盐度等。对出现频率>3 的关键词(共有 250 个)进行共现分析, 通过关键词共现关系聚类, 近 32 年来海草成花领域的研究热点主题可归纳为以下 3 个主题: (1)成花条件研究: 主要关键词包括温度、光照、盐度、沉积物、营养盐、密度、生物量等; (2)种子发育研究: 主要关键词包括种子、物候学、气候变化、水质、纬度等; (3)海草授粉研究: 主要关键词包括授粉、花粉、DNA、雌雄比例、资源分配等。

## 3 影响海草成花的相关因子

尽管当前关于高等植物的成花诱因的研究多集中于模式生物与经济作物上, 对海草的关注度相对较少, 但已有相关研究表明, 海草中同样存在诱导其成花的相关因子。这些因子主要分为两个方面, 一方面主要与生物自身遗传、生理特性等因素相关, 另一方面则主要与非生物因素(如温度、盐度、光照等)间接调控有关(Diaz-Almela *et al.*, 2016)。

### 3.1 温度

海草对温度的适应性较强, 除了北冰洋沿岸外, 全球几乎所有海岸都有海草的分布(Short *et al.*, 2007)。热带海草的最适温度为 23~32 °C, 温带海草的最适温度约为 12~26 °C (林显程等, 2019)。全球气候变化可能通过影响海草成花而影响海草的物候学(Diaz-almela *et al.*, 2007)。当海水温度升高时, 海草可能通过减少碳储备、降低有性繁殖的强度, 以应对热胁迫造成的生理反应, 过高的温度可能导致分生组织缺氧而造成植物死亡, 从而影响越冬种群的规模, 并对下一年海草种群的开花时间、强度、规模产生影响(Greve *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2020b)。如泰来草的成花与低温表现出显著相关性(McMillan, 1980; 许战洲等, 2008), 这种低温促使植物开花的现象成为春化作用, 春化途径也是一些植物诱导开花的途径之一(孙昌辉等, 2007; 刘永平等, 2015)。但不同种类的海草对温度的响应不同。对大洋波喜荡草(*Posidonia oceanica*)研究发现, 其开花率、开花强度与全年最高海表温存在显著正相关关系(Diaz-Almela *et al.*, 2007)。Ruiz 等



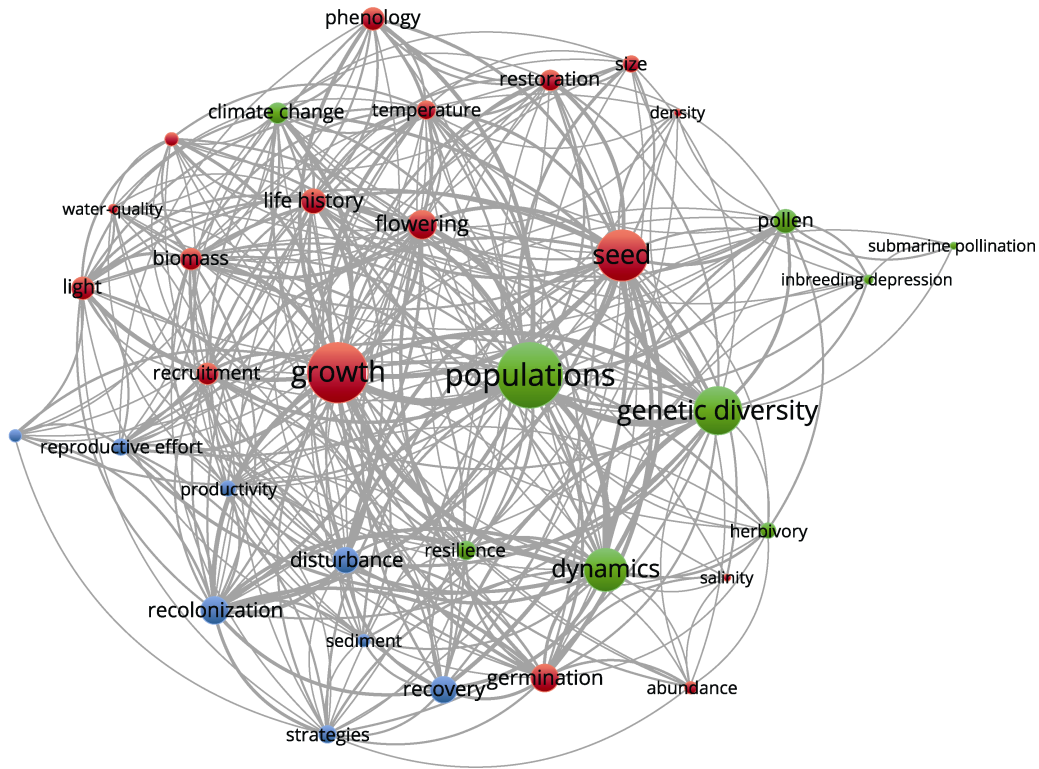


图 2 1991—2022 年海草有性繁殖研究的主要关键词及其共现关系

Fig.2 Main keywords and their co-occurrence in the seagrass sexual reproduction research in 1991–2022

红色为相关因子研究，绿色为种群遗传研究，蓝色为种群保护研究；字号与圆圈大小表示关键词的共现强度。  
 Red is the study of relevant factors, green is the study of population genetics, and blue is the study of population protection. Word size and circle size indicate the co-occurrence strength of keyword.

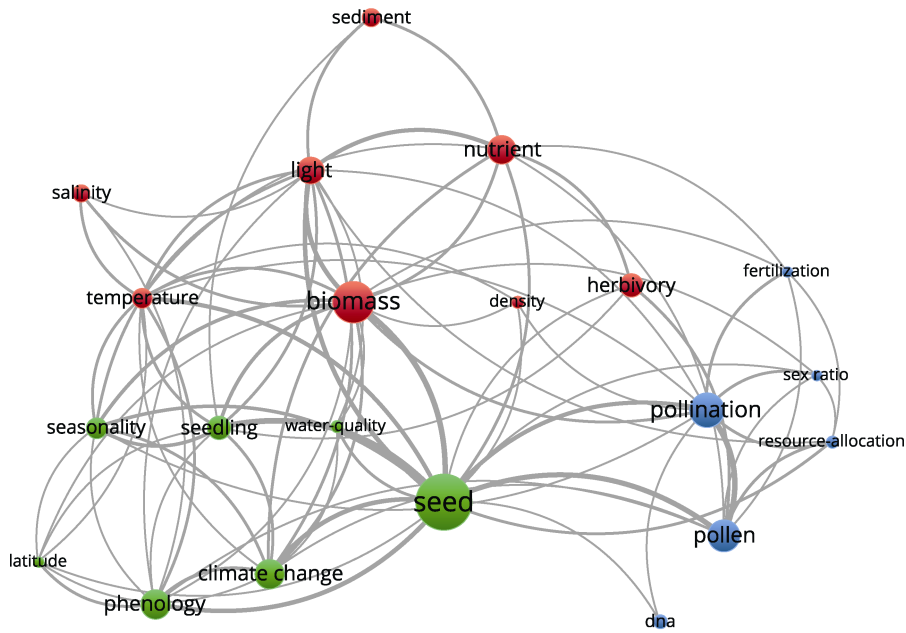


图 3 1991—2022 年海草成花研究的主要关键词及其共现关系

Fig.3 Main keywords and their co-occurrence in the seagrass flowering research in 1991-2022

红色为成花条件研究，绿色为种子发育研究，蓝色为海草授粉研究；字号与圆圈大小表示关键词的共现强度。  
 Red is the study of flowering conditions, green is the study of seed development, and blue is the study of seagrass pollination; word size and circle size indicate the co-occurrence strength of keyword.

表2 我国不同种类海草成花温度

Tab.2 Flowering temperature of different seagrass in China

属名 Genus	种名 Species	成花温度 Flowering temperature/ ℃	参考文献 Reference
丝粉草属 <i>Cymodocea</i>	圆叶丝粉草 <i>Cymodocea rotundata</i>	27~31	McMillan (1982)
	齿叶丝粉草 <i>C. serrulate</i>	27~31	McMillan (1982)
二药草属 <i>Halodule</i>	羽叶二药草 <i>Halodule pinifolia</i>	—	—
	单脉二药草 <i>H. uninervis</i>	24~27	McMillan (1982)
针叶草属 <i>Syringodium</i>	针叶草 <i>Syringodium isoetifolium</i>	22~26	McMillan (1982)
全楔草属 <i>Thalassodendron</i>	全楔草 <i>Thalassodendron ciliatum</i>	—	—
海菖蒲属 <i>Enhalus</i>	海菖蒲 <i>Enhalus acoroides</i>	23~33	Kenyon 等(1997)
喜盐草属 <i>Halophila</i>	贝克喜盐草 <i>Halophila beccarii</i>	30~38	Zakaria 等(2002)
	毛叶喜盐草 <i>H. decipiens</i>	—	—
	小喜盐草 <i>H. minor</i>	—	—
	卵叶喜盐草 <i>H. ovalis</i>	—	—
泰来草属 <i>Thalassia</i>	泰来草 <i>Thalassia hemprichii</i>	22~26	McMillan (1982)
川蔓草属 <i>Ruppia</i>	川蔓草 <i>Ruppia</i> sp.*	18~25	Silberhorn 等(1996)
虾形草属 <i>Phyllospadix</i>	虾形草 <i>Phyllospadix</i> sp.*	15~21	Williams (1995)
鳎草属 <i>Zostera</i>	宽叶鳎草 <i>Zostera asiatica</i>	—	—
	丛生鳎草 <i>Z. caespitosa</i>	10~16	Lee 等(2005)
	具茎鳎草 <i>Z. caulescens</i>	—	—
	日本鳎草 <i>Z. japonica</i>	18~22	Lee 等(2005)
	鳎草 <i>Z. marina</i>	7~21	Lee 等(2005)

注: \*表示未在中国分布的同属海草成花温度。—表示无成花温度数据。

Note: \* It indicates the seagrass flowering temperature of the same genus not distributed in China. — indicates no flowering temperature data.

(2018)在室内人工环境下对大洋波喜荡草(*Posidonia oceanica*)进行了热暴露实验, 同样表明热暴露是大洋波喜荡草成花的主要诱因。因此, 温度的升高或降低都可能诱导海草成花, 作者通过收集我国不同种类海草成花温度数据(表 2), 推测低温可能是海草受到春化作用而诱导成花, 但高温可能是通过环境压力导致海草受迫, 从而诱导成花。

### 3.2 光照

海草为沉水性植物, 除部分浅海海草床在潮汐过程中出现短时间裸露外, 大部分种类海草终生沉水生活。光照强度的变化一方面直接影响海草植株的形态特征、元素含量、生物量等(符妙等, 2022); 另一方面海草可以通过感知光照时间的周期变化调节自身新陈代谢及生理过程, 如植株生长发育、固碳能力、相关基因表达等(Collier *et al*, 2012; Trevathan-Tackett *et al*, 2018; Wong *et al*, 2020; Ruocco *et al*, 2022)。Wong 等(2020)对鳎草海草床进行人为遮阴, 遮阴后的鳎草通过改变植株形态、降低密度以维持低光照下的碳平衡。对有性繁殖而言, 光照强度不足减少了海

草对有性繁殖的投入, 限制海草繁殖芽的诱导, 导致海草的营养枝与开花枝的密度下降(Olesen *et al*, 2017; Qin *et al*, 2020b)。McMillan(1982)曾在实验室连续光照的环境下观察到多个属的海草开花, 表明海草可能是长日照植物, 即在长日照条件下可以促进开花, 短日照则会抑制开花。海草的有性繁殖整体呈季节性, 在一年四季中, 夏季的日照时间长、温度高, 较高温度和较高光照强度是海草进入有性繁殖的诱因, 这也与温带海草多集中在夏季开花相符合(Ramage *et al*, 1998), 但同时将温度与光照作为变量对海草有性繁殖的研究较少。因此, 未来对海草有性繁殖诱因研究过程中, 应将温度与光强、光周期、光质等光照条件综合探讨。

### 3.3 盐度

海草长期生活在近岸海域, 盐度的耐受范围为5~35 (Nejrup *et al*, 2008)。盐度通过影响海草细胞渗透压而影响海草的生理生化结构(杨冉, 2015)。对混合种海草床而言, 盐度的升高与降低对不同种类海草的生长动态产生影响, 甚至可能会发生物种演替(Qiu

*et al*, 2017)。关于盐度对海草成花的影响, 相关文章记载较少且说法不一。McMillan (1980)研究表明, 齿叶丝粉草(*Cymodocea serrulata*)的开花量随着盐度降低至 25 而增加。Ramage(1998)则认为, 盐度下降会导致海草无法繁殖。此外也有研究表明, 诺氏鳗草(*Zostera noltii*)在低盐度与高盐度情况下表现出较为相似的物候学(Ankel *et al*, 2021)。这表明盐度对海草成花的影响并不直接, 可能通过对相关酶活性、光合速率等因子对海草产生影响(Fernández *et al*, 1999)。对多数海草种类而言, 降低盐度可以提高海草种子的萌发率并缩短萌发历期(韦梅球, 2017), 故在受到低盐度胁迫时, 海草植株可能更倾向于增加有性繁殖的投入。对不同种类、地域的海草在受到盐度胁迫响应是否一致仍然需要进一步研究。

### 3.4 水深与潮汐

海草一般栖息于潮下带 6 m 以上的近岸浅水区, 最深也可分布至 90 m, 分布深度主要受到光照的影响(Duarte, 1991)。浅层海草与较深层海草的有性繁殖策略相似, 但浅层海草开花芽发育早于较深层海草, 可能通过这种方式影响种群内的基因交流与遗传结构(von Staats *et al*, 2020)。潮汐导致的深度变化会影响授粉的成功与否。对部分海草而言, 雄花花粉释放后浮于水面, 借助水流在水面上漂浮运输, 花粉与同样浮于水面雌花花柱头完成授粉过程, 此时水深若大于雌花花梗长度, 雌花将无法浮于水面从而影响授粉过程(Rollón *et al*, 2003)。Cox 等(1988、1991)研究发现, 全楔草(*Thalassodendron ciliatum*)与龟裂泰来草的开花与当地的极低潮有关, 这可能是潮间带海草长期适应的结果, 通过在低潮时期海草密集开花, 更多的花粉与浮于水面的雌花授粉, 通过低潮将立体授粉过程转为平面授粉过程, 以提高授粉效率(Cox, 1983)。但潮汐在海草有性繁殖过程中可能并不起主导作用, 可能通过改变水深影响光照与温度并对海草产生刺激。Tongkok (2017)研究发现, 处于花期的泰来草对不同潮位、不同时间段的响应不同, 在低潮位的夜间, 泰来草的花开得最盛。

### 3.5 营养盐

海草生长于近岸, 土地肥料使用与养殖尾水的排放易造成近岸海草床底质有机物富集。相关研究发现, 在沉积物营养富集区域的鳗草的开花枝、开花枝高度、子房数量等都随着沉积物营养盐的富集而增加, 较高的生殖枝能获得来自更远的花粉, 一定程度上避免了近亲杂交, 而子房数量则是直接影响海草种

子产量(Jackson *et al*, 2017; Johnson *et al*, 2017)。营养盐过多富集还可能导致底质缺氧, 产生有毒物质, 并对海草床系统造成生存压力, 通过胁迫诱导海草开花(Smith *et al*, 2016; Guerrero-Meseguer *et al*, 2021)。而水体的营养盐富集引发的大型海藻与附生藻类大量繁殖, 使得海草可利用光能大幅度减少, 从而对有性繁殖产生抑制(黄驰等, 2017; 刘伟妍等, 2017)。

### 3.6 其他

除以上主要环境因素外, 地理位置(如纬度)也会对海草成花有一定影响。研究表明, 广泛分布于不同纬度的温带海草鳗草, 其开花物候与繁殖策略略有不同(Qin *et al*, 2020b)。未来海洋变暖一方面可能导致温带海草物种北移, 另一方面可能导致海草有性繁殖提前, 增强高纬度地区海草的有性繁殖能力(Blok *et al*, 2018; Wang *et al*, 2022)。此外, 近年来一些研究也表明, 海草具有逆境诱导开花的现象, 即在受到胁迫时提前开花, 通过调节自身生长与发育应对外界环境变化(张敏等, 2016)。如日本鳗草(*Zostera japonica*) 在沉积物掩埋的干扰下, 有性繁殖率随着掩埋程度的增加呈先上升后下降的趋势(Henderson *et al*, 2015)。Lekammudiyanse 等(2022)研究也表明, 修剪至 1 cm 的牟氏鳗草(*Zostera muelleri*)的开花率显著高于修剪至 3 cm 牟氏鳗草的开花率, 这些结果均表明, 在逆境条件下, 海草会将个体更多资源分配给有性繁殖以抵御环境干扰。

## 4 海草有性繁殖在海草床修复与保护方面的应用

海草床修复最早记录于 1947 年, 随着近年来海草床持续退化以及人们对海草床重要性认识的深入, 海草床的修复与保护逐渐成为关注的热点(陈石泉等, 2021)。海草床修复方式可分为 3 种: 生境恢复法、种子法和植株移植法(张剑, 2022)。其中, 种子法被认为是成本低、破坏少, 并能够维持遗传多样性的修复方式(于硕等, 2019)。但现阶段仍然面临种子收集难度大、数量不稳定等问题(韦梅球, 2017)。明确海草有性繁殖的成花诱因、准确判断成花时间, 对使用种子法进行海草修复具有重要意义。

水生植物形成新种群更易依赖单一基因型的克隆生殖(Silvertown, 2008)。当一个特定基因型的海草非常适合当地的环境, 那么可能会更多选择通过克隆生殖来扩大种群量, 减少有性繁殖, 降低可能改变关键性状的风险; 不适当当地环境的基因型则可能会通

过有性繁殖产生新性状以提高适应能力(Henderson *et al.*, 2015)。海草大多为雌雄异株, 广泛的无性繁殖可能构成较多单性海草种群, 这可能也是众多野外观察中果实与种子数量较少的原因(Rasheed, 2004)。海草在适宜的环境下进行大规模克隆生殖, 意味着其面对胁迫时的承受能力较低, 对大面积海草床而言, 可以将基因型作为一项评估指标。

海草在生长过程中需要将有限的资源分配在生长、繁殖、抵御环境变化等方面, 以保证其在当前环境下拥有适应能力(Rasheed, 2004)。海草床有性繁殖情况可能是对当地海草床压力状况的一种反映, 长期处于高资源可利用地区的海草个体相较于低资源可利用地区的个体更可能将自身大部分能量用于海草有性繁殖(Johnson *et al.*, 2017)。然而, 现阶段关于逆境对海草有性繁殖的研究较少, 在海草床长期监测过程中也未将其应用, 建议未来在对海草床监测中可将有性繁殖率与一些受迫指标共同分析, 更加全面对海草床健康状况进行评估。

## 5 总结与展望

近年来, 国外研究者对海草有性繁殖关注度在逐步提升, 我国关于海草研究起步较晚, 对海草有性繁殖行为关注较低。本文整理了国内外海草成花相关文献, 列出6项直接或间接影响海草成花的因素, 认为海草响应外界环境刺激与内源信号启动开花途径可能集中在光周期途径、春化途径和自发途径上。但海草不同种类、不同种群间有性繁殖差异较大, 现阶段对海草成花诱因与机理的认识仍不充分。

针对目前国内外海草有性繁殖成花诱因研究存在的主要问题, 建议在以下几方面开展重点工作: (1) 国内外对海草有性繁殖研究较少, 野外海草的有性繁殖行为可能比目前认为的更常见, 明确主要海草床集中开花时间对研究海草成花诱因、保护海草种子库等有促进作用; (2) 开展海草成花诱因室内相关模拟实验, 明确海草成花诱因, 为室外海草有性生殖行为提供参考依据; (3) 海草在逆境环境下进行有性繁殖的行为可用于指示气候与环境的变化, 但现有的调查研究对海草有性繁殖的关注度较低, 也未将有性繁殖率作为一项长期监测指标, 建议在海草床长期监测、评估健康时将性繁殖率与环境因子相结合, 共同评估海草床状况。

## 参 考 文 献

ACKERMAN J D. Diffusivity in a marine macrophyte canopy:

- Implications for submarine pollination and dispersal. *American Journal of Botany*, 2002, 89(7): 1119–1127
- ACKERMAN J D. Sexual reproduction of seagrasses: Pollination in the marine context. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer Netherlands, 2007, 89–109
- ANKEL M, RUBAL M, VEIGA P, *et al.* Reproductive cycle of the seagrass *Zostera noltei* in the Ria de Aveiro Lagoon. *Plants*, 2021, 10(11): 2286
- BALLESTEROS E, CEBRIAN E, GARCIA-RUBIES A, *et al.* Pseudovivipary, a new form of asexual reproduction in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Botanica Marina*, 2005, 48(2): 175–177
- BLOK S E, OLESEN B, KRAUSE-JENSEN D. Life history events of eelgrass *Zostera marina* L. populations across gradients of latitude and temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 2018, 590: 79–93
- CHEN S Q, CAI Z F, SHEN J, *et al.* Restoration effect and influencing factors of seagrass bed in Gaolong Bay, Hainan. *Journal of Applied Oceanography*, 2021, 40(1): 65–73 [陈石泉, 蔡泽富, 沈捷, 等. 海南高隆湾海草床修复成效及影响因素. *应用海洋学学报*, 2021, 40(1): 65–73]
- CHEN S Q, PANG Q Z, CAI Z F, *et al.* Analysis of distribution characteristics, health status, and influencing factors of seagrass bed in Li'an Lagoon, Hainan Island. *Marine Sciences*, 2020, 44(11): 57–64 [陈石泉, 庞巧珠, 蔡泽富, 等. 海南黎安港海草床分布特征、健康状况及影响因素分析. *海洋科学*, 2020, 44(11): 57–64]
- COLLIER C J, WAYCOTT M, OSPINA A G. Responses of four Indo-West Pacific seagrass species to shading. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 65(4/5/6/7/8/9): 342–354
- COX P A, TOMLINSON P B. Pollination ecology of a seagrass, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae), in St. Croix. *American Journal of Botany*, 1988, 75(7): 958–965
- COX P A. Hydrophilous pollination of a dioecious seagrass, *Thalassodendron ciliatum* (Cymodoceaceae) in Kenya. *Biotropica*, 1991: 159–165
- COX P A. Search theory, random motion, and the convergent evolution of pollen and spore morphology in aquatic plants. *The American Naturalist*, 1983, 121(1): 9–31
- DIAZ-ALMELA E, MARBÀ N, ÁLVAREZ E, *et al.* Patterns of seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering in the Western Mediterranean. *Marine Biology*, 2006, 148(4): 723–742
- DIAZ-ALMELA E, MARBA N, DUARTE C M. Consequences of Mediterranean warming events in seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering records. *Global Change Biology*, 2007, 13(1): 224–235
- DU J G, CHEN B, NAGELKERKEN I, *et al.* Protect seagrass meadows in China's waters. *Science*, 2023, 379(6631): 447
- DU J G, CHEN Z H, XIE M L, *et al.* Analysis of organic carbon sources in tropical seagrass fish: A case study of the east coast of Hainan Province. *Marine Biology Research*, 2019, 15(8/9): 513–522
- DU J G, HU W J, NAGELKERKEN I, *et al.* Seagrass meadows provide multiple benefits to adjacent coral reefs through various microhabitat functions. *Ecosystem Health and*



- Sustainability, 2020a, 6(1): 1812433
- DU J G, XIE M L, WANG Y Y, *et al.* Connectivity of fish assemblages along the mangrove-seagrass-coral reef continuum in Wenchang, China. *Acta Oceanologica Sinica*, 2020b, 39(8): 43–52
- DU J G, ZHENG X Q, PERISTIWADY T, *et al.* Food sources and trophic structure of fishes and benthic macroinvertebrates in a tropical seagrass meadow revealed by stable isotope analysis. *Marine Biology Research*, 2016, 12(7): 748–757
- DUARTE C M, URI J S, AGAWIN N S R, *et al.* Flowering frequency of Philippine seagrasses. *Botanica Marina*, 1997, 40: 497–500
- DUARTE C M. Seagrass depth limits. *Aquatic Botany*, 1991, 40(4): 363–377
- ENTRAMBASAGUAS L, JAHNKE M, BIFFALI E, *et al.* Tissue-specific transcriptomic profiling provides new insights into the reproductive ecology and biology of the iconic seagrass species *Posidonia oceanica*. *Marine Genomics*, 2017, 35: 51–61
- FERNÁNDEZ J A, GARCÍA-SÁNCHEZ M J, FELLE H H. Physiological evidence for a proton pump and sodium exclusion mechanisms at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(341): 1763–1768
- FU M, DENG N, LIAO L G, *et al.* Effects of shading on morphological characteristics and element content of *Enhalus acoroides*. *Journal of Tropical Biology*, 2022, 13(3): 212–219 [符妙, 邓娜, 廖立国, 等. 遮光对海菖蒲形态特征及元素含量的影响. *热带生物学报*, 2022, 13(3): 212–219]
- GREVE T M, BORUM J, PEDERSEN O. Meristematic oxygen variability in eelgrass (*Zostera marina*). *Limnology and Oceanography*, 2003, 48(1): 210–216
- GUERRERO-MESEGUER L, VEIGA P, SAMPAIO L, *et al.* Sediment characteristics determine the flowering effort of *Zostera noltei* meadows inhabiting a human-dominated lagoon. *Plants*, 2021, 10(7): 1387
- HENDERSON J, HACKER S D. Buried alive: An invasive seagrass (*Zostera japonica*) changes its reproductive allocation in response to sediment disturbance. *Marine Ecology Progress Series*, 2015, 532: 123–136
- HU W J, ZHANG D, CHEN B, *et al.* Mapping the seagrass conservation and restoration priorities: Coupling habitat suitability and anthropogenic pressures. *Ecological Indicators*, 2021, 129: 107960
- HUANG C, ZHANG J P, JIANG Z J, *et al.* Nutrients uptake processes of seagrass and its competition with epiphytic algae. *Journal of Fisheries Research*, 2017, 39(3): 222–228 [黄驰, 张景平, 江志坚, 等. 海草对营养盐的吸收过程及其与附生藻类的竞争机制. *渔业研究*, 2017, 39(3): 222–228]
- HUANG X P, HUANG L M, LI Y H, *et al.* Seagrass beds and its habitat threat in South China coastal areas. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(S): 114–119 [黄小平, 黄良民, 李颖虹, 等. 华南沿海主要海草床及其生境威胁. *科学通报*, 2006, 51(S): 114–119]
- JACKSON L J, FURMAN B T, PETERSON B J. Morphological response of *Zostera marina* reproductive shoots to fertilized porewater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2017, 489: 1–6
- JOHNSON A J, MOORE K A, ORTH R J. The influence of resource availability on flowering intensity in *Zostera marina* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2017, 490: 13–22
- KENYON R A, CONACHER C A, POINER I R. Seasonal growth and reproduction of *Enhalus acoroides* (Lf) Royle in a shallow bay in the western Gulf of Carpentaria, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 1997, 48(4): 335–342
- KO C J. A taxonomic and distributional study of seagrasses in Taiwan. Master's Thesis of National Sun Yat-Sen University, 2004 [柯智仁. 台湾海草分类与分布之研究. 台湾中山大学硕士研究生学位论文, 2004]
- KUO J, KIRKMAN H. Anatomy of viviparous seagrasses seedlings of *Amphibolis* and *Thalassodendron* and their nutrient supply. *Botanica Marina*, 1990, 33(1): 117–126
- LEE S M, LEE S Y, CHOI C I. Reproductive phenology of four Korean seagrasses, *Zostera caespitosa*, *Z. caulescens*, *Z. japonica* and *Z. marina*. *Ocean and Polar Research*, 2005, 27(2): 125–133
- LEKAMMUDIYANSE M U, SAUNDERS M I, FLINT N, *et al.* Simulated megaherbivore grazing as a driver of seagrass flowering. *Marine Environmental Research*, 2022, 179: 105698
- LI Y Q, BAI J W, ZHANG L, *et al.* Mapping and spatial variation of seagrasses in Xincun, Hainan Province, China, based on satellite images. *Remote Sensing*, 2022, 14(10): 2373
- LIN X C, LING J, ZHANG Y Y, *et al.* Research progress on affecting factors of seagrass growth and application of omics technology. *Biotechnology*, 2019, 29(5): 507–511 [林显程, 凌娟, 张燕英, 等. 海草生长的影响因素及组学技术研究进展. *生物技术*, 2019, 29(5): 507–511]
- LIU W Y, HAN Q Y, TANG Y Q, *et al.* Review of nutrient enrichment and global warming effects on seagrasses. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, 36(4): 1087–1096 [刘伟妍, 韩秋影, 唐玉琴, 等. 营养盐富集和全球温度升高对海草的影响. *生态学杂志*, 2017, 36(4): 1087–1096]
- LIU Y P, YANG J, YANG M F. Pathways of flowering regulation in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(11): 1553–1566 [刘永平, 杨静, 杨明峰. 植物开花调控途径. *生物工程学报*, 2015, 31(11): 1553–1566]
- MACREADIE P I, ANTON A, RAVEN J A, *et al.* The future of blue carbon science. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1–13
- MCMILLAN C. Flowering under controlled conditions by *Cymodocea serrulata*, *Halophila stipulacea*, *Syringodium isoetifolium*, *Zostera capensis* and *Thalassia hemprichii* from Kenya. *Aquatic Botany*, 1980, 8: 323–336
- MCMILLAN C. Reproductive physiology of tropical seagrasses. *Aquatic Botany*, 1982, 14: 245–258
- NEJRUP L B, PEDERSEN M F. Effects of salinity and water temperature on the ecological performance of *Zostera*

- marina*. Aquatic Botany, 2008, 88(3): 239–246
- OLESEN B, KRAUSE-JENSEN D, CHRISTENSEN P B. Depth-related changes in reproductive strategy of a cold-temperate *Zostera marina* meadow. Estuaries and Coasts, 2017, 40(2): 553–563
- QIN L Z, KIM S H, SONG H J, *et al.* Influence of regional water temperature variability on the flowering phenology and sexual reproduction of the seagrass *Zostera marina* in Korean coastal waters. Estuaries and Coasts, 2020a, 43(3): 449–462
- QIN L Z, KIM S H, SONG H J, *et al.* Long-term variability in the flowering phenology and intensity of the temperate seagrass *Zostera marina* in response to regional sea warming. Ecological Indicators, 2020b, 119: 106821
- QIU G L, QUAN J H, SU Z N, *et al.* Characteristics, influence factors, research methods of seagrass seed bank and its significance in seagrass bed recovery. Journal of Applied Oceanography, 2022, 41(2): 193–200 [邱广龙, 权佳惠, 苏治南, 等. 海草土壤种子库: 特征、影响因素、研究方法及其在受损海草场恢复中的作用. 应用海洋学学报, 2022, 41(2): 193–200]
- QIU G L, SHORT F T, FAN H Q, *et al.* Temporal variation of intertidal seagrass in southern China (2008–2014). Ocean Science Journal, 2017, 52(3): 397–410
- RAMAGE D L, SCHIEL D R. Reproduction in the seagrass *Zostera novazelandica* on intertidal platforms in southern New Zealand. Marine Biology, 1998, 130(3): 479–489
- RASHEED M A. Recovery and succession in a multi-species tropical seagrass meadow following experimental disturbance: The role of sexual and asexual reproduction. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 310(1): 13–45
- ROLLÓN R N, VAN STEVENINCK E D D R, VAN VIERSSEN W. Spatio-temporal variation in sexual reproduction of the tropical seagrass *Enhalus acoroides* (Lf) Royle in Cape Bolinao, NW Philippines. Aquatic Botany, 2003, 76(4): 339–354
- RUCKELSHAUS M H. Estimates of outcrossing rates and of inbreeding depression in a population of the marine angiosperm *Zostera marina*. Marine Biology, 1995, 123(3): 583–593
- RUIZ J M, MARÍN-GUIRAO L, GARCÍA-MUÑOZ R, *et al.* Experimental evidence of warming-induced flowering in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. Marine Pollution Bulletin, 2018, 134: 49–54
- RUOCCO M, JAHNKE M, SILVA J, *et al.* 2b-RAD genotyping of the seagrass *Cymodocea nodosa* along a latitudinal cline identifies candidate genes for environmental adaptation. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 866758
- SHORT F, CARRUTHERS T, DENNISON W, *et al.* Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 350(1/2): 3–20
- SILBERHORN G M, DEWING S, MASON P A. Production of reproductive shoots, vegetative shoots, and seeds in populations of *Ruppia maritima* L. from the Chesapeake Bay, Virginia. Wetlands, 1996, 16(2): 232–239
- SILVERTOWN J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: Evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. International Journal of Plant Sciences, 2008, 169(1): 157–168
- SMITH T M, YORK P H, MACREADIE P I, *et al.* Spatial variation in reproductive effort of a southern Australian seagrass. Marine Environmental Research, 2016, 120: 214–224
- SONG Y, DOU L D, ZHANG H J. Molecular and genetic mechanisms of control of floral induction in higher plants. Plant Physiology Journal, 2014, 50(10): 1459–1468 [宋杨, 窦连登, 张红军. 高等植物成花诱导调控的分子和遗传机制. 植物生理学报, 2014, 50(10): 1459–1468]
- SUN C H, DENG X J, FANG J, *et al.* An overview of flowering transition in higher plants. Hereditas, 2007, 29(10): 1182–1190 [孙昌辉, 邓晓建, 方军, 等. 高等植物开花诱导研究进展. 遗传, 2007, 29(10): 1182–1190]
- TONGKOK P, KAEWSURALIKHIT C, KERMANEE P. Reproductive organ characteristics and phenology of a seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson in the Andaman Sea, Thailand. Taiwan, 2017, 62(2): 168–174
- TREVATHAN-TACKETT S M, WESSEL C, CEBRIÁN J, *et al.* Effects of small-scale, shading-induced seagrass loss on blue carbon storage: Implications for management of degraded seagrass ecosystems. Journal of Applied Ecology, 2018, 55(3): 1351–1359
- UNSWORTH R K F, CULLEN-UNSWORTH L C, JONES B L H, *et al.* The planetary role of seagrass conservation. Science, 2022, 377(6606): 609–613
- VAN TUSSENBROEK B I, MONTERO M M, WONG R, *et al.* Pollen limitation in a dioecious seagrass: Evidence from a field experiment. Marine Ecology Progress Series, 2010, 419: 283–288
- VAN TUSSENBROEK B I, SOISSONS L M, BOUMA T J, *et al.* Pollen limitation may be a common allee effect in marine hydrophilous plants: Implications for decline and recovery in seagrasses. Oecologia, 2016a, 182(2): 595–609
- VAN TUSSENBROEK B I, VILLAMIL N, MÁRQUEZ-GUZMÁN J, *et al.* Experimental evidence of pollination in marine flowers by invertebrate fauna. Nature Communications, 2016b, 7(1): 1–6
- VON STAATS D A, HANLEY T C, HAYS C G, *et al.* Intra-meadow variation in seagrass flowering phenology across depths. Estuaries and Coasts, 2021, 44(2): 325–338
- WANG M, WANG Y, LIU G, *et al.* Potential distribution of seagrass meadows based on the maxent model in Chinese coastal waters. Journal of Ocean University of China, 2022, 21(5): 1351–1361
- WAYCOTT M, DUARTE C M, CARRUTHERS T J B, *et al.* Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(30): 12377–12381
- WEI M Q. Influential factors of the storage and germination of seed of intertidal seagrass *Halophila beccarii*. Master's Thesis of Guangxi University, 2017 [韦梅球. 潮间带海草

- 贝克喜盐草种子储存与萌发影响因素的研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2017]
- WILLIAMS S L. Surfgrass (*Phyllospadix torreyi*) reproduction: Reproductive phenology, resource allocation, and male rarity. *Ecology*, 1995, 76(6): 1953–1970
- WONG M C, GRIFFITHS G, VERCAEMER B. Seasonal response and recovery of eelgrass (*Zostera marina*) to short-term reductions in light availability. *Estuaries and Coasts*, 2020, 43: 120–134
- WU Z J, CHEN S Q, WANG D R, *et al.* The health assessment of the sea grass bed ecosystem in the east coast of Hainan Islands. *Marine Sciences*, 2014, 38(8): 67–74 [吴钟解, 陈石泉, 王道儒, 等. 海南岛东海岸海草床生态系统健康评价. *海洋科学*, 2014, 38(8): 67–74]
- XU Z Z, HUANG L M, HUANG X P, *et al.* A primary study on sexual reproduction of seagrass *Thalassia hemprichii* at Xincun Bay. *Journal of Tropical Oceanography*, 2008, 27(2): 60–63 [许战洲, 黄良民, 黄小平, 等. 新村湾泰来藻有性繁殖的初步研究. *热带海洋学报*, 2008, 27(2): 60–63]
- YANG R. The effects of temperature, light intensity and salinity on *Halophila ovalis* growth, physiological and biochemical characteristics. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2015 [杨冉. 温度、光照、盐度对喜盐草生长及生理生化特性的影响. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- YU S, CHEN X Y, RUAN Y G, *et al.* Atlas of China seagrass plants. Beijing: China Ocean Press, 2022 [于硕, 陈旭阳, 阮迎港, 等. 中国海草植物图鉴. 北京: 海洋出版社, 2022]
- YU S, ZHANG J P, CUI L J, *et al.* Preliminary study on seed-based restoration for *Enhalus acoroides* meadow. *Journal of Tropical Oceanography*, 2019, 38(1): 49–54 [于硕, 张景平, 崔黎军, 等. 基于种子法的海菖蒲海草床恢复. *热带海洋学报*, 2019, 38(01): 49–54]
- ZAKARIA M H, BUJANG J S, ARSHAD A. Flowering, fruiting and seedling of annual *Halophila beccarii* Aschers in peninsular Malaysia. *Bulletin of Marine Science*, 2002, 71(3): 1199–1205
- ZHANG J. Transplant restoration effect of *Thalassia hemprichii* in Galong Bay and Xincun Lagoon of Hainan. Master's Thesis of Hainan Tropical Ocean University, 2022 [张剑. 海南高隆湾与新村港泰来草移植修复效果研究. 海南热带海洋学院硕士研究生学位论文, 2022]
- ZHANG M, ZHU J X, WANG L, *et al.* Progress of stress-induced flowering in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(10): 1301–1308 [张敏, 朱佳旭, 王磊, 等. 逆境诱导植物开花的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(10): 1301–1308]
- ZHANG P D, ZHANG Y H, ZHANG H Y, *et al.* Research advances in shoot propagation theory and planting technique of seagrasses. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 181–189 [张沛东, 张彦浩, 张宏瑜, 等. 海草植株扩繁理论及其定植效应的研究进展. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 181–189]
- ZHENG F Y, QIU G L, FAN H Q, *et al.* Diversity, distribution and conservation of Chinese seagrass species. *Biodiversity Science*, 2013, 21(5): 517–526 [郑凤英, 邱广龙, 范航清, 等. 中国海草的多样性、分布及保护. *生物多样性*, 2013, 21(5): 517–526]
- ZHOU Q, ZHANG S S, BAO M Z, *et al.* Advances on molecular mechanism of floral initiation in higher plants. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(11): 3681–3692 [周琴, 张思思, 包满珠, 等. 高等植物成花诱导的分子机理研究进展. *分子植物育种*, 2018, 16(11): 3681–3692]

(编辑 冯小花)

## Research Progress and Prospects of Flowering Induction for Seagrass Sexual Reproduction

DU Jianguo<sup>1,2,3</sup>, CHEN Weilin<sup>1,2</sup>, QIU Guanglong<sup>4</sup>, ZHANG Han<sup>2</sup>,  
CHEN Bin<sup>2</sup>, HU Wenjia<sup>2</sup>, GUO Yuqing<sup>1①</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamenn 361021, China; 2. Key Laboratory of Marine Ecological Conservation and Restoration, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China;

3. Faculty of Marine Biology, Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China;

4. Guangxi Key Laboratory of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Academy of Marine Sciences (Guangxi Mangrove Research Centre), Beihai 536000, China)

**Abstract** Seagrass is a group of flowering plants capable of completing their life cycle in a marine environment. It not only provides a refuge for biodiversity and essential fish spawning and

① Corresponding author: GUO Yuqing, E-mail: guoyuqing@jmu.edu.cn

nursery grounds, but also provides ecologically and socioeconomically important services for urban coasts. Seagrass is widely distributed along temperate and tropical coastlines globally. The biodiversity corresponds with differences in the relative importance of sexual (seed production) and asexual (clonal growth) life history strategies in the maintenance of seagrass populations. Sexual reproduction in predominantly clonal marine plants increases recombination favoring adaptation and enhancing species resilience to environmental change. Flowering induction is an important link in the transition from vegetative growth to reproductive growth of seagrasses. Recent studies on seagrasses suggest that flowering intensity and frequency are correlated with global climate change, and the response of seagrasses will be more complex, and potentially more resilient than previously imagined.

Seagrass environments are characterized by physical conditions, such as temperature, salinity, currents, waves, turbulence, and light. Each of these parameters has the potential to affect vegetation from the smallest (molecular and physiological) to the largest (ecosystem as well as global) scale. Based on bibliometric methods, this study summarized the development trend of seagrass flowering formation research. The SCIE database of the Web of Science core collection of the Institute for Scientific Information (ISI) was chosen as the retrieval source, and select published international journals were chosen as the research object. With "seagrass flowering" as the search keyword, a total of 300 related publications were retrieved. In terms of the number of relevant publications each year, there was an overall increasing trend, indicating that this topic has gradually received more attention in recent years, which has great research potential.

This review summarizes the research progress of flowering inducement in the sexual reproduction of seagrasses and discusses the influence of physical factors on the flowering induction of seagrasses. It was previously thought that the flowering pathway initiated by seagrasses in response to environmental factors and endogenous signals may focus on the photoperiod, vernalization, and spontaneous pathways. However, the sexual reproduction of different species is different, and studying the interaction between seagrasses and their physical environment may improve understanding of the processes that influence their biology. This review focuses on the following aspects: 1) Clarifying the period of concentrated flowering of the seagrass bed, which is conducive to studying the inducement of flowering of seagrass and protecting the seagrass seed bank. 2) Discussing whether more genotypes of seagrass should be introduced for planting in the process of seagrass bed repair to avoid large-scale clonal reproduction of a single genotype of seagrass. 3) How sexual reproduction of seagrasses under adverse environments can be used to indicate changes in the climate and environment. However, existing studies have paid little attention to the sexual reproduction of seagrass beds, and do not consider the sexual reproduction rate as a long-term monitoring indicator. It is suggested that the sexual reproduction rate should be combined with environmental factors in the future long-term monitoring and assessment of the health status of seagrass beds to jointly assess their pressure status.

**Key words** Seagrass; Sexual reproduction; Flowering induction; Flowering pathway



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211116001

http://www.yykyxjz.cn/

路加, 郭栋, 余思滢, 李文涛, 张沛东. 荣成天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游生物的时空变化特征. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 12-25

LU J, GUO D, YU S T, LI W T, ZHANG P D. Spatial-temporal variation of characteristics of plankton in a seagrass bed and an adjacent area of bare sand in Swan Lake, Rongcheng, China. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 12-25

# 荣成天鹅湖海草床及其邻近裸沙区 浮游生物的时空变化特征\*



路加<sup>1</sup> 郭栋<sup>2</sup> 余思滢<sup>1</sup> 李文涛<sup>1</sup> 张沛东<sup>1①</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003;

2. 辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁 大连 116023)

**摘要** 海草床是近海典型生态系统之一, 为了解山东省荣成市天鹅湖鳗草(*Zostera marina*)海草床及其邻近裸沙区的浮游生物群落结构及时空变化特征, 于 2019 年 2 月、5 月、8 月和 11 月, 对天鹅湖鳗草海草床及其邻近裸沙区的浮游生物、海草床生态学特征及关键环境因子进行了周年调查, 并应用典范对应分析(CCA)和冗余分析(RDA)探究了环境因子对浮游生物优势种的影响。结果显示, 共发现浮游植物 38 种, 隶属 3 门 25 属, 其中, 硅藻门(Bacillariophyta)种类最多(89.4%), 甲藻门(Dinophyta)次之(7.8%); 共发现浮游动物 18 种, 幼虫 3 类, 以甲壳动物(71.4%)为主; 浮游生物种类数呈现显著的季节变化, 且在 11 月达到最大值; 海草床浮游植物和浮游动物的年平均丰度分别为  $5.4 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 和  $1.6 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>, 是裸沙区浮游植物和浮游动物年平均丰度的 1.4 倍和 1.5 倍; 典范对应分析和冗余分析显示, 海草床浮游生物优势种主要与水温、海草床的植株密度及生物量显著相关, 而裸沙区浮游生物优势种则主要与水温、pH 值及氨氮含量等环境因子显著相关。结果表明, 天鹅湖海草床相比裸沙区具有更丰富的浮游生物。本研究为深入了解海草床生态系统的结构和功能提供了基础数据。

**关键词** 海草床; 浮游植物; 浮游动物; 群落结构; 环境因子; 天鹅湖

**中图分类号** Q-9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0012-14

海草床是滨海三大典型生态系统之一, 不仅可以吸收营养盐、改善水质, 还能固定底质、抵抗风浪、保护海岸, 亦可为许多动物提供栖息地、繁育场所和食物来源, 对浅海海岸和河口生态系统具有极其重要的意义(Fonseca *et al.*, 1992; Edgar *et al.*, 1994; Moore, 2004; Unsworth *et al.*, 2019)。浮游生物作为水域生态系统重要的生物组分, 是鱼类等水生动物的天然饵料, 也是水体营养物质生产和传输的重要环节, 对维

持食物网的复杂性和稳定性具有重要作用(Tang *et al.*, 2019)。海草床作为重要的育幼场所, 为多种海洋生物提供丰富的食物来源, 主要包括以浮游植物为代表的初级生产者和以初级生产者为食的浮游动物(Nakamura *et al.*, 2005; Lugendo *et al.*, 2006; Gullström *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013)。

研究发现, 海草床显著影响浮游生物的群落结构。如, Ambo-Rappe (2011)研究表明, 印度尼西亚

\* 国家重点研发计划(2019YFD0901302)和国家自然科学基金(42076100)共同资助。路加, E-mail: lj1761615@163.com

① 通信作者: 张沛东, 教授, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-11-16, 收修改稿日期: 2021-11-30

Barrang Lompo 岛附近海菖蒲(*Enhalus acoroides*)海草床和卵叶喜盐草(*Halophila ovalis*)海草床的浮游植物多样性指数是邻近裸沙区的 1.7 倍; Lo 等(2020)研究发现, 马来西亚 Limau-limauan 海域海菖蒲海草床的浮游动物丰度是邻近裸沙区的 1.5 倍以上。海草叶片是大量附生植物的优良附着基, 这些附生植物是端目类和桡足类等众多浮游动物的重要食物来源, 而浮游动物又被海草床的鱼类等更高营养级动物所捕食(Jernakoff *et al*, 1998; Beck *et al*, 2001; Heck *et al*, 2003; Blandon *et al*, 2014)。因此, 海草床的植株密度和生物量等生态特征决定了海草生境结构的复杂性, 也显著影响浮游生物的群落结构(Azmi *et al*, 2016; Metillo *et al*, 2019)。目前为止, 相关研究大多集中于热带海草床生境, 以温带海草床生境为研究区域的报道还很少。

为查明温带海草床及其邻近裸沙区浮游生物群落结构的时空变化特征, 本研究选取荣成天鹅湖鳎草(*Zostera marina*)海草床及其邻近裸沙区, 通过对浮游生物群落结构、鳎草生物量和植株密度以及关键环境因子的周年调查, 对比分析海草床及其邻近裸沙区浮游生物群落结构的时空分布差异, 探讨浮游生物群落

与鳎草海草床生态学特征及关键环境因子的相关性, 以期为深入了解海草床的生态功能、实现海草生境的科学保护提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域与站位布设

天鹅湖(37.34°~37.36°N, 122.56°~122.58°E)位于山东半岛最东端, 面积约为 4.8 km<sup>2</sup>, 是一个半封闭的海湾泻湖, 湖东南部的狭长潮汐水道与外海相通, 湖区平均水深小于 2 m (帅莉等, 2003; Zhang *et al*, 2015)。湖内分布有鳎草和日本鳎草(*Zostera japonica*) 2 种海草, 其中鳎草为优势种, 主要分布于天鹅湖中央部分的潮下带和潮间带区域, 形成大面积海草床(刘建影等, 2017)。

2019 年 2 月、5 月、8 月和 11 月, 对天鹅湖海草床及其邻近裸沙区的浮游生物、关键环境因子和海草床生态特征进行了调查。根据天鹅湖生境类型, 共设置 8 个站位, 其中, C1、C2、C3 和 C4 位于鳎草海草床, S1、S2、S3 和 S4 位于邻近裸沙区(图 1)。

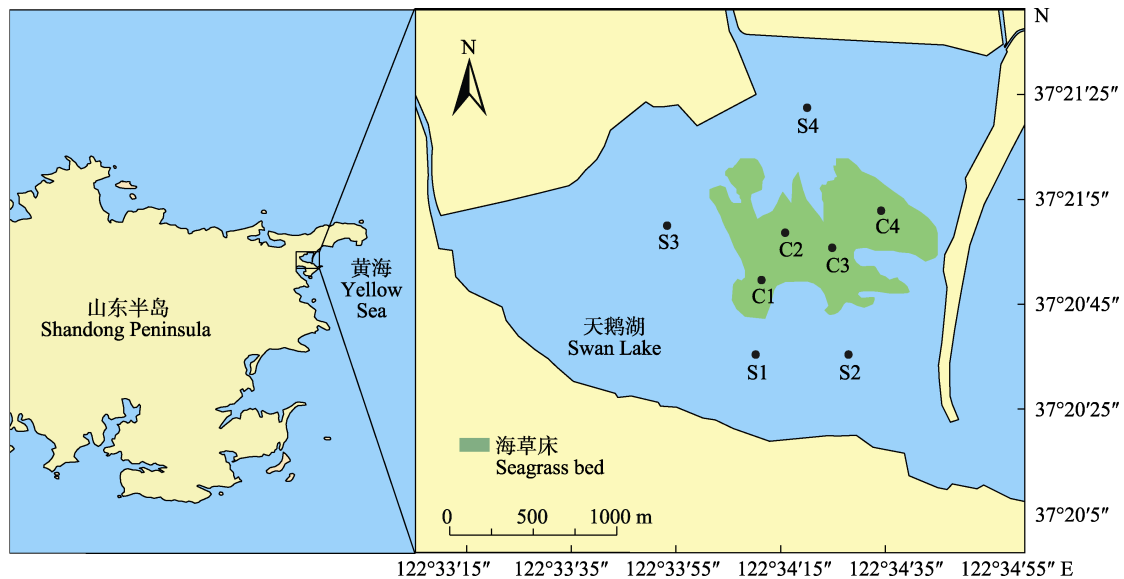


图 1 调查站位设置

Fig.1 Setting of survey stations

### 1.2 样品采集及处理

**1.2.1 浮游生物** 浮游生物的采集按照《海洋调查规范》(GB/T 12763-2007)进行, 其中, 浮游植物使用浅水 III 型浮游生物网(网口面积 0.1 m<sup>2</sup>, 筛孔 77 μm)由底至表进行垂直拖网, 样品用鲁哥氏液现场固定; 浮游动物使用浅水 I 型浮游生物网(网口面积 0.2 m<sup>2</sup>, 孔径 0.5 mm)由底至表垂直拖网, 样品使用 5% 甲醛溶液现场固定保存。固定好的样品带回实验室进行种

类鉴定和数量统计。

**1.2.2 环境指标** 在各站位, 采用 Professional Plus 多功能水质仪(美国 YSI 公司)现场测定海水的 pH 值、水温(WT)、溶解氧含量(DO), 用盐度计测定海水盐度; 用采水器于水下 0.5 m 处采集水样, 按照《海洋监测规范》(GB/T17378.4-2007)的方法进行海水化学需氧量(COD)、生化需氧量(BOD<sub>5</sub>)、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)和磷酸盐(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P)的测定。

**1.2.3 海草床生态学特征** 在海草床的各站位,使用 0.5 m×0.5 m 的采样框进行海草植株取样,潜水挖掘采样框内鳗草植株,并确保植株的完整性,每站位重复取样 3 次。用海水将植株彻底冲洗干净后放到聚乙烯封口袋中,加冰低温运回实验室。先计数每个采样框的植株数量以计算植株密度(shoots/m<sup>2</sup>),再将样品用去离子水进行漂洗,并在 60 °C 烘干至恒重,测量植株生物量(g DW/m<sup>2</sup>)。

### 1.3 数据处理与分析

浮游生物的丰度根据采样时的滤水体积,以每立方米水体中细胞数或个体数(cells/m<sup>3</sup>, ind./m<sup>3</sup>)表示。

优势种使用浮游生物优势度( $Y$ )表示,生物多样性采用香农-威纳指数(Shannon-Weaner index) ( $H'$ )、均匀度指数(Pielou index)( $J$ )和 Margalef 丰富度指数( $D$ )进行分析(张雪等, 2018), 计算公式为:

$$Y = (n_i / N) \times f_i \quad (1)$$

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i \quad (2)$$

$$J = H' / \log_2 S \quad (3)$$

$$D = (S - 1) / \log_2 N \quad (4)$$

式中,  $n_i$  为  $i$  种的个体数,  $N$  为所有种类总个体数,  $f_i$  为该种出现的频率。 $Y > 0.02$  的种类为优势种。 $P_i$  为样品中第  $i$  种的个体数与总个体数的比值;  $S$  为各

站位水柱种类数。

对各环境指标和浮游生物丰度的时间变化进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 差异显著时使用 Duncan 多重比较; 对同月份海草床和裸沙区的环境指标、浮游生物群落多样性指数进行独立样本 T 检验; 显著性水平设置为  $P \leq 0.05$ 。

运用 Canoco 5.0 软件分析浮游生物群落结构和环境因子之间的关系。对优势种的丰度/生物量数据进行去趋势对应分析(DCA)。如果最大梯度长度(length of gradient) > 4.0, 进行典范对应分析(CCA); 如果在 3.0~4.0 之间, 冗余分析(RDA)和 CCA 均可; 如果 < 3.0, 进行 RDA 分析。排序结果用物种-环境因子关系双序图表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 关键环境因子

调查结果显示(表 1), 海草床与裸沙区的关键环境因子呈现显著的季节变化, 且两区之间存在一定的差异。多数环境因子在冬季和春季达到最大值, 水温和 pH 值在夏季达到最大值, 而盐度在秋季达到最大值。尽管各环境因子的平均值在海草床与裸沙区之间无明显不同, 但一些环境因子于某些季节在两区之间存在显著差异( $P < 0.05$ )。如, 裸沙区海水 COD 含量

表 1 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区环境因子的时空变化

Tab.1 Spatial-temporal variation of environmental factors in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

环境指标 Environmental parameters	区域 Area	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November	均值 Average
化学需氧量 COD/(mg/L)	海草床 Seagrass bed	1.91±0.15 <sup>a</sup>	2.23±0.41 <sup>a</sup>	2.00±0.23 <sup>a</sup>	1.33±0.21 <sup>b</sup>	1.86±0.06
	裸沙区 Bare sand area	1.84±0.14 <sup>ab</sup>	3.08±0.11 <sup>a*</sup>	2.38±0.31 <sup>a*</sup>	1.37±0.10 <sup>b</sup>	2.16±0.33
生化需氧量 BOD <sub>5</sub> /(mg/L)	海草床 Seagrass bed	4.34±0.06 <sup>a</sup>	2.12±0.14 <sup>b</sup>	0.78±0.53 <sup>c</sup>	1.83±0.11 <sup>b</sup>	2.34±0.42
	裸沙区 Bare sand area	4.33±0.14 <sup>a</sup>	2.02±0.32 <sup>b</sup>	0.99±0.08 <sup>c</sup>	2.59±0.42 <sup>b*</sup>	2.48±0.46
溶解氧 DO/(mg/L)	海草床 Seagrass bed	11.49±0.12 <sup>a*</sup>	8.85±0.39 <sup>c</sup>	5.96±0.25 <sup>d</sup>	10.16±0.20 <sup>b</sup>	9.12±0.35
	裸沙区 Bare sand area	10.14±0.13 <sup>a</sup>	8.16±0.26 <sup>c</sup>	6.30±0.14 <sup>d</sup>	9.52±0.11 <sup>b</sup>	8.53±0.22
水温 WT/°C	海草床 Seagrass bed	2.68±0.02 <sup>d</sup>	15.03±0.17 <sup>b</sup>	25.80±0.08 <sup>a</sup>	9.60±0.28 <sup>c</sup>	13.28±0.25
	裸沙区 Bare sand area	2.96±0.01 <sup>d</sup>	15.20±0.28 <sup>b</sup>	26.15±0.07 <sup>a</sup>	9.70±0.14 <sup>c</sup>	13.50±0.13
pH	海草床 Seagrass bed	8.35±0.13 <sup>b</sup>	8.07±0.07 <sup>d</sup>	8.46±0.07 <sup>a</sup>	8.26±0.04 <sup>c</sup>	8.29±0.08
	裸沙区 Bare sand area	8.37±0.06 <sup>b</sup>	8.02±0.04 <sup>c</sup>	8.53±0.06 <sup>a</sup>	8.31±0.01 <sup>b</sup>	8.31±0.05
盐度 Salinity	海草床 Seagrass bed	31.41±0.04 <sup>c</sup>	33.85±0.65 <sup>b</sup>	31.75±0.29 <sup>c</sup>	34.25±0.29 <sup>a</sup>	32.82±0.35
	裸沙区 Bare sand area	31.41±0.04 <sup>c</sup>	33.50±0.00 <sup>b</sup>	31.50±0.00 <sup>c</sup>	34.51±0.71 <sup>a</sup>	32.73±0.54
氨氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/L)	海草床 Seagrass bed	1.04±0.14 <sup>a*</sup>	1.21±0.15 <sup>a*</sup>	0.76±0.29 <sup>b</sup>	0.79±0.15 <sup>b</sup>	0.88±0.14
	裸沙区 Bare sand area	0.60±0.23 <sup>b</sup>	0.70±0.24 <sup>b</sup>	2.14±0.27 <sup>a*</sup>	1.07±0.20 <sup>b</sup>	1.18±0.23
磷酸盐 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P/(μmol/L)	海草床 Seagrass bed	0.43±0.21 <sup>c</sup>	1.81±0.11 <sup>a*</sup>	0.38±0.09 <sup>c</sup>	1.29±0.10 <sup>b*</sup>	0.98±0.25
	裸沙区 Bare sand area	0.29±0.08 <sup>c</sup>	1.27±0.12 <sup>a</sup>	0.41±0.13 <sup>c</sup>	0.92±0.18 <sup>b</sup>	0.73±0.22

注: \*表示海草床与裸沙区之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 不同小写字母表示不同月份间存在显著差异( $P < 0.05$ )。下同。

Note: \* indicates that there is significant difference between seagrass bed and bare sand area ( $P < 0.05$ ), and different lowercase letters indicate significant difference between different months ( $P < 0.05$ ). The same as below.

在春、夏季显著高于海草床, 平均为海草床的 1.3 倍; 裸沙区海水 BOD<sub>5</sub> 含量在秋季显著高于海草床, 是其 1.4 倍; 海草床海水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量在冬季和春季显著高于裸沙区, 为裸沙区的 1.7 倍, 夏季则正相反, 海草床海水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量仅为裸沙区 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量的 40%。

## 2.2 海草床生态学特征

鳗草植株的生长表现出明显的季节变化, 植株密度和生物量均于8月达到最大值, 分别为(1 472.0±33.8) shoots/m<sup>2</sup>和(800.3±40.2) g DW/m<sup>2</sup>, 是2月植株密度和生物量的1.7倍和16.7倍( $P<0.05$ ) (表2)。

## 2.3 浮游植物群落结构

**2.3.1 种类组成和丰度** 调查期间, 共发现浮游植物 38 种, 隶属于 3 门 25 属, 如表 3 所示。其中, 硅藻门(Bacillariophyta)最多, 共 16 科 21 属 34 种, 占总种数的 89.4%; 甲藻门(Dinophyta)次之, 共 3 科 3 属 3 种, 占总种数的 7.8%; 金藻门(Chrysophyta)最少, 仅 1 科 1 属 1 种。浮游植物种类数呈现明显的季节变化, 海草床和裸沙区均在 11 月达到最大值, 显著高于其他月份( $P<0.05$ ), 相同月份海草床和裸沙区的浮游植物种类数差异不显著( $P>0.05$ ) (图 2)。

表 2 天鹅湖海草床生态学特征的季节变化

Tab.2 Seasonal variation of ecological characteristics in seagrass bed of Swan Lake

调查指标 Surveyed parameter	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November
植株密度 Density /(shoots/m <sup>2</sup> )	882.0±43.9 <sup>c</sup>	1374.0±19.9 <sup>a</sup>	1472.0±33.8 <sup>a</sup>	1041.0±56.8 <sup>b</sup>
植株生物量 Biomass /(g DW/m <sup>2</sup> )	48.2±3.8 <sup>d</sup>	461.4±11.8 <sup>b</sup>	800.3±40.2 <sup>a</sup>	167.8±8.5 <sup>c</sup>

表 3 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物物种名录

Tab.3 List of phytoplankton species in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

序号 Code	种名 Species	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November
硅藻 Bacillariophyta					
1	柔弱根管藻 <i>Rhizosolenia delicatula</i>	+/*	-/-	-/-	+/*
2	刚毛根管藻 <i>Rhizosolenia setigera</i>	-/-	+/*	+/*	+/*
3	格氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus granii</i>	+/*	+/*	-/-	+/*
4	琼氏圆筛藻 <i>Coscinodiscus jonesianus</i>	-/-	+/*	-/-	+/*
5	辐射列圆筛藻 <i>Coscinodiscus radiatus</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
6	星脐圆筛藻 <i>Coscinodiscus asteromphalus</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
7	虹彩圆筛藻 <i>Coscinodiscus oculus-iridis</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
8	圆筛藻 <i>Coscinodiscaceae</i> sp.	-/-	-/-	-/-	+/*
9	卡氏角毛藻 <i>Chaetoceros castracanei</i>	+/*	-/-	-/-	-/-
10	范氏角毛藻 <i>Chaetoceros vanheurckii</i>	-/-	+/*	+/*	+/*
11	并基角毛藻 <i>Chaetoceros decipiens</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
12	罗氏角毛藻 <i>Chaetoceros lauderi</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
13	艾氏角毛藻 <i>Chaetoceros eibenii</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
14	条纹小环藻 <i>Cyclotella striata</i>	+/*	+/*	+/-	-/-
15	海链藻 <i>Thalassiosira</i> sp.	+/*	+/*	+/*	-/-
16	中华盒形藻 <i>Bidduiphia sinensis</i> Greville	+/-	-/-	-/-	+/*
17	太阳漂流藻 <i>Planktoniella sol</i>	+/*	+/-	-/-	-/-
18	细弱明盘藻 <i>Hyalodiscus subtilis</i> Bailey	-/-	-/-	-/-	+/-
19	曲舟藻 <i>Pleurosigma</i> spp.	-/-	+/*	+/*	-/-
20	柔弱几内亚藻 <i>Guinardia delicatula</i>	-/-	+/-	-/-	+/*
21	长耳齿状藻 <i>Odontella aurita</i>	-/-	+/-	-/-	-/-
22	针杆藻 <i>Synedra</i> spp.	-/-	+/*	+/*	-/-
23	长海毛藻 <i>Thalassiothrix longissima</i>	-/-	+/*	-/-	-/-
24	透明辐杆藻 <i>Bacteriastrum hyalinum</i>	-/-	+/*	+/-	-/-



续表 3

序号 Code	种名 Species	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November
硅藻 Bacilariophyta					
25	钝头盒形藻 <i>Biddulphia obtusa</i>	-/-	+/*	-/-	-/-
26	念珠直链藻 <i>Melosira moniliformis</i>	-/-	-/+	-/-	-/-
27	丹麦细柱藻 <i>Leptocylindrus danicus</i>	-/-	-/-	+/*	+/*
28	菱面盒形藻 <i>Biddulphia rhombus</i>	-/-	-/-	+/*	-/-
29	具槽帕拉藻 <i>Paralia sulcata</i>	-/-	-/-	-/+	-/-
30	菱形藻 <i>Nitzschia</i> sp.	-/-	-/-	-/+	-/-
31	并基海链藻 <i>Thalassiosira decipens</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
32	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
33	泰晤士旋鞘藻 <i>Streptotheca thamesis</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
34	舟形藻 <i>Navicula</i> sp.	-/-	-/-	-/-	+/*
甲藻 Dinophyta					
35	夜光藻 <i>Noctiluca scintillans</i>	-/-	+/*	-/-	+/*
36	三角角藻 <i>Ceratium tripos</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
37	大角三趾藻 <i>Tripos macroceros</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
金藻 Chrysophyta					
38	小等刺硅鞭藻 <i>Dictyocha fibula</i>	+/*	+/-	+/*	-/-

注：+表示该物种于该月份出现在海草床，\*表示该物种于该月份出现在裸沙区，-表示该月份海草床或裸沙区无该物种。下同。

Note: + indicates that the species appears in the seagrass bed in this month, \* indicates that the species appears in the bare sand area in this month, - indicates that there is no species in the seagrass bed or bare sand area in this month. The same as below.

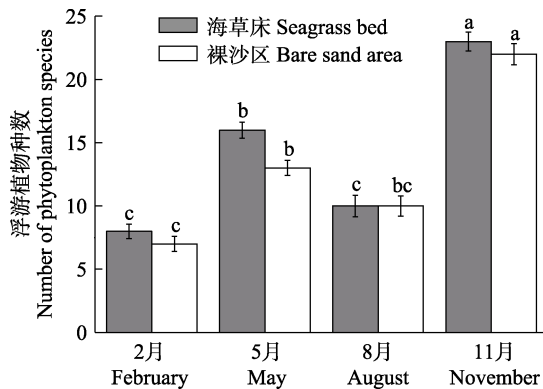


图2 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物种类数的时空变化

Fig.2 Spatial-temporal variation of phytoplankton species in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

调查结果显示，海草床与裸沙区的浮游植物丰度呈现明显的季节变化，且两区之间存在一定的差异(图3)。海草床与裸沙区浮游植物丰度均在5月显著高于其他月份( $P<0.05$ )，分别为  $9.06 \times 10^4$  cells/ $m^3$  和  $6.12 \times 10^4$  cells/ $m^3$ ，为2月浮游植物丰度的3.4倍和2.4倍。5月时，海草床浮游植物丰度显著高于裸沙区( $P<0.05$ )，是裸沙区的1.5倍；其余调查月份，海草床浮游植物丰度亦高于裸沙区浮游植物丰度，但二者差异不显著( $P>0.05$ )。

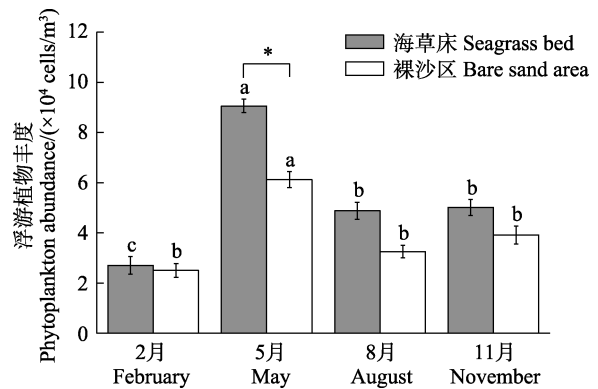


图3 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物丰度的时空变化

Fig.3 Spatial-temporal variation of phytoplankton abundance in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

**2.3.2 第1优势种组成** 浮游植物第1优势种组成表现出明显的季节变化(表4)。5月时，海草床和裸沙区的第1优势种分别为硅藻门的刚毛根管藻(*Rhizosolenia setigera*)和范氏角毛藻(*Chaetoceros vanheurckii*)，平均丰度为  $1.69 \times 10^4$  cells/ $m^3$  和  $1.13 \times 10^4$  cells/ $m^3$ ，均高于其他调查月第1优势种的丰度。

**2.3.3 群落结构特征指数** 除裸沙区的均匀度指数外，海草床和裸沙区浮游植物群落结构特征指数表

表4 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物第1优势种及优势度指数的时空变化

Tab.4 Spatial-temporal variation of the first dominant species and dominance index of phytoplankton in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

月份 Month	区域 Area	第1优势种 Dominant species	平均丰度 Average abundance/( $\times 10^4$ cells/m <sup>3</sup> )	优势度 Dominance
2月 February	海草床 Seagrass bed	格氏圆筛藻 <i>C. granii</i>	0.50	0.21
	裸沙区 Bare sand area	格氏圆筛藻 <i>C. granii</i>	0.63	0.24
5月 May	海草床 Seagrass bed	刚毛根管藻 <i>R. setigera</i>	1.69	0.19
	裸沙区 Bare sand area	范氏角毛藻 <i>C. vanheurckii</i>	1.13	0.18
8月 August	海草床 Seagrass bed	曲舟藻 <i>Pleurosigma</i> spp.	1.06	0.22
	裸沙区 Bare sand area	范氏角毛藻 <i>C. vanheurckii</i>	1.01	0.31
11月 November	海草床 Seagrass bed	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	0.56	0.11
	裸沙区 Bare sand area	夜光藻 <i>N. scintillans</i>	0.43	0.11

表5 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物群落特征指数的时空变化(平均值 $\pm$ 标准差)  
Tab.5 Spatial-temporal variation of phytoplankton community parameters in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake (Mean $\pm$ SD)

群落特征指数 Community parameters	区域 Area	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November	均值 Average
多样性指数 Diversity index ( <i>H'</i> )	海草床 Seagrass bed	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.4
	裸沙区 Bare sand area	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.5
均匀度指数 Evenness index ( <i>J</i> )	海草床 Seagrass bed	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.0
	裸沙区 Bare sand area	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0
丰富度指数 Richness index ( <i>D</i> )	海草床 Seagrass bed	4.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	11.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 2.6
	裸沙区 Bare sand area	5.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	5.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	14.0 $\pm$ 0.5 <sup>a*</sup>	7.3 $\pm$ 3.2

现出明显的季节变化(表5)。其中,两区的多样性指数和丰富度指数均在11月达到最高值,在8月达到最低值,而海草床浮游植物的均匀度指数则在5月达到最低值。海草床和裸沙区之间浮游植物群落结构特征指数的差异不明显,仅在11月,裸沙区浮游植物丰富度指数显著高于海草床( $P<0.05$ )。

**2.3.4 优势种与环境因子的关系** 分别对海草床和裸沙区浮游植物优势种与环境因子进行CCA分析,如图4所示。其中,海草床浮游植物群落前2个排序轴的特征值为0.849和0.673,对物种变量的解释量达72%。由图4a可知,影响海草床浮游植物群落结构的主要因素为水温、鳗草植株密度和生物量,且格氏圆筛藻(*Coscinodiscus granii*)、刚毛根管藻等多数优势种与这3个因子表现为正相关。

裸沙区浮游植物群落前2个排序轴的特征值为0.825和0.719,对物种变量的解释量达74%。由图4b可知,影响裸沙区浮游植物群落结构的主要因素为水温和氨氮,且范氏角毛藻、针杆藻(*Synedra* spp.)、夜光藻(*Noctiluca scintillans*)等大多数优势种与这2个因子表现为正相关。

## 2.4 浮游动物群落结构

**2.4.1 种类组成和丰度** 在鳗草床及其邻近裸沙区共鉴定出浮游动物18种、幼虫3类(表6)。其中,浮游动物成体隶属于刺胞动物门(Cnidaria)(1种)、甲壳动物门(Crustacea)(桡足类10种,枝角类3种,端足类1种,甲壳类1种)、毛颚动物门(Cheateognatha)(1种)、尾索动物门(Urochordata)(1种)。浮游动物种类数呈现明显的季节变化,海草床和裸沙区均在11月达到最大值,显著高于其他月份( $P<0.05$ );两区之间浮游动物种类数差异不明显,仅在2月时,海草床浮游动物的种类数显著高于裸沙区( $P<0.05$ ) (图5)。

调查结果显示,海草床与裸沙区的浮游动物丰度呈现明显的季节变化,且两区之间存在一定的差异(图6)。海草床浮游动物丰度在2月达到最高值,为 $2.88 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>,是8月海草床浮游动物丰度的14.5倍;裸沙区浮游动物丰度则在5月达到最高值,为 $2.14 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>,是8月裸沙区浮游动物丰度的10.2倍。2月时,海草床浮游动物丰度显著高于裸沙区( $P<0.05$ ),是裸沙区浮游动物丰度( $1.25 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>)的2.2倍;其余月份,海草床的浮游动物丰度亦高于裸沙区浮游动物丰度,但两区差异不显著( $P>0.05$ )。

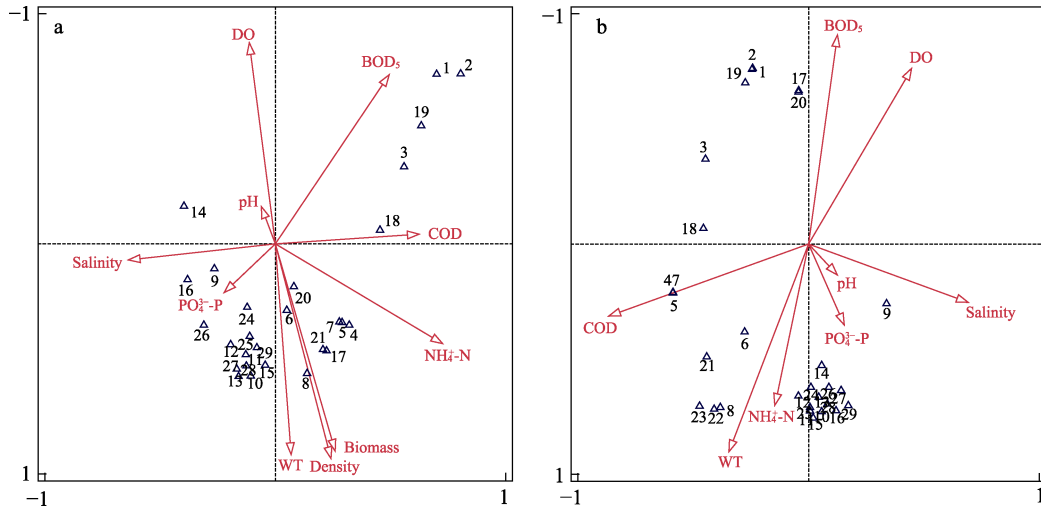


图4 天鹅湖海草床(a)及其邻近裸沙区(b)浮游植物优势种与环境因子的 CCA 排序图

Fig.4 CCA ordination of phytoplankton dominant species and associated environment factors in seagrass bed (a) and its adjacent bare sand area (b) of Swan Lake

- 1: 小等刺硅鞭藻 *D. fibula*; 2: 卡氏角毛藻 *C. castracanei*; 3: 条纹小环藻 *C. striata*; 4: 格氏圆筛藻 *C. granii*;
- 5: 刚毛根管藻 *R. delicatula*; 6: 范氏角毛藻 *C. vanheurckii*; 7: 长海毛藻 *T. longissimi*; 8: 针杆藻 *Synedra* spp.;
- 9: 丹麦细柱藻 *L. danicus*; 10: 夜光藻 *N. scintillans*; 11: 辐射列圆筛藻 *C. radiatus*; 12: 虹彩圆筛藻 *C. oculus-iridis*;
- 13: 圆筛藻 *Coscinodisceae* sp.; 14: 中肋骨条藻 *S. costatum*; 15: 并基角毛藻 *C. decipiens*; 16: 舟形藻 *Navicula* spp.;
- 17: 柔弱根管藻 *R. delicatula*; 18: 海链藻 *Thalassiosira* sp.; 19: 太阳漂流藻 *P. sol*; 20: 琼氏圆筛藻 *C. jonesianus*;
- 21: 曲舟藻 *Pleurosigma* spp.; 22: 具槽帕拉藻 *B. sulcate*; 23: 菱形藻 *Nitzschia* sp.; 24: 中华盒形藻 *B. greville*; 25: 并基海链藻 *T. decipens*; 26: 三角角藻 *C. tripos*; 27: 艾氏角毛藻 *C. eibenii*; 28: 柔弱几内亚藻 *G. delicatula*; 29: 罗氏角毛藻 *C. lauderi*

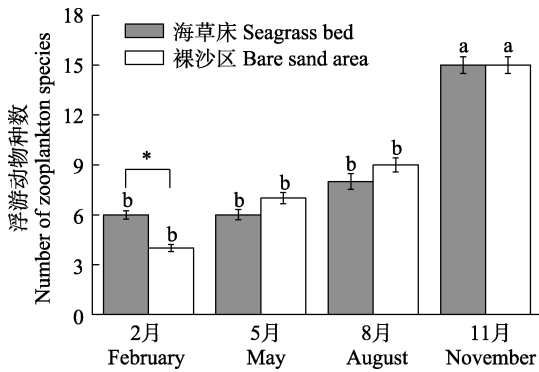


图5 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物种类数的时空变化

Fig.5 Spatial-temporal variation of zooplankton species in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

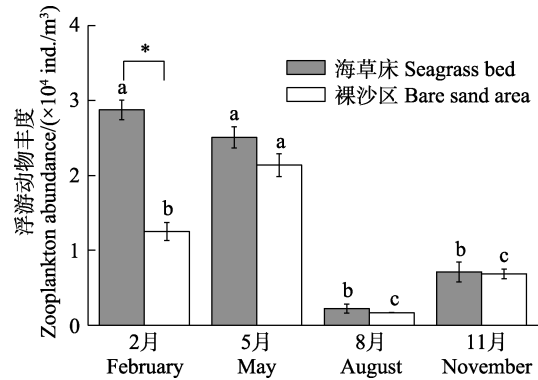


图6 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物丰度的时空变化

Fig.6 Spatial-temporal variation of zooplankton abundance in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

**2.4.2 第1优势种组成** 调查期间,海草床和裸沙区浮游动物第1优势种均为桡足类的小拟哲水蚤 (*Paracalanus parvus*),其丰度具有明显季节变化,平均丰度均于5月达到最大值,分别为  $1.87 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup> 和  $1.75 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>,是8月平均丰度的25.9倍和29.2倍(表7)。两区之间小拟哲水蚤的丰度也具有一定差异。2月时,海草床小拟哲水蚤平均丰度 ( $1.06 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>) 为裸沙区的2.1倍;其余调查月份,两区之间差异不明显。

**2.4.3 群落结构特征指数** 海草床和裸沙区的浮游动物群落结构特征指数表现出相同的季节变化,如表8所示。其中,多样性指数和丰富度指数均在11月达到最高值,而均匀度指数则在5月达到最低值。两区之间群落特征指数差异不明显,仅2月时,海草床浮游动物丰富度指数显著高于裸沙区 ( $P < 0.05$ )。

**2.4.4 优势种与环境因子的关系** 分别对海草床和裸沙区浮游动物优势种与环境因子进行RDA分析,如图7所示。其中,海草床浮游动物前2个排序

表 6 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物物种名录

Tab.6 List of zooplankton species in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

序号 Code	种名 Species	2 月 February	5 月 May	8 月 August	11 月 November
刺胞动物门 Cnidaria					
水螅水母亚纲 Hydromedusae					
1	四枝管水母 <i>Proboscoidactyla flavicirrata</i>	-/-	-/-	-/*	-/-
节肢动物门 Arthropoda					
桡足类 Copepoda					
2	海洋伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus marinus</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
3	火腿许水蚤 <i>Schmackeria poplesia</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
4	克氏纺锤水蚤 <i>Acartia clausi</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
5	猛水蚤 <i>Harpacticoida</i> sp.	+/*	-/*	-/-	-/-
6	双刺纺锤水蚤 <i>Acartia bipinnata</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
7	太平洋纺锤水蚤 <i>Acartia pacifica</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
8	太平洋真宽水蚤 <i>Eurytemora pacifica</i>	-/-	+/*	+/*	-/-
9	细巧华哲水蚤 <i>Sinocalanus tenellus</i>	-/-	-/-	+/*	+/*
10	小拟哲水蚤 <i>Paracalanus parvus</i>	+/*	+/*	+/*	+/*
11	中华哲水蚤 <i>Calanus sinicus</i>	+/*	+/*	+/*	+/*
枝角类 Cladocera					
12	肥胖三角溞 <i>Evadne tergestina</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
13	鸟缘尖头溞 <i>Penilia avirostris</i>	+/-	-/-	+/*	+/*
14	诺氏三角溞 <i>Evadne nordmanni</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
端足目 Amphipoda					
15	细长脚虫戎 <i>Theisto gracilipes</i> (Norman)	+/-	+/*	+/*	-/-
鳃足纲 Branchiopoda					
16	盐卤虫 <i>Artemia salina</i> (Linnaeus)	-/-	-/-	-/-	+/*
毛颚动物门 Cheactognatha					
17	强壮箭虫 <i>Sagitta crassa</i>	+/*	+/*	-/-	+/*
尾索动物门 Urochordata					
18	长尾住囊虫 <i>Oikopleura longicauda</i>	-/-	-/-	-/-	+/*
浮游幼虫 Pelagic larvae					
19	多毛类幼体 Polychaet larvae	-/-	-/-	-/-	+/*
20	腹足类幼体 Gastropod larvae	-/-	+/*	+/*	-/-
21	双壳类幼体 Bivalve larvae	-/-	-/-	-/-	+/*

表 7 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物第 1 优势种及优势度指数的时空变化

Tab.7 Spatial-temporal variation of the first dominant species and dominance index of zooplankton in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake

月份 Month	区域 Area	第 1 优势种 Dominant species	平均丰度 Average abundance /( $\times 10^4$ ind./m <sup>3</sup> )	优势度 Dominance
2 月 February	海草床 Seagrass bed	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	1.06	0.37
	裸沙区 Bare sand area	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	0.51	0.40
5 月 May	海草床 Seagrass bed	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	1.81	0.85
	裸沙区 Bare sand area	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	1.75	0.70
8 月 August	海草床 Seagrass bed	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	0.07	0.31
	裸沙区 Bare sand area	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	0.06	0.37
11 月 November	海草床 Seagrass bed	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	0.17	0.25
	裸沙区 Bare sand area	小拟哲水蚤 <i>P. parvus</i>	0.18	0.25

轴的特征值为 0.58 和 0.27, 物种变量的解释量达 91%。由图 7a 可知, 影响海草床浮游动物群落结构的主要因素为水温、鳗草植株密度和生物量, 且鸟缘尖头蚤 (*Penilia avirostris*)、太平洋真宽水蚤 (*Eurytemora pacifica*)、细巧华哲水蚤 (*Sinocalanus tenellus*) 等优势种与这 3 个因子呈正相关。

裸沙区浮游动物前 2 个排序轴的特征值为 0.61 和 0.24, 对物种变量的解释量达 94%。由图 7b 可知, 影响裸沙区浮游动物群落结构的主要因素为 pH、氨氮、水温, 且鸟缘尖头蚤、太平洋真宽水蚤、细巧华哲水蚤和克氏纺锤水蚤 (*Acartia clausi*) 等优势种与这些环境因子表现为正相关。

表 8 天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物群落特征指数的时空变化(平均值±标准差)

Tab.8 Spatial-temporal variation of zooplankton Community parameters in seagrass bed and its adjacent bare sand area of Swan Lake (Mean±SD)

群落特征指数 Community parameters	区域 Area	2月 February	5月 May	8月 August	11月 November	均值 Average
多样性指数 Diversity index ( <i>H'</i> )	海草床 Seagrass bed	1.5±0.1 <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>c</sup>	1.9±0.1 <sup>b</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>	1.7±0.1
	裸沙区 Bare sand area	1.2±0.1 <sup>c</sup>	1.3±0.1 <sup>c</sup>	2.0±0.1 <sup>b</sup>	2.6±0.0 <sup>a</sup>	1.8±0.1
均匀度指数 Evenness index ( <i>J</i> )	海草床 Seagrass bed	1.0±0.0 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.2
	裸沙区 Bare sand area	1.0±0.0 <sup>a</sup>	0.7±0.0 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.1
丰富度指数 Richness index ( <i>D</i> )	海草床 Seagrass bed	1.8±0.2 <sup>b*</sup>	2.5±0.1 <sup>b</sup>	2.7±0.3 <sup>b</sup>	4.5±0.3 <sup>a</sup>	2.8±0.2
	裸沙区 Bare sand area	1.3±0.3 <sup>c</sup>	2.8±0.4 <sup>b</sup>	3.0±0.4 <sup>b</sup>	4.9±0.2 <sup>a</sup>	3.0±0.3

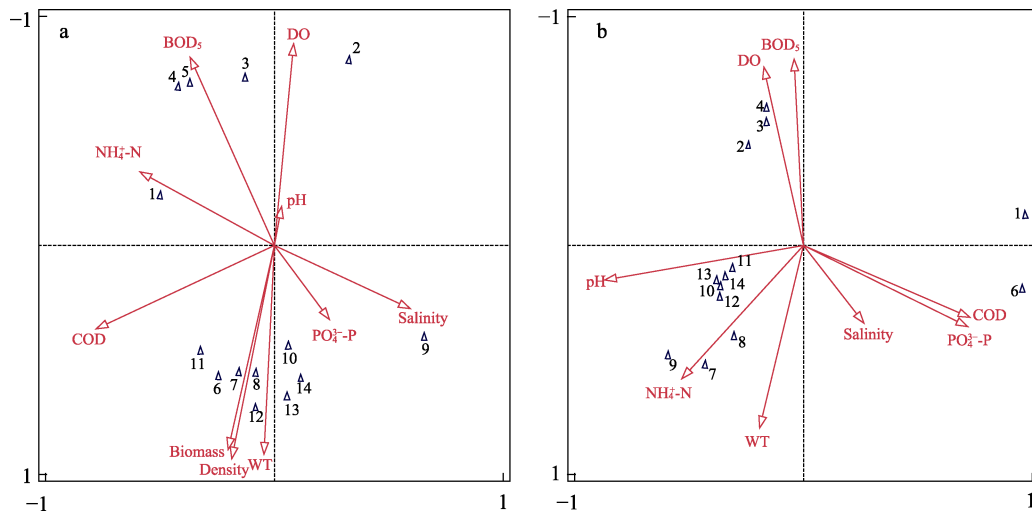


图 7 天鹅湖海草床(a)及其邻近裸沙区(b)浮游动物优势种与环境因子的 RDA 排序图

Fig.7 RDA ordination of zooplankton dominant species and associated environment factors in seagrass bed (a) and its adjacent bare sand area (b) of Swan Lake

- 1: 小拟哲水蚤 *P. parvus*; 2: 强壮箭虫 *S. crassa*; 3: 中华哲水蚤 *C. sinicus*; 4: 猛水蚤 *Harpacticoida* sp.;  
5: 细长脚虫戎 *T. gracilipes*; 6: 腹足类幼体 Gastropod larvae; 7: 鸟缘尖头蚤 *P. avirostris*; 8: 太平洋真宽水蚤 *E. pacifica*;  
9: 细巧华哲水蚤 *S. tenellus*; 10: 克氏纺锤水蚤 *A. clausi*; 11: 太平洋纺锤水蚤 *A. pacifica*; 12: 海洋伪镖水蚤 *P. marinus*;  
13: 火腿许水蚤 *S. poplesia*; 14: 长尾住囊虫 *O. longicauda*

### 3 讨论

#### 3.1 浮游生物群落结构的季节性变化特征

天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游植物种类组成与荣成附近海域浮游植物种类大致相同, 以近岸广布种为主, 硅藻占绝对优势(潘玉龙等, 2019)。浮游植物丰度在两区域表现出相同的季节变化, 春季达到

最高值, 夏秋次之, 冬季最低。另外, 浮游植物数目的季节差异大于空间差异, 种类数均在 11 月最高, 且每个物种的个体丰度差异较小, 导致生物多样性指数和丰富度指数在 11 月显著升高。生物多样性指数的高低反映生物群落结构的复杂程度, 通常指数越高, 群落越复杂, 对环境的反馈和适应功能越强, 群落的结构越稳定(李超伦等, 2010)。天鹅湖浮游植物

多样性指数在 1.7~2.8 之间, 均匀度指数在 0.8~1.0 之间, 处于附近黄海已有研究结果变化范围之内, 说明天鹅湖浮游植物群落处于较为稳定的状态(李超伦等, 2010; 慕建东等, 2009)。

天鹅湖海草床及其邻近裸沙区浮游动物种类组成以近岸低盐类群[海洋伪镖水蚤(*P. marinus*)和太平洋真宽水蚤等]和广温广盐类群[中华哲水蚤(*C. sinicus*)和小拟哲水蚤]为代表。浮游动物丰度在冬春季显著高于夏秋季, 其中, 冬春季节浮游动物丰度较高主要是由优势种小拟哲水蚤和中华哲水蚤较高的个体丰度造成的, 而夏秋季节浮游动物丰度较低则可能与附近海域的养殖活动有关(刘萍等, 2013)。浮游动物种类数从高到低依次为 11 月>8 月>5 月>2 月, 符合黄海浮游动物种类数夏秋季较多、冬春季较少的一般规律(杜明敏等, 2013)。本研究发现, 小拟哲水蚤、强壮箭虫和中华哲水蚤为天鹅湖的主要优势种, 这与帅莉等(2003)在天鹅湖的调查结果相同。海草床和裸沙区浮游动物种类数均在 11 月最高且物种个体丰度差异较小, 导致 11 月生物多样性指数和丰富度指数显著升高。均匀度指数则在 5 月最低, 这可能是由于 5 月小拟哲水蚤在海草床及裸沙区占据绝对优势, 优势度分别为 0.85 和 0.70, 浮游动物种类过于单一, 导致均匀度指数降低。

### 3.2 浮游生物群落变化的重要控制因素

浮游生物群落结构受环境因素的综合影响, 且在不同水体中环境因子对群落结构也存在差异。侯兴等(2021)对桑沟湾浮游植物的调查发现, 各个季节浮游植物丰度与氨氮呈负相关, 除秋季外, 浮游植物与磷酸盐呈正相关。潘玉龙等(2019)对荣成近岸养殖海域浮游植物的调查发现, 浮游植物群落结构主要受溶解氧、硅酸盐、铵盐、温度和 pH 等因素的影响。本研究发现, 海草床浮游植物优势种主要与水温、鳗草植株密度和生物量相关, 裸沙区浮游植物优势种主要与水温、氨氮相关。海草叶片是附生藻类生长繁殖的基质, 尤其在春季时, 海草叶片生长周期较长、更新速率较慢, 利于附生藻类繁殖, 累积更高的生物量(Lavery *et al.*, 2002)。鳗草植株密度也可以通过改变水下光照条件影响浮游植物的生长发育(Mauch, 1942)。

荣成天鹅湖地处中纬度地区, 季节分明, 因此, 温度对生物的影响较大, 是影响浮游植物种类及生物量的关键因子(代龚圆等, 2012)。如硅藻适宜在较低温度的水体中生长, 最适温度通常低于 18 °C(Wasmund *et al.*, 2011)。本研究发现, 硅藻门物种所占

比例为 89%, 且天鹅湖 5 月平均水温为 15 °C, 有利于硅藻大量繁殖, 可能是浮游植物丰度在 5 月达到最高值的主要原因。季节性的调查研究表明, 随着可利用光和温度上升, 浮游植物生物量通常随之增加(Alcoverro *et al.*, 1997; Lepoint *et al.*, 1999)。因此, 温度与可利用光的相互结合很大程度上影响着海草床浮游植物的生长。氮是浮游植物生长所需的重要营养元素, 也是限制元素(Ma *et al.*, 2013)。氨氮作为一种重要的氮源, 显著影响裸沙区浮游植物的生长繁殖, 这可能是由于氨氮能被浮游植物直接利用, 但利用程度取决于浮游植物种类(Balode *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 2009)。本研究中, 裸沙区圆筛藻等优势种与氨氮含量呈正相关, 可以推测这些浮游植物能直接利用氨氮。

本研究发现, 海草床浮游动物优势种主要与水温、鳗草植株密度和生物量相关, 裸沙区浮游动物优势种主要与 pH、氨氮和水温相关, 因此, 水温是天鹅湖浮游动物种类和丰度的关键因子。许多研究表明, 水温能够影响浮游动物的体温、新陈代谢强度、生长发育以及繁殖周期, 从而影响其丰度变化以及群落结构的分布(Lenz *et al.*, 2005; Devreker *et al.*, 2005; 姜会超等, 2015); 另外, 浮游植物可为浮游动物的生长繁殖提供饵料, 水温也可通过影响浮游植物种类和丰度进而改变浮游动物的种类和丰度(叶文建等, 2021)。海草的存在对浮游动物具有显著影响, 这是由于海草床的存在和其复杂的空间结构, 减小了水流和捕食者的影响, 为浮游动物提供了保护(Lo *et al.*, 2020)。水流的削弱也会促进悬浮物沉积, 与海草碎片一同作为浮游动物的碎屑食物来源(Roman *et al.*, 1983; Fonseca *et al.*, 1986、2007; Thresher *et al.*, 1992)。此外, 海草凋落叶含有丰富的非结构碳水化合物等活性物质, 会以溶解有机碳(DOC)的形式释放进入水体或沉积物, 并在微食物环作用下, DOC 得以被浮游动物所利用(Vichkovitten *et al.*, 2004; Lavery *et al.*, 2013; 张明亮等, 2018)。因此, 海草床复杂的物理空间带来的栖息、隐蔽、摄食环境是引起浮游动物丰度高的重要因素。裸沙区氨氮含量可能通过限制浮游植物的生长进而对浮游动物产生间接影响(赵鑫等, 2021)。刘潇等(2019)对荣成近岸海域浮游动物群落进行 RDA 分析发现, pH 是第 1 排序轴重要的负相关影响因子, 和本研究裸沙区浮游动物与环境因子 RDA 的结果较为一致。

### 3.3 海草床对浮游生物群落的影响及其生态学意义

本研究发现, 天鹅湖海草床浮游植物和浮游动物的年平均丰度分别为  $5.4 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> 和  $1.6 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>,



是裸沙区浮游植物和浮游动物年平均丰度的 1.4 倍和 1.5 倍。相比裸沙区,海草床复杂的物理空间和环境条件以及海草叶片、碎屑的可利用性可能是海草床浮游生物丰度和生物量水平较高的关键因素,这些特性可为浮游生物提供基质、食物和庇护(Nagelkerken, 2009; Nanjo *et al.*, 2014)。海草床对浮游生物群落的生态学意义主要有:(1)海草叶片阻碍光向水底的传播,具有或明或暗的光环境,这对某些浮游植物生长、浮游动物的产卵和幼体发育具有重要作用(Przeslawski, 2004; Sridhar *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011);(2)海草叶片不仅是附生藻类和黏性卵良好的附着基,还是生物幼体固着变态发育过程理想的固着基(Allen, 2014);(3)海草叶片与附生藻类之间有着密切的营养物质交换关系,大部分从海草植株释放至周围水柱的营养物质通常在被水流稀释之前可被附生藻类所摄取和利用,同时海草凋落叶会释放 DOC 到周围环境中,经微生物环被浮游动物所利用(McRoy *et al.*, 1974; Vichkovitten *et al.*, 2004; Lavery *et al.*, 2013; 张明亮等, 2018);(4)海草的存在可有效削弱水流,从而为浮游生物提供保护,同时,会促进悬浮物沉积和浮游植物附着,与海草碎屑一起作为浮游动物的食物来源(Kimmerer *et al.*, 1985; Fonseca *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2020)。然而,海草床属于脆弱的生态系统,易受自然环境变迁和人类活动影响,因此,建议加强对海草床的有效保护和科学修复,促进海草床的恢复,并发挥其对资源养护和环境改善的重要作用。

## 参 考 文 献

- ALCOVERRO T, DUARTE C M, ROMERO J. The influence of herbivores on *Posidonia oceanica* epiphytes. *Aquatic Botany*, 1997, 56(2): 93–104
- ALLEN R M. Oviposition site influences dispersal potential in a marine bubble snail. *Marine Biology Research*, 2014, 10(5): 515–522
- AMBO-RAPPE R. Differences in richness and abundance of species assemblages in tropical seagrass beds of different structural complexity. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2011, 9(3): 246–256
- AZMI A A, YOSHIDA T, TODA T, *et al.* Comparison of zooplankton abundance and community in seagrass and non-seagrass areas of Merambong shoal. AIP Publishing LLC, 2016, 1784(1): 060002
- BALODE M, PURINA I, BEÉCHEMIN C, *et al.* Effects of nutrient enrichment on the growth rates and community structure of summer phytoplankton from the Gulf of Riga, Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*, 1998, 20(12): 2251–2272
- BECK M W, HECK K L, ABLE K W, *et al.* The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: A better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and management of these areas. *BioScience*, 2001, 51(8): 633–641
- BLANDON A, ERMGASSEN P. Quantitative estimate of commercial fish enhancement by seagrass habitat in southern Australia. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2014, 141(5): 1–8
- DAI G Y, LI J, LI L, *et al.* The spatio-temporal pattern of phytoplankton in the north basin of Lake Dianchi and related environmental factors. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(5): 946–956 [代龚圆, 李杰, 李林, 等. 滇池北部湖区浮游植物时空格局及相关环境因子. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 946–956]
- DEVREKER D, SOUISSI S, SEURONT L. Effects of chlorophyll concentration and temperature variation on the reproduction and survival of *Temora longicornis* (Copepoda, Calanoida) in the Eastern English Channel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 318(2): 145–162
- DU M M, LIU Z T, WANG C S, *et al.* The seasonal variation and community structure of zooplankton in China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(17): 5407–5418 [杜明敏, 刘镇盛, 王春生, 等. 中国近海浮游动物群落结构及季节变化. *生态学报*, 2013, 33(17): 5407–5418]
- EDGAR J G, SHAW C, WATSON A G F, *et al.* Comparisons of species richness, size-structure and production of benthos in vegetated and unvegetated habitats in Western Port, Victoria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1994, 176(2): 201–226
- FERNANDES D, PODOLSKY R D. Developmental consequences of association with a photosynthetic substrate for encapsulated embryos of an intertidal gastropod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 407(2): 370–376
- FONSECA M S, CAHALAN J A. A preliminary evaluation of wave attenuation by four species of seagrass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1992, 35(6): 565–576
- FONSECA M S, FISHER J S. A comparison of canopy friction and sediment movement between four species of seagrass with reference to their ecology and restoration. *Marine Ecology Progress Series*, 1986, 29(1): 15–22
- FONSECA M S, KOEHL M, KOPP B S. Biomechanical factors contributing to self-organization in seagrass landscapes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 340(2): 227–246
- GULLSTRÖM M, BERKSTRÖM C, ÖHMAN M C, *et al.* Scale-dependent patterns of variability of a grazing parrotfish (*Leptoscarus vaigiensis*) in a tropical seagrass-dominated seascape. *Marine Biology*, 2011, 158(7): 1483–1495
- HECK K L, HAYS G, ORTH R J. Critical evaluation of the

- nursery role hypothesis for seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 253: 123–136
- 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]
- JERNAKOFF P, NIELSEN J. Plant-animal associations in two species of seagrasses in Western Australia. *Aquatic Botany*, 1998, 60(4): 359–376
- JIANG H C, CHEN H G, SONG X K, *et al.* Zooplankton community structure in Jincheng area of Laizhou Bay and its relationship with environmental factors. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(22): 7308–7319 [姜会超, 陈海刚, 宋秀凯, 等. 莱州湾金城海域浮游动物群落结构及与环境因子的关系. *生态学报*, 2015, 35(22): 7308–7319]
- KIMMERER W J, MCKINNON A D. A comparative study of the zooplankton in two adjacent embayments, Port Phillip and Westernport Bays, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1985, 21(2): 145–159
- LAVERY P S, MCMAHON K, WEYERS J, *et al.* Release of dissolved organic carbon from seagrass wrack and its implications for trophic connectivity. *Marine Ecology Progress Series*, 2013, 494(3): 121–133
- LAVERY P S, VANDERRKLIFF M A. A comparison of spatial and temporal patterns in epiphytic macroalgal assemblages of the seagrasses *Amphibolis griffithii* and *Posidonia coriacea*. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 236: 99–112
- LENZ P H, HARTLINE A. Temperature compensation in the escape response of a marine copepod, *Calanus finmarchicus* (Crustacea). *The Biological Bulletin*, 2005, 209(1): 75–85
- LEPOINT G, HAVELANGE S, GOBERT S, *et al.* Fauna vs flora contribution to the leaf epiphytes biomass in a *Posidonia oceanica* seagrass bed (Revellata Bay, Corsica). *Hydrobiologia*, 1999, 394: 63–67
- LI C L, ZHANG Y S, SUN S, *et al.* Species composition, density and seasonal variation of phytoplankton in Sanggou Bay, China. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 1–8 [李超伦, 张永山, 孙松, 等. 桑沟湾浮游植物种类组成、数量分布及其季节变化. *渔业科学进展*, 2010, 31(4): 1–8]
- LIU J Y, LI W T, QIN L Z, *et al.* Spatio-temporal variations in benthic and macrobenthic molluscs in Swan Lake, Shandong, China. *Marine Sciences*, 2017, 41(1): 113–122 [刘建影, 李文涛, 覃乐政, 等. 山东荣成天鹅湖海草场大型底栖贝类时空分布研究. *海洋科学*, 2017, 41(1): 113–122]
- LIU P, SONG H J, FU M Z, *et al.* Seasonal variability of zooplankton community characteristics in the Rongcheng Bay contiguous waters. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013, 35(4): 168–175 [刘萍, 宋洪军, 傅明珠, 等. 荣成湾毗邻海域浮游动物群落季节分布特征. *海洋学报*, 2013, 35(4): 168–175]
- LIU X, PANG Y L, SUN B B, *et al.* Structure of zooplankton community and its relation with environmental factors in Rongcheng adjacent waters. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(10): 177–179 [刘潇, 潘玉龙, 孙蓓蓓, 等. 荣成近岸海域浮游动物群落结构及其与环境因子的关系. *现代农业科技*, 2019(10): 177–179]
- LO S L, YAP T K, CHEN C A, *et al.* Zooplankton in seagrass and adjacent non-seagrass habitats in Tun Mustapha Park, Sabah, Malaysia. *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture*, 2020, 4(1): 6–13
- LUGENDO B R, NAGELKERKEN I, VAN DER VELDE G, *et al.* The importance of mangroves, mud and sand flats, and seagrass beds as feeding areas for juvenile fishes in Chwaka Bay, Zanzibar: Gut content and stable isotope analyses. *Journal of Fish Biology*, 2006, 69(6): 1639–1661
- MA C X, YU H X. Phytoplankton community structure in reservoirs of different trophic status, Northeast China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2013, 31(3): 471–481
- MAUCHA R. Das gleichgewicht des limnischen Lebensraumes. *Magyar Boil Kutatantezet Munka*, 1942, 14: 192–230
- MCROY C P, GOERING J J. Nutrient transfer between the seagrass *Zostera marina* and its epiphytes. *Nature*, 1974, 248(5444): 173–174
- METILLO E B, NISHIKAWA J, ROSS O B, *et al.* Diel patterns of zooplankton community structure in nearshore waters of different substrates off Tinggi and Sibul Islands, Malaysia, with special reference to copepods. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2019, 22(1): 86–102
- MOORE K A. Influence of seagrasses on water quality in shallow regions of the lower Chesapeake Bay. *Journal of Coastal Research*, 2004, 2009(10045): 162–178
- MU J D, DONG W, CHEN B J, *et al.* Ecological characteristics of phytoplankton in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 91–96 [慕建东, 董玮, 陈碧鹃, 等. 桑沟湾浮游植物生态特征. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 91–96]
- NAGELKERKEN I. Evaluation of nursery function of mangroves and seagrass beds for tropical decapods and reef fishes: Patterns and underlying mechanisms. *Ecological connectivity among tropical coastal ecosystems*. Springer, Dordrecht, 2009, 357–399
- NAKAMURA Y, SANO M. Comparison of invertebrate abundance in a seagrass bed and adjacent coral and sand areas at Amitori Bay, Iriomote Island, Japan. *Fisheries Science*, 2005, 71(3): 543–550
- NANJO K, KOHNO H, NAKAMURA Y, *et al.* Differences in fish assemblage structure between vegetated and unvegetated microhabitats in relation to food abundance patterns in a mangrove creek. *Fisheries Science*, 2014, 80(1): 21–41
- PAN Y L, LIU X, SHA J J, *et al.* Influence of environmental factors on phytoplankton community structure and its

- relationship with coastal aquaculture in the waters adjacent to Rongcheng. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 26–33 [潘玉龙, 刘潇, 沙婧婧, 等. 荣成近岸养殖海域浮游植物群落结构及与环境因子的关系. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 26–33]
- PARK H J, CHOY E J, LEE K, *et al.* Trophic transfer between coastal habitats in a seagrass-dominated macrotidal embayment system as determined by stable isotope and fatty acid signatures. *Marine and Freshwater Research*, 2013, 64(12): 1169–1183
- PRZESLAWSKI R. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Molluscan Research*, 2004, 24(1): 43–63
- ROMAN M R, REEVE M R, FROGGATT J L. Carbon production and export from Biscayne Bay, Florida. I. Temporal patterns in primary production, seston and zooplankton. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 1983, 17(1): 45–59
- SHUAI L, YIN X C, YANG X N, *et al.* Studies on phytoplankton and zooplankton in the Yuehu inlet, Shongdong Peninsula. *Journal of Qingdao University*, 2003, 18(4): 70–75 [帅莉, 殷效彩, 杨小妮, 等. 山东荣成月湖浮游动植物的研究. *青岛大学学报*, 2003, 18(4): 70–75]
- SRIDHAR R, THANGARADJOU T, KANTIAN L. Comparative investigation on physico-chemical properties of the coral reef and seagrass ecosystems of the Palk Bay. *Indian Journal of Marine Sciences*, 2008, 37(2): 207–213
- STROM S L, BRIGHT K J. Inter-strain differences in nitrogen use by the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, and consequences for predation by a planktonic ciliate. *Harmful Algae*, 2009, 8(5): 811–816
- TANG C, YI Y, YANG Z, *et al.* Planktonic indicators of trophic states for a shallow lake (Baiyangdian Lake, China). *Limnologica*, 2019, 78: 125712
- THRESHER R E, NICHOLS P D, GUNN J S, *et al.* Seagrass detritus as the basis of a coastal planktonic food chain. *Limnology and Oceanography*, 1992, 37(8): 1754–1758
- UNSWORTH R K F, NORDLUND L M, CULLEN-UNSWORTH L C. Seagrass meadows support global fisheries production. *Conservation Letters*, 2019, 12(1): e12566
- VICHKOVITTEN T, HOLMER M. Contribution of plant carbohydrates to sedimentary carbon mineralization. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(9): 1053–1066
- WASMUND N, TUIMALA J, SUIKKANEN S, *et al.* Long-term trends in phytoplankton composition in the western and central Baltic Sea. *Journal of Marine Systems*, 2011, 87(2): 145–159
- YE W J, DU P, SHOU L, *et al.* Spatio-temporal variation of marco and mesozooplankton communities and the controlling factors around Zhoushan Archipelago. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(1): 254–267 [叶文建, 杜萍, 寿鹿, 等. 舟山海域大中型浮游动物群落时空变化及受控要素. *生态学报*, 2021, 41(1): 254–267]
- ZHANG M L, QI Z H, LI B, *et al.* A preliminary study on energy contribution of terrestrial organic carbon to zooplankton in the Laizhou Bay. *Marine Fisheries*, 2018, 40(3): 319–325 [张明亮, 齐占会, 李斌, 等. 陆源有机碳对莱州湾浮游动物能量贡献的初步研究. *海洋渔业*, 2018, 40(3): 319–325]
- ZHANG X, XU X F, DAI Y Y, *et al.* Phytoplankton community characteristics and variation at artificial reefs of Tianjin offshore. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 1–10 [张雪, 徐晓甫, 戴媛媛, 等. 天津近岸人工鱼礁海域浮游植物群落及其变化特征. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 1–10]
- ZHANG X, ZHOU Y, LIU P, *et al.* Temporal pattern in biometrics and nutrient stoichiometry of the intertidal seagrass *Zostera japonica* and its adaptation to air exposure in a temperate marine lagoon (China): Implications for restoration and management. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 94(1/2): 103–113
- ZHAO X, WANG L, ZHENG S, *et al.* Analysis on community characteristics and environmental factors of plankton and zoobenthos in headwater area of Wudinghe River watershed: A tributary of mid Yellow River. *Water Resources and Hydropower Engineering*, 2021, 52(10): 121–132 [赵鑫, 王琳, 郑帅, 等. 黄河中游支流无定河流域源头区浮游生物和底栖动物群落特征与环境因子分析. *水利水电技术*, 2021, 52(10): 121–132]

(编辑 冯小花)

## Spatial-Temporal Variation of Characteristics of Plankton in a Seagrass Bed and an Adjacent Area of Bare Sand in Swan Lake, Rongcheng, China

LU Jia<sup>1</sup>, GUO Dong<sup>2</sup>, YU Sitian<sup>1</sup>, LI Wentao<sup>1</sup>, ZHANG Peidong<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China)

**Abstract** Seagrass beds are a typical coastal ecosystem. To understand the temporal and spatial variation characteristics of the plankton community structure in a *Zostera marina* seagrass bed and an adjacent area of bare sand in Swan Lake, Rongcheng City, Shandong Province, an investigation of plankton diversity and abundance, ecological characteristics of the seagrass bed, and key environmental factors in the *Z. marina* seagrass bed and its adjacent bare sand area was conducted in February, May, August, and November in 2019. Canonical correspondence analysis (CCA) and redundancy analysis (RDA) were used to explore the influence of environmental factors on the diversity of plankton species. The results showed that there were 38 species of phytoplankton, belonging to 25 genera and three phyla, among which diatom species were the most abundant (89.4%), followed by dinoflagellates (7.8%). A total of 18 species of zooplankton and three species of larvae were identified (mainly crustaceans: 71.4%), and the number of plankton species was the highest in November. The annual average abundance of phytoplankton and zooplankton in the seagrass bed was  $5.4 \times 10^4$  cells/m<sup>3</sup> and  $1.6 \times 10^4$  ind./m<sup>3</sup>, respectively, which were 1.4 times and 1.5 times higher than those in the bare sand area. The CCA and RDA analyses showed that the dominant plankton species in the seagrass bed were significantly correlated with water temperature, plant density, and biomass of seagrass beds, while the dominant plankton species in the bare sand area were mainly correlated with environmental factors such as water temperature, pH value, and ammonia nitrogen content. The results showed that the seagrass bed in Swan Lake supported a higher abundance and diversity of plankton compared with the bare sand area. This study provides baseline data for further elucidating the structure and function of the seagrass bed ecosystem.

**Key words** Seagrass bed; Phytoplankton; Zooplankton; Community structure; Environmental factors; Swan Lake

① Corresponding author: ZHANG Peidong, E-mail: zhangpds@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230331002

http://www.yykxjz.cn/

于兵, 杨启文, 张彦浩, 李洪辰, 张沛东. 赤霉素和弱酸对鳗草种子萌发和生理特性的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 26-34

YU B, YANG Q W, ZHANG Y H, LI H C, ZHANG P D. Effects of gibberellin and weak acid on seed germination and physiological characteristics of the eelgrass *Zostera marina*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 26-34

# 赤霉素和弱酸对鳗草种子萌发和生理特性的影响\*

于 兵 杨启文 张彦浩 李洪辰 张沛东<sup>①</sup>

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003)



**摘要** 本文研究了赤霉素和弱酸对鳗草(*Zostera marina*)种子萌发和生理特性的影响,监测了鳗草种子的累积萌发率、幼苗建成率以及种子萌发过程中种子干重、水分、呼吸速率、可溶性糖、淀粉、赤霉素、脱落酸含量和 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶活性的动态变化,探究了2种外源处理对鳗草种子的促萌作用,分析了鳗草种子应对外源促萌的生理响应过程。结果显示,2种促萌处理均能有效促进鳗草种子萌发和幼苗建成,其中,赤霉素处理组促萌效果最优,其种子萌发率和幼苗建成率为对照组的1.6倍;促萌期间,2个促萌处理组种子 $\alpha$ -淀粉酶活性呈先上升后下降的趋势,淀粉含量呈下降趋势,可溶性糖含量呈持续上升趋势;至实验结束时,赤霉素处理组种子可溶性糖含量最高,是促萌前初始值的3.3倍,亦显著高于弱酸处理组和对照组( $P<0.05$ ),弱酸处理组种子淀粉含量最低,显著低于其他2组( $P<0.05$ ),而各处理组之间种子的 $\alpha$ -淀粉酶活性无显著差异( $P>0.05$ );主成分分析显示,种子 $\alpha$ -淀粉酶活性、淀粉和可溶性糖含量为种子萌发过程中的关键因子。综合分析认为,外源赤霉素处理是破除鳗草种子休眠的有效方法,其主要通过调节种子淀粉酶活性、提高淀粉分解速率和提高可溶性糖含量为种子萌发提供能量实现破除休眠的作用。本研究结果为鳗草种子快速萌发技术提供了理论依据和科学基础。

**关键词** 赤霉素; 萌发率; 种子休眠; 营养物质; 鳗草

**中图分类号** Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0026-09

海草是一类能够在海洋环境中完成整个生活史的高等被子植物,其在适宜环境中能够成片生长从而形成大面积的海草床(Short *et al*, 2011; 周媛媛, 2021)。海草床是近岸海域生产力最高的生态系统之一,在海洋生态环境改善、觅食与庇护所提供、防风固堤、碳封存等方面具有极其重要的生态功能(Stevenson, 1988)。然而,受人类活动及气候变化等影响,全球海草床的分布面积正以  $110 \text{ km}^2/\text{yr}$  的速度迅速衰退,目前,全球约有 29% 的海草床已完全消失,且退化速度仍在加快(吴钟解等, 2021)。

随着海草床退化趋势的日趋严重,有关海草床的

生态修复与保护愈发受到国内外学者的关注(Steinbach *et al*, 1997; Martins *et al*, 2005; 王丽荣等, 2018)。大多数海草的种子数量多、易于采集和保存,海草种子生态修复法成为当前海草床规模化生态修复工程的首选,并得到广泛应用(周毅等, 2020)。但在海草床修复实践中,播种的海草种子受到埋藏深度、水流冲刷、生物捕食与扰动等多重因素影响(刘燕山等, 2014),其成苗率普遍在 1%~10% 之间(Orth *et al*, 2009)。此外,大部分海草的种子具有坚硬的种皮,休眠期长达几周至几年,导致播种种子的成苗率偏低(高春智等, 2012; 田璐, 2014)。因此,明确海草种子的播前促萌

\* 国家自然科学基金(42076100)资助。于 兵, E-mail: yubing8758@stu.ouc.edu.cn

<sup>①</sup> 通信作者: 张沛东, 教授, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2022-03-31, 收修改稿日期: 2023-05-11

理论和方法,是提高海草播种种子成苗率的有效途径之一。

有关播前促萌打破海草种子休眠的研究已有较多报道。研究表明,盐度、温度、光照、溶解氧、激素和机械划破种皮等因素都是影响海草种子休眠或萌发的主要因素(刘永庆等,1995;李凤玲等,2000;李海平等,2009),但不同因素对海草种子萌发的影响程度存在差异。刘云龙等(2016)研究发现,低盐条件能促进鳗草(*Zostera marina*)种子萌发,当盐度降至15以下时种子萌发率显著提高,且淡水处理的种子萌发率最高。一些研究表明,酸蚀、摩擦、刺破等方式破除种皮可促进某些采用物理方法休眠的海草种子萌发,如诺氏鳗草(*Z. noltii*)和鳗草(Loques *et al*, 1990; Harrison *et al*, 1992)。Conacher等(1994)研究发现,较高浓度的赤霉素(50 mg/L, GbA3 和 KN03)和硫脲(50 mg/L)处理可以促进牟氏鳗草(*Z. muelleri*)种子萌发。在种子萌发时,种子内部会进行一系列生理生化变化,包括能量代谢、贮藏物质的转化和细胞的修复与活化等。种子吸水是萌发的启动条件,随后种子的淀粉、脂肪、蛋白质等组分在呼吸作用下被分解和转化,用于种子的生长发育(潘瑞炽等,2008)。尽管有关海草种子萌发生理的研究已有一些报道,但关于播前促萌对海草种子萌发和生理特性的影响还未见报道。

对陆生植物与水生植物的研究均表明,赤霉素和弱酸条件均能促进种子萌发(Jiang *et al*, 2016; 张敏等, 2021)。例如,田璐(2014)探究了不同种皮破除方式(摩擦、酸蚀、碱蚀等)以及赤霉素处理对鳗草种子萌发的影响,发现摩擦破除种皮、50 mg/L 赤霉素处理和 pH=6、浸种 96 h 的弱酸处理,对鳗草种子具有良好的促萌效果,2 个处理的种子累积萌发率分别达到 62.9%和 77.9%。本研究在借鉴已有报道的基础上,以温带海域海草优势种——鳗草为对象,验证外源赤霉素处理(50 mg/L 浸种 15 d)和弱酸处理(pH=6 浸种 96 h)对鳗草种子破除休眠的影响,分析种子萌发过程中  $\alpha$ -淀粉酶活性、淀粉和可溶性糖含量的变化,旨在查明鳗草种子对不同促萌手段的生理学响应过程,以期建立鳗草种子人工促萌理论提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子采集与保存

实验用鳗草种子于 2019 年 7 月采集于山东省荣成市天鹅湖海域(37.3382°N~37.3588°N, 122.5551°E~122.5793°E)。天鹅湖鳗草海草床的平均种子产量可达

(53 623.66±19 628.11) seeds/m<sup>2</sup>(徐少春,2017)。因此,采集时仅需选择 2~3 m<sup>2</sup> 的海草床即可满足本研究种子用量。采集时,仅摘取具有种子的佛焰苞,避免对营养枝造成影响。将摘取的佛焰苞放入网目孔径为 1.0 mm 的尼龙袋,封口后浸于自然海域 1 个月。待种子进一步成熟并自然脱落后,将内容物移入整理箱并反复加入海水搅拌,除去上层有机碎屑及贝壳等杂质,收集种子至广口瓶带回实验室,移入尼龙袋并置于室内 4 °C 循环水槽在自然光照、盐度 33 的条件下暂养。

### 1.2 实验设计

实验于 2020 年 1—4 月进行,共计 120 d。实验设置 3 个处理组,分别为赤霉素处理组、弱酸处理组以及对照组。赤霉素处理组用盐度为 33 的人工海水将外源赤霉素纯品稀释至 50 mg/L 后浸泡鳗草种子 15 d,后置于 4 °C 环境下春化 1 周,弱酸处理组用 0.1 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 溶液将盐度为 33 的人工海水调至 pH=6 后浸泡鳗草种子 96 h,然后置于 4 °C 环境下春化 1 周,对照组为不对鳗草种子进行促萌处理,置于 4 °C 环境下春化 1 周。

### 1.3 实验过程与条件

首先开展不同处理对种子的促萌,挑选 90 000 粒色泽较深、颗粒饱满的成熟鳗草种子,将种子随机平均分成 30 份,每个处理组随机选择 10 份(重复),按实验设计进行种子促萌处理,结束后将每份种子分别放入 500 mL 烧杯,加入 300 mL 盐度为 33 的无菌海水开始种子萌发。萌发期间,保持无光照和室温,每 2 d 换水 1 次。以子叶伸出种皮 1 cm 作为萌发的标志。每 5 d 观察种子萌发情况,统计各重复组萌发数量,计算累积萌发率和平均萌发历期(MTG),并进行一次取样,于每个处理组的各重复中随机取出 100 粒种子,共计 1 000 粒。然后将各处理组取出的种子均匀混合,平均分为 4 份,分别测定种子鲜重、干重、水分、呼吸速率、可溶性糖、淀粉、赤霉素、脱落酸含量和  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶活性。至种子萌发停滞(累积萌发率不再上升)时停止取样,共计 80 d。

期间,将子叶长 1 cm 的幼苗按不同处理组分别移植于底部铺设有 3 cm 厚细沙的 100 mL 烧杯内,并在烧杯壁贴好标签,每个烧杯植入 20 株幼苗,移植时使细沙覆盖幼苗下胚轴。然后将烧杯放入 40 cm×40 cm×20 cm(长×宽×高)的玻璃水槽中,添加海水至水深达到 15 cm(完全覆盖烧杯),放入光照培养箱(GXZ-0288,宁波江南仪器厂)培养 30 d。培养过程中隔天换水,水温设置为 17 °C,光照周期 L:D=12 h:



12 h, 光照强度 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

培养结束后, 统计幼苗数量, 计算幼苗建成率。从各处理组中随机取出 30 株鳗草幼苗, 测量幼苗的株高(cm)、叶鞘长(cm)、叶长(cm)和叶宽(mm)等形态学指标。

#### 1.4 样品处理与分析

**1.4.1 种子萌发和幼苗建成** 实验结束后, 统计并计算种子的累积萌发率、平均萌发历期(MTG)和幼苗建成率:

$$\text{累积萌发率}(\%) = \sum \frac{n_i}{N} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $n_i$  为第  $i$  天种子的萌发数,  $N$  为萌发种子的总数;

$$\text{MTG}(\text{d}) = \sum \frac{n_i \times d}{N} \quad (2)$$

式中,  $n_i$  为第  $i$  天种子的萌发数,  $d$  为萌发的第  $i$  天,  $N$  为萌发种子的总数;

$$\text{幼苗建成率}(\%) = \frac{m}{N} \times 100 \quad (3)$$

式中,  $m$  为幼苗建成数量,  $N$  为播种的种子数量。

**1.4.2 种子水分和内含物组分测定** 实验开始前, 随机挑选成熟饱满的鳗草种子 500 粒, 测定种子各项指标初始值; 实验开始后, 每 5 d 取样 1 次进行各项指标监测。水分含量的测定采用烘干法(杨敏, 2013); 呼吸速率 [ $v$ ,  $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ] 通过海水溶氧含量的变化测定, 选取 50 粒鳗草种子, 用吸水纸吸除表面水分后称重, 记为湿重  $M$ , 然后放入 25 mL 封闭试管内, 倒入 10 mL 海水, 使用微电极溶氧仪测定海水的溶氧含量(记为  $C_1$ ), 间隔 1 h 后再次测定海水的溶氧含量(记为  $C_2$ ), 计算公式:

$$v[\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})] = \frac{(C_1 - C_2)V}{M \cdot T} \quad (4)$$

式中,  $V$  为 10 mL,  $T$  为 1 h。

可溶性糖及淀粉含量的测定采用蒽酮法(Lewis *et al.*, 2007)。 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶活性使用  $\beta$ -淀粉酶检测试剂盒测定, 赤霉素水平使用植物赤霉素酶联免疫分析试剂盒测定, 脱落酸水平使用植物脱落酸酶联免疫分析试剂盒测定, 以上试剂盒均来自南京建成生物工程研究所。每组样品的同一指标重复测定 4 次。

#### 1.5 数据处理

根据种子水分含量的变化趋势将种子吸涨分为快速吸水期(1~30 d)、滞缓期(31~50 d)、二次吸水期(51~65 d)和二次平稳期(66~80 d), 种子组分的分析基于与水分同样的分期。使用 SPSS 19.0 和 Origin 8.5

软件对数据进行分析作图, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组间差异, 若差异显著, 使用 Tukey 多重比较, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。并对种子萌发率和其他生理生化指标进行主成分分析, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平,  $P < 0.01$  作为差异极显著水平。

## 2 结果

### 2.1 鳗草的种子萌发和幼苗建成

**2.1.1 累积萌发率** 随萌发时间增加, 3 个处理组鳗草种子的累积萌发率均呈逐渐升高趋势, 后期趋于平缓。除 15 和 20 d 外, 赤霉素处理组与弱酸处理组的种子累积萌发率均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。赤霉素处理组鳗草种子的累积萌发率最高, 达到 53.3%, 是对照组的 1.6 倍; 弱酸处理组鳗草种子的累积萌发率次之, 达到 49.0%, 是对照组的 1.4 倍(图 1)。

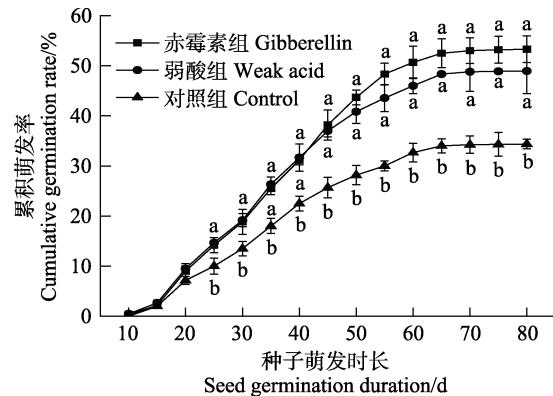


图 1 不同促萌处理组鳗草种子累积萌发率的变化  
Fig.1 Change in cumulative germination rate of seeds of *Z. marina* under different treatments

不同字母表示同一萌发时长各处理组之间存在显著差异( $P < 0.05$ )。下同。

Different letters indicate significant differences among treatments at the same germination time ( $P < 0.05$ ). The same as below.

**2.1.2 平均萌发历期** 经过 80 d 的种子促萌, 各处理组的种子平均萌发历期为 37.3~39.1 d, 各处理组的种子平均萌发历期差异不显著( $P > 0.05$ )。

**2.1.3 幼苗建成率** 经过 80 d 的种子促萌和 30 d 幼苗培养, 赤霉素组、弱酸组和对照组鳗草的幼苗建成率存在显著差异( $P < 0.05$ )。其中, 赤霉素处理组的幼苗建成率最高, 显著高于弱酸处理组和对照组, 是对照组的 1.6 倍; 弱酸处理组的幼苗建成率次之, 亦显著高于对照组, 是对照组的 1.4 倍(图 2)。

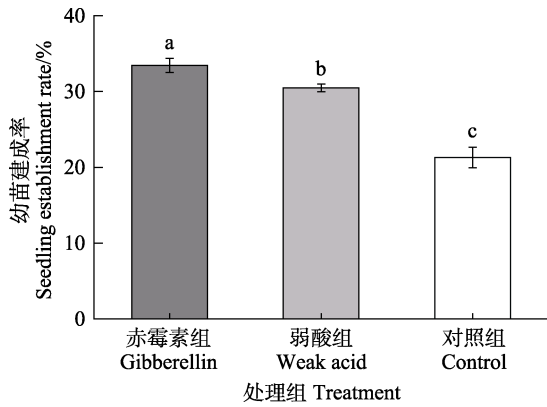


图 2 不同种子促萌处理对鳢草幼苗建成率的影响

Fig.2 Effects of different seed germination treatments on the seedling establishment rate of eelgrass

**2.1.4 幼苗生长** 经 30 d 幼苗培养, 除叶宽外, 弱酸处理组幼苗的生长指标均达到最大值, 其中, 叶鞘长显著高于对照组( $P<0.05$ ) (表 1)。各处理组幼苗的株高、叶片数、叶长和叶宽均无显著差异( $P>0.05$ )。

**2.2 鳢草的生理学指标**

**2.2.1 不同促萌处理鳢草种子萌发与生理指标的关系** 对鳢草不同处理组进行主成分分析, 结果显

示, 不同处理间呈显著差异(图 3A)。对鳢草水分、干重、淀粉、可溶性糖、呼吸速率、赤霉素、脱落酸、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶等生理指标进行 PCA 分析, 如图 3B 所示。前 2 个主成分(PC1 和 PC2)的特征值 $>1$ , 占变异性的 80%以上。其中,  $\alpha$ -淀粉酶、淀粉和可溶性糖 3 个指标的影响程度最高, 贡献度超过 40%。 $\alpha$ -淀粉酶活性和淀粉含量呈正相关关系, 可溶性糖与淀粉含量呈显著的负相关关系( $P<0.05$ )。结果表明, 在  $\alpha$ -淀粉酶影响下, 淀粉和可溶性糖的相互转化可能是影响鳢草种子萌发的关键生理过程, 因此, 后续重点分析这 3 个指标。

**2.2.2  $\alpha$ -淀粉酶** 实验期间, 种子  $\alpha$ -淀粉酶活性的变化如图 4A 所示, 各时期不同促萌处理组种子  $\alpha$ -淀粉酶活性的比较如图 4B 所示。赤霉素组  $\alpha$ -淀粉酶活性在滞缓期达到最大值, 上升了 20.7%, 显著高于其他 2 组( $P<0.05$ )。二次吸水期赤霉素组  $\alpha$ -淀粉酶活性达到 2.02 U/g, 显著高于其他 2 组( $P<0.05$ )。

**2.2.3 淀粉含量** 实验期间, 不同促萌处理组种子淀粉含量的变化整体呈下降趋势(图 5A)。各时期不同促萌处理组种子淀粉含量的比较如图 5B 所示。赤霉素处理组种子淀粉由初始值 48.8%于滞缓期下降了

表 1 不同促萌处理组幼苗形态学指标(平均值 $\pm$ 标准差)  
Tab.1 Morphological indexes of seedlings at different treatments (Mean $\pm$ SD)

指标 Index	处理组 Treatment		
	赤霉素 Gibberellin	弱酸 Weak acid	对照 Control
株高 Shoot height /cm	8.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	8.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
叶鞘长 Leaf sheath length /cm	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	2.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
叶片数 Leave number (片/株)	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
叶长 Leaf length /cm	5.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
叶宽 Leaf width /cm	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>

注: 同一行数据右上角的不同上标字母表示不同处理组之间存在显著差异( $P<0.05$ )。

Note: Different superscript letters in the same line indicate significant differences between different treatments ( $P<0.05$ ).

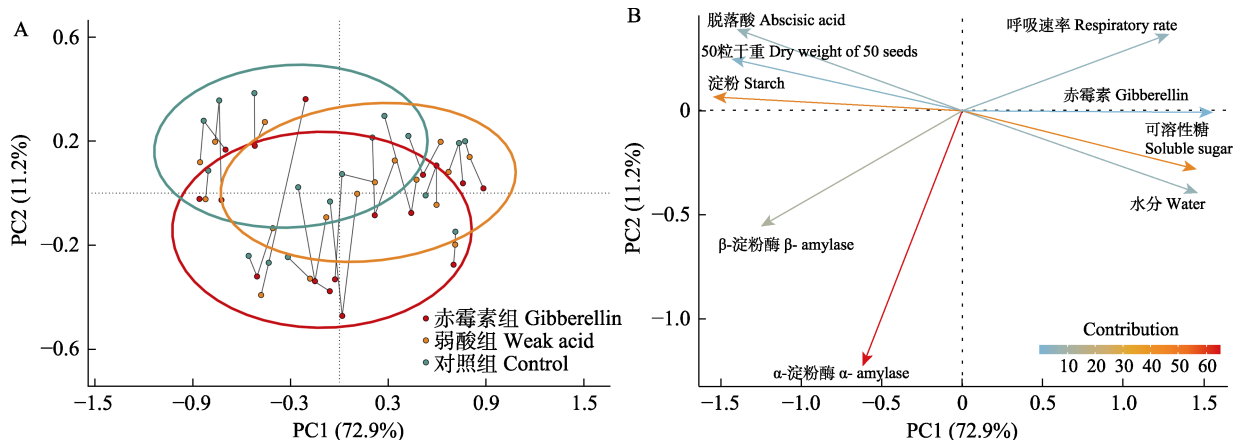


图 3 不同处理组间(A)与鳢草各指标(B)主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of different treatments (A) and eelgrass indicators (B)

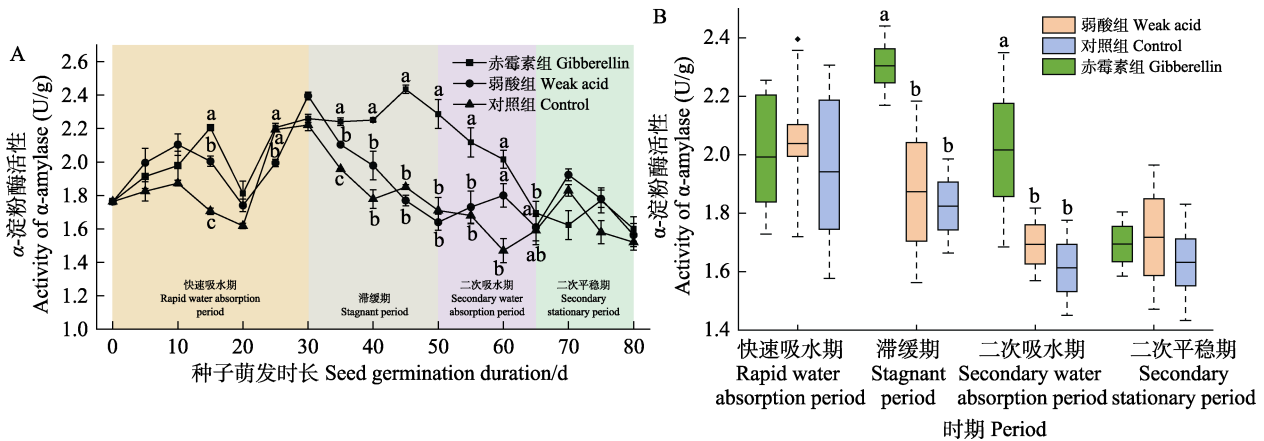


图 4 实验期间(A)与不同时期(B)各处理组种子  $\alpha$ -淀粉酶活性变化

Fig.4 The changes of  $\alpha$ -amylase activity in seeds exposed to different treatments during the experiment (A) and different periods (B)

6.6%，弱酸处理组下降了 5.6%，均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。二次吸水期间，赤霉素处理组和弱酸处理组种子淀粉均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.4 可溶性糖** 实验期间，不同促萌处理组种子可溶性糖含量的变化整体呈上升趋势(图 6A)。各时期不同促萌处理组种子可溶性糖含量的比较如图 6B 所示。其中，与初始值相比，滞缓期赤霉素处理组可溶性糖含量较初始值上升了 2 倍，弱酸组可溶性糖含量上升了 1.9 倍，均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 人工促萌对海草种子萌发和幼苗建成的影响

外源赤霉素的添加以及酸化处理能有效促进种子萌发，打破种子的休眠。本研究发现，对鳗草种子进行赤霉素与弱酸促萌处理的累积萌发率和幼苗建成率均得到提高，分别达到对照组的 1.6 倍和 1.4 倍。

田璐等(2014)研究发现，在  $pH=6$  的条件下浸泡鳗草种子 96 h，种子累积萌发率高于其他各组，达到 77.9%，是对照组的 1.14 倍；对种子进行 50 mg/L 的赤霉素激素处理能显著提高累积萌发率，达到 51.1%。本研究弱酸处理组种子的萌发率低于田璐(2014)的实验结果，可能与本实验种子初始活力较低(63.3%)有关。

唐实玉等(2021)研究发现，200 mg/L 赤霉素浸泡处理后，色木槭(*Acer mono Maxim.*)种子萌发率达到 29.3%，是对照组的 1.7 倍。文湘穗等(2023)研究发现，对北五味子(*Schisandra chinensis*)种子进行 250 mg/L GA3 + 50 mg/L 6-BA 的激素浓度浸泡可以有效打破种子休眠，种子发芽率达到 55%，较对照组增加 27%。杨爽(2013)等研究发现，用 15%的硫酸处理茅膏菜(*Drosera spatulata*)种子 20 min，发芽率较对照组提高 5.5 倍，达到 79.8%。这些研究说明外源赤霉素添加与酸化均能有效促进鳗草种子的萌发与幼苗建成，证

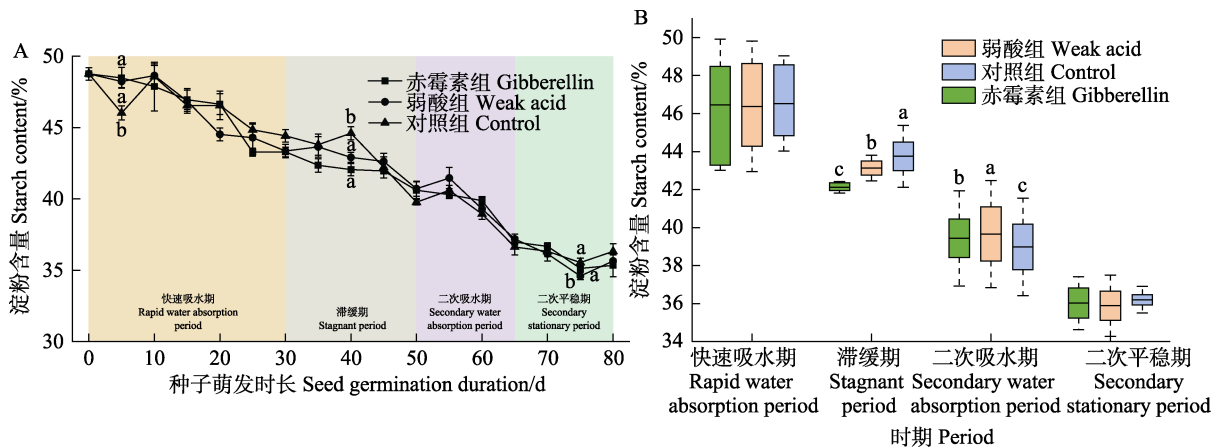


图 5 实验期间(A)与不同时期(B)各处理组种子淀粉含量变化

Fig.5 The changes of seed starch contents in seeds exposed to different treatments during the experiment (A) and different periods (B)

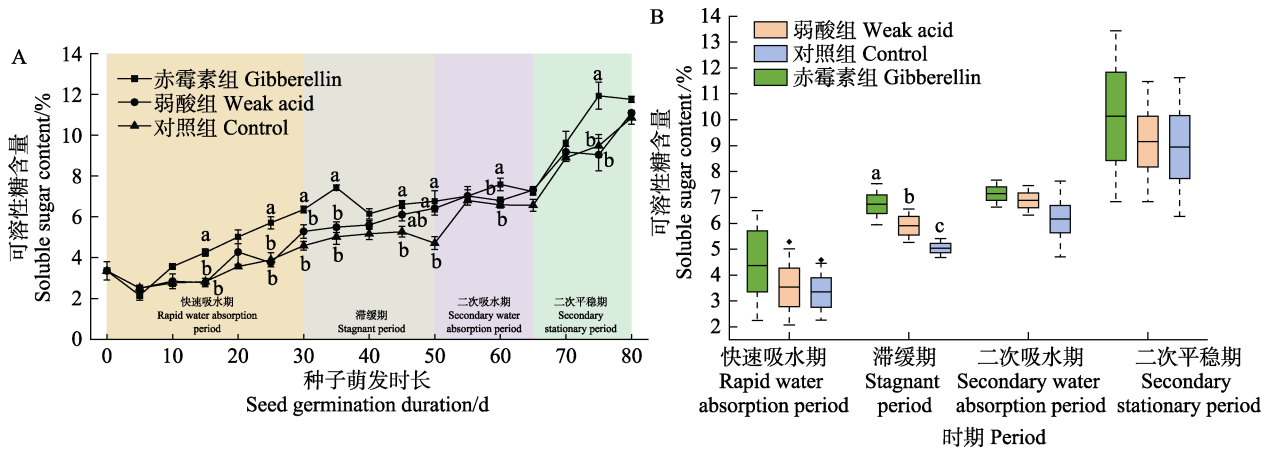


图 6 实验期间(A)与不同时期(B)各处理组种子可溶性糖含量变化  
 Fig. 6 The changes of seed soluble sugar contents in seeds exposed to different treatments during the experiment (A) and different periods (B)

实了外源赤霉素的添加以及酸化处理能有效破除鳗草种子休眠、促进萌发的假设。此外,盐度和温度也是影响海草种子萌发与幼苗建成的重要因素。Kahn等(2005)研究了盐度(0~70)对川蔓草(*Ruppia maritima*)种子萌发的影响,发现只有在低盐度条件下(0、10和20)时种子萌发,且盐度0处理组萌发率最高,达到40%。过高或过低的盐度条件会导致龟裂泰来草(*Thalassia testudinum*)幼苗的存活率降低甚至全部死亡,盐度30和40是幼苗生长的最适宜条件。Morita等(2010)研究发现,对鳗草种子7℃低温处理1个月,萌发率显著高于21~25℃处理组。

### 3.2 海草种子对人工促萌的生理响应

种子萌发包括吸胀、萌动、发芽和成苗4个阶段,种子吸水是水分转向萌发的必要起始步骤(宋松泉等,2008)。种子在休眠过程中,种子的营养物质与酶活性处于一定的动态变化过程(刘子凡等,2016)。种子内存在丰富的营养物质,在萌发过程中逐步被分解利用,一方面在呼吸过程中转化为能量,另一方面通过代谢转化为新细胞的组成成分(Steinbach *et al.*, 1997)。

本研究发现,赤霉素与弱酸处理对鳗草种子的休眠破除作用是多种因素共同作用的结果,综合各处理组鳗草种子萌发率和其他指标的主成分分析发现, $\alpha$ -淀粉酶活性、淀粉和可溶性糖含量是种子萌发期间的关键因素。促萌处理能显著提升种子萌发前期的吸水速率,随种子吸水吸胀的进程,淀粉酶活性提升,加快淀粉的分解速率,种子干重下降,淀粉在酶作用下被分解成可溶性糖,为种子萌发过程提供能量,可溶性糖含量迅速上升。进入滞缓期,种子停止吸水,此

时 $\alpha$ -淀粉酶活性达到最高,赤霉素组酶活显著高于其他2组,达到对照组的1.3倍,此时,赤霉素组和弱酸组淀粉含量均显著低于对照组,可溶性糖含量显著高于对照组。二次吸水期种子重新开始吸水,由于种子呼吸活动加剧各组可溶性糖含量上升缓慢。二次平稳期种子各项指标都趋于稳定,赤霉素组的可溶性糖含量显著高于其他2组。淀粉是种子萌发过程中能量代谢和物质代谢的基础。种子萌发和幼苗生长主要依赖于内源淀粉和可溶性糖的降解(Lv *et al.*, 2021)。研究表明,种子萌发前期营养物质快速消耗,为种子萌发提供必要的能量与物质基础(闫晓娜等,2020)。在种子萌发前利用赤霉素的拮抗作用减弱或消除脱落酸抑制萌发的生理效应是十分必要的(Sun *et al.*, 2004)。

## 4 结论

本研究探究了赤霉素与弱酸2种外源促萌处理对破除鳗草种子休眠的作用,分析了鳗草种子应对外源促萌处理的生理响应过程。结果发现,赤霉素与弱酸2种促萌方法均能有效促进鳗草种子萌发,其中以赤霉素的促萌效果最好,其种子累积萌发率和实生苗建成率分别达到53.3%和33.4%,是对照组的1.6倍;促萌处理提升了鳗草种子内源赤霉素含量,加快水分吸收,抑制脱落酸含量,进而提高 $\alpha$ -淀粉酶活性,加快了营养物质的水解与转化,从而促进了种子的萌发,具体模式如图7所示。外源赤霉素与弱酸对海草种子萌发的促进作用可能存在协同效应,因此,未来的研究需进一步探究赤霉素和弱酸对鳗草种子萌发和生理特性的协同影响。



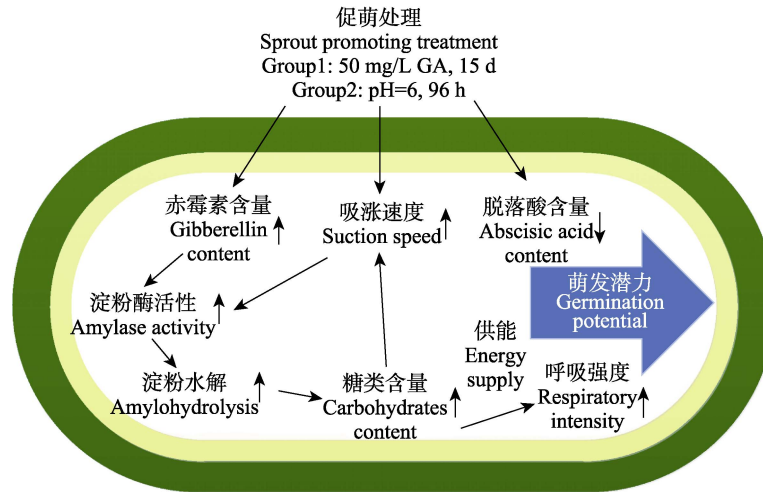


图7 促萌模式

Fig.7 Pattern of promoting germination

## 参 考 文 献

- CONACHER C A, POINER I R, BUTLER J, *et al.* Germination, storage and viability testing of seeds of *Zostera capricorni* Aschers from a tropical bay in Australia. *Aquatic Botany*, 1994, 49(1): 47–58
- GAO C Z, HE Y H, TIAN Y L, *et al.* Effect of different concentration of gibberellin on the seed germination of *Pinus sylvestris* var. Mongolicity. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science)*, 2012, 33(3): 67–72 [高春智, 何炎红, 田有亮, 等. 不同浓度赤霉素浸种对樟子松种子萌发的影响. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2012, 33(3): 67–72]
- HARRISON P G, DURANCE C. Variation in clonal structure in an eelgrass (*Zostera marina*) meadow on the Pacific coast of Canada. *Canadian Journal of Botany*, 1992, 70(3): 653–657
- JIANG Z, XU G, JING Y, *et al.* Phytochrome B and REVEILLE1/2-mediated signalling controls seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12377
- KAHN A E, DURAKO M J. The effect of salinity and ammonium on seed germination in *Ruppia maritima* from Florida Bay. *Bulletin of Marine Science*, 2005, 77: 453–458
- LEWIS M A, DANTIN D D, CHANCY C A, *et al.* Florida seagrass habitat evaluation: A comparative survey for chemical quality. *Environmental Pollution*, 2007, 146(1): 206–218
- LI F L, CHEN J C ZHAO Y J. Effects of gibberellin and light on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis*. *Plant Physiology Journal*, 2000, 26(2): 101–104 [李凤玲, 陈季楚, 赵毓橘. 赤霉素和光对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响. *植物生理学报*, 2000, 26(2): 101–104]
- LI H P, REN C W. Effect of GA seed soaking on germination physiological characteristics in buckwheat seeds. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2009, 37(2): 19–21 [李海平, 任彩文. 赤霉素浸种对苦荞种子萌发生理特性的影响. *山西农业科学*, 2009, 37(2): 19–21]
- LIU Y L, ZHANG X L. The effects of salinity on seed germination and seedling development of the seagrass, *Zostera marina* L. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 38(2): 104–111 [刘云龙, 张学雷. 盐度对大叶藻种子萌发和幼苗发育的影响. *海洋学报*, 2016, 38(2): 104–111]
- LIU Y Q, LUO Z M. A regulation role of gibberellin and abscisic acid on seed germination in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995(3): 267–271 [刘永庆, 罗泽民. 赤霉素和脱落酸对番茄种子发芽的生理调控——文献综述. *园艺学报*, 1995(3): 267–271]
- LIU Y S, ZHANG P D, GUO D, *et al.* Research progress in seagrass seed planting technology. *Fisheries Science*, 2014, 33(2): 127–132 [刘燕山, 张沛东, 郭栋, 等. 海草种子播种技术的研究进展. *水产科学*, 2014, 33(2): 127–132]
- LIU Z F, WEI Y X, ZOU J. *Spermatology*. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2016 [刘子凡, 魏云霞, 邹江. 种子学. 北京: 化学工业出版社, 2016]
- LOQUES F, CAYE G, MEINESZ A. Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan, French Mediterranean. *Aquatic Botany*, 1990, 38(2): 249–260
- LV Z, ZHU F, JIN D, *et al.* Seed germination and seedling growth of *Dendrocalumum brandisii* *in vitro*, and the inhibitory mechanism of colchicine. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 784581
- MARTINS I, NETO J M, FONTES M G, *et al.* Seasonal variation in short-term survival of *Zostera noltii* transplants in a declining meadow in Portugal. *Aquatic Botany*, 2005, 82(2): 132–142
- MORITA T, KAKINUMA M, MIZUNO G, *et al.* Morphological characteristics of annual *Zostera marina* shoots at various germination temperatures. *Aquatic Botany*, 2010, 92(1): 49–54
- ORTH R J, MARION S R, GRANGER S, *et al.* Evaluation of a

- mechanical seed planter for transplanting *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Aquatic Botany*, 2009, 90(2): 204–208
- PAN R C, LI N H, WANG X J. *Plant physiology*. Beijing: Higher Education Press, 2008 [潘瑞炽, 李娘辉, 王小菁. 植物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2008]
- SHORT F T, POLIDORO B, LIVINGSTONE S R, *et al.* Extinction risk assessment of the world's seagrass species. *Biological Conservation*, 2011, 144(7): 1961–1971
- SONG S Q, CHENG H Y, JIANG X C. *Seed biology*. Beijing: Science Press, 2008 [宋松泉, 程红焱, 姜孝成. 种子生物学. 北京: 科学出版社, 2008]
- STEINBACH H S, BENECH-ARNOLD R L, SANCHEZ R A. Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 149–154
- STEVENSON J C. Comparative ecology of submersed grass beds in freshwater, estuarine, and marine environments. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33: 867–893
- SUN T P, GUBLER F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 197–223
- TANG S Y, CUI N J, FENG Y C, *et al.* Effect of gibberellin concentration on seed germination of *Acer mono* Maxim. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(3): 555–559 [唐实玉, 崔宁洁, 冯云超, 等. 赤霉素浓度对色木槭(*Acer mono* Maxim)种子萌发的影响. 应用与环境生物学报, 2021, 27(3): 555–559]
- TIAN L, ZHANG P D, NIU S N, *et al.* Effects of different treatments on seed germination and seedling establishment of eelgrass *Zostera marina* L. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(9): 2408–2413 [田璐, 张沛东, 牛淑娜, 等. 不同处理对大叶藻种子萌发和幼苗建成的影响. 生态学杂志, 2014, 33(9): 2408–2413]
- TIAN L. Effects of three exogenous factors on *Zostera marina* seed germination. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014, 105 [田璐. 三种外源要素对大叶藻种子萌发的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 105]
- WANG L R, YU H B, LI C T, *et al.* Progress in marine ecosystem restoration. *Journal of Applied Oceanography*, 2018, 37(3): 435–446 [王丽荣, 于红兵, 李翠田, 等. 海洋生态系统修复研究进展. 应用海洋学学报, 2018, 37(3): 435–446]
- WEN X S, ZHANG Y Q, WANG Y M, *et al.* The effect of exogenous hormone treatment on *Schisandra* seed during stratification. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(2): 649–657 [文湘穗, 张誉芥, 王雨濛, 等. 外源激素处理对层积过程中北五味子种子生理生化的影响. 分子植物育种, 2023, 21(2): 649–657]
- WU Z J, CHEN S Q, CAI Z F, *et al.* Analysis of distribution change and restoration suggestion of the seagrass beds in Hainan Island. *Marine Environmental Science*, 2021, 40(4): 542–549 [吴钟解, 陈石泉, 蔡泽富, 等. 海南岛海草床分布变化及恢复建议. 海洋环境科学, 2021, 40(4): 542–549]
- XU S C. A study on seed ecology of the eelgrass *Zostera marina* L. in typical seagrass meadows in Shandong. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences), 2017 [徐少春. 山东沿海典型海草床鳗草种子生态学研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2017]
- YAN X N, ZHOU X, WANG F D, *et al.* Effect of three exogenous hormone on seed germination and physiological and chemical characteristics of *Pinus pumila*. *Journal of Temperate Forestry Research*, 2020, 3(4): 25–30, 51 [闫晓娜, 周鑫, 王福德, 等. 3种激素处理对偃松种子萌发及其生理生化的影响. 温带林业研究, 2020, 3(4): 25–30, 51]
- YANG M. *Seed production and management*. Hefei: Hefei University of Technology Press, 2013 [杨敏. 种子生产与管理. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2013]
- YANG S, ZHONG G H, TIAN F Y, *et al.* Effects of different chemical treatments on seed germination of sundew. *Seed*, 2013, 32(2): 76–77, 81 [杨爽, 钟国辉, 田发益, 等. 不同化学处理对茅膏菜种子萌发的影响. 种子, 2013, 32(2): 76–77, 81]
- ZHANG M, KANJANA N, LI R, *et al.* Environmental factors affecting seed germination of prairie grass (*Bromus willdenowii*) in Yunnan Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(12): 143–151 [张敏, Nipapan Kanjana, 李翎, 等. 环境因子对云南扁穗雀麦种子萌发和出苗的影响. 草业学报, 2021, 30(12): 143–151]
- ZHOU Y Y. Study on the protection and sustainable development of seagrass bed resources. *Territory and Natural Resources Study*, 2021(2): 68–71 [周媛媛. 海草床资源保护与可持续发展研究. 国土与自然资源研究, 2021(2): 68–71]
- ZHOU Y, XU S C, ZHANG X M, *et al.* Construction technology of seagrass bed habitats in marine ranching. *Science and Technology for Development*, 2020, 16(2): 199–205 [周毅, 徐少春, 张晓梅, 等. 海洋牧场海草床生境构建技术. 科技促进发展, 2020, 16(2): 199–205]



## Effects of Gibberellin and Weak Acid on Seed Germination and Physiological Characteristics of the Eelgrass *Zostera marina*

YU Bing, YANG Qiwen, ZHANG Yanhao, LI Hongchen, ZHANG Peidong<sup>①</sup>

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

**Abstract** The effects of gibberellin and weak acid on the germination and physiological characteristics of eelgrass (*Zostera marina*) seeds were studied under laboratory conditions. The cumulative seed germination and seedling establishment rates were calculated. The dynamic changes in seed dry weight, water content, respiration rate, soluble sugar, starch, gibberellin, abscisic acid content, and  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase activities during seed germination were monitored. The effect of two exogenous germination-promoting treatments on seed germination was explored, and the physiological response process of the seeds to these treatments was analyzed. The results showed that the treatments effectively promoted seed germination and seedling establishment. The gibberellin treatment had the best germination-promoting effect, and the seed germination and seedling establishment rates were 1.6 times higher than those under the control. During the germination period of seeds in the two treatments, the  $\alpha$ -amylase activity first increased and then decreased, the starch content showed a downward trend, and the soluble sugar content continued to increase. At the end of the experiment, the soluble sugar content of seeds in the gibberellin treatment attained the highest value, which was 3.3 times higher than the value before germination and was significantly higher than that in the weak acid treatment and control ( $P < 0.05$ ). The starch content of seeds in the weak acid treatment attained the lowest value, which was significantly lower than that in the other two treatments ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in  $\alpha$ -amylase activity among the treatments ( $P > 0.05$ ). Principal component analysis showed that  $\alpha$ -amylase activity and starch and soluble sugar contents of seeds were the key factors in seed germination. Comprehensive analysis showed that exogenous gibberellin treatment was an effective method to break seed dormancy. This effect was mainly achieved by regulating amylase activity, increasing starch decomposition rate, and increasing soluble sugar content to provide energy for seed germination. The results provide a theoretical and scientific basis for the rapid germination technology of eelgrass seeds.

**Key words** Gibberellin; Germination rate; Seed dormancy; Nutrients; *Zostera marina*

① Corresponding author: ZHANG Peidong, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230307002

http://www.yykxjz.cn/

李艳平, 张彦浩, 吴晓晓, 李文涛, 张沛东. 不同水体浊度对鳗草存活、生长和生理的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 35-44

LI Y P, ZHANG Y H, WU X X, LI W T, ZHANG P D. Effects of different water turbidity levels on the survival, growth and physiology of the eelgrass *Zostera marina*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 35-44

## 不同水体浊度对鳗草存活、生长和生理的影响\*

李艳平 张彦浩 吴晓晓 李文涛 张沛东<sup>①</sup>

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003)



**摘要** 海水浊度升高是导致海草床退化的主要因素之一。通过 3 个月的室内实验,研究了不同水体浊度[2(对照)、10、20、30 和 40 NTU]对鳗草存活、生长和生理的影响。结果显示,3 个月后,鳗草植株的存活率随水体浊度升高呈现逐渐降低趋势,10~40 NTU 处理组植株存活均显著低于对照组( $P<0.05$ ),至 40 NTU 处理组,植株存活率仅为对照组的 56.1%;随水体浊度升高,植株的生长速率和生产力亦呈现下降趋势,至 40 NTU 处理组,植株茎节延伸速率和叶片延伸速率达到最小值,分别下降至对照组的 48.9%和 61.6%,地上生产力和地下生产力与对照组相比下降了 64.6%和 78.8%;相关性分析表明,长期浊度胁迫主要是通过影响植株非结构性碳水化合物含量,进而对植株生长存活产生负面影响。植株非结构性碳水化合物含量随水体浊度增加而逐渐下降,10~40 NTU 处理组植株碳水化合物含量均显著低于对照组( $P<0.05$ ),各浊度升高处理组植株地上组织可溶性糖含量相对对照组降低了 20.2%~74.7%。研究表明,水体浊度长期升高导致鳗草植株非结构性碳水化合物显著下降,对鳗草的生长存活不利。本研究为阐明鳗草海草床退化机理和选划适宜修复区等提供了理论依据。

**关键词** 鳗草; 浊度; 存活; 生产力; 生长速率; 碳水化合物

**中图分类号** Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0035-10

海草床是近岸海域生产力极高的生态系统之一,具有水质净化、海岸保护、碳封存等重要的生态功能,还可为众多海洋生物提供复杂多样的栖息、产卵、育幼和避敌等场所(Jackson *et al*, 2001; Marbà *et al*, 2007; Barbier *et al*, 2011; Christianen *et al*, 2013; Momota *et al*, 2022)。然而,受自然环境变迁和人类活动的影响,全球海草床的分布面积迅速减少,自 1980 年以来,全球约 1/3 的海草床已退化消失,且消失速率已从 20 世纪 90 年代的 0.9%/yr 上升至 7%/yr(Waycott *et al*, 2009; Unsworth *et al*, 2019)。引起海草床衰退的因素主要包括台风、营养盐富集、水体浑浊度增加、

渔业捕捞和围垦造田等,而因水体浊度增加导致的透明度下降是海草床退化和消失的主要因素之一(Li *et al*, 2021)。例如,2009 年 7 月马来西亚东部老越海域发生浊度升高事件,水体浊度增加约 2.5 倍(浊度为 10 NTU),海域内以羽叶二药草(*Halodule pinifolia*)为主的海草床的平均覆盖率在 2 个月后大约下降 6%(Ahmad-Kamil *et al*, 2013)。

水体浊度增加的原因主要分为突发输入事件(如洪水、径流、降雨)和飓风、疏浚、拖网渔船作业及水产养殖等导致的沉积物再悬浮(Li *et al*, 2021)。水体浊度增加对沉水植物的负面影响往往是持续性的,短

\* 国家自然科学基金(42076100)和联合基金(NSFC-山东联合基金)(U2006214)共同资助。李艳平, E-mail: 2351867775@qq.com

<sup>①</sup> 通信作者: 张沛东, 教授, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

收稿日期: 2023-03-07, 收修改稿日期: 2023-04-07

则持续数小时,长则可达数月(Chartrand *et al.*, 2016)。相关研究发现,水体浊度升高对水生植物具有明显的消极影响(Samper-Villarreal *et al.*, 2016)。例如,李强等(2006)研究发现,30~90 NTU 水体浊度限制菹草(*Potamogeton crispus*)的生长,实验持续 23 d 时,植株株高和叶片数减少,90 NTU 条件下,水下 0.7 m 处光照强度仅为水面光照强度(63 000 lx)的 0.6%,菹草的株高和叶片数分别为对照组的 86.5%和 77.1%。Li 等(2021)研究了水体浊度(4、50、100、200、300 和 400 NTU)和浊度突变持续时间(5、10、15 和 20 d)对鳗草(*Zostera marina*)存活和生长的影响(水深 0.55 m),并对胁迫结束后的植株进行了 30 d 的恢复培育,发现浊度突变持续 15 d,50~200 NTU 浊度处理组鳗草的植株恢复努力(恢复结束时植株存活率与胁迫结束时植株存活率的比率)大于 60%,而 300~400 NTU 浊度植株恢复努力为 0,300 NTU 浊度水平下,持续时间 10 d 植株地上生产努力(恢复结束时植株地上生产力与胁迫结束时植株地上生产力的比率)是 5 d 的 66.7%。目前的研究主要集中于短周期水体浊度升高对沉水植物生长存活的影响,有关长周期水体浊度升高对海洋高等植物生长存活的影响及其生理响应过程的研究尚未见报道。

本研究以温带优势海草种类——鳗草为对象,通过 3 个月的室内实验,研究了不同水体浊度[2 (对照)、10、20、30 和 40 NTU]对鳗草存活和生长的影响,并探究了鳗草应对浊度长期胁迫的生理响应,以期为查明海草床的退化机理提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验鳗草植株于 2018 年 6 月采自山东省荣成市天鹅湖海域(37°21'N, 122°34'E)。采集期间,天鹅湖水体平均盐度为 30.2,平均浊度为 2 NTU。采集过程中,用手将鳗草植株从底部连根挖起,尽量保证植株根系完整,然后,将其用海水洗净,去除植株表面附着的泥沙、贝类和其他附生生物,运回马山集团有限公司育苗车间,置于 12 m × 1 m × 0.6 m 的循环水泥池暂养 7 d。暂养期间,保持自然水温(23±1) °C 和光照条件(1 847.14~17 200.31 lx)。

### 1.2 实验设计

以天鹅湖天然海草床的海水浊度(2 NTU)为对照组,浊度升高处理组则根据 Li 等(2021)的研究结论以及山东半岛成山角附近海域水体浊度(最高可达

40 NTU 以上)(王勇智等, 2014)等报道,分别设定为 10、20、30 和 40 NTU。每个处理组设置 12 个重复,实验进行 3 个月。水体浊度配制所用泥沙为天鹅湖岸边土,将泥沙与海水混匀,静置 5 min 后,使用网目规格为 100 μm 的筛绢过滤上层悬浊液,将滤液在 4 个循环水泥池(8 m × 1 m × 0.8 m)中用海水分别配制成浊度为 10、20、30 和 40 NTU 的实验水体。水体浊度采用上海昕瑞 WGZ-2 型浊度仪测定。

### 1.3 实验过程

**1.3.1 实验容器和基质** 使用 60 个聚乙烯盒(40 cm × 30 cm × 7 cm)作为移植容器,在聚乙烯盒中填充 8 cm 厚的基质。基质配比为 25%细砂(粒度 63~250 μm)与 75%粉土和黏土(粒度 < 63 μm)的混合土壤(Zhang *et al.*, 2015)。植株移植之前,先将装有基质的聚乙烯盒在海水中浸泡至少 48 h,之后将其取出,于室温下晾晒 2 h,以保证基质凝固,增加基质的固定性。

**1.3.2 植株预处理和移植** 从暂养在室内循环水槽的植株中选取 960 株健康、生长状况良好的鳗草植株作为实验植株,并对实验植株进行标准化处理,即株高 24~26 cm,叶片 4~5 片,茎节长 5 cm,并对其进行标记。在植株维管束顶端即分生组织上方 1 cm 处使用针孔标记法标记所有叶片(Short *et al.*, 2001),以进行植株生长速率测定。将标记植株随机平均分为 60 份,每份植株移植于 1 个聚乙烯盒中,移植时小心地将植株的根茎插入基质中约 5 cm,随后于每个循环水泥池内随机放置 12 个聚乙烯盒并开始实验。

**1.3.3 环境条件控制** 实验期间,海水盐度为 30.0±1.2,自然水温为 22.71~27.91 °C,光照条件为 1 847.14~17 200.31 lx,每天换自然海水 1/2。为维持水体浊度的长期稳定,每个循环水泥池底各放置 5 个功率为 200 W 的水泵,以 900 L/h 的交换速率进行水体循环,各循环水泥池配备冷水机以控制水温。各处理组水下光照和温度使用美国 Onset 公司的 HOBO 温度/光照记录仪以 15 min 间隔进行连续监测,实验持续 3 个月。各处理组使用美国 LI-Cor 公司的 LI-250 数据采集器和 LI-193SA 球形光量子传感器同步测定水下光照,拟合光照强度(Ix)和光合光量子通量密度[photosynthetic flux density, PFD, μmol/(m<sup>2</sup>·s)]之间的关系,将 HOBO 光照和温度数据采集器采集到的光照强度数据转换为 PFD,并计算出日 PFD [mol/(m<sup>2</sup>·d)]。根据 Beer-Lambert 表达式( $I_z = I_s \times e^{-K_d Z}$ , Z 为深度, I<sub>z</sub> 为 Z 深度处的辐照度, I<sub>s</sub> 为表面辐照度)计算不同浊度组的光照衰减系数(K<sub>d</sub>, m<sup>-1</sup>) (Ruiz *et al.*, 2003)。

## 1.4 样品采集与处理

**1.4.1 存活与生长指标** 实验结束,统计各处理组鳗草植株的存活情况,并计算存活率(SR, %)。各处理组随机选取4组重复,每组重复随机选取6株植株监测鳗草的株高( $H$ , cm)、新生的根长( $R$ , cm)、茎节直径( $I$ , mm)、单株叶面积(TLA,  $\text{cm}^2/\text{shoot}$ )、叶片延伸速率[LER,  $\text{cm}/(\text{shoot}\cdot\text{d})$ ]、茎节伸长速率[IER,  $\text{mm}/(\text{shoot}\cdot\text{d})$ ]、地上生产力[ADP,  $\text{mg}\cdot\text{DW}/(\text{shoot}\cdot\text{d})$ ]和地下生产力[BDP,  $\text{mg}\cdot\text{DW}/(\text{shoot}\cdot\text{d})$ ] (张沛东等, 2016; Xu *et al.*, 2019)。

### 1.4.2 生理指标

**1.4.2.1 光合色素** 各处理组中随机抽取4个重复组,每个重复中随机抽取1~2株植株,取植株第2片新叶 $2\text{ cm}^2$ 浸没于5 mL N, N-二甲基甲酰胺中,于黑暗条件下萃取3 d,采用萃取法测定叶片叶绿素  $a$  含量(Chl- $a$ ,  $\text{mg}/\text{cm}^2$ )和叶绿素  $b$  含量(Chl- $b$ ,  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) (王文杰等, 2009)。

**1.4.2.2 非结构性碳水化合物** 各处理组随机选取4个重复组,每个重复组随机选取1~2株植株,于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重,并对干样进行研磨,采用蒽酮法测定植株可溶性糖含量(SS,  $\text{mg}/\text{g}$ )和淀粉含量( $S$ ,  $\text{mg}/\text{g}$ ) (Lewis *et al.*, 2007)。

## 1.5 数据分析

对所有数据进行正态性和方差齐性检验,以满足参数统计假设。对鳗草植株各指标进行单因素方差分析(one-way ANOVA)检验不同水体浊度对鳗草的影响,使用Duncan多重比较分析组间差异,结

果使用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,显著性水平设置为 $P<0.05$ 。数据统计分析和曲线拟合使用SPSS 25.0软件进行,分析结果使用OriginLab 2023、R语言进行绘图。采用R语言ggplot2包对各处理组鳗草植株的存活和生长指标进行主成分分析(principal component analysis, PCA),以揭示鳗草植株生长与存活之间的关系并进行降维。采用R语言Corrplot包对鳗草植株存活率、生产力、可溶性糖和叶绿素等指标进行Spearman相关性分析,揭示生长、存活和生理之间的潜在相关性。

## 2 结果

### 2.1 水温和光合光子通量密度(PFD)

实验期间,水温范围为 $22.7\sim 27.9\text{ }^\circ\text{C}$ ,各处理组间无显著差异( $P>0.05$ )。不同处理组水体PFD存在显著不同( $P<0.05$ ),呈现随水体浊度增加,水体PFD减弱的趋势;40 NTU处理组的平均PFD为 $5.8\text{ mol}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ ,与对照组相比降低了40.3%(图1)。光照衰减系数 $K_d$ 值范围为 $0.62\sim 1.19\text{ m}^{-1}$ ,随水体浊度增加, $K_d$ 值持续增大,曲线拟合显示, $K_d$ 和浊度(Tur.)呈现显著的线性关系( $P<0.05$ )(图2)。

### 2.2 存活率

鳗草植株存活率随水体浊度增加呈现逐渐降低的趋势,至40 NTU处理组,植株存活率为44.4%,仅为对照组的56.1%(图3)。单因素方差分析显示,各处理组之间存在显著差异,浊度升高处理组鳗草存活率均显著低于对照组( $P<0.05$ )。

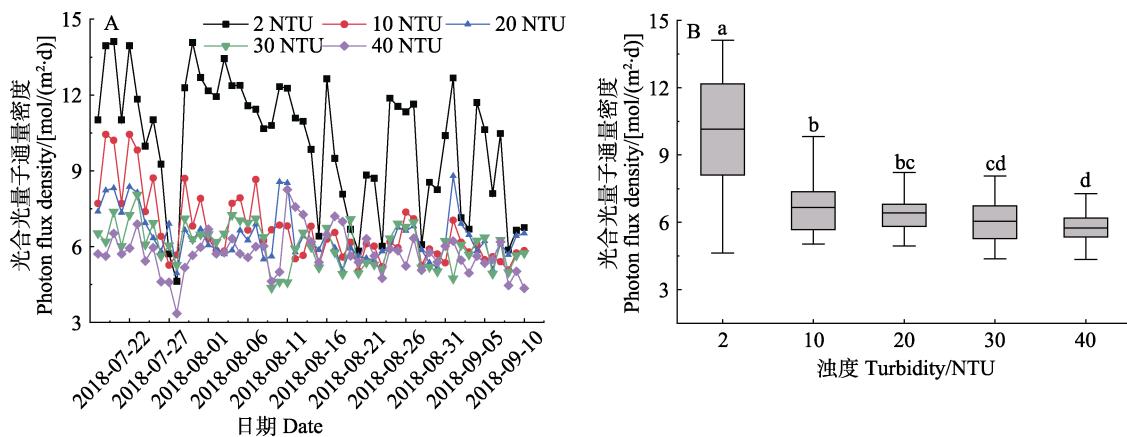


图1 实验期间各处理组水下光合光子通量密度的变化(A)和比较(B)

Fig.1 The change (A) and comparison (B) of underwater photon flux density in each treatment during the experiment

不同字母代表组间差异显著, Duncan test,  $P<0.05$ 。下同。

Different letters represent significant differences among treatments, Duncan test,  $P<0.05$ . The same as below.

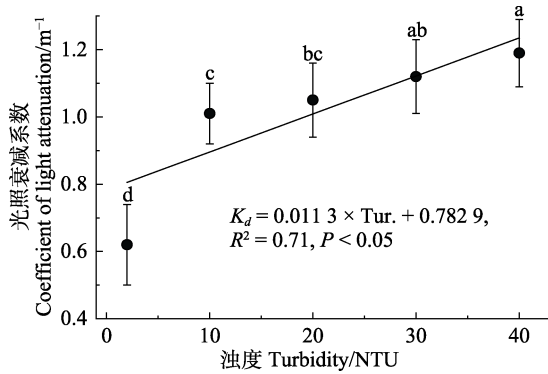


图2 不同水体浊度水平光照衰减系数的变化  
Fig.2 The change of coefficient of light attenuation under different turbidity levels

### 2.3 生长

单因素方差分析结果显示, 10~40 NTU 处理组鳗草植株的各项生长指标均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。水体浊度升高对植株的根长、单株叶面积和茎节延伸速率影响最显著, 其中, 30 和 40 NTU 处理组植株均未见新生根, 40 NTU 处理组植株的单株叶面

积和茎节延伸速率均不足对照组的 50%。水体浊度升高对植株的株高、茎节直径和叶片延伸速率亦有显著影响, 40 NTU 处理组植株 3 项指标分别是对照组的 75.5%、74.1%和 61.6%。鳗草的植株生产力随水体浊度增加呈显著降低趋势, 至 40 NTU 处理组, 植株地上和地下生产力与对照组相比下降 64.6%和 78.8%。

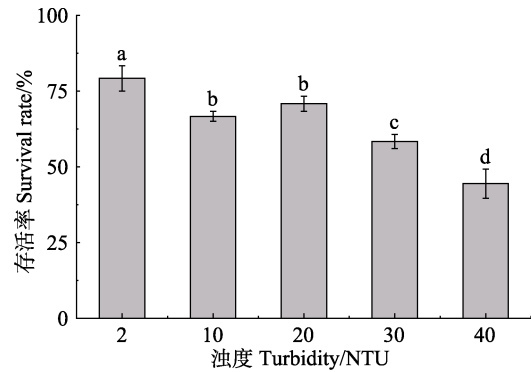


图3 不同水体浊度水平下鳗草植株存活率的变化  
Fig.3 The change of survival rate of *Z. marina* under different turbidity levels

表 1 不同浊度水平下鳗草生长指标的变化

Tab.1 The changes of growth indices of *Z. marina* under different turbidity levels

生长指标 Growth indices	2 NTU	10 NTU	20 NTU	30 NTU	40 NTU
株高 Shoot height/cm	27.73±2.25 <sup>a</sup>	23.10±0.10 <sup>b</sup>	23.90±0.79 <sup>b</sup>	23.15±0.47 <sup>b</sup>	20.93±3.46 <sup>b</sup>
根长 Root length /cm	24.73±2.21 <sup>a</sup>	12.00±1.78 <sup>b</sup>	8.85±1.05 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
茎节直径 Internode diameter /mm	2.74±0.14 <sup>a</sup>	2.43±0.03 <sup>b</sup>	2.49±0.09 <sup>b</sup>	2.20±0.12 <sup>c</sup>	2.03±0.12 <sup>d</sup>
单株叶面积 Total leaf area /(cm <sup>2</sup> /shoot)	16.56±1.07 <sup>a</sup>	11.76±0.83 <sup>b</sup>	12.22±0.67 <sup>b</sup>	8.50±1.57 <sup>c</sup>	7.58±0.73 <sup>c</sup>
茎节延伸速率 Internode elongation rate [mm/(shoot·d)]	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.31±0.02 <sup>b</sup>	0.32±0.03 <sup>b</sup>	0.29±0.01 <sup>b</sup>	0.22±0.03 <sup>c</sup>
叶片延伸速率 Leaf elongation rate [mm/(shoot·d)]	1.51±0.14 <sup>a</sup>	1.25±0.10 <sup>b</sup>	1.30±0.07 <sup>b</sup>	0.97±0.13 <sup>c</sup>	0.93±0.26 <sup>c</sup>
地上生产力 Aboveground productivity [mg·DW/(shoot·d)]	3.05±0.26 <sup>a</sup>	2.08±0.18 <sup>b</sup>	2.04±0.09 <sup>b</sup>	1.25±0.18 <sup>c</sup>	1.08±0.15 <sup>c</sup>
地下生产力 Belowground productivity [mg·DW/(shoot·d)]	0.99±0.08 <sup>a</sup>	0.61±0.05 <sup>b</sup>	0.66±0.11 <sup>b</sup>	0.34±0.06 <sup>c</sup>	0.21±0.13 <sup>c</sup>

注: 同行不同字母表示不同处理组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same row indicate significant differences within the treatments ( $P < 0.05$ ).

### 2.4 生理指标

**2.4.1 光合色素** 单因素方差分析结果显示, 10 和 20 NTU 处理组植株的叶绿素含量与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而 30 和 40 NTU 处理组植株的光合色素含量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。其中, 30 和 40 NTU 处理组植株 Chl-*a* 含量平均是对照组的 1.24 倍, Chl-*b* 含量则平均是对照组的 1.27 倍。

**2.4.2 非结构性碳水化合物** 实验发现, 植株组织可溶性糖和淀粉含量随浊度增加基本呈逐渐降低的变化趋势 (图 5)。单因素方差分析结果显示, 各浊度升高处理组的鳗草组织可溶性糖和淀粉含量均显著

低于对照组 ( $P < 0.05$ )。10~40 NTU 浊度组植株地上组织可溶性糖含量与对照组相比降低了 20.2%~74.7%, 植株地下组织可溶性糖含量分别为对照组的 77.3%~62.3%。30 NTU 浊度水平下, 植株地上组织淀粉含量最低, 与对照组相比下降了 38.1%。至 40 NTU 处理组, 植株地下组织淀粉含量为对照组的 60.2%。

### 2.5 植株存活和生长指标的主成分分析

对不同浊度水平之间鳗草植株的存活和生长指标进行主成分分析 (图 6)。第 1 排序轴和第 2 排序轴对植株各指标的累计解释率达 91.4%。除株高外, 其他指标在第 1 排序轴附近聚成一簇, 呈较强相关性,



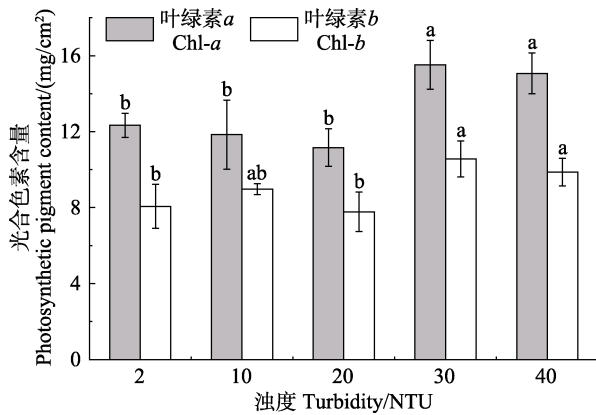


图 4 不同浊度水平下鳗草光合色素含量的变化  
Fig.4 The changes of photosynthetic pigment contents of *Z. marina* under different turbidity levels

且相关性随矢量夹角的增加而降低。植株的株高  $H$  的贡献最大, 其后依次是叶片延伸速率  $LER$ 、地下生产力  $ADP$  和地上生产力  $BDP$ 。将 9 个指标的射线延长, 5 个处理组均垂直投射到射线上, 根据投影点到

射线实心箭头处的相对距离为标准进行排序, 综合结果为 2 NTU(对照) > 10 NTU > 20 NTU > 30 NTU > 40 NTU, 40 NTU 浊度条件下, 植株的存活率和生长指标均低于其他浊度处理组。

## 2.6 鳗草生态学指标和生理指标的相关性分析

选取 SR 以及解释量较大的生长指标  $H$ 、 $LER$ 、 $ADP$ 、 $BDP$  和生理指标进行相关性分析(图 7)。如图 7 所示, 植株的生态学指标与生理指标之间存在较强的相关性。植株存活率与地上组织可溶性糖含量呈极显著正相关关系( $\rho=0.87, P<0.01$ ), 植株生产力则与可溶性糖含量呈极显著的正相关( $P<0.01$ ); 植株 Chl-a、Chl-b 含量与植株的生长、存活间存在较强负相关性。因此, 水体浊度增加主要是通过影响植株非结构性碳水化合物, 进而对植株存活和生长造成负面影响。为适应高水体浊度下水体光照强度的降低, 植株的光合色素含量升高, 提高了植株的光合效率, 以应对水体光照强度的降低。

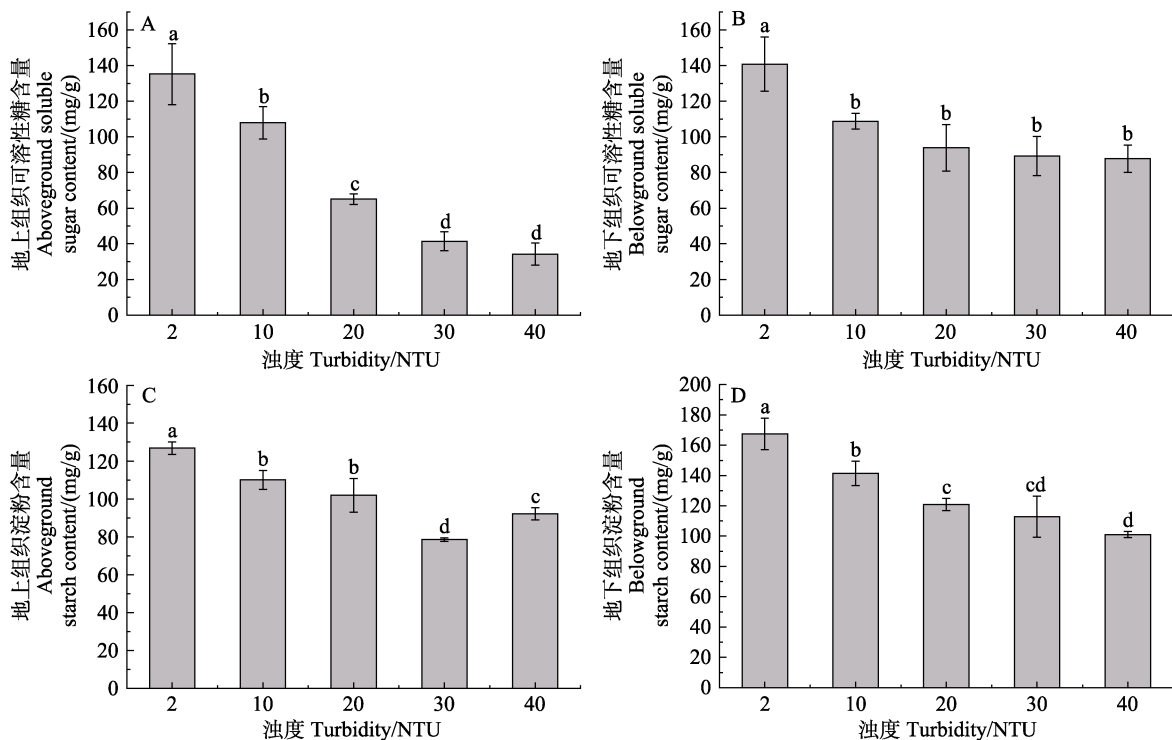


图 5 不同浊度水平下鳗草非结构性碳水化合物含量的变化  
Fig.5 The changes of non-structural carbohydrates content of *Z. marina* under different turbidity levels

## 3 讨论

### 3.1 水体浊度增加对海草生长存活的影响

长期水体浊度升高可导致海草床的急剧衰退。York 等(2015)研究发现, 澳大利亚昆士兰因波特港口

于 2006 年开展了 8 个月的疏浚活动, 造成了大量持续的浑浊水流[日总辐照度 <math>0.5 \text{ mol}/(\text{m}\cdot\text{d})</math>], 导致该区域的毛叶喜盐草(*Halophila decipiens*)和棘状喜盐草(*Halophila spinulosa*)在疏浚期间无法建植, 且疏浚结束 8 个月前海草的平均生物量仅为疏浚前的 1%, 于



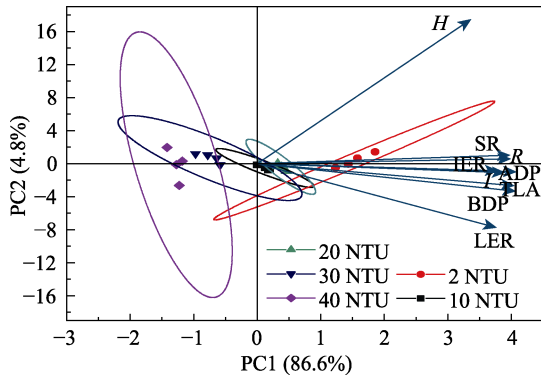


图6 鳗草存活和生长指标的主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of survival and growth indices of *Z. marina*

H: 株高; R: 根长; I: 茎节直径; TL: 单株叶面积;  
IER: 茎节延伸速率; LER: 叶片延伸速率;  
ADP: 地上生产力; BDP: 地下生产力; SR: 存活率。  
H: Shoot height; R: Root length; I: Internode diameter; TL: Total leaf area; IER: Internode elongation rate; LER: Leaf elongation rate; ADP: Aboveground productivity; BDP: Belowground productivity; SR: Survival rate.

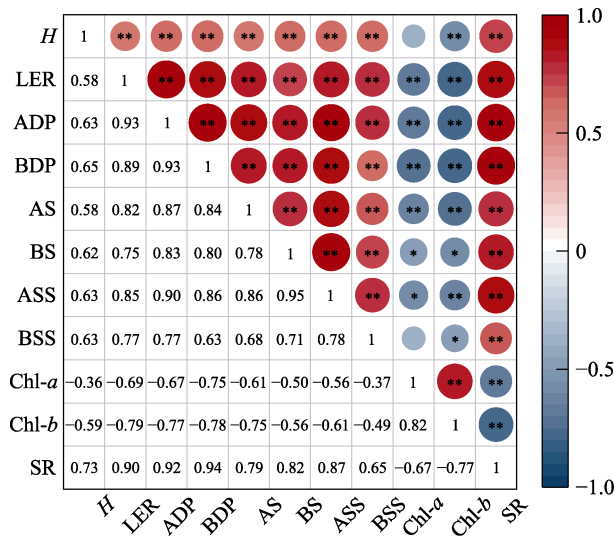


图7 鳗草生态学指标和生理指标的相关性分析

Fig.7 Correlation analysis between ecological indicators and physiological indices of *Z. marina*.

H: 株高; LER: 叶片延伸速率; ADP: 地上生产力;  
BDP: 地下生产力; AS: 地上组织淀粉; BS: 地下组织淀粉;  
ASS: 地上组织可溶性糖; BSS: 地下组织可溶性糖;  
Chl-a: 叶绿素 a; Chl-b: 叶绿素 b; SR: 存活率。

\*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ 。

H: Shoot height; LER: Leaf elongation rate; ADP: Aboveground productivity; BDP: Belowground productivity; AS: Aboveground starch; BS: Belowground starch; ASS: Aboveground soluble sugar; BSS: Belowground soluble sugar; Chl-a: Chlorophyll a; Chl-b: Chlorophyll b; SR: Survival rate; \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ .

2012年10月恢复至疏浚前生物量峰值的12%。研究表明,水体浊度长时间升高严重限制了鳗草植株的存活和生长,当水体浊度持续3个月为40 NTU时,鳗草植株的存活率与对照组相比显著降低43.9%,叶片延伸速率和地上生产力则分别显著降低38.4%和64.6%。Bulmer等(2018)分析了水体浊度对新西兰凯帕拉湾3个海区的牟氏鳗草(*Zostera muelleri*)生长状况的影响,结果发现,牟氏鳗草的总生物量在Mairetahi Creek(水体浊度为41 g/m<sup>3</sup>)最低,为2.14 g/core,分别是Kakaria Flats(浊度为25 g/m<sup>3</sup>)和Tapor Bank(浊度为12 g/m<sup>3</sup>)的76.4%和57.8%。Li等(2021)研究发现,在200 NTU浊度水平下,持续时间为20 d时,鳗草的植株生产努力与持续时间为5 d时相比下降约28%,300 NTU浊度水平下植株的半致死时间(死亡率增加至对照组死亡率的50%的持续时间)为50 NTU浊度组的1/2左右。在一些淡水沉水植物的相关研究中也类似发现,王晋等(2015)研究发现,水体浊度30 NTU(水深0.65 m)持续20 d菹草的植株高度显著降低至对照组的78%,持续至33 d时,植株大量死亡,叶片数降低至对照组的73%。综上,水体浊度升高对水生植物(包括海草)的生长发育具有一定限制作用,且随着浊度持续时间的增加抑制作用愈发明显。

水体浊度增加导致海水悬浮颗粒物水平增加,造成水下辐照度降低,从而导致海草的存活和生长受到限制(Vermaat *et al*, 1997)。一般而言,浊度升高导致的光照降低和叶片泥沙附着增加对海草生长存活的双重负面影响,更容易致使植株死亡。大量研究表明,光照是限制海草生长存活的关键因子(牛淑娜等, 2011),维持海草正常生长存活的表面辐照度通常需要大于11% (Ochieng *et al*, 2010; 符妙等, 2022a)。Bertelli等(2018)研究模拟了表面辐照度降低对鳗草生长的影响,发现40%和90%遮光条件下[冠层 PFD 分别为0.73和0.35 mol/(m<sup>2</sup>·d)]持续29 d时,鳗草叶片表面积与对照组相比分别降低了41.5%和44.0%。符妙等(2022b)在黎安港对海菖蒲(*Enhalus acoroides*)进行原位遮光实验,发现海菖蒲生物量随光照减弱而降低,其中,60%和90%遮光处理下,海菖蒲的地上组织生物量分别是全光照组的69%和56%。Li等(2021)研究也发现,浑浊水体中植株叶片上的泥沙负荷增加会降低海草的光可利用性。Bryars等(2004)调查发现,南澳大利亚阿德莱德港污水处理厂运行了15年的污泥排放口致使周边365 hm<sup>2</sup>区域的波状波喜荡海草(*Posidonia sinuosa*)、南极根枝草(*Amphibolis antarctica*)和塔斯鳗草(*Zostera tasmanica*)完全丧失。

Lambert 等(2021)调查研究了澳大利亚伯德金河河口沉积物再悬浮对海草生态特征的影响,发现悬浮颗粒物负荷与植株密度呈显著负相关,2011—2012年悬浮颗粒物强度达到20~30 Mt (1 Mt =10<sup>3</sup> kg),致使海草床面积一年内下降近50%。综上,导致鳗草植株存活率下降、植株生长速率降低、生产力下降的因素可能是水体浊度升高引起的叶片泥沙负荷增加和 underwater 光照减弱。

### 3.2 海草对水体浊度升高的生理响应

光合色素是植物进行光合作用不可或缺的物质,植物组织中储存的非结构性碳水化合物是光合作用的产物,在植物生命代谢过程发挥重要作用(江志坚等,2012)。本研究结果显示,随水体浊度增加,鳗草植株的非结构性碳水化合物(可溶性糖和淀粉)含量显著下降,叶绿素含量增加;当水体浊度升高至40 NTU时,植株地上组织可溶性糖含量下降为对照组的25.3%,叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 含量则为对照组的1.2倍。

随着水体浊度升高,水体透光率降低,水下形成弱光照环境。另外,光质也随之发生变化,蓝光的吸收增加,海草叶片用于吸收蓝光的叶绿素 *b* 含量也相对于叶绿素 *a* 增加(符妙等,2022b)。Longstaff 等(1999)发现,遮光(冠层光照强度为0 lx)78 d,羽叶二药草(*Halodule pinifolia*)叶片 Chl-*a*/Chl-*b* 下降至遮光前的86%,总 Chl 含量相比遮光前增加52%。海草叶片 Chl 含量增加、Chl-*a* 和 Chl-*b* 含量比值降低是应对水体浊度升高(或水体透明度降低)的一种适应性反应(Longstaff *et al*, 1999)。为适应高浊度环境,植株叶片光合色素含量升高以生产更多的有机物质,平衡呼吸消耗的能量进行光补偿(Longstaff *et al*, 1999)。然而,在过高的浊度环境,光合效率降低,组织非结构性碳水化合物的消耗超过光合作用的净生产量,严重限制了植株的生长和存活(Durako, 1993; 丰玉等, 2018)。

水体浊度升高影响的是光照通透性,透光率降低,植株的光可利用性下降。在西班牙东南部黎凡特湾,高浊度的内港光可用性为表面辐照度(Surface irradiance, SI)的21.9%~24.6%,而低浊度的外港约为SI的30%(Ruiz *et al*, 2003)。弱光环境下,植株的光合作用受限制,海草光合作用产物不足以维持正常生长所需,组织中储存的非结构性碳水化合物作为能源被过量消耗(Alcoverro *et al*, 2001; Ruiz *et al*, 2003; Ralph *et al*, 2007; Eklof *et al*, 2009)。Longstaff 等(1999)研究发现,遮光前羽叶二药草叶片 <sup>13</sup>C 同位素比值为-9%,而在遮光(冠层光照强度为0 lx)38和78 d时分别降至-9.5%和-10.5%。Silva 等(2013)研究发现,处

于24% [PFD=19.7 mol/(m<sup>2</sup>·d)]、40% [PFD=15.6 mol/(m<sup>2</sup>·d)]和75% [PFD=6.5 mol/(m<sup>2</sup>·d)]光衰减环境(水深3 m)3周后,鳗草叶片和根茎的可溶性糖含量显著低于天然光照组[PFD=25.9 mol/(m<sup>2</sup>·d)],其中,根茎可溶糖含量相比对照组降低了70%~85%。Collier 等(2008)研究发现,在3~4 m水深、遮光条件[冠层 PFD 为0.6 mol/(m<sup>2</sup>·d)]下,波状波喜荡草地下组织可溶性糖与对照组相比下降了32%~52%。Ruiz 等(2003)研究发现,西班牙黎凡特湾港口高浊度区[光照衰减系数  $K_d$  为0.205 m<sup>-1</sup>,冠层 PFD 为6.67 mol/(m<sup>2</sup>·d)]大洋波喜荡草(*Posidonia oceanica*)植株根茎淀粉含量是中浊度区[ $K_d=0.184$  m<sup>-1</sup>,冠层 PFD 为7.72 mol/(m<sup>2</sup>·d)]和低浊度区[ $K_d=0.131$  m<sup>-1</sup>,冠层 PFD 为9.28 mol/(m<sup>2</sup>·d)]的57%和64%。综上所述,植株叶绿素含量增加、非结构性碳水化合物含量下降可能是海草应对水体浊度升高导致的水体透光率降低、植株光可利用性下降的重要生理响应过程。

## 4 结论

水体浊度增加对沉水植物的负面影响往往是持续性的,导致的光照降低和叶片泥沙附着对海草生长存活的双重负面影响,更易致植株死亡。本研究以温带优势海草种类——鳗草为对象,探究了不同水体浊度对鳗草存活和生长的影响,分析了鳗草应对浊度长期胁迫的生理响应。实验结束时,10~40 NTU 浊度组植株的存活率较对照组降低了15.8%~43.9%,30~40 NTU 浊度组无新生根且其地上和地下生产力均低于对照组的50%;10~40 NTU 浊度组植株地上组织可溶性糖含量与对照组相比降低了20.2%~74.7%,而植株叶绿素含量随水体浊度的升高而升高,其中,30和40 NTU 处理组植株 Chl-*a* 和 Chl-*b* 含量平均分别为对照组的1.24和1.27倍。研究表明,水体浊度长时间增加能抑制鳗草植株的存活和生长扩繁,其主要通过影响植株非结构性碳水化合物,进而对鳗草的存活和生长造成负面影响,同时,鳗草植株通过增加光合色素含量,进而提高光合效率以应对高水体浊度条件下水下光照强度的降低。研究结果为阐明海草床的退化机理及选择适宜的修复区等提供了基础数据。

## 参 考 文 献

- AHMAD-KAMIL E I, RAMLI R, IAAMAN S A, *et al*. The effects of water parameters on monthly seagrass percentage cover in Lawas, East Malaysia. *Scientific World Journal*, 2013, 2013: 892746

- ALCOVERRO T, MANZANERA M, ROMERO J. Annual metabolic carbon balance of the seagrass *Posidonia oceanica*: The importance of carbohydrate reserves. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 211: 105–116
- BARBIER E B, HACKER S D, KENNEDY C, *et al.* The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 2011, 81(2): 169–193
- BERTELLI C M, UNSWORTH R K F. Light stress responses by the eelgrass, *Zostera marina* (L). *Frontiers in Environmental Science*, 2018, 6: 39
- BRYARS S, NEVERAUSKAS V. Natural recolonisation of seagrasses at a disused sewage sludge outfall. *Aquatic Botany*, 2004, 80(4): 283–289
- BULMER R H, TOWNSEND M, DRYLIE T, *et al.* Elevated turbidity and the nutrient removal capacity of seagrass. *Frontiers in Marine Science*, 2018, 5: 462
- CHARTRAND K M, BRYANT C V, CARTER A B, *et al.* Light Thresholds to prevent dredging impacts on the Great Barrier Reef seagrass, *Zostera muelleri* ssp. *capricorni*. *Frontiers in Marine Science*, 2016, 3: 106
- CHRISTIANEN M J A, Van BELZEN J, HERMAN P M J, *et al.* Low-canopy seagrass beds still provide important coastal protection services. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62413
- COLLIER C J, LAVERY P S, RALPH P J, *et al.* Shade-induced response and recovery of the seagrass *Posidonia sinuosa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 370(1/2): 89–103
- DURAKO M J. Photosynthetic utilization of  $\text{CO}_{2(\text{aq})}$  and  $\text{HCO}_3^-$  in *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Biology*, 1993, 115(3): 373–380
- EKLOF J S, MCMAHON K, LAVERY P S. Effects of multiple disturbances in seagrass meadows: Shading decreases resilience to grazing. *Marine and Freshwater Research*, 2009, 60(12): 1317–1327
- FENG Y, JIANG X L, LIN H Y, *et al.* Photosynthetic response of *Zostera japonica* during environmental stress in the Yellow River Estuary. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 2018, 54(1): 25–31 [丰玉, 蒋湘丽, 林海英, 等. 黄河口日本鳗草(*Zostera japonica*)在环境胁迫下的光合响应研究. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 54(1): 25–31]
- FU M, DENG N, LIAO L G, *et al.* Effects of shading on morphological characteristics and element content of *Enhalus acoroides*. *Journal of Tropical Biology*, 2022a, 13(3): 212–219 [符妙, 邓娜, 廖立国, 等. 遮光对海菖蒲形态特征及元素含量的影响. *热带生物学报*, 2022a, 13(3): 212–219]
- FU M, LIAO L G, LIU Y S, *et al.* Research progress on the effect of light reduction on seagrass. *Marine Fisheries*, 2022b, 44(5): 648–656 [符妙, 廖立国, 刘应帅, 等. 光照减少对海草的影响研究进展. *海洋渔业*, 2022b, 44(4): 648–656]
- JACKSON E L, ROWDEN A A, ATTRILL M J, *et al.* The importance of seagrass beds as a habitat for fishery species. *Oceanography and Marine Biology*, 2001, 39: 269–304
- JIANG Z J, HUANG X P, ZHANG J P. Effect of environment stress on non-structural carbohydrates reserves and transfer in seagrasses. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(19): 6242–6250 [江志坚, 黄小平, 张景平. 环境胁迫对海草非结构性碳水化合物储存和转移的影响. *生态学报*, 2012, 32(19): 6242–6250]
- LAMBERT V, BAINBRIDGE Z T, COLLIER C, *et al.* Connecting targets for catchment sediment loads to ecological outcomes for seagrass using multiple lines of evidence. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 169(6): 112494
- LEWIS M A, DANTIN D D, CHANCY C A, *et al.* Florida seagrass habitat evaluation: A comparative survey for chemical quality. *Environmental Pollution*, 2007, 146(1): 206–218
- LI C, ZHANG Y H, WU X X, *et al.* Changes in survival and growth in response to different combinations of turbidity and duration in eelgrass *Zostera marina* plants. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2021, 249: 107108
- LI Q, WANG G X, PAN G Q, *et al.* Influence of water turbidity on germination of *Potamogeton crispus* and growth of germinated seedling. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(11): 3594–3601 [李强, 王国祥, 潘国权, 等. 水体浊度对菹草萌发及萌发苗光合荧光特性的影响. *生态学报*, 2006, 26(11): 3594–3601]
- LONGSTAFF B J, DENNISON W C. Seagrass survival during pulsed turbidity events: The effects of light deprivation on the seagrasses *Halodule pinifolia* and *Halophila ovalis*. *Aquatic Botany*, 1999, 65(1/2/3/4): 105–121
- MARBÀ N, HOLMER M, GACIA E, *et al.* Seagrass beds and coastal biogeochemistry. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, 2007, 135–157
- MOMOTA K, HOSOKAWA S, KOMURO T. Small-scale heterogeneity of fish diversity evaluated by environmental DNA analysis in eelgrass beds. *Marine Ecology Progress Series*, 2022, 688: 99–112
- NIU S N, ZHANG P D, ZHANG X M. Research progress in the effect of light intensity on the growth and photosynthesis of submerged aquatic vegetation. *Modern Fisheries Information*, 2011, 26(11): 9–12 [牛淑娜, 张沛东, 张秀梅. 光照强度对沉水植物生长和光合作用影响的研究进展. *现代渔业信息*, 2011, 26(11): 9–12]
- OCHIENG C A, SHORT F T, WALKER D I. Photosynthetic and morphological responses of eelgrass (*Zostera marina* L.) to a gradient of light conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 382(2): 117–124
- RALPH P J, DURAKO M J, ENRÍQUEZ S, *et al.* Impact of light limitation on seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 350(1/2): 176–193
- RUIZ J M, ROMERO J. Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure, growth dynamics and photosynthesis of the seagrass *Posidonia oceanica*.

- Marine Pollution Bulletin, 2003, 46(12): 1523–1533
- SAMPER-VILLARREAL J, LOVELOCK C E, SAUNDERS M I, *et al.* Organic carbon in seagrass sediments is influenced by seagrass canopy complexity, turbidity, wave height, and water depth. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(3): 938–952
- SHORT F T, DUARTE C M. Methods for the measurement of seagrass growth and production. *Global Seagrass Research Methods*, 2001, 155–182
- SILVA J, BARROTE I, COSTA M M, *et al.* Physiological responses of *Zostera marina* and *Cymodocea nodosa* to light-limitation stress. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81058
- UNSWORTH R K F, MTWANA NORDLUND L M, CULLEN-UNSWORTH L C. Seagrass meadows support global fisheries production. *Conservation Letters*, 2019, 12(1): e12566
- VERMAAT J E, AGAWIN N S R, FORTES M D, *et al.* The capacity of seagrasses to survive increased turbidity and siltation: The significance of growth form and light use. *Ambio*, 1997, 26(8): 499–504
- WANG J, LIN C, ZHANG Y M, *et al.* Impact of water turbidity on growth of submerged plant *Potamogeton crispus*. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2015, 31(3): 353–358 [王晋, 林超, 张毅敏, 等. 水体浊度对沉水植物菹草生长的影响. *生态与农村环境学报*, 2015, 31(3): 353–358]
- WANG W J, HE H S, GUAN Y, *et al.* Methodological comparison of chlorophyll and carotenoids contents of plant species measured by DMSO and acetone-extraction methods. *Bulletin of Botanical Research*, 2009, 29(2): 224–229 [王文杰, 贺海升, 关宇, 等. 丙酮和二甲基亚砷法测定植物叶绿素和类胡萝卜素的方法学比较. *植物研究*, 2009, 29(2): 224–229]
- WANG Y Z, JU X, QIAO L L, *et al.* Water turbidity in the northern Yellow Sea in summer and winter. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 928–937 [王勇智, 鞠霞, 乔璐璐, 等. 夏冬季北黄海水体浊度分布特征研究. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 928–937]
- WAYCOTT M, DUARTE C M, CARRUTHERS T J B, *et al.* Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(30): 12377–12381
- XU J G, ZHANG Q, LI H C, *et al.* Changes in survival, growth and photosynthetic pigment in response to iron increase in the leaf and root-rhizome tissues of eelgrass *Zostera marina*. *Aquatic Botany*, 2019, 154: 60–65
- YORK P H, CARTER A B, CHARTRAND K, *et al.* Dynamics of a deep-water seagrass population on the Great Barrier Reef: Annual occurrence and response to a major dredging program. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 13167
- ZHANG P D, WU X X, XU Q, *et al.* Studies on promotion of exogenous auxin to *Zostera marina* growth. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(11): 99–107 [张沛东, 吴晓晓, 徐强, 等. 外源植物生长素对鳗草植株促生长作用的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(11): 99–107]
- ZHANG Q, LIU J, ZHANG P D, *et al.* Effect of silt and clay percentage in sediment on the survival and growth of eelgrass *Zostera marina*: Transplantation experiment in Swan Lake on the eastern coast of Shandong Peninsula, China. *Aquatic Botany*, 2015, 122: 15–19

(编辑 马瑾艳)

## Effects of Different Water Turbidity Levels on the Survival, Growth and Physiology of the Eelgrass *Zostera marina*

LI Yanping, ZHANG Yanhao, WU Xiaoxiao, LI Wentao, ZHANG Peidong<sup>①</sup>

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

**Abstract** An increase in water turbidity is one of the main factors underlying seagrass meadow degradation. The effect of different water turbidity levels [2 (control), 10, 20, 30, and 40 NTU] on the survival, growth and physiology of eelgrass (*Zostera marina*) was studied through a 3-month indoor experiment. The results showed that the survival rate of eelgrass decreased gradually with an increase of water turbidity, and the survival rate under 10–40 NTU conditions was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). In particular, the survival rate of eelgrass exposed to 40 NTU was only 56.1% that of the control group. With an increase of water turbidity, the growth rate and productivity of eelgrass also showed a decreasing trend. In the 40 NTU treatment group, the internode elongation rate and leaf elongation rate of eelgrass reached minimum values, which decreased to 48.9% and 61.6% of that of the control group, respectively. Compared to the productivity of the control group, aboveground and underground productivity decreased by 64.6% and 78.8%, respectively. Correlation analysis showed that the increase of water turbidity mainly affected the growth and survival of eelgrass by affecting the content of nonstructural carbohydrates. The content of nonstructural carbohydrates in eelgrass decreased gradually with an increase of water turbidity, and the content of carbohydrates in plants exposed to 10–40 NTU was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The aboveground soluble sugar content in eelgrass exposed to 10–40 NTU was 20.2%–74.7% lower than that in the control group. The results showed that a long-term increase of water turbidity led to a significant decrease in the nonstructural carbohydrates of eelgrass, which was not conducive to its growth and survival. The results provide a theoretical basis for clarifying the degradation mechanism of *Z. marina* seagrass meadows and selecting suitable restoration areas.

**Key words** *Zostera marina*; Turbidity; Survival; Productivity; Growth rate; Carbohydrate

<sup>①</sup> Corresponding author: ZHANG Peidong, E-mail: zhangpdsg@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220324001

http://www.yykxjz.cn/

徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 周鹤庭, 柳学周, 刘新富. 黄条鲷胚胎发育和早期仔鱼生长的温盐适应特性. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 45-54

XU Y J, CUI A J, JIANG Y, WANG B, ZHOU H T, LIU X Z, LIU X F. The ecological and physiological responses of embryonic development and early larval growth of *Seriola aureovittata* to temperature and salinity. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 45-54

## 黄条鲷胚胎发育和早期仔鱼生长的温盐适应特性\*

徐永江<sup>①</sup> 崔爱君 姜燕 王滨 周鹤庭 柳学周 刘新富

(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深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)



**摘要** 采用实验生态学、形态测度和分子生物学的方法,研究了温度、盐度对大洋性经济鱼类黄条鲷(*Seriola aureovittata*)胚胎孵化率、初孵仔鱼畸形率、内源性营养吸收利用、生长基因表达、存活指数(SAI)和饥饿不可逆点(PNR)的影响,并对早期仔鱼活力进行了评价。结果显示,在最适水温 20~22 °C 条件下,胚胎孵化率最高,达 75%~81%,且初孵仔鱼畸形率低于 6.7%,胚胎发育的温度系数  $Q_{10}$  值最接近 2,且初孵仔鱼全长和卵黄囊体积最大。受精卵在盐度 > 30 时漂浮在水面,而在盐度为 20~25 时悬浮在水中,在盐度为 10~15 时下沉于水底部。受精卵胚胎发育的最适盐度范围为 30~35,胚胎孵化率达 79%~80%,初孵仔鱼畸形率低于 6.0%。在 4 个不同温度条件下(18、20、22、24 °C)初孵仔鱼卵黄囊吸收利用速率随着温度的升高而加快。不同盐度条件下,初孵仔鱼的 SAI 值表明,盐度为 30~35 时,仔鱼的 SAI 值较高且峰值出现在盐度为 30 组,而盐度为 10 组仔鱼 SAI 值最低。在水温为 20~22 °C 时,6 d 仔鱼的初次摄食率最高(78%),PNR 出现在 7~8 d。初孵仔鱼在水温为 20~24 °C、盐度为 30~35 条件下,IGF-1 mRNA 表达水平显著高于其他实验组。饥饿条件下,IGF-1 mRNA 在饥饿后第 2 天显著升高,其后在第 3~4 天显著下降,但仍保持较高表达水平,随着饥饿的进行继续下降至显著低于开口期表达水平。本研究明确了黄条鲷受精卵孵化的最适温度为 20~22 °C、最适盐度为 30~35,并建立了初孵仔鱼活力评价的指标,研究结果可为建立规范化的黄条鲷胚胎孵化和苗种培育技术提供依据。

**关键词** 黄条鲷; 胚胎发育; 仔鱼生长; 水温; 盐度

**中图分类号** S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0045-10

我国是世界上最早开展鱼类养殖的国家之一,在春秋时代就有范蠡《养鱼经》的记载,其后我国开发天然水域的鱼类资源用于人工养殖的历史不断丰富。进入 21 世纪以来,随着全球人口数量的爆发式增长,人类对于海洋优质蛋白的需求不断增加,而自然资源

却不断下降,因此,人类开发海水鱼类等海洋生物资源的强度不断加大。开展海水鱼类人工养殖的关键是认识其生活史特征,特别是早期生活史阶段(主要是脆弱的胚胎、仔鱼、稚鱼和幼鱼期),这一时期鱼类个体发育形态特征、生态和生理变化相当剧烈,对环

\* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102; 2019YFD0900901)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNL30001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。

① 通信作者:徐永江,研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-24, 收修改稿日期: 2022-05-09



境因子变化的感知最为敏感(殷名称, 1991)。温度、盐度、饥饿等是影响海水鱼类早期生长发育的重要环境因素, 在胚胎孵化和器官发育、仔鱼生长发育及代谢调控中起着关键的生理作用, 也是影响胚胎和仔鱼成活的决定性因素(徐永江等, 2005; 黄贤克等, 2017; 方璐等, 2021)。因此, 认识海水鱼类早期生活史阶段对环境因子的适应特性, 提高胚胎孵化效率和仔稚幼鱼的成活率是成功进行苗种人工培育的关键, 对于阐明鱼类自然资源的补充、数量动态特征和可持续利用机制也具有重要的现实意义(陈大刚, 1991)。

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)是一种全球海洋广泛分布的具有长距离洄游特性的大洋性经济鱼类, 在我国沿海均有分布(张春霖, 1955), 具有体型大、生长快、营养丰富和经济价值高等特点, 深受国际消费市场青睐。养殖实践表明, 黄条鲷非常适宜于深水抗风浪网箱养殖生产方式, 是开发前景广阔的一种深远海养殖优良鱼种。目前, 国际上 10 余个国家已开展了黄条鲷人工养殖技术研发, 特别是中国、日本、澳大利亚、新西兰、智利等国家开展了黄条鲷的人工繁殖技术研究(Sang *et al.*, 2016; Stuart *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016)。2017 年以来, 中国水产科学研究院黄海水产研究所突破了黄条鲷的人工繁育技术, 获得了亲鱼自然产卵, 建立了苗种“工程化池塘+工厂化循环水车间”接力规模化培育技术。然而, 苗种培育技术研发过程中时常会出现受精卵孵化不稳定、早期苗种大量减耗、畸形率高等问题(Leyton *et al.*, 2017; 徐永江等, 2019), 成为制约苗种规模化培育的瓶颈, 主要原因在于对黄条鲷早期生活史的生长发育规律及其环境适应机制的认识不足。针对于此, 本团队开展了温度、盐度对黄条鲷胚胎和早期仔鱼生长发育的影响研究, 揭示了温度、盐度对胚胎孵化、初孵仔鱼营养吸收、饥饿耐受力、生存指数(survival index, SAI)以及生长相关基因表达的影响, 明确了黄条鲷胚胎发育和早期仔鱼生长的适宜温度和盐度以及活力评价方法, 以期丰富黄条鲷的早期发育生物学内容, 为建立稳定的黄条鲷胚胎孵化和苗种规模化繁育技术提供基础生物学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验于 2019—2021 年分别于辽宁大连富谷食品有限公司和山东青岛贝宝海洋科技有限公司开展。使用的受精卵来自于 2 个公司培育的黄条鲷亲鱼自然产卵(20~22 °C)获得。2019—2021 年, 在大连富谷食

品有限公司开展了胚胎发育的环境因子适应实验。2020—2021 年, 在青岛贝宝海洋科技有限公司同时进行了胚胎发育和早期仔鱼生长的环境因子适应实验。

胚胎发育的环境适应实验优选细胞分裂相正常的多细胞期受精卵, 仔鱼生长的环境适应及活力评价实验选择体态正常的初孵仔鱼。

### 1.2 温度对胚胎孵化的影响

在盐度为 32 条件下, 设置 14、16、18、20、22、24、26 和 28 °C 共 8 个温度实验组, 每组设置 2 个平行。以 2 000 mL 玻璃烧杯为实验容器, 置于容积为 200 L 的不同白色塑料桶水浴系统中, 以加热器和控温仪(精确度 $\pm 0.5$  °C)控制水浴内水温并设定的温度。每个烧杯内加入发育至多细胞期的受精卵 100 粒。孵化过程中微充气, 及时使用吸管移除烧杯内死亡的沉卵。受精卵死亡的依据是沉入水底且发白。

统计不同温度条件下受精卵的孵化时间, 计算受精卵孵化的温度系数  $Q_{10}$  值(代表温度升高 10 °C 时胚胎发育速度加快的倍数), 定量表示某一范围内温度变化对鱼类胚胎发育时间的影响。计算公式如下:

$$Q_{10} = (t_0/t_a)^{10/(T_a-T_0)}$$

式中,  $T_0$  为胚胎发育的起始温度,  $t_0$  表示  $T_0$  温度条件下的孵化时间;  $t_a$  表示  $T_a$  温度下的孵化时间。一般认为, 当  $Q_{10}$  值为 2 时, 胚胎发育的温度范围最为适宜。

比较了 6 个不同温度条件下(18、20、22、24、26 和 28 °C)的初孵仔鱼规格, 测量了全长、卵黄囊长径、短径和油球径等指标。

### 1.3 盐度对胚胎孵化的影响

设置 10、15、20、25、30、35 和 40 共 7 个盐度实验组, 每个实验组设置 2 个平行。高盐度海水以砂滤海水添加人工海水素配制而成; 低盐度海水以砂滤海水加淡水(充分曝气除  $\text{Cl}_2$ )配制。以海水比重计(精确度 $\pm 1\%$ )标定盐度值(徐永江等, 2005)。

以 2 000 mL 烧杯为容器, 置于容积为 200 L 的白色塑料桶水浴系统中, 以加热器和控温仪(精确度 $\pm 0.5$  °C)控制水浴内水温在 20~21 °C。每个烧杯内加入发育至多细胞期的受精卵 100 粒。孵化过程中微充气, 实验过程中, 及时使用吸管移出沉卵。统计不同盐度组受精卵的孵化时间, 观察受精卵和初孵仔鱼在不同盐度水体中的分布情况, 并记录和描述。

### 1.4 温度对初孵仔鱼卵黄囊营养利用的影响

选取 4 个不同温度(18、20、22 和 24 °C)条件下的正常初孵仔鱼, 继续以原温度静水不投饵培育。每天取样 20~30 尾测量仔鱼卵黄囊长径、短径。仔鱼卵

黄囊体积计算公式:

$$V(\text{mm}^3)=4/3\pi\times R/2\times(r/2)^2 \quad (1)$$

式中,  $R$  为卵黄囊长径(mm),  $r$  为卵黄囊短径(mm)。比较不同温度条件下, 初孵仔鱼卵黄囊的吸收利用速率。实验持续 7 d 至所有实验组仔鱼的卵黄囊吸收完毕。

### 1.5 盐度对初孵仔鱼 SAI 值的影响

在温度为 20~21 °C 条件下, 使用 2 000 mL 烧杯设置 10、15、20、25、30、35 和 40 共 7 个盐度实验组, 各放入体态正常、活力较好的初孵仔鱼 100 尾, 在无投饵、静水和无充气条件下进行培育。每天上午、下午统计死亡仔鱼数并及时清除。计算仔鱼生存指数(SAI), 用于评价不同盐度下仔鱼的活力(陈昌生等, 1997), 公式如下:

$$\text{SAI}=\sum_{i=1}^k(N-h_i)\times\frac{i}{N} \quad (2)$$

式中,  $N$  为实验仔鱼数,  $h_i$  为第  $i$  天的仔鱼死亡累计数,  $K$  为生存尾数为 0 时的天数。实验持续时间为 7 d。

### 1.6 初孵仔鱼饥饿不可逆点的确定

饥饿不可逆点(point of no return, PNR)的确定参照万瑞景等(2004)的方法。仔鱼孵化出膜后, 置入容积为 10 L 的白色圆形塑料桶内培育, 温度为 20~21 °C、盐度为 35 条件下, 持续饥饿。从第 3 天开始, 每天选择 100 尾仔鱼, 放入 2 000 mL 的烧杯内, 投喂褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)(10 个/mL), 同时, 添加海水小球藻(*Chlorella* sp.), 观察统计饥饿仔鱼的初次摄食率, 当所测定的初次摄食率下降至最高初次摄食率的 1/2 时, 即为 PNR 时间, 以孵化后日龄(d)表示。

### 1.7 温度、盐度和饥饿对初孵仔鱼 IGF-1 基因表达的影响

收集不同温度(20、22、24 和 26 °C)和盐度(20、25、30 和 35)组孵化的健康初孵仔鱼各 20 尾。饥饿组的设置: 在温度为 20~21 °C、盐度为 32 条件下, 在容积为 10 L 的白色圆形塑料桶内培育初孵仔鱼, 持续饥饿, 自开口(孵化后 3 d)开始, 每天取样 20 尾, 一直取样至仔鱼全部饥饿死亡。所有样品快速冷冻于液氮中, 带回实验室后保存于-80 °C 保存备用。

总 RNA、cDNA 反转录、引物序列、定量扩增和结果计算等参考 Wang 等(2019)的方法, 以黄条鲮 18S rRNA 为内参基因(表 1)。PCR 体系为 20 μL: 10 μL 的 2×SYBR® Premix Ex Taq II; 10 μmol/L 的上、下游引物各为 0.8 μL; 2 μL 的 cDNA 模版; 7.2 μL 的

ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环。目的基因表达量采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算。

表 1 黄条鲮 IGF-1 定量扩增引物序列  
(引自 Wang et al, 2019)

Tab.1 The primer sequences used for quantitative amplification of IGF-1 gene of *S. aureovittata* (from Wang et al, 2019)

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
igf1 F	TTGTGTGTGGAGAGAGAGGCTTT
igf1 R	GAAGCAGCATTTCGTCAACAATG
18S F	TACCACATCCAAAGAAGGCA
18S R	TCGATCCCGAGATCCAACCTA

### 1.8 数据统计分析

受精卵孵化率、仔鱼畸形率、SAI 值、基因表达等数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析, 设定差异显著性水平  $P=0.05$ ,  $P<0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 温度对黄条鲮胚胎孵化的影响

本研究显示, 在温度为 14~16 °C 时, 黄条鲮胚胎发育停滞在原肠中期和胚体形成初期, 均无法孵化出膜。在温度为 18~28 °C 条件下, 胚胎均可孵化出膜。其中, 18 °C 时胚胎孵化率仅为(55.72±3.02)%, 初孵仔鱼畸形率达(19.67±4.51)%。在温度为 20~26 °C 条件下, 孵化率均达 60.00%~81.00%, 其中, 在温度为 20~22 °C 条件下, 孵化率高达 75.00%~81.00%, 畸形率低于 6.70%; 在温度为 24~26 °C 条件下, 初孵仔鱼畸形率达 17.67%~27.33%。在温度为 28 °C 时, 孵化率下降至(49.09±4.64)%, 且初孵仔鱼畸形率高达(67.67±7.63)%。

本研究发现, 温度为 18 °C 时, 黄条鲮胚胎孵化出膜时间明显延长, 达 98.5 h; 在温度为 20~28 °C 条件下, 胚胎孵化时间分别为 84.6、73.6、58.2、48.5 和 41.5 h。同时, 不同温度下胚胎发育的温度系数  $Q_{10}$  不同, 其中, 温度为 20~22 °C 时,  $Q_{10}$  为 2.007 (表 2), 表明 20~22 °C 为黄条鲮胚胎孵化的最适温度范围。

测量了 6 个不同温度条件下(18、20、22、24、26 和 28 °C)的初孵仔鱼规格(表 3)。在温度为 18 °C 时, 初孵仔鱼全长最小, 而温度为 22 °C 时, 初孵仔鱼全长最

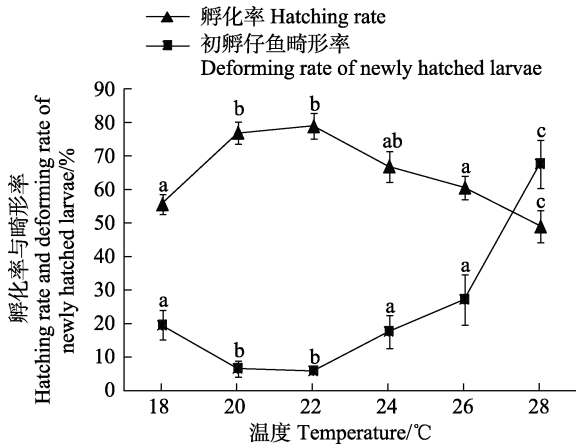


图1 温度对黄条鲮胚胎孵化和初孵仔鱼畸形率的影响

Fig.1 Effects of temperature on embryonic hatching and deforming rate of newly hatched larvae of *S. aureovittata*

不同字母表示组间具有显著性差异，下同。

Different letters indicate significant differences among groups, the same as below.

表2 黄条鲮胚胎发育各温度带的  $Q_{10}$

Tab.2 Values of  $Q_{10}$  at different temperature bands for embryonic development of *S. aureovittata*

$T_a/°C$	$T_0/°C$	$t_a/h$	$t_0/h$	$T_a-T_0/°C$	$Q_{10}$
28	26	41.5	48.5	2	2.380
	24	41.5	58.2	4	2.329
	22	41.5	73.6	6	2.598
	20	41.5	84.6	8	2.436
	18	41.5	98.5	10	2.373
26	24	48.5	58.2	2	2.488
	22	48.5	73.6	4	2.837
	20	48.5	84.6	6	2.528
24	18	48.5	98.5	8	2.424
	22	58.2	73.6	2	3.234
	20	58.2	84.6	4	2.548
22	18	58.2	96.5	6	2.323
	20	73.6	84.6	2	2.007
	18	73.6	98.5	4	2.072
20	18	84.6	98.5	2	2.139

表3 不同温度下孵化的初孵仔鱼的全长、卵黄囊与油球规格

Tab.3 The size of total length, yolk-sac and oil globe of *S. aureovittata*

温度 (Temperature/°C)	全长 (Total length/mm)	卵黄囊长径 (Horizontal diameter of yolk sac/mm)	卵黄囊短径 (Vertical diameter of yolk sac/mm)	油球直径 (Diameter of oil globe/mm)
18	4.36±0.22	0.82±0.11	0.33±0.02	0.32±0.03
20	4.45±0.32	0.83±0.10	0.33±0.01	0.31±0.01
22	4.48±0.28	0.79±0.07	0.32±0.05	0.31±0.01
24	4.43±0.14	0.72±0.05	0.30±0.02	0.29±0.02
26	4.41±0.12	0.64±0.03	0.27±0.02	0.24±0.02
28	4.39±0.11	0.58±0.01	0.25±0.03	0.22±0.01

大，而温度为 20 °C 时，孵化的仔鱼卵黄囊长径和短径最大。不同温度条件下，孵化的初孵仔鱼全长、卵黄囊长短径以及油球直径相比无显著差异 ( $P>0.05$ )。

2.2 盐度对胚胎孵化的影响

受精卵在盐度 > 30 时漂浮在水面，而在盐度为 25 时悬浮在水体中部，盐度为 10~20 时沉于容器底部。所有盐度条件下胚胎均可孵化出膜。其中，盐度为 10 和 15 时，胚胎孵化率低于 26.0%，初孵仔鱼畸形率高达 57.0%~94.2%。盐度为 20、25 时，孵化率升高至 51.0%~66.0%，且初孵仔鱼畸形率下降至 10.0%~25.0%。盐度为 30 和 35 时，胚胎孵化率最高达 79.0%~80.0%，且初孵仔鱼畸形率低于 6.0%。当盐度为 40 时，虽然，胚胎孵化率达 69.0%，但初孵仔鱼畸形率上升至(14.0±3.1)%。

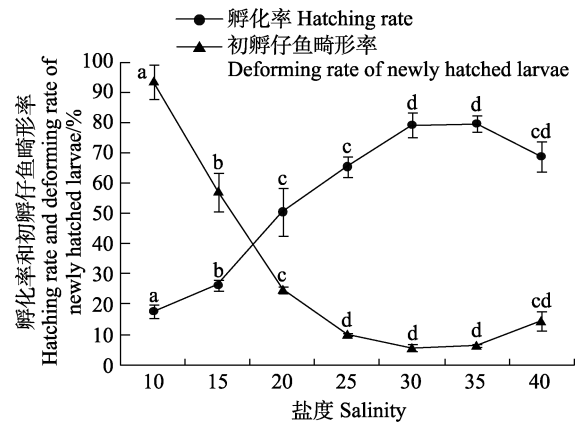


图2 盐度对黄条鲮胚胎孵化和初孵仔鱼畸形率的影响

Fig.2 The effects of salinity on embryonic hatching and deforming rate of newly hatched larvae of *S. aureovittata*

仔鱼孵化出膜后, 盐度为 35 组, 90%以上仔鱼分布在水体上层和表层, 10%分布在水体中部和底部。盐度为 25 和 30 组, 仔鱼 80%分布在水体上层和表层, 20%分布在水体中部和底部。而在盐度为 15~20 组, 60%~70%的仔鱼分布在水体上层和表层, 40%~30%仔鱼分布在水体中部和底部。而盐度为 10 实验组, 仅有约 10%在水体上层和表层分布, 约 90%分布在水体中部和底部(图 2)。

盐度为 25~40 时, 胚胎孵化时间为 73.4~75.5 h, 无明显差异; 盐度为 20 时, 胚胎孵化时间为 78.5 h; 而盐度为 10~15 时, 胚胎孵化时间延长至 82~84 h。综合孵化率、初孵仔鱼畸形率、仔鱼分布和孵化时间等结果, 黄条鲮胚胎适宜的孵化盐度范围为 30~35。

### 2.3 初孵仔鱼活力评价

#### 2.3.1 温度对初孵仔鱼内源性营养利用的影响

比较了 4 个不同温度条件下(18、20、22 和 24 °C), 初孵仔鱼卵黄囊的消耗速度, 发现随着温度的升高, 卵黄消耗速度加快, 在温度为 18 °C 条件下, 孵化后 168 h 才完全消耗完毕; 在温度为 20 和 22 °C 条件下, 分别在孵化后 144、120 h 消耗完毕; 而 24 °C 条件下, 在孵化后 96 h 即完全消耗完毕(图 3)。

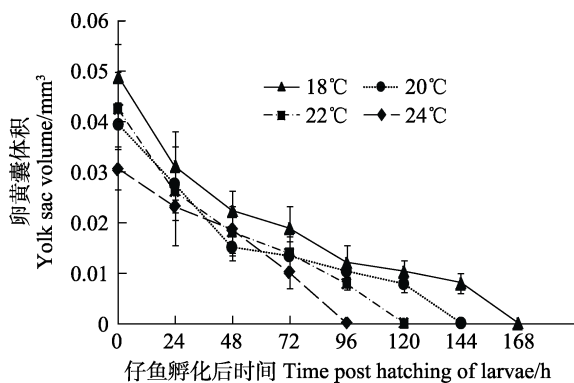


图 3 不同温度下孵化的初孵仔鱼卵黄囊吸收利用速度

Fig.3 The effects of temperature on absorption of yolk sac of *S.aureovittata* larvae

**2.3.2 不同盐度条件下初孵仔鱼的 SAI 值** 在不同盐度条件下, 静水无投饵培育对仔鱼的生长和存活影响较大(图 4)。SAI 值最高点(10.20)出现在盐度为 30 组, 仔鱼存活时间最长达 8 d; 而最低 SAI 值(2.99)出现在盐度为 10 组, 仔鱼孵化后 4 d 全部死亡, 而盐度为 15、20 和 40 组仔鱼的 SAI 值均较低, 表明过高或高低盐度都会对仔鱼的活力产生不利的影

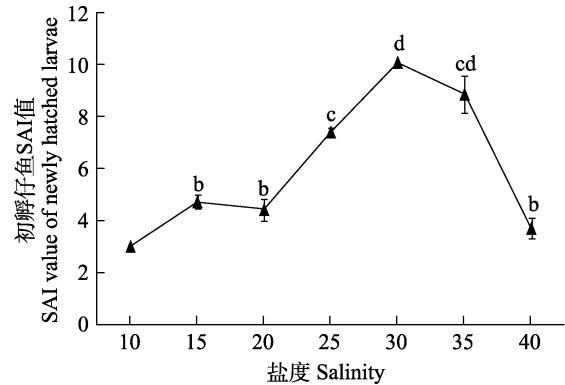


图 4 不同盐度下黄条鲮初孵仔鱼的 SAI 值  
Fig.4 The SAI value of newly hatched larvae of *S. aureovittata*

**2.3.3 初孵仔鱼饥饿不可逆点(PNR)** 在水温为 20~22 °C 条件下, 初孵仔鱼开口后第 3 天(6 d 仔鱼)的初次摄食率最高(78%), 其后初次摄食率下降, PNR 出现在 7~8 d 之间, 仔鱼开始进入饥饿不可逆期(图 5)。

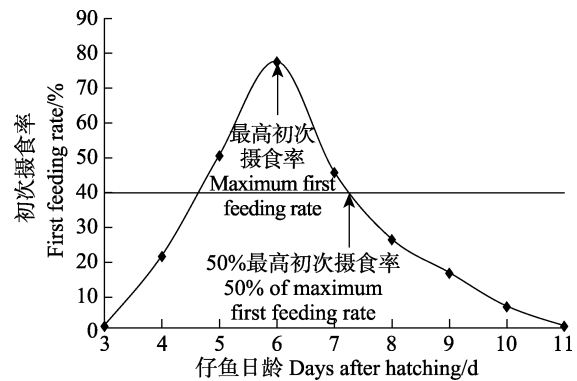


图 5 黄条鲮初孵仔鱼的饥饿不可逆点  
Fig.5 The point of no return of newly hatched larvae of *S. aureovittata*

### 2.4 温度、盐度与饥饿对初孵仔鱼 IGF-1 基因表达的影响

不同温度条件下, 孵化的仔鱼中 *IGF-1* mRNA 表达水平有显著差异。在温度为 20~24 °C 条件下, 初孵仔鱼 *IGF-1* mRNA 表达水平显著高于其他温度组, 以温度为 24 °C 组为最高。同时, 盐度为 25~35 条件下, 初孵仔鱼 *IGF-1* mRNA 表达水平显著高于其他盐度组。在饥饿条件下, *IGF-1* mRNA 在饥饿后第 2 天显著升高, 其后在饥饿第 3~4 天显著下降, 但仍保持高表达水平, 随着饥饿的进行继续下降至显著低于开口期表达水平( $P<0.05$ )(图 6~图 8)。

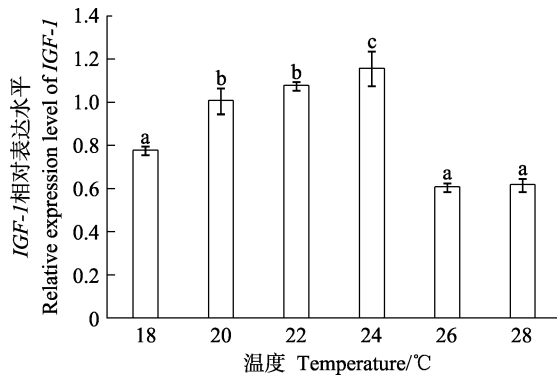


图6 不同温度下初孵仔鱼 IGF-1 mRNA 的表达水平  
Fig.6 The effect of temperature on IGF-1 mRNA level in newly hatched larvae of *S. aureovittata*

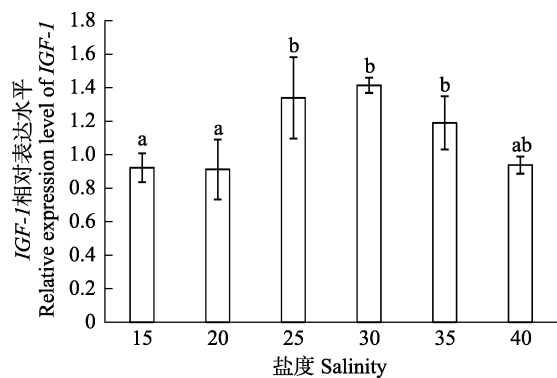


图7 不同盐度下初孵仔鱼 IGF-1 mRNA 的表达  
Fig.7 The effect of salinity on IGF-1 mRNA level in newly hatched larvae of *S. aureovittata*

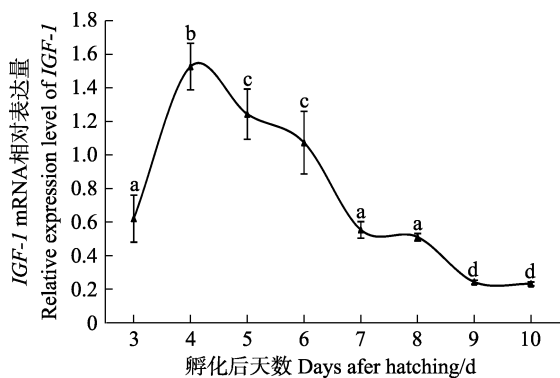


图8 饥饿对早期仔鱼 IGF-1 mRNA 表达的影响  
Fig.8 The effects of starvation on IGF-1 mRNA level in early larvae of *S. aureovittata*

### 3 讨论

本研究确立了大洋性经济鱼类黄条鲷胚胎孵化的适宜温度和盐度, 查明了不同温度和盐度条件下, 初孵仔鱼规格、卵黄囊吸收利用、SAI 值、PNR 值和 IGF-1 基因表达等特性, 为建立规范化的受精卵孵化和苗种培育技术提供了早期发育生物学与生态学资料。

温度和盐度是影响鱼类在水域中分布和生长繁衍的关键因子, 在胚胎发育和仔鱼生长过程中, 细胞分化和器官发生等关键生理过程起关键调控作用(陈昌生等, 1997; 黄贤克等, 2017; 张廷廷等, 2016)。对五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)的研究表明, 胚胎孵化的适宜温度为 22~24 °C, 低温条件下胚胎发育迟滞, 而高温条件下孵化时间较短但仔鱼畸形率高(方璐等, 2021)。本研究也发现, 14 和 16 °C 温度条件下, 黄条鲷胚胎发育停滞死亡, 表明 16 °C 为胚胎发育的下限。本研究还发现, 黄条鲷胚胎发育与温度呈负相关关系, 胚胎在 20~22 °C 孵化率最高, 初孵仔鱼的畸形率最低, 且温度系数  $Q_{10}$  最接近 2。研究表明, 温度可通过调控孵化酶的作用影响鱼类胚胎孵化, 只有在适宜的温度范围内孵化酶才拥有最大活性(樊廷俊等, 2002; 楼允东, 1965), 过高的温度会抑制孵化酶活性或使得卵裂及器官分化过程出现紊乱(王宏田等, 1998), 从而导致胚胎孵化率下降和畸形率升高, 因此, 鱼类胚胎发育的启动和正常过程需要在生物学 0 °C 以上的适宜温度带内, 与本研究结果相一致。Moran 等(2007)研究了澳大利亚海域黄条鲷胚胎发育过程中的能量代谢特性, 发现胚胎发育所需的耗氧量与温度呈负相关关系, 同时, 高温下孵化的仔鱼全长相对较小, 认为是由氨基酸等代谢产物的过快利用和消耗引起的。本研究发现, 高温条件下(24~28 °C)黄条鲷胚胎孵化时间短, 而初孵仔鱼的全长和卵黄囊相对小, 可能也是由于温度对胚胎和仔鱼生长发育能量分配机制的改变引起的。因此, 也提示在黄条鲷胚胎孵化和早期仔鱼培育过程中, 应保持适宜的孵化和培育温度, 以获得较高的孵化率和高质量的初孵仔鱼。

作为一种具有长距离洄游的大洋性经济鱼类, 黄条鲷对高盐度有较高的适应能力。本研究发现, 在盐度为 30~35 条件下, 胚胎孵化率最高, 盐度 < 30 和 > 35 时, 孵化率降低且初孵仔鱼畸形率升高, 这与同属鲷科(Carangidae)的高体鲷(*Seriola dumerili*)类似, 较半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)(柳学周等, 2004)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)(徐永江等, 2009)等海水鱼类的最适孵化盐度要高。高体鲷受精卵在盐度 < 30 时呈沉性, 而在盐度 > 32 的海水中漂浮(陈昌生等, 1997)。本研究也发现, 黄条鲷受精卵在盐度 > 30 时漂浮, 而在盐度为 25 时悬浮, 盐度 < 20 时沉于烧杯底部, 表明低盐度条件对于维持受精卵正常的漂流态是不利的。

在海水鱼类苗种培育过程中, 日本等国家多采用 SAI 来评价仔鱼活力, 进而决定仔鱼是否可以用于苗

种培育(陈昌生等, 1997)。SAI代表仔鱼在无投饵、饥饿、无换水和无充气条件下的存活能力, 其值越高, 仔鱼的活力就越好, 用于苗种培育时成活率比较高。对高体鲷的研究表明, 盐度为 32~35 条件下的仔鱼 SAI 值最高(18.3~18.8), 卵形鲳鲹、石斑鱼[云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*) (♀)×七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*) (♂)]等鱼类也是在适宜孵化的盐度下获得的仔鱼 SAI 值最高(许晓娟等, 2009; 李炎璐等, 2013), 表明胚胎孵化期间的盐度条件决定了仔鱼的质量。本研究中, 黄条鲷仔鱼在盐度为 30~35 时 SAI 值最高, 表明这一盐度范围内孵化的仔鱼用于苗种培育可提高成功率, 为建立胚胎孵化和早期苗种培育技术规范提供了条件选择依据。

殷名称(1991)研究认为, 鱼类早期生活史阶段的初次摄食期是一个可能引起大量死亡的危险阶段, 而饥饿是被认为引发初次摄食期死亡的主要原因之一。Blaxter 等(1963)提出了初次摄食期仔鱼 PNR 的概念, 从生态学角度研究初次摄食期仔鱼对饥饿的耐受能力和饥饿致死临界点。其后, 这一概念被引入到鱼类的人工繁殖过程中, 以 PNR 来评价初孵仔鱼的活力以及确定最佳的初次饵料投喂时间(陈昌生等, 1997; 李艳秋等, 2014)。李艳秋等(2014)研究表明, 太平洋鲷(*Gadous macrocephalus*)仔鱼初次摄食率为 30%, PNR 出现在 9 d, 最佳投喂时间为 5~7 d; 而鳀鱼(*Engraulis japonicus*)的 PNR 发生在 6 d (万瑞景等, 2004)。本研究中, 黄条鲷仔鱼的 PNR 出现在孵化后 7~8 d, 从最高初次摄食率到进入不可逆转期的时间较达到最高初次摄食率的时间短了 2 d, 表明黄条鲷仔鱼耐饥饿能力相对较弱, 另外, 其卵黄囊和油球等内源性营养物质吸收殆尽的时间为 4~5 d (徐永江等, 2019), 因此, 建议早期苗种培育的适宜初次投喂时间为 4 d, 同时, 保证饵料的充足供应, 以便于仔鱼在混合营养期内建立外源性摄食关系, 使得初孵仔鱼免受进展性饥饿, 提高早期苗种培育成活率。

鱼类的生长是一个由内在生理遗传与外界环境共同互作调控的过程, 其中, GH-IGF-1 轴起关键调控作用, 大量研究表明, IGF-1 是鱼类生长发育的一个关键生长功能因子(张雅星等, 2019; Triantaphyllopoulos *et al.*, 2019)。对半滑舌鳎的研究表明, IGF-1 具有母源遗传的特性, 在胚胎即将孵化期表达水平最高(张雅星等, 2019)。Wang 等(2019)的研究表明, 黄条鲷 IGF-1 也具有亲本遗传的特性, 且在胚胎发育早期具有较高表达水平, 因此, 胚胎发育期间的环境因子对其发生和表达具有重要的影响。本研究表明, 不同温度下孵化

出的黄条鲷仔鱼 IGF-1 mRNA 表达水平差异较大, 温度为 20~24 °C 组仔鱼中, IGF-1 mRNA 表达水平显著高于其他温度组, 与胚胎孵化的适宜温度范围相一致, 说明在适宜温度条件下, 孵化出的仔鱼具有较高的生长潜力。同样, 在盐度为 25~35 条件下, 孵化的仔鱼中 IGF-1 mRNA 表达水平显著高于其他温度组, 表明在胚胎孵化期适宜的盐度对于亲本 IGF-1 积累和传递具有较大的影响。在仔鱼饥饿过程中, IGF-1 mRNA 表达水平呈先显著上调再显著下调的趋势, 这与其他鱼类中的表达模式一致(Triantaphyllopoulos *et al.*, 2019), 饥饿初期的 IGF-1 mRNA 表达水平上升, 可能是内在生理补偿代谢机制启动的结果, 随后内源性营养和能量的消耗殆尽而外源性营养未及时补充, 导致生长轴生理调控功能失衡, 因此, IGF-1 mRNA 表达水平在 7~8 d 显著下调, 从分子层面验证了饥饿不可逆点的可靠性, 为早期仔鱼培育提供了内在生理指示指标。

#### 4 小结

本研究针对大洋性经济鱼类黄条鲷苗种繁育的技术需求, 查明了受精卵孵化的最适温度为 20~22 °C、最适盐度为 30~35, 并通过 SAI、PNR、内源性营养吸收利用、初孵仔鱼 IGF-1 等验证了最适温盐范围和评价了初孵仔鱼活力, 确立了适宜的评价参数, 可为建立规范化的黄条鲷胚胎孵化和苗种培育技术提供依据。

#### 参 考 文 献

- BLAXTER J H S, HEMPLE G. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). ICES Journal of Marine Science, 1963, 28(2): 211-240
- CHEN C S, JI R X, HUANG J M, *et al.* The relationship between the salinity and the embryonic, early larval development in *Seriola dumerili*. Journal Shanghai Ocean University, 1997, 6(1): 5-10 [陈昌生, 纪荣兴, 黄佳鸣, 等. 高体鲷胚胎、早期仔鱼发育与盐度的关系. 上海海洋大学学报, 1997, 6(1): 5-10]
- CHEN D G. Fishery ecology in Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: China Ocean Press, 1991, 138-139 [陈大刚. 黄渤海渔业生态学. 北京: 海洋出版社, 1991, 138-139]
- FAN T J, SHI Z P. Research progress and application prospects of fish hatching enzymes. Marine Limnology Bulletin, 2002(1): 48-56 [樊廷俊, 史振平. 鱼类孵化酶的研究进展及其应用前景. 海洋湖沼通报, 2002(1): 48-56]
- FANG L, XU Y J, LIU X Z, *et al.* The early growth and development characteristics of *Seriola quinqueradiata* and



- the temperature adaptation of embryonic development. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 194–204 [方璐, 徐永江, 柳学周, 等. 五条鲷早期生长发育特征及胚胎发育的温度适应特性. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 194–204]
- HUANG X K, SHAN L Z, YAN M C, *et al.* Embryonic development of yellow aquarium and its relationship with temperature and salinity. *Marine Science*, 2017, 41(7): 44–50 [黄贤克, 单乐州, 闫茂仓, 等. 黄姑鱼胚胎发育及其与温度和盐度的关系. *海洋科学*, 2017, 41(7): 44–50]
- LEYTON Y, SAYES C, MEJIAS C, *et al.* Increased larval survival of *Seriola* captive spawning and larval rearing of California yellowtail (*Seriola lalandi*), using *Pseudoalteromonas* sp. as probiotics. *Revista de Biología Marinay Oceanografía*, 2017, 52(1): 95–101
- LI Y L, WANG Q Y, CHEN C, *et al.* Effect of salinity on embryonic development and larval activity of *F<sub>1</sub> Epinephelus moara* (♀) × *E. Septemfasciatus* (♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 17–22 [李炎璐, 王清印, 陈超, 等. 盐度对云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育和仔鱼活力的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 17–22]
- LI Y Q, JIANG Z Q, SUN Y, *et al.* Experimental starvation on *Gadous macrocephalus* and definition of the point of no return. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(14): 3873–3878 [李艳秋, 姜志强, 孙阳, 等. 太平洋鳕仔鱼饥饿实验及不可逆生长点的确定. *生态学报*, 2014, 34(14): 3873–3878]
- LIU X Z, XU Y J, MA A J, *et al.* Effects of salinity, temperature, light rhythm and light intensity on embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* Günther and its hatching technology optimization. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 1–6 [柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鳎胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究. *海洋水产研究*, 2004, 25(6): 1–6]
- LOU Y D. Hatching enzymes of fish. *Zoological Journal*, 1965(3): 97–101, 123 [楼允东. 鱼类的孵化酶. *动物学杂志*, 1965(3): 97–101, 123]
- MORAN D, GARA B, WELLS R M G. Energetics and metabolism of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) during embryogenesis. *Aquaculture*, 2007, 265: 359–369
- SANG G Y, SANG W H, JI S C, *et al.* Morphological development of embryo, larvae and juvenile in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. *Development and Reproduction*, 2016, 20(2): 131–140
- SHI Z H, XIA L J, WANG J G, *et al.* Effect of salinity on embryonic development and larval growth of *Dentex tumifrons* Temminck et Schlegel. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(5): 599–603 [施兆鸿, 夏连军, 王建钢, 等. 盐度对黄颡鱼胚胎发育及早期仔鱼生长的影响. *水产学报*, 2004, 28(5): 599–603]
- STUART K R, DRAWBRIDGE M A. Captive spawning and larval rearing of California yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture Research*, 2013, 44(5): 728–737
- TRIANTAPHYLLOPOULOS K A, CARTAS D, MOLIOU H, *et al.* Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: How can aquaculture industry benefit? *Reviews in Aquaculture*, 2019, 1–26
- WANG B, XU Y J, LIU X Z, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of insulin-like growth factors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) during embryonic development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45: 375–390
- WANG H T, ZHANG P J. Effects of environmental factors on the development of marine fish fertilized eggs and early larvae. *Marine Science*, 1998, 22(4): 50–52 [王宏田, 张培军. 环境因子对海产鱼类受精卵及早期仔鱼发育的影响. *海洋科学*, 1998, 22(4): 50–52]
- WAN R J, LI X S, ZHUANG Z M, *et al.* Experimental starvation on *Engraulis japonicus* larvae and definition of the point of no return. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(1): 79–83 [万瑞景, 李显森, 庄志猛, 等. 鳀鱼仔鱼饥饿试验及不可逆点的确定. *水产学报*, 2004, 28(1): 79–83]
- XU X J, LI J E, OU Y J. Effects of salinity on embryonic development and early larvae in ovate pompano *Trachinotus ovatus*. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(6): 31–35 [许晓娟, 李加儿, 区又君. 盐度对卵形鲳鲹胚胎发育和早期仔鱼的影响. *南方水产*, 2009, 5(6): 31–35]
- XU Y J, LIU X Z, MA A J, *et al.* Effects of salinity on embryonic development and growth of early life stages of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Sciences*, 2005, 29(11): 39–43 [徐永江, 柳学周, 马爱军, 等. 半滑舌鳎胚胎发育及仔鱼生长与盐度的关系. *海洋科学*, 2005, 29(11): 39–43]
- XU Y J, LIU X Z, WANG Y Y, *et al.* Effects of temperature and salinity on embryonic development and starving tolerance of newly hatched larvae of rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 25–32 [徐永江, 柳学周, 王妍妍, 等. 温度、盐度对条石鲷胚胎发育影响及初孵仔鱼饥饿耐受性. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 25–32]
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Early growth and development characteristics of yellowtail. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172–182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲷早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172–182]
- YANG S G, JI S C, GU L S, *et al.* Management of sexual maturation and natural spawning of captive-reared yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*, in an indoor rearing tank. *Development and Reproduction*, 2016, 20(2): 141–147
- YIN M C. The research on early life stage of fish and its progresses. *Journal of Fisheries of China*, 1991, 15(6): 348–358 [殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. *水产学报*, 1991, 15(6): 348–358]

ZHANG C L. Survey report on fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: Science Press, 1955, 116–119 [张春霖. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 1955, 116–119]

ZHANG T T, CHEN C, SHI Z H, *et al.* Effects of temperature on embryonic development and larval vigor of Moray grouper (*Epinephelus moara*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 28–33 [张廷廷, 陈超, 施兆鸿, 等. 温度对云

纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 28–33]

ZHANG Y X, WANG B, LIU X Z, *et al.* Physiological role of the growth axis in embryonic development and early growth of *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 287–295 [张雅星, 王滨, 柳学周, 等. 生长轴对半滑舌鲷早期生长发育的调控作用. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 287–295]

(编辑 陈 严)

## The Ecological and Physiological Responses of Embryonic Development and Early Larval Growth of *Seriola aureovittata* to Temperature and Salinity

XU Yongjiang<sup>①</sup>, CUI Aijun, JIANG Yan, WANG Bin, ZHOU Heting, LIU Xuezhou, LIU Xinfu

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

**Abstract** Yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*, is a long-distance migratory oceanic species belonging to the Carangidae family of Perciformes, which has a global distribution and inhabits temperate and subtropical marine waters. *S. aureovittata* is large in size, has a fast growth rate, and is highly favored by international consumers owing to its excellent flesh taste, nutritional quality, and economic value. Furthermore, it is a promising candidate for the global farming industry and is particularly suitable for rapidly developed open ocean aquaculture in China.

Currently, yellowtail kingfish aquaculture occurs in over 10 countries including Japan, Australia, New Zealand, South Africa, Chile, Greece, Holland, USA, Mexico, and China. In 2017, a great breakthrough in seedling production of *S. aureovittata* was achieved, and currently juveniles are mass-produced in China by combining the “engineering pond” and “land based indoor tanks” modes, which led to the rapid development of the *Seriola* fish farming industry in China. Nowadays, *Seriola* species are farmed in Liaoning Province, Fujian Province, and Shandong Province of China, and the combined annual farming yield is approximately 500 tons. However, we found that during seedling production of *S. aureovittata*, especially at the early larval growth stage, the hatching rate of eggs was variable among different spawning batches, and the survival of early larvae was low especially when the larvae reached 8~10 d post hatching. Occasionally, the high total death rate was attributed to the sudden “sinking death” of larvae, which may have been caused by stress as a result of changes in environmental factors. Therefore, it is necessary to determine the ecological and physiological effects of environmental factors, especially temperature and salinity fluctuations, on the early life stages of *S. aureovittata* under artificial breeding conditions.

In the present study, the effects of two key environmental factors, temperature and salinity, on embryonic development and early larval growth of *S. aureovittata* were investigated using experimental ecology, morphological measurements, and molecular methods under laboratory conditions. The indexes including hatching rate of eggs, deformation rate of newly hatched larvae, absorption of yolk sac, *IGF-1*

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

gene expression, survival index (SAI), and point of no return (PNR) were determined. Moreover, the vitality of newly hatched larvae was tested and evaluated. The results showed that the highest hatching rates of 75%~81% were obtained under temperatures of 20~22 °C, and the deformation rates of newly hatched larvae were lower than 6.7%. In addition, according to the  $Q_{10}$  calculation, the most appropriate water temperature range for embryonic development of *S. aureovittata* was confirmed to be 20~22 °C. Meanwhile, the total length and yolk sac volume of newly hatched larvae of yellowtail kingfish hatched from the 20°C and 22 °C groups were larger than those in the other temperature groups. Regarding salinity, the fertilized eggs floated on the water surface when salinity was over 30 ‰, were suspended in the water when salinity was between 20~25, and sank to the bottom of the container when salinity was lower than 15. The optimum salinity range for embryonic development of *S. aureovittata* was therefore determined to be 30~35, when hatching rates were between 79%~80%, and the deformation rate of newly hatched larvae was 6%. The yolk sac absorption by newly hatched larvae was measured under four temperatures (18 °C, 20 °C, 22 °C, and 24 °C). It was found that the absorption and exhaustion speed of the yolk sac increased with temperature, and the yolk sac was exhausted at 7 d post hatching at 18 °C, whereas the time decreased to 6 d, 5 d, and 4 d at 20 °C, 22 °C, and 24 °C, respectively. The highest SAI value for newly hatched larvae was observed at a salinity of 30, whereas the lowest was observed at a salinity of 10, which was consistent with the hatching results of embryos under different salinities. The highest first feeding rate of newly hatched larvae was observed at 6 d post hatching, and the PNR appeared between 7 d and 8 d post hatching at culture temperatures ranging from 20~22 °C. *IGF-1* mRNA levels in newly hatched larvae from different temperatures and salinities were detected, and significantly higher expression levels were found at temperatures of 20~24 °C and salinities of 30~35. Under continuous starvation conditions, the *IGF-1* mRNA in larvae significantly increased at 2 d post mouth open and decreased at 3 d and 4 d, although expression levels remained relatively high, and then continually decreased to a significantly lower level as starvation continued. Results from the present study provide basic knowledge and useful tools for the construction of standardized technological methods for optimal embryonic hatching and seedling production of *S. aureovittata*.

**Key words** *Seriola aureovittata*; Embryonic development; Larval growth; Temperature; Salinity

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220311003

http://www.yykxjz.cn/

方璐, 徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 周鹤庭, 柳学周. 黄条鲷 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 55–63

FANG L, XU Y J, CUI A J, JIANG Y, WANG B, ZHOU H T, LIU X Z. Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola aureovittata*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 55–63

# 黄条鲷 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性\*



方璐<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>2①</sup> 崔爱君<sup>2</sup> 姜燕<sup>2</sup> 王滨<sup>2</sup> 周鹤庭<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>2</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黄海水产研究所  
青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)在鱼类的应激与免疫反应中发挥重要的生理调控作用, HSP70 是该家族的重要成员。为探讨热休克蛋白在大洋性经济鱼类黄条鲷(*Seriola aureovittata*)生长发育中的生理作用, 本研究克隆获得了黄条鲷 *hsp70* 基因的全长 cDNA 序列, 并采用定量 PCR 技术测定了其组织分布及在早期生长发育过程中的表达特征。结果显示, 黄条鲷 *hsp70* 基因的 cDNA 序列全长为 2 332 bp, 其中, 5'-UTR 长度为 187 bp, ORF 长度为 1 920 bp, 3'-UTR 长度为 225 bp, 编码 639 个氨基酸, 蛋白质分子量为 70.1 kDa, 等电点为 5.16。黄条鲷 *hsp70* mRNA 的组织表达具有性别二态性差异, 其中, 在雌性鳃、心、脾脏和卵巢组织中显著高表达( $P<0.05$ ), 且以卵巢中表达量最高; 雄性垂体、鳃、头肾和精巢组织显著高表达( $P<0.05$ ), 且以鳃中表达量最高。胚胎发育过程的表达检测显示, 在卵裂前的受精卵中可检测到 *hsp70* 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性。同时, 在胚胎发育过程的各个时期都可检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 且在低囊胚期之前的各发育阶段一直保持较低表达水平, 在原肠前期开始显著上调表达( $P<0.05$ ), 其后保持相对较高表达水平, 至胚胎孵化出膜期达峰值。在仔稚幼鱼中, *hsp70* mRNA 在初孵仔鱼和 1 d 仔鱼中高表达, 其后在 4 d 仔鱼中显著降低( $P<0.05$ ), 其后显著上调表达, 至 15 d 仔鱼达峰值, 其后在 20 d 仔鱼显著下降, 并在 25 d 后稚鱼和幼鱼中保持相对较低表达水平。研究结果可为深入认识黄条鲷 *hsp70* 基因的结构特征、发生发育及其早期生长发育阶段的表达调控功能提供依据。

**关键词** 黄条鲷; *hsp70*; 基因克隆; 表达调控; 早期生活史

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0055-09

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)是一种在全球水域广泛分布的暖温性中上层掠食性长距离洄游鱼类, 我国沿海均有分布(张春霖, 1955; 刘静等, 2015)。黄条鲷

体型大、游泳速度快, 肉质鲜美、营养丰富、生食口感可媲美三文鱼, 经济价值较高。2017 年以来, 中国水产科学研究院黄海水产研究所突破了黄条鲷苗

\* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM30001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项—海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。方璐, E-mail: 342245529@qq.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-11, 收修改稿日期: 2022-03-31

种培育关键技术,然而,黄条鲮在苗种早期培育阶段,对水温、光照、营养等条件的应答较为敏感,导致苗种在早期因应激而批量死亡的问题较为突出,直接导致苗种早期培育成活率低。因此,有必要认识黄条鲮早期生长发育对环境因子胁迫的生理应答机制,为建立稳定的苗种培育技术提供理论依据。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类具有高度保守结构的分子伴侣,广泛存在于细菌、哺乳动物和植物中,在应对环境压力等方面发挥着关键作用(Hartl, 1996)。根据分子量大小和氨基酸序列同源性,热休克蛋白一般分为5个主要家族:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和低分子量HSP(Surajit *et al.*, 2011)。HSP70是热休克蛋白家族中最为重要的一员,具有分子伴侣、保护DNA、增强细胞耐受能力等生物学功能,特别是在高温下,HSP70能协助变性蛋白复性、保护生物体免受损伤(Heredia, 2008; Deane, 2006; Rosic *et al.*, 2011)。在水产生物中,对HSP70的研究较为广泛,主要集中在其应对环境胁迫适应的蛋白稳态和细胞修复方面(Hangzo *et al.*, 2016; Abha *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021);在鱼类早期生长发育方面研究较少,对鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的研究发现,*hsp70*参与晶状体的形成过程(王鹏飞, 2014; Evans *et al.*, 2005)。本研究采用RACE法(rapid-amplification of cDNA ends)克隆获得了黄条鲮*hsp70*基因的cDNA序列,并揭示了其组织表达特性,探明了其在胚胎和仔稚幼鱼生长发育过程中的差异表达调控特性,旨在为开发黄条鲮生长发育应答环境胁迫的应激消减调控技术提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用1龄黄条鲮取自大连富谷食品有限公司,全长为(44.0±3.5) cm,体重为(822.5±212.9) g。用MS-222(80 mg/L)的麻醉鱼,快速解剖取出脑、垂体、鳃、心、肝、脾、肾、头肾、胃、肠、肌肉和性腺,置于液氮中保存,带回实验室后转移到-80℃冰箱保存备用。

2020年的黄条鲮繁殖和苗种培育季节,在大连富谷食品有限公司采集了17个不同发育时期的胚胎样品,包括受精卵、2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期、32细胞期、64细胞期、多细胞期、桑葚胚期、高囊胚期、低囊胚期、原肠早期、原肠后期、神经胚期、胚体包被1/2期、胚体包被2/3期和破膜

孵化期;采集了仔稚幼鱼样品:孵化出膜后1、4、7、10、15、20、25、30、40、50、60 d样品。将样品贮存于液氮中带回实验室,转移至-80℃冰箱中保存。

### 1.2 总RNA提取和cDNA第一链合成

取黄条鲮成鱼不同组织样品各约20 mg,按照TRIzol试剂(TaKaRa, 日本)说明书进行RNA提取。总RNA以NanoDrop2000C(Thermo, 美国)分光光度计测定浓度,取高质量RNA用于反转录。以SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3' kit(TaKaRa, 日本)合成5'及3'-RACE cDNA第1链,用于*hsp70*基因全长克隆。以PrimeScript<sup>™</sup> II 1st strand cDNA synthesis kit(TaKaRa, 日本)合成cDNA第1链,用于*hsp70* mRNA组织表达特性分析。反转录操作按照说明书进行。

### 1.3 黄条鲮*hsp70*基因核心片段克隆

以脑组织cDNA为模板,设计3对引物(HSP70 F1、HSP70 R1; HSP70 F2、HSP70 R2; HSP70 F3、HSP70 R3)(表1),使用重组Taq DNA聚合酶混合物(TaKaRa, 日本)进行扩增,分别对*hsp70*基因核心片段进行PCR扩增。3次PCR体系均为25 μL: 0.2 μL TaKaRa Ex Taq、2.5 μL 10× Taq Buffer、2.0 μL dNTP Mix(2.5 μmol/L)、0.5 μL 模板、1.0 μL 正向引物(HSP70 F1、HSP70F2、HSP70F3)、1.0 μL 反向引物(HSP70 R1、HSP70R2、HSP70R3)、17.8 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR条件:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共38个循环;最后72℃延伸5 min。将产物利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带产物利用SteadyPure DNA凝胶回收试剂盒(AG, 中国)回收,回收产物连接到pEASY-T1 simple载体(TransGene Biotech, 中国),后转入Transl-T1 Phage Resistant 感受态细胞(TransGene Biotech, 中国),摇菌培养1 h后,涂布于含有氨苄的固体培养基,37℃过夜培养;挑单克隆菌落于含有氨苄的LB液体培养基中,37℃下200 r/min振荡2 h,菌液PCR验证后,将筛选出的阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.4 黄条鲮*hsp70*基因5'端和3'端序列扩增

根据获得的*hsp70*基因核心片段设计RACE引物(表1)。使用Smart RACE Advantage 2 PCR试剂盒(TaKaRa, 日本)进行扩增。第1次PCR体系:17.5 μL RNase free H<sub>2</sub>O、2 μL Buffer、2 μL 50× dNTP mix、0.5 μL 50× Advantage 2 polymerase mix、1 μL cDNA、1 μL 引物(HSP70 3'F1和HSP70 5'R1)(表1)和1 μL

表 1 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及定量表达所用引物  
Tab.1 The primer used for cloning and quantitative expression of *S. aureovittata hsp70*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
HSP70 F1	CAACGCAGTCGTCACAG	Partial CDS
HSP70 R1	CGATGCCCTCAAACAGA	
HSP70 F2	AAGGACATCAGCCAGAACA	
HSP70 R2	TTCTGGACTTTGGGGATT	
HSP70 F3	GCTGTGCTCCGACCTGT	
HSP70 R3	GCCAGGCGATGGTCTCA	
HSP70 3'F1	GAGGCTCCACCCGAATC	3'RACE, 1st PCR
HSP70 3'F2	GGAGTCCTACGCCTTCAACA	3'RACE, 2nd PCR
HSP70 5'R1	GTGATGGAGGTGTAGAAGTCG	5'RACE, 1st PCR
HSP70 5'R2	CTGGGACTGTGACGACTGC	5'RACE, 2nd PCR
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Universal primers
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
q-HSP70 F	ACCTTCGACGTGTCCATCCT	qPCR
q-HSP70 R	TGGCTGATGTCTTCTTGTGTT	
18S F	TACCACATCCAAAGAAGGCA	
18S R	TCGATCCCAGATCCAACCTA	

UPM (long), 共 25  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min; 12  $^{\circ}$ C 保存。以第 1 次 PCR 的产物稀释 10 倍为模板, 进行巢式 PCR 扩增, 反应体系: 16.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、2  $\mu$ L Buffer、2  $\mu$ L 50 $\times$  dNTP mix、0.5  $\mu$ L 50 $\times$  Advantage 2 polymerase mix、2  $\mu$ L cDNA、1  $\mu$ L UPM (short)和 1  $\mu$ L 引物(HSP70 3'F2 和 HSP70 5'R2) (表 1), 共 25  $\mu$ L。PCR 扩增条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

### 1.5 黄条鲮 *hsp70* 基因的定量表达检测

根据黄条鲮 *hsp70* cDNA 序列设计定量引物, 以 18S rRNA 为内参。使用 Light Cycler 96 Real-time PCR 仪(Roche, 瑞士), 使用 SYBR<sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit II 试剂盒(AG, 中国), 在黄条鲮不同组织、胚胎和仔稚幼鱼中扩增检测。PCR 体系为 20  $\mu$ L: 2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS Premix II 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算 *hsp70* 基因的表达量。

### 1.6 数据处理及分析

通过软件 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测黄条鲮 *hsp70* 基因的信号肽, 利用 ExPASy ([www.expasy.org/tools/protparam](http://www.expasy.org/tools/protparam)。

html)预测蛋白结构和分子量等。使用软件 DNAMAN 6.0 (LynnonBiosoft, 美国)将得到的 *hsp70* 基因 cDNA 序列片段进行拼接, 得到完整的 cDNA 序列; 使用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行结构域的预测; 通过 SWISS-MODEL 自动化蛋白质建模服务器 ProMod II 程序估计三级蛋白质结构 (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>); 采用 MEGA 7.0 软件进行同源序列比对, 应用邻接法构建氨基酸的系统进化树, 1 000 次重复计算自展值。采用 SPSS 26.0 软件(IBM, 美国)进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 通过 Duncan 统计比较各个基因在不同组织和不同发育阶段的相对表达水平的差异, 显著性水平 *P* 设置为 0.05, 当 *P*<0.05 时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 黄条鲮 *hsp70* 的序列全长和结构特征

黄条鲮 *hsp70* 基因的 cDNA 全长为 2 332 bp, 其中, 5'-UTR 长度为 187 bp, ORF 长度为 1 920 bp, 3'-UTR 长度为 225 bp, 编码氨基酸 639 个, 蛋白质分子量为 70.1 kDa, 等电点为 5.16 (图 1)。序列中存在非细胞器特征的基序 RARFEEL 和位于 C-端的细胞质定位特征基序 EEVD。拥有 3 个典型的 HSP70 家族标签基序 IDLGTTYS、IFDLGGGTFDVSIL 和 IVLVGGSTRIPKIQK。

应用 SWISS-MODEL 软件中 ProMod II 程序对获



得的黄条鲷 *hsp70* 空间结构进行预测(图 2)。结果显示, *hsp70* 空间结构由 3 部分组成: ATP 酶结合结构域、底物多肽结构域和 C 端结构域。其中, ATP 酶结

合结构域是由 4 个亚域构成的 2 个叶状结构;底物多肽结构域具有结合底物多肽的功能, 由 2 个亚域组成, 它们之间由螺旋结构相连。

```

1  aggctgagttctatagcactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagtacatggggaggagcacagagagaagactacaagaag
91  aagaagaagcagcggagagagggacacaacacatcaggaacctcttcaactatcttctcatcttcaacgagagacaccaattcaaacc
181  aaccaagATGCTCTGCAGCTAAAGGTGTAGCGATCGGCATCGACCTGGGACCACCTACTCCTGTGTGGGGTTTTCCAGCAGGAAAAAGT
1      M S A A K G V A I G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V
271  AGAAATCATCGCCAACGACCAGGGCAACAGGACCACCCACGCTATGTGGCCTTCACTGACACAGAGAGACTGATTGGTGACGCAGCCAA
29   E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K
361  GAACCAGGTGGCTCTGAACCCAGCAACCCGTGTTGATGCCAAGAGACTGATTGGAAGAAAAGTTGATGATGCAGTGGTGCAGGCTGA
59   N Q V A L N P S N T V F D A K R L I G R K F D D A V V Q A D
451  CATGAAGCACTGGCCCTTCAAGTGGTTTCAGATGGAGGGAAGCCAAAGTTCAGGTGGCGTACAAAGGGGAGGACAAAGCTTTCAACCC
89   M K H W P F K V V S D G G K P K V Q V A Y K G E D K A F N P
541  TGAGGAGATTTCTCCATGGTCTGGTGAAGATGAAGGAGATCGTGAAGCCTACCTCGGCCACAAGGTGTCCAACGCAGTGTGACAGT
119  E E I S S M V L V K M K E I A E A Y L G H K V S N A V V T V
631  CCCAGCGTACTTCAACGACTCCAGCGACAGGCGACTAAAGACGCGGGCGTCATCGCAGGACTTAACGTCTGAGGATCATCAACGAGCC
149  P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V L R I I N E P
721  GACGGCGCGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAAGGCAAGTCAGGAGAACGTAACGTCTGATCTTTGACCTGGGCGGAGGACCTTCGA
179  T A A A I A Y G L D K G K S G E R N V L I F D L G G G T F D
811  CGTGTCCATCTGACAATCGAAGACGGGATCTTTGAGGTCAAATCCACGCGCGGGGACTCACCTGGGCGGAGAGGACTTTGACAACCG
209  V S I L T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R
901  CATGGTCAACCACTTTGTGGAGGAGTTCAAGAGGAAACACAAGAAGGACATCAGCCAGAACAAGAGAGCCCTGAGGAGGCTGCGCAGGC
239  M V N H F V E E F K R K H K K D I S Q N K R A L R L R T A
991  TTGTGAGAGGGCCAAGAGGACGCTGTCTCCAGCTCCAGGCCAGCATCGAGATCGATTCTGTGTTGAGGGCATCGACTTCTACACCTC
269  C E R A K R T L S S S S Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S
1081  CATCACCAGGGCTCGCTTCGAGGAGCTGTGCTCCGACCTGTTCAAGGGAACATTAGATCCGGTGGAGAAAAGCCCTGAGGGACGCCAAAAT
299  I T R A R F E E L C S D L F R G T L D P V E K A L R D A K M
1171  GGACAAGGCGCAGATCCACGACATCGTCTGGTGGGAGGCTCCACCCGAATCCCCAAAGTCCAGAAAACCTCTGCAGGATTTCTTCAACGG
329  D K A Q I H D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G
1261  TAGAGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCAGATGAGGCGGTGGCTTACGGCGCGCCGTCAGGCCGCCATTCTCTCAGGTGATACCTCTGG
359  R E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D T S G
1351  CAACGTTCAAGCACTGCTGCTGGACGTGGCCCTCTGTCCTGGGTATCGAGACAGCGGGAGGAGTCAAGATCCCTGATTAACG
389  N V Q D L L L L D V A P L S L G I E T A G G V M T S L I K R
1441  CAACACCACATCCCACTAAACAAACCCAGGTCTTACCACCTACTCTGACAACCAGCCCGGGTCTCATCCAGGTGACGAAGGGGA
419  N T T I P T K Q T Q V F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E
1531  AAGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTGCTGGCAAGTTGAGCTGACAGGAATCCACCTGCTCCACGAGGGGTCACAGATCGAGGT
449  R A M T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V
1621  CACGTTCCAGCTAGACGCCAACGGCATTTTGAACGTATCTCGGGTGGACAAAAGCACCAGGCAAGAGAACAAAGTACCATCACCACCGA
479  T F D V D A N G I L N V S A V D K S T G K E N K I T I T N D
1711  CAAGGGCCGACTGAGCAAAGAAGAGATCGAGAGGATGGTGCAGGACGCCGACAAGTACAAAGCTGAGGACGACCTTACAGGGGACAAAAAT
509  K G R L S K E I E R M V Q D A D K Y K A E D D L Q R D K I
1801  CTCTGCCAAGAACTCGTGGAGTCTCAACCTTCAACATGAAGAGCAGCGTGCAGGACGAGAACCTGAAGDCAAAATGAGTGAGGAGGA
539  S A K N S L E S Y A F N M K S S V Q D E N L K G K M S E E E
1891  GCAGAAGAAGGTGGTTGAGAAGTGTGATGAGACCATCGCTGGTGGAGAACAACAGCTGGTGATAAAGACGAGTATCAACACAAGCA
569  Q K K V V E K C D E T I A W L E N N Q L A D K D E Y Q H K Q
1981  GAAAGAGCTGGAGAAGTGTGCAACCCATCATCAGCAAGTTGTATCAGGGAGGAATGCCTGAAGGTAAGTGTGAGAGCAGGCACAAGC
599  K E L E K V C N P I I S K L Y Q G G M P E G N C G E Q A Q A
2071  CGGCTCCAGGGGCCACTATTGAGGAGGTGGACTAAagtgtcccttaatatggactctgtgatcactgtaacaataacgttatacctca
629  G S Q G P T I E E V D *
2161  tgtttgtgggttttgttccagacatttatatgtttaaacttaacaatcaagaaattataagaactgaccatatttttacaagtgtgat
2251  tgtgtgactttgcaatgaagataaaatgtgaatacatcttaagtgtttgttttggtttcaataaaaattacttgaatcaccaaa

```

图 1 黄条鲷 *hsp70* 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *S. aureovittata hsp70*

ORF 用大写字母表示, 5'-UTR 和 3'-UTR 用小写字母表示。起始密码子加框显示, 终止密码子以星号标注。

阴影部分为 *hsp70* 家族保守基序。

The ORF domain is indicated with uppercase letters, and the 5'-UTR domain and 3'-UTR domain are indicated with lowercase letters. The start codon is boxed and the stop codon is indicated with asterisk.

The conservative motif domains of *hsp70* gene are shown in shadow.



图 2 预测的黄条鲮HSP70 三级结构  
Fig.2 The predicted tertiary structure of HSP70 of *S. aureovittata*

2.2 氨基酸序列同源性比较和系统进化分析

对黄条鲮和其他脊椎动物的 *hsp70* 基因的氨基酸序列进行同源序列比对(表 2), 并绘制了基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 3)。结果显示, 黄条鲮与同为鲈形目(Perciformes)的长背鲮(*S. lalandi dorsalis*)的 *hsp70* 同源性最高, 达 99.5%, 其次为高体鲮(*Seriola dumerili*), 达 98.9%, 与鲤形目(Cypriniformes)和鲑形目(Salmoniformes)的亲缘关系较远, 与哺乳纲其他动

物的亲缘关系更远。系统进化分析表明, 我国黄条鲮HSP70 与长背鲮和高体鲮HSP70 聚为一个小分支, 与其他鲤形目和鲑形目鱼类聚为大分支, 表明鲈科(Carangidae)鱼类 *hsp* 基因的进化亲缘关系最为接近。

2.3 黄条鲮*hsp70* mRNA 的组织表达特性

检测了 *hsp70* 基因在雌雄成鱼组织中的表达, 发现各组织中均可检测到 *hsp70* 基因 mRNA 表达(图 4), 雌鱼中以卵巢组织表达水平最高, 其次为鳃、心、脾脏, 在肾脏和垂体等其他组织中低表达; 雄鱼中以鳃组织 *hsp70* mRNA 表达水平显著高于其他组织, 其次在垂体、头肾和精巢中也显著高表达, 在脾脏等其他组织中相对低表达, 表明 *hsp70* 基因在黄条鲮成鱼的组织表达模式和生理功能各不相同, 具有明显的性别二态性。

2.4 黄条鲮*hsp70* 基因 mRNA 在胚胎发育过程中的表达特性

本研究发现, 在未卵裂前的受精卵中可检测到 *hsp70* 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性。在胚胎发育过程的各个时期都可检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 在低囊胚前各发育阶段, *hsp70* mRNA 一直保持较低表达水平, 在原肠前期开始显著上调表达, 其后保持相对较高表达水平至胚胎孵化出膜期达峰值 ( $P<0.05$ )(图 5)。

表 2 黄条鲮与其他脊椎动物 *hsp70* 基因氨基酸序列同源性分析/%

Tab.2 Homology analysis of amino acid sequences of *hsp70* gene of *S. aureovittata* and other vertebrates /%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	86.1												
3	90.1	85.4											
4	86.5	83.6	83.8										
5	90.0	89.8	86.0	85.2									
6	88.1	83.9	86.3	85.5	85.3								
7	86.4	84.7	85.1	95.5	86.2	85.6							
8	81.1	76.7	79.0	82.7	79.1	80.5	83.3						
9	91.7	85.7	89.3	85.1	89.4	86.7	85.6	80.7					
10	86.5	96.0	85.5	83.3	88.9	83.7	84.1	76.3	85.9				
11	91.5	85.7	88.1	86.0	89.8	85.9	86.0	80.0	94.2	86.3			
12	91.9	85.4	88.5	86.2	89.5	86.2	85.7	80.9	94.4	86.3	98.4		
13	92.0	85.7	88.5	86.0	89.8	86.4	86.0	80.4	94.7	86.3	99.5	98.9	

注: 1. 团头鲂; 2. 加州鲈; 3. 大黄鱼; 4. 小鼠; 5. 斜带石斑鱼; 6. 爪蟾; 7. 牛; 8. 猪; 9. 罗非鱼; 10. 虹鳟; 11. 长背鲮; 12. 高体鲮; 13. 黄条鲮。

Note: 1. *Megalobrama amblycephala*; 2. *Micropterus salmoides*; 3. *Larimichthys crocea*; 4. *Mus musculus*; 5. *Epinephelus coioides*; 6. *Xenopus laevis*; 7. *Bos indicus*; 8. *Sus scrofa*; 9. *Oreochromis mossambicus*; 10. *Oncorhynchus mykiss*; 11. *Seriola lalandi dorsalis*; 12. *Seriola dumerili*; 13. *Seriola aureovittata*.

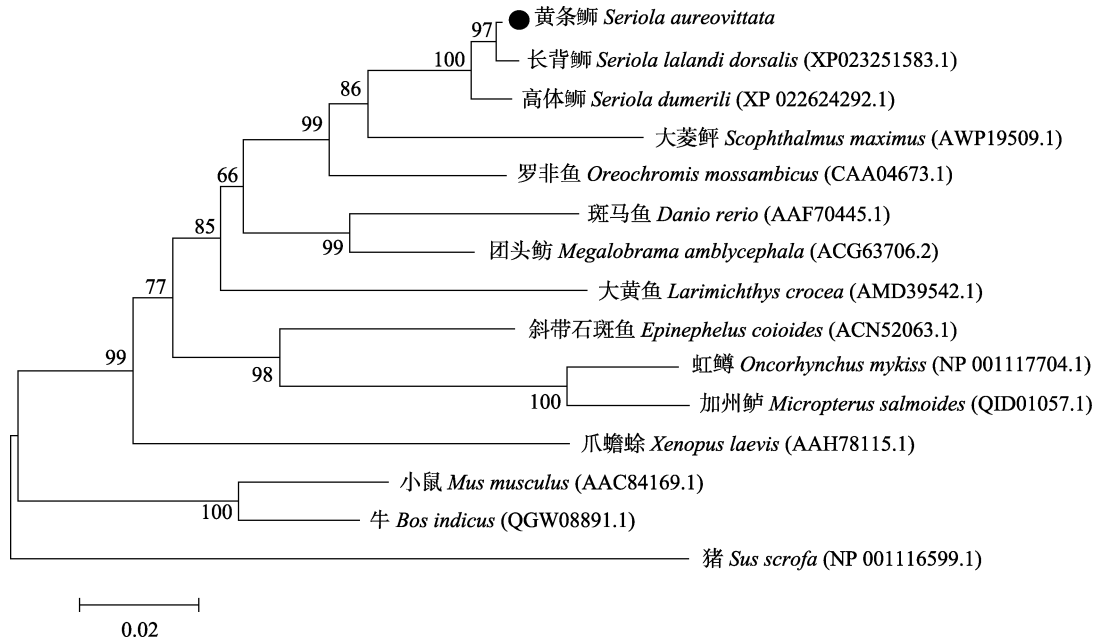


图3 黄条鲷HSP70与其他脊椎动物的NJ系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of HSP70 of *S. aureovittata* and other vertebrates by neighbor-joining method

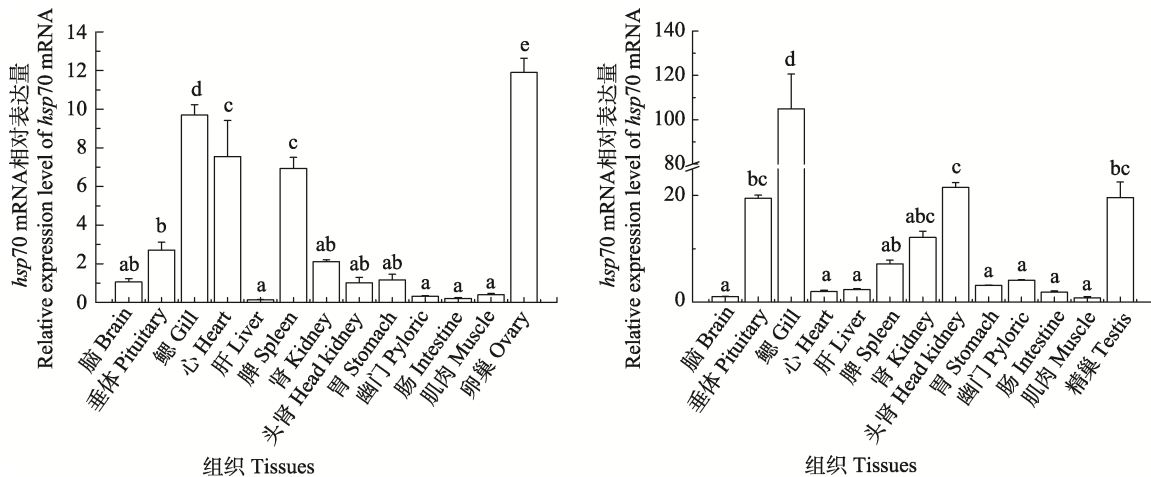


图4 黄条鲷 *hsp70* 基因在雌性(左)和雄性(右)中的组织表达分布特性

Fig.4 The differential spatial expression patterns of *hsp70* mRNA in female (left) and male (right) *S. aureovittata*

### 2.5 黄条鲷 *hsp70* 在仔稚幼鱼生长发育过程中的表达特性

检测了 *hsp70* mRNA 在仔稚幼鱼生长发育过程中的表达变化(图 6)。结果显示, *hsp70* mRNA 在 1 d 仔鱼中高表达,在 4 d 仔鱼中显著降低( $P < 0.05$ ),自 7 d 仔鱼开始显著上调表达至 15 d 仔鱼达峰值( $P < 0.05$ ),在 20 d 仔鱼中显著下降( $P < 0.05$ ),并在 25 d 稚鱼及其后均保持相对较低表达水平。

## 3 讨论

有关 *hsp* 基因家族的研究始于 20 世纪发现了果

蝇(*Drosophila*)的 HSP 蛋白(Ritossa, 1962),其后各种 HSP 家族的功能因子的结构与功能研究逐步深入。HSP70 家族是进化最为保守也是研究最为广泛的 HSPs (Sun *et al*, 2021)。本研究通过同源克隆和 RACE 方法获得了黄条鲷 *hsp70* 基因的全长 cDNA 序列,揭示了其结构特征、系统进化地位以及在胚胎和仔稚幼鱼生长发育过程中的表达调控特性,为鱼类 *hsp70* 基因的生理功能研究添加了新的基础资料。

HSP 家族基因序列高度保守,无论在脊椎动物还是无脊椎动物的不同种属之间均有很高相似性,因此,先前研究认为这些蛋白具有相似的功能(Gething *et al*, 1992)。目前,已有数十种鱼类的 *hsp70* 基因的

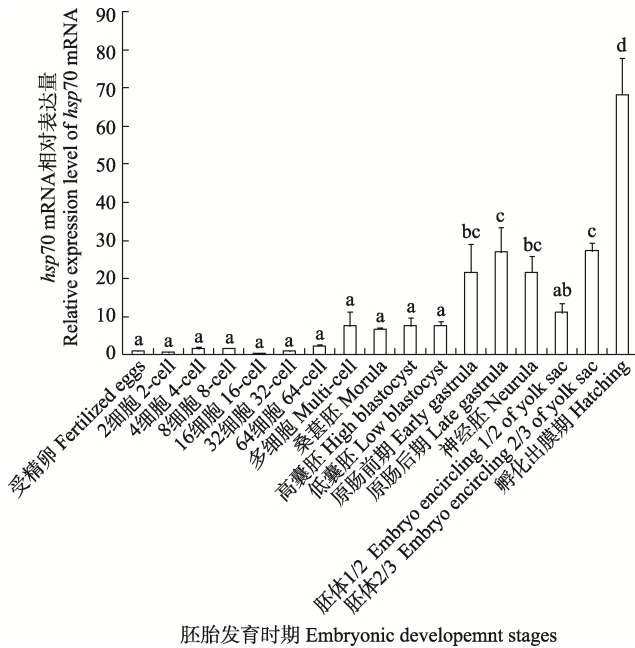


图 5 黄条鲫胚胎发育过程中 *hsp70* mRNA 表达特性  
Fig.5 The temporal expression pattern of *hsp70* mRNA of *S. aureovittata* during embryonic development

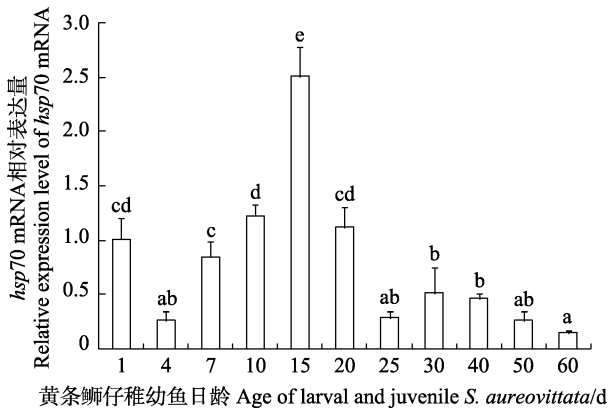


图 6 黄条鲫仔稚幼鱼生长发育过程中 *hsp70* mRNA 表达水平变化

Fig.6 The temporal expression pattern of *hsp70* mRNA of *S. aureovittata* larvae and juveniles

结构和组织表达特性公开报道(Rosic *et al*, 2011; Ma *et al*, 2020)。本研究发现, 黄条鲫 *hsp70* 基因具有真核生物 *hsp70* 家族的典型结构特征, 包括 3 个功能结构域和 3 个典型的 *hsp70* 家族标签基序; 存在非细胞器基序 RARFEEL, 说明它定位于胞质中, 进一步验证了鱼类 *hsp70* 基因的结构保守特性(Sun *et al*, 2021)。在组织表达特性方面, 对杂交黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂) 的研究表明, *hsp70* 基因主要在肝脏中表达, 其次为脑、鳃和肌肉(朱凌威等, 2021)。在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中, *hsp70* 基因主要在脑中表达, 其次为肝胰脏、鳃和肌肉(林亚秋等, 2009)。而淞江鲈

(*Trachidermus fasciatus*) *hsp70* 基因主要在鳃中最高表达, 其次为脑、肌肉和肝脏(刘庆全, 2013)。在鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)中, 以卵巢、肠道和头肾中的表达水平较高(王鹏飞, 2014)。本研究中, 雌性黄条鲫卵巢中 *hsp70* 基因表达最高, 其次为鳃、心和脾脏, 而雄性黄条鲫中鳃组织 *hsp70* 基因显著高表达, 其次为垂体、头肾和精巢, 与其他已报道的鱼类有一定的差异, 表明 *hsp70* 基因的组织表达特性具有典型的物种特异性。更有趣的是, 黄条鲫 *hsp70* 基因的组织表达也具有较为明显的性别二态性, 其具体的生物学意义和生理学功能有待于进一步深入解析。

先前研究表明, 热休克蛋白在动物胚胎发育过程中也起着非常重要的生理作用, 除了作为分子伴侣维持胞内蛋白稳态以外, 还参与组织或器官的形态建成, HSPs 在胚胎发育中的表达具有发育阶段依赖性和组织特异性(Rupik *et al*, 2011)。但有关 *hsp70* 对水生生物胚胎发育的调控作用及机制研究报道较少, 对斑马鱼(*Danio rerio*)的研究表明, 在卵母细胞发生过程中可检测到 *hsp70* 基因表达, 且与胚胎发育过程中晶状体和脑等器官的发生发育密切相关(Evans *et al*, 2005、2007)。本研究中, 黄条鲫未发生卵裂的受精卵中检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性, 这与斑马鱼中 *hsp70* 参与卵母细胞发育过程的结果类似(Rupik *et al*, 2011), 但黄条鲫 *hsp70* 基因主要来自母本还是父本或者父母本双方, 有待于进一步在性腺分化发育过程中的表达检测来验证。另外, 在黄条鲫胚胎发育各阶段均可检测到 *hsp70* 基因的转录表达, 在原肠前期开始显著上调表达直至胚胎孵化出膜期达峰值, 该结果与鳊鱼 *hsp70* 在胚胎发育过程中的表达模式相似(王鹏飞, 2014)。在黄条鲫胚胎发育过程中, 自原肠期原口关闭后, 胚体形成, 其后视囊和晶体等器官相继发生和发育(徐永江等, 2019), *hsp70* 的这种特定发育期的高表达模式表明其可能参与了黄条鲫胚胎发育阶段器官形成发育的调控, 具体的作用及机制有待于进一步研究确证。

在黄条鲫仔稚幼鱼生长发育阶段, *hsp70* 在 1 d 仔鱼中高表达, 这与亲本遗传有关。其后, 在 4 d 仔鱼中显著下调表达, 这一时期是黄条鲫开口由内源性营养向外源性营养过渡的关键时期, 仔鱼初次接触到外源性营养供给, 可能会造成一定的生理适应性的改变, 而 *hsp70* 的下调表达特性也表明其可能参与了内外营养转化过程的生理适应调控。黄条鲫 7 d 仔鱼已完全积极地摄食外源营养, 鳔已充气, 10~15 d 仔鱼消化系统发育完全、生长加速, 且 15 d 仔鱼尾椎开始完全准备进入变态期(徐永江等, 2019), 这一时期

*hsp70* 的高表达可能提示其在黄条鲮变态前期摄食与生长发育过程中起着重要的生理调控作用, 具体的途径与机制有待于深入研究。黄条鲮 20 d 仔鱼进入变态期, 至 25 d 变态完成进入稚鱼期, 此时的苗种各种表观器官发育更为完善且生长更为迅速, 而 *hsp70* 显著下调表达, 表明其在变态期和变态完成后的调控作用发生变化。下一步, 本实验室将借助基因敲降等手段深入探究黄条鲮胚胎发育过程中 *hsp70* 基因对器官发生发育的调控作用与生理机制。

### 参 考 文 献

- ABHA G, ANKUSH B, KAZUE H. HSP70 and HSP90 in neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*, 2020, 716: 134678
- DEANE E E, WOO N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(1): 9–15
- EVANS T G, YAMAMOTO Y, JEFFERY W R, *et al.* Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 101: 66–78
- EVANS T G, BELAK Z, OVSENEK N, *et al.* Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 146(1): 131–140
- GETHING M J, SAMBROOK J. Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, 355: 33–45
- HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–579
- HEREDIA P. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(4): 552–556
- HANGZO H, BANERJEE B, SAHA S, *et al.* Ammonia stress under high environmental ammonia induces Hsp70 and Hsp90 in the mud eel, *Monopterus albus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 43: 77–88
- LIN Y Q, ZHEN Y C, JI H. Partial sequence cloning of HSP70 gene and differences in tissue expression in grass carp. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(4): 67–71 [林亚秋, 郑玉才, 吉红. 草鱼 HSP70 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异. *淡水渔业*, 2009, 39(4): 67–71]
- LIU J, CHEN Y X, MA L. Yellow Sea and Bohai Sea fish atlas. Beijing: Science Press, 2015, 172 [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志. 北京: 科学出版社, 2015, 172]
- LIU Q Q. A preliminary study on the cloning and expression of the full sequence of *Trachidermus fasciatus* Heckel HSP70. Master's Thesis of Fudan University, 2013, 25–27 [刘庆全. 淞江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel) HSP70 全序列的克隆及其表达的初步研究. 复旦大学硕士研究生学位论文, 2013, 25–27]
- MA F, LUO L. Genome-wide identification of Hsp70/110 genes in rainbow trout and their regulated expression in response to heat stress. *PeerJ*, 2020, 8: e10022
- RITOSSA F. A new pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18: 571–573
- ROSIC N N, PERNICE M, DOVE S, *et al.* Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: Possible implications for coral bleaching. *Cell Stress and Chaperones*, 2011, 16(1): 69–80
- RUPIK W, JASIK K, BEMBENEK J, *et al.* The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 159(4): 349–366
- SUN Y, WEN H, TIAN Y, *et al.* HSP90 and HSP70 families in *Lateolabrax maculatus*: Genome-wide identification, molecular characterization, and expression profiles in response to various environmental stressors. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 784803
- SURAJIT S, DHRUBA S, RENU Y, *et al.* Heat shock proteins: Molecules with assorted functions. *Frontiers in Biology*, 2011, 6(4): 312–327
- WANG P F. Cloning and expression of heat shock proteins and hypoxic reaction genes in *Siniperca chuatsi*. Doctoral Dissertation of Sun Yat-Sen University, 2014 [王鹏飞. 鳊热休克蛋白和低氧反应基因的克隆和表达研究. 中山大学博士研究生学位论文, 2014]
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Early growth and development characteristics of *Seriola lalandi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172–182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲮早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172–182]
- ZHANG C L. Fish survey report of the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 1955, 116–119 [张春霖. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 1955, 116–119]
- ZHU L W, ZHANG C Y, LIU Z, *et al.* Cloning, expression and tissue expression of the core sequence of *hsp70* gene in *Pelteobagrus fulvidraco* and its tissue expression under high temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 47–55 [朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 等. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 47–55]

## Molecular Cloning and Temporal Expression Pattern of *hsp70* Gene During the Early Life Stages of *Seriola aureovittata*

FANG Lu<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>2①</sup>, CUI Aijun<sup>2</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>, ZHOU Heting<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>2</sup>

(1. School of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

**Abstract** *Seriola aureovittata* is a long-distance migratory oceanic species belonging to the Carangidae family; it is also known as yellowtail kingfish. It inhabits temperate and subtropical marine waters worldwide. We reached a significant breakthrough in *S. aureovittata* seedlings production in 2017, enabling current massively juvenile rearing in China, which became a promising candidate for the farming industry, especially for the rapidly growing open ocean aquaculture. However, sudden larvae death caused by environmental changes-related stresses during the early life stages of *S. aureovittata* leads to great losses. Thus, exploring the physiological mechanism of larvae responses to environmental stresses during seedlings' production under artificial breeding conditions is urgently needed. Heat shock proteins (HSPs) play an important function in the physiological regulation of stress and immune responses in vertebrates, including fish. HSP70 is a member of the HSPs family studied in dozens of fish species, with physiological roles in protein homeostasis, DNA protection, and stress tolerance enhancement, among others. To investigate the possible physiological effects of HSPs on early growth and development of *S. aureovittata*, we cloned and obtained the full-length cDNA sequence of the *hsp70* gene. Furthermore, the structure and spatial and temporal expression patterns of *hsp70* during embryonic development, larval and juvenile growth and development of *S. aureovittata* were determined. The results showed that the full-length cDNA sequence of the *hsp70* gene contains 2 332 bp, wherein the 5'-UTR is 187 bp, the ORF is 1 920 bp, and the 3'-UTR is 225 bp in length. A 639 amino acids protein with a molecular weight of 70.1 kDa is encoded by *hsp70*. The *hsp70* spatial expression exhibited a sex dimorphism pattern, with significantly high expression levels in the gill, heart, spleen, and ovary in females, whereas in males, the significantly high expression levels were found in the pituitary, gill, head kidney, and testis. Notably, the highest *hsp70* expression levels were observed in the ovary of females and the testis of males. During the *S. aureovittata* embryonic development, the *hsp70* mRNA was detected in fertilized eggs before cleavage, indicating that *hsp70* is parentally inherited. Additionally, the *hsp70* mRNA could be detected at all stages of embryonic development, wherein the lowest expression levels were observed before the low blastula stage, with a significant increase at the early gastrula stage maintained until the hatching stage. The high levels of *hsp70* mRNA were detected in one-day-old larva, which decreased in four-day-old larva, followed by an increase in 15-day-old larva. Remarkably, the *hsp70* mRNA level once again decreased in 20-day-old larva, maintaining an average level until 60-day-old juveniles. The results from the present study may provide insights into the origin and physiological function of *hsp70* during the early life stages of *S. aureovittata*.

**Key words** *Seriola aureovittata*; *hsp70*; Gene cloning; Expression and regulation; Early life stages

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220418002

http://www.yykxjz.cn/

王琳, 王滨, 徐永江, 关长涛. 黄条鲮白介素-1 $\beta$  基因克隆及其免疫应答分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 64–73  
WANG L, WANG B, XU Y J, GUAN C T. Two putative interleukin-1 beta molecules involved in the immune response of *Seriola aureovittata*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 64–73

## 黄条鲮白介素-1 $\beta$ 基因克隆及其免疫应答分析\*

王琳<sup>1,2</sup> 王滨<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1,2①</sup> 关长涛<sup>1,2</sup>

(1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;  
2. 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能研究室 山东 青岛 266237)

**摘要** 白介素-1 $\beta$  是一种典型的促炎细胞因子, 参与调控免疫细胞增殖、分化和凋亡等过程。本研究从黄条鲮(*Seriola aureovittata*)中鉴定到 2 个白介素-1 $\beta$  分子(分别命名为 *SalL-1 $\beta$ 1* 和 *SalL-1 $\beta$ 2*)。 *SalL-1 $\beta$ 1* 全长 cDNA 序列为 1 292 bp, 开放阅读框长度为 828 bp, 编码 275 个氨基酸; *SalL-1 $\beta$ 2* cDNA 序列为 1 337 bp, 开放阅读框长度为 960 bp, 编码 319 个氨基酸。 *SalL-1 $\beta$ 1* 和 *SalL-1 $\beta$ 2* 编码的蛋白均含有 IL-1 保守的结构域和 12 个  $\beta$  折叠, 具有结构上的保守性。组织表达分布显示, *SalL-1 $\beta$ 1* 在头肾中表达量最高, 脾脏和肝脏次之; 而 *SalL-1 $\beta$ 2* 在鳃中表达量最高, 头肾和脾脏次之。脂多糖(LPS)刺激后, *SalL-1 $\beta$ 1* 和 *SalL-1 $\beta$ 2* 在头肾和脾脏中的表达量均显著增加。在头肾中, LPS 刺激后 6 h, *SalL-1 $\beta$ 1* 急剧上升至对照组的 10.03 倍( $P < 0.05$ ), 随后逐渐回落, 在 12、24、48、72 h 分别为对照组的 7.15、4.09、2.71、3.03 倍( $P < 0.05$ ); 在刺激后 6 h, *SalL-1 $\beta$ 2* 表达量急剧上升至对照组的 11.49 倍( $P < 0.05$ ), 最后逐渐回落, 48 h 恢复至正常水平, 72 h 下降至对照组的 0.29 倍( $P < 0.05$ )。脾脏中, LPS 刺激后 6 h, *SalL-1 $\beta$ 1* 表达量急剧上升至对照组的 6.59 倍( $P < 0.05$ ), 随后逐渐回落; *SalL-1 $\beta$ 2* 转录水平表达模式与 *SalL-1 $\beta$ 1* 相似。综上, 本研究在黄条鲮中鉴定了 2 种白介素-1 $\beta$  分子, 并探讨了其在免疫应答中的表达规律, 为研究白介素-1 $\beta$  分子在黄条鲮抗菌免疫中的作用提供了基础。

**关键词** 白介素-1 $\beta$ ; 免疫应答; 细胞因子; 黄条鲮

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0064-10

白介素-1 (IL-1)家族是调节免疫系统炎症反应的重要细胞因子, 在哺乳动物中, 该家族包含 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-1Ra、IL-36Ra、IL-38 和 IL-17 等 11 个成员(Wang *et al*, 2013), 按功能主要分为三类, 分别为具有促炎活性的细胞因子、天然受体拮抗剂和抗炎细胞因子(Dinarello, 2018)。IL-1 $\beta$  作为一个典型的促炎细胞因子, 广泛存在于后生动物中, 在病原感

染引起的免疫防御中发挥重要作用。哺乳动物成熟的 IL-1 $\beta$  蛋白由 IL 前体和 IL1 两个结构域构成, 12 个  $\beta$  折叠片折叠形成三叶草状结构, 其 C-末端含有 IL-1 家族的特征基序(Dinarello, 2013)。正常情况下, IL-1 $\beta$  以无活性的前体形式存在于细胞基质中, 当接收到外界刺激信号后, IL-1 $\beta$  前体经半胱氨酸蛋白酶-1 (caspase-1)特异性切割, 形成具有生物学活性的成熟

\* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM300001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD51; 2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。王琳, E-mail: wanglin@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-04-18, 收修改稿日期: 2022-05-09

IL-1 $\beta$ , 通过非经典分泌途径从细胞中释放出来(Wewers *et al*, 1997)。IL-1 $\beta$ 与受体结合后,通过衔接蛋白髓样分化因子(MyD88)激活下游的白介素1受体相关激酶(IRAKs)和肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF6),调控核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)等转录因子的激活,进而在机体免疫应答、炎症响应、代谢调节、肿瘤转移等一系列生理过程中发挥作用(Dinarelo, 2018)。

IL-1 $\beta$ 的结构和功能在进化中较为保守。目前,已在多种鱼类中鉴定出IL-1 $\beta$ 基因,且发现在新真骨鱼亚群、原棘鳍总目等鱼类中存在1个以上的IL-1 $\beta$ 亚型(Engelsma *et al*, 2003; Zou *et al*, 1999)。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、神经坏死病病毒(VNNV)和寄生性血内鞭毛虫(*Trypanoplasma borreli*)感染能够引起鱼类IL-1 $\beta$ 表达响应(Wu *et al*, 2015; Pleguezuelos *et al*, 2000; Wu *et al*, 2019)。个体注射重组IL-1 $\beta$ 蛋白能够增强鱼类单核/巨噬细胞迁移和吞噬活性,抑制细菌增殖(Gao *et al*, 2019; Hong *et al*, 2003)。在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中使用重组IL-1 $\beta$ 作为佐剂可增强疫苗注射后的免疫应答,提高抗体效价(Guo *et al*, 2018; Taechavasonyoo *et al*, 2013)。

黄条鲮(*Seriola aureovittata*)肉质鲜嫩,具有极大的消费市场潜力(Wang *et al*, 2021)。目前,黄条鲮的人工繁育和养殖技术已日渐成熟,但其疾病防控技术尚待完善(Purcell *et al*, 2018)。本研究通过RACE克隆获得黄条鲮SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的cDNA全长,并基于序列特征进行了生物信息学分析,进而通过荧光定量PCR(qRT-PCR)技术对SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的组织分布和免疫应答模式进行了探究,以为黄条鲮疾病综合防控技术提供基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用黄条鲮(平均体重约430 g)于实验1周前购自辽宁省大连富谷水产有限公司,置于18~25℃、盐度20~23、pH 8.0~8.3的无菌海水中暂养,期间持续充氧,并投喂商品化基础饲料以维持良好状态。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物刺激实验、样品收集** 将40尾黄条鲮随机等分为2组,MS222麻醉后称重,实验组按照1  $\mu$ g/g体重注射脂多糖(LPS),对照组注射磷酸盐缓冲液(PBS),分别于6、12、24、48、72 h后每组随机取4尾鱼,解剖取头肾和脾脏组织,保存于液氮中,

用于总RNA提取。此外,取对照组黄条鲮的脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃组织保存于液氮中,用于基因克隆和组织表达分析。

**1.2.2 总RNA提取和cDNA合成** 采用Trizol法提取上述黄条鲮各组织样品总RNA。通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,使用NanoDrop2000定量并调整至相同浓度备用。以黄条鲮9个组织混合RNA为模板,使用SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa),按照说明书操作步骤分别合成5'RACE及3'RACE cDNA,用于基因片段克隆。使用Primer Script<sup>TM</sup> RT Master Mix试剂盒(TaKaRa)将黄条鲮LPS刺激实验的组织RNA分别反转录为cDNA,用于不同组织及LPS不同时期基因表达情况的检测。

### 1.2.3 SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2基因的克隆与测序

根据NCBI基因组数据库中注释的基因序列信息,使用Primer Premier 5.0软件设计SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的特异引物(表1),并利用ExTaq高保真酶进行扩增。扩增体系(25  $\mu$ L): ExTaq酶0.15  $\mu$ L, cDNA模板1  $\mu$ L, 正反向引物各1  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 2.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.85  $\mu$ L。反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸3 min 40 s, 35个循环。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收目的条带连接T载体并转化至克隆菌pMD19-T,挑取阳性单克隆菌株,送生工生物(上海)股份有限公司进行测序。

**1.2.4 基因序列分析** 利用DNAMAN对SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的氨基酸序列进行序列比对;利用SMART软件预测SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的蛋白结构域;利用在线蛋白分析软件(<https://www.expasy.org>)预测蛋白分子量和等电点;通过SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2蛋白的三级结构;通过NCBI查找相关脊椎动物IL-1氨基酸序列(表2),利用SeaView4软件(Gouy *et al*, 2010)采用最大似然法构建进化树。

**1.2.5 qRT-PCR** 根据SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2序列设计qRT-PCR引物,选用18S rRNA作为内参基因进行qRT-PCR扩增。反应条件: 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 45 s, 40个循环。每个待测样品均设置3次重复,保证准确性。实验得到的数据采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法处理数据,经计算得到SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的相对表达量(Schmittgen *et al*, 2008)。

**1.2.6 数据分析** 本实验所涉及数据的差异性分析均利用SPSS软件,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较。所有数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)(n=3)表示, P<0.05为差异显著。

表1 本研究用到的引物序列

Tab.1 Nucleotide sequence of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
SaIL-1 $\beta$ 1-F1	TTCACTCTCATCAGTCTACATCAGG	SaIL-1 $\beta$ 1 核心序列扩增
SaIL-1 $\beta$ 1-R1	GTACCCTCAGCATCTGGATACATTA	SaIL-1 $\beta$ 1 core sequence
SaIL-1 $\beta$ 2-F1	CAGACCTTCTCAATTCAGAAAAAG	SaIL-1 $\beta$ 2 核心序列扩增
SaIL-1 $\beta$ 2-R1	CCAAATTAGTTACAAGGCTTATTA	SaIL-1 $\beta$ 2 core sequence
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Universal primer
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Universal primer
SaIL-1 $\beta$ 1-R334	GGCGTCCGCAACCGTCTTCACAAC	5'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 1-R220	GTTACCCGCCATCACCAGCGTAGC	5'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 1-F197	GCTACGCTGGTGATGGCGGTGAAC	3'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 1-F385	CACCCTGAGCGACACCCAGAAGAA	3'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 2-R761	GGGTGCCAGTCTACATTCAGTAAGGGG	5'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 2-R416	GTGCTGGGTAAAGGTGGCAAGTAGGT	5'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 2-F735	CCCCTTACTGAATGTAGACTGGCACCC	3'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 2-F227	GTGCTTTTCAAATCCACCAAGTCAGTT	3'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 1-F2	GTCACTCTGAAAGGAGGATACGCCG	qRT-PCR
SaIL-1 $\beta$ 1-R2	GACGCAGGAGAGGTAGAACTTGTGG	
SaIL-1 $\beta$ 2-F2	TGGAGACAGTGGAGGACAAAAGC	qRT-PCR
SaIL-1 $\beta$ 2-R2	AGGGAAGGAGGCAGACATGAAAG	
18S-F	TACCACATCCAAAGAAGGCA	内参基因
18S-R	TCGATCCCCGAGATCCAATA	Reference gene

## 2 结果

### 2.1 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 的编码序列分析

以黄条鲮脑、肝脏和肌肉等混合组织为模板,扩增得到候选白介素基因序列,分别命名为 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2*, *SaIL-1 $\beta$ 1* 基因全长 cDNA 为 1 292 bp, 其中, 5'UTR 为 25 bp, 3'UTR 为 439 bp, 编码区长度为 828 bp, 编码 275 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 30.75 kDa, 理论等电点为 6.14 (图 1)。SMART 保守结构域分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 第 121~268 个氨基酸区域构成 IL-1 结构域(图 3a)。*SaIL-1 $\beta$ 2* 基因全长 cDNA 序列为 1 337 bp, 其中, 5'UTR 为 122 bp, 3'UTR 为 255 bp, 编码区长度为 960 bp, 编码 319 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 36.66 kDa, 理论等电点为 6.40 (图 2)。SMART 保守结构域分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 第 91~245 个氨基酸区域构成 IL-1 结构域(图 3b)。通过 SWISS-MODEL 网站预测获得, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 蛋白均为由 12 个  $\beta$  折叠构成的三叶草结构(图 4)。

### 2.2 氨基酸多序列比对与系统进化分析

*SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 蛋白序列与其他物种的同源性分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 与高体鲮(*Seriola dumerili*,

XP\_022625284.1)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*, XP\_035481228.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, KAE8285371.1)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP\_005457944.1)蛋白的相似性分别为 87.04%、53.01%、50.55%和 47.58%。*SaIL-1 $\beta$ 2* 与高体鲮(BAT57261.1)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*, AZL87291.1)、大菱鲂(XP\_035496710.1)和大黄鱼(KAE8291795.1)蛋白的相似性分别是 97.25%、77.43%、65.18%和 60.16%。氨基酸多序列比对揭示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 的 C 端均含有 IL-1 超家族典型的 [FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-P-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM]基序(图 5)。进化树分析结果表明, 脊椎动物 IL-1 $\beta$  蛋白分为两支, 哺乳动物、爬行动物和鸟类聚为一支, 鱼类聚为一支, *SaIL-1 $\beta$ 1* 与高体鲮 IL-1 $\beta$  亲缘关系较近, *SaIL-1 $\beta$ 2* 与卵形鲳鲹 IL-1 $\beta$  亲缘关系较近(图 6)。

### 2.3 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在不同组织中的表达分布

通过 qRT-PCR 检测 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在黄条鲮脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃中的表达水平。结果显示, 9 种组织中均检测到 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 转录水平表达。其中, *SaIL-1 $\beta$ 1* 在头肾中表达量最高, 脾脏和肝脏次之, 随后依次是鳃、心脏、胃、垂体、肌肉和脑(图 7a)。*SaIL-1 $\beta$ 2* 在

```

aagc agt ggt atc aac gca gag tac atg gga gtc tac atc agg aca atg tgc gac ttt gat 61
                                     M G V Y I R T M C D F D 12
ctg gct caa gct ctg gac agt cct ctg gga ttc gac gat aca gga cct gaa tcc cgc tgc 121
L A Q A L D S P L G F D D T G P E S R C 32
ttc gac atg acg gat gtt aaa aaa gag atc atc aac ctc gac acg gga ctg aac ctg gag 181
F D M T D V K K E I I N L D T G L N L E 52
att tcc tgc aac cca aaa acc atg aag agc gtc gct acg ctg gtg atg gcg gtg aac agg 241
I S C N P K T M K S V A T L V M A V N R 72
atg aaa aag tcc ccg act cgc agc agc tgg gag ctg aga ggc gac gag ctc tgc agc gtg 301
M K K S P T R S S W E L R G D E L C S V 92
atc atg gac agc ctg gtg gac gaa acg gtt gtg aag acg gtt gcg gac gcc acc acg gga 361
I M D S L V D E T V V K T V A D A T T G 112
cag aga agc atc aag ttc gta cgc gcc cga agc gag gag tgc acc ctg agc gac acc cag 421
Q R S I K F V R A R S E E C T L S D T Q 132
aag aaa gac atc atc tgc acc ccg gga gat tta aaa ctg cag gcc gtc act ctg aaa gga 481
K K D I I C T P G D L K L Q A V T L K G 152
gga tac gcc gat cgc aaa gtg aat ttt aaa ctg gtg aag tac atc tcc att ggt gcc ggg 541
G Y A D R K V N F K L V K Y I S I G A G 172
cag acg ttt gtt ctg tca atc aaa aat gac cac agc cac aag ttc tac ctc tcc tgc gtc 601
Q T F V L S I K N D H S H K F Y L S C V 192
aag aac agc aac aat gct gag ctg cat ctg gag gaa tgc agt gag gac gat ata aga aac 661
K N S N N A E L H L E E C S E D D I R N 212
gac atg gac cgt ttc ctc ttc gaa aag aaa tta tca gga aaa tct cag acc agc ttc gag 721
D M D R F L F E K K L S G K S Q T S F E 232
tcc gtt aag cac cgc ggc tgg ttc atc agc acg tct gag agc gag aac cag cca gtg gag 781
S V K H R G W F I S T S E S E N Q P V E 252
ctg tgt caa ata gac agc gcc cag cgt gtc acc tcc ttc aac gtc agc tca aaa aag cct 841
L C Q I D S A Q R V T S F N V S S K K P 272
ctg att ggc tga agc agc tgt gta cag tta cag ttt aat gta tcc aga tgc tga ggg tac 901
L I G * 275
ttt tta ttt taa aac ttt ttt att tta cct gac ccc tag atg gag taa tcc cct gca gga 961
tga taa taa ttc agt gta acc tac taa aag aga ctt taa ctt tat att att tta ccc tga 1021
ggc aaa atg atg tga aat ttg tat ttt ttt tac tgg gga atg taa cag gat att cct aaa 1081
atc tgc ttc cat ttt taa tta tta ttt ccc ctt aac tta act tca tta ttg att gtc cgt 1141
tgt tac taa ata tgc cat tgt cat ttt taa gtg cat gta aaa aat tac gtt att att tgc 1201
tgt ttt aat aaa cat caa ata tgt gtt tgt tta aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa 1261
aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa a 1292

```

图 1 黄条鲮 *SalL-1 $\beta$*  基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SalL-1 $\beta$*  in *S. aureovittata*

小写字母为核苷酸序列, 大写字母为推导的氨基酸序列, 阴影表示起始密码子和终止密码子;  
下划线表示保守结构域; 双下划线表示 polyA 信号。

Lowercases indicate the nucleotides, and uppercases indicate the amino acids. Shadow indicates the start and stop codons.  
Underline indicates the conserved domain. Double underline indicates the polyA tail sequence.

鳃中表达量最高, 头肾和脾脏次之, 随后依次是心脏、胃、垂体、肌肉、肝脏和脑(图 7b)。

#### 2.4 LPS 刺激后黄条鲮免疫组织中 *SalL-1 $\beta$* 和 *SalL-1 $\beta$ 2* 的表达

在 LPS 刺激后的黄条鲮头肾中, *SalL-1 $\beta$*  各时间点转录水平表达均显著高于对照组, 在 LPS 刺激后

6 h, *SalL-1 $\beta$*  急剧上升至对照组的 10.03 倍( $P < 0.01$ ), 随后逐渐回落, 在 12、24、48、72 h 分别为对照组的 7.15、4.09、2.71、3.03 倍( $P < 0.05$ )(图 8a)。*SalL-1 $\beta$ 2* 转录水平呈现出先上升后下降的趋势, 在 LPS 刺激后 6 h, 急剧上升至对照组的 11.49 倍( $P < 0.05$ ), 最后逐渐回落, 48 h 恢复至正常水平, 72 h 下降至对照组的 0.29 倍( $P < 0.05$ )(图 8b)。

```

aa 2
gca gtg gta tca acg cag agt aca tgg gga gaa caa cac tga cag gac aag ctt aac caa 62
gaa cag taa aac aac ttc ttc tct act gac ttc aac aga cct tcc tca att cag aaa aag 122
atg gaa tcc gag atg aaa tgc aac ttg agc gag atg tgg agc tcc aag atg ccc aag gga 182
M E S E M K C N L S E M W S S K M P K G 20
ctg gac ctg gag atc tcc cat cat cca atg aca atg agg cgt gtg gcc aac ctc atc atc 242
L D L E I S H H P M T M R R V A N L I I 40
gcc atg gag agg ctg aag gcc ggc aca tca gag tca gtg ctg agc acc gag ttc aga gat 302
A M E R L K A G T S E S V L S T E F R D 60
gaa aac ctg ctc aac atc atg atg gag aac atg gtg gaa gag cgt gtt atg ttc gag tgc 362
E N L L N I M M E N M V E E R V M F E C 80
ttt tca aat cca cca agt cag ttc agg agg aca tgt cag cac cag tgc agt gtg acc gac 422
F S N P P S Q F R R T C Q H Q C S V T D 100
agc cag cag aga cac tta gtt agg gac tta aac agc atg gag ctc aac gca gtg acg ctg 482
S Q Q R H L V R D L N S M E L N A V T L 120
caa gcc ggc agt gaa aac cac aaa gtg cat ctg acc atg tgg acc tac ttg cca cct tta 542
Q A G S E N H K V H L T M S T Y L P P L 146
ccc agc acc gag gcc aag gcc aga cct gtg gct ctg tgc att aaa gac aca aat atc tac 602
P S T E A K A R P V A L C I K D T N I Y 160
ttg tca tgc cac atg gac ggt gac atg cca acc ctg aac ctg gag aca gtg gag gac aaa 662
L S C H M D G D M P T L N L E T V E D K 180
agc agt ctg ctg agg atc agc tct gac agc gat ctg gtg cga ttt ctg ttc tac acc cag 722
S S L L R I S S D S D L V R F L F Y T Q 200
gtc agc gga ctg aac gtc acc act ttc atg tct gcc tcc ttc cct gac tgg tac atc agc 782
V S G L N V T T F M S A S F P D W Y I S 220
aca gca gag gaa gac aac aag cca gtt gat atg tgc acg gag acc gac aac cgc tac aga 842
T A E E D N K P V D M C T E T D N R Y R 240
acc ttc aac atc cgg tca aag aca ccc ctt act gaa tgt aga ctg gca ccc ggg gtc atg 902
T F N I R S K T P L T E C R L A P G V M 260
aga ggc gct ctt aaa gag aac atc ttg gta ttg aac aga atg caa aag tta ttg tat ttt 962
R G A L K E N I L V L N R M Q K L L Y F 280
aga tgt ttt gat tca gat aat cag cta caa aga tgt aat ttt cta cca ctg tet gcg aga 1022
R C F D S D N Q L Q R C N F L P L S A R 300
aag act tct gca agt ttt aca gag tgc cta ttt act gta tgt acc aag tac aga aag tga 1082
K T S A S F T E C L F T V C T K Y R K * 319
aat tet aag tgt att gac ata gtc aaa tat cac cac aag gtg aca ttg ttg tgc tga ctg 1142
gtg agc acc ttg tgt att tac atg aca cac tct taa tgc ttt tat cta ttt att cat tta 1202
ttt atc tat tta tgc acc att tta aca tat gta ttt att tgg aaa tct gct ttc taa caa 1262
tta ttt aaa tga tgt tca aca aat ctt taa taa agc ctt gta act aaa aaa aaa aaa 1322
aaa aaa aaa aaa 1337

```

图 2 黄条鲷 *SaIL-1β2* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SaIL-1β2* in *S. aureovittata*

小写字母为核苷酸序列，大写字母为推导的氨基酸序列，阴影表示起始密码子和终止密码子；  
下划线表示保守结构域；双下划线表示 polyA 信号。

Lowercases indicate the nucleotides, and uppercases indicate the amino acids. Shadow indicates the start and stop codons.  
Underline indicates the conserved domain. Double underline indicates the polyA tail sequence.

在 LPS 刺激后的黄条鲷脾脏中, *SaIL-1β1* 转录水平显著升高, 在 LPS 刺激后 6 h, *SaIL-1β1* 急剧上升至对照组的 6.59 倍 ( $P < 0.05$ ), 随后逐渐回落, 在 12、24、48 h 分别为对照组的 3.85、4.09、2.17、2.65 倍 ( $P < 0.05$ ), 72 h 恢复正常水平(图 8c)。 *SaIL-1β2* 转录水平表达模式与 *SaIL-1β1* 相似, 在 6、12、24、48 h

分别为对照组的 7.25、3.20、2.02、1.59 倍, 72 h 恢复至正常水平(图 8d)。

### 3 讨论

本研究在黄条鲷中克隆获得了 *SaIL-1β1* 和 *SaIL-1β2* 两个基因, 分别编码 275 和 319 个氨基酸。



经预测, 2 个蛋白均不含信号肽, 具有白介素-1 结构域并含有 12 个  $\beta$  折叠片。与其他脊椎动物相同, 鱼类 IL-1 $\beta$  蛋白在前体阶段被半胱天冬-1 酶分解后分泌

至细胞外, 因此, 分解过程无信号肽参与(Wewers *et al*, 1997)。SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 两个蛋白含有的 12 个  $\beta$  折叠是成熟 IL-1 $\beta$  的典型特征, 可能形成对受体结合至关重要的  $\beta$  三叶草结构。高等脊椎动物 IL-1 $\beta$  由 IL1 前体结构域和 IL1 结构域组成(Dinarelllo, 2013)。已有研究提出, 部分鱼类物种中缺少的 IL1 前体结构域功能性较弱, 且其保守性远低于 IL1 结构域(Hailey *et al*, 2009)。哺乳动物 IL-1 超家族的 C 端经典基序为[FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-P-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM] (Bird *et al*, 2002), 多序列比对结果显示, IL-1 $\beta$  的 C 端典型基序在 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$  蛋白中均存在, 但在黄条鲮中存在细微变异, 为[FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-[PRS]-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM]形式。相较于哺乳动物 IL-1 $\beta$ , 鱼类的 IL-1 $\beta$  存在基因多态性(Eggestøl *et al*, 2020; Engelsma *et al*, 2003), 本研究在黄条鲮中发现了 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 两种亚型, 可能与鱼类基因组复制有关。进一步分析脊椎动物 IL-1 $\beta$  分子的进化关系, 结果表明, 鱼类的 IL-1 $\beta$  分子发生了独立复制, 单独聚为一支, 而在鱼类中 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 分属于 2 个分支, 其中, SaIL-1 $\beta$ 1 与高体鲮 IL-1 $\beta$  进化关系最近, SaIL-1 $\beta$ 2 与卵形鲳鲹进化关系最近。以上结果表明, SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 基本具有脊椎动物 IL-1 $\beta$  的结构特征, 可能属于白介素-1 超家族成员。

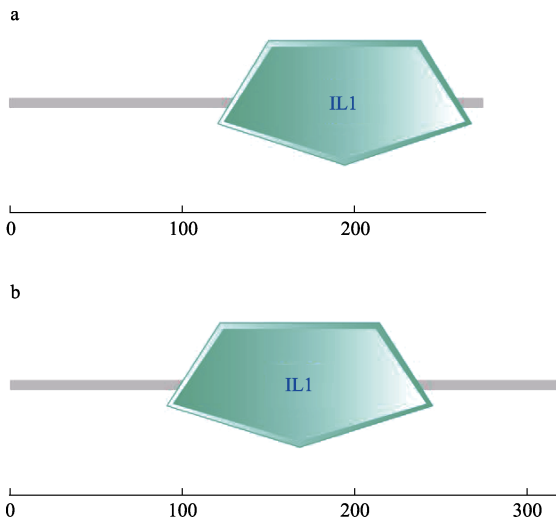


图 3 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白结构域预测  
Fig.3 The predicted domain of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2

a: SaIL-1 $\beta$ 1 结构域; b: SaIL-1 $\beta$ 2 结构域  
a: Domain of SaIL-1 $\beta$ 1; b: Domain of SaIL-1 $\beta$ 2

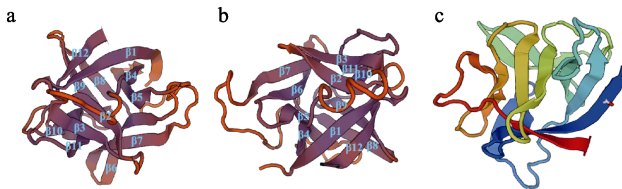


图 4 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白三级结构预测  
Fig.4 The tertiary structure of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2

a: SaIL-1 $\beta$ 1 蛋白; b: SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白;  
c: 人类 IL-1 $\beta$  蛋白  
a: SaIL-1 $\beta$ 1 protein; b: SaIL-1 $\beta$ 2 protein;  
c: Human IL-1 $\beta$  protein

表 2 序列比对及进化树构建所用 IL-1 $\beta$  蛋白序列  
Tab.2 The amino acid sequences of IL-1 $\beta$  used in multi-sequence alignment and phylogenetic analyses

物种名 Species	NCBI Accession No.
智人 <i>Homo sapiens</i>	AAA74137.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	EDL28238.1
绿海龟 <i>Chelonia mydas</i>	XP_007066079.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_989855.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAI70521.1
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005457944.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	KAE8285371.1
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	XP_035481228.1
高体鲮 <i>Seriola dumerili</i>	XP_022625284.1
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	AZL87291.1

IL-1 $\beta$  是一种重要的促炎症细胞因子, 在免疫响应中起着重要的调节作用(Dinarelllo, 2018)。本研究显示 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 mRNA 在脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃组织广泛表达, 表明 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 可能广泛参与机体各种生理活动, 其中 SaIL-1 $\beta$ 1 在头肾、脾脏、肝脏和鳃中表达较高, 而 SaIL-1 $\beta$ 2 主要在鳃、头肾、脾脏和心脏中表达较高, 在肝脏中较少。头肾和脾脏是鱼类主要的免疫器官, 鳃是鱼类接触水环境微生物的主要器官, 其中的黏膜中含有大量的 T 淋巴细胞抵御病原感染(Klosterhoff *et al*, 2015)。以上结果暗示了 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 在黄条鲮免疫响应中具有重要作用。

头肾和脾脏是硬骨鱼类免疫细胞产生和分化的重要器官(Kumar *et al*, 2016)。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分, 能够模拟细菌感染、激活机体炎症信号通路、诱导炎症因子的释放(Lu *et al*, 2008)。为探究 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 是否参与黄条鲮免疫应答, 本研究检测了 LPS 刺激后黄条鲮头肾和脾脏中 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 转录水平时序变化。qRT-PCR 结果显示, SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 均在 LPS 刺激后大量表达, 且在刺激 6 h 时表达量最高, 达到对照组的 10 倍以上。斑马鱼和大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼类



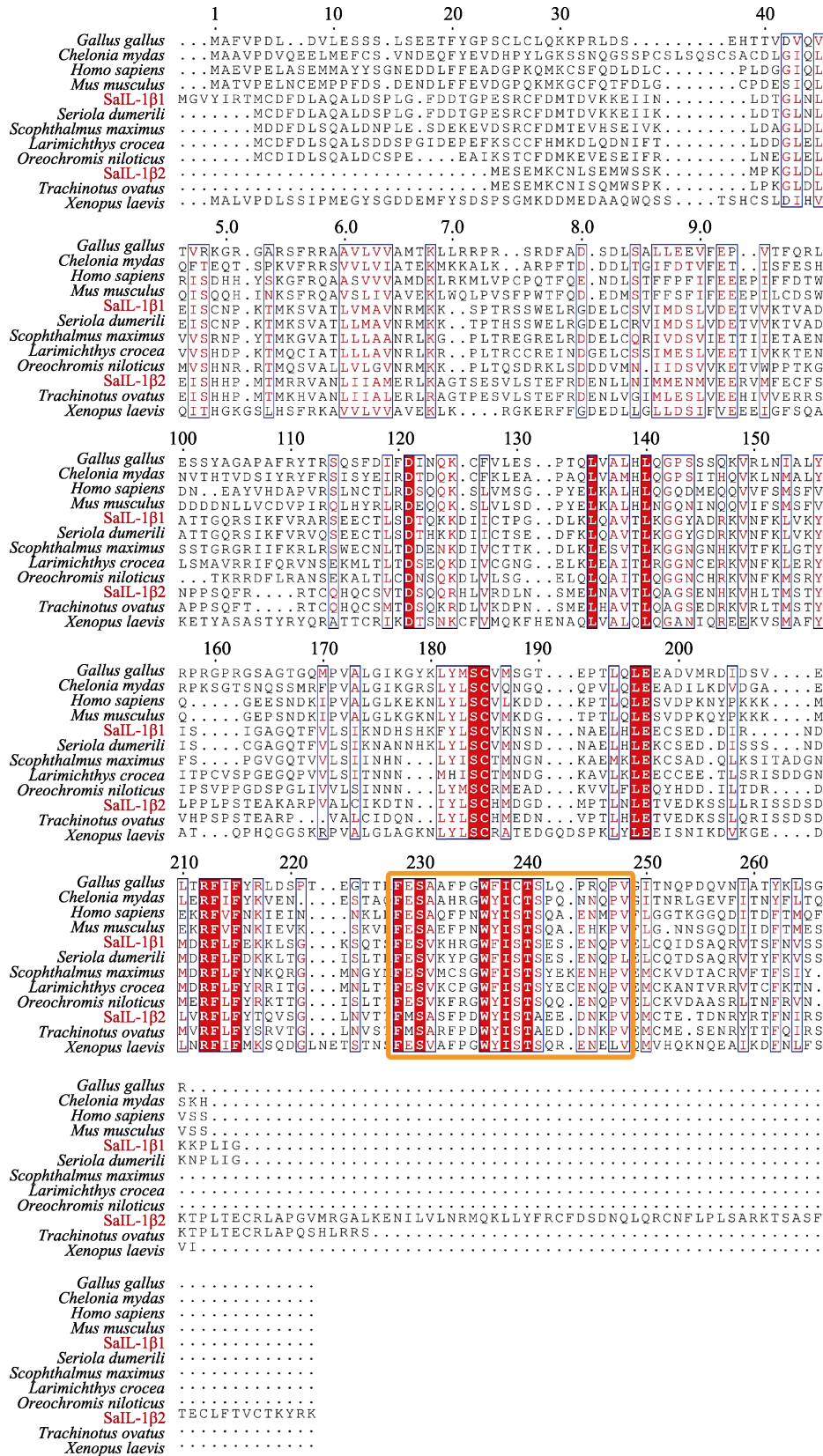


图5 黄条鲷 SaIL-1β1 和 SaIL-1β2 与其他物种 IL-1β 氨基酸序列对比  
 Fig.5 Multi-sequence alignment of SaIL-1β1 and SaIL-1β2 with IL-1β in other species

黄框为 IL-1 超家族 C 端保守基序。

Yellow box indicates the conserved motifs of IL-1 superfamily.

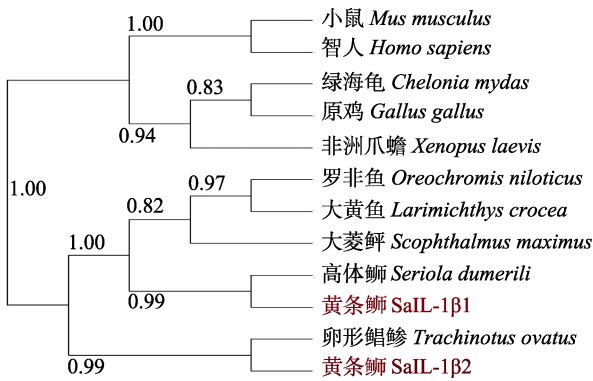


图 6 黄条鲷 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 与其他脊椎动物 IL-1 $\beta$ 2 的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic relationship of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2 with other IL-1 $\beta$ s in vertebrates

在 LPS 刺激后, 激活 Toll 通路上调 *il-1 $\beta$*  表达, 进而诱导其他炎症细胞因子、趋化因子的合成, 激活淋巴细胞和巨噬细胞等, 介导机体促炎反应(Pleguezuelos *et al*, 2000; Vojtech *et al*, 2012)。因此, 可以推测, 在 LPS 刺激后, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在黄条鲷头肾和脾脏中表达量上调以参与免疫反应, 且在免疫防御早期的促炎反应中发挥重要作用。

本研究首次在黄条鲷中克隆得到 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2*, 通过序列结构、组织表达分析等手段鉴定了其作为 IL-1 $\beta$  分子的特征。同时, 探明了 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 参与黄条鲷免疫响应的表达规律, 为今后深入研究细胞因子白介素在黄条鲷免疫防御中的作用提供了基础信息。

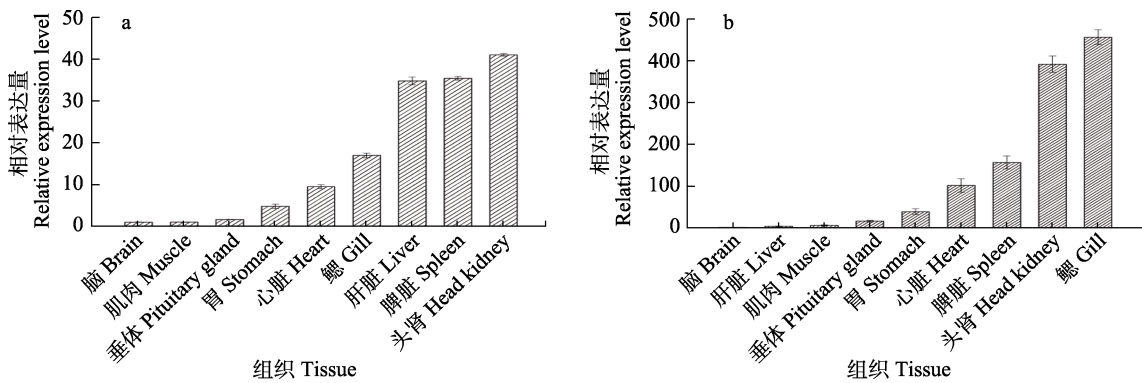


图 7 黄条鲷主要组织中 *SaIL-1 $\beta$ 1*(a)和 *SaIL-1 $\beta$ 2*(b)转录水平表达

Fig.7 The expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* (a) and *SaIL-1 $\beta$ 2* (b) transcripts in different tissues of *S. aureovittata*

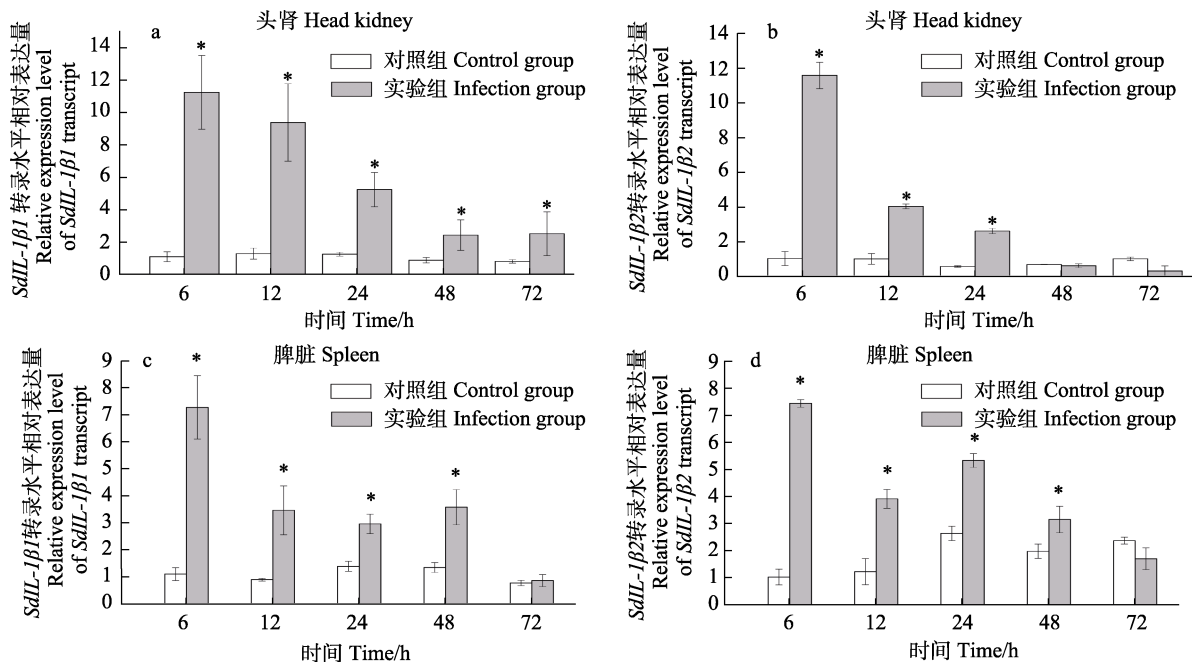


图 8 LPS 刺激后 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 的转录水平变化

Fig.8 The expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* transcripts after LPS stimulation

## 参 考 文 献

- BIRD S, ZOU J, WANG T, *et al.* Evolution of interleukin-1 $\beta$ . Cytokine and Growth Factor Reviews, 2002, 13(6): 483–502
- DINARELLO C A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews, 2018, 281(1): 8–27
- DINARELLO C A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. In "Seminars in immunology", 2013, 25(1): 389–393
- EGGESTØL H Ø, LUNDE H S, KNUTSEN T M, *et al.* Interleukin-1 ligands and receptors in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Molecular characterization, phylogeny, gene expression, and transcriptome analyses. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 502
- ENGELSMA M Y, STET R J, SAEIJ J P, *et al.* Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1 $\beta$  genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cytokine, 2003, 22(1): 21–32
- GAO J, JIANG X, WANG J, *et al.* Phylogeny and expression modulation of interleukin 1 receptors in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Developmental and Comparative Immunology, 2019, 99: 103401
- GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular and Biological Evolution, 2010, 27: 221–224
- GUO M, TANG X, SHENG X, *et al.* The effects of IL-1 $\beta$ , IL-8, G-CSF and TNF- $\alpha$  as molecular adjuvant on the immune response to an *E. tarda* subunit vaccine in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 2018, 77: 374–384
- HAILEY K L, LI S, ANDERSEN M D, *et al.* Pro-interleukin (IL)-1 $\beta$  shares a core region of stability as compared with mature IL-1 $\beta$  while maintaining a distinctly different configurational landscape: A comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(38): 26137–26148
- HONG S, PEDDIE S, CAMPOS-PÉREZ J J, *et al.* The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 $\beta$  on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developmental and Comparative Immunology, 2003, 27(9): 801–812
- KLOSTERHOFF M C, PEREIRA Jr J, RODRIGUES R V, *et al.* Ontogenic development of kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of CD3 and CD4 receptors on the lymphocytes of cobia (*Rachycentron canadum*). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2015, 87: 2111–2121
- KUMAR R, JOY K, SINGH S. Morpho-histology of head kidney of female catfish *Heteropneustes fossilis*: Seasonal variations in melano-macrophage centers, melanin contents and effects of lipopolysaccharide and dexamethasone on melanins. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(5): 1287–1306
- LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 2008, 42(2): 145–151
- PLEGUEZUELOS O, ZOU J, SECOMBES C J. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1  $\beta$  gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunogenetics, 2000, 51(12): 1002–1011
- PURCELL C M, SEETHARAM A S, SNODGRASS O, *et al.* Insights into teleost sex determination from the *Seriola dorsalis* genome assembly. BMC Genomics, 2018, 19(1): 1–11
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, 2008, 3: 1101–1108
- TAECHAVASONYO A, KONDO H, NOZAKI R, *et al.* Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 393–396
- VOJTECH L N, SCHARPING N, WOODSON J C. Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1 beta during *Francisella noatunensis* infection. Infection and Immunity, 2012, 80(8): 2878–2885
- WANG B, WANG K, CUI A, *et al.* LPXRFa down-regulates brain reproductive genes in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Aquaculture, 2021, 545: 737251
- WANG P, LU Y Q, WEN Y, *et al.* IL-16 induces intestinal inflammation via PepT1 upregulation in a pufferfish model: New insights into the molecular mechanism of inflammatory bowel disease. Journal of Immunology, 2013, 191(3): 1413–1427
- WEWERS M D, DARE H A, WINNARD A V, *et al.* IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: Macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. Journal of Immunology, 1997, 159: 5964–5972
- WU J, SHI Y H, ZHANG X H, *et al.* Molecular characterization of an IL-1 $\beta$  gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. Zoological Research, 2015, 36(3): 133–141
- WU Y, ZHOU Y, CAO Z, *et al.* Comparative analysis of the expression patterns of IL-1 $\beta$ , IL-11, and IL-34 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) following different pathogens challenge. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 93: 863–870
- ZOU J, CUNNINGHAM C, SECOMBES C J. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 $\beta$  gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. European Journal of Biochemistry, 1999, 259: 901–908

## Two Putative Interleukin-1 beta Molecules Involved in the Immune Response of *Seriola aureovittata*

WANG Lin<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2①</sup>, GUAN Changtao<sup>1,2</sup>

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China)

**Abstract** Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) is the quintessential pro-inflammatory cytokine, playing important roles in immune cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The IL-1 $\beta$  genes have been characterized for many fish species. Unlike mammalian genes, several species of fish possess two IL-1 $\beta$  genes, which may be a consequence of genome duplication in particular fish lineages. Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) is a pelagic marine finfish species, which is an emerging candidate for the aquaculture industry. Therefore, details encompassing the role of IL-1 $\beta$  in the immune response aids a development strategy for economic and efficient aquaculture. In the present study, two novel *il-1 $\beta$*  molecules were identified from *S. aureovittata* (designated as *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2*). The full-length cDNA of *SaIL-1 $\beta$ 1* was 1 292 bp with a 828 bp open reading frame, encoding a polypeptide of 275 amino acids, while the full-length cDNA of *SaIL-1 $\beta$ 2* was 1 337 bp with a 960 bp open reading frame, encoding a polypeptide of 319 amino acids. Both *SaIL-1 $\beta$*  molecules contain an IL1 domain, 12  $\beta$ -sheets, and a C-terminal conserved region, which are IL-1 family signature characters. A phylogenetic analysis revealed the fish IL-1 $\beta$ s clustered together. *SaIL-1 $\beta$ 1* and IL-1 $\beta$  in *Seriola dumerili* initially clustered together. However, *SaIL-1 $\beta$ 2* initially clustered with IL-1 $\beta$  in *Trachinotus ovatu*. Real-time PCR showed the transcripts of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* were present in all the tested tissues, including the head kidney, spleen, liver, gill, heart, stomach, pituitary gland, muscle, and brain. Among them, the *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were predominantly in the head kidney, spleen, and liver. The expression of *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA was predominantly in the gill, head kidney, and spleen. The high expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA in the immune related organs implies a potential role in immune regulation. LPS is a pro-inflammatory endotoxin used as a standard immune activating agent. After LPS stimulation, the two *SaIL-1 $\beta$ s* transcripts were vigorously altered in the head kidney and spleen. *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were significantly increased at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-stimulation in the head kidney (10.03, 7.15, 4.09, 2.71, and 3.03-fold of the control group results, respectively) ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, *SaIL-1 $\beta$ 2* transcripts significantly increased from 6 h to 24 h post-stimulation after infection in the head kidney (11.49, 4.08, and 4.70-fold of the control group, respectively) ( $P < 0.05$ ), had returned to normal at 48 h, and had decreased at 72 h (to 0.29-fold of the control group) ( $P < 0.05$ ). In the spleen, *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were sharply elevated at 6 h (to 6.59-fold of control group), gradually returned to normal at 12 h, 24 h, and 48 h (3.85, 4.09, 2.17, and 2.65-fold of control group, respectively) ( $P < 0.05$ ), and had dropped to basal level by 72 h. *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA had a similar expression pattern to *SaIL-1 $\beta$ 1*. *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA increased from 6 h to 48 h post-stimulation after infection (7.25, 3.20, 1.59, and 1.59-fold of the control group, respectively) ( $P < 0.05$ ) and had returned to normal by 72 h. The activated immune signaling promoted the expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* in the immune response, especially in the early stage, indicating they might be a pro-inflammatory cytokine in *S. aureovittata*. Collectively, the conserved structure and tissue distribution of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2*, together with their sensitivity to LPS stimulation suggests their involvement in the immune response, providing clues to our understanding of the role of IL-1 $\beta$  in *S. aureovittata* during immune response.

**Key words** Interleukin-1 beta; Immune response; Cytokine; *Seriola aureovittata*

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220818001

http://www.yykxjz.cn/

邱夏君, 王滨, 徐永江, 崔爱君, 姜燕. 黄条鲮 *npv* 基因克隆及其对饥饿再投喂的应答特性. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 74-83

QIU X J, WANG B, XU Y J, CUI A J, JIANG Y. Molecular cloning and characterization of *npv* gene and its response to the starvation-refeeding strategy in *Seriola aureovittata*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 74-83

# 黄条鲮 *npv* 基因克隆及其对饥饿再投喂的应答特性\*



邱夏君<sup>1,2</sup> 王滨<sup>2</sup> 徐永江<sup>2①</sup> 崔爱君<sup>2</sup> 姜燕<sup>2</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黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 为探究神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 在黄条鲮 (*Seriola aureovittata*) 摄食调控中的作用及机制, 本研究采用同源克隆的方法获得了黄条鲮 *npv* 基因的开放阅读框 (ORF) 序列, 并利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *npv* 基因的组织分布以及其对饥饿再投喂的应答特性。黄条鲮 *npv* 基因 ORF 序列长度为 300 bp, 编码 99 个氨基酸的前体蛋白, 其中包括 28 个氨基酸的信号肽、36 个氨基酸的成熟肽。氨基酸序列同源性比对发现, 黄条鲮 *npv* 编码的氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*) 等其他硬骨鱼高度保守 (>90%); 系统进化树分析表明, 黄条鲮 *npv* 与高体鲮 (*Seriola dumerili*) 的关系最近。*npv* mRNA 在所检测的 12 种组织中均有表达, 其中, 在脑组织表达量最高, 在垂体和胃中表达量次之。在饥饿再投喂实验中, 饥饿刺激了 *npv* mRNA 的表达, 特别是饥饿 21 d 时, 实验组垂体 *npv* mRNA 表达量显著高于对照组, 再投喂 7 d 后恢复到对照组水平。上述结果表明, *npv* 可能参与了黄条鲮的摄食调控, 在饥饿代谢补偿机制中发挥了重要作用。

**关键词** 黄条鲮; *npv*; 克隆; 组织表达; 摄食

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0074-10

鱼类的摄食行为不仅与外界因素有关, 还受到多种内源性摄食因子的调控 (Volkoff *et al.*, 2020)。下丘脑神经内分泌因子, 如神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)、黑皮质素 (melanocortin, MCR) 及食欲肽 (orexin) 等在鱼类摄食中发挥重要的调控作用 (Bertucci *et al.*, 2019; Soengas *et al.*, 2018)。其中, NPY 在鱼类中是一种强有力的促食欲因子 (Bertucci *et al.*, 2019)。

1982 年, NPY 首次从猪脑中提取出来, 因其富含酪氨酸而被称为神经肽酪氨酸或神经肽 Y, 具有显

著促进摄食的功能 (Tatemoto *et al.*, 1982)。在硬骨鱼类中, *npv* 于 1989 年首次在金鱼 (*Carassius auratus*) 中克隆获得 (Kah *et al.*, 1989)。目前, 已在大西洋鲑 (*Salmo salar*) (Murashita *et al.*, 2009)、重口裂腹鱼 (*Schizothorax davidi*) (Deng *et al.*, 2019)、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) (Lei *et al.*, 2019) 等硬骨鱼中相继克隆获得了 *npv* 基因。已有研究表明, 鱼类 *npv* mRNA 主要在脑中表达 (Lei *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2019), 参与摄食调控、糖脂代谢等多种生理功能

\* 青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNL30001-1)、国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。邱夏君, E-mail: 17806168816@163.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-08-18, 收修改稿日期: 2022-09-30



(Horio *et al.*, 2021)。

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)是一种大型长距离洄游的掠食性鱼类(Booth *et al.*, 2022; 柳学周等, 2017)。本团队于2017年突破了黄条鲷苗种繁育技术, 并开展了其生长和生殖功能基因的相关研究(Wang *et al.*, 2021; 徐永江等, 2019)。黄条鲷食量较大且摄食凶猛, 在养殖过程中, 养殖户需了解黄条鲷的摄食特性及其内在调控机制, 以便对投喂策略做出调整, 在节约养殖成本的同时, 促进养殖鱼类的生长, 从而获得更大的经济效益。NPY 作为一种强有力的促食欲因子(Bertucci *et al.*, 2019), 在硬骨鱼中被证明有促摄食的作用(Lei *et al.*, 2019; Tolås *et al.*, 2021), 但尚未在黄条鲷中鉴定出该基因。本研究拟探究 *npv* 基因在黄条鲷摄食与饥饿补偿机制中的规律, 以期为进一步研究黄条鲷的摄食和能量代谢提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计与样品采集

所有动物均经中国水产科学研究院黄海水产研究所实验动物福利伦理和动物实验安全委员会批准。本研究用黄条鲷购自大连富谷食品有限公司, 克隆及组织表达所用的黄条鲷为3龄鱼, 取样3尾雌鱼[体重为(5.58±0.21) kg, 全长为(85.67±2.18 cm)]和3尾雄鱼[体重为(4.28±0.04) kg, 全长为(80.33±1.36 cm)]。用MS-222 (120 mg/L)将黄条鲷麻醉, 分别取脑、垂体、鳃、心、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉和性腺等组织样品, 置于液氮中保存备用。

饥饿再投喂实验所用的黄条鲷为1龄鱼, 使用180尾实验鱼[体重为(616.25±24.23) g, 全长为(41.5±0.65 cm)], 设置对照组(持续投喂)和实验组(饥饿再投喂), 每组设置3个平行, 每个平行30尾鱼, 实验正式开始前驯化7 d。实验鱼被饲养在容积为3 m<sup>3</sup>玻璃钢水槽中, 充气流养殖(盐度为27~30, pH值为7.8~8.2, 溶氧>6 mg/L, 水温为24~26 °C), 日换水率为300%。饵料为冰鲜玉筋鱼(*Ammodytes personatus*),

每天投喂2次(07:00和18:00)至饱食, 1 h后清理底部残饵。饥饿再投喂实验组先进行21 d饥饿处理, 随后7 d与对照组同步投喂。在实验开始后的第7、14、21和28天进行取样, 每次每组取样6尾。取样前12 h统一停止投喂, 采用MS-222麻醉实验鱼(身体失去平衡, 腹部向上, 眼睑有反应), 解剖后取出脑、垂体和胃, 置于液氮中保存备用。

### 1.2 总RNA提取与cDNA反转录

使用RNAiso Plus Total RNA提取试剂盒(TaKaRa, 日本)提取黄条鲷的组织总RNA, 通过NanoDrop 2000C分光光度计(Thermo, 美国)测定RNA浓度, 当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在1.8~2.0之间, RNA可用于后续实验。使用PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA eraser (TaKaRa, 日本)合成cDNA第一链, 按照说明书的操作步骤进行, 合成的cDNA模板保存于-20 °C备用。

### 1.3 基因克隆

根据NCBI数据库中预测的 *npv* 序列(XP\_023282438.1)设计特异性引物(表1)。基因克隆以脑cDNA为模板, PCR体系(50 μL)包含25 μL rTaq酶、ddH<sub>2</sub>O 21 μL、上下游引物各1 μL和cDNA模板2 μL。PCR扩增条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 38个循环; 最后72 °C再延伸5 min, 4 °C保存。

将符合目的基因大小的条带用Steady Pure DNA凝胶回收试剂盒(艾科瑞生物)进行胶回收, 将胶回收产物与pEASY-T1 Simple载体、Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞(TransGene Biotech, 北京)进行连接转化, 37 °C培养箱中培养12 h, 挑取阳性克隆产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.4 基因定量表达分析

基因定量表达分析使用TB Green Premix Ex Taq™ II试剂盒(TaKaRa, 日本), 仪器为Lightcycler

表1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 $T_m$ /°C	目的 Purpose
<i>npv</i> F	ATGCAGCCTAACATGGTGAGC	55	ORF sequence amplification
<i>npv</i> R	TCACCACAATGACGGGTCAT		
<i>npv</i> qF	GCGGAGGAACTGGCCAAATA	60	qPCR
<i>npv</i> qR	CAACAGCAGCTCTGAGACCA		
18S F	TACCACATCCAAAGAAGGCA	53	
18S R	TCGATCCCAGATCCAATA		



480 II Real-time PCR 仪(Roche, 瑞士)。PCR 体系(10  $\mu$ L): TB Green Premix Ex Taq II 5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析以验证产物特异性。所有目的基因和内参基因的标准曲线相关系数( $r^2$ )和扩增效率( $E$ ):  $0.99 < (r^2) < 0.999$ ,  $0.9 < E < 1.1$ 。18S 为内参基因, 基因相对表达量参照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算(Livak *et al.*, 2001)。

### 1.5 结果分析

使用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找预测的黄条鲮 *npv* 序列, 利用软件 SignalP5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析黄条鲮 *npv* 基因的信号肽, 通过 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行序列比对和同源性分析, 利用软件 ExPASy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))分析成熟蛋白的分子量和等电点, 采用 SWISS-MODEL 自动化蛋白质建模服务器 ProMod II 程序估计三级蛋白质结构(<https://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)。通过 MEGA 7.0 软件, 以邻接法 Neighbor-Joining (NJ)构建系统进化树。

实验数据以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示。采用 SPSS 26.0 统计软件进行 T 检验、单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较, 显著性水平  $P$  设为 0.05, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著, 当  $P < 0.01$  时认为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 黄条鲮 *npv* cDNA 序列克隆、组织分布和系统进化分析

黄条鲮 *npv* 基因的 ORF 序列长度为 300 bp, 编码 99 个氨基酸, 其中, 包括 28 个氨基酸的信号肽, 36 个氨基酸的成熟肽, 32 个氨基酸的 C 端未知功能肽段和 1 个 GKR 蛋白水解位点(图 1), 预测的蛋白质分子量为 11.24 kDa, 等电点为 5.02。

黄条鲮与斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑等物种的 NPY 氨基酸序列比对结果见表 2。黄条鲮 *npv* 与高体鲮(*Seriola dumerili*) (99.0%)、条纹鲈鱼(*Morone saxatilis*) (98.0%)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) (96.0%)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (94.9%)的 *npv* 表现出高度的同源性, 其次是鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (93.9%)、青鳉(*Oryzias latipes*) (92.9%)。此外, 与其他鱼相比,

```

1 ATGCAGCCTAACATGGTGAGCTGGCTGGGGACTCTGGGGTTCCTGCTGTGGGCGCTGCTC
1 M Q P N M V S W L G T L G F L L W A L L
                                     Signal peptide
61 TGCTTGGGCGCCCTGACGGAGGGATACCCGGTGAACCCGGGAACCCCGGGGAGGACGCC
21 C L G A L T E G Y P V K P E N P G E D A
121 CCGGCGGAGAACTGGCCAATACTACTCAGCACTAGACACTACATCAACCTCATCACA
41 P A E E L A K Y S A L R H Y I N L I T
181 AGACAGAGGTATGGGAAGAGGTCCAGCCCTGAGATTCTGGACACGCTGGTCTCAGAGCT
61 R Q R Y [G K R] S S P E I L D T L V S E L
                                     Proteolytic site
241 CTGTTGAAGAAAGCACAGACACACTTCCACAGTCAAGATATGACCCGTCATTGTGGTGA
81 L L K E S T D T L P Q S R Y D P S L W *

```

图 1 黄条鲮 *npv* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列  
Fig.1 Sequence of open reading frame and deduced amino acid of *S. aureovittata npv* gene

起始密码子加框, 终止密码子用星号表示。

推定的信号肽加下划线, 水解位点用方框表示。

成熟肽标以下划线和粗体字母表示。

The start codon is boxed, and the stop codon is indicated by asterisk. Putative signal peptides are underlined, and proteolytic site is framed. Mature peptides are underlined and indicated in bold letters.

序列相似度也较高(66.3%~80.8%)。*npv* 基因序列的三级结构由 2 个螺旋区组成, 即  $\alpha$  螺旋和富含脯氨酸的螺旋区。2 个螺旋区是互逆平行的, 都有两性电离的特点, 且靠疏水键维持稳定(图 2A)。与其他脊椎动物相比较, 黄条鲮 *npv* 信号肽和成熟肽的结构非常保守, 都包含 28 个氨基酸的信号肽、36 个氨基酸的成熟肽、3 个脯氨酸和 2 个酪氨酸残基(Pro<sup>2/5/8</sup> 和 Tyr<sup>20/27</sup>) (图 2B)。系统进化分析表明, 黄条鲮 *npv* 与高体鲮聚为一个小的分支, 且与鲈形目(Perciformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)的鱼类聚为一个大的分支(图 3)。

### 2.2 *npv* 基因的组织表达分析

*npv* 在黄条鲮脑、垂体和胃中表达量较高, 其他组织少量表达。通过对雌、雄黄条鲮 *npv* 的组织表达特性比较发现, 在雌鱼和雄鱼的性腺组织中, *npv* mRNA 表达水平呈现显著性差异( $P < 0.05$ ), 在肠组织中存在极显著性差异( $P < 0.01$ ) (图 4)。

### 2.3 饥饿再投喂对黄条鲮 *npv* 基因表达的影响

与对照组相比, 饥饿组黄条鲮脑、垂体和胃组织中 *npv* mRNA 上调表达, 恢复投喂后 *npv* mRNA 表达水平下降。脑组织中, 随着饥饿时间的延长, 实验组 *npv* mRNA 表达水平有上升的趋势, 恢复投喂 7 d 后恢复到对照组水平(图 5A)。垂体组织中, 实验组 *npv* mRNA 变化趋势与脑相似, 特别是在饥饿 21 d, 与对照组相比, 实验组 *npv* 显著高表达( $P < 0.05$ ) (图 5B)。实验组胃组织中 *npv* mRNA 水平在饥饿 14 d 时略高于对照组, 恢复投喂 7 d 后略低于对照组(图 5C)。

表2 黄条鲮与其他脊椎动物 *npv* 基因氨基酸序列的同源性分析/%Tab.2 Homology analysis of amino acid sequences of *npv* gene of *S. aureovittata* and other vertebrates /%

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	100																	
2	83.5	100																
3	64.6	64.6	100															
4	61.5	62.5	65.3	100														
5	63.5	64.6	65.3	97.0	100													
6	80.4	90.7	66.7	63.5	65.6	100												
7	63.9	61.9	64.6	79.8	82.8	63.9	100											
8	61.5	61.5	64.2	91.9	94.9	62.5	77.8	100										
9	64.9	61.9	64.6	79.8	82.8	63.9	98.0	77.8	100									
10	62.5	64.6	64.2	93.9	97.0	65.6	81.8	91.9	81.8	100								
11	64.6	64.6	65.3	96.0	99.0	65.6	81.8	93.9	81.8	96.0	100							
12	65.6	64.6	66.3	96.0	98.0	65.6	80.8	92.9	80.8	94.9	99.0	100						
13	63.5	63.5	93.8	67.4	67.4	66.7	66.7	66.3	66.7	66.3	66.3	67.4	100					
14	62.5	62.5	92.7	66.3	66.3	65.6	65.6	65.3	65.6	65.3	65.3	66.3	97.9	100				
15	64.6	66.7	63.2	92.9	96.0	64.6	79.8	90.9	79.8	92.9	94.9	93.9	65.3	64.2	100			
16	80.4	76.3	61.5	58.3	59.4	74.2	58.8	57.3	58.8	60.4	60.4	61.5	59.4	58.3	59.4	100		
17	85.6	94.8	65.6	61.5	63.5	92.8	60.8	61.5	60.8	63.5	63.5	63.5	64.6	63.5	62.5	78.4	100	
18	62.5	63.5	65.3	94.9	96.0	64.6	79.8	90.9	79.8	94.9	94.9	93.9	67.4	66.3	91.9	59.4	62.5	100

注: 1. 安乐蜥; 2. 牛; 3. 斑马鱼; 4. 大口黑鲈; 5. 条纹鲈鱼; 6. 小家鼠; 7. 虹鳟; 8. 青鳉; 9. 大西洋鲑; 10. 大菱鲆; 11. 高体鲮; 12. 黄条鲮; 13. 中华倒刺鲃; 14. 银鲫; 15. 鳊鱼; 16. 非洲爪蟾; 17. 人; 18. 半滑舌鳎。

Note: 1. *Anolis carolinensis*; 2. *Bos taurus*; 3. *Danio rerio*; 4. *Micropterus salmoides*; 5. *Morone saxatilis*; 6. *Mus musculus*; 7. *Oncorhynchus mykiss*; 8. *Oryzias latipes*; 9. *Salmo salar*; 10. *Scophthalmus maximus*; 11. *Seriola dumerili*; 12. *Seriola aureovittata*; 13. *Spinibarbus sinensis*; 14. *Carassius gibelio*; 15. *Siniperca chuatsi*; 16. *Xenopus laevis*; 17. *Homo sapiens*; 18. *Cynoglossus semilaevis*.

### 3 讨论

#### 3.1 黄条鲮 *npv* 基因克隆与序列分析

黄条鲮 *npv* 基因编码 99 个氨基酸, 这与大口黑鲈(刘浩等, 2016)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Wang *et al.*, 2015)一致, 而银鲫 *npv* 基因编码 96 个氨基酸(Lei *et al.*, 2019), 大西洋鲑 *npv* 基因编码 100 个氨基酸(Murashita *et al.*, 2009)。黄条鲮成熟肽中的 3 个脯氨酸和 2 个酪氨酸残基(Pro<sup>2/5/8</sup> 和 Tyr<sup>20/27</sup>) 在脊椎动物中是非常保守的, 这些脯氨酸和酪氨酸残基在维持 *npv* 家族的构象中具有重要作用(Cerdá-Reverter *et al.*, 2000)。与其他硬骨鱼类相似, 黄条鲮 *npv* 的成熟肽 C 端附近也发现 13 个氨基酸残基(ALRHYNLITRQR), 说明这 13 个氨基酸残基高度保守(Deng *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019)。在爬行类、两栖类、哺乳类和硬骨鱼类的 NPY 成熟肽中不含半胱氨酸(C), 只在信号肽第 21 个氨基酸位点上有一个半胱氨酸(C), 在重口裂腹鱼(Deng *et al.*, 2019)、银鲫(Lei *et al.*, 2019)也得到相同结果。通过氨基酸比对发现, 黄条鲮与条纹鲈鱼、

大口黑鲈分别有 2 个和 3 个氨基酸差异, 与高体鲮仅有 1 个氨基酸不同, 并且与高体鲮 *npv* 编码的氨基酸序列一致性高达 99%。另外, 构建的 *npv* 基因的系统进化树显示, 黄条鲮与鲈形目、鲷形目其他鱼类聚为一支, 亲缘关系较近。

#### 3.2 黄条鲮 *npv* 组织分布特征

黄条鲮 *npv* mRNA 在大部分组织中均有表达, 特别是脑、垂体和胃中有较高的表达, 这与银鲫(Lei *et al.*, 2019)、重口裂腹鱼(Deng *et al.*, 2019)、斑马鱼(Kaniganti *et al.*, 2021)的结果一致。本研究还发现, 黄条鲮雌鱼和雄鱼肠组织和性腺中 *npv* mRNA 的表达有显著性差异, 表明 *npv* 基因在黄条鲮的组织表达模式具有明显的性别二态性, 这与黄条鲮 *hsp70* 基因的组织表达模式一致(方璐等, 2023), 提示 *npv* 基因在雌、雄性腺发育、消化等生理过程中发挥重要的差异化调控作用, 具体的功能差异及可能的作用途径有待深入研究确证。目前, 在其他硬骨鱼中尚未见 *npv* 基因的性别二态性相关报道, 根据这一特性, 可以在产卵前针对性地对雌、雄亲鱼分别进行营养强化, 或可

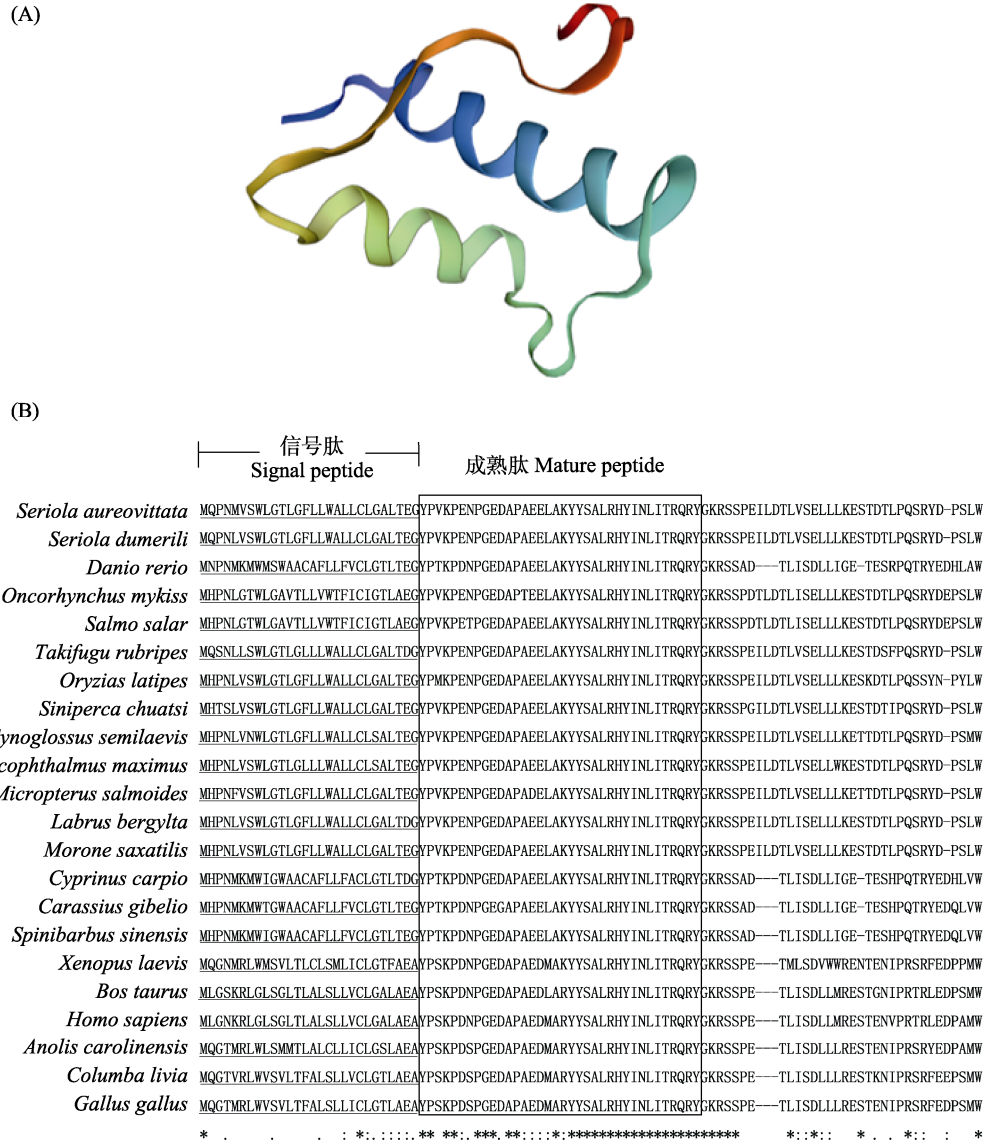


图2 黄条鲮NPY的分子特征

Fig.2 Molecular characterization of *S. aureovittata* NPY

A: 预测的黄条鲮NPY三级结构; B:黄条鲮npy基因编码的氨基酸序列与其他脊椎动物的比对分析。

连字符(-)指示在一些序列中引入的间隙以最大化对齐, 相同的序列用星号(\*)表示, 保守氨基酸用点号(.)表示, 高度保守的氨基酸用冒号(:)表示, 推定的信号肽标以下划线表示, NPY成熟肽用方框表示。

A: The predicted tertiary structure of NPY in *S. aureovittata*; B: Alignment of the amino acid sequences of the *npy* gene between *S. aureovittata* and other vertebrates. Gaps introduced in some sequences to maximize the alignment are indicated by hyphens.

Identical sequences are indicated by asterisks. Dots denote conserved amino acids, and colons indicate highly conserved amino acids. Putative signal peptides are underlined, the mature NPY peptide sequences are boxed.

为黄条鲮亲鱼提供差异化强化培育的思路。

### 3.3 黄条鲮NPY对饥饿再投喂的应答特性

摄食调控是由中枢和外周系统协同完成。已有研究证实, NPY行使生理功能主要是通过NPY受体的直接或间接作用来实现。斑马鱼室旁核中的NPY与NPY Y1、NPY Y2或NPY Y5受体结合引发传出信号, 激活PKC通路, 增加食欲和摄食量(Yokobori et al,

2012)。对大西洋鲑的研究表明, 弓状核中的NPY神经元还可以对进入的外周信号如瘦素、胰岛素等因子做出快速反应, 信号向下传递到各个组织, 刺激胃等消化系统分泌npy mRNA (Kalanathan et al, 2020); 同时上调促摄食因子(*agrp*和*ghrelin*), 下调抑摄食因子(*pmc*和*leptin*) (Opazo et al, 2019; Zhang et al, 2020), 从而实现了对生物体的摄食调控。

本研究中, 黄条鲮在饥饿期间, *npy* mRNA呈现

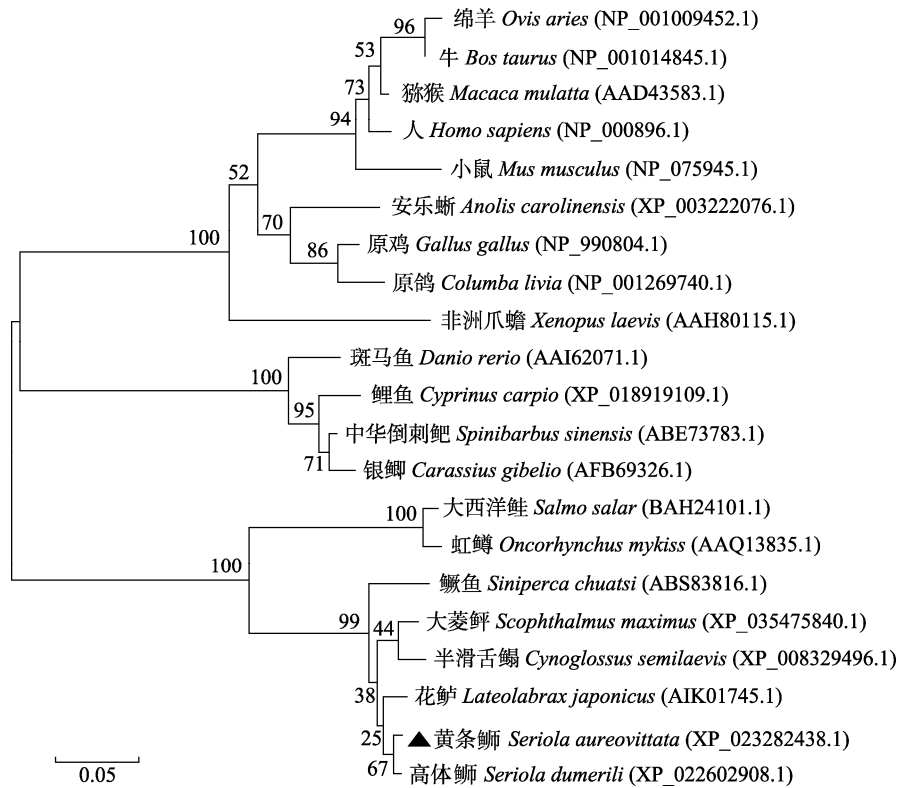


图 3 黄条鲷 *npv* 基因与其他脊椎动物的 NJ 系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of *npv* gene of *S. aureovittata* and other vertebrates using neighbor-joining method

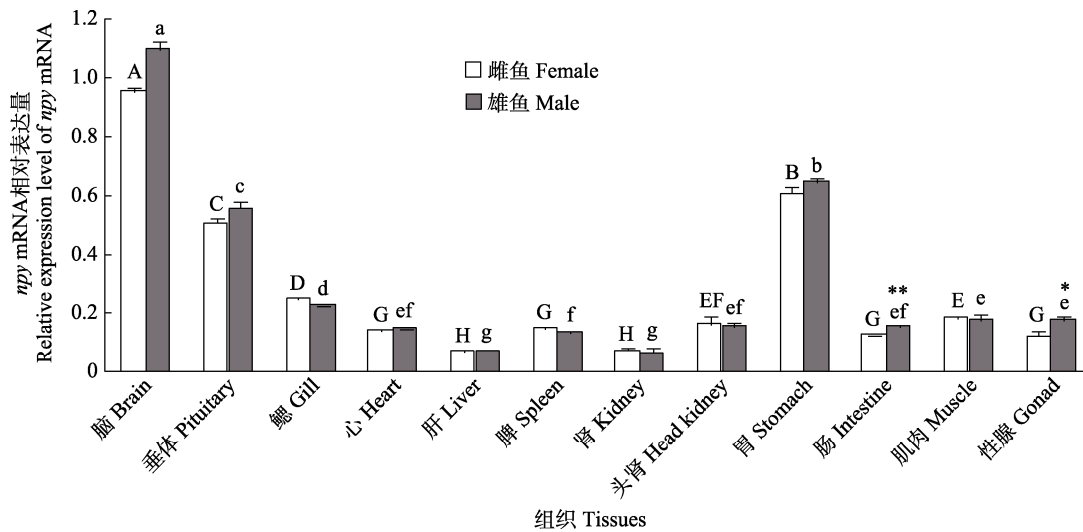


图 4 黄条鲷 *npv* mRNA 的组织表达分布特征

Fig.4 Spatial expression pattern of *npv* mRNA of *S. aureovittata*

柱上方相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母表示雄鱼各个组织之间存在显著性差异( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示雌鱼各个组织之间存在显著性差异( $P<0.05$ ).

\*表示雌鱼和雄鱼在同一组织内存在显著差异( $P<0.05$ ), \*\*表示存在极显著性差异( $P<0.01$ ).

Above the same column, the same letters indicate no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference between the various tissues of male fish ( $P<0.05$ ), and different uppercase letters mean significant difference between the various tissues of female fish ( $P<0.05$ ). \* indicates significant difference within the same tissue between female and male fish ( $P<0.05$ ), and \*\* indicates highly significant difference within the same tissue between female and male fish ( $P<0.01$ ).



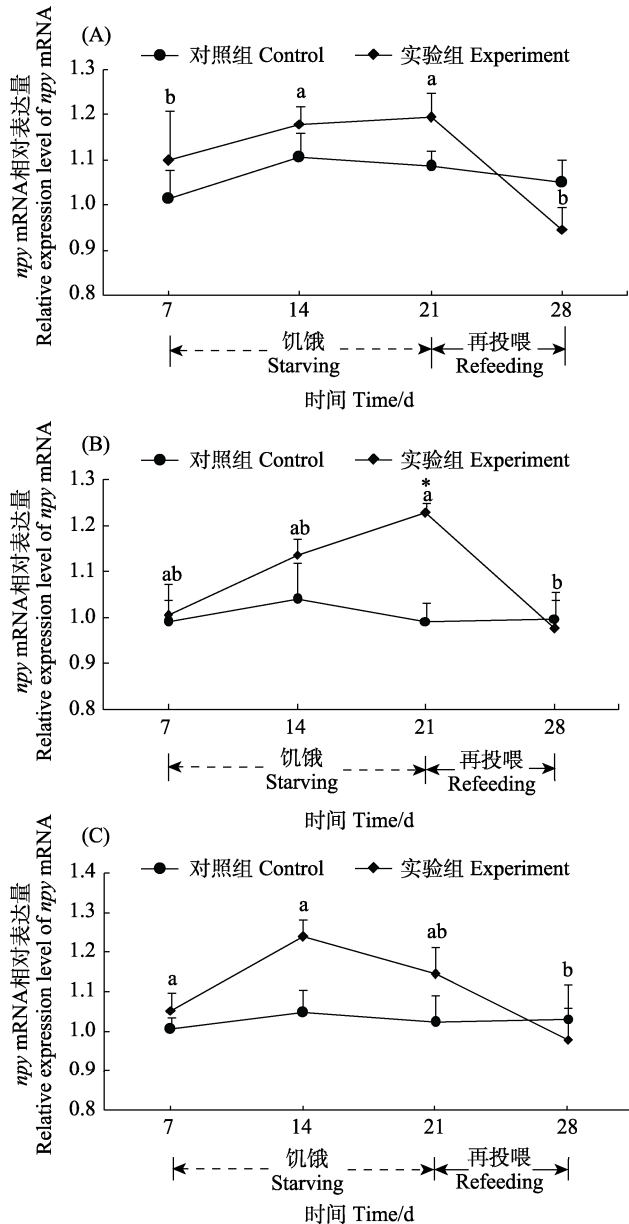


图5 黄条鲮的脑(A)、垂体(B)和胃(C)中 *npy* mRNA 在饥饿再投喂条件下的相对表达

Fig.5 Relative expression of *npy* mRNA in the brain (A), pituitary (B) and stomach (C) of *S. aureovittata* after starving and refeeding

不同字母表示组内有显著性差异( $P < 0.05$ ), \*表示在同一个时间点, 对照组和实验组之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。Different letters indicate significant difference within the group ( $P < 0.05$ ), and \* indicates significant difference between control and experimental groups fish at one given time point ( $P < 0.05$ ).

为上调表达, 恢复投喂 7 d 后, *npy* mRNA 表达水平恢复到对照组水平, 这与银鲫(Lei *et al.*, 2019)、重口裂腹鱼(Deng *et al.*, 2019)的研究结果相似, 表明与其他硬骨鱼一样, 黄条鲮 *npy* 也参与了摄食调控。

本研究中, 饥饿期间, 黄条鲮脑和垂体 *npy* mRNA

表达量上升, 其原因可能是饥饿刺激神经中枢发出促食信号, 从而启动了 *npy* mRNA 的表达, 从而达到增强食欲的作用(Yousefvand *et al.*, 2021); 且在恢复投喂 7 d 后, 神经中枢发出饱食信号, 使 *npy* mRNA 表达量略低于对照组。本研究还发现, 黄条鲮饥饿 21 d, 脑组织中 *npy* mRNA 的表达量升高( $P > 0.05$ ); Kehoe (2007)等对大西洋鳕(*Gadus morhua*)研究发现, 饥饿 7 d, 其脑组织中 *npy* mRNA 表达变化同本结果一致; 然而, Deng (2019)研究发现, 重口裂腹鱼饥饿 5 d 时, 其脑组织中 *npy* mRNA 出现显著变化。上述研究表明, *npy* 基因在禁食初期出现显著应答的时间不同, 这可能是由于物种特异性和环境差异造成。另外, 本研究仅检测了脑、垂体和胃组织中 *npy* 基因的表达调控特性, 未对 *npy* 信号通路上其他相关基因如 *leptin*、*ghrelin*、*npyr*、*pomc*、*gh* 和 *igf* 等摄食与生长调控因子进行检测及互作关系进行分析, 因此, 未能进一步揭示 *npy* 基因对黄条鲮摄食调控作用的信号通路, 下一步本实验室将深入开展相关研究, 揭示 *npy* 调控黄条鲮摄食作用的信号通路。

胃是动物重要的消化器官, 在摄食调控中扮演了重要角色(Abdalla, 2017)。本研究中, 与脑、垂体组织一样, 黄条鲮胃组织中 *npy* mRNA 也存在着明显的变化, 表明胃中的 *npy* 基因对饥饿再投喂产生了应答, 也参与了黄条鲮的摄食调节。Kalanathan 等(2020)研究发现, 大西洋鳕胃的扩张与肠壁上的内分泌因子和受体之间的相互作用调节着肽激素的分泌, 这些肽激素将胃和肠道的饱腹程度以及营养含量传递给中枢系统。本研究中, 饥饿再投喂诱导黄条鲮脑、垂体和胃中 *npy* mRNA 表达的规律一致, 均呈现上升再下降的变化趋势, 说明脑、垂体和胃中 *npy* 对于饥饿的响应机制是一致的。关于 *npy* 基因的调控方式仍需进一步研究, 以探明 *npy* 基因在黄条鲮饥饿再投喂中的机制, 进一步优化黄条鲮的摄食投喂策略。

综上, 本研究首次克隆了黄条鲮 *npy* 基因的 ORF 序列并对其结构和表达模式进行了研究。*npy* 转录本主要在脑中显著高表达, 其次是垂体和胃, 这与其他硬骨鱼类类似。饥饿再投喂实验表明, 黄条鲮 NPY 是具有显著促食欲的内分泌因子, 其促摄食的分子调控机制值得进一步研究。

## 参 考 文 献

- ABDALLA M M I. Central and peripheral control of food intake. *Endocrine Regulations*, 2017, 51(1): 52–70  
 ASSAN D, WANG Y, MUSTAPHA U F, *et al.* Neuropeptide Y in

- spotted scat (*Scatophagus argus*), characterization and functional analysis towards feed intake regulation. *Fishes*, 2022, 7(3): 111
- BERTUCCI J I, BLANCO A M, SUNDARRAJAN L, *et al.* Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 83
- BOOTH M A, PIROZZI I. The digestible histidine requirement of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture*, 2022, 548: 737543
- CERDÁ-REVERTER J M, MARTINEZ-RODRIGUEZ G, ZANUY S, *et al.* Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: Cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regulatory Peptides*, 2000, 95(1/2/3): 25–34
- DENG X, LEI L, YUAN D, *et al.* Cloning, expression profiling, and effects of fasting status on neuropeptide Y in *Schizothorax davidi*. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(7): e12892
- FANG L, XU Y J, CUI A J, *et al.* Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola lalandi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 55–63 [方璐, 徐永江, 崔爱君, 等. 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性. *渔业科学进展*, 2023, 44(4): 55–63]
- HORIO N, LIBERLES S D. Hunger enhances food-odour attraction through a neuropeptide Y spotlight. *Nature*, 2021, 592(7853): 262–266
- KAH O, PONTET A, DANGER J M, *et al.* Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1989, 7(1): 69–76
- KALANANTHAN T, MURASHITA K, RØNNESTAD I, *et al.* Hypothalamic *agrp* and *pomc* mRNA responses to gastrointestinal fullness and fasting in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 61
- KANIGANTI T, DEOGADE A, MADUSKAR A, *et al.* Sensitivity of olfactory sensory neurons to food cues is tuned to nutritional states by Neuropeptide Y signaling. *Journal of Neurochemistry*, 2021, 159(6): 1028–1044
- KEHOE A S, VOLKOFF H. Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 146(3): 451–460
- LEI L, DENG X, YUAN D, *et al.* Molecular cloning and function characterization in feeding of neuropeptide Y in Gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Pakistan Journal of Zoology*, 2019, 51(3): 1017–1025
- LIU H, BAI J J, LI S J. Cloning and analysis of DNA and cDNA sequence in NPY gene of Northern and Florida subspecies of largemouth bass. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(5): 99–106 [刘浩, 白俊杰, 李胜杰. 大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种 NPY 基因的 DNA 和 cDNA 克隆及序列分析. *生物技术通报*, 2016, 32(5): 99–106]
- LIU X Z, XU Y J, LI R, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition of the muscle of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 128–135 [柳学周, 徐永江, 李荣, 等. 黄条鲮 (*Seriola aureovittata*) 肌肉营养组成分析与评价. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 128–135]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MURASHITA K, KUROKAWA T, EBBESSON L O E, *et al.* Characterization, tissue distribution, and regulation of agouti-related protein (AgRP), cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 162(2): 160–171
- OPAZO R, PLAZA-PARROCHIA F, CARDO G R, *et al.* Fasting upregulates *npv*, *agrp*, and *ghsr* without increasing ghrelin levels in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Frontiers in Physiology*, 2019, 9: 1901
- SOENGAS J L, CERDÁ-REVERTER J M, DELGADO M J. Central regulation of food intake in fish: An evolutionary perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2018, 60(4): R171–R199
- TATEMOTO K, CARLQUIST M, MUTT V. Neuropeptide Y: A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 1982, 296(5858): 659–660
- TOLÁS I, KALANANTHAN T, GOMES A S, *et al.* Regional expression of *npv* mRNA paralogs in the brain of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) and response to fasting. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 720639
- VOLKOFF H, RØNNESTAD I. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 2020, 7(4): 307–320
- WANG B, WANG K J, CUI A J, *et al.* LPXRFa down-regulates brain reproductive genes in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 2021, 545: 737251
- WANG Q, TAN X, DU S, *et al.* Characterization, tissue distribution, and expression of neuropeptide Y in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(3): 553–558
- XU Y J, ZHANG Z G, LIU X Z, *et al.* Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172–182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲮早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172–182]
- YOKOBORI E, AZUMA M, NISHIGUCHI R, *et al.* Neuropeptide Y stimulates food intake in the zebrafish,



- Danio rerio*. Journal of Neuroendocrinology, 2012, 24(5): 766–773
- YOUSEFVAND S, HAMIDI F. The role of ventromedial hypothalamus receptors in the central regulation of food intake. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(1): 689–702
- ZHANG L, REED F, HERZOG H. Leptin signalling on arcuate NPY neurones controls adiposity independent of energy balance or diet composition. Journal of Neuroendocrinology, 2020, 32(9): e12898

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Characterization of *npv* Gene and Its Response to Starvation-Refeeding Strategy in *Seriola aureovittata*

QIU Xiajun<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>, XU Yongjiang<sup>2①</sup>, CUI Aijun<sup>2</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>

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

**Abstract** Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*), a pelagic marine finfish species with a worldwide distribution, is regarded as an emerging candidate for the aquaculture industry owing to its fast growth, superior flesh quality, and farming suitability in both sea cages and land-based facilities in China. The species has high economic value and is the second most produced *Seriola* species in the world following Japanese yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Researchers worldwide have studied the role of regulatory factors neuropeptide Y (NPY) in fish feeding regulation. In recent years, there has been great progress in research on food intake in fish, however, very little attention has been paid to the endocrine regulation mechanism of food intake. Methods on strengthening the production performance of fish through appetite regulation is still a hot research topic.

The control of food intake and energy metabolism in vertebrates are complex processes involving several neural pathways. Some hypothalamic signals are released by peripheral tissues that are associated with energy homeostasis or nutrient availability. Among the signaling molecules involved, NPY plays a key role. NPY is recognized as one of the most effective appetite regulators, which primarily function as a signaling factor to regulate a variety of biological processes such as food intake and glucose homeostasis. The orexigenic actions of NPY have been well investigated thoroughly over the past decades. Much evidence supports that NPY's functional role as a regulator of energy homeostasis and appetite control is conserved across vertebrates, including teleosts. In several species, including rainbow trout, Nile tilapia, and grass carp, NPY injections increase food intake, supporting an orexigenic role. In line with this, food deprivation increased *npv* mRNA expression in the brain, such as seen for goldfish and Johnny carp. Moreover, refeeding normalized *npv* mRNA abundance following food deprivation. As *S. aureovittata* feeds heavily and fiercely, the breeding industries need to understand its feeding control mechanism. To make real-time adjustment to feeding strategy, it is necessary to obtain high-quality and high-yield aquatic products with the least input to maximize economic benefits. As a potent appetite stimulating factor, *npv* has been proven to promote feeding, but this gene has not been identified in *S. aureovittata*. Therefore, it is necessary to explore the variable rules of the *npv* gene in feeding and starvation compensation

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

mechanism, to provide the special compound feed for breeding.

To gain insight into the existence of *npv* in *S. aureovittata*, we used homologous cloning, RNA extraction and reverse-transcription to obtain the ORF sequence of *npv*. *npv* belongs to the pancreatic polypeptide (PP) family, which plays an important role in appetite regulation and energy expenditure in mammals and fish. The ORF of *S. aureovittata npv* is 300 nucleotides in size and encodes a 99-amino-acid precursor, with a calculated molecular mass and isoelectric point of 11.24 kDa and 5.02, respectively. The precursor protein is composed of a predicted signal peptide of 28-aa in size, 36-aa putative mature peptide, a GKR protein proteolytic site, and a 32-aa C terminus of unknown function. Bioinformatics analysis on the amino acid sequence identities and evolutionary relationships of the *npv* was performed. Comparison of homology of the precursor peptide sequences of *npv* analysis revealed that *S. aureovittata npv* displayed a high degree of identity with the counterparts of *Seriola dumerili* (99.0%), *Morone saxatilis* (98.0%), *Micropterus salmoides* (96.0%), and *Scophthalmus maximus* (94.9%), followed by *Cynoglossus semilaevis* (93.9%) and *Oryzias latipes* (92.9%). Phylogenetic analysis highly supported that the *npv* of *S. aureovittata* was closely related to that of *S. dumerili*. Furthermore, using real-time quantitative PCR, we found that the *npv* mRNA is widely expressed in 12 tissues, with abundant expression in the brain, followed by the pituitary and stomach. In addition, except for the intestine and gonad, *npv* was found to have no significant difference in all other detected tissues of both sexes. To establish the functional link between *npv* and feeding, the expression profiles of *npv* mRNA during food deprivation and refeeding were examined in *S. aureovittata*. We detected the 7 d, 14 d, and 21 d starvation and 7 d refeeding effect on *npv* mRNA levels. Results showed that fasting induced an increase of *npv* mRNA levels in brain, pituitary, and stomach when compared to the control groups. Interestingly, the pituitary *npv* transcripts significantly increased after 21 d of starvation compared with the control group. In addition, refeeding normalized *npv* mRNA abundance following food deprivation in the brain, pituitary, and stomach. These results indicated that *npv* is involved in the regulation of feeding and energy homeostasis in *S. aureovittata*. Collectively, we provided initial evidence for the existence of *npv* in *S. aureovittata* and suggested its involvement in the regulation of feeding, which plays an important role in the starvation compensation mechanism.

In summary, we obtained the ORF sequence of *npv* and clarified its role as a potent orexigenic peptide in feeding regulation of *S. aureovittata*, which would be beneficial for specific feed for this species.

**Key words** *Seriola aureovittata*; *npv*; Cloning; Tissue expression; Food intake

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221213001

http://www.yykxjz.cn/

张文静, 徐永江, 崔爱君, 王滨, 姜燕, 王开杰, 周鹤庭. 黄条鲮*igfbp-1*和*igfbp-2*基因克隆、表达及其生长调控作用. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 84-98

ZHANG W J, XU Y J, CUI A J, WANG B, JIANG Y, WANG K J, ZHOU H T. Molecular cloning, expression profiles of insulin-like growth factor-binding protein-1 (*igfbp-1*) and *igfbp-2* and their regulation effects on growth of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 84-98

# 黄条鲮*igfbp-1*和*igfbp-2*基因克隆、表达 及其生长调控作用\*



张文静<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>2①</sup> 崔爱君<sup>2</sup> 王滨<sup>2</sup> 姜燕<sup>2</sup> 王开杰<sup>2</sup> 周鹤庭<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022; 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深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, IGFbps)在调节胰岛素样生长因子的生物学活性和生长调控中起着至关重要的生理作用。本研究克隆了黄条鲮(*Seriola aureovittata*) *igfbp-1*、*igfbp-2a*和*igfbp-2b*等3个基因cDNA编码的开放阅读框(ORF)序列,分析了其组织分布特征,并检测了工厂化不同养殖密度下黄条鲮肝脏中5个基因*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*对生长的调控作用。结果显示,*igfbp-1*的ORF长为741 bp,共编码246个氨基酸;*igfbp-2a*的ORF长度为882 bp,共编码293个氨基酸;*igfbp-2b*的ORF长度为810 bp,共编码269个氨基酸。它们均具有广泛的组织表达特性,其中在肝脏中显著高表达,且具有性别二态性表达特性。工厂化养殖条件下,低密度组实验鱼生长速度最快且*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*表达量均最高,与中、高密度组有显著性差异( $P<0.05$ ),且与血清IGF-1、GH表达趋势相同,与皮质醇含量及葡萄糖浓度的趋势相反;而中、高密度组实验鱼的生长及*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*表达量均无显著差异。本研究表明,*igfbp-1*、*igfbp-2a*和*igfbp-2b*参与了不同养殖密度下黄条鲮生长的调控过程,且与*igf-1*、*igf-2*对生长的表达调控存在正向协同效应。研究结果为阐释黄条鲮生长的分子机制以及工厂化条件下适宜养殖密度的调控提供了理论依据。

**关键词** cDNA克隆; *igfbp-1*; *igfbp-2*; 黄条鲮; 组织表达; 生长调控

中图分类号 S965.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0084-15

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)在脊椎动物的生长发育和代谢调节中起着重要作用,主要包括IGFs(IGF-1、IGF-2和IGF-3)、细胞表面受体(IGF-1R和IGF-2R)和IGF结合蛋白(IGFBP)等关键因子。IGFBP是一个由6个成员组成的蛋白质

家族(IGFBP1~6)(Hwa *et al*, 1999; Duan *et al*, 2005),对IGF有高度的亲和力。IGFBP通过与IGF及其受体之间的相互作用影响IGF的分布、稳定性、生物学活性以及在体循环中的流通、转运,从而实现对脊椎动物生长的调控。目前,在哺乳动物中已发现有6种

\* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM30001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。张文静, E-mail: 1024159439@qq.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-13, 收修改稿日期: 2023-02-13

类型的 *igfbp*, 每一种通常都有一个等位基因形式, 而在斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼中每个 *igfbp* 则有 2 个或 4 个亚型, 它们虽然在结构上高度同源, 但各有不同的结构功能和组织表达特性(Allard *et al.*, 2018)。研究显示, 肝脏是硬骨鱼类 *igfbp* 主要的合成场所(钱焜等, 2014)。*igfbp-1* 被认为是硬骨鱼生长、繁殖和发育的重要调控因子(Wood *et al.*, 2005a; Garcia de la Serrana *et al.*, 2018), 如在大西洋鲑幼鱼中,*igfbp-1* 可以与皮质醇相互作用来调控生长(Breves *et al.*, 2020)。在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)体外孵育的原代肝细胞中, *igfbp-1* 可通过与胰岛素的互作进而实现对细胞代谢和生长的调控(Yang *et al.*, 2019)。在硬骨鱼中, *igfbp-2* 具有广泛组织表达特性, 对 *igf* 的调控可能通过自分泌或者旁分泌的通路进行。如在斑马鱼中, 长期禁食诱导了肝脏中 *igfbp-2* 表达量增加(Duan *et al.*, 1999)。另外, *igfbp-2* 会通过 *igf* 的高亲和力来抑制 *igf* 配体的活性从而对斑马鱼生长过程起抑制调控作用(Wood *et al.*, 2005b)。Chen 等(2014)在金鱼(*Carassius auratus*) *igfbp-2* 的克隆、分子表征及表达分析中发现, 禁食后金鱼肝脏中 *igfbp-2* 表达量显著上调, 并在饲养后迅速恢复到正常水平, 表明 *igfbp-2* 的表达可能与金鱼的合成和分解代谢有关, 且受到代谢因子的调控。

黄条鲮(*Seriola aureovittata*)是一种具有长距离洄游特性的暖温性大洋性经济鱼类, 分布于全球海洋中上层, 具有较高的经济价值和营养价值(徐永江等, 2019), 适宜在陆基工厂化循环水、深水网箱、围栏以及养殖工船等多种模式下养殖(崔爱君等, 2022)。黄条鲮体型大、生长速度快, 我们前期陆海接力养殖的研究表明, 鱼类的生长受到多种环境因素的影响, 如养殖密度、温度等(Ndandala *et al.*, 2022; 倪嘉豪等, 2020), 同时受到内源性生长激素-胰岛素样生长因子(GH-IGFs)轴的调控。*igfbp-1* 和 *igfbp-2* 是硬骨鱼类生长轴的重要调控因子, 它们通过与 *igfs* 及其受体协同作用调控鱼类的生长发育和营养代谢, 但其在黄条鲮生长调控中的功能与作用目前尚未见报道。

本实验室前期已开展黄条鲮快速生长的调控机制相关研究, 克隆了 *gh*、*igf-1*、*igf-2*、*ghr* 等生长相关功能基因, 并揭示了其在早期生长发育中的分子调控功能(Wang *et al.*, 2019、2020)。为进一步揭示生长轴在黄条鲮生长中的调控作用, 本研究克隆得到黄条鲮 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因开放阅读框(ORF)区域, 解析其结构特征及表达特性, 并探究肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2* 与生长轴关键因子 *igf-1*、*igf-2* 对不

同养殖密度下黄条鲮生长的调控作用, 为进一步阐释黄条鲮生长调控机制与开发养殖关键技术提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用黄条鲮取自大连富谷食品有限公司工厂化养殖车间, 在 6 个容积约 3 m<sup>3</sup> 的圆形玻璃缸水槽中随机投放实验用鱼, 采用流水养殖的方式, 日换水率 400%以上。养殖水温保持在 22~27 °C, 盐度为 29~32, 溶解氧>6 mg/L。按鱼体重的 3%~5%投喂冰鲜玉筋鱼(*Ammodytes personatus*), 均饱食投喂。每天投喂后 1 h 清理养殖水槽, 保持底部清洁。实验开始之前, 将实验鱼在玻璃缸水槽中暂养适应 14 d。将筛选后体质健康的 1 龄鱼[平均体长为(33.12±0.83) cm, 平均体重为(565.83±70.22) g]重新随机分布, 并开始正式实验, 设置低密度组(10 尾/m<sup>3</sup>)、中密度组(20 尾/m<sup>3</sup>)和高密度组(30 尾/m<sup>3</sup>) 3 个实验组, 每个实验组设 2 个平行。实验鱼在不同养殖密度下 60 d 后取样。暂养结束时随机取雌雄鱼各 3 尾, 用 120 mg/L 的 MS222 麻醉处理, 在冰盘上快速取脑、垂体、鳃、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、头肾、胃、肌肉、性腺等组织于 1.5 mL 无酶灭菌离心管中, 置于液氮中保存, 后转入-80 °C 冰箱中保存, 用于 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因克隆与组织分布分析。实验结束时, 每个密度组分别采集 6 条实验鱼的肝脏组织于 1.5 mL 无酶灭菌离心管中, 置于液氮中保存后转入-80 °C 中保存, 用于检测不同养殖密度下肝脏组织中 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因对黄条鲮生长的表达调控作用分析。

### 1.2 黄条鲮 *igfbp-1*、*igfbp-2* 基因克隆

提取肝脏组织总 RNA, 使用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa); 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 以 NanoDrop2000C 分光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 的质量。用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real-Time)反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA 第一链。

根据 GenBank 数据库中黄条鲮 *igfbp* 基因的预测序列设计引物(表 1), 按照表 2 中的 PCR 体系及程序扩增 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 3 个基因的 ORF 区。

PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带切胶、回收, 将胶回收产物用 pEASY-T1 Simple 载体(TransGene Biotech, 中国)、Trans1-T1

表1 基因克隆及定量表达分析用的引物序列

Tab.1 Primer sequences used for gene cloning and quantitative expression analysis

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>igfbp-1</i>	F: ATGCTTCTGTATTTAAACATCCTGGTG R: TCAGTGTGTGACTTCTTGATGACACTC	ORF 扩增 ORF amplification
<i>igfbp-2a</i>	F: ATGATAATGACCAAAAACCTCATGCCTA R: CTATATCTGGGCCATGTCAGGGA	ORF 扩增 ORF amplification
<i>igfbp-2b</i>	F: ATGGTCATACATTTTACATACGGATGGC R: TCAGCGGGACGTTGATGCA	ORF 扩增 ORF amplification
<i>qigfbp-1</i>	F: TGAGAAGACATTTGTGGCAGGAGTG R: CGGGATGGCAGGACAGTTGTTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigfbp-2a</i>	F: GACACCGAGACGACCACTTTCAG R: ATCTCACTCACGCCCTGCTCAG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigfbp-2b</i>	F: CACCAAGAGACCAGCCATAGATGC R: ACTCCGTCTGACAGGCACTCTG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigf-1</i>	F: TTGTGTGTGGAGAGAGAGGCTTT R: GAAGCAGCATTCGTCACAAATG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigf-2</i>	F: GCAAAGATACGGACCACTCACT R: CGCAGGACTGGACGAAGACAT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>arp</i>	F: TGCCATTGTCATACACTTGCTG R: GGGGAACCATTGAAATCTTGAG	内参基因 Reference gene

表2 黄条鲮 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* PCR 体系及扩增程序Tab.2 PCR system and amplification procedure for *Seriola aureovittata igfbp-1*, *igfbp-2a* and *igfbp-2b*

基因 Gene	PCR 体系 PCR system	PCR 扩增条件 PCR amplification conditions
<i>igfbp-1</i>	25 $\mu$ L Premix <i>Taq</i> <sup>TM</sup> (TaKaRa <i>Taq</i> <sup>TM</sup> Version 2.0 plus dye)、正反引物各 1 $\mu$ L、cDNA 模板 2 $\mu$ L、ddH <sub>2</sub> O 补充终体积为 50 $\mu$ L	95 $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s), 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存
<i>igfbp-2a</i>	25 $\mu$ L Premix <i>Taq</i> <sup>TM</sup> 、正反引物各 1 $\mu$ L、cDNA 模板 2 $\mu$ L、ddH <sub>2</sub> O 补充终体积为 50 $\mu$ L	95 $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1min), 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。
<i>igfbp-2b</i>	0.5 $\mu$ L Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs)、正反引物各 2.5 $\mu$ L、10 $\mu$ L 5 $\times$ Q5 reaction buffer、1 $\mu$ L 10 mmol/L dNTP、cDNA 模板 3 $\mu$ L、ddH <sub>2</sub> O 补充终体积为 50 $\mu$ L	98 $^{\circ}$ C 30 s, 50 个循环(98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s), 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

Phage Resistant 感受态细胞(TransGene Biotech,中国)进行连接转化。之后挑取阳性克隆,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.3 序列分析

利用 BLAST 程序比对所得 cDNA 及其氨基酸序列;利用 DNAMAN 进行多序列比对及预测蛋白分子量和等电点;利用 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)在线软件预测蛋白的信号肽;利用 NetPhos 3.1 Server 软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测磷酸化位点;利用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析预测结构域;利用 SWISS-MODEL 软件(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测蛋白 3D 结构,建立模型;

利用 MEGA 7 软件构建系统进化树。

### 1.4 基因表达特性分析

检测了 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因的组织表达特性,以及工厂化不同养殖密度下实验鱼肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

基因定量检测使用 SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup>(TaKaRa)试剂盒,定量 PCR 体系为 10  $\mu$ L: cDNA 模板 1  $\mu$ L, TB Green Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> II (TaKaRa) 5  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L,灭菌水 3.2  $\mu$ L。运用 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪(美国)进行 qRT-PCR。采用两步法反应,PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环。每个样品设 3 个重复,使用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法计算基因的相对表达量。黄条鲮 *arp* 基因作为内参(表 1)。



### 1.5 统计分析

数据表示为平均值±标准误(Mean±SE), 用 SPSS 26.0 软件对基因在不同组织间、不同性别间的表达水平差异进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 运用 Duncan 多重比较进行显著性检验。采用 Pearson 法进行基因表达量与不同养殖密度下生长的相关性分析。以  $P < 0.05$  作为差异显著性标准。

## 2 结果

### 2.1 黄条鲮 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的基因结构特征

黄条鲮 *igfbp-1* 基因 ORF 长度为 741 bp, 共编码 246 个氨基酸, 其编码蛋白预测分子量为 26.558 kDa, 等电点为 6.55; 预测信号肽为 23 个氨基酸, 整个编码序列包含 18 个半胱氨酸残基, 聚集在 N 末端和 C 末端结构域(图 1)。

*igfbp-2a* 基因 ORF 长度为 882 bp, 编码 293 个氨基酸, 预测信号肽为 33 个氨基酸, 其编码的蛋白预测分子量为 32.850 kDa, 等电点为 7.42, 成熟蛋白在其 N 末端和 C 末端含有 18 个半胱氨酸残基(图 2)。

*igfbp-2b* 基因 ORF 长度为 810 bp, 编码 269 个氨基酸, 预测信号肽为 23 个氨基酸, 其编码的蛋白预测分子量为 29.774 kDa, 等电点为 7.19, 成熟蛋白在其 N 末端和 C 末端含有 18 个半胱氨酸残基(图 3)。

3 个基因编码的蛋白 3D 空间结构如图 4 所示: IGFBP 空间结构 N 末端均存在胰岛素样生长因子结合蛋白同源物(IB)保守结构域, C 末端均含有甲状腺球蛋白 I 型重复(Ty-1)保守结构域, 且均具有蛋白激酶 A 和 C、酪蛋白激酶和细胞周期素依赖蛋白激酶 5 磷酸化位点。IGFBP-1 的 N 端结构域位于 32~109, C 端结构域位于 165~240, 该域具有 3 个二硫键, 分别位于 165~195、206~217、219~240; 具有 DNA 依赖性蛋白激酶磷酸化位点;  $\alpha$ -螺旋占 26.83%, 延伸链占 7.72%。IGFBP-2A 的 N 端结构域位于 37~114, C 端结构域位于 197~276, 该域中, 3 个二硫键分别位于 197~231、242~253、255~276, 还存在一个 N-糖基化位点位于 275, 以及 P38 蛋白激酶、DNA 依赖性蛋白激酶、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶、细胞分裂周期激酶 2、蛋白激酶 G 磷酸化位点;  $\alpha$ -螺旋占 29.69%, 延伸链占 6.83%。IGFBP-2B 的 N 端结构域位于 26~102, C 端结构域位于 173~252, 该域中, 3 个二硫键分别位于 173~207、218~229、231~252, 还存在糖原合成酶激酶-3 磷酸化位点;  $\alpha$ -螺旋占 25.65%, 延伸链占 9.67%。

```

1 ATGCCGCGATTATATGAGAAGACATTGTGGCAGGAGTGGCTCTGGCTGTCTTAGTCATG
1 M P G L Y E K T F V A G V A L A V L V M
                                     signal peptide
61 GTGAGATCTCCCCAGTGGTGGGACCGGAGCCAATCCGCTGTGCCCCCTGCACGCAGGAG
21 V R S S P V V G P E P I R C A P C T Q E
                                     IB domain
121 AAACAGAACACTGTCTGCCATCCCGGCAGAGTGAAGCAGGTGCTGAGGGAGCCTGGC
41 K Q N N C P A I P A E C K Q V L R E P G
181 TCGGGTGTGCATGGCTGGCTGGACAAAGTGCATCCTGTGGAGTTCACACAGCC
61 C G C C M A C A L D K G A S C G V H T A
241 CACTGTGGTGAGGGTCTCCGCTGCACTGCCAGGCGGGTGAGGCCAGACCTCTCCATGCT
81 H C G E G L R C T A R P G E A R P L H A
301 CTGACCAGGGGCAAGGGTCTGCACTGAAGACTTGGGCCAAGAGGAAACTGAAGGACTC
101 L T R G Q G V C T E D L G Q E E T E G L
361 CCTGACCACGGCTCCCTGCACTACCTGTGGCCCTCAACCTCCCTTTGACCACCATGAC
121 P D H G S L H Y L L G L N L P F D H D H
421 ACTGTGAGGGCCAAAGAGAGCATCAAGGCCAAGTCAACGCTATCCGCAACAACTGGAA
141 T A E G Q E S I K A K V N A I R N K L E
481 CAACAGGACCCCTGTACATTGAAGTGCACAACGCACTGGACATGATAGCCAGCTCTCAG
161 Q Q G P C H I E L H N A L D M I A S S Q
                                     Thyroglobulin_1 domain
541 CAGAACTAGGAGAGAAGTTCACAACCTTCTACCTCCCAACTGTGACAAGTACGGCTTC
181 Q K L G E K F T T F Y L P N C D K Y G F
601 TACAAGCCCAAGCAGTGTGAGTCTCTCTGGTGGGCGCCGCTCGCTGTGGTGTG
201 Y K P K Q C E S S L V G P P A R C W C V
661 TCTCCCTGGAATGGGAAGAAGATCCCAGGATCGAGGACCTGTGGGTGATTAGAGTGT
221 S P W N G K K I P G S S D L L G D S E C
721 CATCAAGAAGTCAACACTGA
241 H Q E V T H *
    
```

图 1 黄条鲮 *igfbp-1* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列  
Fig.1 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-1* gene from *Seriola aureovittata*

ORF 区用大写字母表示。起始密码子加框。信号肽加下划线。下划线和加粗的氨基酸序列表示保守结构域(IB 结构域和 Ty\_1 结构域)。灰色阴影表示半胱氨酸残基; \*表示终止密码子。下同。

The ORF domain is indicated by capital letters. The start codon is boxed. The signal peptide is underlined. The underlined and bold amino acid sequence represent the conserved domains (IB domain and Ty\_1 domain). The gray shadow shows cysteine residues. The stop codon is indicated by an asterisk. The same as below.

### 2.2 氨基酸序列同源性与系统进化分析

同源性分析表明, 黄条鲮 IGFBP-1 氨基酸序列与五条鲮(*Seriola quinqueradiata*)、斜带石斑鱼、黄金鲈(*Perca flavescens*)的 IGFBP-1 同源性分别为 98.37%、84.08%、83.20%, 与哺乳动物的 IGFBP-1 同源性为 41%~46% (图 5)。IGFBP-2A 与高体鲮(*Seriola dumerili*)、河鲈(*Perca fluviatilis*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的同源性分别为 100%、95.90%、96.59%、93.01%, 与高等脊椎动物的同源性为 50%~51%。*igfbp-2b* 氨基酸序列与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、斑马鱼、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的同源性分别为



```

1 ATGATATGACCAAAAAACCTCATGCCTATAACGATGCTGCTGCTACGTGGGCTGCAGCTTG
1 M I M T K N L M P I T M L S Y V G C S L
signal peptide
61 CTGATCCTCTCCGGCTCTTTCGGCGGGCCCTCCCTGGCCGAGATGGTGTTCCTGCCGCCG
21 L I L S A S F A G A S L A E M V F R C P
IB domain
121 GGCTGCACCCGGGAGCGCCAGGCGCTGTGCCAAAAGCTCACCGAGACTTGCCTGGGAGATA
41 G C T A E R Q A L C P K L T E T C A E I
181 GTGCGGAAACCGGGTGGGGTGTGCCCGTGTGCCCGGCAAGAGGGCGAGATGTGC
61 V R E P G C G C C P V C A R Q E G E M C
241 GGCGTGTACACCCGAGGTGTTCACGGTCTCCGATGCTACCCACCGCCGATTCGGAG
81 G V Y T P R C S T G L R C Y P T P D S E
301 CTTCCCTGGGCAACTGGTGCAGGGCCAGGGGCACTGCCGGCGCAAAGTGGACACCGAG
101 L P L E Q L V Q G Q G Q C R R K V D T E
361 ACGACCACTTTCAGCCAGGAGCACCAGGAGCAAAACAGCGGTGAGGCCGTGGAGCCGCTG
121 T T T F S Q E H R E Q T S G E A V E P L
421 CCTGAGCAGGGCGTGTGAGATCCCGCGCTCCGGAAGCCAGTAAAGAGACCCCTGG
141 P E Q G V S E I P A V R K P S K E T P W
481 CTGGGACCAAAAGAGAGCGCAGTGCAGCAGCATAGACAGGAGATGAAGACCAAGATGAAG
161 L G P K E S A V R Q H R Q E M K T K M K
541 ACCAACAAGTGAAGAGGTCAAACCTACTCGGCCAAGCAGACTCAGTGTGACGAGGAG
181 T N K V E E V K P T R P K Q T Q C Q Q E
601 CTTGACCAAGTCTGGAGCGGATCAAGATGCCCTTCAGAGATAACCGAGGTCCCTCG
201 L D Q V L E R I S K M P F R D N R G P L
Thyroglobulin_1 domain
661 GAAGACCTGTATGCCCTGCACATCCCCAAGTGTGACAAGAGGGGGCAGTATAACCTCAA
721 E D L Y A L H I P N C D K R G Q Y N L K
771 CAGTGCAGAGATGTCTTCCACGGCCAGAGGGGCGAGTGTGGTGGCTCAACCCCTCACACC
241 Q C K M S L H G Q R G E C W C V N P H T
781 GGCCGACCTATCCCATCAGCCCCACCGTGAAGGGCGACCCCAACTGCAGCCAGTACCTC
261 G R P I P S A P T V R G D P N C S Q Y L
841 AGAGAGCTGGAGCTGCCTCCCTGCATGGCCAGATATAG
281 R E L E L E L P D M A Q I *

```

图2 黄条鲷 *igfbp-2a* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列  
Fig.2 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-2a* gene from *Seriola aureovittata*

```

1 ATGTCATACATTTTACATACGGATGGCTGTTGCATACATGCTTTCCTGGAATCTTA
1 M V I H F T Y G W L F A Y I A L P G I L
signal peptide
61 CTCGGGGATTAGCTTTCGGATGCCCAAGTTGCACCGGGCGGTTTAGCTGCGTGCCCC
21 L G D L A F R C P S C T A A R L A A C P
IB domain
121 AAAGTACCACAGATATGTGCAGAGATCGTGAGAGGCCAGGCTGTGGTGTCTTCAATG
41 K Y T T V C A E I V R E P G C G C P M
181 TGTGCCAGGCTGGAGGGGAGCTTTCGGGGTCTACACGCCAGGTGTCCACTGGCCTG
61 C A R L E G E L C G V Y T P R C S T G L
241 AGATGCTACCCGAGCGCAGAGGCTGAGTTACCTTGAACAGCTCATCCAGGGTTTAGGT
81 R C Y P S A E A E L P L Q Q L I Q G L G
301 CGATGTGGGCAAAAAGTGAATAGATTCGACAAGTTTGACCAACAGGCAAAATGAG
101 R C G Q K V E I D S T S L D H Q A T N E
361 GTGCATGGGACTGAGAATCCACTCACAAGAGACAGCCATAGATGCTGCGTTATGGCAG
121 V H G T E N P L T K R P A I D A A L W Q
421 GAGTCGGCCAGGCAGTACTTGAACGAGCGCAAAACCAAGTGAAGACAAATCAACTG
141 E S A R Q Q Y L N E R K T K M K T N Q L
481 GAGGACCCCGAACCCGAAAGCTCCTCAGAGTGCCTGTGACAGCGGATGGACAAGGTC
161 E D P R T P K A P Q S A C Q T E L D K V
Thyroglobulin_1 domain
541 TTAGAGGAGATCTCCAAAATGACCTCTGAGGATAACAGAGGCCGCTGGAGAACCTGTAT
181 L E E I S K M T S E D N R G P L E N L Y
601 GGGCTCAAATTTCCAAACTGTGACAGACATGGATTGTACAACCTCAAACAGTGCAACATG
201 G L K F P N C D R H G L Y N L K Q C N M
661 TCCACCCAGCCAGAGGGGCGAGTGTGGTGTAAACCCCTTAACTGGGATCCAGATA
221 S T H G Q R G E C W C V N P L T G I Q I
721 CCGGCGACACCTAAAGTCAGAGGGGATCCCAACTGTAAACAGTTTCAAGAGGAGCTCAGG
241 P A T P K V R C G C T D P N C N Q F Q E E L R
781 GCAATGCCCACTGCATCAACGTCCCGCTGA
261 A M P T A S T S R *

```

图3 黄条鲷 *igfbp-2b* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列  
Fig.3 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-2b* gene from *Seriola aureovittata*

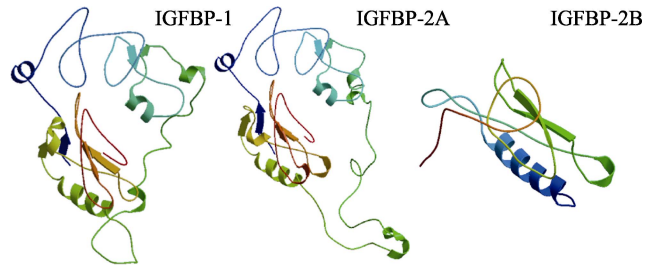


图4 黄条鲷 IGFBP-1、IGFBP-2A、IGFBP-2B 蛋白结构  
Fig.4 3D structure of *Seriola aureovittata* IGFBP-1, IGFBP-2A, and IGFBP-2B

84.39%、60.08%、56.93%，与高等脊椎动物的同源性为 45%~47%。黄条鲷 IGFBP-2A 和 IGFBP-2B 的氨基酸序列同源性为 55.22% (图 6)。

系统进化分析表明，黄条鲷 IGFBP-1 与五条鲷 IGFBP-1 聚为一个小的分支，又与黄金鲈和斜带石斑鱼等鲷形目鱼类聚为一个大的分支，哺乳动物的 IGFBP-1 单独为一分支。IGFBP-2A 与高体鲷 IGFBP-2 聚为一个小的分支，与河鲈和鞍带石斑鱼等鲷形目鱼类 IGFBP-2A 聚为一支，又与大菱鲆 IGFBP-2A、牙鲆 IGFBP-2A 鲷形目鱼类聚为大的一支。而 IGFBP-2B 与牙鲆 IGFBP-2B 等鲷形目鱼类聚为一小支，然后与斑马鱼 IGFBP-2B 鲤形目鱼类聚为一支，哺乳动物 IGFBP-2 聚为一支，表明黄条鲷 IGFBP-2B 在系统进化上的保守性较低(图 7)。

### 2.3 组织分布

黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 基因在所检测组织中均有分布(图 8)。*igfbp-1* 在雌雄鱼肝脏中均表达量最高( $P<0.05$ )，在性腺中也有高表达，且雄鱼表达量高于雌鱼( $P<0.05$ )，其他组织间的表达量极低且无显著差异。*igfbp-2a* 在雌雄鱼在肝脏中均表达量最高( $P<0.05$ )，其次为性腺( $P<0.05$ )，在其他组织中表达量相对较低，雌鱼肝脏中的表达量高于雄鱼的表达量( $P<0.05$ )。*igfbp-2b* 在雌雄鱼肝脏中均表达量最高( $P<0.05$ )，在其他组织中表达量较低且无显著性差异，雄鱼肝脏中的表达量高于雌鱼( $P<0.05$ )。

### 2.4 肝脏 *igfbp* 对不同养殖密度下生长的表达调控

本实验室前期研究已表明，在不同工厂化养殖密度条件下，黄条鲷的生长性能出现明显差异：低密度组实验鱼终末体质量和肥满度显著高于高密度组( $P<0.05$ )，增重率和特定生长率显著高于中、高密度组( $P<0.05$ )，而中、高密度组实验鱼生长差异不显著(姜燕等, 2022)。

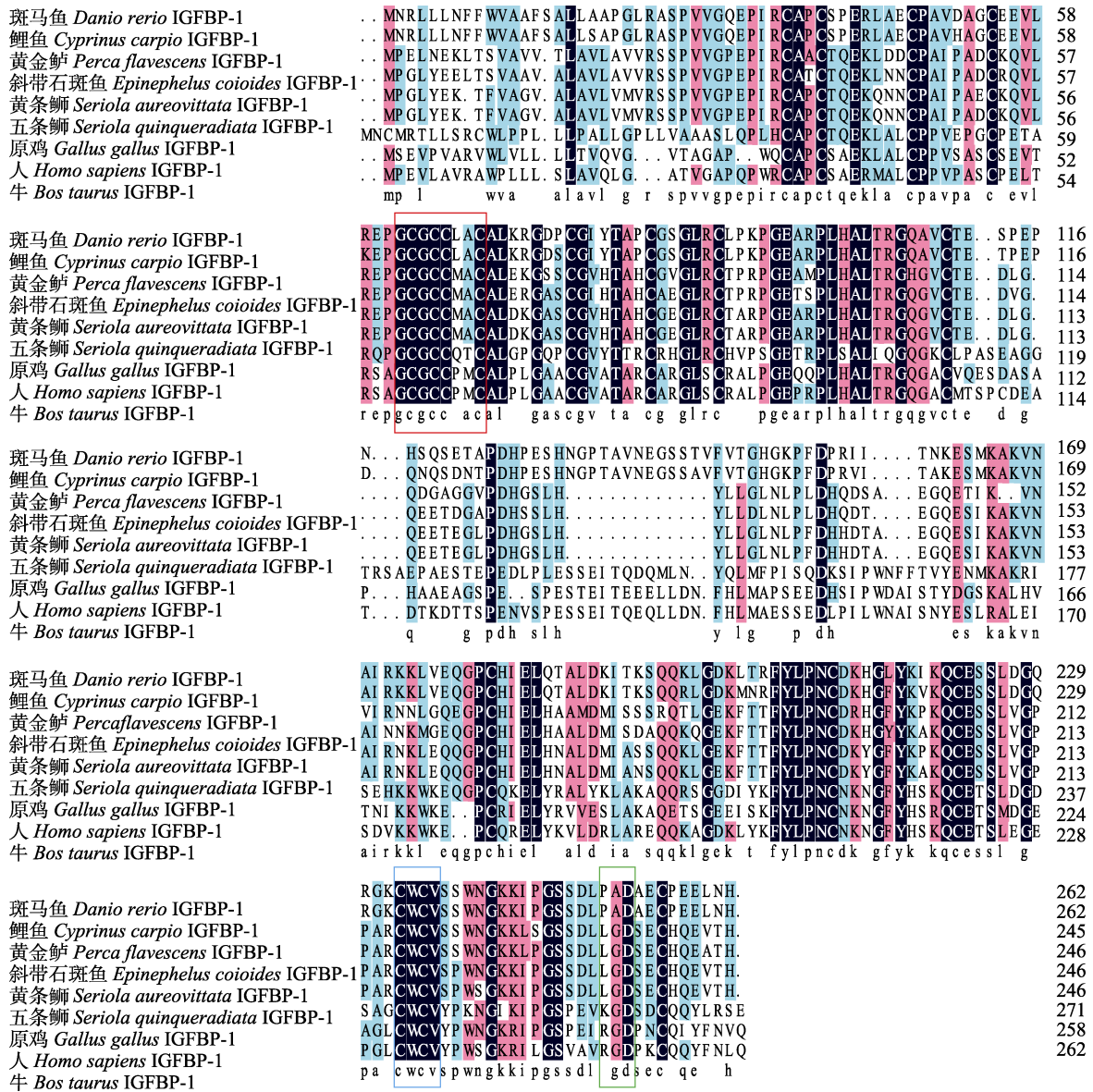
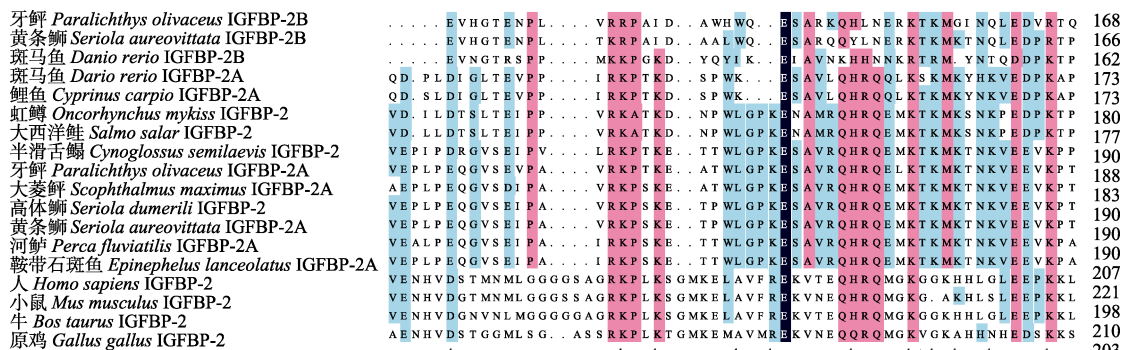


图 5 黄条鲷 IGFBP-1 与其他物种氨基酸序列比对

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of *Seriola aureovittata* IGFBP-1 with other species

红色框表示(GCGCCXXC)结构域, 蓝色框表示(CWCV)结构, 绿色框表示 RGD 结构。下同。

The red box represents the (GCGCCXXC) structure, the blue box the (CWCV) structure, and the green box the RGD structure. The same as below.







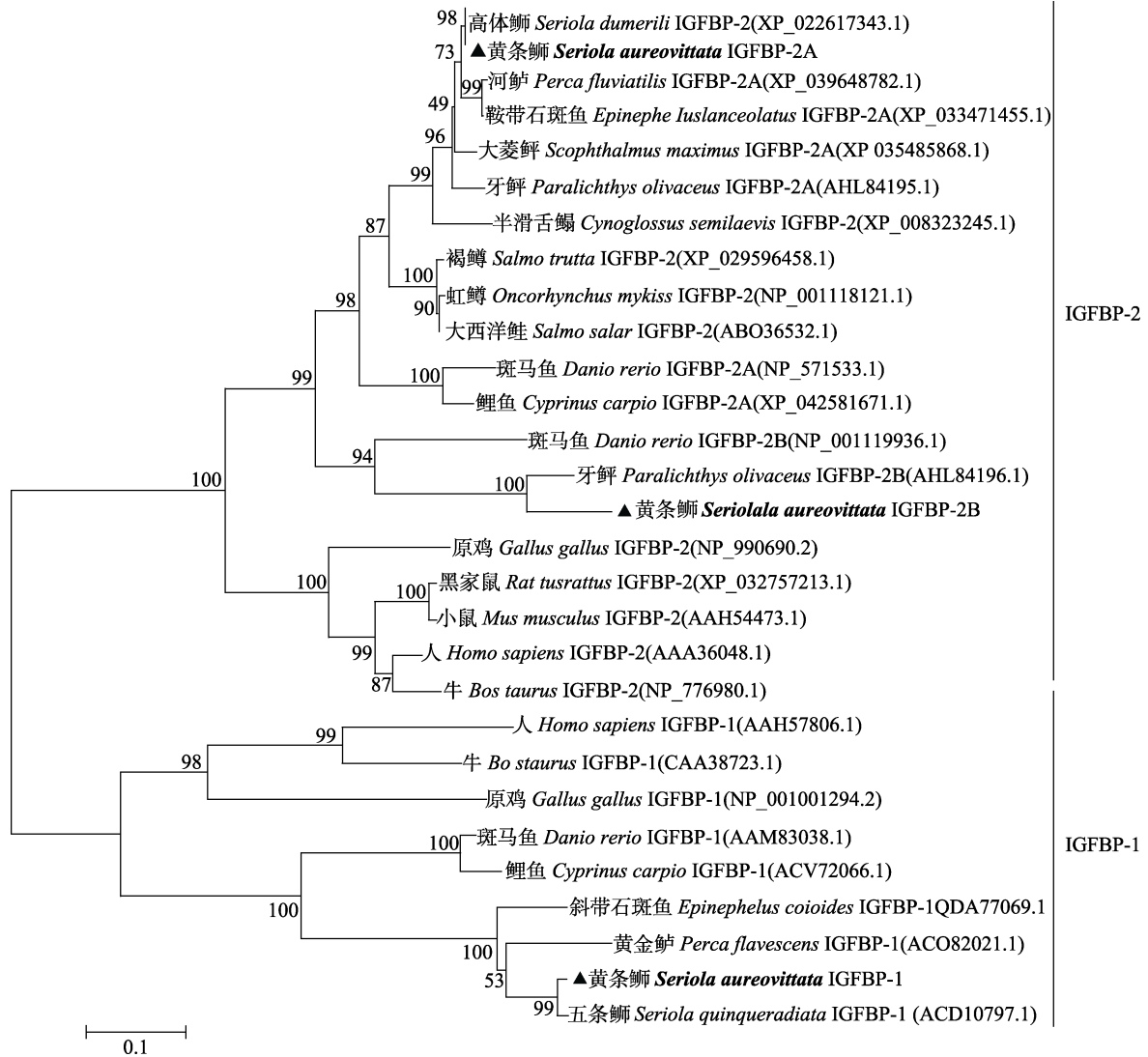


图 7 黄条鲷 IGFBP-1 和 IGFBP-2 氨基酸序列的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of *Seriola aureovittata* IGFBP-1 and IGFBP-2 amino acid sequences

检测了不同养殖密度组黄条鲷肝脏中 *igfbp-1*、*-2a*、*-2b* 以及 *igf-1* 和 *igf-2* 基因表达水平变化(图 9): 随着密度的增加, *igfbp-1*、*-2a*、*-2b* 的表达量呈现下降趋势, 低密度组表达量最高( $P<0.05$ ), 中、高密度组表达量低且无显著性差异; *igf-1* 和 *igf-2* 也呈现低密度组表达量最高的表达特性( $P<0.05$ ) (图 9)。相关性分析表明, 各基因表达水平均与低密度组实验鱼生长呈现显著正相关(*igfbp-1*  $r=0.836$ ,  $P<0.05$ ; *igfbp-2a*  $r=0.443$ ,  $P<0.05$ ; *igfbp-2b*  $r=0.549$ ,  $P<0.05$ ; *igf-1*  $r=0.500$ ,  $P<0.05$ ; *igf-2*  $r=0.925$ ,  $P<0.05$ ;) , 但与中、高密度组实验鱼生长无显著相关关系。

### 3 讨论

#### 3.1 黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2* 基因结构与系统进化分析

本研究首次获得了黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和

*igfbp-2b* 基因的 ORF 序列。结果显示, 与其他硬骨鱼类基本一致, *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 中均存在 N 末端结构域中 12 个半胱氨酸残基和 C 末端结构域中 6 个半胱氨酸残基, 这些半胱氨酸残基参与内部二硫键的形成以及帮助形成 N 末端和 C 末端结构域的球状结构, 且在进化上较为保守(Hwa *et al*, 1999; Zhou *et al*, 2008)。已有研究发现, 半胱氨酸残基参与了草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) *igfbp-2* 空间结构的形成(Yang *et al*, 2020)。序列比对结果显示, 在 N 末端结构域中, 黄条鲷 3 个 *igfbp* 之间也存在一个共同的保守的基序(GCGCCXXC), 五条鲷中也存在类似情况(Pedroso *et al*, 2009), 此基序在与 *igf* 的相互作用中起着重要作用(Kamangar *et al*, 2006)。不同物种中 *igfbp* 的 N 末端和 C 末端具有高度的保守性。中间可变结构域保守性较低, 翻译后修饰, 如糖基化位点和磷酸

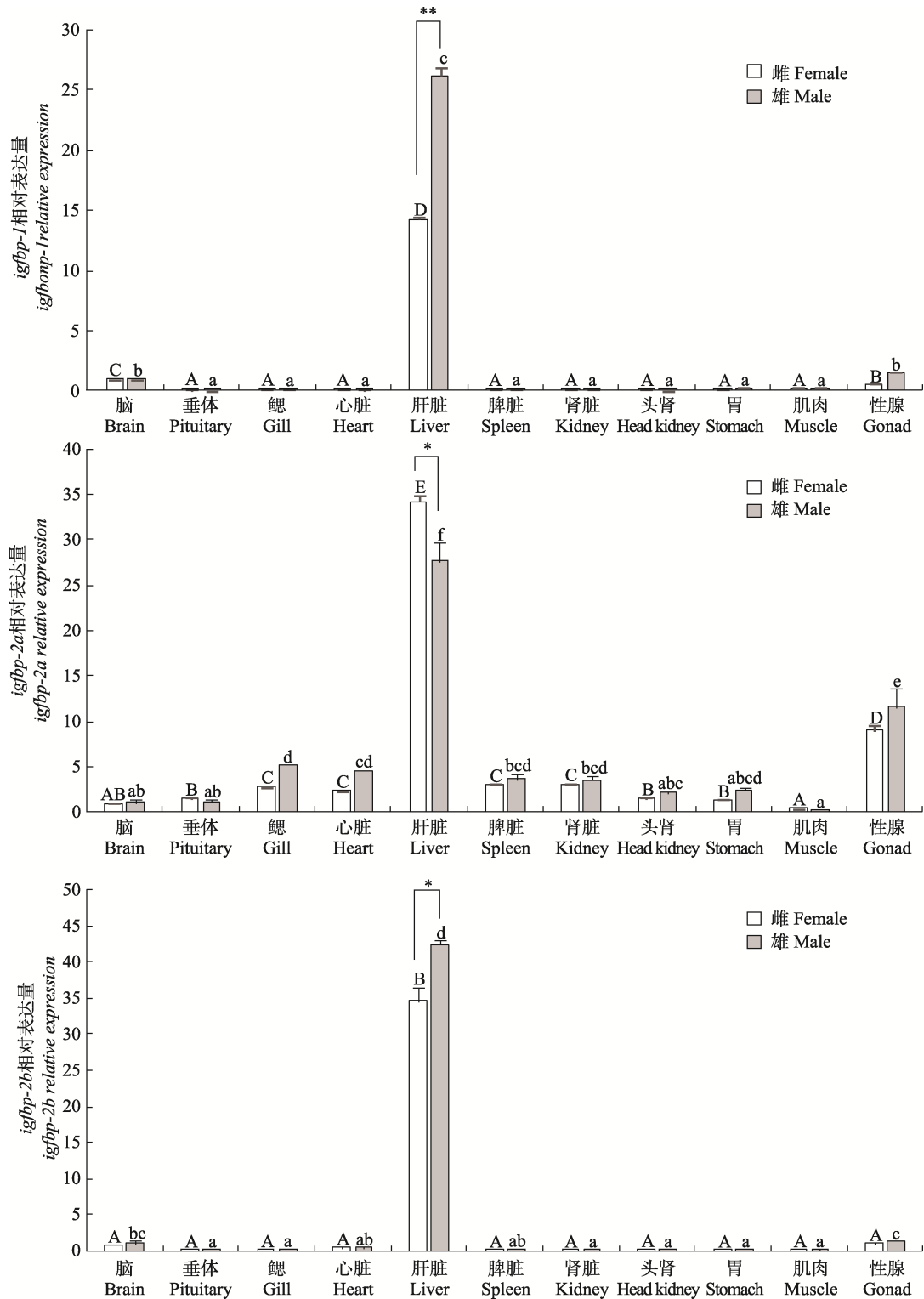


图8 黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig.8 Relative expression levels of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* in different tissues of *Seriola aureovittata*

不同大写字母表示雌鱼不同组织之间差异显著( $P < 0.05$ )；不同小写字母表示雄鱼不同组织之间差异显著( $P < 0.05$ )。

\*表示雌鱼和雄鱼在同一组织内存在显著差异( $P < 0.05$ )，\*\*代表有极显著差异( $P < 0.01$ )。

Different capital letters indicate significant differences between different tissues of female ( $P < 0.05$ ), and different small letters indicate significant differences between different tissues of male ( $P < 0.05$ ). \* indicates significant difference within the same tissue between female and male fish ( $P < 0.05$ ), and \*\* indicates highly significant difference within the same tissue between female and male fish ( $P < 0.01$ ).

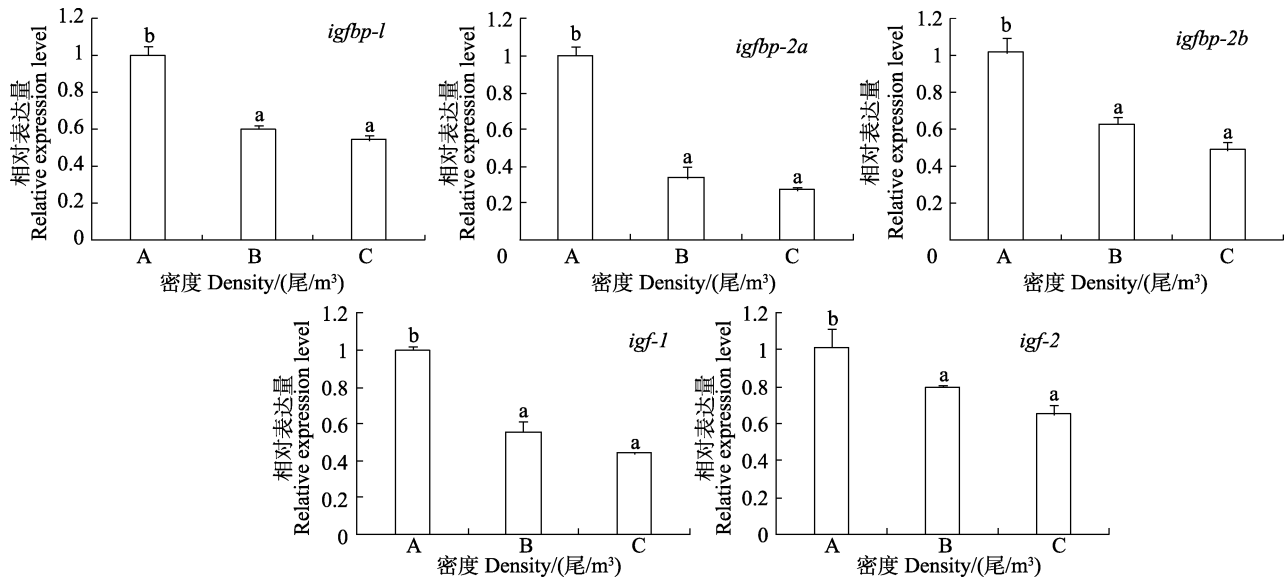


图 9 不同养殖密度下黄条鲮肝脏 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因的表达特性  
Fig.9 Expression characteristics of liver *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b*, *igf-1*, and *igf-2* of *Seriola aureovittata* under different stocking densities

A、B、C 分别代表低、中、高密度组。

A, B, and C stand for low, medium, and high density culture group, respectively.

化位点,通常在这个中间区域发现(Zhou *et al*, 2008)。黄条鲮 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的 C 末端结构域高度保守,其中包含一个保守的 CWCV 结构,此结构被称为甲状腺球蛋白 I 型重复结构域(钱焜等, 2014),可能在 *igfbp* 和 *igf* 与细胞外基质的结合中起重要作用(Bach, 2018)。先前研究表明,所有哺乳动物 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的 C 末端都含有 RGD 结构(Rodgers *et al*, 2008),人类 *igfbp-1* 可以通过 RGD 结构与  $\alpha 5\beta 1$  整合素结合来刺激细胞迁移(Feng *et al*, 2015),但在黄条鲮与其他硬骨鱼的 *igfbp-1* 中,其 C 末端区域缺失 RGD 结构,取而代之的结构为 LGD。斑马鱼(Maures *et al*, 2002)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)(钱焜等, 2014)、大菱鲆(胡健等, 2012) *igfbp-1* 中也均未发现 RGD 结构。而哺乳动物、鸟类和其他已知硬骨鱼 *igfbp-2* 中的 RGD 结构在黄条鲮 *igfbp-2* 中有发现,花鲈、大菱鲆 *igfbp-2* 中也是如此,表明 *igfbp-1* 在鱼类与硬骨鱼类中发挥生理功能的机制存在差异。

本研究从黄条鲮肝脏中克隆出 2 种类型的 *igfbp-2*, 分别为 *igfbp-2a*、*igfbp-2b*。黄条鲮 *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因位于不同分支。*igfbp-2a* 与高体鲮关系最近,和斑马鱼 *igfbp-2a* 聚为一支;而 *igfbp-2b* 与牙鲆关系最近,和斑马鱼 *igfbp-2b* 聚为一支。系统进化分析结果表明黄条鲮 *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因起源于同一祖先基因,经历了鱼类基因组的复制,是人类等其他哺乳动物 *igfbp-2* 的同源基因。在虹鳟体内也

发现了 2 种同源的 *igfbp-2* (钱焜等, 2014), 其中一种还被误命名为 *igfbp-3* (Maures *et al*, 2002), 原因是其结构与其他 *igfbp* 结构相似度很低。本研究也发现,黄条鲮 *igfbp-2b* 在结构上保守性较差,系统进化分析也表明其与鲽形目(Pleuronectiformes)、鲤形目(Cypriniformes)聚为一支,表明其在系统进化上保守性不高。在斑马鱼及其他鱼中也发现, *igfbp-2* 存在类似同源性且具有不同功能,可能是由基因组复制引起并在进化过程中发生了生理功能的改变(Allard *et al*, 2018)。本研究虽未对其功能进行研究,但发现在黄条鲮生长调控中与 *igfbp-2a* 表达量一致,表明虽结构不保守,但功能是保守的。

### 3.2 组织分布特征

已有研究表明,肝脏是硬骨鱼 *igfbp-1* 合成的主要场所(Pedroso *et al*, 2009)。本研究在黄条鲮中检测到 *igfbp-1* mRNA 在肝脏中表达量最高,在脑和性腺中也有显著表达,但其他组织中 *igfbp-1* mRNA 表达量极低;组织分布特征与五条鲮(Pedroso *et al*, 2009)、牙鲆(翟万营等, 2012)类似。但也有研究表明,陶洋等(2011)在草鱼成鱼的脾、肌、眼、鳃、胰脏、肠、脑和性腺中均未检测到 *igfbp-1* mRNA 的表达。以上结果表明,不同鱼类 *igfbp-1* mRNA 主要在肝脏中表达,在除肝脏以外的组织中表达分布差异较大,这可能取决于物种的特异性。



Zhou(2008)等对斑马鱼研究发现,斑马鱼基因组包含2个 *igfbp-2*, *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 的蛋白具有类似的生物活性,但这2个基因却表现出不同的时空表达模式。本研究黄条鲮 *igfbp-2* mRNA 在肝脏组织中显著高表达,与鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Chen *et al*, 2009)、斜带石斑鱼(Chen *et al*, 2010)、五条鲮(Pedroso *et al*, 2009)的研究结果一致。*igfbp-2a* mRNA 表达量最丰富的组织是肝脏,性腺次之,在鳃、心脏、肾脏、头肾中也有较高表达但无显著差异。*igfbp-2b* mRNA 也是在肝脏组织表达量最高,其余组织中均有分布,但表达量极低且无显著差异。这些结果表明,除了在结构和系统进化上有差别外,黄条鲮 *igfbp-2* 的2种等位基因在生理功能上可能也不同,其功能的差异特性及可能的作用通路有待于今后进一步验证。另外,本研究还发现,黄条鲮 *igfbp-2a* mRNA 在性腺中也有明显高表达,可能说明其除了调控生长之外,还有更广泛的生物功能,这在其他鱼中也有发现,如在鲤鱼(Chen *et al*, 2009)和虹鳟(钱焜等, 2014)性腺中也检测到有表达,表明 *igfbp-2* 对于鱼类性腺发育也可能具有重要的调控作用(Chen *et al*, 2010),但 *igfbp-2* 对黄条鲮性腺发育是否具有生理调控作用尚需进一步确证。

本研究还发现,雌雄鱼相同组织中同一基因的表达量之间也存在差异,比如雄鱼肝脏中基因的表达量 *igfbp-1* 和 *igfbp-2b* 显著高于雌鱼,而雌鱼肝脏 *igfbp-2a* 表达量则显著高于雄鱼。这种性别之间基因的组织差异性表达,说明 *igfbp* 发挥生理功能时可能具有性别二态性,同黄条鲮 *hsp70* 的基因表达模式相似(方璐等, 2023),但这种雌雄差异的特性具体是由什么决定以及可能的信号通路尚不清楚,值得今后深入研究。

### 3.3 IGFBPs 对黄条鲮生长的表达调控作用

越来越多的研究证实,IGFBP 通过生长轴(GH/IGF-I axis)对鱼类生长代谢起着重要的生理调控作用(Reinecke, 2010)。胡健等(2012)对大菱鲆早期生长发育过程的调控机制的研究表明,IGFBP-1 和 IGFBP-2 对细胞增殖、生长及组织器官分化发育都起着重要的生理学作用。本实验室开展的工厂化养殖密度对黄条鲮生长的影响研究发现,低密度组实验鱼生长显著快于高密度组(姜燕等, 2022)。本研究进一步发现,在工厂化低密度养殖条件下,黄条鲮肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igf-1* 和 *igf-2* mRNA 表达水平均显著高于高密度组实验鱼,同时,这些生长关键因子的表达与低密度下的快速生长呈显著正相关关系,表明

IGFBPs 与 IGFs 等生长因子通过生长轴对黄条鲮的生长起着正向协同调控作用。已有研究表明, *igfbp-1* 主要在肝脏中合成,其表达和分泌受到分解代谢因子和激素的高度调控,如肝脏 *igfbp-1* 表达水平被饥饿、缺氧和应激高度诱导(Maures *et al*, 2002; Kajimura *et al*, 2006)。Breves 等(2016)的研究也表明,在饥饿条件下,大西洋鲑的肝脏 *igfbp1a1* 显著上调表达,但同时肌肉 *igf1* 则显著下调表达,表明肝脏和肌肉组织中的生长关键因子可能通过不同的途径参与了生长代谢调控。对五条鲮的研究也表明,在实验鱼饥饿并恢复投喂后生长速度加快,同时,肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igfbp-3*、*igfbp-5* 和 *igf-1* 表达量均升高,表明生长轴关键因子 *igf-1* 与 *igfbps* 协同参与了饥饿后的代谢补偿生长调控(Pedroso *et al*, 2009)。另外,对若鲉杜父鱼(*Scorpaenichthys marmoratus*) (Strobel *et al*, 2020) 研究也表明,实验鱼在饥饿条件下生长受到抑制,同时肝脏 *igf-1* 和 *igfbp-1* 表达水平升高,而 *igfbp-2b* 基因表达水平降低,推测是 *igf-1* 通过与 *igfbp* 的结合直接调节细胞有丝分裂和代谢过程,激活生长因子的合成和释放来调节机体生长(Qian *et al*, 2016; Hack *et al*, 2019)。在体外细胞孵育水平上,有学者研究了生长激素对鲤鱼原代培养肝细胞中 *igfbp-1a* 的表达影响,结果表明,生长激素下调了肝细胞中 *igfbp-1a* 的表达,推测通过 MAPK 和三碘化磷激酶信号通路实现了对细胞生长的调控(Chen *et al*, 2018)。本研究结果表明,高密度抑制了黄条鲮肝脏 *igfbps* 与 *igs* 基因的表达,且它们在生长过程中起正向协同调控作用。

本实验室的前期研究还发现,工厂化低密度养殖条件下显著快速生长的黄条鲮血清中 IGF-1、GH 的水平均显著高于高密度组条件下生长显著迟滞的实验鱼,而血清中皮质醇含量及葡萄糖浓度显著低于高密度组(姜燕等, 2022)。本研究深入分析发现,低密度下快速生长的黄条鲮肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igf-1* 和 *igf-2* mRNA 显著高表达,且血清 IGF-1、GH 具有相同表达趋势,与皮质醇含量及葡萄糖浓度表达趋势相反,表明生长轴关键因子与皮质醇和葡萄糖参与了不同密度下黄条鲮的生长调控。皮质醇是指示生物应激状态程度的重要因子,而葡萄糖则是机体供能的重要来源以及应对环境胁迫的重要生理指标。已有研究表明,胰岛素可降低 *igfbp-1* 的表达,糖皮质激素可增加其表达(O'Brien *et al*, 1995),这种调节机制有助于促进 *igfbp-1* 在饥饿和分解代谢条件下的表达,包括氨基酸短缺和缺氧(McLellan *et al*, 1992)。在不利生长条件下, *igfbp-1* 的功能是通过与 *igf* 结合并抑制 *igf* 活性来降低发育和生长速率(Maures *et al*, 2002;

Kajimura *et al.*, 2006)。新近对大西洋鲑幼鱼的研究表明, 外源皮质醇激素可以通过调节 GH/IGF-I 生长轴, 主要是肝脏中 *igf-1*、*igf-2*、*igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的表达来影响大西洋鲑幼鱼的生长和离子调节(Breves *et al.*, 2020)。同时, Yang 等(2020)在草鱼肝脏细胞的体外孵育研究中发现, 肝细胞 *igfbp-2* 的表达受到葡萄糖、胰岛素和胰高血糖素的调控。因此, 本研究发现的黄条鲮肝脏 IGFBP-1、IGFBP-2、IGF-1 和 IGF-2 等生长因子与血清皮质醇、葡萄糖之间存在的相关表达调控, 是否是黄条鲮通过调整机体代谢水平以适应环境从而获得不同密度下的快速生长优势尚有待于深入研究。

### 参 考 文 献

- ALLARD J B, DUAN C. IGF-binding proteins: Why do they exist and why are there so many? *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 117
- BACH L A. What happened to the IGF binding proteins? *Endocrinology*, 2018, 159(2): 570–578
- BREVES J P, PHIPPS-COSTIN S K, FUJIMOTO C K, *et al.* Hepatic insulin-like growth-factor binding protein (*igfbp*) responses to food restriction in Atlantic salmon smolts. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 233: 79–87
- BREVES J P, SPRINGER-MILLER R H, CHENOWETH D A, *et al.* Cortisol regulates insulin-like growth-factor binding protein (*igfbp*) gene expression in Atlantic salmon parr. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 518: 110989
- CHEN W B, LI W G, ZHANG Z, *et al.* Cloning, molecular characterization and expression analysis of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) cDNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(6): 1669–1681
- CHEN W B, LI W S, LIN H R. Common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): Molecular cloning, expression profiles, and hormonal regulation in hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 390–399
- CHEN W B, LIN H R, LI W S. Molecular cloning and expression profiles of IGFBP-1a in common carp (*Cyprinus carpio*) and its expression regulation by growth hormone in hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 221/222: 50–59
- CHEN W B, WANG Y, LI W S, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular characterization, expression profiles and regulation by 17 $\beta$ -estradiol in ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 157(4): 336–342
- CUI A J, XU Y J, LIU X Z. Comparative analysis of digestive enzyme activities among three *Seriola* species. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(6): 102–110 [崔爱君, 徐永江, 柳学周. 3 种养殖鲷鱼消化相关酶活性的比较分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(6): 102–110]
- DUAN C, DING J, LI Q, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(26): 15274–15279
- DUAN C, XU Q J. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 44–52
- FANG L, XU Y J, CUI A J. Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola lalandi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 00–00 [方璐, 徐永江, 崔爱君. 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性. *渔业科学进展*, 2023, 44(4): 00–00]
- FENG N P, ZHANG Z, WANG Z F, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 promotes adhesion of endothelial progenitor cells to endothelial cells via integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Journal of Molecular Neuroscience*, 2015, 57(3): 426–434
- GARCIA DE LA SERRANA D, MACQUEEN D J. Insulin-like growth factor-binding proteins of teleost fishes. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 80
- HACK N L, CORDOVA K L, GLASER F L, *et al.* Interactions of long-term food ration variation and short-term fasting on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathways in copper rockfish (*Sebastes caurinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 280: 168–184
- HU J, WEN H S, GUAN J, *et al.* Cloning of IGFBP-1, -2 and expression analysis during adult and early developmental stages in *Scophthalmus maximus*. *Acta Oceanologica Sinica* (in Chinese), 2012, 34(5): 139–146 [胡健, 温海深, 关键, 等. 大菱鲆 2 种类型胰岛素样生长因子结合蛋白基因克隆及在成鱼和早期发育期中的表达. *海洋学报(中文版)*, 2012, 34(5): 139–146]
- HWA V, OH Y, ROSENFELD R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(6): 761–787
- JIANG Y, WANG X, XU Y J, *et al.* Effects of industrial stocking density on the growth and physiological characteristics of *Seriola lalandi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(9): 1290–1299 [姜燕, 王维鑫, 徐永江, 等. 工厂化养殖密度对黄条鲮生长和生理特性的影响. *中国水产科学*, 2022, 29(9): 1290–1299]
- KAJIMURA S, AIDA K, DUAN C. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: *in vitro* and *in vivo* analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(3): 1142–1155

- KAMANGAR B B, GABILLARD J C, BOBE J. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGFBP-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: Molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation. *Endocrinology*, 2006, 147(5): 2399-2410
- MAURES T J, DUAN C. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology*, 2002, 143(7): 2722-2731
- MCLELLAN K C, HOOPER S B, BOCKING A D, *et al.* Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-2 gene expression in the ovine fetus. *Endocrinology*, 1992, 131(4): 1619-1628
- NDANDALA C B, DAI M S, MUSTAPHA U F, *et al.* Current research and future perspectives of GH and IGFs family genes in somatic growth and reproduction of teleost fish. *Aquaculture Reports*, 2022, 6: 101289
- NI J H, ZHU X J, JI Y P, *et al.* Effects of breeding density on the growth, metabolic enzyme activity and related gene expression level of juvenile *Pampus argenteus*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2020, 39(2): 54-64 [倪嘉豪, 朱晓静, 季益平, 等. 养殖密度对银鲳幼鱼生长、代谢酶活力及其相关基因表达的影响. *热带海洋学报*, 2020, 39(2): 54-64]
- O'BRIEN R M, NOISIN E L, SUWANICHKUL A, *et al.* Hepatic nuclear factor 3- and hormone-regulated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein 1 genes. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(3): 1747-1758
- PEDROSO F L, FUKADA H, MASUMOTO T. Molecular characterization, tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP-1, -2, -3 and -5 in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 344-353
- QIAN B Y, XUE L Y. Liver transcriptome sequencing and de novo annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress. *Marine Genomics*, 2016, 25: 95-102
- QIAN K, WEN H S, CHI M L, *et al.* Cloning and characteristics of insulin-like growth factor-binding protein-1, 2 genes (*igfbp-1*, 2) of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and their expression analysis. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2014, 44(9): 37-45 [钱焜, 温海深, 迟美丽, 等. 海产花鲈 IGFBP-1、2 基因的克隆及表达分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(9): 37-45]
- REINECKE M. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(6): 1233-1254
- RODGERS B D, ROALSON E H, THOMPSON C. Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(1): 201-207
- STROBEL J S, HACK N L, LABEL K T, *et al.* Effects of food deprivation on plasma insulin-like growth factor-1 (Igf1) and Igf binding protein (Igfbp) gene transcription in juvenile cabezon (*Scorpaenichthys marmoratus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 286(C): 113319
- TAO Y, ZOU S M. cDNA cloning and expression of insulin-like growth factor binding protein gene IGFBP-1 in *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(1): 15-21 [陶洋, 邹曙明. 草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 克隆及表达. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 15-21]
- WANG B, XU Y J, LIU X Z, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of insulin-like growth factors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) during embryonic development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 375-390
- WANG B, ZHANG Y X, LIU Q, *et al.* Molecular identification and developmental expression patterns of growth hormone and its receptors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(9): 7305-7312
- WOOD A W, DUAN C, BERN H A. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, 2005a, 243: 215-285
- WOOD A W, SCHLUETER P J, DUAN C. Targeted knockdown of insulin-like growth factor binding protein-2 disrupts cardiovascular development in zebrafish embryos. *Molecular Endocrinology*, 2005b, 19(4): 1024-1034
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172-182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲷早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172-182]
- YANG G K, CHEN B C, SUN C Y, *et al.* Molecular identification of grouper *Igfbp1* and its mRNA expression in primary hepatocytes under Gh and insulin. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 281: 137-144
- YANG G K, ZHAO W L, QIN C B, *et al.* Molecular identification of grass carp *igfbp2* and the effect of glucose, insulin, and glucagon on *igfbp2* mRNA expression. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(4): 1469-1482
- ZHAI W Y, ZHANG J L, SHI Z Y, *et al.* The full-length cDNA cloning and gene expression analysis of insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(2): 170-179 [翟万营, 张俊玲, 施志仪, 等. 牙鲆胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 cDNA 全长的克隆及表达分析. *水产学报*, 2012, 36(2): 170-179]

ZHOU J F, LI W H, KAMEI H, *et al.* Duplication of the IGFBP-2 gene in teleost fish: Protein structure and

functionality conservation and gene expression divergence. PLoS One, 2008, 3(12): 1–11

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning, Expression Profiles of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 (*igfbp-1*) and *igfbp-2* and their regulation effects on growth of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)

ZHANG Wenjing<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>2</sup>①, CUI Aijun<sup>2</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>,  
JIANG Yan<sup>2</sup>, WANG Kaijie<sup>2</sup>, ZHOU Heting<sup>2</sup>

(1. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;  
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

**Abstract** Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) play crucial roles in regulating biological activities of insulin-like growth factors (IGFs) and growth performance in vertebrates. IGFBP is a six-member protein family (IGFBP1–6) with a high affinity for IGF. It affects the distribution, stability, and biological activity of IGF by regulating the interaction between IGF ligands and receptors. Recently, IGFBP-1 was identified as a regulator of growth, reproduction, and development in bony fish, such as juvenile Atlantic salmon, where IGFBP-1 interacts with cortisol to regulate growth. IGFBP-1 regulates cell metabolism and growth through interaction with insulin in primary hepatocytes incubated *in vitro* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). IGFBP-2 has a wide range of tissue expression characteristics in bony fish, and IGF regulation may occur through autocrine or paracrine pathways. For example, long-term fasting induced increased *igfbp-2* mRNA expression in the liver of zebrafish. In addition, IGFBP-2 can inhibit the activity of IGF ligand through its high affinity with IGF to play an inhibitory and regulatory role in zebrafish growth. *igfbp-2* mRNA expression was significantly up-regulated in *Carassius auratus* (goldfish) liver after fasting, and quickly recovered to normal levels after feeding. This indicated that *igfbp-2* mRNA expression may be related to the anabolism and catabolism of goldfish, and is regulated by metabolic factors.

Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) of the Carangidae family has high economic value and nutrition value. It is a warm and temperate oceanic fish with long distance migration characteristics that is distributed in the middle and upper oceans globally. This species is large with a fast growth rate, and is a promising candidate for aquaculture in land-based industrial circulating water system, deep-water cages, net pen systems, and aquaculture craft, *etc.* Our laboratory studied the regulatory mechanism of the rapid growth of yellowtail kingfish and cloned *gh*, *igf-1*, *igf-2*, *ghr*, and other growth-related functional genes to reveal their molecular regulation in early growth and development. *igfbp* genes regulate the growth, development, and nutrient metabolism of fish through their interaction with growth axis. The mechanism of IGFBP and how it influences the regulation of yellowtail kingfish growth is unreported. This paper further studied the growth of yellowtail kingfish

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

by analyzing the key growth axis factors.

RNAiso Plus reagent (TaKaRa) was used to extract total RNA from tissues. RNA integrity was detected by agarose gel electrophoresis, and RNA quality was determined by a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). First, cDNA strand was synthesized using a PrimeScript™ RT reagent kit with a gDNA Eraser (Perfect Real-Time) reverse transcription kit (TaKaRa). Primers were designed to clone the predicted sequence of yellowtail kingfish *igfbp* gene according to the NCBI GenBank database. The product was amplified by polymerase chain reaction, purified from agarose gel electrophoresis, linked with T4 Ligases, transformed into Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell, and positive clones were selected and tested. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze the distribution of yellowtail kingfish tissues and the expression patterns of liver tissues under different densities of industrial culture.

The lengths of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b* open reading frame (ORF) domains were 741 bp, 882 bp, and 801 bp, and encoded 246 amino acids, 293 amino acids, and 269 amino acids, respectively. The conserved domain of insulin growth factor-binding protein homologues (IB) was present in the N-terminus of the three *igfbps*, and the conserved domain of thyroglobulin type-1 repeat (Ty-1) was present in the C-terminus. They had a wide range of tissue expression characteristics and were highly expressed in the liver. There were differences between the expression of the same gene in the same tissues of male and female fish. For example, the expression of *igfbp-1* and *igfbp-2b* genes was significantly higher in the liver of male fish compared with female fish, while *igfbp-2a* expression was significantly higher in the liver of female fish compared with male fish. The tissue differential expression of genes between sexes indicates that *igfbp* may have sex dimorphism when it plays a physiological role. However, the specific characteristics of this difference between males and females and the possible signaling pathway are unclear. The fish in the low-density group showed the greatest growth rate and the highest expression levels of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b*, *igf-1*, and *igf-2* under industrial culture conditions. These expression levels were significantly different from those of the medium and high-density groups ( $P < 0.05$ ). However, there were no significant differences in the expression levels of growth and liver genes between the middle and high-density groups.

*igfbp-1*, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* participated in the growth regulation of yellowtail kingfish. The expression regulation of *igf-1* and *igf-2* had a positive synergistic effect with growth regulation of yellowtail kingfish. The ORF regions of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* genes of yellowtail kingfish were cloned, and the structural characteristics, tissue expression characteristics, and relationships with growth performance were analyzed under different culture densities. The content of serum IGF-1, GH, cortisol, and glucose concentration was detected in the early stage. The expression trend of *igfbp-1*, *igfbp-2*, *igf-1*, and *igf-2* was the same as that of serum IGF-1 and GH in the liver of yellowtail kingfish rapidly growing at the low-density group, but contrary to the expression trend of cortisol content and glucose concentration. This indicated that the key factors of growth axis, cortisol, and glucose participated in the growth regulation of yellowtail kingfish at different densities. However, the specific regulatory mechanism requires further study. The results provide a theoretical basis for interpreting the molecular mechanism of the growth of yellowtail kingfish and the regulation of suitable culture densities under industrial conditions.

**Key words** cDNA cloning; *Seriola aureovittata*; *igfbp-1*; *igfbp-2*; Tissue expression; Growth regulation



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220321001

http://www.yykxjz.cn/

杨超, 张衡, 韩海斌, 赵国庆, 石永闯, 徐博, 蒋沛雯, 严云志, 葛雅丽. 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场时空分布及其最适环境特征. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 99–110

YANG C, ZHANG H, HAN H B, ZHAO G Q, SHI Y C, XU B, JIANG P W, YAN Y Z, GE Y L. Spatio-temporal distribution of *Sardinops sagax* in the North Pacific: Optimal environmental characteristics. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 99–110

# 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场时空分布 及其最适环境特征\*



杨超<sup>1,2</sup> 张衡<sup>1,2,3①</sup> 韩海斌<sup>1,2</sup> 赵国庆<sup>1,2</sup>  
石永闯<sup>1,2</sup> 徐博<sup>4</sup> 蒋沛雯<sup>2,5</sup> 严云志<sup>5</sup> 葛雅丽<sup>5</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 农业农村部远洋与极地渔业创新重点实验室 上海 200090; 3. 长江三角洲河口湿地生态系统教育部/上海市野外科学观测研究站 上海 202162; 4. 中国极地研究中心 上海 201209; 5. 安徽师范大学生态与环境学院 安徽 芜湖 241000)

**摘要** 基于2019—2020年北太平洋灯光敷网渔业数据和海表温度、叶绿素、海面高度等环境数据,采用空间叠加图、频次分析与经验累积分布函数、K-S检验和GAM模型4种方法分析了远东拟沙丁鱼(*Sardinops sagax*)渔场的单位捕捞努力量(CPUE)时空分布特征及与关键环境因子的相关关系。分析结果显示,作业渔场重心分布范围为147°~153°E、39°~43°N,在4—8月向东北方向移动,9—11月则向西南方向折返。通过频次分析与经验累积分布函数分析,中心渔场区域最适海表温度为10.0~18.0℃,最适叶绿素浓度为0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>,最适海面高度为0.2~0.7 m。K-S检验分析表明,高值CPUE海域和海表温度、叶绿素浓度、海面高度均有密切关系,最适范围分别为10.9~18.9℃、0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>、0.2~0.7 m。GAM模型模拟结果表明,高值CPUE的最适海表温度为11.0~17.0℃,最适叶绿素浓度为0.3~0.8 mg/m<sup>3</sup>,最适海面高度为0.1~0.4 m。综合来说,CPUE高值区海域的最适海表温度为11.0~18.0℃,叶绿素浓度为0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>,海面高度为0.2~0.7 m。

**关键词** 北太平洋公海; 远东拟沙丁鱼; 海洋环境因子; GAM模型

**中图分类号** S931.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0099-12

远东拟沙丁鱼(*Sardinops sagax*)作为一种暖温性小型中上层鱼类,其集群性强,是世界上渔获量较高的中上层鱼类之一(韦晟等,1989)。北太平洋远东拟沙丁鱼主要分布于中国、日本、俄罗斯沿海及附近公海海域(胡雅竹等,1993)。日本在20世纪20年代开始进行远东拟沙丁鱼的商业捕捞,我国在20世纪80年代开始相关渔业资源的开发(王明彦等,1992)。近些年来,我国

在北太平洋公海的远洋渔业稳步发展,主捕鱼种为日本鲭(*Scomber japonicus*)、远东拟沙丁鱼、柔鱼(*Ommastrephes bartrami*)和秋刀鱼(*Cololabis saira*) (马超等,2018)。

远东拟沙丁鱼渔场历史上经历过数次大的变动,其产量极不稳定,最显著的是1965—1980年间,其产量最高可达百万吨,而最低时产量不足万吨(管锡弟等,

\* 国家重点研发计划(2019YFD0901405)、中国水产科学研究院东海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2021M06)、长江三角洲河口湿地生态系统教育部/上海市野外科学观测研究站开放基金(K202001)和浙江省远洋渔业资源探捕项目(CTZB-2021070657)共同资助。杨超, E-mail: 243353707@qq.com

① 通信作者: 张衡, 副研究员, E-mail: zhangzhiqian0601@163.com

收稿日期: 2022-03-21, 收修改稿日期: 2022-04-14

1985)。目前,极少有关于北太平洋远东拟沙丁鱼与海洋环境因子之间关系的研究报道,仅在食品加工和生理学方面有少量报道(李亚会等, 2021; 李锐等, 2019)。关于远东拟沙丁鱼的渔场与海洋环境的关系, 仅见徐博等(2020)对北太平洋的渔获物组成及渔场时空的研究中有所涉及。根据中国远洋渔业协会统计, 近些年来, 北太平洋远东拟沙丁鱼的产量逐渐上升, 2020年其产量已超过灯光敷网渔业总渔获量的50%。北太平洋渔业委员会(North Pacific Fisheries Commission, NPFC)将其列为优先评估鱼种, 准备开展其资源评估与管理的工作(Nippon Suisan Gakkaishi, 2016)。因此, 探讨北太平洋远东拟沙丁鱼的渔场时空分布及其最适环境特征的影响对于提高我国北太平洋公海渔业的捕捞效率及渔业资源的科学管理具有重要现实意义。

为可持续利用北太平洋远东拟沙丁鱼资源, 本研究采用2019—2020年我国在北太平洋渔业生产数据, 结合卫星遥感的海表温度、叶绿素浓度、海面高度数据, 分析远东拟沙丁鱼渔场时空分布及其最适环境特征的影响, 从而为该渔业资源的合理利用和我国在NPFC制定管理政策提供数据支撑与依据。

## 1 数据与方法

### 1.1 数据来源

远东拟沙丁鱼渔业数据来自于我国公海拖围网渔业生产数据库的灯光敷网船生产作业数据, 包括作业时间、作业位置、日产量和作业网次数。时间范围为2019—2020年的渔汛期4—11月, 渔场范围为

39°~43°N、147°~153°E(图1)。

海表面温度(sea surface temperature, SST)、海面高度(sea surface height, SSH)数据来自于CMEMS(copernicus.eu)网站的再分析数据, 叶绿素浓度(chlorophyll-*a*, Chl-*a*)数据来自<https://coastwatch.pfeg.noaa.gov/erddap/griddap/index.html>网站的Aqua卫星, 时间范围均为2019—2020年, 其中, SST与SSH的空间分辨率为0.25°×0.25°, Chl-*a*空间分辨率为0.025°×0.025°。使用ArcGIS10.6软件进行重采样, 将空间分辨率为0.025°×0.025°的环境数据(Chl-*a*)转换为0.25°×0.25°的空间分辨率, 使用MATLAB2020(a)软件将0.25°×0.25°的渔业数据与环境数据进行时空匹配。

### 1.2 数据分析方法

**1.2.1 单位捕捞努力渔获量** 按照经纬度0.25°×0.25°的空间分辨率计算2019—2020年远东拟沙丁鱼渔场的单位捕捞努力渔获量(catch per unit effort, CPUE)的月平均值, 计算公式为(田思泉等, 2010):

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

式中,  $C$  为0.25°×0.25°网格内2019—2020年4—11月每月的渔获量(t),  $E$  为0.25°×0.25°网格内每月作业的总网次数(网), CPUE单位为t/网。共获得CPUE样本数量766个。

**1.2.2 渔场重心计算** 渔场时空位置的变化可以使用渔场重心来描述, 其计算公式为(唐峰华等, 2014; 化成君等, 2014):

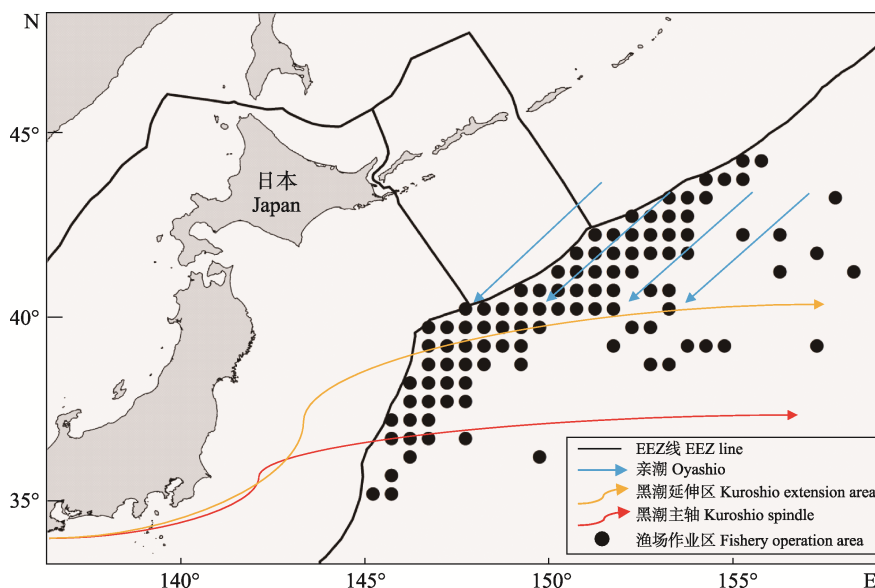


图1 北太平洋远东拟沙丁鱼作业范围

Fig.1 Range of *Sardinops sagax* operation in the North Pacific

$$X = \frac{\sum_i^n C_i \times X_i}{\sum_i^n C_i}; Y = \frac{\sum_i^n C_i \times Y_i}{\sum_i^n C_i} \quad (2)$$

式中,  $X$  代表渔场重心的经度,  $Y$  代表渔场重心的纬度;  $X_i$  为第  $i$  网次放网时的纬度,  $Y_i$  代表第  $i$  网次放网时的纬度;  $C_i$  为第  $i$  网次的 CPUE,  $n$  代表下网的总次数。使用 ArcGIS 10.6 软件绘制渔场重心分布图。

**1.2.3 渔场与适宜环境区间** SST、Chl- $a$ 、SSH 与 CPUE 的时空变化规律使用 ArcGIS 10.6 软件绘制分布图来分析, 其最适环境参数通过频次分析与经验累积分布函数(ECDF)得到。高值 CPUE 与适宜表层环境参数区间和表层环境参数的平均值, 采用非参数统计 K-S (Kolmogorov-Smirnov) 检验方法进行显著性检验。检验方法为分别计算 3 个表层环境变量和中心渔场(CPUE>10 t/网的海域) CPUE 累计频度曲线, 求出 K-S 检验的统计量  $D$ , 并与  $D_{0.05}=0.07$  (据样本数 766, 选取显著性水平为 0.05 可得) 相比较, 观察其是否具有显著相关性。累计分布曲线方程和统计量计算公式如下所示(Perry *et al*, 1994):

$$f(t) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n l(x_i) \quad (3)$$

其中, 分段函数  $l(x_i)$  表达式为:

$$l(x_i) = \begin{cases} 1, & x_i < t \\ 0, & \text{其他} \end{cases} \quad (4)$$

$$g(t) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_i}{\bar{y}} l(x_i) \quad (5)$$

$$D = \max |g(t) - f(t)| \quad (6)$$

式中,  $f(t)$  是特征参数经验累积频率分布函数,  $l(x_i)$  是分段函数,  $g(t)$  是中心渔场 CPUE 权重经验累积分布函数。 $n$  为资料个数;  $t$  为分组环境因子值,  $x_i$  为第  $i$  月温跃层特征参数值;  $y_i$  为第  $i$  月的月平均 CPUE;  $\bar{y}$  为月平均 CPUE 的平均值;  $D$  为 K-S 检验中的临界值; 通过给定的显著水平  $\alpha$ , 采用 K-S 检验统计量。统计分析使用 MATLAB 2020(a) 软件及相关工具包。

**1.2.4 GAM 模型构建** 使用广义可加模型 (generalized additive model, GAM) 对远东拟沙丁鱼及其影响因子的关系进行分析, 将标准化后的沙丁鱼 CPUE 作为响应变量, SST、SSH、Chl- $a$  浓度、Lon、Lat 和 month 作为解释变量构建 GAM 模型, 分析时空和环境因子对 2019—2020 年远东拟沙丁鱼 CPUE 的时空分布的影响。GAM 的表达式为:

$$\log(\text{CPUE}) + 1 - S(\text{SST}) + S(\text{SSH}) + S(\text{Lon}) + S(\text{Lat}) + S(\text{Chl-}a) + S(\text{month}) + \varepsilon \quad (7)$$

$S$  为自然立方样条平滑 (natural cube spline

smoother),  $\varepsilon$  为误差项。在处理 GAM 模型时, 为避免因为 CPUE 出现零值报错, 将所有处理过的标准 CPUE 加 1 后再处理。将 GAM 模型的模拟结果中上下 95% 置信区间虚线离实线最接近的区间定义为渔场最适环境因子的范围,  $F$  检验来评估影响因子的显著性。GAM 模型采用 R 语言及相关工具包实现。

## 2 结果

### 2.1 渔获量

2019 年, 远东拟沙丁鱼总产量为 23 751.6 t, 5—9 月每月产量均保持在 3 000 t 左右的较高水平, 5 月总产量达到峰值, 为 3 877.8 t (图 2)。2020 年, 远东拟沙丁鱼总产量达到 87 384.47 t, 较 2019 年增幅为 268%, 7—8 月产量维持在较高水平 (约 20 000 t), 7 月产量达到峰值, 为 20 074.45 t。2019 年 CPUE 值波动较小, 6 月 CPUE 值最高 (11.25 t/网)。2020 年 CPUE 值在生产初期波动较大, 在生产中期直至末期趋于稳定, 5 月 CPUE 值最高 (24.61 t/网) (图 2)。

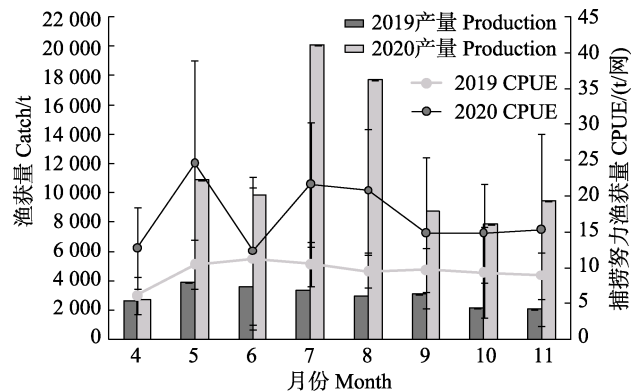


图 2 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼月平均产量和 CPUE (平均值±标准误)

Fig.2 Average monthly *S. sagax* production and CPUE in the North Pacific in 2019–2020 (Mean±SE)

### 2.2 渔场重心变化

在春季 (4—5 月) 和夏季 (6—8 月), 2019 年远东拟沙丁鱼渔场重心空间变化规律与 2020 年基本一致, 均从 147~148°E、39~40°N 海域开始作业, 随后向东北方向移动至东北端海域 (152~153°E、42~43°N)。在秋季 (9—11 月), 2020 年渔场重心仅向西南方向折返至 152°E、42°N, 149°E、41°N, 比 2019 年更偏北 (图 3)。

### 2.3 远东拟沙丁鱼渔场与海洋环境的关系

**2.3.1 远东拟沙丁鱼渔场与海表温度的关系** 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场分布呈现明显的时空差异 (图 4)。



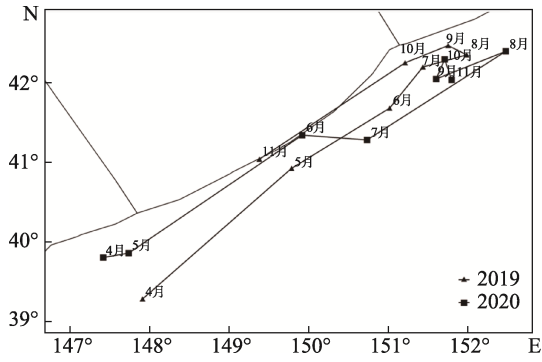


图3 2019—2020年北太平洋远东拟沙丁鱼渔场重心月变化  
Fig.3 Monthly changes of *S. sagax* fishing ground center in the North Pacific in 2019–2020

空间上，中心渔场区域随着季节变化逐渐向北转移。时间上，不同月份中心渔场对应的适宜海表温度范围有所不同；6月渔场区最适 SST 范围为 14.0~16.0 °C，7—9月为 18.0~20.0 °C，11月为 11.0~13.0 °C。此外，高值 CPUE 多出现在等值线较为密集的海域。

由散点图(图 5a)得出，远东拟沙丁鱼渔场的 SST 适宜温度范围为 11~20 °C，作业网次数比例较高值(9%~11%)渔场适宜 SST 范围为 10.9~17.9 °C(图 5b)，综合 SST 空间叠加图(图 4)与 SST 散点与频次分析图(图 5)的分析结果得出，CPUE 高值区所在的适宜温度范围为 10.0~18.0 °C。

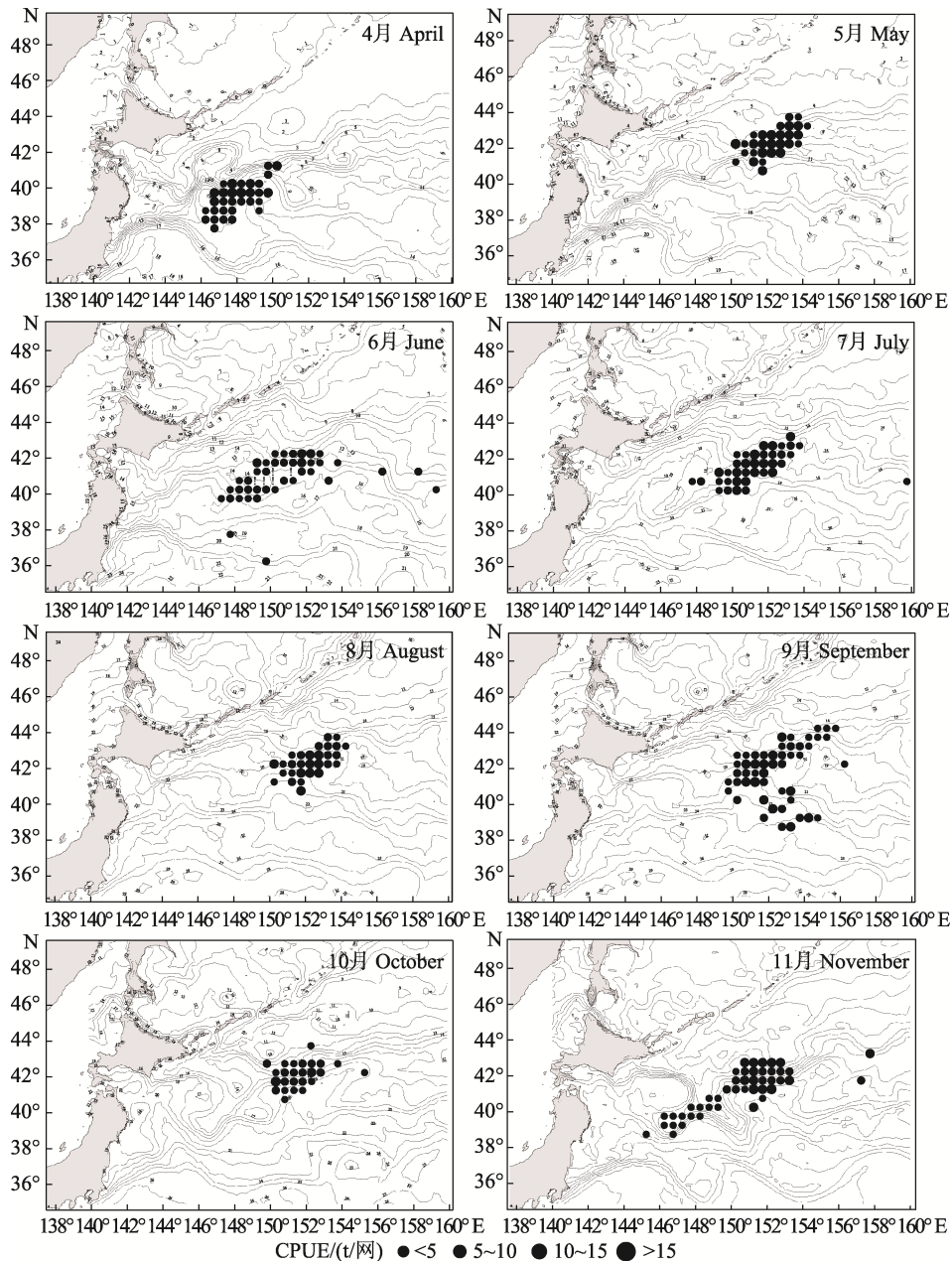


图4 2019—2020年北太平洋远东拟沙丁鱼月平均 CPUE 和海表温度空间叠加  
Fig.4 Stack distribution of SST and CPUE of *S. sagax* in the North Pacific in 2019–2020

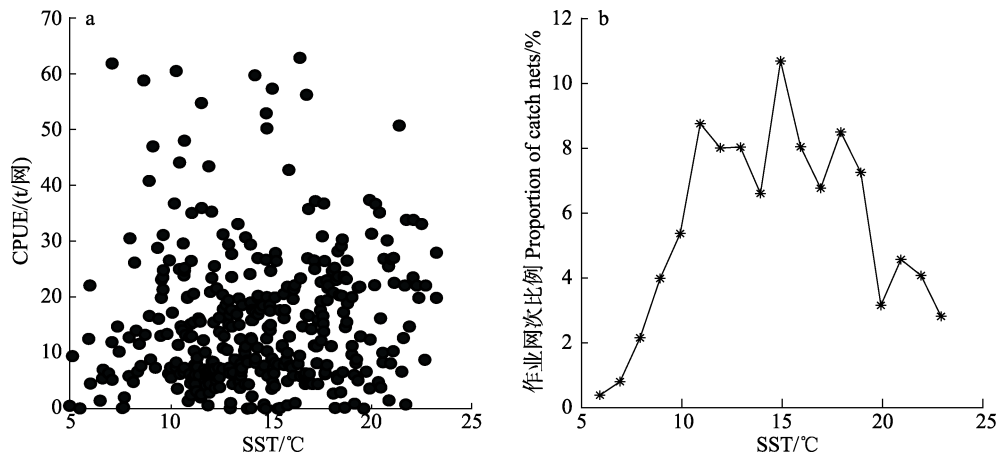


图 5 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼 CPUE 与海面温度散点图(a)及作业网次比例与海面温度频次图(b)  
 Fig.5 Scatter plot between *S. sagax* CPUE and SST (a), and frequency plot of proportion of catch nets and SST (b) in the North Pacific in 2019–2020

**2.3.2 远东拟沙丁鱼渔场与叶绿素的关系** 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场与 Chl-*a* 同样呈现较为明显的时间与空间差异, 通过 Chl-*a* 环境因子与 CPUE 叠加可以得出(图 6), 随着季节的变化, Chl-*a* 浓度在空间上也发生变化, 具体表现在 4—6 月高值区(0.8~1.2 mg/m<sup>3</sup>)空间分布较广, 6 月之后逐渐向西北方向收缩, 10—11 月公海海域的浓度较低。虽然浓度在时空尺度上变化较大, 但从整个作业期间来看, 远东拟沙丁鱼的大部分高值 CPUE 区的最适叶绿素浓度为 0.3~0.5 mg/m<sup>3</sup>(图 6)。

由散点图(图 7a)得出, 远东拟沙丁鱼中心渔场适宜的 Chl-*a* 浓度范围为 0.2~0.5 mg/m<sup>3</sup>, 作业网次数比例较高值(15%~26%)的渔场适宜 Chl-*a* 范围为 0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>(图 8b), 综合 Chl-*a* 空间叠加图(图 6)和散点与频次分析图(图 7)可知, CPUE 高值海域的适宜浓度为 0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>。

**2.3.3 远东拟沙丁鱼渔场与海面高度的关系** 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场生产期间海面高度南部整体大于北部(图 8), 南部 36°N 附近为黑潮延伸区, 海面高度较高。通过分析叠加图得出, 渔汛期 CPUE 高值区海面高度为 0.3~0.7 m。此外, 在 9—11 月, 高值 CPUE 区所对应的海域为海面高度等值线密集区。

由散点图(图 9a)得出, 远东拟沙丁鱼中心渔场适宜 SSH 范围为 0.2~0.7 m, 作业网次数比例较高值(12%~19%)的渔场适宜 SSH 为 0.2~0.5 m(图 10b), 综合 SSH 空间叠加图(图 8)与散点与频次分析图(图 9)的结果得出, CPUE 的高值区所在海域的适宜范围为 0.2~0.7 m。

**2.3.4 K-S 检验分析** 在  $\alpha=0.05$  显著性的水平下, SST、Chl-*a* 和 SSH 3 个参数对应的 *D* 值分别为 0.03、

0.01 和 0.03, 均小于  $D_{0.05}=0.07$ , 表明 CPUE 和 3 个参数变量服从了同一分布, 说明高值 CPUE 海域与 Chl-*a*、SSH、SST 均有密切关系, 最适范围分别为 0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>、0.2~0.7 m 和 10.9~18.9 °C(图 11)。

**2.3.5 GAM 模型分析** GAM 模型分析环境因子和时空因素对 2019—2020 年北太平洋公海远东拟沙丁鱼 CPUE 的结果见图 11。高值 CPUE 的最适 SST 为 11~17 °C, 最适 Chl-*a* 为 0.3~0.8 mg/m<sup>3</sup>, 最适 SSH 为 0.1~0.4 m, 远东拟沙丁鱼的作业渔场主要集中在 149°~153°E、40°N~42°N。GAM 结果表明, 5—7 月的 CPUE 值较高, 8—10 月呈负相关, CPUE 值较低, 10 月之后呈正相关, CPUE 值提升。根据远东拟沙丁鱼的 CPUE 与环境因子与时空因子的 GAM 模型, 经 *F* 检验得到(表 1), SST、SSH、Chl-*a*、Lat 差异性极显著( $P<0.001$ ), month、Lon 差异显著( $P<0.05$ )。

表 1 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼环境因子与渔获量 GAM 模拟的检验系数值和显著性

Tab.1 Test coefficient values and significance of GAM simulations of environmental factors and *S. sagax* fishery in the North Pacific in 2019–2020

环境因子 Environment factor	有效自由度 Effective degrees of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
海表温度 SST	8.673	8.969	$<2 \times 10^{-16}***$
海面高度 SSH	5.501	3.870	$4.910 \times 10^{-4}***$
叶绿素 <i>a</i> Chl- <i>a</i>	8.239	28.680	$<2 \times 10^{-16}***$
月份 month	4.897	3.108	$7.478 \times 10^{-3}**$
经度 Lon	9.017	2.407	$6.285 \times 10^{-3}**$
纬度 Lat	8.396	6.812	$<2 \times 10^{-16}***$

注:\*\*代表 1%显著性水平, \*\*\*代表 0.1%显著性水平。

Note: \*\* represents 1% significance level, and \*\*\* represents 0.1% significance level.



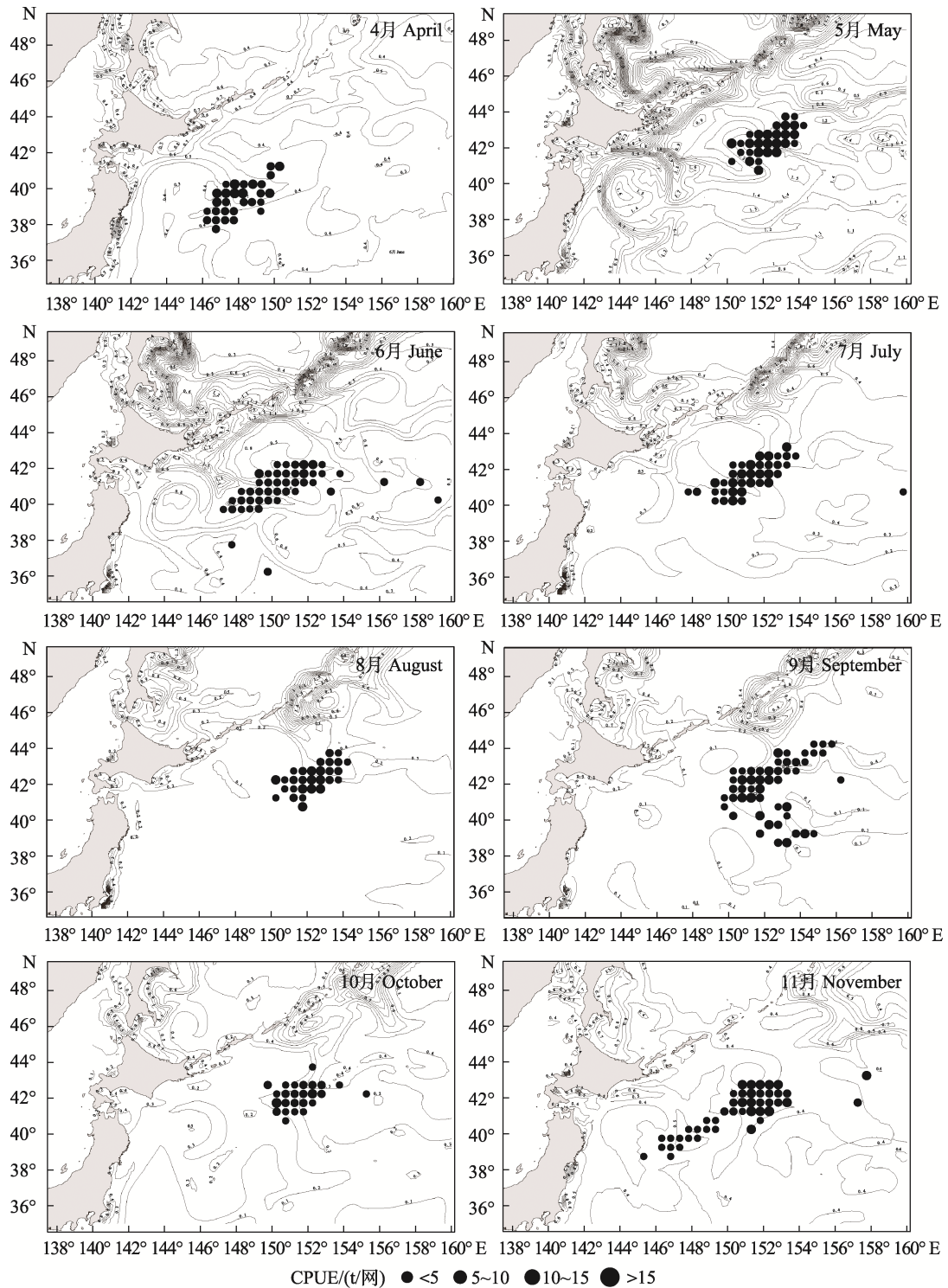


图6 2019—2020年北太平洋远东拟沙丁鱼月平均CPUE和叶绿素浓度空间叠加  
Fig.6 Stack distribution of Chl-a and CPUE of *S. sagax* in the North Pacific in 2019–2020

根据 GAM 模型分析环境因子对中心渔场的结果来看,对其影响最大的为 SST 与 Chl-a 浓度,SSH 对其影响不如前二者。空间上来看,纬度对中心渔场分布的影响大于经度,时间尺度上来看,5—7 月 CPUE 值较高,8—10 月 CPUE 值较低。

### 3 讨论

#### 3.1 产量、CPUE 及渔场重心的变化

2019 年 CPUE 从生产作业初期(4 月)至末期(10、11 月)波动不大,维持在 10 t/d 左右。2020 年在生产

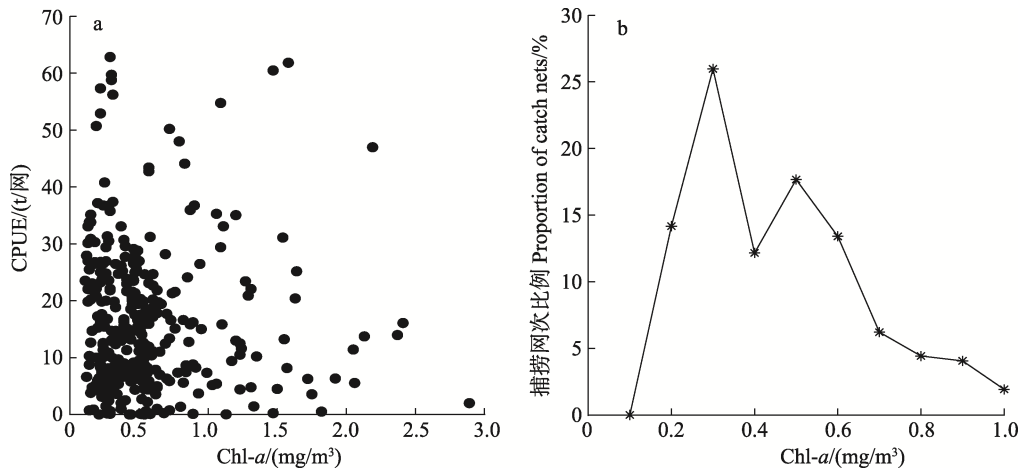


图7 2019—2020年北太平洋远东拟沙丁鱼 CPUE 与叶绿素浓度(a)及作业网次比例与叶绿素浓度(b)的关系  
Fig.7 Relationship between *S. sagax* CPUE and Chl-*a* (a), proportion of catch nets and Chl-*a* (b) in the North Pacific in 2019–2020

a: 散点图; b: 频次图  
a: Scatter plot; b: Frequency plot

作业初期和中期 CPUE 波动较大, 初期(5月)较高(24.61 t/d), 中期(7—8月)维持在 20 t/d 左右, 末期(9—11月)维持在 15 t/d 左右, CPUE 值的变化可以很好地体现沙丁鱼渔业的资源变动, 在外界环境没有显著变化的情况下, 2020年 CPUE 值的升高与北太平洋远东拟沙丁鱼资源量变好有直接关联。渔场重心的变化在生产作业初期, 远东拟沙丁鱼渔场重心位于 147.9°E、39.2°N 附近海域, 之后向东北方向移动, 生产作业中期到达最东北端(151.9°E、42.3°N), 生产作业末期再向西南海域(149.4°E、41.1°N)折返, 其空间变化与远东拟沙丁鱼的迁徙变化一致(Okunishi *et al.*, 2009), 与 2016—2017 年北太平洋公海围网主要渔获种类渔场重心与环境因子的分析结果同样相符(徐博等, 2020)。

### 3.2 远东拟沙丁鱼渔场与海洋环境的关系

远东拟沙丁鱼和日本鲭同属中上层鱼类, 且生活习性类似, 因此, 可采用日本鲭的中心渔场与海洋环境因子的关系来对比远东拟沙丁鱼(戴澍蔚等, 2018)。研究表明, SST、SSH、Chl-*a* 这些海洋环境因子对日本鲭中心渔场的有显著影响(袁小楠等, 2016)。本文综合频次分析、ECDF 方法、K-S 检验分析与广义可加模型 GAM 等 4 种方法得出, 北太平洋远东拟沙丁鱼渔场的适宜海洋环境因子分布范围, SST 为 11~18 °C, Chl-*a* 为 0.2~0.6 mg/m<sup>3</sup>, SSH 为 0.2~0.7 m。

各个海洋环境因子之间均有着密切关系(刘金立等, 2021), 并且对远东拟沙丁鱼的洄游、生殖和产卵都有着非常重要的影响, 北太平洋的海表温度有着随着季节变化呈先升高再降低的趋势, 中心渔场随上述

规律先向东北方向移动, 到生产作业末期再向西南折返, 以寻求 11~18 °C 范围的最适海表温度环境。北太平洋的海表温度除了受季节影响之外, 同时受黑潮的影响也较大, 从北赤道流北上的黑潮携带着高温、高盐的海流影响着北太平洋的渔场(Watanabe *et al.*, 1995), 在黑潮延伸区远东拟沙丁鱼的自然死亡系数与春、冬季海表温度呈显著正相关(Noto *et al.*, 1999)。对于沙丁鱼幼鱼, 其洄游路线上的海温和食物密度被认为是影响生存和决定资源丰度的主要因素(Kawasaki *et al.*, 2010), 海洋中叶绿素浓度是浮游植物存量多少的一个重要指标, 其分布反映了海水中浮游植物及藻类的丰度及其相关的变化规律(刘广鹏, 2014), 远东拟沙丁鱼的主要摄食对象为海洋中的藻类和浮游植物, 其资源量的变化与因气候变动而导致的藻类和浮游植物的变化趋势非常吻合(Kawasaki *et al.*, 1984)。北太平洋远东拟沙丁鱼的最适叶绿素浓度为 0.3~0.6 mg/m<sup>3</sup>, 当叶绿素浓度不适宜时, 渔获量都较少; 在相关海域海洋环境中叶绿素浓度适宜时(7—8月), 渔场产量较高; 在相关海域的海洋环境中叶绿素浓度较高时(4—6月、10—11月), 产量较叶绿素浓度适宜时(7—8月)低, 说明远东拟沙丁鱼对叶绿素浓度的季节性变化反应较为显著。海流的聚合和辐散会影响海面高度的上升和下降, 从而形成渔场区域(邵全琴等, 2005; Wang *et al.*, 2021)。北太平洋的黑潮延伸区有明显的 SSH 梯度密集的海域(Bo *et al.*, 2000), 密集梯度的出现与黑潮和亲潮的交汇相关(Imawaki *et al.*, 2001), 中心渔场大多分布在密集梯度区偏北一侧, 与黑潮延伸体的北面分支海域相重叠(图 1), 黑潮的延伸带来了大量的营养物质和 CO<sub>2</sub> 复杂水团(Sakamoto *et al.*, 2005;

Nakano *et al.*, 2011), 由此所形成的特殊海洋环境使得该海域不仅形成了远东拟沙丁鱼的渔场, 同时也是柔鱼、日本鲭等诸多渔业的复合渔场(陈新军等, 2012、1997; 解明阳等, 2021)。

北太平洋远东拟沙丁鱼中心渔场的分布除了与上述的海洋环境因子相关外, 在远东拟沙丁鱼研究中的气候变化对资源量变动是一个非常重要的因素, 其变化会直接影响海洋环境因子的变动(Alheit *et al.*,

2012; Kaplan *et al.*, 2016), 进而导致远东拟沙丁鱼的栖息地随之变化(Urias-Sotomayor *et al.*, 2018)。目前, 国内关于北太平洋公海远东拟沙丁鱼的研究较少, 但根据其捕捞数据及 CPUE 值来看, 在作业方式与渔船数量基本保持不变的情况下, 2020 年 CPUE 值大幅提升。导致该现象的相关因素有很多, 仍需要采集更多的远东拟沙丁鱼渔业数据, 更加了解其生物学特征和洄游习性, 才能得出针对该现象的相关结论。

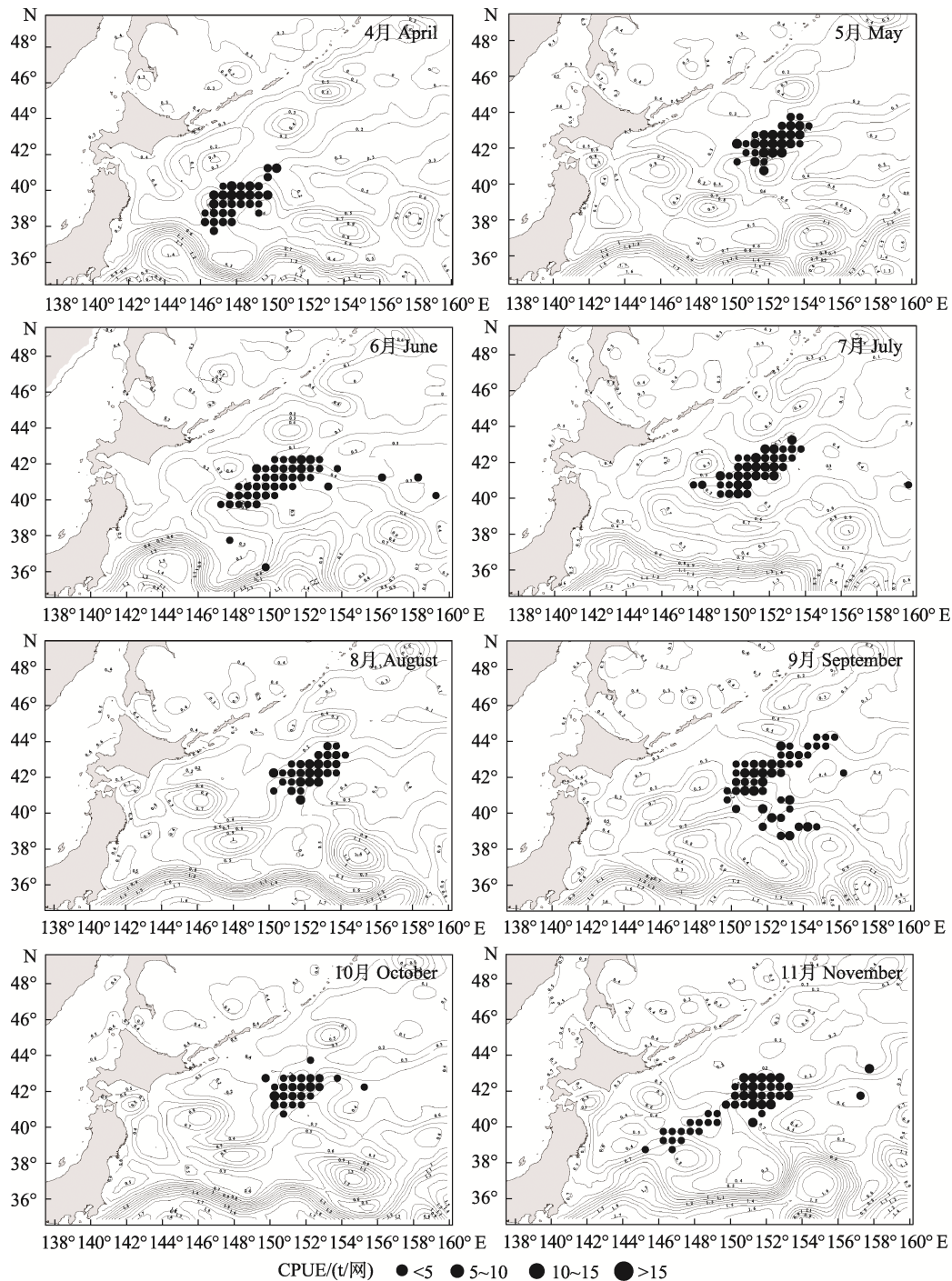


图8 2019—2020年北太平洋远东拟沙丁鱼月平均CPUE和海面高度空间叠加  
Fig.8 Stack distribution of SSH and CPUE of *S. sagax* in the North Pacific in 2019–2020

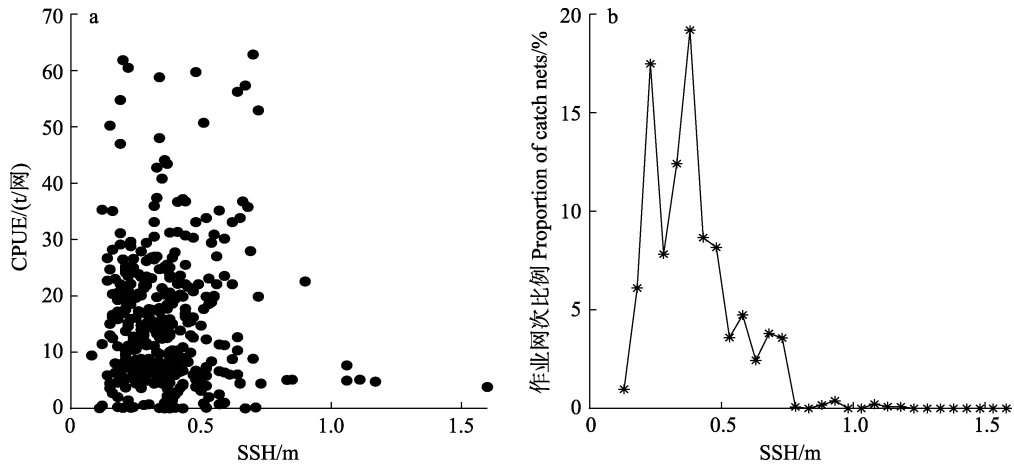


图 9 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼 CPUE 与海面高度(a)及作业网次比例与海面高度(b)的关系  
 Fig.9 Relationship between *S. sagax* CPUE and SSH (a), proportion of catch nets and SSH (b) in the North Pacific in 2019–2020

a: 散点图; b: 频次图  
 a: Scatter plot; b: Frequency plot

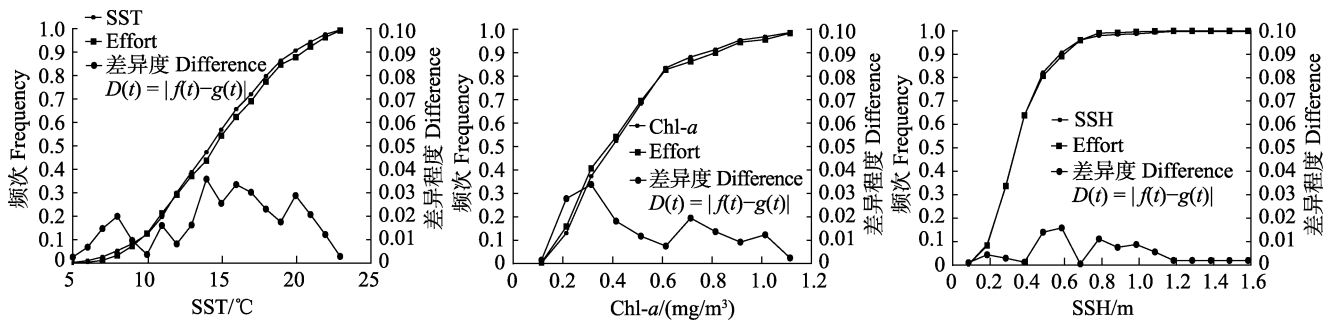


图 10 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼 CPUE 与 SST、Chl-a、SSH 的关系  
 Fig.10 Relationship between the *S. sagax* CPUE and SST, Chl-a and SSH in the North Pacific in 2019–2020

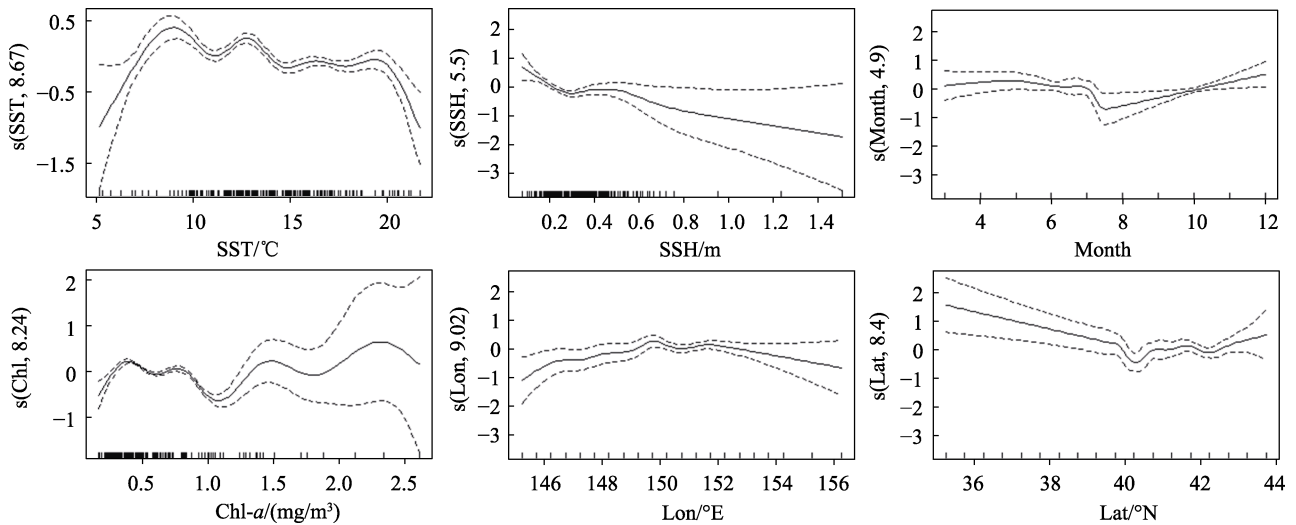


图 11 2019—2020 年北太平洋远东拟沙丁鱼环境因子与渔获量 GAM 模拟结果  
 Fig.11 GAM simulation results of environmental factors and catch of *S. sagax* in the North Pacific in 2019–2020



## 参 考 文 献

- ALHEIT J, POHLMANN T, CASINI M, *et al.* Climate variability drives anchovies and sardines into the North and Baltic Seas. *Progress in Oceanography*, 2012, 96(1): 128–139
- BO Q. Interannual variability of the Kuroshio extension system and its impact on the wintertime SST field. *Journal of Physical Oceanography*, 2000, 30(6): 1486–1502
- CHEN X J, LU H J, LIU B L, *et al.* Current exploitation and some scientific issues in the sustainable utilization of Ommastrephidae. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 831–840 [陈新军, 陆化杰, 刘必林, 等. 大洋性柔鱼类资源开发现状及可持续利用的科学问题. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 831–840]
- CHEN X J. An Analysis on marine environmental factors of fishing ground of *Ommastrephes bartrami* in northwestern Pacific. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1997, 6(4): 263–267 [陈新军. 关于西北太平洋的柔鱼渔场形成的海洋环境因子的分析. *上海水产大学学报*, 1997, 6(4): 263–267]
- DAI S W. Basic biological property and spatiotemporal dynamics in fishing ground of scomber japonicas in North Pacific high seas. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [戴澍蔚. 北太平洋公海日本鲭基础生物学特征及其渔场时空动态. *上海海洋大学硕士研究生学位论文*, 2018]
- GUAN X D. *Sardinops sagax* from the coast of Japan. *Marine Fisheries*, 1985(4): 187–189 [管锡弟. 日本周围沿海的远东拟沙丁鱼. *海洋渔业*, 1985(4): 187–189]
- HU Y Z, QIAN S Q. A study on the age and growth of *Sardinops melanostictus* (Temminck et Schlegel) in off-sea waters of the East China Sea. *Fishery Information and Strategy*, 1993(7): 16–19 [胡雅竹, 钱世勤. 东海外海远东拟沙丁鱼的年龄和生长的研究. *现代渔业信息*, 1993(7): 16–19]
- HUA C J, ZHANG H, WU Y M, *et al.* Spatiotemporal patterns of fishing grounds of tuna longline fishery in the mid-eastern Pacific Ocean. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(5): 1243–1247 [化成君, 张衡, 伍玉梅, 等. 中东太平洋金枪鱼延绳钓中心渔场的时空变化. *生态学杂志*, 2014, 33(5): 1243–1247]
- IMAWAKI S, UCHIDA H, ICHIKAWA H, *et al.* Satellite altimeter monitoring the Kuroshio transport south of Japan. *Geophysical Research Letters*, 2001, 28(1): 17–20
- KAPLAN I C, WILLIAMS G D, BOND N A, *et al.* Cloudy with a chance of sardines: Forecasting sardine distributions using regional climate models. *Fisheries Oceanography*, 2016, 25(1): 15–27
- KAWASAKI T, KUMAGAI A. Food habits of the far eastern sardine and their implication in the fluctuation pattern of the sardine stocks. *Nihon-Suisan-Gakkai-Shi*, 1984, 50(10): 1657–1663
- KAWASAKI T. Recovery and collapse of the Far Eastern sardine. *Fisheries Oceanography*, 2010, 2(3/4): 244–253
- LI R, ZHANG H L, LI X Y, *et al.* Umami substances comparison of *Sardinops sagax* fish sauces prepared by three fermentation processes. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(22): 143–149 [李锐, 张海玲, 李旭艳, 等. 三种发酵方法制备远东拟沙丁鱼鱼露中鲜味物质的比较. *食品与发酵工业*, 2019, 45(22): 143–149]
- LI Y H, LI J H, JI H W, *et al.* Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax*. *Chinese Journal of Food*, 2021, 21(2): 229–238 [李亚会, 李积华, 吉宏武, 等. 远东拟沙丁鱼抗氧化肽的分离纯化及结构解析. *中国食品学报*, 2021, 21(2): 229–238]
- LIU G P. Spatial and temporal variability of chlorophyll-*a* patterns and its mechanisms off the Yangtze River estuary. Master's Thesis of East China Normal University, 2014 [刘广鹏. 长江口及邻近海域叶绿素时空变化及影响机制. *华东师范大学硕士研究生学位论文*, 2014]
- LIU J L, CHEN X J. Research progress and hotspots of marine biodiversity: Based on bibliometrics and knowledge mapping analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 201–213 [刘立金, 陈新军. 海洋生物多样性研究进展及其热点分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 201–213]
- MA C, ZHUANG Z D, LIU Y, *et al.* Preliminary study on catch composition and biological characteristics of light-liftnet in the Northwest Pacific Ocean. *Journal of Fisheries Research*, 40(2): 141–147 [马超, 庄之栋, 刘勇, 等. 西北太平洋公海灯光敷网渔获组成及主要种类渔业生物学特性研究. *渔业研究*, 2018, 40(2): 141–147]
- NAKANO H, TSUJINO H, HIRABARA M, *et al.* Uptake mechanism of anthropogenic CO<sub>2</sub> in the Kuroshio extension region in an ocean general circulation model. *Journal of Oceanography*, 2011, 67(6): 765–783
- NIPPON SUISAN GAKKAISHI. 北太平洋漁業委員会(NPFC) について, 2016, 82
- NOTO I M. Population decline of the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*, in relation to sea surface temperature in the Kuroshio extension. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1999, 56(6): 973–983
- OKUNISHI T, YAMANAKA Y, ITO S I. A simulation model for Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) migrations in the western North Pacific. *Ecological Modelling*, 2009, 220(4): 462–479
- PERRY R I, SMITH S J. Identifying habitat associations of marine fishes using survey data: An application to the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1994, 51(3): 589–602
- SAKAMOTO T T, HASUMI H, ISHII M, *et al.* Responses of the



- Kuroshio and the Kuroshio extension to global warming in a high-resolution climate model. *Geophysical Research Letters*, 2005, 32(14): 337–349
- SHAO Q Q, MA W W, CHEN Z Q, *et al.* Relationship between Kuroshio meander pattern and *Ommastrephes bartrami* CPUE in Northwest Pacific Ocean. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(2): 111–122 [邵全琴, 马巍巍, 陈卓奇, 等. 西北太平洋黑潮路径变化与柔鱼 CPUE 的关系研究. *海洋与湖沼*, 2005, 36(2): 111–122]
- TANG F H, CUI X S, YANG S L, *et al.* GIS analysis on effect of temporal and spatial patterns of marine environment on purse seine fishery in the western and central Pacific. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(2): 18–26 [唐峰华, 崔雪森, 杨胜龙, 等. 海洋环境对中西太平洋金枪鱼围网渔场影响的 GIS 时空分析. *南方水产科学*, 2014, 10(2): 18–26]
- TIAN S Q, CHEN X J, *et al.* Impacts of different calculating methods for nominal CPUE on CPUE standardization. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(2): 240–245 [田思泉, 陈新军. 不同名义 CPUE 算法对 CPUE 标准化的影响. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(2): 240–245]
- URIAS-SOTOMAYOR R, RIVERA-PARRA G I, MARTINEZ-CORDERO F J, *et al.* Stock assessment of jumbo squid *Dosidicus gigas* in northwest Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2018, 46(2): 330–336
- WANG M Y, DONG W D. Development and utilization of the *Sardinops sagax* in the Far East. *Fisheries Science*, 1992(7): 14–16 [王明彦, 董文德. 远东拟沙丁鱼的开发利用现状. *水产科学*, 1992(7): 14–16]
- WANG Y T, TANG R, YU Y, *et al.* Variability in the sea surface temperature gradient and its impacts on oceanic features in the Kuroshio extension. *Remote Sensing*, 2021, 13(5): 888
- WATANABE Y, ZENITANI H, KIMURA R. Population decline of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus* owing to recruitment failures. *Journal Canadien Des Sciences Halieutiques et Aquatiques*, 1995, 52(8): 973–983
- WEI S, CHEN Y Z, ZHOU B B, *et al.* Identification of sardine *Sardinops melanostictus* (*temmincket schrdinops*) populations in Yellow Sea. *Marine Science*, 1989(4): 55–60 [韦晟, 陈毓桢, 周彬彬, 等. 黄海远东拟沙丁鱼种群鉴别的研究. *海洋科学*, 1989(4): 55–60]
- XIE M Y, CHEN X J. Analysis of the fishing seasons characteristics of *Ommastrephes bartramii* and prediction of the main fishing seasons based on the grey system theory. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 1–8 [解明阳, 陈新军. 基于灰色系统的北太平洋柔鱼渔汛特征分析及旺汛期预测. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 1–8]
- XU B, ZHANG H, TANG F H, *et al.* Relationship between center of gravity and environmental factors of main catches of purse seine fisheries in North Pacific high seas based on GAM. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(5): 60–70 [徐博, 张衡, 唐峰华, 等. 基于 GAM 的北太平洋公海围网主要渔获种类渔场重心与环境因子的关系分析. *南方水产科学*, 2020, 16(5): 60–70]
- YUAN X N, CHEN X J, LI G, *et al.* Annual change of fishing ground gravity for *Scomber japonicas* by large light seine fishery and their relationship with environmental factors in the East China Sea and Yellow Sea. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(3): 110–114 [袁小楠, 陈新军, 李纲. 东黄海日本鲈灯光围网渔场重心年际变化及其与环境因子关系. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(3): 110–114]

(编辑 冯小花)

## Spatio-Temporal Distribution of *Sardinops sagax* in the North Pacific: Optimal Environmental Characteristics

YANG Chao<sup>1,2</sup>, ZHANG Heng<sup>1,2,3①</sup>, HAN Haibin<sup>1,2</sup>, ZHAO Guoqing<sup>1,2</sup>,  
SHI Yongchuang<sup>1,2</sup>, XU Bo<sup>4</sup>, JIANG Peiwen<sup>2,5</sup>, YAN Yunzhi<sup>5</sup>, GE Yali<sup>5</sup>

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

2. Key Laboratory of Oceanic and Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;

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

3. Yangtze Delta Estuarine Wetland Ecosystem Observation and Research Station, Ministry of Education & Shanghai  
Science and Technology Committee, Shanghai 202162, China; 4. Polar Research Institute of China, Shanghai 201209, China;

5. School of Ecology and Environment, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

**Abstract** Sea surface temperature (SST) and chlorophyll concentration in the North Pacific in 2019–2020 were analyzed based on the data of light net fertilization fisheries, including chlorophyll-*a*, sea surface height (SSH), and data regarding other environmental factors. The spatial and temporal distribution characteristics of catch per unit effort (CPUE) and its relationship with key environmental factors of *Sardinops sagax* fishery in the Far East were analyzed by spatial superposition map and frequency analysis, empirical cumulative distribution function, K-S test, and GAM model. The results showed that the geographical fishery center ranges from 147°–153°E and 39°–43°N and moves to the northeast from April to August, returning to the southwest from September to November. According to the frequency analysis and empirical cumulative distribution function, the optimal SST and chlorophyll concentration in the central fishing area were 10.0–18.0 °C and 0.2–0.6 mg/m<sup>3</sup>, while the optimal sea level was 0.2–0.7 m. The K-S test showed that high CPUE was closely related to SST, chlorophyll concentration, and sea surface height, and the optimal ranges were 10.9–18.9 °C, 0.2–0.6 mg/m<sup>3</sup>, and 0.2–0.7 m, respectively. The GAM model simulation results showed that the optimal SST of high CPUE was 11.0–17.0 °C, the optimal chlorophyll concentration was 0.3–0.8 mg/m<sup>3</sup>, and the optimal sea surface height was 0.1–0.4 m. Overall, the results showed that the optimal SST, chlorophyll concentration, and sea surface height were 11.0–18.0 °C, 0.2–0.6 mg/m<sup>3</sup>, and 0.2–0.7 m, respectively.

**Key words** North Pacific high seas; *Sardinops sagax*; Environmental factors; GAM

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220329001

http://www.yykxjz.cn/

黄俊杭, 房景辉, 方建光, 于瑞海, 郑小东, 毛玉泽, 蒋增杰. 牡蛎-海参筏式综合养殖可行性研究. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 111-120

HUANG J H, FANG J H, FANG J G, YU R H, ZHENG X D, MAO Y Z, JIANG Z J. Feasibility of integrated oyster-sea cucumber raft culture. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 111-120

## 牡蛎-海参筏式综合养殖可行性研究\*



黄俊杭<sup>1,2</sup> 房景辉<sup>1①</sup> 方建光<sup>1</sup> 于瑞海<sup>2</sup> 郑小东<sup>2</sup> 毛玉泽<sup>1</sup> 蒋增杰<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003)

**摘要** 为探究牡蛎-海参筏式综合养殖模式的可行性,在2个具有代表性的牡蛎养殖区——山东荣成桑沟湾和乳山挂子场海域开展了长牡蛎(*Crassostrea gigas*)-仿刺参(*Apostichopus japonicus*)筏式笼养效果对比实验。在牡蛎养殖笼中,奇数层放养长牡蛎,偶数层放养仿刺参。实验设置3个因子:偶数层的底盘类型(普通养殖盘、无孔养殖盘和无孔养殖盘加无节网)、放养仿刺参的密度(1、2和4头/盘)和放养海域(桑沟湾和挂子场),共18个处理组,每组5个重复,实验期为2020年11月—2021年6月。实验期间,对两海域水体6项指标(叶绿素 $a$ 、颗粒有机物、活性磷酸盐、亚硝酸盐、硝酸盐和铵盐)和实验动物的生长、存活等方面进行跟踪测定和比较分析。结果显示,两海域叶绿素 $a$ 和颗粒有机物无显著性差异( $P>0.05$ ),但其他4项营养盐指标均差异显著( $P<0.05$ )。处理组中,两海域各处理组间牡蛎个体体重及肥满度无显著差异( $P>0.05$ ),海参低密度处理组中,海参个体体重及成活率显著高于海参高密度处理组( $P<0.05$ );在其他处理条件相同时,无孔养殖盘处理组的仿刺参个体体重高于普通养殖盘处理组,在挂子场海域有显著差异( $P<0.05$ )。本研究表明,在牡蛎养殖笼偶数层使用无孔养殖盘并放养1头仿刺参,能在降低牡蛎养殖密度的同时,显著提高仿刺参的个体体重和成活率。综上,该牡蛎-海参筏式综合养殖模式可以作为牡蛎规模化养殖区的有益补充。

**关键词** 仿刺参;长牡蛎;多营养层次综合养殖;生长;营养盐;水环境

**中图分类号** S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0111-10

我国是水产养殖大国,养殖产量和面积均位于世界首位,其中,牡蛎养殖产量占全球牡蛎总养殖产量的80%(于潇等,2020)。但伴随着养殖产业的迅猛发展,也产生了一系列的问题。近年来,为了追求经济利益,养殖海区内牡蛎养殖密度不断增加,辽宁大连大窑湾海区、广西钦州、北海和防城港等地均因为牡蛎养殖密度不断增加,出现产量下降、个体变瘦、牡蛎大量死亡和病害频繁发生等问题(隋锡林等,2002;

潘英等,2021)。因此,迫切需要探索新型养殖模式,以期解决上述问题。

随着人们对海洋生态系统的深入研究,生态养殖模式逐渐被人们接受并加以推广,其中,多营养层次综合养殖模式(integrated multi-trophic aquaculture, IMTA)是公认的环境友好型养殖模式。该养殖模式的核心是将不同生态位的种类,按照适当比例在同一水体中进行养殖,部分生物的排泄物作为另一生物的饵料,在减

\* 十三五“蓝色粮仓科技创新”国家重点研发计划(2019YFD0900803)、国家自然科学基金面上项目(41876185)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD50)共同资助。黄俊杭, E-mail: 18565729720@163.com

① 通信作者: 房景辉, 研究员, E-mail: fangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-29, 收修改稿日期: 2022-04-25

少废物排放的同时,增加经济效益,使能量和营养得到充分利用。目前,许多研究证实,该养殖模式应用效果显著(Ashkenazi *et al*, 2019; Gui *et al*, 2018),可以增加单位面积产出(于潇等, 2020)、改善海域环境(张继红等, 2013)、提高物质利用率(吴文广等, 2021)。

规模化养殖的滤食性贝类,在摄食后会产生大量的生物沉积物,将水体中的颗粒物由上层搬运至底层(聂梦晨等, 2022)。大量有机物以生物沉积物的形式累积到养殖区海底,会对底质环境造成一定负面影响(Hatcher *et al*, 1994)。研究表明,海参能大量摄食贝类产生的富含有机质的沉积物,加快系统内营养盐的循环,降低沿海贝类及鱼类养殖造成的营养负荷(赵聚萍, 2018; 秦培兵等, 1999)。因此,在多营养层次综合养殖原理的基础上,利用具有沉积食性的海参对滤食性贝类产生的生物沉积物进行摄食,可能形成一种新型的综合养殖模式。基于此,本研究通过改进养殖方式,尝试在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的下层水体中养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*),进行牡蛎-海参筏式综合养殖,目的是使牡蛎产生的生物沉

积物得到原位利用,降低牡蛎养殖密度,维持经济效益。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验生物来源

实验所使用的牡蛎为长牡蛎,海参为仿刺参,均由山东荣成楮岛水产有限公司提供。挑选规格相近、活力好的长牡蛎和仿刺参用于实验。长牡蛎和仿刺参初始体重分别为(60±15) g和(40±10) g。

### 1.2 实验设计

本研究选择了2个具有代表性的牡蛎养殖海域(图1):山东省荣成市桑沟湾海域(37°03'58"N, 122°33'28"E)和山东省乳山市挂子场渔港附近海域(36°43'48"N, 121°36'21"E)。

使用牡蛎养殖笼(直径为31 cm,高约为170 cm,孔径为1.6 cm,共10层)进行实验。长牡蛎和仿刺参隔层放养,奇数层放养总重0.6 kg的长牡蛎,每个养

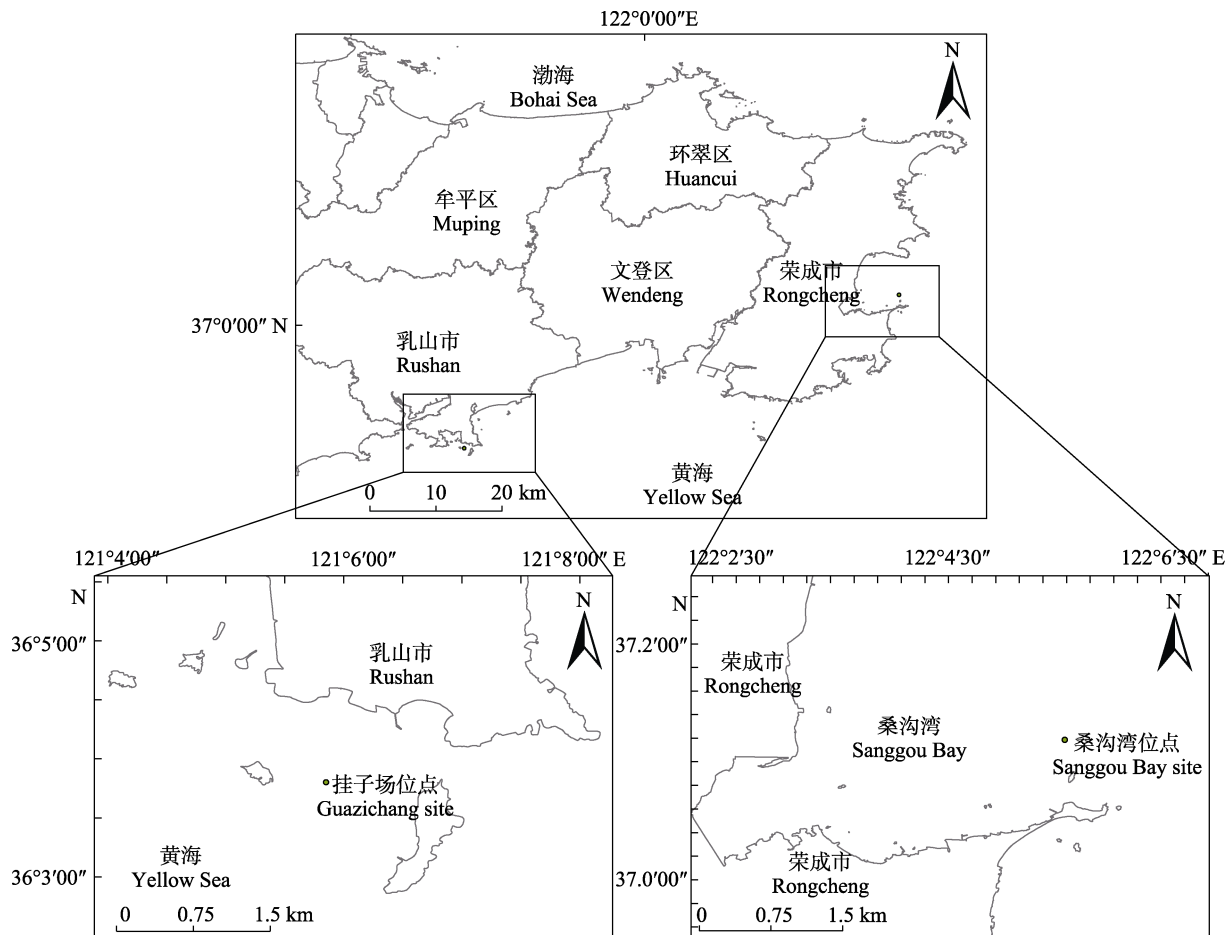


图1 实验海域示意图

Fig.1 Sketch map of experimental sea area

殖笼内长牡蛎的初始总重为 3 kg; 偶数层放养仿刺参, 其数量根据如下实验分组确定: 每偶数层放养仿刺参分为 3 个密度, 分别为 1、2 和 4 头, 标记为海参密度 1、2、4 头/盘。偶数层的养殖盘分为普通养殖盘和无孔养殖盘 2 种, 分别标记为 P 和 W 处理; 同时, 在部分无孔养殖盘的笼内放置约为 2 倍养殖盘面积的无结网, 标记为 J 处理。每个海域 9 个处理组编号见表 1。本研究在 2 个海域进行, 共 18 个处理组, 每个处理组 5 个重复, 每个实验海域使用 45 个养殖笼, 实验共使用 90 个养殖笼。

表 1 处理组编号  
Tab.1 Treatment group number

养殖盘处理 Treatment of plate	海参密度 Density of sea cucumber/(ind./plate)		
	1	2	4
普通养殖盘 P Common plate	P1	P2	P4
无孔养殖盘 W Holeless plate	W1	W2	W4
无孔养殖盘+无结网 J Holeless plate with non-knot nets	J1	J2	J4

### 1.3 样品采集

实验时间为 2020 年 11 月—2021 年 6 月, 每月定期前往 2 个实验海域进行样品采集。现场随机选取 5 个取样位点, 使用 YSI 多参数水质分析仪(Eureka 公司, 美国)测量实验海域的水温( $T$ )、盐度( $S$ )、溶解氧( $DO$ )和 pH 值。每个位点采集 2.5 L 表层水, 参照《海洋监测规范 GB17378.4-2007》进行现场固定, 将水样带回实验室进行相关分析。

每 2 个月采集 1 次长牡蛎和仿刺参样品, 每个处理组采集长牡蛎个体 30 个、仿刺参个体 5 个, 用于测量生长指标。养殖实验结束后, 对所有养殖笼内长牡蛎和仿刺参进行称重和计数, 计算不同处理组长牡蛎和仿刺参的平均单笼总重和成活率。

### 1.4 样品测定

使用游标卡尺测量长牡蛎壳高、壳长和壳宽, 使用电子天平(0.01 g 精度)测量长牡蛎的总湿重、软体部湿重和仿刺参湿重。将长牡蛎软体部和壳在 70 °C 烘箱内烘干 72 h 至恒重后, 测量长牡蛎软体部干重和壳干重。

叶绿素  $a$  (Chl- $a$ )参照《海洋监测规范 GB 17378.7-2007》使用分光光度法测定; 颗粒有机物(POM)参照

《海洋调查规范 GB/T 12763.9-2007》, 使用预先灼烧称重后的 GF/F 玻璃纤维滤膜测定; 活性磷酸盐( $PO_4^{3-}$ -P)、亚硝酸盐( $NO_2^-$ -N)、硝酸盐( $NO_3^-$ -N)和铵盐( $NH_4^+$ -N)参照《海洋调查规范 GB/T 12763.4-2007》分别使用抗坏血酸还原磷钼蓝法、重氮-偶氮法、锌镉还原法和次溴酸钠氧化法测定。

### 1.5 计算公式和数据分析

牡蛎个体肥满度(condition index, CI)计算公式(Walne, 1976):

$$CI = DW_t/DW_s \times 100\%$$

式中,  $DW_t$  表示牡蛎软体部干重,  $DW_s$  表示牡蛎壳干重。

实验数据均采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 SPSS 23.0 统计分析软件分析数据; 采用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验方法对数据进行正态分布检验和方差齐性检验。使用双因素方差分析(two-way ANOVA)检验不同海域和取样月份对海域 Chl- $a$ 、POM、 $PO_4^{3-}$ -P、 $NO_2^-$ -N、 $NO_3^-$ -N 和  $NH_4^+$ -N 的影响; 使用三因素方差分析(three-way ANOVA)检验不同海域、养殖盘和海参密度对长牡蛎单笼总重、仿刺参单笼总重、仿刺参个体体重、仿刺参成活率、长牡蛎个体体重和长牡蛎肥满度的影响, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平,  $P < 0.01$  作为差异极显著水平。对存在显著交互效应的因变量, 分析各处理组间的简单效应; 对不存在显著交互效应、仅存在显著主效应的因变量, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较分析各处理组间是否存在显著差异。使用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制图表。

## 2 结果

### 2.1 养殖区环境因子变化

**2.1.1 叶绿素  $a$  和颗粒有机物** 双因素方差分析显示, 海域对 Chl- $a$  和 POM 影响不显著( $P > 0.05$ ); 取样月份对 Chl- $a$  和 POM 影响均极显著( $P < 0.01$ ); 海域和取样月份交互效应对 Chl- $a$  影响显著( $P < 0.05$ ), 对 POM 影响极显著( $P < 0.01$ ) (表 2)。

12 月和翌年 5 月两海域 Chl- $a$  含量存在显著差异( $P < 0.05$ ), 其他各月份两海域 Chl- $a$  含量无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域内各月份 Chl- $a$  含量差异显著( $P < 0.05$ ), 桑沟湾海域变化范围为 0.92~2.11  $\mu\text{g/L}$ , 挂子场海域变化范围为 0.88~2.41  $\mu\text{g/L}$  (图 2a)。

12 月两海域 POM 含量存在显著差异( $P < 0.05$ ), 其他各月份两海域 POM 含量无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域各月份差异显著( $P < 0.05$ ), 桑沟湾海域变化



范围为 3.57~12.52 mg/L, 挂子场海域变化范围为 4.02~11.59 mg/L (图 2b)。

**2.1.2 营养盐** 双因素方差分析显示, 海域和取样月份对 4 项营养盐指标的影响均极显著( $P<0.01$ ); 海域和取样月份交互效应对  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  和  $\text{NO}_3\text{-N}$  的影响极显著( $P<0.01$ ), 对  $\text{NO}_2\text{-N}$  和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的影响不显著( $P>0.05$ ) (表 2)。

12 月桑沟湾海域  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  浓度显著低于挂子场海域( $P<0.05$ ), 其他各月桑沟湾海域均高于挂子场海域, 除 1 月和 6 月以外的月份差异显著( $P<0.05$ ); 相同海域各月的  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  浓度差异显著( $P<0.05$ ), 整体表现为先下降后上升的趋势(图 3a)。

挂子场海域  $\text{NO}_2\text{-N}$  浓度整体高于桑沟湾海区, 除 3 月、6 月以外的月份差异显著( $P<0.05$ ); 相同海域各月  $\text{NO}_2\text{-N}$  浓度差异显著( $P<0.05$ ), 整体较为稳定(图 3b)。

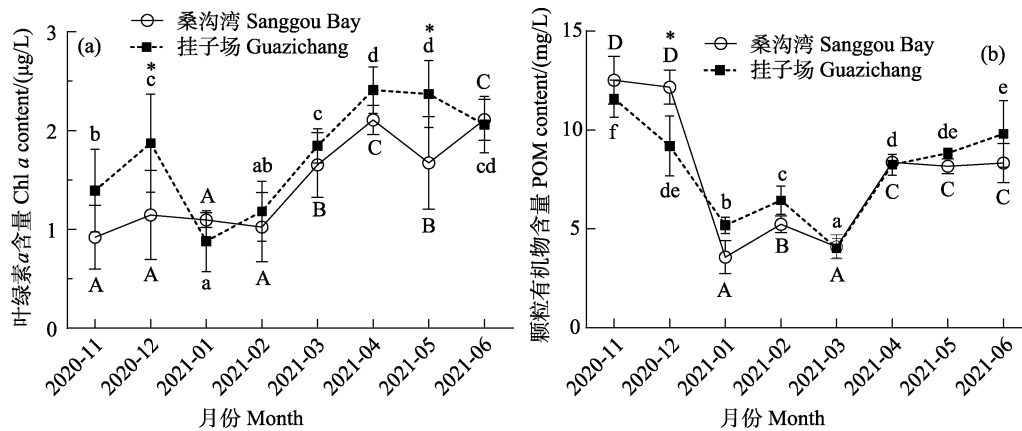


图 2 实验海域叶绿素 a 和颗粒有机物含量变化

Fig.2 Variation of Chlorophyll a content and POM content in experimental sea areas

不同大写字母表示桑沟湾海域不同月份数据差异显著( $P<0.05$ ); 不同小写字母表示挂子场海域不同月份数据差异显著( $P<0.05$ ); \*表示相同月份不同海域数据差异显著( $P<0.05$ ), 下同。

Different capital letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) among different months in Sanggou Bay, and Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) among different months in Guazichang.

\* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) between sea areas in the same month, the same as below.

桑沟湾海域  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度整体高于挂子场海域, 除 4 月和 6 月以外的月份差异显著( $P<0.05$ ); 相同海域各月份  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度差异显著( $P<0.05$ ), 整体表现为下降趋势(图 3c)。

桑沟湾海域  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度整体高于挂子场海域, 除 2 月和 5 月以外的月份差异显著( $P<0.05$ ); 相同海域各月份  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度差异显著( $P<0.05$ ), 整体较为稳定(图 3d)。

## 2.2 长牡蛎和仿刺参的生长

**2.2.1 长牡蛎总重和仿刺参总重** 三因素方差分析显示(表 3), 养殖盘和海参密度对仿刺参和长牡蛎

表 2 海域与取样月份对海域环境因子影响的双因素方差分析结果

Tab.2 Two-way ANOVA analysis of the influence of sea area and month on the environmental factors

环境因子	P 值 P value		
	海域 Sea area	取样月份 Month	海域×取样月份 Sea area × month
Chl-a	0.163	<0.001**	0.019*
POM	0.590	<0.001**	<0.001**
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	<0.001**	<0.001**	<0.001**
$\text{NO}_2\text{-N}$	<0.001**	<0.001**	0.109
$\text{NO}_3\text{-N}$	<0.001**	<0.001**	<0.001**
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	<0.001**	<0.001**	0.107

注: \*\*:  $P<0.01$ , \*:  $0.01<P<0.05$ , 下同。

Note: \*\* represents  $P<0.01$ , \* represents  $0.01<P<0.05$ , the same as below.

单笼总重影响均极显著( $P<0.01$ ), 海域影响不显著( $P>0.05$ ); 两因素交互作用对仿刺参单笼总重影响不显著( $P>0.05$ ), 对长牡蛎单笼总重影响显著( $P<0.05$ ); 三因素交互作用对仿刺参单笼总重影响不显著( $P>0.05$ ), 对长牡蛎单笼总重影响显著( $P<0.05$ )。

相同养殖盘和海参密度条件下, W2 和 J2 处理组不同海域之间长牡蛎单笼总重存在显著差异( $P<0.05$ ), 其他各处理组不同海域之间均无显著差异( $P>0.05$ )。相同海域和海参密度条件下, 密度为 1 头/盘时, W 和 J 处理组显著高于 P 处理组( $P<0.05$ )。相同海域和养殖盘条件下, 当养殖盘为普通养殖盘(P)时, 2 头/盘的处理组显著高于 1 头/盘的处理组( $P<0.05$ ), 与

4 头/盘的处理组差异不显著( $P>0.05$ ) (图 4a)。

相同养殖盘和海参密度条件下, 各处理组不同海域之间仿刺参单笼总重均无显著差异( $P>0.05$ )。相同海域和海参密度条件下, W 处理组仿刺参单笼总重显著高于 P 和 J 处理组( $P<0.05$ )。相同海域和养殖盘条件下, 密度为 4 头/盘的处理组仿刺参单笼总重显著高于 1 和 2 头/盘的处理组( $P<0.05$ )。相对于初始体重,

1 头/盘的处理组仿刺参单笼总重表现出增长, 其他处理组均表现为下降(图 4b)。

**2.2.2 仿刺参个体体重和存活率** 三因素方差分析显示(表 3), 海域对仿刺参个体体重影响极显著( $P<0.01$ ), 对其成活率影响不显著( $P>0.05$ ), 海参密度对两指标影响均极显著( $P<0.01$ ), 养殖盘对两指标影响均不显著( $P>0.05$ ); 两因素交互作用中只有海域×

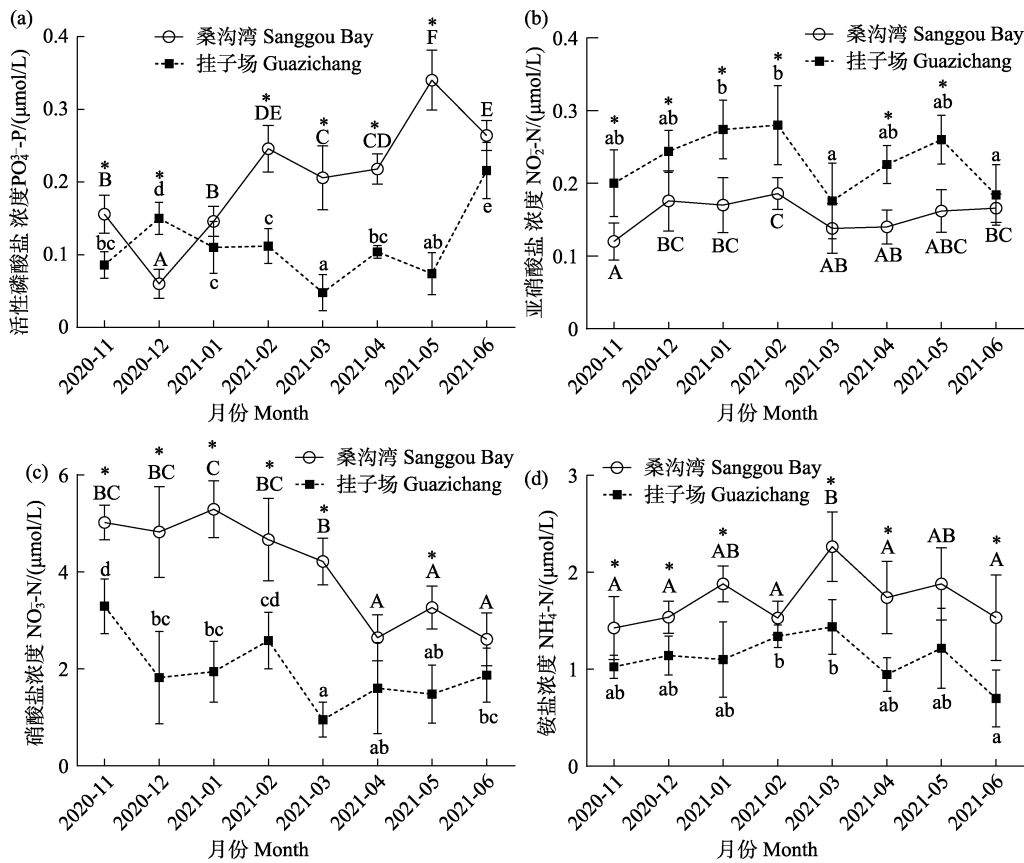


图 3 实验海域营养盐含量变化

Fig.3 Variation of nutrient contents in experimental sea areas

表 3 海域、养殖盘和海参密度对长牡蛎及仿刺参生长指标的三因素方差分析结果

Tab.3 Three-way ANOVA analysis of the influence of sea area, aquaculture plate, and sea cucumber density on the growth index of the *C. gigas* and *A. japonicus*

因素 Factor	生长指标 Growth index					
	仿刺参单笼总重 Total weight of sea cucumber	长牡蛎单笼总重 Total weight of oysters	仿刺参个体体重 Sea cucumber weight	仿刺参成活率 Survival rate of sea cucumber	长牡蛎个体体重 Oyster weight	长牡蛎肥满度 Condition index
A	0.343	0.537	<0.001**	0.100	0.834	0.186
B	0.005**	<0.001**	0.131	0.161	0.969	0.529
C	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.682	0.578
A × B	0.622	0.007**	0.213	0.148	0.991	0.679
A × C	0.277	0.026*	0.028*	0.432	0.996	0.938
B × C	0.057	<0.001**	0.093	0.737	0.990	0.090
A × B × C	0.301	0.031*	0.011*	0.430	0.996	0.688

注: A 表示海域, B 表示养殖盘, C 表示海参密度。

Note: A represents sea area, B represents aquaculture plate, and C represents sea cucumber density.

海参密度交互作用对仿刺参个体体重影响显著( $P < 0.05$ ), 其他两因素交互作用对两指标影响均不显著( $P > 0.05$ ); 三因素交互作用对仿刺参个体体重影响显著( $P < 0.05$ ), 对其成活率影响不显著( $P > 0.05$ )。

相同养殖盘和海参密度条件下, 除 W1、J1 和 P4 处理组挂子场海域仿刺参个体体重显著高于桑沟湾海域以外( $P < 0.05$ ), 其他各处理组不同海域之间均无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域和海参密度条件下, 挂子场海域的 W1 和 J1 处理组仿刺参个体体重显著高于 P1 处理组( $P < 0.05$ )。相同海域和养殖盘条件下, 密度为 1 头/盘的处理组显著高于 2 和 4 头/盘处理组( $P < 0.05$ ); 同时, 相对于初始仿刺参个体体重, 仅有密度为 1 头/盘的处理组表现出增长, 其他密度处理组均表现为下降(图 5a)。

相同养殖盘和海参密度条件下, 各处理组不同海域之间海参成活率均无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域和海参密度条件下, 仅有桑沟湾海域 W2 处理组显著低于 P2 和 J2 处理组( $P < 0.05$ ), 其他各组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域和养殖盘条件下, 海参密度为 1 头/盘的处理组显著高于 2 和 4 头/盘处理组( $P < 0.05$ ) (图 5b)。

**2.2.3 长牡蛎个体体重和肥满度** 三因素方差分析显示, 3 种因素对长牡蛎个体体重及其肥满度均无

显著影响( $P > 0.05$ ); 两因素和三因素交互作用对两指标均无显著影响( $P > 0.05$ ) (表 3)。

在所有组别中, 长牡蛎个体体重各组间均无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 6a)。

相同养殖盘和海参密度条件下, 各处理组不同海域之间长牡蛎肥满度均无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域和海参密度条件下, 仅有桑沟湾海域 W2 处理组长牡蛎肥满度显著低于 P2 处理组( $P < 0.05$ ), 其他各组间无显著差异( $P > 0.05$ )。相同海域和养殖盘条件下, 仅有桑沟湾海域 W2 处理组长牡蛎肥满度显著低于 W1 和 W4 处理组( $P < 0.05$ ), 其他各组间无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 6b)。

### 3 讨论

#### 3.1 实验海域水质条件变化对牡蛎养殖的启示

桑沟湾和挂子场海域都是我国北方重要的水产养殖海域, 其中, 挂子场海域隶属于山东省乳山海域, 以牡蛎养殖著称, 有“中国牡蛎之乡”的美誉(Fang *et al.*, 2016; 谭林涛等, 2019)。目前, 很大一部分牡蛎在桑沟湾海区生长至一定规格后, 转运去乳山海域中进行育肥养殖, 这说明在生产实践中人们得出了乳山海域水质比桑沟湾海域更适合牡蛎生长的结论(徐雯雯

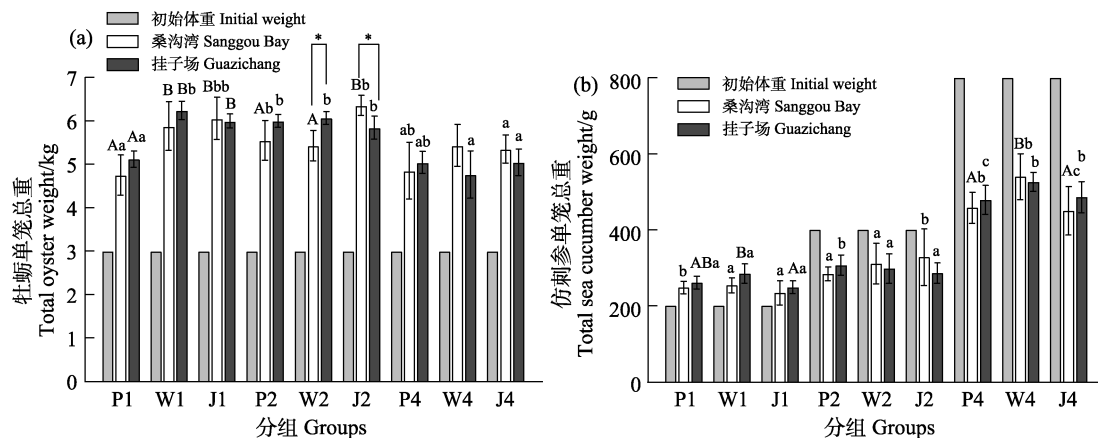


图4 长牡蛎和仿刺参单笼总重比较

Fig.4 Comparison of total weight of *C. gigas* and *A. japonicus* in a single aquaculture cage

P 代表普通养殖盘处理组, W 代表无孔养殖盘处理组, J 代表添加无节网处理组; 数字 1、2、4 分别代表每层投放海参密度为 1、2、4 头/盘; 不同大写字母表示相同海域和海参密度条件下不同养殖盘组数据差异显著( $P < 0.05$ ); 不同小写字母表示相同海域和养殖盘条件下不同海参密度组数据差异显著( $P < 0.05$ );

\*表示相同处理条件下不同海域数据差异显著( $P < 0.05$ ), 下同。

P represents the common aquaculture plate treatment group, W represents the holeless aquaculture plate treatment group, and J represents the treatment group of adding non-knot net. Numbers 1, 2, and 4 represent the density of sea cucumbers treated as 1, 2, and 4 ind./plate. Different capital letters indicate significant differences of different aquaculture plate groups in the same sea area and sea cucumber density ( $P < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant differences of different sea cucumber density groups in the same sea area and using the same kind of aquaculture plate ( $P < 0.05$ ).

\* indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different sea areas in the same treatment group, the same as below.

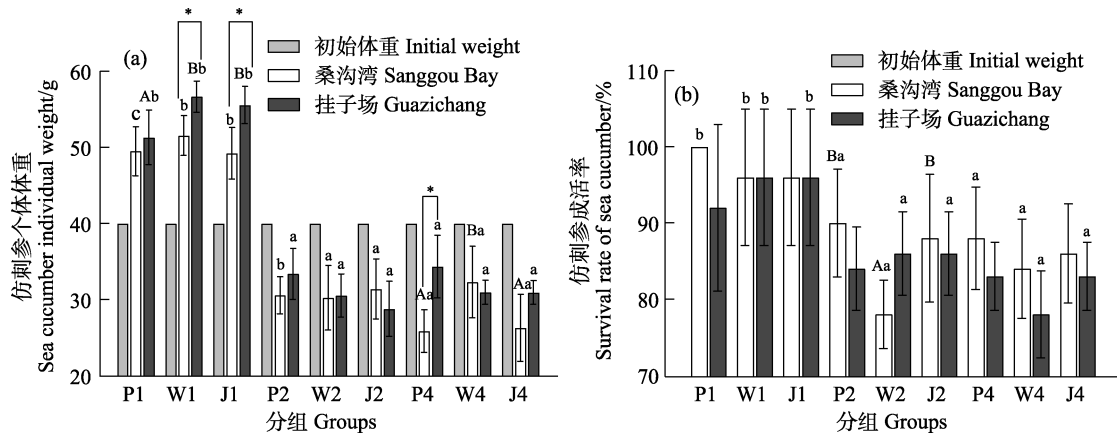


图 5 仿刺参个体体重和成活率差异  
Fig.5 Comparison of individual weight and survival rate of *A. japonicus*

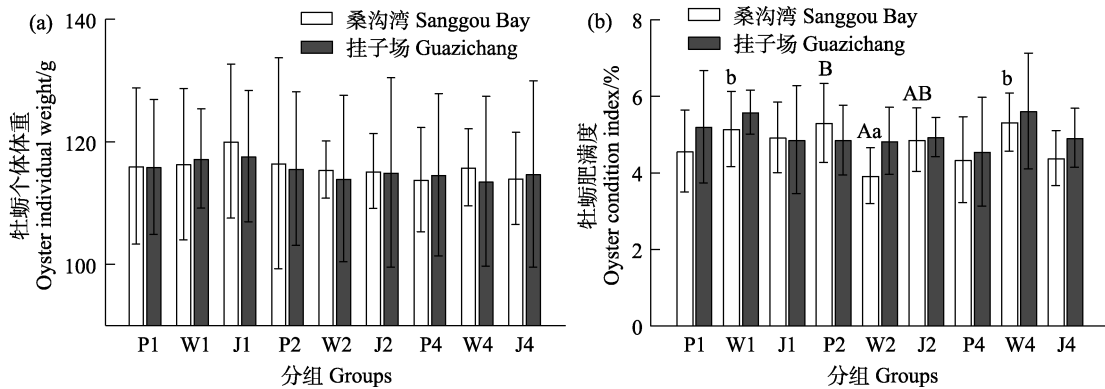


图 6 长牡蛎个体体重和肥满度差异  
Fig.6 Comparison of individual weight and condition index of *C. gigas*

等, 2021)。本研究中, 测得桑沟湾海域 Chl-*a* 浓度范围为 0.92~2.11  $\mu\text{g/L}$ , 与吴文广等(2016)于 2014 年测得 Chl-*a* 浓度(0.30~1.87  $\mu\text{g/L}$ )大致相符; 但测得挂子场海域 Chl-*a* 浓度范围为 0.88~2.41  $\mu\text{g/L}$ , 显著低于陈辰等(2013)于 2010 年测得 Chl-*a* 浓度范围(0.76~9.94  $\mu\text{g/L}$ ); 除 12 月和翌年 5 月以外, 这 2 片海域的 Chl-*a* 浓度和 POM 含量相差较小, 无显著差异( $P>0.05$ ), 这与传统认知中的“乳山水肥”相悖。由此可以推断, 挂子场养殖区可能已经接近甚至超过了该海域的养殖容量。近年来, 已有许多研究证实了这一点。徐雯雯等(2021)研究显示, 乳山市牡蛎养殖面积由 2008 年的 2 900  $\text{hm}^2$  已经发展至 2020 年的 20 000  $\text{hm}^2$ ; 吕旭宁(2017)研究发现, 在牡蛎的摄食压力作用下, 养殖海域中浮游植物的生物量和悬浮颗粒物浓度迅速下降, 难以支撑大规模牡蛎养殖的摄食和营养需求。本研究中, 两海域长牡蛎生长和肥满度均无显著差异( $P>0.05$ ), 这也印证了环境数据的结果。同时, 挂子场海域  $\text{NO}_2\text{-N}$  浓度显著高于桑沟湾海域, 也可能是由于牡蛎的大规模养殖所导致。2021 年市场调研发现, 当年乳山海域

养殖的牡蛎肥满度较差, 相同养殖时间无法达到与往年相同的品质。综上所述, 建议适当降低挂子场海域的牡蛎养殖密度, 降低养殖户的养殖风险, 有利于牡蛎养殖产业的可持续发展。

### 3.2 牡蛎-海参筏式综合养殖的可行性与优越性

本研究中, 海参密度为 1 头/盘的实验组经过 8 个月养殖后, 个体体重较实验初始体重增重 25% 以上, 同时, 仿刺参的成活率都在 90% 以上, 在较高密度的实验组中, 个体体重均产生了不同程度的下降, 成活率也显著低于密度为 1 头/盘实验组( $P<0.05$ )。这说明仿刺参在养殖笼有限的空间中, 可通过摄食上层长牡蛎产生的粪便等生物沉积物以及附着在养殖盘上的藻类等附着物满足生长需求(Paltzat *et al*, 2008)。但海参密度增加后, 食物需求也增加, 笼内单位时间内产生的食物不足以满足仿刺参生长需求, 导致个体体重下降、死亡率升高。

在 6 个密度为 1 头/盘的处理组中, 挂子场海域仿刺参个体体重均显著高于桑沟湾海域( $P<0.05$ ), 这

可能与不同海区附着在养殖笼内的藻类不同有关。相同海域和密度为 1 头/盘条件下, W 和 J 处理组的仿刺参个体体重高于 P 处理组, 在挂子场海域有显著差异( $P < 0.05$ )。推测认为, 无孔养殖盘(W 和 J)相较于带孔养殖盘(P)表面积更大、水流冲刷弱、上层长牡蛎产生的生物沉积物会在养殖盘上积累更多, 同时, 无孔养殖盘上可供底栖硅藻附着的面积更大, 为仿刺参提供了更多食物, 促进其生长。J 处理组相较于 W 处理组的仿刺参个体体重无显著差异( $P > 0.05$ ), 虽然无节网上能附着更多藻类、生物沉积物等有机物, 但考虑到海参活动能力较弱(许慈荣, 1983), 无节网可能会阻碍仿刺参的活动, 从而限制其活动范围, 导致 J 处理组的个体体重未表现出更显著的增长。

本研究中, 各处理组的长牡蛎生长无显著差异, 说明通过该牡蛎-海参筏式综合养殖模式不会影响长牡蛎的生长, 且通过养殖高经济价值的仿刺参, 可以弥补牡蛎养殖密度下降带来的养殖收益下降问题。相较于底播养殖海参, 筏式笼养模式安全性更高, 可有效防止养殖海参被捕食, 提高回捕率和成活率, 且收获时无需潜水捕捞, 降低了人力成本(刘园园等, 2013)。综上所述, 在长牡蛎养殖笼中养殖适当数量的仿刺参可以降低牡蛎养殖密度, 减少环境压力, 同时, 仿刺参可以弥补由于牡蛎密度降低造成的产量和收益下降。因此, 该养殖模式可以作为牡蛎规模化养殖区的有益补充, 从而促进牡蛎养殖产业的健康可持续发展。

## 参 考 文 献

- ASHKENAZI D Y, ISRAEL A, ABELSON A. A novel two-stage seaweed integrated multi-trophic aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(1): 246–262
- CHEN C, LI Q, MU C M, *et al.* Analysis and evaluation of seasonal variation of water quality in the oyster cultivation regions of Rushan. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2013(1): 38–44 [陈辰, 李琪, 慕翠敏, 等. 乳山牡蛎养殖海域水质状况季节分析与评价. *海洋湖沼通报*, 2013(1): 38–44]
- FANG J G, ZHANG J H, XIAO T, *et al.* Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in Sanggou Bay, China. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016, 8(1): 201–205
- GUI J F, TANG Q S, LI Z J, *et al.* Aquaculture in China: Success stories and modern trends. John Wiley and Sons, 2018, 1: 103–104
- HATCHER A, GRANT J, SCHOFIELD B. Effects of suspended mussel culture (*Mytilus* spp.) on sedimentation, benthic respiration and sediment nutrient dynamics in a coastal bay. *Marine Ecology-Progress Series*, 1994, 115(3): 219–235
- LIU Y Y, ZHANG J S, SHI F, *et al.* Contrastive experiment of sea cucumber culture in pond and cage. *Hebei Fisheries*, 2013(11): 46–47 [刘园园, 张劲松, 石峰, 等. 池塘和网箱养殖海参效果的对比试验. *河北渔业*, 2013(11): 46–47]
- LÜ X N. Environmental effects and exploration of sustainable production model of large-scale mariculture of filter-feeding bivalves. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [吕旭宁. 滤食性贝类规模化养殖的环境效应及可持续生产模式探索. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- NIE M C, HUANG C L, SUI Q, *et al.* Carbon and nitrogen stable isotope analysis and source identification of organic matter in sediments of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(5): 84–97 [聂梦晨, 黄翠玲, 隋琪, 等. 桑沟湾沉积物有机质的碳氮稳定同位素分析及其来源解析. *渔业科学进展*, 2022, 43(5): 84–97]
- PALTZAT D L, PEARCE C M, BARNES P A, *et al.* Growth and production of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus* Stimpson) co-cultured with suspended Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 2008, 275(1/2/3/4): 124–137
- PAN Y, LI J M, HUANG W D, *et al.* Analysis of current situations, existing problems of oyster industry and its developmental suggestions in Guangxi. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(9): 2608–2618 [潘英, 李坚明, 黄伟德, 等. 广西牡蛎产业现状分析及发展策略. *南方农业学报*, 2021, 52(9): 2608–2618]
- QIN P B, LU J W, ZHAO Z X, *et al.* Change of POC and PN in different experiment ecosystems. *Essays on Shellfish Science (Volume IX)*, 1999, 102–108 [秦培兵, 卢继武, 赵增霞, 等. 扇贝不同养殖模式室内模拟实验中 POC、PN 的变化比较. *贝类学论文集(第IX辑)*, 1999, 102–108]
- SUI X L, SUN J W, WANG F G, *et al.* Reasons of mass death-off in Pacific oyster cultured in Dalian sea shore. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2002, 17(4): 272–278 [隋锡林, 孙景伟, 王富贵, 等. 大连沿海太平洋牡蛎大量死亡原因解析. *大连水产学院学报*, 2002, 17(4): 272–278]
- TAN L T, WANG J G, XU W W, *et al.* Brief talk about the experience of Shandong Rushan oyster industry transform. *China Fisheries*, 2019(4): 50–52 [谭林涛, 王津果, 徐雯雯, 等. 浅谈山东乳山牡蛎产业转型经验. *中国水产*, 2019(4): 50–52]
- WALNE P R. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture*, 1976, 8(4): 371–381
- WU W G, ZHANG J H, LIU Y, *et al.* Analysis of the effectiveness of the polyculture of shellfish and algae and influencing factors in the Xuejiadao sea cage aquaculture area. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 146–155 [吴文广, 张继红, 刘毅, 等. 薛家岛海水网箱养殖海域贝藻综合养殖效果及其影响因素分析. *渔业科学进展*, 2022,



- 43(3): 146–155]
- WU W G, ZHANG J H, WANG W, *et al.* Distribution of chlorophyll-a concentration and its control factors in spring in Sungo Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(15): 4855–4863 [吴文广, 张继红, 王巍, 等. 桑沟湾春季叶绿素 a 浓度分布及其影响因素. *生态学报*, 2016, 36(15): 4855–4863]
- XU C R. Morphological structure and living habits of sea cucumber. *Bulletin of Biology*, 1983(6): 22–24 [许慈荣. 海参的形态结构和生活习性. *生物学通报*, 1983(6): 22–24]
- XU W W, ZHENG F Q, YU C S, *et al.* Rushan oyster industry development report. *China Fisheries*, 2021(12): 65–70 [徐雯雯, 郑富强, 于成松, 等. 乳山牡蛎产业发展报告. *中国水产*, 2021(12): 65–70]
- YU X, LU Y B, LIU J Z, *et al.* Ecological farming of oyster. *Journal of Aquaculture*, 2020(4): 1–3, 7 [于潇, 卢钰博, 刘嘉卓, 等. 牡蛎的生态养殖. *水产养殖*, 2020(4): 1–3, 7]
- ZHANG J H, WU T, GAO Y P, *et al.* Feeding behavior of 5 species filter-feeding bivalves on *Paralichthys olivaceus* feed, fecal and sediment particulates in cage farming area. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 727–734 [张继红, 吴桃, 高亚平, 等. 5种滤食性贝类对牙鲆的粪便、残饵及网箱养殖区沉降物的摄食行为. *水产学报*, 2013, 37(5): 727–734]
- ZHAO J P. Study on three polyculture modes of *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Yantai University, 2018 [赵聚萍. 三种刺参混养模式的研究. 烟台大学硕士学位论文, 2018]

(编辑 马瑾艳)

## Feasibility of Integrated Oyster-Sea Cucumber Raft Culture

HUANG Junhang<sup>1,2</sup>, FANG Jinghui<sup>1</sup>①, FANG Jianguang<sup>1</sup>, YU Ruihai<sup>2</sup>,  
ZHENG Xiaodong<sup>2</sup>, MAO Yuze<sup>1</sup>, JIANG Zengjie<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,  
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;

2. Ocean University of China, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

**Abstract** China is a major aquaculture country, with both the world's largest aquaculture production and area, especially oyster aquaculture which accounts for 80% of the global production. However, its ascent has had numerous negative implications, requiring the development of more environmentally friendly aquaculture methods. The ecological farming model is gradually being acknowledged and encouraged as it is the result of in-depth investigations of marine ecosystems. "Integrated Multi-trophic Aquaculture" is a well-known environmentally friendly aquaculture model. The application effects have been outstanding, as it boosts high output per unit area, improves the marine environment, and improves material utilization. Filter-feeding shellfish are raised at levels that create considerable biodeposition. Particulate matter is transferred from the upper to the lower layers of the water body. Organic matter accumulates on the seafloor in the form of biological sediments, which badly influences the substrate environment, including releasing ammonia nitrogen, increasing dissolved oxygen consumption, and altering seabed biodiversity. Previous research suggests sea cucumbers absorb large amounts of organic matter-rich sediments, reducing the nutrient load caused by coastal shellfish and fish aquaculture. Therefore, a novel sustainable farming model based on the principle of multi-trophic integrated farming could be developed by using sedimentary sea cucumbers to feed on the biological sediments produced by filter-feeding shellfish. The purpose of this study was to investigate the possibility of an oyster-sea cucumber raft integrated culture. Sea cucumbers were stocked in oyster breeding cages. A raft-style integrated oyster-sea cucumber culture

① Corresponding author: FANG Jinghui, E-mail: fangjh@ysfri.ac.cn

was attempted to improve the breeding method. This method allows oyster biological sediments to be utilized in situ, reducing oyster breeding density and maintaining economic benefits. This comparative culture experiment of integrated oyster (*Crassostrea gigas*)-sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) raft culture utilized Sanggou Bay and Guazichang as representative oyster farming locations. We stocked *C. gigas* in the odd-numbered layers and *A. japonicus* in the even-numbered layers of the oyster cages in polyculture. Even-numbered layers had three levels of chassis: common aquaculture plate, holeless aquaculture plate, and holeless aquaculture plate with non-knot nets. The aquaculture plate was the first variable in the experiment. The stocking density of *A. japonicus* in each of the even-numbered layers were separated into three levels, 1, 2, and 4 ind./plate. The second variable in the experiment was stocking density of sea cucumbers. The experiment was simultaneously conducted at both sea locations. Therefore, the experimental design consisted of a three-factor and three-level experiment with a total of 18 treatment groups. During the experiment, we examined to content of: chlorophyll *a*, particulate organic matter,  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  in both sea locations. The survival rate, growth performance, and condition of *C. gigas* and *A. japonicus* were compared. There was no significant difference in the contents of chlorophyll *a* or particle organic matter between the two marine areas ( $P>0.05$ ). There were significant differences in the four nutrient salt contents between the two locations ( $P<0.05$ ). There were no significant differences in the individual oyster weight or condition between the two locations ( $P>0.05$ ). Only the low-stocking density sea cucumbers grew, with individual weights over 25% higher than that of the high-density individuals. Individual sea cucumber weights and survival rates in the low density treatment groups were considerably higher than those in the high density treatment groups ( $P<0.05$ ). The performance of the holeless aquaculture plate considerably exceeded the common treatment group ( $P<0.05$ ). The holeless aquaculture plates with sea cucumbers at a density of 1 ind./plate achieved the highest results in this study. The chlorophyll in the sea area of Sanggou Bay remained mostly unchanged in this experiment. However, the chlorophyll in the water region of Guazichang reduced when compared with that of previous data. With the recent rapid growth in the oyster industry in Rushan City, the oyster output may have reached or possibly exceeds the area's aquaculture capacity. We advise the oyster breeding density in the Rushan sea area to be reduced to lower the breeding risk for farmers while also promoting the breeding industry's long-term viability. In this experiment, there was no significant difference in oyster growth across the treatment groups, indicating that the integrated oyster-sea cucumber raft culture mode can lower oyster density and reduce environmental impacts. Simultaneously, breeding high-value sea cucumbers compensates for the loss of breeding income induced by the lower oyster breeding density. When compared to bottom-seeded sea cucumbers, this raft cage mode has a higher level of safety and ease of harvest. This method can be used to replenish oyster growing zones with a high density of oysters to boost the aquaculture industry's health and long-term development.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; *Crassostrea gigas*; Integrated multi-trophic aquaculture; Growth; Nutrient; Water environment

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220322003

http://www.yykxjz.cn/

裴泓霖, 谭八梅, 王萃, 夏兴龙, 郝振林, 丁君, 常亚青. 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 121-134

PEI H L, TAN B M, WANG L, XIA X L, HAO Z L, DING J, CHANG Y Q. Composition of the bacterial community in the sediment of ponds for culturing sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Influence of environmental factors during ice-melting period. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 121-134

# 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素\*



裴泓霖<sup>1</sup> 谭八梅<sup>1</sup> 王萃<sup>1①</sup> 夏兴龙<sup>1</sup> 郝振林<sup>1</sup> 丁君<sup>1,2</sup> 常亚青<sup>1</sup>

(1. 大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 辽宁 大连 116023;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 广东 广州 511458)

**摘要** 本研究以我国北方典型岸基半开放刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘为对象, 利用高通量测序技术构建冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 16S rRNA 基因测序文库, 解析封冰期、融冰期和化冰期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征, 并查明影响菌群结构的主导环境因子。结果显示, 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性表现为整体下调趋势, 在融冰初期呈现显著性波动( $P<0.05$ )。冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构呈现显著性差异, 封冰期、融冰期和化冰期差异菌群分别隶属于厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和软壁菌门(Tenericutes)。尽管不同阶段微生物相对丰度比例不同, 但第一优势菌门均隶属于变形菌门(Proteobacteria), 相对丰度高于49.04%; 次优势菌门则呈现出显著性变化, 其中, 封冰期为拟杆菌门(Bacteroidetes), 融冰期为绿弯菌门(Chloroflexi)和放线菌门(Actinobacteria), 化冰期为浮霉菌门(Planctomycetes)。环境因子与菌群相关性分析表明, 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构与环境因子具有显著相关性( $P<0.05$ ), 温度、盐度、总氮和总有机碳是沉积物菌群的主导环境因子。本研究将为刺参养殖池塘精细化管理提供理论依据。

**关键词** 刺参; 冻融期; 沉积物; 高通量测序; 菌群结构

**中图分类号** S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0121-14

刺参(*Apostichopus japonicus*)具有较高的经济价值, 是我国北方重要的海水养殖品种(Roggatz *et al.*, 2018)。随着刺参养殖产业的不断发展, 封闭或半封闭的池塘养殖已成为刺参增养殖的主要模式(Yuan *et al.*, 2007)。

冻融期是我国北方地区因初春气温回升导致池

塘表面冰层融化的一段特殊时期。冻融期冰层的融化使养殖池塘水体环境由封闭状态逐渐转变为对外交换状态, 由此引起养殖池塘水体出现温跃层、盐跃层和溶解氧分层等现象(Giliehinsky *et al.*, 2002)。调查显示, 冰层融化导致的池塘跃层会引起池塘底部水质恶化及病原菌暴发, 进而危害养殖生物的健康(黄华伟

\* 国家自然科学基金(31902395)、国家重点研发计划(2018YFD0901604)、大连市青年科技之星项目(2020RQ115)和南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)共同资助。

裴泓霖, E-mail: 897544591@qq.com

① 通信作者: 王萃, 副研究员, E-mail: dlouwangluo@sina.com

收稿日期: 2022-03-22, 收修改稿日期: 2022-04-14

等, 2011)。

沉积物菌群在养殖池塘生态系统中占据着重要地位, 在生态系统平衡、水质调控、养殖生物疾病防控等方面均发挥着重要作用(Deng *et al*, 2009; Michaud *et al*, 2009; Blancheton *et al*, 2013; 范立民, 2015; 姜燕等, 2022)。李步先(2015)研究表明, 从虾蟹养殖池塘沉积物中分离得到的盐单胞菌属(*Halomonas*)能改善养殖环境、有效降解养殖环境中的氨态氮、防止因氮污染滋生病原菌引起养殖生物患病, 且具有修复环境污染的功能。从刺参养殖池塘沉积物中分离得到的益生菌菌株 YQ-2 和 DY-6 能有效抑制刺参病原菌——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)的生长繁殖(杜佗等, 2017; 王金燕等, 2018)。然而, 养殖池塘生态系统极易受到外部理化因子的影响, 季节变动、营养物质输入等变化均可造成池塘养殖环境菌群种类和丰度的改变(Bentzon-Tilia *et al*, 2016; 谭八梅等, 2021)。例如, 高温条件能提高微生物体内的酶活性、提高微生物代谢水平、加速有机物分解, 进而促进养殖环境物质循环(李彬等, 2010)。水体透明度直接决定光照射入池塘水体的深度, 控制了水中微生物的光合作用强度, 进而改变养殖环境物质循环状态(龚骏等, 2013)。pH 是生物地球转换的重要调控因子, 能够通过调节菌群对水中离子和微量金属的利用率, 从而改变代谢效率(Lindstöm *et al*, 2012)。外部理化环境因子变化剧烈的冻融期是刺参健康养殖的关键时期, 但关于养殖池塘冻融期菌群结构方面的研究还鲜有报道。

因此, 本研究以中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘为对象, 利用高通量测序技术解析冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素, 旨在为刺参养殖池塘精细化管理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 采集样品

本研究选取中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘(40°37'46"N; 122°8'59"E)为对象, 利用采泥器分别采集封冰期、融冰期和化冰期同一刺参养殖池塘表层 3~5 cm 沉积物样品, 采样信息见表 1。样品装入无菌离心管中, -80 °C 冰箱冷冻保存, 用于细菌总 DNA 的提取。所有样品采自同一池塘并设置 3 个平行, 池塘面积约为 0.07 km<sup>2</sup>, 水深约为 4 m, 刺参密度约为 5 头/m<sup>2</sup>, 全年未使用微生物制剂。

表 1 样品信息

Tab.1 Sampling information

采样时期		样品信息
Sampling period		Sample information
封冰期	Icebound period	C-1、C-2、C-3
融冰期	融冰第 1 天	R1-1、R1-2、R1-3
	融冰第 3 天	R3-1、R3-2、R3-3
	融冰第 5 天	R5-1、R5-2、R5-3
化冰期	化冰第 7 天	R7-1、R7-2、R7-3
	化冰第 14 天	R14-1、R14-2、R14-3

注: 封冰期是指冰层未融化的时期; 融冰期是指冰层开始融化至冰层完全融化的时期; 化冰期是指冰层完全消失后的时期。

Note: Icebound period refer to the period when the ice does not melt. Melting period refers to the period from the beginning of melting to the complete melting of ice. Ablation period refers to the period after the complete disappearance of ice.

### 1.2 环境因子测定

采用 HACH (HQd)水质分析仪器(HACH 公司, 美国), 现场测定养殖池水的温度(*T*)、盐度(*S*)和酸碱性度(pH), 其他理化参数测定均依据中华人民共和国《海洋沉积物质量标准(GB18668-2002)》进行。沉积物总有机碳(TOC)的测定采用重铬酸钾氧化-还原容量法, 总氮(TN)采用过硫酸钾氧化法, 总磷(TP)采用钼锑抗分光光度法, 氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)采用次溴酸盐氧化法, 硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)采用镉柱还原法, 亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)采用萘乙二胺分光光度法, 磷酸盐(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P)采用磷钼蓝分光光度法, 硫化物采用亚甲基蓝分光光度法。

### 1.3 DNA 提取、扩增和测序

选用 OMEGA Soil DNA 试剂盒(D5625)提取沉积物总 DNA。提取的 DNA 用 NanoDrop2000 分光光度计检测浓度和纯度, 为确保 DNA 无降解无污染, DNA 浓度要求 ≥ 50 ng/μL, 纯度 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>=1.8~2.0。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, DNA 条带清晰且带型完整无拖尾现象, 表明所提 DNA 无蛋白质污染、无降解发生。

以细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 片段 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 805R(5'-GACTACHVGGTATCTAATCC-3')作为扩增引物进行 PCR 扩增, 使用带 barcode 的特异引物, TaKaRa 公司的 Tks Gflex DNA 聚合酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。

将上述 PCR 扩增后获得的细菌 16S rRNA 基因产物送生工生物工程(上海)股份有限公司, 采用

Illumina Miseq 2×300 bp 测序平台进行高通量测序。

#### 1.4 数据处理与分析

用 FASTP (版本 0.18.0) (Guo *et al.*, 2017) 对 Illumina 平台的原始数据进行过滤, 标准如下: 去除含有未知核苷酸(N)≥10%的 reads; 去除 phred 质量评分≤20 的碱基≥50%的 reads; 删除含接头的 reads。对低质量 tag 过滤得到 clean tag (Bokulich *et al.*, 2013)。参照 QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) 的 tags 质量控制流程。使用 UCHIME 算法(Edgar *et al.*, 2011)进行 tag 的嵌合体检查。过滤嵌合体后得到的 effective tag 进行 OTU 丰度统计和其他后续分析。选取丰度最高的 tag 序列作为每个操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)的代表序列。采用 Usearch (8.1.1831)软件, 按照序列相似性为 97%的阈值进行 OTUs 聚类。采用 Mothur (1.30.1)软件对样品序列进行  $\alpha$  多样性分析。采用 RDP Classifier (2.12)软件对样品合格序列进行物种分类操作, 阈值设置为 0.8, 低于该阈值的分类结

果被划归为 unclassified 一类。使用 R 语言(版本 2.5.3)进行环境因子相关性分析, 以明确环境因素对群落组成的影响, 获得不同水平各 rank 的丰度值。环境因素与物种之间的 Pearson 相关系数使用 R 语言 psych 包(版本 1.8.4)计算(Revelle *et al.*, 2010)。使用 SPSS19.0 软件对样本进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 环境因子监测

本研究对中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘封冰期、融冰期和化冰期沉积物环境理化因子进行监测(表 2)。结果显示, 融冰期温度和盐度呈现显著性升高( $P<0.05$ ), TOC 在融冰期第 1 天达到最高, TOC 在第 3 天开始显著下降, 至融冰期达到最低点( $P<0.05$ ), 随后保持稳定。TP、NO<sub>3</sub>-N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 含量在冻融期间呈逐渐下降的趋势。化冰后期环境因子波动较小, 温度和盐度基本保持稳定。

表 2 冻融期刺参养殖池塘沉积物环境理化因子

Tab.2 Environment factors of the sediment of ponds for culturing sea cucumber during ice-melting period

环境因子 Environmental factor	封冰期 Icebound period		融冰期 Melting period		化冰期 Ablation period	
	C	R1	R3	R5	R7	R14
底层水温 $T/^\circ\text{C}$	5.60±0.09 <sup>b</sup>	7.50±0.40 <sup>a</sup>	6.90±0.07 <sup>ab</sup>	8.30±0.21 <sup>a</sup>	8.10±0.13 <sup>a</sup>	8.00±0.10 <sup>a</sup>
盐度 $S$	28.80±2.11 <sup>b</sup>	30.80±0.52 <sup>a</sup>	33.80±0.62 <sup>a</sup>	33.20±0.74 <sup>a</sup>	31.30±0.26 <sup>a</sup>	31.30±0.13 <sup>a</sup>
溶解度 DO/(mg/L)	12.75±0.11 <sup>a</sup>	12.92±0.48 <sup>a</sup>	12.87±0.25 <sup>b</sup>	12.94±0.27 <sup>b</sup>	13.30±0.53 <sup>b</sup>	10.62±0.62 <sup>c</sup>
酸碱度 pH	7.79±0.20 <sup>a</sup>	7.79±0.15 <sup>a</sup>	7.82±0.04 <sup>a</sup>	7.85±0.11 <sup>a</sup>	7.43±0.09 <sup>a</sup>	7.74±0.03 <sup>a</sup>
总氮 TN/(mg/kg)	1.650±0.131 <sup>a</sup>	1.732±0.032 <sup>a</sup>	1.195±0.053 <sup>b</sup>	1.427±0.242 <sup>ab</sup>	1.512±0.108 <sup>ab</sup>	1.244±0.241 <sup>b</sup>
总磷 TP/(mg/kg)	0.047±0.001 <sup>a</sup>	0.033±0.000 <sup>a</sup>	0.031±0.011 <sup>a</sup>	0.003±0.000 <sup>b</sup>	0.036±0.012 <sup>a</sup>	0.024±0.044 <sup>a</sup>
氨氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/(mg/kg)	0.046±0.010 <sup>a</sup>	0.033±0.000 <sup>a</sup>	0.036±0.001 <sup>a</sup>	0.030±0.001 <sup>a</sup>	0.037±0.000 <sup>a</sup>	0.043±0.023 <sup>a</sup>
硝酸氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(mg/kg)	2.550±0.540 <sup>a</sup>	0.353±0.012 <sup>b</sup>	0.374±0.102 <sup>b</sup>	0.139±0.193 <sup>b</sup>	0.501±0.232 <sup>b</sup>	0.293±0.171 <sup>b</sup>
磷酸盐 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /(mg/kg)	1.927±0.012 <sup>a</sup>	1.164±0.071 <sup>a</sup>	1.080±0.034 <sup>a</sup>	0.239±0.143 <sup>b</sup>	0.249±0.031 <sup>b</sup>	0.196±0.011 <sup>b</sup>
硫化物 Sulfide/(mg/kg)	0.008±0.000 <sup>b</sup>	0.020±0.012 <sup>b</sup>	0.008±0.000 <sup>b</sup>	0.007±0.000 <sup>b</sup>	4.637±1.376 <sup>a</sup>	5.269±0.835 <sup>a</sup>
总有机碳 TOC/(mg/kg)	7.855±0.032 <sup>a</sup>	8.949±0.143 <sup>a</sup>	3.372±0.924 <sup>b</sup>	4.487±0.571 <sup>b</sup>	0.014±0.572 <sup>c</sup>	0.005±0.000 <sup>c</sup>
氧化还原电位 ORP/(mV)	-62±3 <sup>b</sup>	-121±7 <sup>a</sup>	-127±3 <sup>a</sup>	-93±1 <sup>ab</sup>	-95±1 <sup>ab</sup>	-101±2 <sup>ab</sup>

注: 表中数据为平均数±标准差; 同行不同字母表示不同时期的差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

Note: Data in the table are Mean±SD; Data with different superscripts in the same row are significantly different ( $P<0.05$ ).

### 2.2 高通量测序结果

冻融期不同阶段共 18 个样品所得原始测序序列为 45 106~79 040 条, 原始序列经质量控制、嵌合体和非靶区域序列去除后, 所得有效序列为 42 993~76 635 条(表 3)。

### 2.3 $\alpha$ 多样性分析

通过比较不同时期样本  $\alpha$  多样性指数得出(图 1), 刺参养殖池塘冻融期间沉积物菌群丰度和多样性呈总体下降的趋势, 融冰前期则呈显著性波动( $P<0.05$ ), 融冰后期菌群呈回升趋势, 在冰层完全消失的化冰期



表3 刺参养殖池塘沉积物菌群高通量测序结果

Tab.3 High throughput sequencing results of bacteria in the sediment of ponds for culturing sea cucumber

样品 Sample	原始序列 Original sequence	质量控后序列 Quality control sequence	非靶区序列 Not target sequence	嵌合体序列 Chimeric sequence	有效序列 Effective sequence	OTU 数目 OTU number
C-1	53 771	53 492	14	433	53 045	4 042
C-2	54 122	53 851	8	452	53 391	4 289
C-3	47 742	47 502	17	664	46 821	3 956
R1-1	66 119	65 745	17	282	65 446	3 728
R1-2	52 576	52 337	35	756	51 546	3 200
R1-3	59 108	58 705	12	1 327	57 366	4 068
R3-1	79 040	78 919	34	2 250	76 635	5 297
R3-2	64 976	64 942	28	674	64 240	4 707
R3-3	47 306	47 267	18	497	46 752	4 399
R5-1	77 450	77 336	48	2 994	74 294	4 580
R5-2	47 175	47 137	19	2 252	44 866	3 546
R5-3	68 082	67 993	15	1 883	66 095	4 313
R7-1	57 329	57 247	25	5 763	51 459	3 808
R7-2	46 641	46 596	30	3 305	43 261	3 323
R7-3	54 086	54 021	4	4 262	49 755	3 688
R14-1	45 106	45 077	7	2 077	42 993	3 751
R14-2	64 018	63 988	19	2 674	61 295	4 430
R14-3	55 559	55 508	15	1 623	53 870	3 866

菌群丰度和多样性再次下调。

#### 2.4 $\beta$ 多样性分析

在 OTU 水平上,根据加权 Unifrac 距离不同对封冰期、融冰期和化冰期样本进行主成分分析(图 2)。其中,PCA1 (principal component analysis)、PCA2 和 PCA3 的贡献率分别为 94%、2%和 1%,总贡献率为 97%。各组分样品聚集在 PCA1,显示出较好的生物学重复性。不同时期样品分布分散,说明组间群落结构存在差异。

#### 2.5 菌群结构特征分析

门水平上(图 3a),相对丰度排名前 5 的菌门分别为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)。冻融期刺参养殖池塘沉积物第一优势菌门均为变形菌门(相对丰度>49.04%)。次优势菌门存在显著性差异,其中,封冰期次优势菌门为拟杆菌门(相对丰度>6.80%),融冰期次优势菌门为绿弯菌门(Chloroflexi)和放线菌门;化冰期次优势菌门则演替为浮霉菌门。

属水平上(图 3b),封冰期优势菌属主要隶属于海泥大海球菌(*Halioglobus*)、硫卵菌属(*Sulfurovum*)、*Desulfopila*、*Lutimonas*、硫深海菌属(*Thiopfundum*);

融冰期优势菌属主要隶属于 *Sulfurovum*、*Thiopfundum*、*Desulfopila*;化冰期优势菌属主要隶属于 *Sulfurovum*、*Desulfopila*、*Thiopfundum*。值得注意的是,在冻融期间检测出刺参条件致病菌假交替单胞杆菌(*Pseudoalteromonas*) (相对丰度为 0.9%)。

线性判别法 LEfSe 分析显示(图 4),不同分类水平下共有 244 个细菌类群在冻融期存在差异。封冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌门主要隶属于厚壁菌门,其代表菌属为盐厌氧杆菌(*Halanaerobium*)和嗜盐菌属(*Halocella*)。融冰期沉积物差异菌门隶属于酸杆菌门,其代表性差异菌属分别为 GP7、GP17 和 GP26。化冰期沉积物差异菌门隶属于软壁菌门(Tenericutes),其代表性差异菌属为 *Haloplasma*。

#### 2.6 COG 功能预测分析

基于 COG 数据库(图 5),对比 25 组功能蛋白,刺参养殖池塘沉积物菌群在冻融期共有 18 组功能蛋白存在显著性差异( $P<0.05$ )。与封冰期相比,融冰期沉积物菌群在一般功能预测(general function prediction only) [R], 次生代谢物生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism) [Q], 辅酶的运输和代谢(coenzyme transport and metabolism) [H], 碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism) [G], 核苷

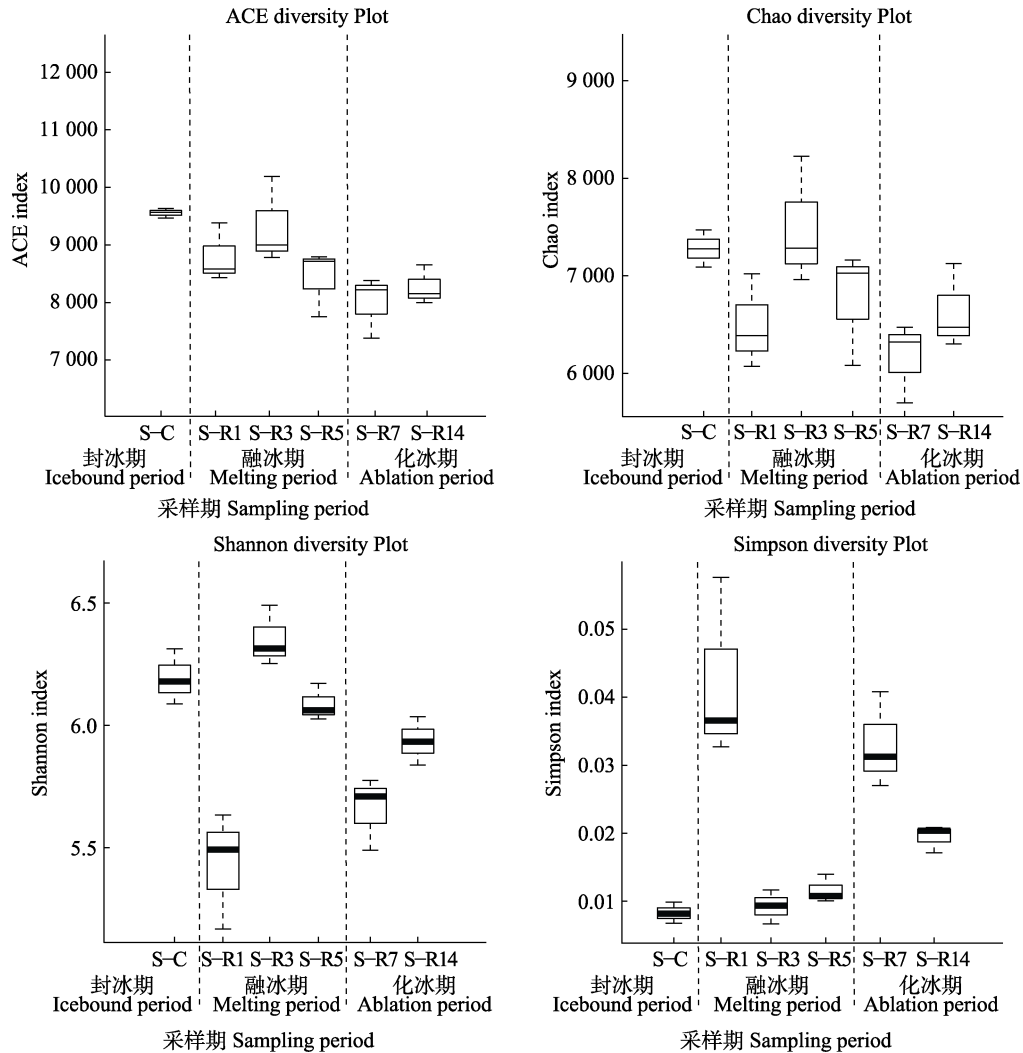


图 1 刺参养殖池塘沉积物菌群 α 多样性指数

Fig.1 α Diversity index in sea cucumber culture pond during ice-melting period

S-R1、S-R3、S-R5 分别为融冰期的第 1、3、5 天；S-R7、S-R14 分别为化冰期的第 7、14 天。

S-R1, S-R3, and S-R5 indicate the first, third and fifth day of the melting period, respectively;

S-R7 and S-R14 indicate the 7th and 14th day of the ablation period.

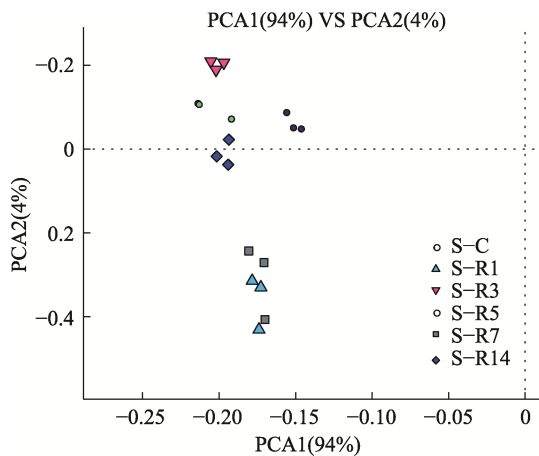


图 2 刺参养殖池塘沉积物菌群 PCA 分析图

Fig.2 PCA analysis diagram in sea cucumber culture pond during ice-melting period

酸的运输和代谢(nucleotide transport and metabolism) [F], 能量产生与转化(energy production and conversion) [C], 复制、重组和修复(replication, recombination and repair) [L], 转录(transcription) [K], 染色质结构及作用方式(chromatin structure and dynamics) [B], RNA 加工与修饰(RNA processing and modification) [A], 细胞外结构功能(extracellular structures) [W], 细胞骨架(cytoskeleton) [Z], 防御机制(defense mechanisms) [V], 信息转导机制(signal transduction mechanisms) [T], 细胞膜、细胞壁、包膜生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis) [M], 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分区(cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) [D] 16 个方面呈现出显著性上调( $P < 0.05$ )。

化冰期, 沉积物菌群在染色质结构及作用方式(chromatin structure and dynamics) [B], RNA 加工与修饰(RNA processing and modification) [A], 碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism) [G], 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分区(cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) [D], 细胞外结构功能(extracellular structures) [W], 信息转导机制(signal transduction mechanisms) [T], 一般功能预测(general function prediction only) [R], 转录(transcription) [K], 次生代谢物生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism) [Q] 9 组功能蛋白中表现为显著性下调( $P < 0.05$ )。

## 2.7 菌群结构与环境因子相关性分析

冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群与环境因子

CCA 分析结果见图 6。如图 6 所示, 封冰期刺参养殖池塘沉积物菌群单独聚为一类, 融冰期和化冰期沉积物菌群则聚为另一类。根据环境因子箭头与原点连线的长度可知, 刺参养殖池塘沉积物菌群排名前 4 的主导环境因子分别为温度、盐度、TN 和 TOC。其中, 温度和盐度与封冰期沉积物菌群呈负相关, 与融冰期沉积物菌群呈正相关。TOC 和 TN 与封冰期沉积物菌群相对丰度呈正相关。

冻融期刺参养殖池塘沉积物优势菌门与主导环境因子间相关性分析结果见表 4。其中, 拟杆菌门与盐度呈极显著负相关( $P < 0.001$ ), 表明拟杆菌门受沉积物盐度影响较大。绿弯菌门与温度和盐度呈极显著正相关( $P < 0.001$ ), 与 TOC 含量呈极显著负相关( $P < 0.001$ )。浮霉菌门与温度和盐度等环境因子均未表现出显著相关性( $P > 0.05$ )。放线菌门与盐度呈极显著正相关( $P < 0.01$ ), 与 TOC 含量呈极显著负相关( $P < 0.01$ )。

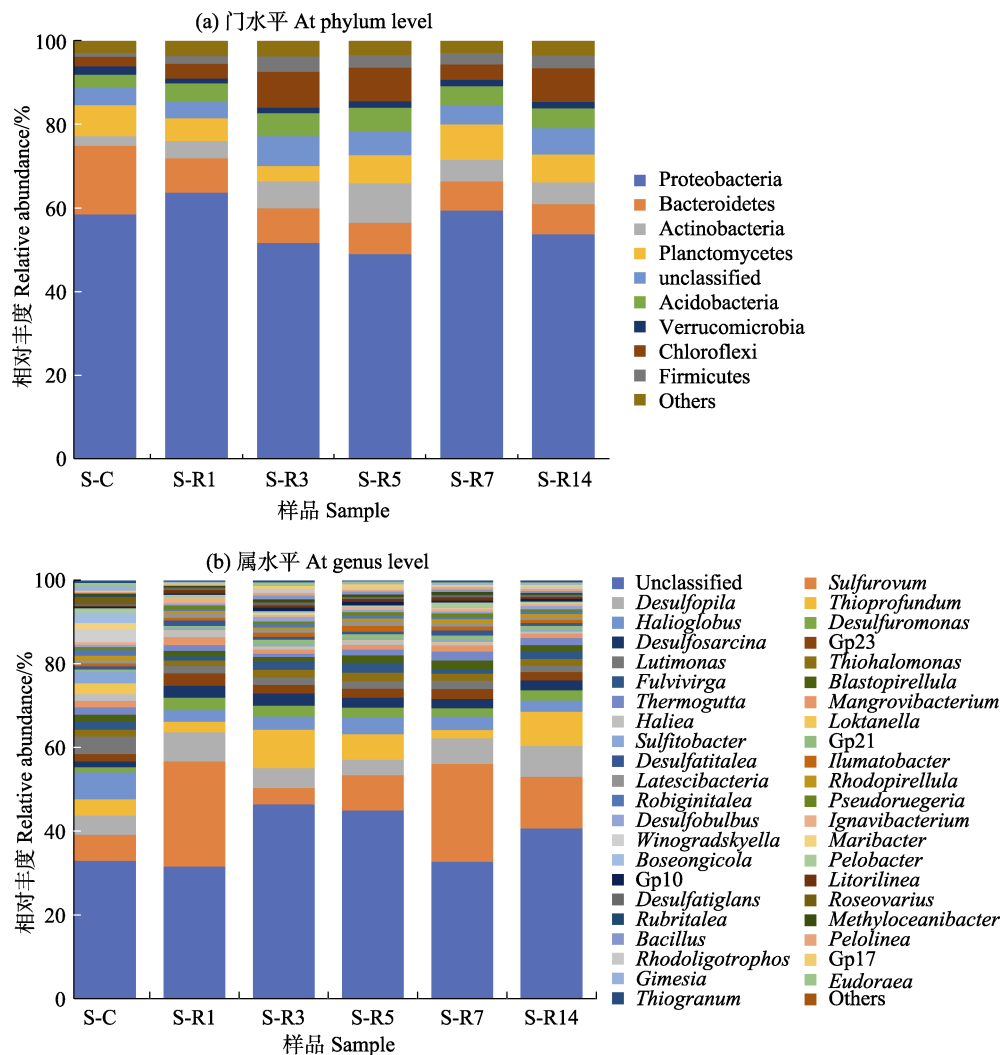


图 3 沉积物菌群结构相对丰度图

Fig.3 Relative abundance of sediment bacterial community

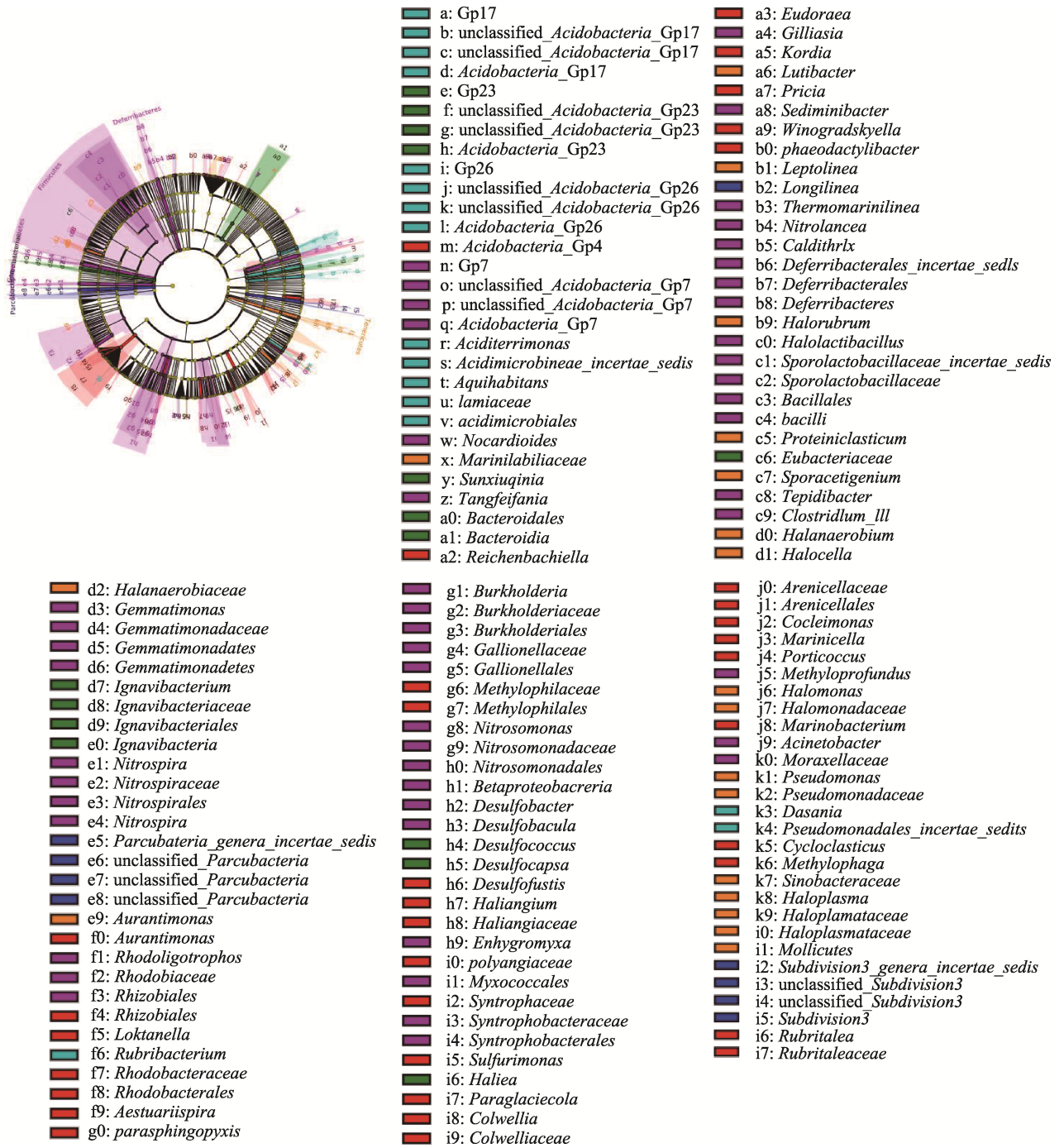


图 4 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 LEfSe 分析

Fig.4 LEfSe analysis of the sediment bacterial community in sea cucumber culture pond during ice-melting period

### 3 讨论

#### 3.1 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性

微生物作为养殖池塘生态系统的生产者和分解者,在生态系统物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用(Langenheder *et al*, 2006; Adams *et al*, 2010; 金笑等, 2017)。菌群生长繁殖所需的营养物质主要依靠环境中的无机盐和有机物,其群落组成对环境因子

的变化有较强的敏感性(王轶南等, 2010; Bell *et al*, 2013; 李建光等, 2014; Yang *et al*, 2015; Amabebe *et al*, 2020)。本研究表明,冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性总体呈下调趋势,但融冰初期则出现显著波动。相较于封冰期,温跃层及盐跃层的出现引起底部水层环境因子发生剧烈变化(姜森颖等, 2015)。温度的升高为更多微生物提供了适宜的生境,能加速酶促反应,进而促进微生物代谢(Tang *et al*,

2014; Cardona *et al.*, 2016), 造成融冰初期菌群丰度及多样性上调。同时, 盐度作为海水养殖中的重要环境因素, 能干扰水体微生物新陈代谢, 影响沉积物中微生物的多样性(Jackson *et al.*, 2009)。倪蒙等(2019)对不同盐度罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)养殖池塘调查显示, 高盐度组菌群丰度与多样性显著高于低盐度组。环境因子的大幅改变, 破坏了封冰期沉积物

原有的菌群结构, 引起冻融期微生物丰度和多样性出现波动, 随着气温回升, 养殖环境温度和盐度变化趋势减小, 养殖池塘环境因子和菌群结构也趋于稳定。

相比于融冰期, 化冰期菌群丰度及多样性呈下调趋势。微生物能通过碳循环获取能量, 而有机碳作为环境中碳源的指标之一, 能在一定程度上反映环境微生物丰度。李谷等(2013)对养殖池塘群落的碳源代谢

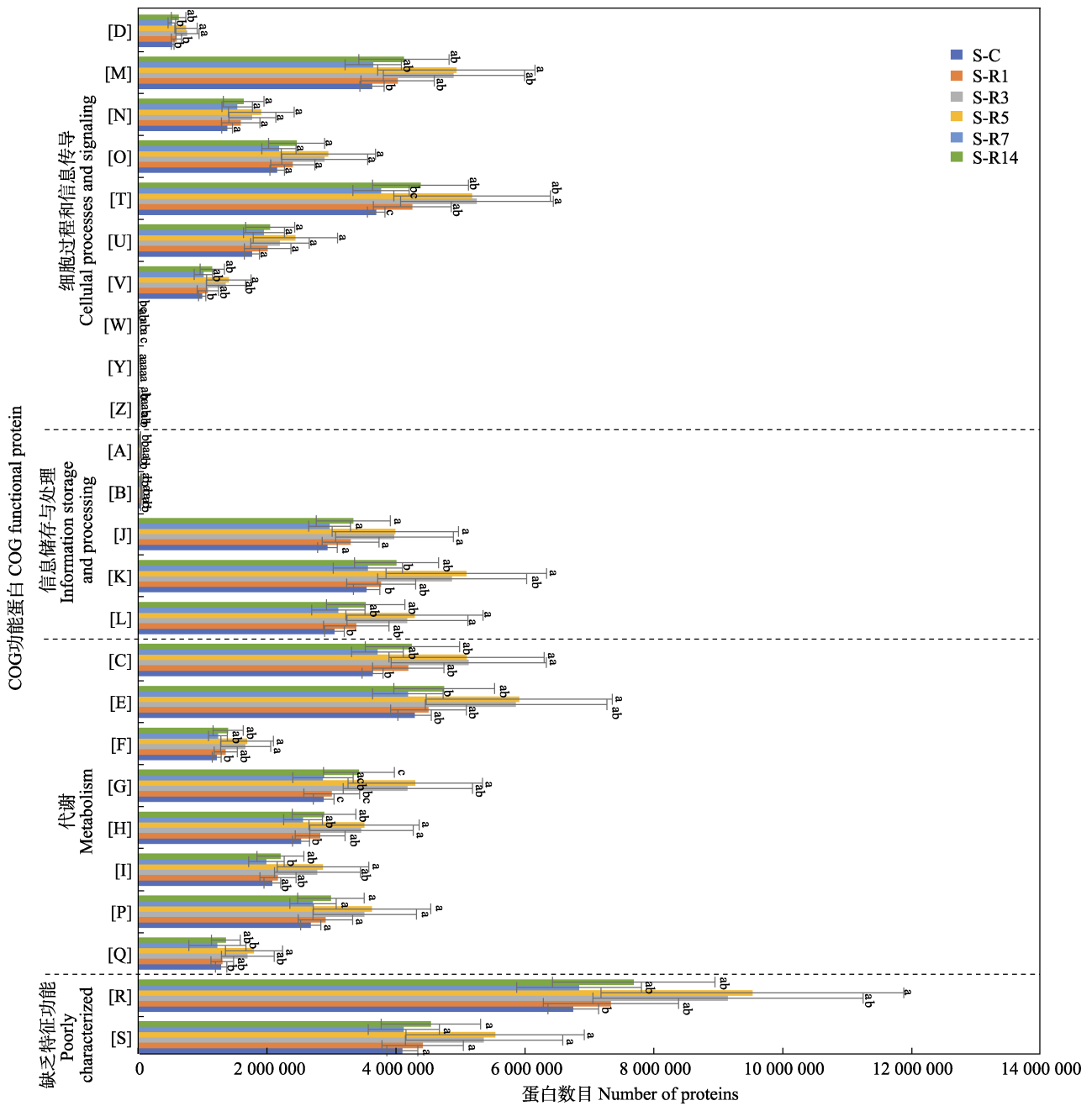


图5 基于 COG 数据库注释沉积物菌群功能

Fig.5 Function abundances of sediment bacterial based on COG database

同一组中上标不同字母表示平均值间差异显著( $P < 0.05$ ), 各组上标相同字母表示组间差异不显著( $P > 0.05$ )。

In the same group, there is a significant difference between the mean values indicated by different superscripts ( $P < 0.05$ ), while there is no significant difference between groups indicated by the same superscripts ( $P > 0.05$ ).



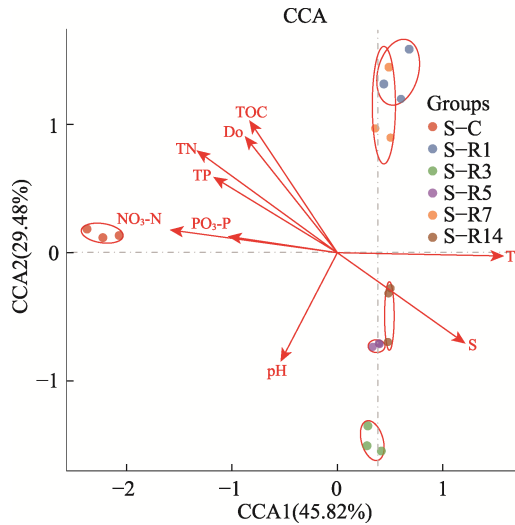


图 6 沉积物菌群与环境因子 CCA 分析图

Fig.6 CCA analysis of sediment bacterial community and environmental factors

特性和功能多样性进行调查,发现养殖池塘水体微生物群落对不同碳源有不同程度的利用。高浓度有机碳更适合微生物大量繁殖栖息(Ram *et al*, 1982)。本研究中,化冰期沉积物 TOC 含量显著下降(仅为 0.014 mg/kg)。TOC 含量过低抑制了微生物的生长繁殖,进而限制了微生物的丰度及其多样性,可能是引起化冰期微生物丰度及多样性出现下调的原因。

### 3.2 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征及其影响因素

本研究中,冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构呈现显著的演替特征,但变形菌门始终为冻融期沉积物第一优势菌门。变形菌门作为刺参养殖池塘丰度最高的菌群(丁斯予等, 2019; 任利华等, 2015; 窦妍等, 2016), 主要是由其在原核生物分子生物学分类中的绝对优势所决定的(Gupta, 2000)。August 等(2009)研究表明,  $\alpha$ -变形菌纲通过光合作用储存能量,用于生长代谢、CO<sub>2</sub> 和 N 的固定。厌氧条件下,一些  $\gamma$ -变形菌可以和厌氧环境中的动物产生共生关系,对环境中的 C、N 和 S 循环起着重要作用(Olav *et al*, 1989; Bakunina *et al*, 2000; Manzoni *et al*, 2008)。

此外,不同时期菌群存在显著性差异,且各时期差异菌群与其生境环境因子之间显著相关。闫法军等(2014)研究表明,微生物作为生境的反映,与环境理化性质密切相关且相互限制影响。其中,封冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌以厚壁菌门为代表。厚壁菌门可以形成抗逆性芽孢,具有极强的环境适应性,温度越低,厚壁菌门的相对丰度越大(宋兆齐等, 2015, 与封冰期的低温条件相符。酸杆菌门作为融冰期特异性菌群的代表,与 pH 值密切相关。Jones 等(2009)对北美和南美的共 87 个土壤样品大尺度分析发现,酸杆

表 4 沉积物优势菌群与主导环境因子相关性分析

Tab.4 Correlation analysis between dominant bacterial community and environment factors in sediment

优势菌群 Dominant bacterial community	环境因子 Environment factors					
	温度 <i>T</i>	总氮 TN	盐度 <i>S</i>	总有机碳 TOC	硫化物 Sulfide	酸碱度 pH
拟杆菌门 Bacteroidetes	-0.515**	0.375*	-0.634***	0.452*	-0.120	0.341
绿弯菌门 Chloroflexi	0.596***	-0.550**	0.607***	-0.668***	0.453*	0.241
浮霉菌门 Planctomycetes	-0.040	0.221	0.845	0.062	-0.151	-0.251
放线菌门 Actinobacteria	0.425*	-0.299	0.550**	-0.494**	0.194	-0.016

注: 同列中标有\*\*\*表示差异极显著( $P < 0.001$ ); \*\*表示差异显著( $P < 0.01$ ); \*表示差异显著( $0.01 < P < 0.05$ ); 无标注则为差异不显著( $P > 0.05$ )。

Note: In the same column, \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P < 0.001$ ), \*\* indicates highly significant difference ( $P < 0.01$ ), \* indicates significant difference ( $0.01 < P < 0.05$ ), and no marked indicates no significant difference ( $P > 0.05$ ).

菌门中的 GP7 和 GP17 相对丰度与 pH 呈显著正相关关系。结合环境因子数据,与融冰期沉积物较高 pH 条件相符。化冰期刺参养殖池塘沉积物差异菌以软壁菌门为代表,而目前有关于软壁菌门的研究还鲜有报道。值得注意的是,冻融期间刺参养殖池塘沉积物中发现假交替单胞杆菌,相对丰度为 0.9%,该菌是刺参腐皮综合征的主要致病菌(李强等, 2013),发病时的死亡率可达 90%。因此,冻融期养殖环境管理十

分重要,建议定期向水中投放水质改良剂,防止水质恶化。同时加入免疫增强剂促进诱发宿主防御反应,增强刺参抗病能力。

### 3.3 冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群 COG 功能分析

微生物参与多种物质循环,与次生代谢物生物合成、运输和分解代谢、碳水化合物运输和代谢、能量产生与转化、转录、RNA 加工与修饰等功能息息

相关(Rungrassamee *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2016)。放线菌门与绿弯菌门作为融冰期的两大优势菌门与该时期 COG 功能蛋白的上调具有一定相关性。放线菌门具有降解淀粉和蛋白质等大分子的功能,在氮磷循环、有机物降解及矿化过程中也具有重要作用,其发酵产物能抗菌抗病毒,能够抑制部分革兰氏阳性菌发挥功能(李文均等, 2002; 凌春耀等, 2020; Bull *et al.*, 2005)。绿弯菌门营养方式和代谢途径十分丰富,是 C、N、S 等元素的生物地球化学循环的重要参与者(鲜文东等, 2020), 如 CO<sub>2</sub> 固定、CO、CH<sub>4</sub>、NO<sub>2</sub> 氧化及纤维素等大分子的降解,这些功能与碳水化合物的运输和代谢、能量产生与转化等功能息息相关。其部分次级代谢产物具有高效的细胞毒性和抗菌作用,具有成为益生菌的潜力(Nett *et al.*, 2006)。这些优势菌群功能与 COG 蛋白中次生代谢物合成、运输和分解代谢、碳水化合物的运输代谢、能量产生与转化等功能相吻合,说明冻融期独特的优势菌门可能是其功能蛋白显著上调的原因。开展冻融期沉积物菌群 COG 功能分析,能够反映出菌群整体代谢水平及其生理偏向。

#### 4 结论

本研究利用高通量测序技术首次探究冻融期刺参养殖池塘沉积物菌群结构和功能的演替特征,并查明影响沉积物菌群结构的主导环境因子。研究表明,环境因子改变不利于养殖池塘沉积物菌群结构的稳定,易导致潜在致病菌增殖,加大养殖生物患病风险。因此,在养殖过程中应注重融冰期养殖池塘环境的管理,避免水质恶化与病害暴发。

#### 参 考 文 献

- ADAMS H E, CRUMP B C, KLING G W. Temperature controls on aquatic bacterial production and community dynamics in arctic lakes and streams. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1319–1333
- AMABEBE E, ROBERT F O, AGBALALAH T. *et al.* Microbial dysbiosis-induced obesity role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *British Journal of Nutrition*, 2020, 123(10): 1127–1137
- AUGUET J C, BARBERAN A, CASAMAYOR E O. Global ecological patterns in uncultured archaea. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 4(2): 182–190
- BAKUNINA I, SHEVCHENKO L S, NEDASHKOVSKAIA O I, *et al.* Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases. *Mikrobiologiya*, 2000, 69(3): 370–376
- BELL T H, YERGEAU E, MAYNARD C, *et al.* Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(6): 1200–1210
- BENTZON-TILIA M, SONNENSCHNEIN E C, GRAM L. Monitoring and managing microbes in aquaculture-towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(5): 576–584
- BLANCHETON J P, ATTRAMADAL K J K, MICHAUD L, *et al.* Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*, 2013, 53: 30–39
- BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57–59
- BULL A T, STACH J E M, WARD A C, *et al.* Marine actinobacteria: Perspectives challenges future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 65–79
- CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336
- CARDONA E, GURGUEN Y, MAGRÉ K, *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 157
- DENG H, HE C B, ZHOU Z C, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009, 287(1/2): 18–27
- DING S Y, WANG L, XU H C, *et al.* Bacterial community structure and function in the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 210–220 [丁斯予, 王萃, 徐翰晨, 等. 刺参肠道及养殖环境菌群结构与功能. *生态学杂志*, 2019, 38(1): 210–220]
- DOU Y, ZHAO X W, DING J, *et al.* Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 122–129]
- DU T, LI B, WANG Y G, *et al.* Screening and characteristic analysis of potential probiotics from large water ponds used for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 180–187 [杜佺, 李彬, 王印庚, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特性分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 180–187]
- EDGAR R C, HASS B J, CLEMENTE J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194–2200

- FAN L M. Microbial community in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultural ponds. Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 [范立民. 吉富罗非鱼养殖池塘微生物群落研究. 南京农业大学博士研究生学位论文, 2015]
- GILIEHINSKY D A. Permafrost model of extraterrestrial habitat. *Astrobiology*, 2002, 125–142
- GONG J, ZHANG X L. Contribution and mechanism of microbe-driving nitrogen cycling processes in coastal ecosystems. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 44–58 [龚骏, 张晓黎. 微生物在近海氮循环过程的贡献与驱动机制. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 44–58]
- GUPTA R S. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 367–402
- HUANG H W, WANG Y G, CHEN X, *et al.* Relationship between the occurrence of rotten skin syndrome and environmental factors in cultured *Apostichopus japonicus* at low temperature. *Fisheries Science and Technology Information*, 2011, 38(6): 292–297 [黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 低温期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. *水产科技情报*, 2011, 38(6): 292–297]
- JACKSON C, VALLAIRE S. Effects of salinity and nutrients on microbial assemblages in Louisiana wetland sediments. *Wetlands*, 2009, 29(1): 277–287
- JIANG S H, LIU S F, CAI X, *et al.* Annual variation characteristics of main ecological factors in the culture ponds of *Apostichopus japonicus* Selenka. *Fishery Modernization*, 2015, 42(5): 1–7 [姜森颖, 刘双凤, 蔡勋. 刺参养殖池塘主要生态因子周年变化特征. *渔业现代化*, 2015, 42(5): 1–7]
- JIANG Y, LI C Y, XU Y J, *et al.* Responses of microbiota structure in the intestinal tract and pond culture environment of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to probiotics. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 137–146 [姜燕, 李存玉, 徐永江, 等. 池塘养殖牙鲆肠道和环境菌群结构对益生菌制剂的响应. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 137–146]
- JIN X, KOU W B, YU H T, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Poyang Lake. *Research of Environmental Sciences*, 2017, 30(4): 529–536 [金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 鄱阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系. *环境科学研究*, 2017, 30(4): 529–536]
- JONES R T, ROBESON M S, LAUBER C L, *et al.* A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, 2009, 3: 442–453
- LANGENHEDER S, LINDSTROM E S, TRANVIK L J. Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 212–220
- LI B X. A primary study on isolation, screening and removal characteristics of probiotics in ponds of shrimp and crab. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [李步先. 虾蟹养殖池塘益生菌的分离筛选及降解特性初步分析研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LI B, RONG X J, LIAO M J, *et al.* Bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter. *Marine Sciences*, 2010, 34(4): 64–69 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究. *海洋科学*, 2010, 34(4): 64–69]
- LI G, SONG J H, LI X L, *et al.* Metabolic characteristics and functional diversity of carbon source in microflora of ponds with recirculating aquaculture system. *Agricultural Science and Technology*, 2014, 15(2): 278–282, 299 [李谷, 宋景华, 李晓莉, 等. 循环水养殖池塘微生物群落的碳源代谢特性和功能多样性研究. *农业科学与技术(英文版)*, 2014, 15(2): 278–282, 299]
- LI J G, XU Y P, LI X Y, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different culture seasons. *Fisheries Science*, 2014, 33(9): 562–568 [李建光, 徐永平, 李晓宇, 等. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. *水产科学*, 2014, 33(9): 562–568]
- LI Q, SUN K T, ZHANG X Y, *et al.* Research progress on “skin ulceration syndrome” of *Apostichopus japonica*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(6): 40–45 [李强, 孙康泰, 张显昱. 刺参“腐皮综合征”研究进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 40–45]
- LI W J, ZHANG Z Z, JIANG C L. The advance on taxonomic of genus *Thermoactinomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 759–763 [李文均, 张忠泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展. *微生物学报*, 2002, 42(6): 759–763]
- LIN C Y, HUANG H B, GAO C H, *et al.* Antibacterial anthracimycins from *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 isolated from Ascidian. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(3): 7–14 [凌春耀, 黄洪波, 高程海, 等. 海鞘来源放线菌 *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 中 anthracimycin 类化合物及其抗菌活性研究. *中国海洋药物*, 2020, 39(3): 7–14]
- LINDSTÖM E S, LANGENHEDER S. Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(1): 1–9
- MANZONI S, JACKSON R B, TROFYMOW J A, *et al.* The global stoichiometry of litter nitrogen mineralization. *Science*, 2008, 321(5889): 684–686
- MICHAUD L, LO GIUDICE A, TROUSSELLIER M, *et al.* Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(6): 1935–1946

- NETT M, EROL Ö, KEHRAUS S, *et al.* Siphonazole, an unusual metabolite from *Herpetosiphon* sp. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(23): 3863–3867
- NI M, GAO Q, YUAN J L, *et al.* Effect of salinity on the water quality and microbial community structure of the water for young *Macrobrachium rosenbergii* rearing. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(5): 976–985 [倪蒙, 高强, 原居林, 等. 不同盐度罗氏沼虾育苗水体水质及微生物群落结构研究. *江西农业大学学报*, 2019, 41(5): 976–985]
- OLAV V, OLSEN Y. Chemical composition and phosphate uptake kinetics of limnetic bacterial communities cultured in chemostats under phosphorus limitation. *Limnology and Oceanography*, 1989, 34(5): 939–946
- RAM N M, ZUR O, AVNIMELECH Y. Microbial changes occurring at the sediment-water interface in an intensively stocked and fed fish pond. *Aquaculture*, 1982, 27(1): 63–72
- REN L H, LI B, SUN G H, *et al.* Structure of bacterial community in biofloc from *Apostichopus japonicus* breeding ponds revealed by 16S rRNA clone library. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 197–205 [任利华, 李斌, 孙国华, 等. 16S rDNA 克隆文库解析仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 苗种培育池中生物絮团的细菌群落结构. *海洋与湖沼*, 2015, 46(1): 197–205]
- REVELLE W, REYELLE M W. Package ‘psych’. The Comprehensive R Archive Network, 2010
- ROGGATZ C C, GONZÁLEZ-WANGÜEMERT M, PEREIRA H, *et al.* A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research*, 2018, 32(1): 116–120
- RUNGRASSAMEE W, KLANCHUI A, MAIBUNKAEW S, *et al.* Bacterial dynamics in intestines of black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 12–19
- SONG Z Q, WANG L, LIU X H, *et al.* Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet. *Biotechnology*, 2015, 25(5): 481–486, 436 [宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性. *生物技术*, 2015, 25(5): 481–487, 436]
- TAN B M, WANG L, PEI H L, *et al.* The seasonal structural and functional characteristics of bacterial community in *Apostichopus japonicus* culture pond water. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 77–88 [谭八梅, 王萃, 裴泓霖, 等. 不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征研究. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 77–88]
- TANG Y Y, TAO P Y, TIAN J G, *et al.* Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8): 13663–13680
- WANG J Y, LI B, WANG Y G, *et al.* Screening and characteristic analysis of *Bacillus velezensis* from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 567–575 [王金燕, 李彬, 王印庚, 等. 刺参养殖池塘一株贝莱斯芽孢杆菌的分离及其生理特性. *中国水产科学*, 2018, 25(3): 567–575]
- WANG Y N, ZHU S W, CHANG Y Q, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 119–122 [王轶南, 朱世伟, 常亚青, 等. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 119–122]
- XIAN W D, ZHANG X T, LI W J, *et al.* Research status and prospect on bacterial phylum *Chloroflexi*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1801–1820 [鲜文东, 张潇橦, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望. *微生物技术与生态理论*, 2020, 60(9): 1801–1820]
- XIONG J B, DAI W F, LI C H. Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: The guidelines from an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 6947–6954
- YAN F J, TIAN X L, DONG S L, *et al.* Seasonal variation of functional diversity of aquatic microbial community in *Apostichopus japonicus* cultural pond. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(5): 1499–1505 [闫法军, 田相利, 董双林, 等. 刺参养殖池塘水体微生物群落功能多样性的季节变化. *应用生态学报*, 2014, 25(5): 1499–1505]
- YANG Y Y, WANG Z, HE T, *et al.* Sediment bacterial communities associated with anaerobic biodegradation of bisphenol A. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 97–104
- YUAN X T, YANG H S, WANG L L, *et al.* Effects of aestivation on the energy budget of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(8): 3155–3161

## Composition of the Bacterial Community in the Sediment of Ponds for Culturing Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*): Influence of Environmental Factors During Ice-Melting Period

PEI Honglin<sup>1</sup>, TAN Bamei<sup>1</sup>, WANG Luo<sup>1①</sup>, XIA Xinglong<sup>1</sup>,  
HAO Zhenlin<sup>1</sup>, DING Jun<sup>1,2</sup>, CHANG Yaqing<sup>1</sup>

(1. Dalian Ocean University, Agriculture Department Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Dalian 116023, China; 2. Guangdong Provincial Laboratory of Southern Marine Science and Engineering (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

**Abstract** The sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) has high economic value and is one of the important mariculture species in northern China. With the continuous development of aquaculture industry, closed or semiclosed pond aquaculture has become the main sea cucumber culture method. The ice-melting period is a special period when the ice on the pond surface melts due to the temperature rise in early spring in northern China. During this period, the ice-melting layer gradually changes the water environment of pond aquaculture from a closed state to external exchange state, resulting in the formation of thermocline and halocline areas and dissolved oxygen stratification in pond aquaculture waters. Some investigations have shown that the thermocline of pond water caused by ice-melting will cause the deterioration of water quality at the bottom of the pond and the outbreak of pathogenic bacteria, which will endanger the health of cultured organisms. Microorganisms are an important part of the pond aquaculture ecosystem. They play an important role in the ecosystem's material circulation and energy flow and are significant to maintaining its balance. As an important part of the pond aquaculture ecosystem, sediment bacteria not only play a great role in the material circulation and energy flow processes but correlate with the growth, digestion, immunity, and diseases of aquaculture organisms. However, external physical and chemical factors easily affect the pond aquaculture ecosystem's bacterial structure. Seasonal changes and nutrient input can modulate the species and abundance of bacteria in the pond aquaculture environment, and indirectly affect the growth and health of aquaculture organisms. In recent years, investigations have been carried out on the bacterial community structure in ponds water and sediment. Nonetheless, only few reports comprise the structure and function of the bacterial community during the ice-melting period. Therefore, it is of great theoretical and practical significance to study the structural and functional characteristics of the sea cucumber sediment bacterial community in the pond aquaculture during the ice-melting period. Therefore, this study used the typical shore-based semi-open sea cucumber pond culture in northern China as its research object. A 16S rRNA sequencing library was constructed based on the sediment bacterial community during the icebound, melting, and ablation periods and analyzed using high-throughput sequencing technology. These sequences were used to evaluate the structural characteristics of these bacterial communities and identify the dominant environmental factors affecting them. The results showed that the abundance and diversity of sediment bacterial

① Corresponding author: WANG Luo, E-mail: dlouwangluo@sina.com



communities showed an overall downward trend in the ice melting period, fluctuating significantly in the early stage of ice-melting ( $P<0.05$ ). Compared with the icebound period, the appearance of thermocline and halocline caused drastic changes in the environmental factors of the bottom water layer. The temperature increase provides a suitable habitat for more microorganisms, accelerating enzymatic reactions and promoting microbial metabolism, which results in the up-regulation of bacteria abundance and diversity in the early melting period. As an important environmental factor in mariculture, salinity can interfere with the metabolism of microorganisms in the water and affect its diversity in sediments. This investigation showed that the bacterial community abundance and diversity in high-salinity conditions were significantly higher than those in low salinity. The substantial changes in the environmental factors destroyed the original sediment bacterial structure during the icebound period, resulting in microbial abundance and diversity fluctuation during the ice-melting period. With the gradual disappearance of the thermocline and salt layers, the pond aquaculture's environmental factors and bacterial structure tended to be stable. In the ice-melting period, there were significant differences in the structure of sediment bacteria. The differential bacterial communities in the icebound, melting, and ablation periods were Firmicutes, Acidobacteria, and Tenericutes, respectively. Although the relative abundance ratio of microorganisms in different stages is distinct, the first dominant bacteria belong to Proteobacteria, and the relative abundance is higher than 49.04%. The secondary dominant bacteria included Bacteroides in the icebound period, Chloroflexi and Actinobacteria in the melting period, and Planctomycetes in the ablation period. The environmental factors and bacterial community structure showed significant correlation in the sea cucumber culture pond during the ice-melting period ( $P<0.05$ ). Temperature, salinity, total nitrogen, and total organic carbon were the dominant environmental factors affecting sediment bacteria. This study will provide a theoretical basis for effectively managing sea cucumber pond aquaculture.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Ice-melting period; Sediment; High-throughput sequencing; Bacterial community

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220323001

http://www.yykxjz.cn/

马骞, 吴雨薇, 王刘永, 赵晓龙, 周启苓, 陈刚, 黄建盛. 军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 135-144

MA Q, WU Y W, WANG L Y, ZHAO X L, ZHOU Q L, CHEN G, HUANG J S. Screening and characterization of polymorphic SSR markers based on whole genome sequencing of cobia (*Rachycentron canadum*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 135-144

# 军曹鱼全基因组微卫星特征分析与多态性标记的筛选及应用\*



马骞<sup>1,2</sup> 吴雨薇<sup>1</sup> 王刘永<sup>1</sup> 赵晓龙<sup>1</sup> 周启苓<sup>1</sup> 陈刚<sup>1,2①</sup> 黄建盛<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524025;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江) 广东 湛江 524025)

**摘要** 为更好地开发军曹鱼(*Rachycentron canadum*)高多态性微卫星分子标记,本研究基于军曹鱼全基因组测序结果,利用MISA1.0软件对其简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)的位点信息进行检索及分析。结果显示,基因组中共筛选出1~6个核苷酸为重复单元的SSR位点344 820个,其中,以单核苷酸重复序列最多(174 146个),占SSR总数的50.50%;其次为二核苷酸重复和三核苷酸重复序列,分别占SSR总数的30.23%和14.02%。在SSR包含的重复单元中,单核苷酸重复以A/T类型为主,AC/GT是二核苷酸的优势重复单元类型。军曹鱼基因组SSR核心序列重复次数在4~275次范围内波动,单核苷酸SSR重复数为10的最多,二核苷酸SSR重复次数为6的最多。本研究设置长度≥12 bp为筛选高多态性SSR位点的标准,共获得361 684个位点。在上述位点中随机选取100个候选位点进行基因分型检测,利用从中筛选到多态性较高的10个SSR标记分别对北海、陵水、硇洲、徐闻和三亚5个养殖群体进行遗传多样性分析,145尾个体中共检测到69个等位基因,观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )和多态信息含量(PIC)平均值分别为0.628、0.706和0.653。相关研究表明,军曹鱼基因组中SSR位点类型较为丰富、多态性潜能较高,从中筛选获得的多态性SSR标记可为军曹鱼分子标记辅助育种、群体遗传多样性评价等研究提供有力支持。

**关键词** 军曹鱼; 基因组; SSR; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0135-10

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)俗称海鲷、海龙,是大型肉食性暖水鱼类,主要分布于印度洋、西太平洋和大西洋沿岸,在我国的南海、东海及黄海均有分布(勾效伟等, 2007)。军曹鱼因其肉质细嫩、味道鲜美、营养价值高而深受消费者喜爱;其在营养成分上富含多种不饱和脂肪酸及微量元素,具有一定的药用

价值;加之军曹鱼具有生长速度快、抗病力强等优点,因而成为我国最具养殖前景的海水鱼类之一(李刘冬等, 2002)。近年来,国内外学者针对军曹鱼的生长发育特征(邝杰华等, 2021; 毛非凡等, 2022)、繁殖生物学特征(邝杰华等, 2021)、营养需求(麻永财等, 2012)、人工繁育及苗种培育(陈刚等, 2004; 刘海娟等, 2012)

\* 广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022)、广东省大学生创新创业训练计划项目(S202110566012)、现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)和南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)(ZJW-2019-06)共同资助。马骞, E-mail: maq@gdou.edu.cn

① 通信作者: 陈刚, 教授, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

收稿日期: 2022-03-23, 收修改稿日期: 2022-04-28

等开展了大量研究。目前,关于军曹鱼遗传多样性水平的研究报道较少。王中锋等(2010、2011)利用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记和扩增片段长度多态分析技术(AFLP)对军曹鱼养殖群体的遗传多样性分析显示,选取的各养殖群体遗传多样性水平较高,其群体遗传分化水平与野生群体差异不大。李伟强等(2020)利用 12 个 SSR 标记对广东、海南等 5 个军曹鱼养殖群体的遗传多样性分析结果显示,各群体的遗传多样性水平较 10 年前均有所下降。由此推测,长期人工繁育可能会导致军曹鱼不同养殖群体间基因交流减少,群体遗传多样性水平降低。因此,加强军曹鱼种质资源保护与利用,对于其增养殖业的健康发展具有重要意义。

SSR 分子标记也称为微卫星 DNA 序列标记,其最常见的重复单元类型为 1~6 个核苷酸重复排列(赵相艳, 2014)。SSR 在真核生物基因组中广泛分布(罗文永等, 2003),鱼类基因组中绝大多数 SSR 位于非编码区,但也有少数 SSR 位于编码区附近,甚至编码区内(李红梅, 2014)。SSR 具有数量多、分布广、易检测且符合孟德尔遗传等特点,目前已被广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱构建、物种及亲缘关系鉴定等研究(罗文永等, 2003; 李红梅, 2014; 赵相艳, 2014)。SSR 分子标记的开发对于海水鱼类种质资源保护利用及分子辅助育种等工作的开展具有重要意义。然而,目前已发表军曹鱼 SSR 标记的数量十分有限,亟需开发筛选更多的多态性标记。

相较于传统的文库法、富集法等 SSR 开发方法,基于高通量测序数据批量开发 SSR 标记这一研究策略已在大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(李红梅, 2014)、黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)(吴仁协等, 2019)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)(郭显嵩等, 2011)等多种鱼类中获得广泛应用。本研究在军曹鱼 Illumina HiSeq X Ten 及 PacBio Sequel 测序平台测序获得数据信息的基础上,利用 MicroSatellite (MISA)软件从基因组测序结果中查找 SSR 位点,并对其分布、数量、组成特征等进行分析;利用从中开发的多态性 SSR 标记用于养殖群体的遗传多样性分析。筛选获得的 SSR 标记可用于军曹鱼群体遗传结构分析、重要性状 QTL 定位和良种选育等研究,以期为军曹鱼增养殖业的健康发展提供有效技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

基因组测序用军曹鱼取自北部湾养殖群体,剪取

其背部肌肉,置于 95%的乙醇中储存,用于军曹鱼基因组 DNA 的提取。

军曹鱼样品为北海养殖群体(RC-BH) 30 尾、陵水养殖群体(RC-LS)30 尾、硃洲养殖群体(RC-NZ) 30 尾、徐闻养殖群体(RC-XW) 20 尾和三亚养殖群体(RC-SY) 35 尾,共 145 尾。剪取少量尾鳍保存在 95%的乙醇中,于-40 °C 储存,用于基因组 DNA 提取。

### 1.2 全基因组数据来源

军曹鱼基因测序由武汉菲沙基因信息有限公司完成,基因组大小为 575.35 Mb,原始数据已上传至 NCBI (登录号 PRJNA634421)。

### 1.3 SSR 序列搜索及筛选标准

利用 MISA1.0 软件对军曹鱼全基因组序列进行分析,并对基因组单链 DNA 上 SSR 序列的数量和种类进行统计。SSR 位点的选择及筛选参数设置参照其他鱼类基因组 SSR 特征分析结果及筛选依据(段永楠等, 2019; 王耀嵘等, 2020; 黄纬杰等, 2022),选取单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复;通过设定筛选标准为单核苷酸重复单元的重复次数至少 10 次,二核苷酸重复至少 6 次,三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复次数至少 4 次,以筛选多态性 SSR 位点。

### 1.4 多态性 SSR 标记的筛选

根据上述筛选得到的 SSR 位点信息,随机选取适合扩增的 100 个位点设计并合成引物。所有正向引物在 5'端添加 16 bp 的通用 Tag,以随机 5 尾军曹鱼的混合 DNA 作为模板,优化 PCR 条件,并排除扩增无条带、条带模糊及多条带等 PCR 结果不理想的位点。此后,以不同养殖群体的 16 尾军曹鱼 DNA 为模板,利用 PCR 扩增理想的 SSR 引物进行多重扩增(Tag 修饰引物,各标记正向、反向引物)(Schuelke, 2000)。所有引物由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR 体系为 20  $\mu$ L: 金牌 Mix 16.45  $\mu$ L (北京擎科生物科技有限公司),正向引物(10  $\mu$ mol/L) 0.15  $\mu$ L,反向引物(10  $\mu$ mol/L) 1.2  $\mu$ L, Tag 引物(10  $\mu$ mol/L) 1.2  $\mu$ L, gDNA 10~50 ng。PCR 条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s,各引物适宜退火温度 10 s, 72 °C 延伸 10 s,共进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物由北京擎科生物科技有限公司进行毛细管荧光电泳检测(ABI3730),并利用 GeneMapper 4.1 软件进行数据准确位点的分析。基于基因分型数据,挑选其中多态性高的 SSR 位点进行 5 个养殖群体的遗传多样性分析。

1.5 数据分析

群体遗传多样性的数据统计及分析参照李伟强等(2020)的方法。利用 PopGene32 软件计算等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Shannon 指数( $H$ )、近交系数( $F_{is}$ )、基因流( $N_m$ )等; 利用 Cervus 3.0.7 软件(Kalinowski *et al*, 2007)计算微卫星标记观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )和多态信息含量(PIC); 利用 Genepop4.0.7 软件检测哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg, HWE)平衡。利用 MEGA 6.0 软件构建 5 个军曹鱼养殖群体的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 军曹鱼基因组 SSR 位点类型与数量分析

统计军曹鱼基因组中不同碱基重复序列, 共发现 424 827 条 SSR 重复序列, 其中, 符合本研究筛选标准的以 1~6 个碱基为重复单元的 SSR 位点共计 344 820 个, 占总 SSR 的 81.17%。在这些 SSR 位点中, 单核苷酸重复类型最多(174 146 个), 占总数的 50.50%; 其次为二核苷酸重复(104 242 个), 占总 SSR 的 30.23%; 三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复各有 48 358、12 792、4 403 和 879 个, 分别占总 SSR 的 14.02%、3.71%、1.28%和 0.25%(表 1)。

2.2 军曹鱼 SSR 重复单元的序列组成

由表 2 可知, 在军曹鱼基因组 SSR 中, 单核苷酸重复序列以 A/T 重复类别最多, 共 159 774 条, 占 SSR 总数的 46.34%; 二核苷酸重复序列中, AC/GT 为主要重复类别, 有 75 190 条, 占 SSR 总数的 21.81%,

CG/CG 重复类别数量最少(105 条), 占 SSR 总数的 0.03%; 三核苷酸重复序列以 AAT/ATT 和 AGG/CCT 居多, 分别为 13 133 和 8 775 条, 各占 SSR 总数的 3.81%和 2.54%; 四核苷酸重复以 AAAT/ATTT 出现频率最高, 这一重复单元序列共有 2 452 条, 占 SSR 总数的 0.71%; 五核苷酸重复序列中 AGAGG/CCTCT

表 2 军曹鱼 SSR 重复单元的类型  
Tab.2 Type of microsatellite repeat motifs in cobia genome

重复类型 Repeat type	重复单元 Repeat motif	重复个数 Repeat number	占总 SSR 比例 Proportion of total SSR/%
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	159 774	46.34
	C/G	14 372	4.17
二核苷酸 Dinucleotide	AC/GT	75 190	21.81
	AG/CT	18 236	5.29
	AT/AT	10 711	3.11
	CG/CG	105	0.03
三核苷酸 Trinucleotide	AAT/ATT	13 133	3.81
	AGG/CCT	8 775	2.54
	GCC/GGC	523	0.15
	AAC/GTT	5 303	1.54
	AAG/CTT	4 676	1.36
	ACT/AGT	3 648	1.06
	ATC/ATG	3 596	1.04
	ACG/CGT	2 938	0.85
	AGC/CTG	2 930	0.85
	ACC/GGT	2 836	0.82
四核苷酸 Tetranucleotide	AAAT/ATTT	2 454	0.71
	AAAC/GTTT	1 664	0.48
	AAAG/CTTT	872	0.25
	AGAT/ATCT	1 326	0.38
	AGAC/GTCT	841	0.24
	其他类型四核苷酸 Other types of tetranucleotide	5 635	1.63
五核苷酸 Hexanucleotide	AGAGG/CCTCT	913	0.26
	AGAGA/TCTCT	227	0.07
	AAAAC/GTTTT	315	0.09
	AAAAT/ATTTT	224	0.06
	AAGGC/GCCTT	331	0.10
	ATTAT/ATAAT	235	0.07
	其他类型五核苷酸 Other types of pentanucleotide	2 158	0.63
六核苷酸 Hexanucleotide	ACCAGG/CCTGGT	92	0.03
	其他类型六核苷酸 Other types of hexanucleotide	787	0.23

表 1 军曹鱼基因组 SSR 不同重复单元分布情况

Tab.1 Distribution of different nucleotide repeat types of microsatellite in cobia genome

重复类型 Repeat type	SSR 数 SSR number	占总 SSR 比例 Proportion in total SSR/%
单核苷酸 Mononucleotide	174 146	50.50
二核苷酸 Dinucleotide	104 242	30.23
三核苷酸 Trinucleotide	48 358	14.02
四核苷酸 Tetranucleotide	12 792	3.71
五核苷酸 Pentanucleotide	4 403	1.28
六核苷酸 Hexanucleotide	879	0.25

重复类别最多,有913条,占SSR总数的0.25%;六核苷酸重复序列的重复类别种类多于其他核苷酸,以ACCAGG/CCTGGT为主,仅有92条。

### 2.3 军曹鱼基因组 SSR 的重复次数

军曹鱼基因组 SSR 核心序列重复次数整体在4~275范围内波动,不同类型SSR核苷酸重复次数的波动范围和数量差异较大。单核苷酸SSR核心序列的重复次数为10~105,其中,重复数为10的SSR最多,有37572个,占单核苷酸SSR总数的21.58%,20次及以上的重复共计24812个,在单核苷酸SSR中占14.25%;二核苷酸SSR的重复数为6~167,其中,6次重复的SSR最多,有24371个,占其总数的23.38%;三核苷酸SSR重复次数为4~275,其中,4次重复最多(29144个),占SSR总数的60.27%;四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复次数分别为4~272、4~28和4~19,均以4次重复最多,分别有7200、2290和602个,在同类型的SSR中各自占比56.29%、52.01%和68.49%。

### 2.4 军曹鱼基因组 SSR 的长度

为筛选具有潜在利用价值的高多态性SSR位点,本研究只对长度 $\geq 12$  bp的SSR位点进行分析,共筛选出符合上述标准的SSR位点361684个。由军曹鱼基因组SSR片段长度的分布情况(图1)可知,片段长度为12~19 bp的SSR位点最多(188166个),占SSR总数的52.02%;其次是重复单元长度为20~30 bp的SSR位点(70081个),占SSR总数的19.38%;长度为31~40 bp的SSR位点共有22809个,占SSR总数的6.31%;长度为41~50 bp的SSR位点有14551个,占SSR总数的4.02%;片段长度 $> 50$ 的SSR数量为66077个,占SSR总数的18.27%。66077个,占SSR总数的18.27%。

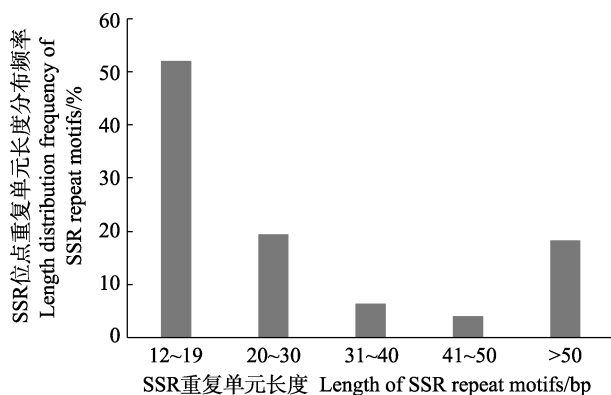


图1 军曹鱼SSR位点重复单元序列长度分布频率

Fig.1 Frequency of SSR repeat sequence length distribution in cobia

### 2.5 多态性SSR位点的筛选及其在养殖群体遗传多样性分析中的应用

基于100个候选位点设计的引物在5尾军曹鱼混合DNA的扩增结果中,筛选出条带明亮单一的引物共23对。随后,对筛选出的引物进行荧光标记修饰,并检测其在16尾军曹鱼DNA中的基因分型结果,共从中筛选到10个多态性较高的SSR标记(表3)。利用这些标记在5个养殖群体145尾军曹鱼中共检测到69个等位基因,其中,最小等位基因数目为5(RCSSR155),最大等位基因数目为11(RCSSR50)。观测杂合度( $H_o$ )为0.396~0.799,平均值为0.628;期望杂合度( $H_e$ )为0.610~0.767,平均值为0.706;平均多态信息含量(PIC)为0.528~0.724,平均值为0.653。10个位点在5个军曹鱼养殖群体中的近交系数( $F_{is}$ )范围为-0.317~0.270(表4)。

5个军曹鱼养殖群体间的遗传相似度和遗传距离如表5所示,遗传距离为0.141~0.464,相似度为0.629~0.868。根据Nei's遗传距离构建的UPGMA系统进化树如图2所示,RC-LS和RC-XW聚为一支后与RC-NZ聚在一起;RC-BH和RC-SY聚为一支。

## 3 讨论

随着SSR重复单元序列碱基数目的增加,军曹鱼基因组SSR不同重复单元的出现频率逐渐下降,与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(唐荣叶等,2021)、斑鳢(*Channa maculata*)(上官清等,2020)、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)(李薇等,2017)等鱼类基因组或转录组中SSR的分布特征相似。然而,各物种基因组SSR在核苷酸组成分布上(优势SSR类型)存在一定的特异性,例如,军曹鱼基因组1~6碱基SSR中单核苷酸重复所占比例最大,其次为二核苷酸重复和三核苷酸重复,这与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(梁霞等,2021)、圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)(李学梅等,2021)、斑鳢(上官清等,2020)等鱼类基因组SSR的分布情况相似;但在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(徐杰杰等,2020)、大黄鱼(李红梅,2014)和金钱鱼(*Scatophagus argus*)(王耀嵘等,2020)等鱼类基因组中,其SSR均以二核苷酸重复类型为主。推测造成这种差异的主要原因,可能是各研究用于筛选和分析SSR特征的软件及其中设置的筛选标准等存在差异。目前,硬骨鱼类基因组SSR在分布特征上尚未发现三核苷酸重复类型占优势的情况,但在西施舌(*Coelomactra antiquata*)(王雨吉等,2021)、缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck)(刘博等,2012)等软



表 3 10 个军曹鱼微卫星位点引物基本信息  
Tab.3 Basic information of ten identified SSR primers for cobia

引物 Primer	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence	片段大小 Size range /bp	退火温度 Annealing temp./°C	荧光标记物质 Fluorescence label
RCSSR026	(TTCC) <sub>7</sub>	F: CCTTCCTCCGTTCTTTCCTC R: AGGGAGGGTGGCAGTGAG	199	62.00	Fam
RCSSR027	(TGAT) <sub>8</sub>	F: ACAGCGTTTGCTCAGTTTCTT R: GATGCTCAGCTCTTTGCTT	216	60.00	Fam
RCSSR045	(CA) <sub>21</sub>	F: TGCTGTTGTTGACCCAACTC R: GGCGACTTCTGCTTTCAATC	206	60.00	Fam
RCSSR046	(GAG) <sub>10</sub>	F: CTGTCAGTGAGGAAGGGAGG R: GACAACAATGGCATGTCAGC	224	64.00	Fam
RCSSR095	(ATTA) <sub>4</sub>	F: ACCAAGGCCAAACTACAACG R: CTTAGAGTGCAGGCTGGCTT	263	60.00	Hex
RCSSR104	(TG) <sub>25</sub>	F: AGGTGAGACTGGGACACTTCTC R: GGCTTCTGCACTAAATTGCC	264	60.00	Hex
RCSSR112	(CTTT) <sub>7</sub>	F: GTGACACAGCTGCTGGAAAG R: CACAATGCACACATGCAGAG	187	62.00	Rox
RCSSR148	(ATTG) <sub>10</sub>	F: TGTCAAACACTACACAAAGCTGCAT R: ACCTCTTCAACCACACGACC	220	54.90	Rox
RCSSR155	(GT) <sub>16</sub>	F: GGACTAGTTTCCCTGACGCA R: AGTGATGGTTCGGTCGATACC	164	62.00	Rox
RCSSR050	(CA) <sub>13</sub>	F: ATGTGGAGCAACACACAAGG R: CGTGTTTGTCCCTGTCCTG	136	60.00	Fam

表 4 军曹鱼 10 个多态性微卫星位点的遗传学特征  
Tab.4 Characterization of 10 polymorphic SSR loci in in five cultured population of cobia

位点 Locus	等位基因数 $N_a$	有效等位基因 $N_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	Shannon 指数 $H$	多态信息含量 PIC	HWE 平衡 $P_{HWE}$	近交系数 $F_{is}$	基因流 $N_m$
RCSSR026	8	4.242	0.799	0.767	1.528	0.724	0.002**	-0.228	1.447
RCSSR027	6	2.997	0.718	0.669	1.184	0.598	0.000***	-0.204	1.426
RCSSR045	6	3.425	0.655	0.710	1.433	0.671	0.000***	0.086	1.099
RCSSR046	6	2.888	0.577	0.656	1.218	0.596	0.010*	-0.123	1.235
RCSSR104	6	2.548	0.685	0.610	1.057	0.528	0.000***	-0.317	0.983
RCSSR095	7	3.433	0.664	0.711	1.399	0.662	0.000***	-0.163	1.216
RCSSR112	6	3.617	0.584	0.726	1.420	0.676	0.000***	-0.238	0.628
RCSSR148	8	3.893	0.642	0.746	1.550	0.707	0.000***	-0.118	1.001
RCSSR155	5	3.465	0.557	0.714	1.351	0.660	0.000***	-0.012	0.758
RCSSR050	11	3.941	0.396	0.749	1.674	0.710	0.000***	0.270	1.245

注:  $P_{HWE}$  为哈迪-温伯格平衡。\*为显著偏离 HWE,  $P<0.05$ ; \*\*为极显著偏离 HWE,  $P<0.01$ ; \*\*\*为极其显著偏离 HWE,  $P<0.001$ 。

Note:  $P_{HWE}$  represented Hardy-Weinberg equilibrium. \* indicated significant deviation from HWE,  $P<0.05$ ; \*\* indicated significantly deviated from HWE,  $P<0.01$ ; \*\*\* indicated extremely significant deviation from HWE,  $P<0.001$ .

体动物中,三核苷酸重复则是基因组 SSR 的主要重复类型。

军曹鱼基因组 SSR 中,单核苷酸重复类别主要以 A/T 类型为主,这与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)

(崔建洲等, 2006)、西施舌(王雨吉等, 2021)等物种基因组 SSR 中的主要单核苷酸重复类型相同。二核苷酸重复类别中, AC/GT 类型出现的频率最高,这与黄唇鱼(*Bahaba flavolabiata*)(赵彦花等, 2019)、大泷六

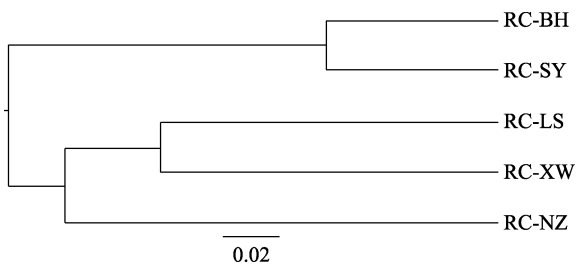
表5 5个军曹鱼养殖群体的遗传相似度和遗传距离

Tab.5 Genetic identity and genetic distance of five cultured population of cobia

群体 Population	RC-BH	RC-LS	RC-NZ	RC-SY	RC-XW
RC-BH	***	0.633	0.629	0.868	0.692
RC-LS	0.457	***	0.704	0.759	0.750
RC-NZ	0.464	0.352	***	0.659	0.704
RC-SY	0.141	0.276	0.417	***	0.764
RC-XW	0.369	0.288	0.352	0.269	***

注：对角线以上为遗传相似度，对角线以下为遗传距离。  
RC-BH：北海养殖群体；RC-LS：陵水养殖群体；RC-NZ：  
硃洲养殖群体；RC-XW：徐闻养殖群体；RC-SY：三亚养  
殖群体。图2同。

Note: Genetic distance is above diagonal, genetic identity is  
below diagonal. RC-BH, RC-LS, RC-NZ, RC-XW and  
RC-SY respectively represented cultured population collected  
in Beihai, Lingshui, Naozhou, Xuwen and Sanya. The same as  
in Fig.2.

图2 基于 Nei's 遗传距离构建的 5 个军曹鱼群体的  
UPGMA 系统进化树Fig.2 UPGMA dendrogram of five population of cobia  
based on Nei's genetic distance

线鱼(*Hexagrammos otakii*)(沈朕, 2017)、鲤鱼(梁霞等, 2021)等硬骨鱼类的结果一致。此外, 在已报道的脊椎动物基因组 SSR 特征分析结果中, CG/CG 这一类型的二核苷酸重复序列的分布水平普遍较低, 同样地, 军曹鱼基因组 SSR 中 CG/CG 类型中在二核苷酸重复类别中的出现次数最少。推测产生上述现象的原因有二, 一是少量的 CG 利于维持 DNA 热力学稳定性; 二是基因组 DNA 在复制及转录过程中 C/G 可能突变为 A/T (Schorderet *et al*, 1992)。军曹鱼基因组 SSR 三核苷酸重复类别中, AAT/ATT 重复单元的占比最高。这一优势类型在斑点叉尾鲷(唐荣叶等, 2021)、花斑无须鲈(*Ageneiosus marmoratus*)(苏孟园等, 2021)、美丽硬仆骨舌鱼(*Scleropages formosus*)(段永楠等, 2019)等多种鱼类基因组 SSR 的三核苷酸重复类别中的位点数目均为最高。此外, 卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(张永德等, 2020)基因组 SSR 三核苷酸类别以 GAG/CTC 为优势类型; 虾虎鱼科(Gobiidae)物种则以

ACT/AGT 为优势类型(白翠翠等, 2016)。四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸类型在不同生物基因组中分布存在较大差异, 分布情况更为复杂。

随着核心序列拷贝数的增加, 军曹鱼基因组中各重复类型 SSR 的数目呈递减趋势。这一现象同样存在于斑点叉尾鲷(唐荣叶等, 2021)、黄颡鱼(徐杰杰等, 2020)、金钱鱼(王耀嵘等, 2020)、花斑无须鲈(苏孟园等, 2021)等鱼类中。推测这一现象产生的主要原因, 一是 SSR 重复单元的重复次数增多会导致其长度相应增加, 从而引起稳定性降低、突变率增高等情况, 并最终导致该重复类型 SSR 数目减少(Wierdl *et al*, 1997); 二是 SSR 通常会维持一定的长度范围, 长等位基因会倾向于变短, 从而使得 SSR 长度不能无限增长, 因而核心序列拷贝数越多的 SSR 其数目就会越少(Ellegren *et al*, 2000)。

SSR 片段长度大小会影响其多态性的高低, SSR 分子标记的多态性越高, 其潜在利用价值则越高。当 SSR 的重复单元长度低于 12 bp 时, 其多态性较低; 当 SSR 重复单元长度大小在 12~20 bp 区间时, 其具有中等多态性水平; 当长度 >20 bp 时, 其多态性较高(田镇等, 2021)。军曹鱼基因组中, 重复序列长度在 20 bp 以上的 SSR 位点共有 173 518 个, 占 SSR 总数的 47.98%, 这些 SSR 位点在理论上具有较高的多态性, 本研究从中随机选取 100 个位点进行多态性标记筛选, 共获得 10 个多态性较高的 SSR 标记, 并将其应用于军曹鱼养殖群体遗传多样性分析。

本研究采用李伟强等(2020)使用的相同军曹鱼养殖群体样品, 10 个 SSR 位点在 5 个群体中获得的  $N_a$ 、 $N_e$  均低于前期报道中 12 个 SSR 位点所获得的数值, 但  $H_o$  和  $H_e$  则高于或接近前期结果。上述结果表明, 利用不同标记对相同养殖群体的遗传多样性评估结果存在一定差异, 但各参数的平均值并无显著差异。此外, 遗传距离和遗传相似度分析结果显示, 各参数数值排序与前期研究相似, 即 RC-SY 与 RC-BH 之间的遗传距离最小(0.141), 而 RC-NZ 与 RC-BH 之间的最大(0.464), 表明两批次标记对各养殖群体间遗传关系的评价较为一致。基于 UPMGA 法构建的群体聚类分析结果显示, RC-NZ 与 RC-LS/RC-XW 分支先聚在一起, 而后与 RC-BH/RC-SY 进行聚类; 但前期研究结果中, RC-BH 和 RC-SY 聚为一支, RC-LS 和 RC-XW 聚为一支, 两支聚为一支后又与 RC-NZ 聚为一支。由此可见, 本研究基于基因组信息查找筛选获得的 SSR 标记在 5 个养殖群体中的遗传多样性参数、群体遗传距离等结果均与前期研究相似, 进一步验证

了军曹鱼养殖群体遗传多样性在多代的人工选育后有所降低这一现状;但群体聚类分析结果的差异也在一定程度上反映了标记数量及类型对遗传多样性评估结果的影响,因此,针对不同情况选取最适数量及类型的标记对于获得准确研究结果至关重要。此外,SSR位点的无效等位基因频率及多态性等因素也会影响聚类分析结果的可靠性。与前期研究相比,本研究筛选得到的SSR标记偏离哈迪-温伯格平衡的情况更为突出,因此,也会造成系统进化树分支的聚类存在差异。最后,鉴于军曹鱼各养殖群体间仍存在较大的分化程度,因此,在后续选育过程中,可利用本研究筛选获得的多态性标记对亲本群体进行评估,优化繁殖配组方式,避免因近亲交配等产生种质退化问题,保障军曹鱼种业的健康发展。

本研究开展的军曹鱼基因组SSR特征分析可为多态性SSR标记的筛选提供重要数据资料,相关研究为鱼类多态性分子标记的开发提供了新思路,筛选获得的SSR标记为鱼类群体遗传多样性分析、种质资源评估及分子辅助育种等提供了有力的评价工具。

## 参 考 文 献

- BAI C C, LIU S F, ZHUANG Z M. Characteristic analysis of microsatellite DNA in the genome of Gobiidae. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 9–15 [白翠翠, 柳淑芳, 庄志猛. 虾虎鱼科(Gobiidae)基因组微卫星DNA的分布特征. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 9–15]
- CHEN G, ZHANG J D, YE N, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum* (I). *Scientific Fish Farming*, 2004(1): 10–11 [陈刚, 张健东, 叶宁, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(上). *科学养鱼*, 2004(1): 10–11]
- CUI J Z, SHEN X Y, YANG G P, *et al.* The analysis of simple sequence repeats in *Takifugu rubripes* genome. *Journal of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2006, 36(2): 249–254, 272 [崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(2): 249–254, 272]
- DUAN Y N, LIU Y, HU Y C, *et al.* Distribution regularity of microsatellites in *Scleropages formosus* genome. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(23): 152–158 [段永楠, 刘奕, 胡隐昌, 等. 美丽硬仆骨舌鱼全基因组微卫星分布规律特征. *中国农学通报*, 2019, 35(23): 152–158]
- ELLEGREN H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*, 2000, 24(4): 400–402
- GOU X W, OU Y J, LIAO R. Present status on studies of cobia *Rachycentron canadum* in China. *Marine Fisheries*, 2007, 29(1): 84–89 [勾效伟, 区又君, 廖锐. 我国军曹鱼研究现状. *海洋渔业*, 2007, 29(1): 84–89]
- GUO Y S, WANG Z D, XIE Z Q, *et al.* Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite DNA in *Lutjanus erythropterus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(4): 13–17 [郭昱嵩, 王中锋, 谢子强, 等. 红鳍笛鲷微卫星DNA标记的开发与遗传多样性分析. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(4): 13–17]
- HUANG W J, GUO X Z, ZHANG Z H, *et al.* Analysis of microsatellite in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome and the application in parentage identification. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(2): 1–12 [黄伟杰, 郭向召, 张子豪, 等. 草鱼全基因组微卫星特征分析与亲子鉴定. *水产学报*, 2022, 46(2): 1–12]
- KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106
- KUANG J H, CHEN G, MA Q, *et al.* Embryonic development and morphological characteristics of larvae and juveniles of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1814–1824 [邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼的胚胎发育及仔稚鱼形态观察. *水产学报*, 2021, 45(11): 1814–1824]
- KUANG J H, CHEN G, MA Q, *et al.* Histological observation on gonadal differentiation and first annual gonadal development of cobia (*Rachycentron canadum*). *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(8): 128–138 [邝杰华, 陈刚, 马骞, 等. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)性腺分化及首周年发育的组织学观察. *海洋学报*, 2021, 43(8): 128–138]
- LI H M. New microsatellite satellite markers development based on whole genome sequencing information and its application in population genetics in large yellow croaker. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2014 [李红梅. 基于基因组信息的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)微卫星标记开发及应用. *浙江海洋学院硕士研究生学位论文*, 2014]
- LI L D, CHEN B S, FENG J, *et al.* Analysis and evaluation in nutritive value of *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Journal of Tropical Oceanography*, 2002(1): 76–82 [李刘冬, 陈毕生, 冯娟, 等. 军曹鱼营养成分的分析及评价. *热带海洋学报*, 2002(1): 76–82]
- LI W Q, CHEN G, MA Q, *et al.* Genetic diversity in five cultured population of cobia (*Rachycentron canadum*) using microsatellite markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 113–120 [李伟强, 陈刚, 马骞, 等. 利用微卫星标记分析军曹鱼养殖群体的遗传多样性. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 113–120]
- LI W, LI J X, JING H F, *et al.* Development of microsatellite loci for Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) using high-throughput sequencing. *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(3): 449–457 [李薇, 李久焯, 荆慧芳, 等. 基于高通量测序的达氏鲟微卫星标记筛选. *动物学杂志*, 2017,

- 52(3): 449–457]
- LI X M, WU X B, YANG D G, *et al.* Development of microsatellite markers for *Coreius guichenoti* based on transcriptome sequencing. *Journal of Hydroecology*, 2021, 42(4): 97–103 [李学梅, 吴兴兵, 杨德国, 等. 基于转录组测序的圆口铜鱼微卫星标记筛选. *水生生态学杂志*, 2021, 42(4): 97–103]
- LIANG X, WANG H Q, MA Y X, *et al.* Distribution characteristics of microsatellites in the whole genome of *Cyprinus carpio*, Linnaeus. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2021, 44(3): 103–111 [梁霞, 王慧琪, 马宇璇, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)全基因组微卫星分布特征研究. *南京师大学报(自然科学版)*, 2021, 44(3): 103–111]
- LIU B, SHAO Y Q, TENG S S, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 132–137 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) EST-SSR 分布特征及引物开发利用. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 132–137]
- LIU H J, CHEN R F, PENG Y H, *et al.* Artificial breeding of *Rachycentron canadum*. *Guangxi Sciences*, 2012, 19(3): 293–296 [刘海娟, 陈瑞芳, 彭银辉, 等. 军曹鱼人工繁育试验研究. *广西科学*, 2012, 19(3): 293–296]
- LUO W Y, HU J, LI X F. The evolution and application of microsatellites. *Hereditas(Beijing)*, 2003, 25(5): 615–619 [罗文永, 胡骏, 李晓方. 微卫星序列及其应用. *遗传*, 2003, 25(5): 615–619]
- MA Y C, ZHANG G R, LI M M, *et al.* Progress in nutritional requirements and feed research of cobia *Rachycentron canadum*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(3): 680–692 [麻永财, 张关荣, 李孟孟, 等. 军曹鱼营养需求与饲料研究进展. *水生生物学报*, 2019, 43(3): 680–692]
- MAO F F, CHEN G, MA Q, *et al.* Skeletal deformities in the juveniles of cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(1): 133–140 [毛非凡, 陈刚, 马骞, 等. 养殖军曹鱼稚鱼骨骼畸形研究. *渔业科学进展*, 2022, 43(1): 133–140]
- NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(12): 3321–3323
- SCHORDERET D F, GARTLER S M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(3): 957–961
- SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233–234
- SHANGGUAN Q, CHEN K C, LIU H Y, *et al.* Characteristics of microsatellites and genetic structure of wild *Channa maculate*. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 47–60 [上官清, 陈昆慈, 刘海洋, 等. 斑鳢基因组中微卫星分布特征及野生种群遗传结构分析. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 47–60]
- SHEN Z. Characterization of novel molecular markers, correlation with growth traits and research of genetic diversity. Master's Thesis of Shandong University, 2017 [沈朕. 大泷六线鱼分子标记的开发、生长性状的关联性分析及遗传多样性研究. 山东大学硕士研究生学位论文, 2017]
- SU M Y, YANG W S, TANG R Y, *et al.* Microsatellite distribution in the whole genome of *Ageneiosus marmoratus*. *Journal of Nanjing Normal University (Engineering and Technology)*, 2021, 21(2): 65–71 [苏孟园, 杨汶珊, 唐荣叶, 等. 花斑无须鲈(*Ageneiosus marmoratus*)全基因组微卫星分布特征研究. *南京师范大学学报(工程技术版)*, 2021, 21(2): 65–71]
- TANG R Y, SU M Y, YANG W S, *et al.* Analysis of microsatellite distribution characteristics in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) genome. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 89–97 [唐荣叶, 苏孟园, 杨汶珊, 等. 斑点叉尾鲷全基因组微卫星分布特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 89–97]
- TIAN Z, CHEN A H, WU Y P, *et al.* Bioinformatics analysis of microsatellite sites in the RNA-sequencing of *Meretrix meretrix*. *Marine Fisheries*, 2021, 43(2): 160–167 [田镇, 陈爱华, 吴杨平, 等. 文蛤转录组中微卫星位点生物信息分析. *海洋渔业*, 2021, 43(2): 160–167]
- WANG Y J, MENG X P, YI L F. Isolation of microsatellite markers in transcriptome of *Coelomactra antiquata* and their application in cryptic species identification. *Fisheries Science*, 2022, 41(2): 289–295 [王雨吉, 孟学平, 易乐飞. 基于转录组西施舌微卫星标记开发及隐种鉴定. *水产科学*, 2022, 41(2): 289–295]
- WANG Y R, YANG W, REN X L, *et al.* Distribution patterns of microsatellites and development of polymorphic markers from *Scatophagus argus* genome. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(4): 7–14 [王耀嵘, 杨尉, 任席林, 等. 金钱鱼基因组微卫星分布特征分析及多态性标记开发. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(4): 7–14]
- WANG Z D, CHEN T M, GUO Y S, *et al.* A genetic analysis of cultured populations of cobia (*Rachycentron canadum*) with microsatellite markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 16–21 [王中锋, 陈铁妹, 郭昱嵩, 等. 军曹鱼全人工繁殖群体遗传特征的 SSR 分析. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 16–21]
- WANG Z D, SHI P X, SU H N, *et al.* Analysis on population genetic structure of cobia (*Rachycentron canadum*) with AFLP markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(1): 12–17 [王中锋, 史沛鑫, 苏惠娜, 等. 军曹鱼群体遗传结构的 AFLP 分析. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(1): 12–17]
- WIERDL M, DOMINSKA M, PETES T D. Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the

- microsatellite. *Genetics*, 1997, 146(3): 769–779
- WU R X, ZHAI Y, XIAO Y, *et al.* Microsatellite marker development for *Acanthopagrus latus* and cross-species amplification in the family Sparidae. *Journal of Applied Oceanography*, 2019, 38(3): 356–364 [吴仁协, 翟云, 肖瑶, 等. 黄鳍棘鲷微卫星标记开发及其在鲷科鱼类中的跨物种扩增. *应用海洋学学报*, 2019, 38(3): 356–364]
- XU J J, ZHENG X, LI J, *et al.* Distribution characteristics of whole genome microsatellite of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5488–5498 [徐杰杰, 郑翔, 李杰, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)全基因组微卫星分布特征分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5488–5498]
- ZHANG Y D, WEN L T, LUO H L, *et al.* Genome survey and development of SSR molecular markers for *Trachinotus ovatus*. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(5): 983–994 [张永德, 文露婷, 罗洪林, 等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 983–994]
- ZHAO X Y. Compositional and comparative analysis of microsatellite in organism genomes. Doctoral Dissertation of Hunan University, 2014 [赵相艳. 微卫星序列在生物体基因组中的组成与比较分析. 湖南大学博士研究生学位论文, 2014]
- ZHAO Y H, OU Y J, WEN J F, *et al.* Development of SSR markers in *Bahaba flavolabiata* by transcriptome sequencing. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(9): 2078–2087 [赵彦花, 区又君, 温久福, 等. 基于转录组测序技术的黄唇鱼 SSR 分子标记筛选. *南方农业学报*, 2019, 50(9): 2078–2087]

(编辑 冯小花)

## Screening and Characterization of Polymorphic SSR Markers Based on Whole Genome Sequencing of Cobia (*Rachycentron canadum*)

MA Qian<sup>1,2</sup>, WU Yuwei<sup>1</sup>, WANG Liuyong<sup>1</sup>, ZHAO Xiaolong<sup>1</sup>,  
ZHOU Qiling<sup>1</sup>, CHEN Gang<sup>1,2</sup>①, HUANG Jiansheng<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China)

**Abstract** The cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), is an important aquaculture species in cage and other intensive systems. This species has many advantages such as fast growth rate, excellent meat quality, and high market value, making cobia an excellent candidate species for commercial aquaculture. However, long-term artificial breeding of cobia has reduced gene exchange and population genetic diversity. To better protect germplasm resources, molecular markers provide a powerful tool in developing the breeding industry of cobia. Microsatellites are widely distributed, large in number with high polymorphism, and have long been considered important molecular markers for genetic diversity and marker-assisted breeding. More polymorphic microsatellite markers need to be developed for cobia because the number of published polymorphic simple sequence repeat (SSR) loci is very limited. In this study, Micro Satellite (MISA) software was used to identify SSR loci based on the genome sequencing data of cobia. We analyzed the distribution, quantity, and composition characteristics of the SSR loci to develop polymorphic microsatellite markers. The identified markers were used to evaluate the genetic diversity in five cultured populations.

In this study, a total of 424 827 SSR loci were identified in the genome data of cobia, among which mononucleotides, dinucleotides, and trinucleotides accounted for 50.50%, 30.23%, and 14.02% of the total SSRs, respectively. Among all the repeat units contained in the total SSRs, A/T was the predominant repeat type of the mononucleotide repeats; AT/AT and AC/GT were the dominant repeat types of dinucleotides; AAT/ATT and AGG/CCT were the dominant repeat types of

① Corresponding author: CHEN Gang, E-mail: cheng@gdou.edu.cn



trinucleotides. Repeat numbers of the SSR core sequences in the genome of cobia ranged from 4 to 275 times. The predominant repeat number of the mononucleotide SSR was ten and the predominant number of the dinucleotide and trinucleotide SSR were six and four, respectively. A total of 173 518 SSR loci had a length of  $\geq 20$  bp, accounting for 47.98% of the total number of SSRs in the genome. These results indicated that the SSR loci in the genome of cobia were of a high frequency, rich variety, and with high polymorphic potential.

Unigenes obtained by the genome sequencing of cobia were used to detect and analyze the SSR loci information using MISA software. The numbers and types of SSR sequences on the single-stranded DNA of the genome were counted. SSR sites in cobia genome mainly contain mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide, and hexanucleotide repeats. The screening criteria for the polymorphic SSR loci was set as “mononucleotide repeat units with repeats at least 10 times; dinucleotides with repeats at least six times; trinucleotides, tetranucleotides, pentanucleotides, and hexanucleotides with repeats at least four times”. Subsequently, based on the information of SSR loci screening, 100 candidate loci were randomly selected to design and synthesize primers for amplification. A total of 16 DNA samples from different cultured populations were used as templates. Multiple PCR amplifications were performed to screen ideal polymorphic SSR loci and suitable PCR primers. PCR products were detected using capillary fluorescence electrophoresis. The GeneMapper 4.1 software was used to analyze the accurate sites of the amplified sequences. Based on the genotyping data of the 100 SSR loci, SSR loci with high polymorphism were selected to analyze the genetic diversity of five cultured populations of cobia.

The screening analysis results revealed a total of 344 820 SSR loci were detected in the genome of cobia. Among these SSR (with 1–6 nucleotide as repeat units), the top three repeat types were mononucleotide, dinucleotide, and trinucleotide, accounting for 50.49%, 30.23% and 14.02% of the total detected SSRs, respectively. Among the repeating units included in the detected SSRs, the mononucleotide repeats were dominated by A/T type, accounting for 46.34% of the total detected SSRs; AC/GT was the dominant repeat unit type of dinucleotide, accounting for 21.81% of the total detected SSRs. The number of SSR core sequence repeats in the total detected SSRs fluctuated in the range of 4 to 275 times. The predominant number of repeats of mononucleotide SSR was ten, and the predominant number of repeats of dinucleotide SSR was six. In this study, the length of  $\geq 12$  bp was set as the standard for screening high polymorphic SSR loci. A total of 361 684 SSR loci were obtained. However, the SSR loci with fragment lengths of 12–19 bp accounted the largest number, with a total of 188 166; these loci accounted for 52.02% of the total number of SSRs. Among the selected 100 candidate loci for genotyping, a total of ten polymorphic SSR markers were obtained. These markers were used in the genetic diversity analysis of five cultured populations collected in Beihai (RC-BH), Lingshui (RC-LS), Naozhou (RC-NZ), Xuwen (RC-XW), and Sanya (RC-SY). A total of 69 alleles were detected from 145 individuals, the average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.628, and the average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.706, and the mean polymorphism information content (PIC) was 0.653. The inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ) of the ten loci in the five cultured populations ranged from -0.317 to 0.270. The genetic distance between the five cultured populations ranged from 0.141 to 0.464, and the genetic similarity was 0.629–0.868. The results were similar to that of previous research using published markers, indicating that the polymorphic markers screened from the genome of cobia were of high accuracy and reliability. These polymorphic SSR markers provide strong support for population genetic diversity evaluation and molecular marker-assisted breeding of cobia, and provide effective technical support for the development of the cobia aquaculture industry.

**Key words** *Rachycentron canadum*; Genome; SSR; Molecular marker; Genetic diversity

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220227002

http://www.yykxjz.cn/

王雨, 徐伟, 杨建, 耿龙武, 张宇婷. 拟赤梢鱼卵巢早期发育与 *sox3* 基因 cDNA 克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 145–154

WANG Y, XU W, YANG J, GENG L W, ZHANG Y T. Early ovary development, *sox3* gene cDNA cloning and expression analysis of *Pseudaspius leptocephalus*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 145–154

# 拟赤梢鱼卵巢早期发育与 *sox3* 基因 cDNA 克隆及表达分析\*



王雨<sup>1,2,3</sup> 徐伟<sup>1,2①</sup> 杨建<sup>1,2</sup> 耿龙武<sup>1,2</sup> 张宇婷<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增养殖重点开放实验室 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

**摘要** 为初步阐明拟赤梢鱼(*Pseudaspius leptocephalus*)卵巢发育特征及 *sox3* (*sry* related high mobility group box 3)基因在其卵巢发育过程中的作用,本研究通过组织切片观察了拟赤梢鱼卵巢早期发育过程,利用 RACE 技术克隆了该鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长序列,并进行生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *sox3* 基因在拟赤梢鱼不同组织及性腺不同发育时期的表达模式。结果显示,拟赤梢鱼卵巢在孵化后 45 d 分化形成,160 d 时由 I 期进入 II 期,孵化后 360 d,卵巢仍处于 II 期。拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长为 1 800 bp (GenBank 登录号: MT952206),编码 299 个氨基酸,存在保守的 HMG (histidine, methionine, glycine-rich)结构域。氨基酸序列比对和系统进化树分析结果显示,拟赤梢鱼 SOX3 蛋白与斑马鱼(*Danio rerio*)和翘嘴鲇(*Culter alburnus*)亲缘关系最近。此外,*sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢中表达量最高,其次是脑和眼睛,在精巢和其他组织中微量表达;在性腺分化过程中,*sox3* 基因在卵巢中表达量显著高于未分化性腺和精巢,在卵巢发育阶段表达量不断升高,而在精巢中持续低水平表达。综上,本研究推测 *sox3* 基因主要参与拟赤梢鱼卵巢的分化和发育。

**关键词** 拟赤梢鱼; 卵巢发育; *sox3*; 基因克隆; 基因表达

**中图分类号** S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0145-10

拟赤梢鱼(*Pseudaspius leptocephalus*)隶属鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、拟赤梢鱼属(张觉民, 1995),在中国主要分布于黑龙江流域,是当地珍稀名贵经济鱼类之一。近年来,由于环境污染、过度捕捞,拟赤梢鱼的野生资源量迅速下降(李明德, 2011)。目前,对拟赤梢鱼的研究在肌肉营养(吴善福等, 2016)、胚胎发育(杨建等, 2021)等方面有少量报道。拟赤梢鱼的保护性研究工作于 2015 年陆续展开,

2019 年成功攻克了拟赤梢鱼的人工繁殖难题(张颖等, 2016)。2021 年,实现拟赤梢鱼全人工繁育(杨建等, 2021)。目前,亟需开展拟赤梢鱼性腺分化、发育特征和成鱼性腺发育周年变化规律等方面的研究,为其人工繁育提供理论指导。

性腺分化与发育是一个复杂的基因调控过程,已有多个性别决定相关基因相继被发现。其中, *sox3* 基因(*sry* related high mobility group box 3)作为转录

\* 农业财政专项“东北地区重点水域渔业资源与环境调查”、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2019XT0604; 2020TD56)和国家重点研发计划(2019YFD0900404; 2020YFD0900402)共同资助。王雨, E-mail: wangyu5736@163.com

① 通信作者: 徐伟, 研究员, E-mail: xwsc23@163.com

收稿日期: 2022-02-27, 收修改稿日期: 2022-04-26

调控因子 *sox* 家族成员之一,是唯一定位于 X 染色体上的 *sox* 家族基因,且与雄性性别决定基因 *sry* 在 HMG (histidine, methionine, glycine-rich) 结构域上的同源性最高(Rajakumar *et al*, 2014),被认为是参与个体性别决定和分化相关的重要基因(许可等, 2017)。

本研究通过 RACE 技术克隆了拟赤梢鱼 *sox3* 基因,同时利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测其不同组织和性腺早期分化、发育过程中的时空表达特征,并结合组织切片技术观察拟赤梢鱼早期卵巢分化、发育的结构变化特征,以期初步阐明 *sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢发育与分化中的作用,为开展拟赤梢鱼的人工繁育研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用拟赤梢鱼亲鱼取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验站,经池塘人工肥育后使用药物催产获得受精卵,将受精卵置于室内水温 22 °C 条件下孵化。仔鱼破膜、平游后,移至室内循环水养殖系统培育,水温 21~23 °C,孵化后 45 d 内投喂丰年虫; 45~85 d 期间,使用丰年虫和升索 S4 级鲤鱼幼鱼商品料混合投喂; 85~360 d, 幼鱼置于室内养殖池培育,期间投喂鲤鱼颗粒饲料。

### 1.2 样品采集

性腺发育组织切片样品采集: 仔鱼破膜 0~85 d, 每 5 d 采集一次整鱼样本,每个时间点采集 20 尾; 85~360 d, 每 20 d 采集一次性腺组织样本,每次采集 20 尾。采集的样品用波恩氏液固定 48 h 后,置于 75% 酒精保存,以备组织切片观察性腺分化时间及各发育时期特点。不同生长时期拟赤梢鱼体长数据见表 1。

qRT-PCR 样品采集: 挑选 4 龄雌性、雄性成鱼各 3 尾,体长为(26.862±2.172) cm, 体重为(194.033±9.734) g, 分别采集其脑、眼睛、鳃、心脏、肝、肾、

脾、肠、肌肉、精巢和卵巢等组织,液氮保存,以备 *sox3* 基因组织表达特征分析;根据组织切片结果,采集性腺分化期仔鱼 20 尾,每条仔鱼于背鳍附近切取 5 mm 厚的鱼段,波恩氏液固定,用于组织切片确定性腺类型,剩余样本液氮保存,以备 *sox3* 基因在性腺分化过程表达特征分析;采集孵化后 85、160、260、360 d 幼鱼及 4 龄成鱼各 20 尾,一侧性腺固定于波恩氏液,用于组织切片确定性腺类型,另一侧液氮保存,以备 *sox3* 基因在性腺发育过程表达特征分析。

### 1.3 性腺发育组织切片

取波恩氏液固定好的样品,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、连续切片、二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、H.E 染色、透明、中性树脂胶封片、烘片等步骤后用显微镜观察、拍照。

### 1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采取 Trizol 法提取拟赤梢鱼不同组织及性腺不同发育时期样品的总 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白测定仪(Thermo Scientific)检测总 RNA 的完整性和浓度。取 1 μg 总 RNA 作为模板,按照 GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) 试剂盒(Promega)说明书进行反转录合成第一链 cDNA,产物稀释 5 倍后于 -20 °C 保存备用。

### 1.5 拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 克隆

根据斑马鱼(*Danio rerio*) *sox3* 基因 cDNA 序列(GenBank: NM\_001001811.2)设计引物(表 2)。以拟赤梢鱼成鱼卵巢 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 20 μL,反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收、纯化,纯化片段连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa),转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(TaKaRa),经菌落 PCR 鉴定,挑选阳性克隆菌落送金唯智生物科技有限公司测序。

表 1 拟赤梢鱼生长数据(平均值±标准差)

Tab.1 The growth data of *Pseudaspius leptcephalus* (Mean±SD)

日龄 Days/d	全长 Total length/cm	体重 Body weight/g	日龄 Days/d	全长 Total length/cm	体重 Body weight/g
15	1.172±0.141	0.016±0.001	75	4.650±0.356	1.356±0.285
25	1.964±0.101	0.105±0.018	85	4.754±0.324	1.428±0.180
35	2.718±0.094	0.254±0.031	160	9.126±0.448	7.672±0.477
45	3.508±0.099	0.498±0.046	220	12.185±0.672	9.364±0.563
55	3.943±0.091	0.857±0.087	260	13.748±0.590	10.831±0.664
65	4.424±0.196	1.076±0.072	360	15.748±0.807	12.482±0.626

表 2 实验所用引物及序列  
Tab.2 Sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	应用 Application
<i>sox3</i> -F	GAGATTAAAAGCCCCATTCCGC	部分 CDS 区扩增 Part of the CDS amplification
<i>sox3</i> -R	GCTACCCCTAACCCACATTGTA	
GSP5'	GGCCAGCTGGTCCTGCATGAGGGAGT	5'-RACE 扩增 5'-RACE amplification
GSP3'	AAGCATGTACCTGCCGCCCGGAGG	3'-RACE 扩增 3'-RACE amplification
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
Q- <i>sox3</i> -F	ACAGCGCATACTCCCTCATG	qRT-PCR
Q- <i>sox3</i> -R	GCCGTGGACATCATTGGGTA	
18S-F	CCGCTTTGGTGA CTCTAGAT	内参基因 Internal reference gene
18S-R	CTTGGATGTGGTAGCCGTTTC	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆验证 Positive clone verification
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	

根据获得的 *sox3* 基因中间片段分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性引物(表 2), 按照 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa)说明书, 以 RACE Ready cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增, 反应程序: 94 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 4 °C 保持。扩增产物经胶回收、纯化、连接、转化及阳性菌落筛选, 挑选阳性克隆菌落送金唯智生物科技有限公司测序。

### 1.6 *sox3* 基因生物信息学分析

将拟赤梢鱼 *sox3* 基因部分 CDS 区、5'/3'端序列通过 SeqMan 软件进行拼接, 得到 cDNA 全长序列; 使用 DNAMAN 8.0 软件分析开放阅读框(ORF)结构, 推导氨基酸序列, 并进行氨基酸同源对比; 使用专业蛋白分析系统(Expert Protein Analysis System)分析 SOX3 蛋白基本理化性质; 使用 MEGA 5.0 软件, 采用邻接法构建 *sox3* 基因系统进化树, Bootstrap 重复次数设置为 1 000; 使用 Swiss-Model 预测拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三级结构。

### 1.7 qRT-PCR 检测 *sox3* 基因的表达规律

根据获得的 *sox3* 基因全长 cDNA 序列设计 qRT-PCR 特异性引物(表 2); 以拟赤梢鱼不同发育阶段性腺样本及各组织 cDNA 为模板, 18S 基因为内参, 使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems), 按照 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作, 每个样品重复测定 3 次。反应体系 10  $\mu$ L, 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。

### 1.8 数据处理

采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因的相对表达量, 结果用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较, 显著性水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟赤梢鱼性腺发育组织学观察

**2.1.1 性腺分化** 孵化后 1 d, 拟赤梢鱼原始生殖细胞(PGCs)位于脊索下方体壁腹膜背侧, 体积明显大于周围体细胞, 呈圆形(图 1-a)。孵化后 5 d, PGCs 数量增加至多个, 并在脊索下方前肾管聚集(图 1-b); 15 d 时, PGCs 被上皮细胞包围, 形成纺锤形原始性腺, 由肠系膜粘附在鳔和肠道之间(图 1-c); 40 d 时, 性腺呈现椭圆形和梭形 2 种不同的形态(图 1-e、f); 至 45 d 时, 椭圆形性腺中央可观察到中空的卵巢腔结构, 且性腺细胞数量较多(图 1-h), 卵巢分化形成;

**2.1.2 卵巢发育** 孵化后 100 d 时, 拟赤梢鱼卵巢体积和生殖细胞数目明显增加, 卵巢处于 I 期发育阶段(图 1-10); 120 d 时, 卵母细胞核增大, 核内含 1~3 个大而圆的核仁, 且分布在细胞核膜附近(图 1-k); 至 160 d 时, 卵母细胞质出现液泡, 及少量的滤泡细胞, 标志着卵巢发育进入 II 期(图 1-l); 260 d 时, 卵母细胞呈不规则多角形, 形态发生改变, 在卵巢中松散分布, 部分卵母细胞质出现卵黄核(图 1-m); 360 d 卵母细胞卵质加厚, 卵黄核明显, 未见辐射带及滤泡层出现, 仍处于 II 期(图 1-n)。

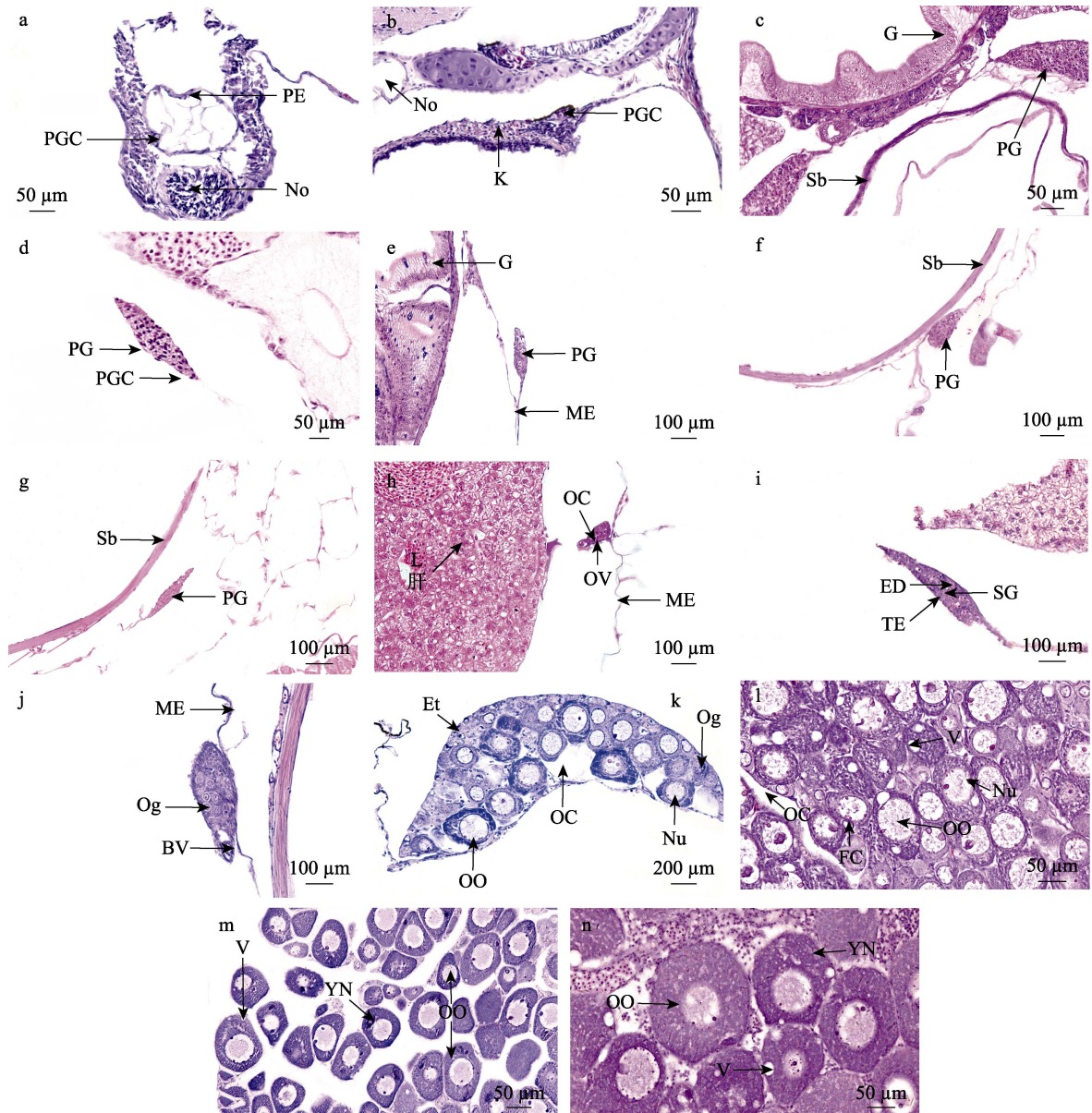


图1 拟赤梢鱼卵巢分化与不同发育时期形态结构变化

Fig.1 The changes of morphosis in ovary differentiation and development of *P. leptocephalus* at different stages

a: 1 d; b: 5 d; c: 15 d; d: 35 d; e and f: 40 d; g and h: 45 d; i: 75 d;  
j: 100 d; k: 120 d; l: 160 d; m: 260 d. n: 360 d

PGC: 原始生殖细胞; No: 脊索; PG: 原始性腺; K: 肾; G: 肠; ME: 肠系膜; Sb: 鳔; GC: 生殖细胞; PE: 腹膜上皮; SC: 体细胞; OC: 卵巢腔; ED: 精小管; OV: 卵巢; TE: 精巢; SG: 精原细胞; Og: 卵原细胞; Nu: 核仁; OO: 卵母细胞; FC: 滤泡细胞; V: 液泡; YN: 卵黄核; BV: 血管; St: 光滑边缘; Et: 生殖上皮  
a: 1 d; b: 5 d; c: 15 d; d: 35 d; e and f: 40 d; g and h: 45 d; i: 75 d; j: 100 d; k: 120 d; l: 160 d; m: 260 d; n: 360 d.  
PGC: Primordial germ cell; No: Notochord; PG: Primary gonad; K: Kidney; G: Gut; ME: Mesentery; Sb: Swim bladder; Gc: Germ cell; PE: Peritoneum; SC: Somatic cell; OC: Ovarian cavity; ED: Efferent duct; OV: Ovary; TE: Testis; SG: Spermatogonia; Og: Oogonium; Nu: Nucleolus; OO: Oocyte; FC: Follicular cells; V: Vacuole; YN: Yolk nuclear; BV: Blood vessel; St: Smooth type; Et: Germinal epithelium.

## 2.2 拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 序列分析

拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长为 1 800 bp (GenBank 登录号为 MT952206), 包括 5'非编码区

(5'-UTR, 209 bp)、3'非编码区(3'-UTR, 691 bp)和开放阅读框(ORF, 900 bp), 共编码 299 个氨基酸, 第 34-104 位为 HMG 保守结构域(图 2)。拟赤梢鱼 SOX3 蛋白分子式为  $C_{1425}H_{2259}N_{427}O_{443}S_{25}$ , 相对分子量为



```

1 ACATGGGGTCAGAGTTCCTGGCAGAGCAGAGTGAACACACTGAGGTGAGGTGTGGAGACATTTGAAACTTGAGTTCGGTCTATGTG
91 ACTTGAGTTTTTGTCTCTGAACTTTTGACTGACTACCGACTACTTTATTTTGTGAGACTCTTTAAATTCAGCGTTGTCTTTCGAGTGC
181 TTTTAAAGCACCACCTTTTAAGTAGTTTGAATGTATAACATGATGAAACCGAGATTTAAAGCCCCCTCCCGCAGTCCAACACGGGCTCGG
1 M Y N M M E T E I K S P L P Q S N T G S
271 CGGCGGGCGGCAAAAACAACAGTGCCAACGACCAGGACCGGGTGAAGCGGCTATGAATGCTTTCATGGTGTGGTCTCGCGGTGACGGGA
21 A A G G K N N S A N D Q D R V K R P M N A F M V W S R G Q R
361 GGAAGATGGCACAGGAGAAATCCTAAAATGCACAATCTGAGATCAGCAAGCGCCTCGGTGCTGACTGGAACCTTTTGACTGACCCGAGA
51 R K M A Q E N P K M H N S E I S K R L G A D W K L L T D A E
451 AGAGCCCTTCATTGACGAGGCGGTTACGAGCATGCACATGAAGGAGCACCCGGATTACAATAACCGTCCCGCAGGAAGACCA
81 K R P F I D E A K R L R A M H M K E H P D Y K Y R P R R K T
541 AGACCCTGCTGAAGAAAGACAAGTATTCCTTGCCCGGAGGACTCTTGGCGCCCGGTGCCAACGCTGTCAACAGTGCCTGCTCGGTGGGGC
111 K T L L K K D K Y S L P G G L L A P G A N A V N S A V S V G
631 AGCGGATGGACTACACACACATGAACGGCTGGACGAACAGCGCTACTCCCTCATGCAGGACCAGCTGGCTACACTCAGCATCCCAGCA
141 Q R M D Y T H M N G W T N S A Y S L M Q D Q L A Y T Q H P S
721 TGAACAGCCCCAGATTCAGCAGATGCACCGCTACGACATGGCGGGACTTCAGTACCCGATGATGTCCACGGCCAGACCTACATGAACG
171 M N S P Q I Q Q M H R Y D M A G L Q Y P M M S T A Q T Y M N
811 CGGCGTCCACGTACAGCATGTACCAGCATACACGCAGCAAACCTCCAGTGCAATGGGTTTGGGCTCCATGGCTTCAGTGTGCAAGACGG
201 A A S T Y S M S P A Y T Q Q T S S A M G L G S M A S V C K T
901 AACCCAGCTCTCCTCCTCCGGCCATAACCTCTCACTCTCAGCGTGCCTGTTTGGGAGACCTGAGGGATATGATAAGCATGTACCTGCCGC
231 E P S S P P P A I T S H S Q R A C L G D L R D M I S M Y L P
991 CCGGAGGAGACGCGCCGACCTCCAGTCTACAGACCAGTCCGTTACACAGCGTTCATCCGCACTATCAAAGCGCAGGGGATGGGCTGA
261 P G G D S A E H S S L Q T S R L H S V H P H Y Q S A G T G V
1081 ACGGAACGCTACCCCTAACCCACATTTGAAGACTCCTAAAAAGACTAAGTAGCCTACTTCGGATACTTGAACATTTTGGTTTGCAAAA
291 N G T L P L T H I *
1171 AAGAATCGAAGTTCAATTTTCGTTTTTAAAAAAGAACTATTTTTAATCTCAATGAGTTGTCGGTTTGAAGCATTATTTATGACGACATAT
1261 CTGGGACTTAAGAATAAATGCATTGCAGAGGAGCTTTTGTGATAAGCTGTAAGCAATCAACGTCTGTAGAAGAATATTGGACTTCTGA
1351 CGTATTTGGCGCCAGAGTTTGTCTTTATGAAAAGGCACGTGGCTTCGTGAAGAGGCTGTATTTCAAAAAGAAAAATGGAGGGAGAGAGT
1441 ATGTTCACTCATAAATGTTTACACTTATTTTTAGAAATGTCGATTTTGTCCAAATCTGTGTAGTATTTTTGTGTTTCAATTTATGAAC TAGG
1531 TTTTATTGAAATGAAAGACTGTGCTGGTGCAGCGCAAAGTTTGTTTTATTTATAGTGAGTTTTTTTTTTTTTAAAGCTTGTGAACCACT
1621 GTACGTCTTTGCTGAAATGTTCCACTCTTGTTTTGTGAATCTTCTTTCTGTGATGTTATGGCAGTATCATGTTAATCCATTGTGTGGGA
1711 CTGAGAGTTTTATTAACTGACGTTTCTACTTAAGACTAAATGAATAAATTTGTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 2 拟赤梢鱼 *sox3* cDNA 序列及氨基酸序列  
 Fig.2 cDNA and amino acid sequence of *P. leptocephalus sox3*

灰色阴影: 起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA); 黄色阴影: HMG-box 序列;  
 黑色方框: SOXp motif; 下划线: 5'/3'-UTR; 斜体加粗: 加强信号和 Poly A 尾。  
 Grey shadow: Initiation codon (ATG), termination codon (TGA); Yellow shadow: HMG-box;  
 Black box: SOXp motif; Underline: 5'/3'-UTR; Italics bold: Strengthen the signal and poly A tail.

33.26 kDa, 理论 pI 值为 9.63, 蛋白质的不稳定系数为 66.11。

### 2.3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性分析

在 NCBI 数据库中, 拟赤梢鱼与其他物种 *sox3* 基因编码的氨基酸序列比对结果显示, 拟赤梢鱼与其他硬骨鱼类同源性在 98.66%~92.33%之间; 与翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)氨基酸同源性最高, 与高等哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)的同源性达 61.33% (表 3)。利用 DNAMAN 8.0 软件比较分析拟赤梢鱼与其他物种 SOX3 蛋白氨基酸序列, 不同物种 SOX3 蛋白氨基酸序列中均存在高度保守的 HMG 结构域(图 3)。此外, 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三级结构与斑马鱼高度一致, 均含有 3 个  $\alpha$  螺旋和 2 个环区(图 4)。

### 2.4 拟赤梢鱼 *sox3* 基因系统进化树分析

拟赤梢鱼与其他硬骨鱼类聚为一支, 人(*Homo*

表 3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性比对  
 Tab.3 Homology comparison of amino acid sequence of *P. leptocephalus* SOX3

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank No.	同源性 Identity /%
翘嘴鲌 <i>C. alburnus</i>	QJU11823.1	98.66
鲫鱼 <i>C. auratus</i>	XP_026136346.1	97.32
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	XP_016413698.1	97.00
香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i>	AHK05949.1	95.00
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	NP_001098234.1	95.00
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	XP_019939045.1	93.67
黑鲷 <i>A. schlegelii</i>	ABQ96860.1	92.33
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	AVV62220.1	67.10
人 <i>Homo sapiens</i>	CAA50465.1	66.78
小鼠 <i>M. musculus</i>	AAL40744.1	61.33

*sapiens*)、小鼠等哺乳动物聚为一支,两栖类单独聚为一支(图 5)。其中,拟赤梢鱼与斑马鱼、翘嘴鲌 *sox3* 基因氨基酸序列相似度最高,与人、鼠和原鸡(*Gallus gallus*)等较高等脊椎动物的亲缘关系较远。

### 2.5 拟赤梢鱼 *sox3* 基因组织特异性表达分析

如图 6 所示, *sox3* 基因在拟赤梢鱼肝、肾、心、

脾、肠、脑、鳃、肌肉、眼和性腺 10 种组织中的表达水平存在显著差异( $P < 0.05$ ),在卵巢中表达量最高,脑次之,眼睛再次之,在精巢和其他组织中均微量表达。此外, *sox3* 基因在性腺中的表达具有显著的性别差异( $P < 0.05$ ),卵巢中的表达量约为精巢中表达量的 46 倍,而在其他组织中的表达无性别差异( $P > 0.05$ )。

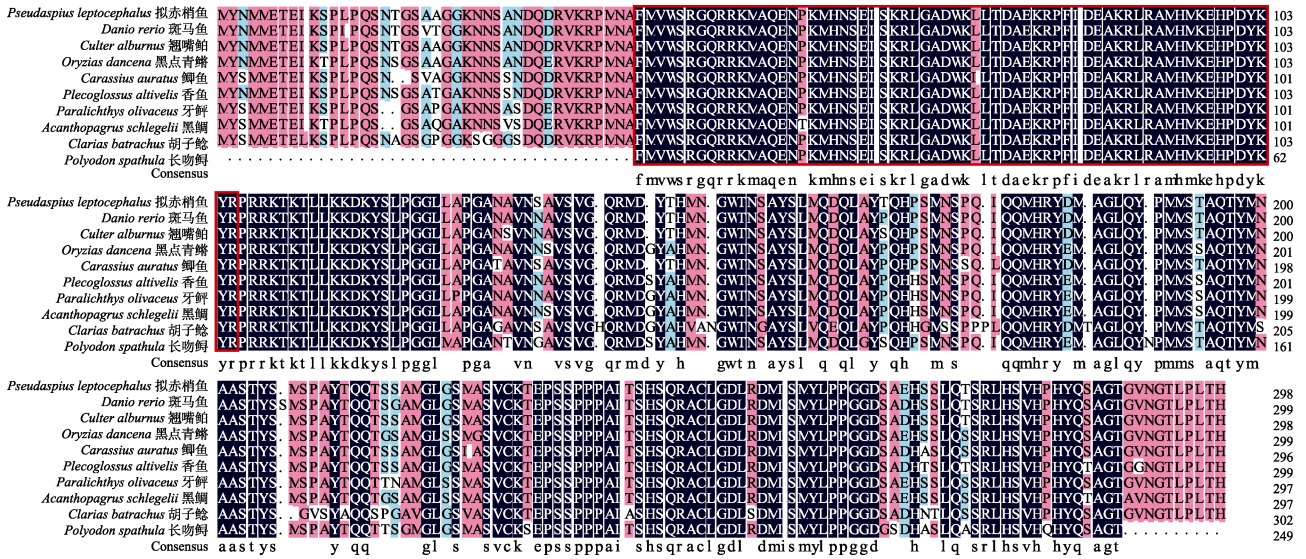


图 3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性比对

Fig.3 Homology comparison of amino acid sequence of *P. leptocephalus* SOX3

红色方框: HMG 结构域 Red box: HMG domain

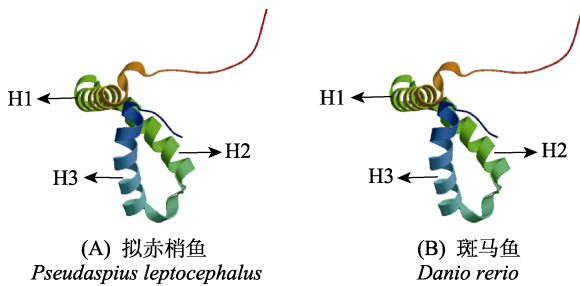


图 4 拟赤梢鱼与斑马鱼 SOX3 蛋白分子三级结构

Fig.4 The spatial structure of SOX3 proteins of *P. leptocephalus* (A) and *Danio rerio* (B)

α 螺旋用 H1~H3 表示。

Alpha helices are indicated as H1~H3.

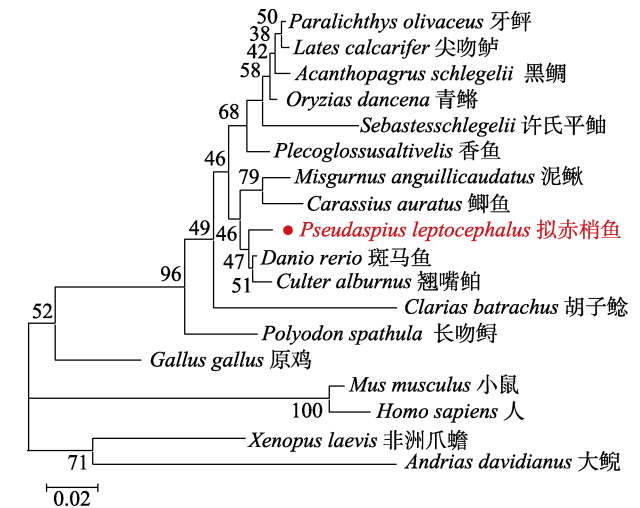
### 2.6 拟赤梢鱼 *sox3* 基因在早期性腺发育阶段的表达分析

根据组织切片结果选择未分化性腺、卵巢和精巢 3 种类型性腺样品检测 *sox3* 基因表达量, *sox3* 基因在上述 3 种不同类型性腺中的表达存在显著差异,卵巢

图 5 拟赤梢鱼与其他脊椎动物 *sox3* 基因构建的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of *sox3* of *P. leptocephalus* and other species

中 *sox3* 基因表达量显著高于未分化性腺和精巢 ( $P < 0.05$ ),精巢中的表达量最低,仅为卵巢表达量的 1/8 (图 7-A)。



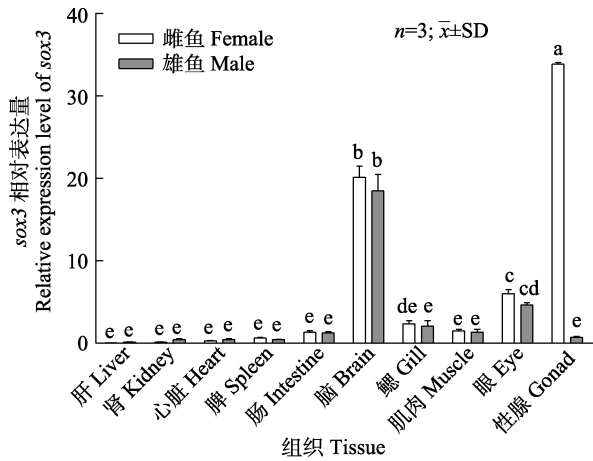


图 6 *sox3* 基因在拟赤梢鱼不同组织中的表达  
Fig.6 The expression levels of *sox3* in different tissues of *P. leptocephalus*

不同字母表示组织间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
Different letters indicate significant differences between tissues ( $P < 0.05$ ).

在 85~360 d 卵巢早期发育过程中, *sox3* 基因的表达呈显著上升的变化趋势。其中, 360 d 时, *sox3* 基因表达量约为 85 d 时的 127 倍, 成熟卵巢中 *sox3* 基因的表达量显著高于 85 d、160 d 卵巢发育期 ( $P > 0.05$ ), 但显著低于 260 d、360 d 发育期 ( $P > 0.05$ ); 在孵化后 85 d、360 d 的精巢发育过程及成熟精巢中, *sox3* 基因表达量在各发育阶段无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 始终微量表达(图 7-B)。

### 3 讨论

目前, 关于鱼类性腺分化时间及特征主要从解剖学和细胞学特征来区分, 如卵巢腔、输精管、精小叶的发生(刘亚秋等, 2019; 刘淑琰, 2017); 而细胞学分化主要是以生殖细胞的减数分裂为标志(Nagasawa *et al*, 2013), 但这一划分标准仍存在一定的争议。不同鱼类早期性腺分化时的结构特征存在显著差异, 如南方鲇(*Silurus meridionalis*)性腺横切面呈梨形的分化为卵巢, 呈长条形的将分化成精巢(张修月等, 2005); 而大黄鱼(*Larimichthys crocea*)早期性腺呈梨形的分化成精巢, 呈长条形的分化成卵巢(游秀荣, 2012)。

鱼类的性腺分化方式主要分为两类, 一类是由原始性腺直接发育为精巢或卵巢, 称为可分化的雌雄异体型(刘晨斌等, 2019), 如四大家鱼(刘晓蕾, 2013); 另一类是先由原始性腺发育为类卵巢结构, 类卵巢继续发育为卵巢, 结构退化的类卵巢则发育为精巢, 称为不分化的雌雄异体型, 如斑马鱼(王晶等, 2011)等。本研究结果显示, 拟赤梢鱼原始性腺在孵化后 40 d 时, 出现椭圆形和梭形 2 种形态差异显著的原始性腺; 孵化后 45 d 的椭圆形性腺首次出现卵巢腔结构, 标志着卵巢分化的开始; 75 d 时, 梭形性腺中出现精细小管及精原细胞, 标志着精巢分化形成。在拟赤梢鱼性腺分化期间, 未发现类卵巢结构特征的原始性腺, 因此, 本研究认为拟赤梢鱼性腺分化方式属于可分化的雌雄异体型。

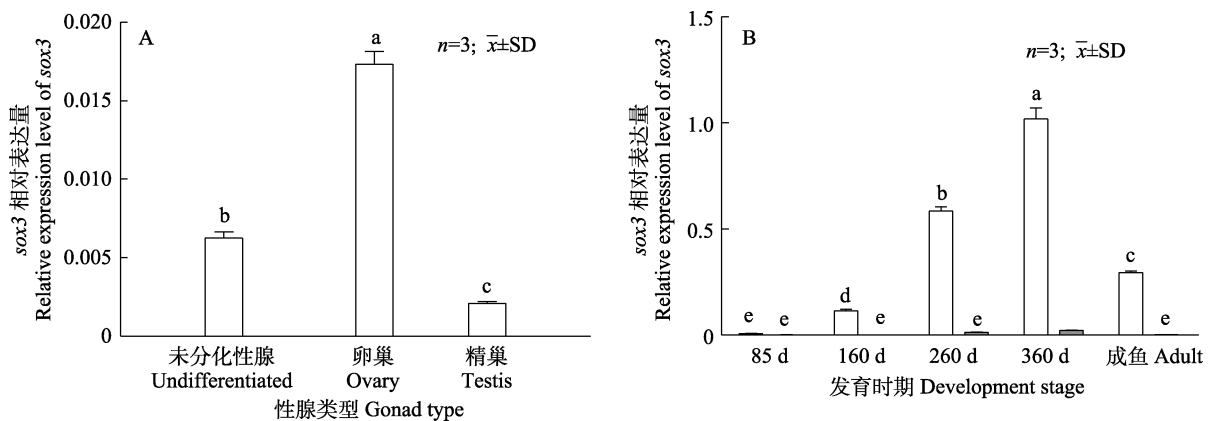


图 7 拟赤梢鱼 *sox3* 基因在性腺分化、发育不同阶段中的表达  
Fig.7 Expression of *sox3* of *P. leptocephalus* during different gonad differentiation and development stages

A: 性腺分化阶段; B: 卵巢分化后。不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
A: Gonad differentiation stages; B: Gonad development stages after differentiation.  
Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

鱼类性腺分化的时间存在种属差异,青鳉(*Oryzias latipes*)(张静, 2013)在孵化后 5~10 d 发生性腺分化,人工养殖的中华鲟(*Acipense sinensis*)(陈细华等, 2004)性腺直至 9 月龄才开始分化,而同属鲤科鱼类的鲫鱼(*Carassius auratus*)(岳敏娟等, 2009)与拟赤梢鱼性腺分化时间相近,在 2 月龄开始出现分化。此外,大多数硬骨鱼类卵巢分化要早于精巢分化(Rasmussen *et al*, 2006),如黄河鲤(*Cyprinus carpio*)(Jiang *et al*, 2019)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)(李冰玉等, 2021);在本研究中拟赤梢鱼卵巢分化较精巢早约 30 d。

拟赤梢鱼及其他硬骨鱼类和哺乳动物的 *sox3* 基因同源比较和系统进化树分析结果表明,拟赤梢鱼 *sox3* 基因与硬骨鱼类聚为一簇,且 SOX3 蛋白与同属鲤科鱼类翘嘴鲌和斑马鱼 SOX3 蛋白的 HMG 结构域高度一致,亲缘关系最近,这表明 *sox3* 基因在进化上具有一定保守性。拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三维结构与 Hou 等(2017)报道 SOX3 蛋白结构相一致,3 个  $\alpha$  螺旋组成的空间结构是一个 L 型,便于结合 DNA 分子。HMG 结构域能够识别 DNA 特异性结合位点,SOX 蛋白可以依靠 HMG 与目的 DNA 结合,进而调节目的基因的转录(贺超等, 2017),其高度保守性保证了 *sox3* 基因在不同物种间功能的发挥。

*sox3* 基因参与生物体性腺分化与发育的整个过程,在性别分化和性腺发育中起着不可或缺的作用(Cheah *et al*, 2015)。目前,关于 *sox3* 基因在鱼类性腺发育中的具体功能还存在一定的争议。在许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)卵巢分化和卵子发生时, *sox3* 基因发挥着重要作用(Ma *et al*, 2019);而在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)中的 *sox3* 基因在精巢中表达量强于卵巢(Shin *et al*, 2009)。本研究中检测到 *sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢中表达量最高,脑次之,其次是眼睛,在精巢等其他组织中均微量表达,具有显著的组织特异性;切片结果可知,卵巢分化早于精巢,孵化后 75 d 精巢出现分化,在该时期同时存在未分化性腺、卵巢和精巢 3 种类型性腺, *sox3* 基因在卵巢中的表达显著高于未分化性腺,而在精巢中的表达处于较低水平,由不同性腺类型表达差异推测, *sox3* 基因可能在拟赤梢鱼卵巢分化过程中发挥一定作用。拟赤梢鱼孵化后 160 d,卵巢发育开始进入 II 期,此时 *sox3* 基因转录水平显著升高,显著高于成熟期卵巢,在精巢中始终持续低水平表达,由组织特异性结果显示, *sox3* 基因在维持拟赤梢鱼卵巢发育过程中可能发挥更重要的作用。这与斑马鱼中的研究结果相一致(Qiang *et al*, 2019)。 *sox3* 基因同样参与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)卵巢发生和功能维持,在其未

成熟卵巢中大量表达,在卵母细胞成熟期微弱表达(姚波等, 2003)。

*sox3* 基因还广泛参与软骨组织生成、血细胞形成以及心脏和神经系统发生发育等(郭稳杰等, 2014)。本研究结果显示, *sox3* 基因在拟赤梢鱼眼睛和脑组织中存在较高表达,这与之前的报道相一致(Kamachi *et al*, 2013)。推测 *sox3* 基因参与鱼类眼睛晶状体和神经系统的发育。

## 参 考 文 献

- CHEAH P S, THOMAS P Q. *sox3* expression in the glial system of the developing and adult mouse cerebellum. SpringerPlus, 2015, 1(4): 400–407
- CHEN X H, WEI Q W, YANG D G, *et al*. Histological studies on gonadal origin and differentiation of cultured *Acipenser sinensis*. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 633–639 [陈细华, 危起伟, 杨德国, 等. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究. 水产学报, 2004, 28(6): 633–639]
- GUO W J, YU X M. Cloning and sequence evolution analysis of *sox* genes in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 664–668 [郭稳杰, 俞小牧. 鳙 *sox* 基因克隆及序列进化分析. 水生生物学报, 2014, 38(4): 664–668]
- HE C, HONG G, WU J X, *et al*. Study on cloning and tissue expression of *sox9* in *Betta splendens*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 151–155 [贺超, 洪广, 吴静娴, 等. 泰国斗鱼 *sox9* 基因的克隆及组织表达研究. 安徽农业科学, 2017, 45(8): 151–155]
- HOU L, SRIVASTAVA Y, JAUCH R. Molecular basis for the genome engagement by SOX proteins. Seminars in Cell Developmental Biology, 2017, 63: 2–12
- JIANG M, JIA S, CHEN J, *et al*. Timing of gonadal development and dimorphic expression of sex-related genes in gonads during early sex differentiation in the Yellow River carp. Aquaculture, 2020, 518: 734825
- KAMACHI Y, KONDOH H. SOX proteins: Regulators of cell fate specification and differentiation. Development, 2013, 140(20): 4129–4144
- LI B Y, WEN H S, WANG L Y, *et al*. Histology of gonadal differentiation and expression analysis of sex-related genes *cyp11b* and *cyp19a1a* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 185–193 [李冰玉, 温海深, 王灵钰, 等. 花鲈性腺分化组织学及性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 185–193]
- LI M D. The ecology of economic fishes in China. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2011, 28–30 [李明德. 中国经济鱼类生态学. 天津: 天津科学技术出版社, 2011, 28–30]
- LIU C B, XU G F, HUANG T Q, *et al*. A review of research progress on gonadal development in fish. Chinese Journal of

- Fisheries, 2019, 32(1): 46–54 [刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46–54]
- LIU S Y. The occurrence and development of the testis and the sperm characteristics of *Silurus asotus*. Master's Thesis of Henan Normal University, 2017 [刘淑琰. 鲌精巢发生、发育规律及其精子特性研究. 河南师范大学硕士研究生学位论文, 2017]
- LIU X L. Primary studies on sex differentiation and the ovary development and oogenesis of *Myxocyprinus asiaticus*. Master's Thesis of Southwest University, 2013 [刘晓蕾. 胭脂鱼性腺分化与卵巢发育和卵子发生的初步研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013]
- LIU Y Q, LI X H, LI Y F, *et al.* A histological study on gonadal development of black amur bream (*Megalobrama terminalis*). South China Fisheries Science, 2019, 15(1): 113–118 [刘亚秋, 李新辉, 李跃飞, 等. 广东鲂性腺发育组织学研究. 南方水产科学, 2019, 15(1): 113–118]
- MA L M, WANG W J, SHANG R J, *et al.* Characterization of *sox3* gene in an ovoviviparous teleost, black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Journal of Ocean University of China, 2019, 18(2): 431–440
- NAGASAWA K, FERNANDES J, YOSHIZAKI G, *et al.* Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of *vasa*, *dead end*, and lymphocyte antigen 75 genes. Molecular Reproduction and Development, 2013, 80(2): 118–131
- QIANG H, CONG L, YING R, *et al.* Loss-of-function of *sox3* causes follicle development retardation and reduces fecundity in zebrafish. Protein Cell, 2019, 10(5): 347–364
- RAJAKUMAR A, SRNTHILKUMARAN B, *et al.* Expression analysis of *sox3* during testicular development, recrudescence, and after hCG induction in catfish, *Clarias batrachus*. Sexual Development, 2014, 8(6): 376–386
- RASMUSSEN T H, JESPERSEN A, KORSGAARD B. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarces viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): A histological and ultrastructural study. Journal of Morphology, 2006, 267(9): 1032–1047
- SHIN H S, AN K W, PARK M S, *et al.* Quantitative mRNA expression of *sox3* and *dmrt1* during sex reversal, and expression profiles after *GnRH $\alpha$*  administration in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154(1): 150–156
- WANG J, WANG B, LI J T, *et al.* Histologicals observation of zebrafish gonads developments. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(2): 168–174 [王晶, 王冰, 李纪同, 等. 斑马鱼性腺发育的组织学观察. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(2): 168–174]
- WU S F, ZHANG Y, MA B, *et al.* Evaluation of nutritional quality and proximate composition in the muscle of *Pseudaspius leptocephalus* in Ussuri River. Journal of Biology, 2016, 33(6): 52–56 [吴善福, 张颖, 马波, 等. 乌苏里江拟赤梢鱼肌肉营养成分分析与品质评价. 生物学杂志, 2016, 33(6): 52–56]
- XU K, YANG H B, PAN H, *et al.* Function and mutation of *sox3* gene. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(8): 1214–1216 [许可, 阳洪波, 潘慧. *sox3* 基因的功能及其突变. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(8): 1214–1216]
- YANG J, GENG L W, WANG Y, *et al.* Embryonic and larval-juvenile developmental characteristics of *Pseudaspius leptocephalus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 636–644 [杨建, 耿龙武, 王雨, 等. 拟赤梢鱼的胚胎发育和仔稚鱼生长特性观察. 水生生物学报, 2021, 45(3): 636–644]
- YAO B, ZHOU L, GUI J F. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *sox3* gene in grouper *Epinephelus coioides*. High Technology Letters, 2003, 13(5): 74–81 [姚波, 周莉, 桂建芳. 斜带石斑鱼 *sox3* 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯, 2003, 13(5): 74–81]
- YOU X R. Histological studies on the origin and migration of the primordial germ cells and gonadal sex differentiation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [游秀荣. 大黄鱼原始生殖细胞发生、迁移及性腺性别分化的组织学研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]
- YUE M J, YOU Y L, LIN D. The influence of temperature on sex differentiation of *Carassius auratus*. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(1): 9–16 [岳敏娟, 尤永隆, 林丹. 温度对鲫鱼性腺分化的影响. 动物学杂志, 2009, 44(1): 9–16]
- ZHANG J. Expression analysis of *dmy* and *dmrt1*, involved in gonad sexual differentiation and histological observation of Medaka, *Oryzias latipes*, gonadal sex development. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 26 [张静. 青鳉性腺发育的组织学观察和 *dmy*、*dmrt1* 基因的表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 26]
- ZHANG J M. Fishes of Heilongjiang Province. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1995, 243–245 [张觉民. 黑龙江省鱼类志. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995, 243–245]
- ZHANG X Y, JIAO B W, WU T L, *et al.* Histological observation on gonadal sex differentiation in the southern catfish, *Silurus meridionalis*. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(1): 41–48 [张修月, 焦保卫, 吴天利, 等. 南方鲶性腺分化的组织学观察. 动物学杂志, 2005, 40(1): 41–48]
- ZHANG Y, MA B, ZHANG Y Q, *et al.* Artificial method of oxytocin in *Pseudaspius leptocephalus*, CN105340791A. 2016–2–24 [张颖, 马波, 张永泉, 等. 拟赤梢鱼人工催产方法, CN105340791A. 2016-2-24]



## Early Ovary Development, *sox3* Gene cDNA Cloning and Expression Analysis of *Pseudaspius leptcephalus*

WANG Yu<sup>1,2,3</sup>, XU Wei<sup>1,2①</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>, GENG Longwu<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuting<sup>1,2,3</sup>

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province, Harbin 150070, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** *Pseudaspius leptcephalus* is the famous indigenous fish in Northeast China region, with very important economic and research value. In recent years, environmental pollution and overfishing has caused it to become increasingly scarce. We performed *P. leptcephalus* conservation research, including clarifying the characteristics of ovarian development and the role of the *sox3* gene (SRY-related high-mobility-group-box 3) in the ovarian development of *P. leptcephalus*. The histological characteristics of *P. leptcephalus* ovarian development were investigated using the paraffin section technique. The full length of the cDNA of the *sox3* gene was cloned and analyzed using Rapid Amplification of cDNA End (RACE) technology. The expression pattern of the *sox3* gene in different tissues and at different gonad development stages were analyzed using real-time PCR.

The results revealed the ovarian cavity was clearly visible in the elliptical gonads, indicating ovary formation occurs around 45 d. At 160 d, the nucleoli of the oocytes in the ovaries were distributed along the nucleus and the testis was preparing to form seminiferous lobules and began to enter early stage II development. At 260 d of ovarian development, the yolk nucleus appeared in the cytoplasm of some ovary oocytes, and the ovaries entered the middle stage II phase. Also at 260 d, the number of secondary spermatocytes in the testis increased, and remained at stage II until 360 d (when the study ceased). The differentiation of the testis began later than that of the ovaries. This result is consistent with the gonadal development in most fish. The results indicate the cDNA of the *sox3* gene in *P. leptcephalus* is 1 800 bp (GenBank: MT952206), and encodes 299 amino acids. Among them, the protein contains an HMG conserved domain. The alignment of the amino acid sequence and the phylogenetic tree analysis indicates the SOX3 sequence in *P. leptcephalus* contains highly conserved regions. These regions are highly consistent with the SOX3 sequences in *Danio rerio* and *Carassius auratus*. Furthermore, the RT-PCR demonstrated that *sox3* was highly expressed in the ovary, followed by the brain and eyes. Between the sexes, the expression level of the *sox3* gene only varied significantly in the gonads, with the *sox3* gene expression in the ovary being significantly higher than that in the testis. In the early stage of gonadal differentiation, the expression of *sox3* in the ovaries is obviously higher than that in undifferentiated gonads. The lowest expression levels were detected in the testis. In the developmental stage after gonadal differentiation, *sox3* was continuously expressed throughout ovarian development, while the expression in the testis remained at a low level. Therefore, the *sox3* gene might play an important role in ovary differentiation and development when compared to the testis, but its specific function and mechanism require further research.

**Key words** *Pseudaspius leptcephalus*; Ovarian development; *sox3*; Gene cloning; Gene expression

① Corresponding author: XU Wei, E-mail: xwsc23@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220303003

http://www.yykxjz.cn/

杜博博, 姚璐, 李治平, 董迎辉, 任建峰. 缢蛏 Toll 样受体家族基因全基因组水平鉴定及其在弧菌刺激下的表达分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 155-166

DU B B, YAO L, LI Z P, DONG Y H, REN J F. Genome-wide identification of Toll-like receptor family genes in *Sinonovacula constricta* and their expression in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 155-166

# 缢蛏 Toll 样受体家族基因全基因组水平鉴定 及其在弧菌刺激下的表达分析\*

杜博博<sup>1,3</sup> 姚璐<sup>1,3</sup> 李治平<sup>1,3</sup> 董迎辉<sup>2</sup> 任建峰<sup>1,3</sup>①

(1. 上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306;

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 315000;

3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

**摘要** 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国传统的四大海水养殖贝类之一, 养殖过程中易受病原菌感染而造成大量死亡和经济损失。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是目前研究最多的模式识别受体, 在无脊椎动物的先天性免疫中发挥着重要作用。研究缢蛏 TLR 分子特征及其免疫功能对预防和控制病原菌感染至关重要。本研究从缢蛏基因组序列中鉴定出 42 个 TLR 基因(*ScTLR*), 其中, 33 个编码典型的 TLR 蛋白, 其他 9 个为 TLR 样蛋白。根据蛋白结构域特点, 将典型的 TLR 蛋白分为 2 大类 4 个亚类, 一类为多半胱氨酸簇 TLR (*mccTLR*), 包括 1 个 P 型 TLR 和 7 个 sPP 型 TLR; 另一类为单半胱氨酸簇 TLR (*sccTLR*), 包括 16 个 sP 型 TLR 和 9 个 Ls 型 TLR。与其他 9 种软体动物 TLR 基因的类型和数目比较结果显示, 缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 TLR, 起源古老的 *mccTLR* 类群在软体动物中没有大规模的扩张, 而起源较晚的 *sccTLR* 类群却发生了大规模的扩张。荧光定量 PCR 分析显示, 6 种 *ScTLR* 在检测的 7 种组织中普遍表达, 且在血细胞、鳃和肝胰腺组织中高表达。最后, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)胁迫 12 h 和 48 h 的缢蛏鳃和肝胰腺转录组数据分析显示, 副溶血弧菌感染前后 9 个 TLR 基因在鳃或肝胰腺中的表达量发生显著变化, 6 个基因(*ctg118.25*、*ctg118.26*、*ctg356.25*、*ctg774.6*、*ctg681.6* 和 *ctg1513.5*)在感染 12 h 或 48 h 后的鳃组织中表达差异显著, 前 5 个基因表达量上调, 仅 *ctg1513.5* 表达量下调; 3 个基因(*ctg467.9*、*ctg2496.3* 和 *ctg903.17*)在感染 12 h 或 48 h 后的肝胰腺中表达差异显著, 其中, *ctg467.9* 和 *ctg2496.3* 表达量下调, *ctg903.17* 表达量上调。综上所述, 本研究结果将为深入探讨不同 TLR 基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供研究基础。

**关键词** 缢蛏; Toll 样受体; 弧菌刺激; 表达分析

中图分类号 K826.15 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0155-12

贝类作为一种无脊椎动物, 体内不存在特异性免疫细胞和相应的抗体, 主要依靠先天性免疫系统发挥

免疫功能。先天性免疫反应的第一步是通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来感知病原体

\* 宁波市科技创新 2025 重大专项(2019B10005)资助。杜博博, E-mail: 1243146339@qq.com

① 通信作者: 任建峰, 副研究员, E-mail: jfren@shou.edu.cn

收稿日期: 2022-03-03, 收修改稿日期: 2022-04-11

相关的分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP), 启动特定的信号通路, 抵御病原体的入侵(Medzhitov, 2007)。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是研究最广泛和深入的模式识别受体之一, 在先天性免疫系统中发挥着重要功能。果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 Toll-1 是第一个被发现的 TLR, 其通过激活转录因子 NF- $\kappa$ B 信号通路来指导胚胎的早期发育(Medzhitov *et al.*, 1998), 随后证实 Toll 基因在果蝇抗感染免疫方面也发挥重要的作用(Lemaitre *et al.*, 1997)。典型的 TLR 蛋白包括 3 个主要的结构域, 一是富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)的胞外结构域; 二是跨膜结构域(transmembrane domain, TMD); 三是含有 TIR (Toll/interleukin-1 receptor)的胞内结构域。根据其胞外结构域的变化, TLR 可分为两大类: 单半胱氨酸簇 TLR (single cysteine cluster TLR, sccTLR)和多半胱氨酸簇 TLR (multiple cysteine cluster TLR, mccTLR), sccTLR 的特征是在 LRR 的 C-末端存在 1 个与细胞膜并列的半胱氨酸簇, 而 mccTLR 胞外结构域具有 2 个或更多的半胱氨酸簇(Leulier *et al.*, 2008)。Brennan 等(2018)推测, mccTLR 起源于刺胞动物门(Cnidaria), 而 sccTLR 类群在软体动物门(Mollusca)显著扩张, TLR 在低等生物体中具有免疫和发育双重功能。

TLR 基因作为先天免疫的重要组成部分, 在脊椎动物中受到广泛研究, 但海洋无脊椎动物 TLR 的分子特征和功能的研究仍处于初步阶段。相对于脊椎动物, 海洋无脊椎动物基因组中 TLR 数目均存在不同程度的扩张现象。前期的研究表明, 在文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)和海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)中分别鉴定出 72 个和 222 个 TLR (Satake *et al.*, 2012); Toubiana 等(2013)在地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中通过转录组数据鉴定出 23 个 TLR, 其中, 3 个 TLR 为 mccTLR, 其他 TLR 均属于 sccTLR; Zhang 等(2015)从长牡蛎(*Crassostrea gigas*)基因组中注释得到 83 个 TLR, 根据蛋白结构域的特点, 将其分为 V、P、sP、sPP 和 Ls 共 5 种类型, 其中 19 个 TLR 在病毒和细菌的刺激下差异表达; Gorbushin (2020)从厚壳玉黍螺(*Littorina littorea*)血细胞转录组中鉴定出 43 个 TLR, 根据 TLR 蛋白的最新分类标准, 将它们分为 V 型和 Twin-TIR 型两类; 除此之外, Ren 等(2021)从菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)转录组文库中鉴定出 8 个 TLR, 并将其分为 V、P、sP 和 Ls 型。

贝类生活在水体中, 易受病原菌的感染, 如弧菌(*Vibrio*)和病毒对贝类养殖产业产生极大危害并造成严重的经济损失(张颖雪等, 2020; 白昌明等, 2021)。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国传统的四大海水养殖贝类之一, 广泛分布于西太平洋沿岸的潮间带和河口水域(Zhao *et al.*, 2017)。然而, 随着养殖环境恶化及各种细菌病毒病的暴发, 给缢蛏养殖产业带来较大的经济损失, 因此, 深入了解缢蛏的免疫防御机制有利于制定有效的抗病策略。先前的研究表明, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后, 缢蛏鳃和肝胰腺组织中部分免疫相关的基因发生了应答(Zhao *et al.*, 2017); 急性高温胁迫下缢蛏的免疫反应也会发生很大的变化(孔祥辉等, 2022)。然而, 对缢蛏免疫相关信号通路的研究仍相对较少, 仅少数免疫基因被克隆和表征, 如组织蛋白酶(Niu *et al.*, 2013a、b)、纤维蛋白原相关蛋白(Wu *et al.*, 2021)、肽聚糖识别蛋白(Meng *et al.*, 2022)以及 C-型凝集素(Xu *et al.*, 2020)等。本文通过对缢蛏全基因组中 TLR 基因的鉴定和分类、其组织表达模式的分析以及副溶血弧菌感染前后其在鳃和肝胰腺免疫组织的表达变化研究, 进一步了解缢蛏 TLR 基因的扩张现象, 并为深入探讨不同 TLR 基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供研究基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 缢蛏 TLR 基因鉴定

基于已有的缢蛏全基因组数据(Dong *et al.*, 2020), 对 TLR 家族基因进行全基因组范围内的鉴定。从 Pfam 蛋白质家族数据库(<http://pfam.xfam.org/>)查询 TIR 结构域(PF01582)和 LRR 结构域(PF13855)的 Pfam 编号, 基于缢蛏全基因组编码基因蛋白序列的 InterProScan 分析结果文件, 根据 Pfam 编号, 对同时包含 LRR 和 TIR 两种结构域的蛋白编码基因进行检索。利用检索获得的基因蛋白序列作为种子序列, 通过 TBLASTN 程序在全基因组 DNA 序列内进一步鉴定出基因组注释过程中未正确注释出的 TLR 基因。通过 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对已鉴定的 TLR 蛋白结构域进一步分析和确认, 结构域对比结果阈值设定为  $E < 1 \times 10^{-5}$ 。完整的 TLR 蛋白序列应该至少由 LRR 和 TIR 两个结构域组成, 且具有较高的序列保守性。对于蛋白结构域不完整的 TLR 基因, 利用 Softberry 网站(<http://www.softberry.com/>)

的 FGENESH<sup>+</sup> 在线基因预测程序, 利用基因组序列对其基因结构进行校正。基于校正后的基因序列进行数据分析(缢蛏 *TLR* 基因 cDNA 和蛋白序列见 <https://figshare.com/s/958beb427d81530b78a0>)。

## 1.2 软体动物 *TLR* 家族基因的比较和系统发育分析

对软体动物 4 个纲 9 个代表物种[多板纲: 石鳖 (*Acanthopleura granulata*); 头足纲: 中国真蛸 (*Octopus vulgaris*); 腹足纲: 加州海兔 (*Aplysia californica*)、福寿螺 (*Pomacea canaliculata*)、霸王莲花青螺 (*Lottia gigantea*); 双壳类: 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*)、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)、长牡蛎]的 *TLR* 家族基因进行分类, 并与缢蛏 *TLR* 基因分类进行比较。*TLR* 基因分类基于其蛋白结构域序列, 根据 Gerdol 等(2017)提出的方法进行。本研究 9 种软体动物校正的 *TLR* 蛋白序列参考王璐等(2021)。

获取缢蛏全长 *TLR* 蛋白序列中保守的 TIR 结构域, 利用 ClustalW (Thompson *et al*, 1994)对 TIR 蛋白序列进行多重序列比对, 然后再利用 MEGA7 软件 (Kumar *et al*, 2016) 基于邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树, 使用 P-distance 模型及 Bootstrap 抽样自展法估算进化树分支节点的支持率, 重复数为 1 000。系统发育树结果用 iTOL (<https://itol.embl.de/index.shtml>) (Letunic *et al*, 2016) 进行可视化。

## 1.3 实验样品与组织收集

本实验所用缢蛏的平均壳长为(6.7±0.2) cm, 湿重为(12.0±0.5) g, 采自浙江省台州市三门县。实验前, 将缢蛏在水温为 20 °C、盐度为 20 的海水中暂养 1 周, 然后随机挑选 9 只健康个体, 用 1 mL 的注射器从闭壳肌采集血淋巴, 立即于 4 °C 800 g 离心 10 min, 弃上清液, 获得血细胞。加入 1 mL TRIzol (诺唯赞 R401-01) 重悬血细胞, 提取血细胞总 RNA。然后再收集外套膜、斧足、水管、鳃、性腺和肝胰腺等组织样品, 放入 RNase-free 的离心管中, 立即液氮速冻, 然后放入 -80 °C 冰箱保存备用。将 60 只规格一致、暂养 1 周的缢蛏随机分为 2 组, 即细菌攻毒组和对照组, 每组各 30 只。用 1 mL 注射器向攻毒组缢蛏的斧足中注射 100 μL PBS 稀释后浓度为 1×10<sup>8</sup> CFU/mL 的副溶血弧菌, 对照组注射相同体积的 PBS 无菌缓冲液。于注射后 12 h 和 48 h 后分别从实验组和对照组随机选取 6 只缢蛏, 收集鳃和肝胰腺组织, 提取总 RNA, 每组选取 3 只缢蛏合格 RNA 用于转录组文库的构建和测序。

## 1.4 RNA 的提取

使用 TRIzol (诺唯赞 R401-01) 提取缢蛏各组织总 RNA, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳分别检测其浓度和完整性。将提取的 RNA 放入 -80 °C 冰箱保存备用。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 分析

为探究缢蛏 *TLR* 基因在成体组织中的表达模式, 从 33 个结构域完整的 *TLR* 基因中随机选取 6 个基因, 分别为 *mccTLR* 类中的 *ctg294.3* (sPP 型)、*ctg1017.8* (sPP 型) 和 *ctg1228.10* (P 型) 及 *sccTLR* 类中的 *ctg1513.3* (Ls 型)、*ctg5741.1* (sP 型) 和 *ctg169.28* (Ls 型)。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对其在健康成体组织中的表达水平进行定量分析。具体步骤如下: 将缢蛏 7 种组织的 RNA, 分别利用 HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (诺唯赞 R223-01) 试剂盒反转录成 cDNA, 然后以 18S rRNA 为内参基因, 进行 qRT-PCR 定量(表 1)。定量反应利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 预混液(诺唯赞 Q712), 在 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 II 荧光定量 PCR 系统上进行。反应体系: 10 μL 2× SYBR qPCR Master Mix, 0.4 μL 正向引物(0.4 μmol/L), 0.4 μL 反向引物(0.4 μmol/L), 2 μL cDNA 模板, ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。采用两步法程序进行反应: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 进行 40 个循环。健康缢蛏组织 *TLR* 基因的表达模式分析, 以血细胞中阈值循环数 (*C<sub>T</sub>* 值) 作为对照, 计算 *TLR* 在其他组织(实验组)中的表达水平。将血细胞(对照组)和其他组织(实验组)的 mRNA 表达水平标准化到同一样本的 18S rRNA 基因表达水平。实验重复 3 次, 以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算基因的表达量。使用 GraphPad Prism 8.4.3 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及作图, 其中, *P*<0.05 表示差异显著, *P*>0.05 表示差异不显著。

## 1.6 弧菌感染后缢蛏 *TLR* 基因响应分析

将转录组测序得到的干净读段 (clean reads) 使用 HISAT2 软件将比对到缢蛏参考基因组上 (Mortazavi *et al*, 2008), 然后, 根据比对结果利用 FeatureCounts 统计每个基因上的读段数目 (Liao *et al*, 2014)。最后, 利用 DESeq2 进行不同样品组间差异基因表达分析 (Love *et al*, 2014), 从分析结果中检索 42 个 *TLR* 基因的表达量数据绘制热图, 根据差异表达基因绘制维恩图。差异表达标准为 |log<sub>2</sub>FoldChange| >1 且 *P*<0.05 (*TLR* 基因在不同样品中表达量的具体数值和统计分析结果见 <https://figshare.com/s/958beb427d81530b78a0>)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Tab.1 Sequence of primers used for qRT-PCR

基因编号 Gene ID	引物序列 Primer sequences (5'~3')	用途 Purpose
<i>ctg169.28</i>	F: GACGGCAACTGGATAAATAA R: TTGACAGAAGGAGGTGAAGC	qRT-PCR
<i>ctg294.3</i>	F: TACCCGAAGCCGATTATACGA R: TACCAACCAGCACTTGACGA	qRT-PCR
<i>ctg1228.10</i>	F: ATGTTCTATTACCTCGTCTTC R: TGACTCTATGCCTTCTTCT	qRT-PCR
<i>ctg5741.1</i>	F: CTGGAACGATTGGAAAAGTA R: CATCAAGGTTGCACAAGACA	qRT-PCR
<i>ctg1513.5</i>	F: AACTGGACTAATTGCGAACC R: GTCGGAAGTATTGTAGAAGAT	qRT-PCR
<i>ctg1017.8</i>	F: ATTGCATTGCGATTGTTATTCC R: GACAACACTCGGCACCACCA	qRT-PCR
18S rRNA	F: TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT R: CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参 Reference

## 2 结果与分析

### 2.1 缢蛭 TLR 家族基因全基因组水平的鉴定

基于氨基酸序列的相似性和蛋白结构域的组成,本研究在缢蛭全基因组序列中共鉴定出 42 个 TLR 基因(表 2)。通过对结构域编码不完整的 TLR 基因利用 FGENESH<sup>+</sup> 基因预测程序在基因组序列层面进行校正,并结合 SMART 网站对 TLR 蛋白结构域分析,结果显示,33 个 TLR 蛋白具有 LRR 结构域、跨膜结构域和胞内 TIR 结构域,为典型的完整 TLR 蛋白,其他 9 个为 TLR 样蛋白,其中,4 个 TLR 蛋白缺乏胞内 TIR 结构域,2 个缺乏跨膜结构域,1 个缺乏 LRR 结构域,其他 2 个缺乏 TIR 和 TM 结构域或 LRR 和 TM 结构域。

### 2.2 缢蛭 TLR 家族基因的分类和系统演化

基于胞外 LRR 结构域的特征,软体动物 TLR 可以分为两大类: sccTLR 和 mccTLR,并进一步细分为 6 个亚类(图 1),其中, sccTLR 包括 3 个亚类: (1) V 型 TLR,经典的 sccTLR,其 N 端和 C 端的 LRR 结构域(LRR-NT 和 LRR-CT)位于 LRR 两侧; (2) sP 型 TLR,类似于 V 型 TLR,但略短; (3) Ls 型 TLR,无 LRR-NT 结构域,胞外为不规范或退化的 LRR 结构域。mccTLR 也分为 3 个亚类: (4) P 型 TLR,类似于果蝇 *Toll* 基因,其特征是典型的 2 个 LRR 结构域被 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域分隔; (5) sPP 型 TLR,类似于 P 型 TLR,但略短; (6) Twin-TIR 型 TLR,类似

于 P 型和 sPP 型 TLR,但具有 2 个连续的 TIR 结构域(Gerdol *et al*, 2017)。此外,对于缺乏 LRR 或者 TIR 结构域的蛋白统称为 TLR 样蛋白(TLR-like protein)(Brennan *et al*, 2018)。缢蛭 42 个 TLR 基因包括 25 个 sccTLR、8 个 mccTLR 和 9 个 TLR 样蛋白(表 2)。为了更好地研究缢蛭 TLR 家族基因的结构和系统演化关系,将缢蛭 33 个完整 TLR 蛋白基于 TIR 结构域序列构建系统发育树。根据 TLR 结构域注释及系统发育分析发现,缢蛭的 33 个完整 TLR 分属在 4 个亚类,分别为 P 型、sPP 型、sP 型和 Ls 型,其中, sP 和 Ls 型 TLR 分散于进化树不同的亚支(图 2)。

### 2.3 软体动物 TLR 的分类比较

基于 TLR 蛋白结构域特点,并根据 Gerdol 等(2017)提出的 TLR 分类方法,进行包括缢蛭在内的 10 种软体动物 TLR 家族基因分类和数目比较(表 3)。从表 3 可以看出,缢蛭中不存在 V 型和 Twin-TIR 型 TLR,且 sccTLR 数目多于 mccTLR,其中, sccTLR 中的 sP 型 TLR 最多,有 16 个;而 mccTLR 中的 P 型 TLR 与大多数软体动物一样数目较少,仅有 1 个。此外,缢蛭中存在 9 个 TLR 样蛋白,这在大部分软体动物中都有发现,如长牡蛎和马氏珠母贝中分别有 6 个和 11 个。通过对 10 种软体动物 TLR 家族基因分类和数目比较可以看出,不同软体动物的 TLR 基因的数目存在较大差异,腹足纲的霸王莲花青螺仅有 16 个 TLR,而双壳纲的美洲牡蛎却有高达 130 个 TLR;作为同属的长牡蛎和美洲牡蛎,其 TLR 的数目也存在较大差异,长牡蛎有 83 个 TLR;除此之外, Ls 型和 sP 型 TLR 在软体动物中占主导地位,与其他类型的 TLR 相比数目明显偏多,且存在于脊椎动物中的 V 型 TLR 在部分软体动物中也存在,但数量较少,在 1~4 个之间。

### 2.4 缢蛭 TLR 基因在成体组织中的表达特征

TLR 基因成体组织表达特征分析结果显示,6 个 TLR 基因在所检测的 7 个组织中,包括血细胞、鳃、肝胰腺、性腺、斧足、外套膜和水管中均有不同程度的表达(图 3)。其中, *ctg294.3* (sPP 型)、*ctg1017.8* (sPP 型)和 *ctg1513.3* (Ls 型) 3 个基因均在血细胞中显著高表达( $P < 0.05$ ),其次是鳃,而在水管、外套膜和性腺等组织中表达量较低( $P > 0.05$ )。除血细胞外, *ctg294.3* 和 *ctg1513.3* 的表达量在其他组织间差异不显著,而 *ctg1017.8* 鳃组织与其他组织差异较显著( $P < 0.05$ )。 *ctg5741.1* (sP 型)和 *ctg169.28* (Ls 型) 2 个基因分别在肝胰腺和鳃中表达量最高( $P < 0.05$ ),在斧足和性腺中



表 2 缢蛏全基因组中鉴定出的 *TLRs*  
Tab.2 *TLRs* identified in the genome of *Sinonovacula constricta*

TLR 类型 TLR type	TLR 亚类 TLR subtype	基因编号 Gene ID	蛋白长度 Protein length /aa	结构域 Domain structure		
mccTLR	P 型	<i>ctg1228.10</i>	1 213	SP-LRR(18)-NT-LRR(3)-TM-TIR		
		<i>ctg1017.8</i>	755	LRR(5)-CT-NT-LRR(2)-CT-TM-TIR		
	sPP 型	<i>ctg294.1</i>	362	LRR(8)-CT-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg294.3</i>	710	LRR(2)-CT-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg1017.9</i>	269	SP-LRR(5)-CT-NT-LRR(2)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg1350.1</i>	1 155	SP-LRR(5)-CT-NT-LRR-CT-TM-TIR		
		<i>ctg356.25</i>	531	CT-NT-CT-TM-TIR		
		<i>ctg2.41</i>	601	CT-NT-LRR(1)-CT-TIR		
		sccTLR	sP 型	<i>ctg774.6</i>	750	SP-LRR(2)-NT-LRR-TM-TIR
				<i>ctg899.7</i>	835	SP-LRR(1)-NT-LRR(1)-TM-TIR
<i>ctg368.18_20</i>	774			SP-LRR(2)-NT-TM-TIR		
<i>ctg903.17</i>	224			SP-NT-LRR(7)-TM-TIR		
<i>ctg255.18</i>	564			LRR(6)-TM-TIR		
<i>ctg414.46</i>	880			SP-LRR(8)-TM-TIR		
<i>ctg1193.4</i>	864			SP-LRR(9)-TM-TIR		
<i>ctg58.57</i>	606			SP-LRR(2)-TM-TIR		
<i>ctg730.10</i>	251			LRR(1)-TM-TIR		
<i>ctg58.54</i>	438			SP-LRR(2)-TM-TIR		
<i>ctg118.25</i>	607			LRR(1)-TM-TIR		
<i>ctg118.26</i>	393			LRR-TM-TIR		
<i>ctg2496.3</i>	408			CT-TM-TIR		
<i>ctg467.9</i>	705			SP-NT-LRR(7)-CT-TM-TIR		
<i>ctg5741.1</i>	705			SP-NT-LRR(7)-CT-TM-TIR		
<i>ctg467.8</i>	705			SP-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
Ls 型	<i>ctg1105.25</i>			945	CT-TM-TIR	
	<i>ctg4463.3</i>			1 030	CT-TM-TIR	
	<i>ctg169.28</i>			725	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR	
	<i>ctg169.30</i>	723	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg169.29</i>	723	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg109.1</i>	737	SP-LRR(5)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg18.55</i>	735	LRR(9)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg1513.3</i>	455	LRR(1)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg1513.5</i>	733	SP-LRR(10)-CT-TM-TIR			
	TLR 样蛋白 TLR-like protein	无 TM 结构域 No TM domain	<i>ctg681.6</i>	409	SP-LRR(4)-TIR	
	无 TIR 结构域 No TIR domain	<i>ctg242.33</i>	615	LRR(9)-TIR		
		<i>ctg58.58</i>	558	LRR(6)-TM		
	无 LRR 结构域 No LRR domain	<i>ctg375.2</i>	601	SP-LRR(4)-TM		
		<i>ctg730.9</i>	630	SP-LRR(7)-TM		
		<i>ctg375.3</i>	855	LRR(5)-TM		
	其他 Others	<i>ctg356.23</i>	239	TM-TIR		
		<i>ctg1472.2</i>	96	TIR		
		<i>ctg1184.1</i>	466	SP-NT-LRR(8)		

注: LRR: 亮氨酸重复序列; TM: 跨膜结构域; TIR: TIR 结构域; SP: 信号肽; CT: LRR 的 C 末端; NT: LRR 的 N 末端。

Note: LRR: Leucine-rich repeat; TM: Transmembrane domain; TIR: Toll/interleukin-1 receptor domain; SP: Signal peptide; CT: C-terminus of the LRR; NT: N-terminus of the LRR.

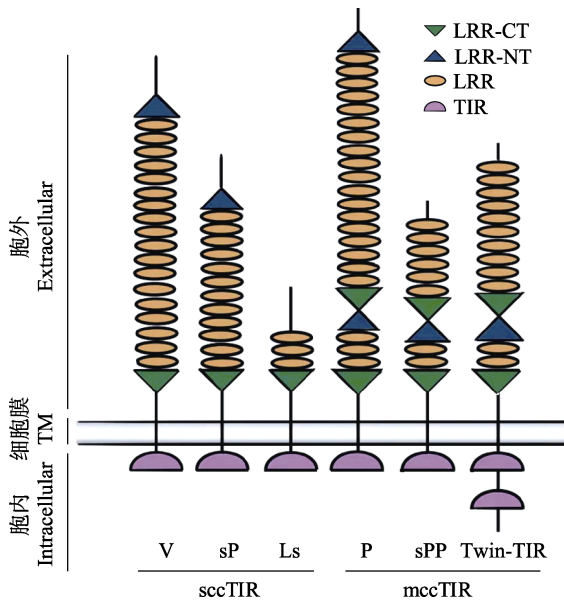


图 1 不同亚类 TLR 蛋白结构域模式

Fig.1 Pattern of protein domains in different subtype of TLRs

LRR: 亮氨酸重复序列; LRR-CT: LRR 的 C 末端;  
 LRR-NT: LRR 的 N 末端; TIR: TIR 结构域。  
 LRR: Leucine-rich repeat; LRR-CT: C-terminus of the LRR;  
 LRR-NT: N-terminus of the LRR; TIR: Toll/interleukin-1  
 receptor domain.

表达较低( $P>0.05$ ), 而 *ctg1228.10* (P 型)基因在各组织中广泛表达, 表达水平不存在显著性差异。TLR 基因成体组织表达模式与其结构特征未表现出相关性。

### 2.5 感染弧菌后缃蛭 TLR 基因响应分析

根据转录组中基因表达水平数据, 绘制 TLR 基因表达热图(图 4A), 可以看出, 在 PBS 对照组中, 42 个基因中 41 个基因均有表达(FPKM>1), 但不同基因表达模式有明显的差别, 有些基因只在 1 种组织(鳃或肝胰腺)中明显表达, 有些基因在 2 种组织(鳃和肝胰腺)中均明显表达。如 *ctg1184.1* 在肝胰腺中高表达(PBS\_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 1 672、1 370 和 2002), 鳃中几乎不表达(PBS\_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 0.027、0 和 0.029); *ctg2.41* 在鳃中明显表达(PBS\_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 3.04、9.33 和 12.97), 肝胰腺中几乎不表达(PBS\_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 0.49、0.43 和 0.07), 而 *ctg356.25* 在鳃和肝胰腺中均有表达(PBS\_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 2.86、2.77 和 2.23; PBS\_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 6.01、3.08 和 1.43)。在弧菌感染实验组中, 一些 TLR 基因在弧菌感染 12 h 和/或 48 h 后在鳃或肝胰腺中的表达量发生了变化, 根据差异表达基因筛选标准, 共有 9 个 TLR 基因在鳃或肝胰腺中的表达量发生了显著变化。差异基因表达热图(图 4B)显示, 感染弧菌后, 5 个基因(*ctg118.25*、*ctg118.26*、*ctg356.25*、*ctg774.6* 和 *ctg681.6*)在鳃组织中表达量上调, 前 4 个基因在感染 12 h 变化较显著, 仅 *ctg681.6* 在感染 48 h 变化较显著; *ctg1513.5* 在感染弧菌后的鳃组织表达

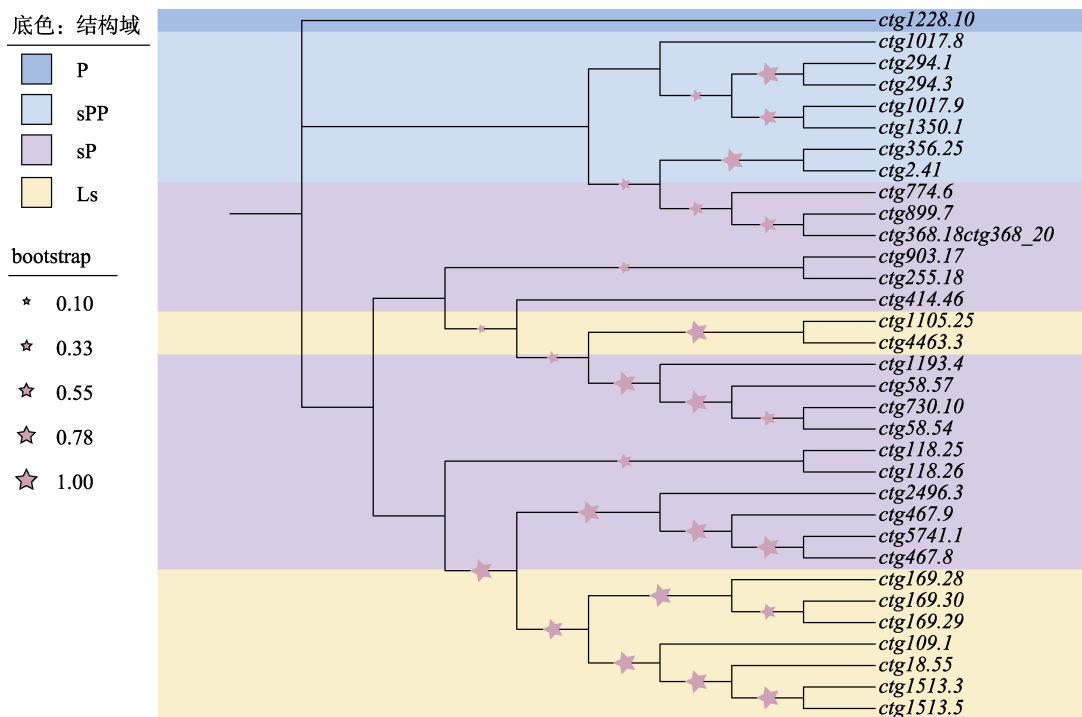


图 2 缃蛭 32 个完整 TLR 的分类及系统发育树

Fig.2 Classification and phylogenetic tree of 32 complete TLRs identified in the genome of *S. constricta*

表 3 软体动物 TLR 基因的分类

Tab.3 Classification of TLR genes in molluscs

物种 Species	单半胱氨酸簇 TLR sccTLR			多半胱氨酸簇 TLR mccTLR			未分类 Unclassified TLR 样蛋白 TLR-like protein	总计 Total
	V-type	Ls-type	sP-type	sPP-type	P-type	Twin-TIR		
	石鳖 <i>Acanthopleura granulata</i>	1	12	7	5	1	1	3
中国真蛸 <i>Octopus sinensis</i>	1	8	4	3	1	—	—	17
加州海兔 <i>Aplysia californica</i>	—	1	33	1	3	—	10	48
霸王莲花青螺 <i>Lottia gigantea</i>	—	4	7	2	2	—	1	16
福寿螺 <i>Pomacea canaliculata</i>	2	40	8	13	—	1	8	72
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	—	9	16	7	1	—	9	42
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	1	36	73	5	2	2	11	130
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	4	13	55	3	2	—	6	83
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	—	23	25	5	—	1	5	59
马氏珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	1	18	52	12	2	—	11	96

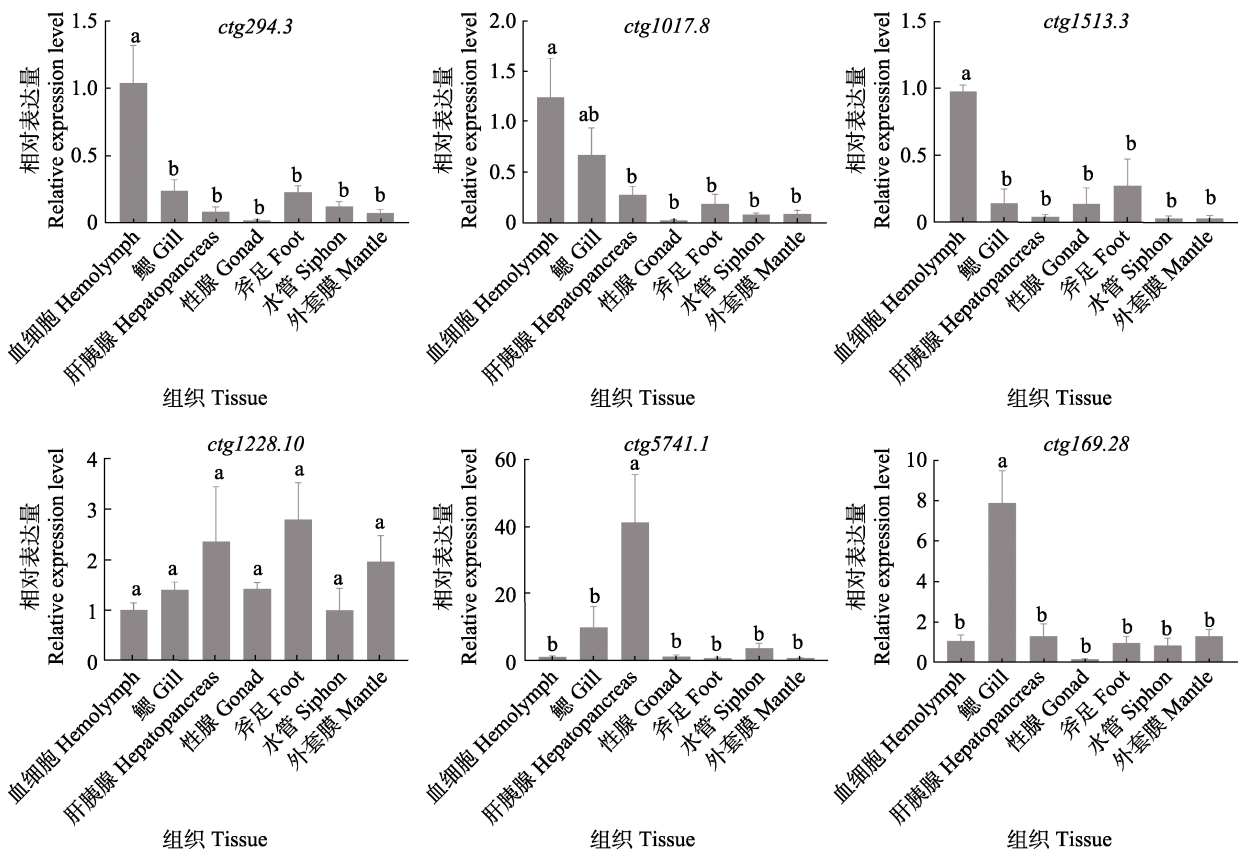


图 3 缢蛏 6 个 TLR 基因在不同组织中的相对表达水平

Fig.3 Relative expression level of six TLR genes in the different tissues of *S. constricta*

相同字母代表差异不显著( $P>0.05$ ), 不同字母代表差异显著( $P<0.05$ )。

The same letters indicate no significant difference ( $P>0.05$ ), while different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

量下调且 12 h 变化较显著; *ctg903.17*、*ctg467.9* 和 *ctg2496.3* 在弧菌感染后的肝胰腺中表达量显著变化,

其中, *ctg2496.3* 和 *ctg467.9* 表达量下调且 48 h 较为显著, *ctg903.17* 表达量上调且 12 h 较为显著。

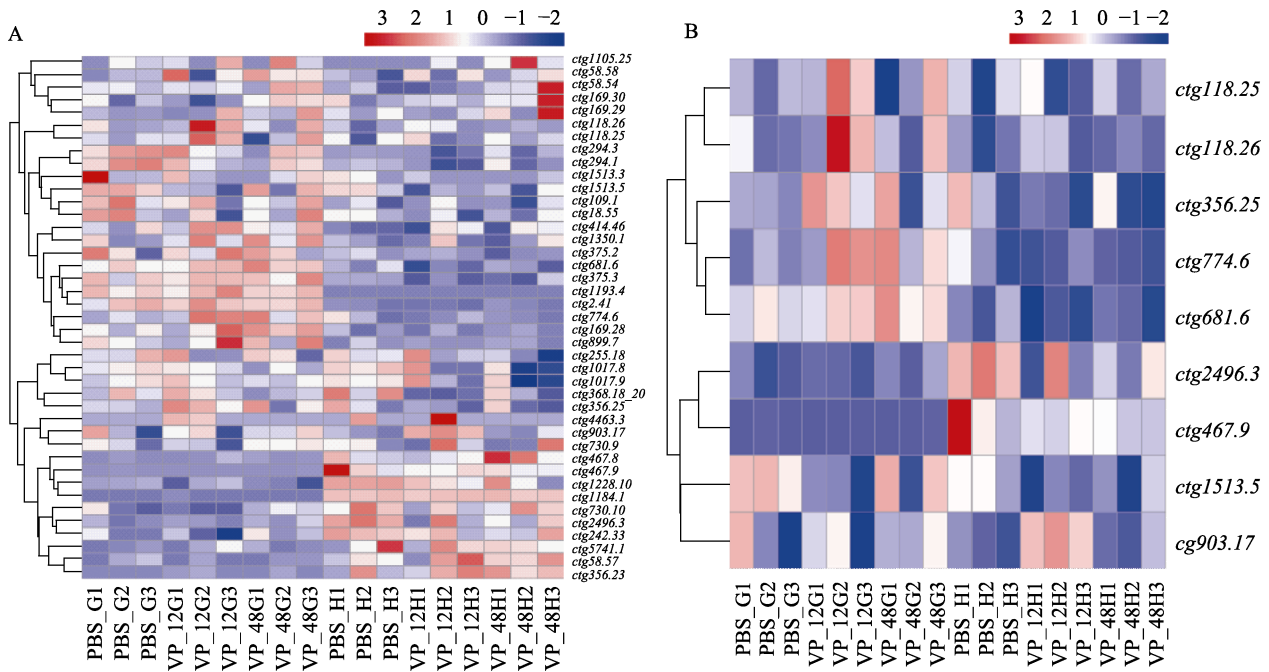


图4 TLR基因在鳃和肝胰腺中的表达量热图(A)和不同组间差异表达基因的表达量热图(B)

Fig.4 Heat map of TLR expression level in gill and hepatopancreas (A) and heat map of genes differentially expressed between different groups (B)

PBS\_G: 对照组鳃组织; PBS\_H: 对照组肝胰腺; VP\_12G: 副溶血弧菌感染 12 h 鳃组织;

VP\_48G: 副溶血弧菌感染 48 h 鳃组织; VP\_12H: 副溶血弧菌感染 12 h 肝胰腺; VP\_48H: 副溶血弧菌感染 48 h 肝胰腺。

PBS\_G: Gill of control group; PBS\_H: Hepatopancreas of control group; VP\_12G: Gill of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) infection for 12 h; VP\_48G: Gill of VP infection for 48 h; VP\_12H: Hepatopancreas of VP infection for 12 h; VP\_48H: Hepatopancreas of VP infection for 48 h.

### 3 讨论

#### 3.1 缢蛏 TLR 家族基因的鉴定及分类

在长期进化过程中,海洋无脊椎动物已进化出独特的免疫防御体系,如通过免疫基因的大量扩张等策略来适应环境。TLR 是模式识别受体家族中的重要一员,它可以特异地识别病原体相关的分子模式,激活信号级联反应,释放各种细胞因子和干扰素来消除病原微生物,在抵御病原微生物过程中发挥重要作用。本研究利用基因组数据鉴定了缢蛏的 TLR,并对其进行了特征分析和分类。和大多数软体动物一样,缢蛏基因组中的 TLR 数目也发生了显著性扩张,共鉴定出 42 个 TLR,其中 33 个 TLR 具有 LRR 结构域,跨膜结构域和胞内 TIR 结构域,为典型的 TLR 蛋白,而剩余的 9 个 TLR 结构域不完整,称为 TLR 样蛋白,可能是基因组序列不完整,或是基因长期进化过程中结构域丢失造成的。

根据 TLR 蛋白结构域注释及系统发育分析,缢蛏的 TLR 分为 mccTLR 和 sccTLR 两大类, mccTLR 进一步分为 P 型和 sPP 型,而 sccTLR 进一步分为 Ls

和 sP 型,缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 TLR (表 3)。mccTLR 典型的特征为 LRR 被 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域分隔,而 sccTLR 中单个 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域位于典型的 LRR 两侧。由于结构上的差异, mccTLRs 和 sccTLRs 一直被认为具有独立的起源(Luo *et al*, 2000)。从图 2 可以看出, sPP、sP 和 Ls 型 TLR 在缢蛏中均发生明显的扩张现象,其中 sP 型 TLR 的扩张占主导地位,这与长牡蛎 TLR 的扩张现象一致(Zhang *et al*, 2015)。缢蛏中 TLR 的扩张现象证实了 TLR 在宿主免疫防御中功能的多样化和复杂性。

为进一步了解软体动物不同类型 TLR 的扩张现象,根据 Gerdol 等(2017)提出的 TLR 分类方法,本研究对软体动物 4 个纲 10 个代表物种的 TLR 进行分类。P 型 TLR 与昆虫 Toll 具有高度的结构相似性,支持所有无脊椎动物 P 型 TLR 共同起源的假设(Toubiana *et al*, 2013)。软体动物中仅有少量的 P 型 TLR (表 3),如缢蛏和长牡蛎基因组中分别有 1 个和 2 个 P 型 TLR,表明这类 TLR 在软体动物中没有经历过扩张。先前的研究表明, sPP 型 TLR 是一个基因

数目相对较少的 TLR 类型,如长牡蛎中仅有 2 个 sPP 型 TLR (Zhang *et al.*, 2015); 在这 10 种软体动物中, sPP 型 TLR 数量不等, 在 1~13 个之间, 数目变化较大, 马氏珠母贝和福寿螺中 sPP 型 TLR 数量分别为 12 和 13 个。目前, sPP 型 TLR 在软体动物中的功能尚不清楚。Twin-TIR 型 TLR 为 mccTLR 的新成员, 其存在 2 个连续的胞内 TIR 结构域, 三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) Toll-2 为贝类中发现的第 1 个 Twin-TIR 型 TLR, 其能够通过诱导 AMP 的表达参与抗菌免疫反应(Ren *et al.*, 2014)。目前, 仅在少数软体动物中发现 Twin-TIR 型 TLR。sccTLR 为起源较晚的 TLR 类群。与 P 型 TLR 类似, V 型 TLR 与其他动物门包括脊椎动物门中发现的 sccTLR 也显示出惊人的相似性(Gerdol *et al.*, 2017), 而在软体动物中, 仅在少数动物中鉴定出少量的 V 型 TLR, 缢蛏基因组中未发现 V 型 TLR。除此之外, sP 和 Ls 型 TLR 作为软体动物中数目最多的 TLR 类群, 在 10 种软体动物中均发生了不同程度的扩张, 可能是软体动物长期应对复杂多变的环境进化出的一类特殊的免疫机制, 然而这类 TLR 具体的作用机制目前尚不清楚。根据 Gerdol 等(2017)提出的 TLR 分类原则, 我们还发现了一些 TLR 蛋白不能归类到现有的 TLR 类型, 定义为 TLR 样蛋白, 其分类原则和功能有待进一步研究。综上所述, mccTLR 作为起源古老的 TLR 类群, 在无脊椎动物中的分布范围很广, 在软体动物中没有经历大规模的扩张, 而起源较晚的 sccTLR 类群在软体动物的进化中发生了大规模的扩张。本研究结果丰富了双壳类 TLR 的信息, 并为进一步研究 TLR 在缢蛏非特异性免疫中的功能奠定了基础。

### 3.2 缢蛏 TLR 基因在成体组织中的表达特征

作为重要的模式识别受体, TLR 在动物非特异性免疫防御中发挥重要作用。在软体动物中, 尽管不同的 TLR 一般在各个组织都有表达, 但它们的表达水平有显著差异。如长牡蛎 *CgToll1* 和 *CgTLR6*、皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*) *AbTLR-A*、栉孔扇贝 *CfToll-1*、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) *McTLR2* 及菲律宾蛤仔 8 个 *RpTLR* 基因主要在血细胞中表达(Li *et al.*, 2019; Priyathilaka *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011), 而厚壳贻贝 *McTLRj* 在肝胰腺中表达水平最高, 其次是鳃和血细胞, 而性腺和外套膜中表达量中等, 肝胰腺和闭壳肌中表达较弱(Xu *et al.*, 2019)。皱纹盘鲍 *AbTLR-B* 主要在鳃中表达(Priyathilaka *et al.*, 2019), 三角帆蚌的 *HcToll1* 在血细胞、肝胰腺、鳃和外套膜中高表达(Ren

*et al.*, 2013), 而三角帆蚌另一个新型 *HcTLR* 在所有组织中均广泛表达, 在鳃和肝胰腺中表达水平较高(Yin *et al.*, 2021)。为了检测缢蛏 TLR 基因的组织表达规律, 我们从结构域编码完整的 TLR 基因中随机选择 6 个 TLR, 利用 qRT-PCR 技术检测其在健康缢蛏组织中的表达模式, 结果显示, *ScTLR* 在所有检测组织中广泛表达, 其中, 血细胞、鳃和肝胰腺中表达水平较高, 而其他组织表达量差异不显著, 这些 *ScTLR* 基因的不同表达谱可能暗示它们在缢蛏中发挥的功能不同。不同的 TLR 基因在血细胞或鳃中不同程度地呈现高表达水平, 也证实了血细胞和鳃是软体动物中主要的免疫组织(Xu *et al.*, 2019), 同时也表明 *ScTLR* 可能在缢蛏的非特异性免疫防御中发挥重要作用。

### 3.3 缢蛏 TLR 基因对弧菌感染的响应

根据缢蛏转录组数据, 我们对 TLR 基因的表达量进行了分析, 在鉴定的 42 个 TLR 基因中, 41 个基因在鳃或者肝胰腺中有表达, 但表达量各不相同且具有明显的组织差异, 这反映了鳃和肝胰腺组织在缢蛏免疫防御反应中的分工。此外, 有 9 个 TLR 在弧菌感染前后在鳃和肝胰腺中表达量发生显著变化, 其中 6 个 TLR 表达量显著上调, 可能在抵御弧菌的入侵过程中发挥了重要的作用, 这与栉孔扇贝和厚壳贻贝中 TLR 的表达模式一致(Lu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019), 而对于表达量显著下调的 3 个 TLR, 其在抵御病原菌的入侵中可能发挥了不同作用。总之, 这些结果表明, 在弧菌胁迫下缢蛏可能通过鳃和肝胰腺两种重要免疫器官中不同 TLR 基因的表达, 协同控制下游免疫相关基因的表达, 以达到免疫防御的效果。

## 4 结论

本研究基于缢蛏全基因组序列, 系统地鉴定出 42 个 *ScTLR* 基因, 其中, 33 个编码典型的 TLR 蛋白, 其他的 9 个为 TLR 样蛋白; 根据其蛋白结构域的位置特点将其进一步分为 P 型、sPP 型、sP 型和 Ls 型 4 种类型。此外, 通过与 9 种软体动物 TLR 蛋白比较, 在缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 TLR; 起源古老的 mccTLR 类群在软体动物中没有经历大规模的扩张, 而起源较晚的 sccTLR 类群却发生了大规模的扩张。TLR 基因组织表达水平检测结果显示, 缢蛏 TLR 在血细胞或鳃组织中高表达, 进一步证实血细胞和鳃是软体动物中主要的免疫组织。最后, 弧菌胁迫下缢蛏鳃和肝胰腺转录组数据显示, 41 个 TLR 基因在鳃和肝胰腺中表达量各不相同且具有明显的组织差异, 这反映了鳃和肝



胰腺组织在缢蛏免疫反应中的分工; 缢蛏可能通过鳃和肝胰腺 2 种重要免疫器官中不同 *TLR* 基因的表达, 协同控制下游免疫相关基因的表达, 以达到免疫防御的效果。本研究结果为深入探讨不同 *TLR* 基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供了基础。

## 参 考 文 献

- BAI C M, XIN L S, WANG C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 214–226 [白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 214–226]
- BRENNAN J J, GILMORE T D. Evolutionary origins of Toll-like receptor signaling. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 357: 1576–1587
- DONG Y, ZENG Q, REN J, *et al.* The chromosome-level genome assembly and comprehensive transcriptomes of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 664
- GERDOL M, VENIER P, EDOMI P, *et al.* Diversity and evolution of TIR-domain-containing proteins in bivalves and Metazoa: New insights from comparative genomics. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 70: 145–164
- GORBUSHIN A M. Toll-like signaling pathway in the transcriptome of *Littorina littorea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 106: 640–644
- KONG X H, WANG S S, DONG Y H, *et al.* Analysis of expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 194–203 [孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 等. 缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 194–203]
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 337: 1870–1874
- LEMAITRE B, REICHHART J M, HOFFMANN J A. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(26): 14614–14619
- LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W242–W245
- LEULIER F, LEMAITRE B. Toll-like receptors: Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(3): 165–178
- LI Y F, LIU Y Z, CHEN Y W, *et al.* Two Toll-like receptors identified in the mantle of *Mytilus coruscus* are abundant in haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 90: 134–140
- LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923–930
- LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- LU Y, ZHENG H, ZHANG H, *et al.* Cloning and differential expression of a novel Toll-like receptor gene in noble scallop *Chlamys nobilis* with different total carotenoid content. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 56: 229–238
- LUO C H, ZHENG L B. Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics*, 2000, 512: 92–98
- MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, KOPP E, *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*, 1998, 22: 253–258
- MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007, 449(7164): 819–826
- MENG Y, DAI W, LIN Z, *et al.* Expression and functional characterization of peptidoglycan recognition protein-S6 involved in antibacterial responses in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2022, 129: 104331
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 57: 621–628
- NIU D H, JIN K, WAN L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013a, 35(2): 581–588
- NIU D H, JIN K, WANG L, *et al.* Identification of cathepsin B in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013b, 41(1): 94–99
- PRIYATHILAKA T T, BATHIGE S, LEE S, *et al.* Transcriptome-wide identification, functional characterization, and expression analysis of two novel invertebrate-type Toll-like receptors from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 802–815
- QIU L, SONG L, XU W, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 451–466
- REN Q, LAN J F, ZHONG X, *et al.* A novel Toll like receptor with two TIR domains (HcToll-2) is involved in regulation of antimicrobial peptide gene expression of *Hyriopsis cumingii*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45(1): 198–208
- REN Q, ZHONG X, YIN S W, *et al.* The first Toll receptor from the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1287–1293
- REN Y, LIU H, FU S, *et al.* Transcriptome-wide identification and characterization of Toll-like receptors response to *Vibrio*

- anguillarum* infection in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2021, 111: 49–58
- SATAKE H, SEKIGUCHI T. Toll-like receptors of deuterostome invertebrates. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3: 34–40
- THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673–4680
- TOUBIANA M, GERDOL M, ROSANI U, *et al.* Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 158–166
- WANG L, CHAN J L, LI Q, *et al.* Evolutionary history of the Toll-like receptor and Myd88 in molluscs. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(4): 936–946 [王璐, 产久林, 李倩, 等. 海洋贝类 Toll 样受体及其接头蛋白 MyD88 的分子进化研究. *海洋与湖沼*, 2021, 52(4): 936–946]
- WANG W, ZHANG T, WANG L, *et al.* A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 65: 182–190
- WU Y, ZHENG Y, LI Y, *et al.* Two fibrinogen-related proteins (FREPs) in the razor clam (*Sinonovacula constricta*) with a broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 121: 104075
- XU K, ZHANG Z, XU Z, *et al.* A novel invertebrate Toll-like receptor is involved in TLR mediated signal pathway of thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2019, 97: 11–19
- XU X R, LIAO K, SHI P, *et al.* Involvement of a novel Ca<sup>2+</sup>-independent C-type lectin from *Sinonovacula constricta* in food recognition and innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 104: 374–382
- YIN S, CHEN J, ZHU M, *et al.* Characterization of a novel Toll-like receptor and activation NF-kappaB signal pathway in triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 255: 110608–110617
- ZHANG L, LI L, GUO X, *et al.* Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8693–8703
- ZHANG L, LI L, ZHANG G. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 653–660
- ZHANG Y X, SU J, FAN J F, *et al.* Outbreaks of vibriosis in mariculture shellfish and its research progress. *Marine Environmental Science*, 2020, 39(3): 480–487 [张颖雪, 苏洁, 樊景凤, 等. 海水养殖贝类弧菌病流行暴发及其环境影响因素研究进展. *海洋环境科学*, 2020, 39(3): 480–487]
- ZHAO X, DUAN X, WANG Z, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 67: 523–535

(编辑 冯小花)

## Genome-Wide Identification of Toll-Like Receptor Family Genes in *Sinonovacula constricta* and Their Expression in Response to *Vibrio parahemolyticus* Infection

DU Bobo<sup>1,3</sup>, YAO Lu<sup>1,3</sup>, LI Zhiping<sup>1,3</sup>, DONG Yinghui<sup>2</sup>, REN Jianfeng<sup>1,3</sup>①

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** Molluscs do not have adaptive immune cells and corresponding antibodies in their bodies. They mainly rely on the innate immune system to protect themselves from various pathogens and foreign substances to maintain normal life activities. Pattern recognition receptors (PRRs) first sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) during the innate immune response, triggering specific signaling pathways and resisting pathogenic invasion. Toll-like receptors (TLRs) are widely studied PRRs

① Corresponding author: REN Jianfeng, E-mail: jfren@shou.edu.cn

and play important roles in the innate immunity of invertebrates. The first TLR was found in *Drosophila*, which activated the transcription factor NF- $\kappa$ B signaling pathway to guide early embryonic development. Later, it was proved to play an important role in the immunity of *Drosophila*. A typical TLR protein includes three protein domains, the extracellular domain containing two to 45 leucine-rich repeats (LRRs), the transmembrane domain, and the intracellular region containing a TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain. According to their structure variation in the LRR extracellular domain, TLRs can be divided into two types, namely single cysteine cluster TLR (sccTLR) and multiple cysteine cluster TLR (mccTLR).

The razor clam *Sinonovacula constricta* is an economically important bivalve species and one of the four traditional mariculture mollusks in China. However, deterioration of the rearing environment and various bacterial and viral disease outbreaks have caused significant economic losses to the *S. constricta* industry. Therefore, a deep understanding of the immune defense mechanisms in *S. constricta* would help implement effective disease resistance strategies. In this study, we identified all TLR genes in *S. constricta* using whole genomic resources. Firstly, we identified the *S. constricta* proteins with both TIR domain (PF01582) and LRR domain (PF13855) using the InterProScan. Secondly, we further searched the whole genome DNA sequence using the TBLASTN program and the TIR-LRR protein sequences as query to identify missed *TLR* genes during genome annotation. The TLR protein domains identified were analyzed with the SMART software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). The TLR proteins with incomplete domains were further corrected with the FGENESH<sup>+</sup> program on the Softberry website (<http://www.softberry.com/>). Finally, a total of 42 *S. constricta* *TLR* (*ScTLR*) genes were identified. Among them, 33 genes encode typical TLR proteins with three domains, and the remaining nine genes encode TLR-like proteins lacking some domains. The typical *S. constricta* TLR proteins were classified into two types and four subtypes based on the protein domain structure characteristics. The type mccTLR includes one P-TLR and seven sPP-TLRs, while the type sccTLR includes 16 sP-TLRs and nine Ls-TLRs. Furthermore, the type and number of *TLR* genes were compared among ten species from four classes of mollusks, including *S. constricta*. The results showed that two types of *TLR* genes, V-type and Twin-TIR TLR, identified in other mollusks were not found in the *S. constricta* genome. The number of TLR genes varied dramatically between different species, wherein the owl limpet (*Lottia gigantea*) and the common octopus (*Octopus sinensis*) possessed 16 and 17 *TLR* genes, respectively, while the American oyster (*Crassostrea virginica*) owned more than 130 *TLR* genes. Even in the same taxonomic genus, different species had a vastly different number of *TLR* genes, such as the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), which belongs to the same genus as the American oyster, and possessed 83 *TLR* genes, obviously less than the American oyster. Evolutionarily, the anciently originated *mccTLR* genes in mollusks did not expand in number, while the recently originated *sccTLR* genes largely expanded in number. The qRT-PCR tissue-specific expression analysis showed that six *TLR* genes randomly selected were expressed in seven tissues, including the hemolymph, gill, hepatopancreas, gonad, foot, mantle, and siphon, being highly expressed in the hemolymph, gill, and hepatopancreas. Finally, the razor clams were infected with *Vibrio parahemolyticus*, and the gill and hepatopancreas tissues were collected at 12 h and 24 h post-injection (hpi) for further transcriptome analysis. The results showed that nine *TLR* genes were differentially expressed in the gill or hepatopancreas before and after *V. parahemolyticus* injection. Six genes (*ctg118.25*, *ctg118.26*, *ctg356.25*, *ctg774.6*, *ctg681.6*, and *ctg1513.5*) were differentially expressed in gill at 12 hpi or 48 hpi, in which only *ctg1513.5* was down-regulated and the other five were up-regulated. Three genes (*ctg467.9*, *ctg2496.3*, and *ctg903.17*) were differentially expressed in the hepatopancreas at 12 hpi or 48 hpi, wherein *ctg467.9* and *ctg2496.3* were down-regulated, and *ctg903.17* was up-regulated. In summary, our findings will pave the way for investigating the functions of *TLR* genes in the innate immune response to different pathogens.

**Key words** *Sinonovacula constricta*; Toll-like receptors; *Vibrio* challenge; Expression analysis

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220418005

http://www.yykxjz.cn/

殷丽坤, 黄凯, 于凯, 宿志健, 郭睿婕, 杨旭红, 吴耀庭. 低氧胁迫下中华圆田螺的肝脏转录组学分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 167-178

YIN L K, HUANG K, YU K, SU Z J, GUO R J, YANG X H, WU Y T. Transcriptome analysis of liver tissue of *Cipangopaludina cathayensis* under hypoxic stress. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 167-178

# 低氧胁迫下中华圆田螺的肝脏转录组学分析

殷丽坤<sup>1</sup> 黄凯<sup>1①</sup> 于凯<sup>1</sup> 宿志健<sup>2</sup>  
郭睿婕<sup>1</sup> 杨旭红<sup>1</sup> 吴耀庭<sup>1</sup>

(1. 广西大学动物科学技术学院 广西 南宁 530004;

2. 德州市德城区市场监督管理局 山东 德州 253011)



**摘要** 为了探究低氧胁迫下中华圆田螺(*Cipangopaludina cathayensis*)肝脏组织基因的差异表达,本研究通过高通量测序技术,分析中华圆田螺低氧胁迫组(2.5 mg/L)和常氧组(6.9 mg/L)某些基因的差异表达,并对差异基因进行生物信息学分析,进一步采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对关键差异表达基因进行验证。结果显示,测序共获得232 379条基因(unigenes),与对照组比较,低氧胁迫组筛选到176个差异基因,包含64个上调基因和112个下调基因。GO功能注释分析显示,差异基因主要富集在生物学过程中的几丁质代谢过程和含氨基葡萄糖的复合代谢过程,细胞组分中的胶原三聚体成分,分子功能中的几丁质结合功能和糖衍生物结合功能。KEGG通路富集分析显示,差异基因主要集中于环境信息处理、遗传信息处理、代谢和生物系统这4大类通路。6个关键差异基因的RT-qPCR结果显示,热休克蛋白70B2和热休克蛋白 $\beta$ -6基因表达量上调,几丁质酶蛋白4、 $\alpha$ -1胶原蛋白(XIV)、 $\alpha$ -4胶原蛋白(XIV)、5-磷酸酶蛋白基因表达量下调,证实了转录组测序结果的可靠性。本研究发现,低氧胁迫激活了中华圆田螺适应缺氧的生理活动,并获得了低氧胁迫下中华圆田螺肝脏组织中相关功能基因的表达信息,为深入研究中华圆田螺响应低氧胁迫的调控机制提供了基础数据和理论依据。

**关键词** 中华圆田螺; 低氧胁迫; 转录组; 差异表达基因; 热休克蛋白

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0167-12

中华圆田螺(*Cipangopaludina cathayensis*)是我国特有的物种(陈元晓等, 2009),适宜生长在富含底泥腐殖质、溶氧充足、天然饵料较丰富的微流水域中(杨立平, 2007)。稻田养殖田螺优先选取水源丰富、水质清新且水体溶氧达到5 mg/L以上的稻田(廖建云, 2020)。溶解氧是水体环境中最重要的因子之一,对水产动物的生长发育、新陈代谢、繁殖繁育等一系列生命活动都有重要影响(Small *et al*, 2014)。水中溶解氧低于2 mg/L时,水体处于低氧或缺氧状态(王春枝

等, 2014; 王晓雯等, 2016; 徐贺等, 2016)。低氧胁迫会使水生动物生长发育缓慢,抗病能力以及繁殖能力下降,严重时会导致水生动物死亡(徐贺等, 2016)。李丽萍等(2012)在研究溶解氧和体重对无齿蚌耗氧率的影响时发现,椭圆背角无齿蚌(*A. woodiana elliptica*)和圆背角无齿蚌(*A. woodia pacifica*)耗氧率均随水中溶解氧降低而降低。

RNA-seq技术是目前筛选机体特异性状的关键基因和研究基因表达调控机制的有效方法(Li *et al*,

\* 广西科技重大专项创新驱动发展基金(桂科AA20302019-6)和广西重点研究开发项目(AB18294011)共同资助。

殷丽坤, E-mail: 873115363@qq.com

① 通信作者: 黄凯, 教授, E-mail: hkai110@163.com

收稿日期: 2022-04-18, 收修修改稿日期: 2022-05-17

2014)。曹梅等(2021)对低氧胁迫下脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*)的转录组分析,推测低氧诱导因子可以激活虾体适应缺氧的一系列生理活动,增强脊尾白虾各类物质代谢,并且能通过抑制线粒体生物合成和活化线粒体自噬来降低线粒体氧耗。刘韬等(2023)基于转录组分析了青田田鱼(*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*)对稻田急性溶氧变化的水环境的适应性,为进一步研究青田田鱼在急性溶氧变化环境下的生理调节机制提供了基础数据。

近年来,关于中华圆田螺的研究主要集中在抗肿瘤机制(朱涛等, 2016)、免疫应答(赵劲松等, 2019)、营养价值评价(薛飞等, 2022)和耐抗生素性(王宏伟等, 2017)等方面,而关于中华圆田螺在转录水平上进行的低氧调控方面的研究尚未见报道。本研究基于RNA-seq技术对低氧胁迫下中华圆田螺肝脏组织进行转录组分析,探究低氧胁迫对中华圆田螺的影响,进而为深入研究中华圆田螺应对低氧胁迫的调控机制奠定基础,也为中华圆田螺的健康养殖提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用的中华圆田螺均取自广西玉林陆川县养殖基地,其生活水温为(26.5±0.5)℃,溶氧量(6.9±0.2)mg/L,氨氮含量<0.5 mg/L,采用微流水稻田养殖模式。随机选择健康且螺壳无机械损伤的田螺进行实验。选取田螺的壳宽、壳高及体重见表1。

表1 中华圆田螺基础指标  
Tab.1 Basic traits of *C. cathayensis*

基础指标 Basic traits	数据 Data
壳宽 Shell width/mm	30.57±7.51
壳高 Shell height/mm	44.62±11.33
壳口宽 Shell mouth width/mm	24.58±6.51
壳口高 Shell mouth height/mm	18.14±3.95
体重 Body weight/g	22.33±10.38

### 1.2 低氧胁迫实验

中华圆田螺运至实验室后于40 L塑料桶中暂养1周,温度维持在26℃,溶氧量维持在(6.9±0.1)mg/L。将中华圆田螺随机设置为低氧胁迫组和常氧对照组,每组3个重复,每个重复30只。低氧胁迫处理方法:溶解氧在1h之内从6.9 mg/L下降到2.5 mg/L左右,维持24 h。在低氧培养期间,不投喂饵料,同时利用HQ30D型便携式溶氧仪每1 h测定一次水体中溶氧

含量。对照组维持溶氧为(6.9±0.1)mg/L,24 h后与低氧组同时取样。2组各取15只田螺(每个平行组随机取5只田螺),活体解剖,取肝脏组织立即置于液氮中速冻,然后在-80℃冰箱中保存备用。

### 1.3 总RNA的提取

分别取低氧组和对照组田螺的肝脏组织(每个平行组随机取5只田螺的肝脏组织并混合),利用Trizol法提取总RNA,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,利用紫外分光光度计检测其纯度及浓度。总RNA的浓度>250 ng/μL,OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>介于1.8~2.2之间,OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>230 nm</sub>≥2.0,确保RNA无降解、无污染。

### 1.4 mRNA文库构建及测序

利用试剂盒(Qubit RNA)精确定量RNA,确定构建mRNA文库加入量。根据试剂盒(Hieff NGS™)说明书,用Tris Buffer重悬磁珠对提取的总RNA进行成熟mRNA富集和纯化,按照其建议构建文库。利用Illumina HiSeq™平台进行测序,使用FastQC平台对数据进行可视化质量评估,以确保质量达标。

### 1.5 转录组序列组装及注释

将原始数据使用Trimmomatic去除低质量碱基、含N序列以及reads接头序列,质控后的序列利用Trinity软件组装clean data得到每个转录本中最长序列作为unigene,即参考序列(Grabherr *et al.*, 2011)。将unigene分别与Blast+、NCBI、NR、GO、KEGG、KOG数据库进行比对注释。

### 1.6 差异表达分析

采用DESeq分析差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),筛选阈值为Fold change>2及Q-value<0.05, Q-value越小,则基因表达量差异越显著(Anders *et al.*, 2010)。选取DEGs进行GO功能注释和KEGG富集分析。

### 1.7 实时荧光定量PCR分析

选取6个DEGs进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证,以此评价RNA-seq技术鉴定差异基因的可靠性。利用Primer 5.0软件设计特异性引物(表2),并在生工生物工程(上海股份有限公司)完成引物合成。使用反转录试剂盒(TaKaRa)将每组RNA(样本数目及提取方法同1.3)反转录为cDNA,之后以cDNA为模板、β-actin为内参进行RT-qPCR检测。每个样品3次重复,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算各基因的对表达量。



表 2 中华圆田螺肝脏差异表达基因 RT-qPCR 分析引物  
Tab.2 Primers used for the RT-qPCR analysis of differentially expressed genes in the *C. cathayensis*

Unigene ID	基因 Gene	引物 Primer	
		正向 Forward (5'~3')	反向 Reverse (5'~3')
DN72529_c3_g1	Beta-actin	CTGGAAGGTGGACAGAGAGG	AAATCATCGCTCCACCAGAG
TDN76189_c0_g5	Heat shock protein 70 B <sub>2</sub>	ATTCGATACACCTCCCGCAC	AGAAACTGAGCAGCAGCGAT
TDN59468_c0_g4	Heat shock protein beta-6	GTCGCGAAGTACACTGACCA	AATTAACGGTTCACGCCAGC
TDN70295_c1_g2	Chitinase-like protein 4	TCCAGTGACCAGAACATGGC	GTGCAGTCAACAACCATACGC
TDN75616_c0_g1	Collagen alpha-1(XIV) chain	CCAAGCAGTCTTGCGAATGG	AGGCTCTCAGTGTGAAGGC
TDN57666_c0_g1	Collagen alpha-4(VI) chain	ACGTAGACGTTCCCAAGCAG	TTCGGATGATCTCGCTCGTG
TDN74463_c0_g1	Phospholipid phosphatase-related protein type 5	TATGAAGTGCCTGTGCGTGT	ACTGTCACTGCGAGGTTCTG

## 2 结果与分析

### 2.1 测序结果及转录组拼接

使用 Trimmomatic 处理 Illumina Hiseq™ 测序得到的原始数据(raw reads), 去除低质量与含接头的 reads 后, 利用 Trinity 软件对所得数据进行组装, 得到 500 584 条转录本(transcript)和 232 379 条 unigenes, 转录本与 unigenes 的 N50 分别为 1 674 bp 和 1 127 bp。组装数据统计见表 3, unigenes 长度分布见图 1。由拼接结果判断出原始数据拼接的质量较高, 可用于后续功能注释和 DEGs 分析。

### 2.2 基因功能注释

将 unigenes 信息分别在 Swiss-Prot、GO、KOG、Nr 和 KEGG 数据库进行序列比对及功能注释。共有 232 379 条 unigenes 得到注释, 各数据库注释到的 unigenes 数量及百分比见表 4。

与 Nr 蛋白数据库进行同源性比对后, 有 26 636 条 unigenes 与已知基因同源, 与中华圆田螺相关的注释信息较少(图 2)。注释信息占比最高为海兔(*Aplysia californica*, 6 470), 随后依次是霸王莲花青螺(*Lottia gigantea*, 3 121)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*,

表 3 组装结果统计  
Tab.3 Statistics of assembly results

序列长度 Length range	转录本 Transcript	单基因簇 Unigene
≥ 500 bp	222 895	79 176
≥ 1 000 bp	128 141	37 541
总计 Count	500 584	232 379
最大长度 Max length /bp	36 115	36 115
最小长度 Min length /bp	201	201
平均长度 Mean length /bp	891.24	686.65
N50	1 674	1 127
N90	323	270

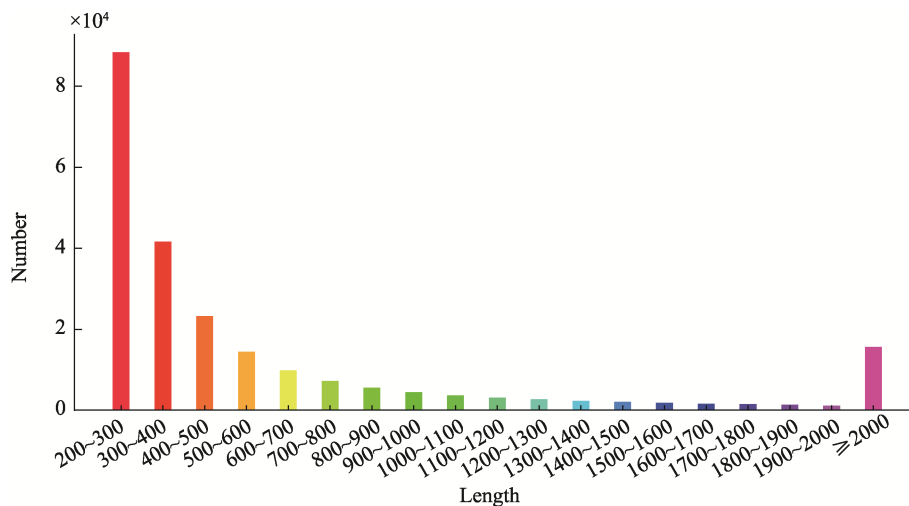


图 1 unigenes 序列长度分布  
Fig.1 Length distribution of unigenes

表 4 Unigenes 注释统计  
Tab.4 Statistics of unigenes annotated

注释数据库 Annotated database	单基因簇数量 Number of unigenes	百分比 Percentage /%
Nr	26 636	11.46
GO	22 907	9.86
Swiss-Prot	20 061	8.63
KOG	13 290	5.72
KEGG	4 179	1.8
合计 Total	232 379	100

3 110)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, 2 976)、舌形贝(*Lingula anatina*, 994)、双唇海鲉(*Octopus bimaculoides*, 967)、紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, 428)、海葵(*Exaiptasia pallida*, 370)、囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*, 300)和文昌鱼(*Branchiostoma floridae*, 276)。

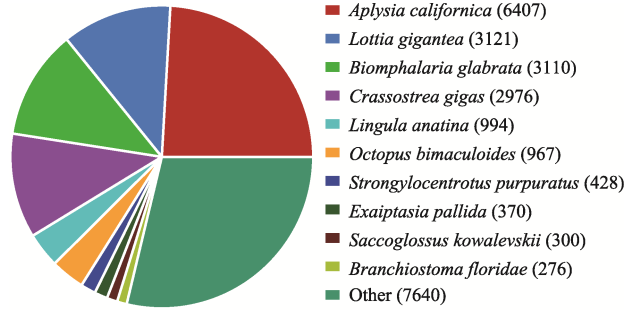


图 2 Nr 同源物种分布  
Fig.2 Homologous species distribution of Nr

### 2.3 Unigenes 的 GO 分析

将所有 unigenes 进行 GO 统计分析, 共有 22 907 条 unigenes 得到注释。unigenes 在生物学(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)中均有分布, 得到注释的基因数目分别为 6 737、8 759、7 411 个(图 3)。

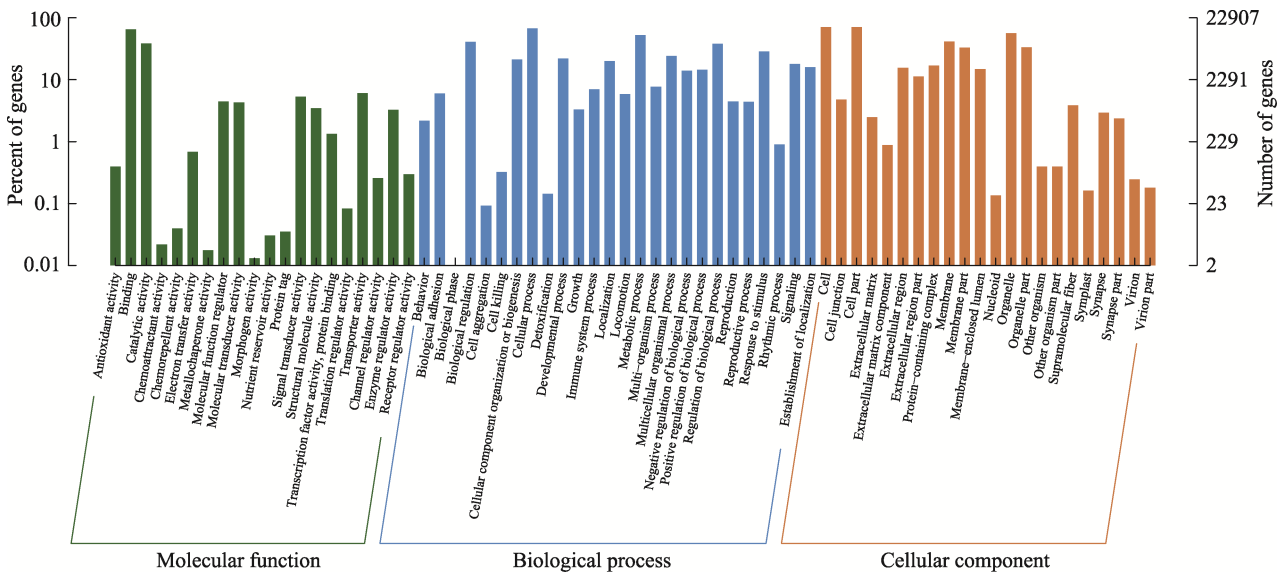


图 3 Unigenes 的 GO 功能分类  
Fig.3 Unigenes GO functional classification

### 2.4 Unigenes 的 KOG 功能分析

对所有 unigenes 进行 KOG 功能注释, 有 13 290 条 unigenes 得到注释。其中, 信号转导机制(signal transduction mechanisms, 2 543)是最大的类群, 占 19.13%, 其次是转录(transcription, 1 593)和蛋白质翻译后修饰、转换和伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones, 1 270)相关的 unigenes 较多, 各占 11.99%和 9.56%, 而与细胞运动(cell motility, 21)相关功能基因占比很少, 低于 1%(图 4)。

### 2.5 Unigenes 的 KEGG pathway 分析

根据 KEGG 数据库, 进一步对中华圆田螺肝脏 unigenes 进行注释, 共有 4 179 条 unigenes 得到注释, 分布于新陈代谢(metabolism)、有机系统(organismal systems)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)和细胞过程(cellular processes)这 5 大类通路(图 5)。

### 2.6 差异表达基因筛选

通过 DEseq 进行差异表达分析, 设置 2 倍 fold

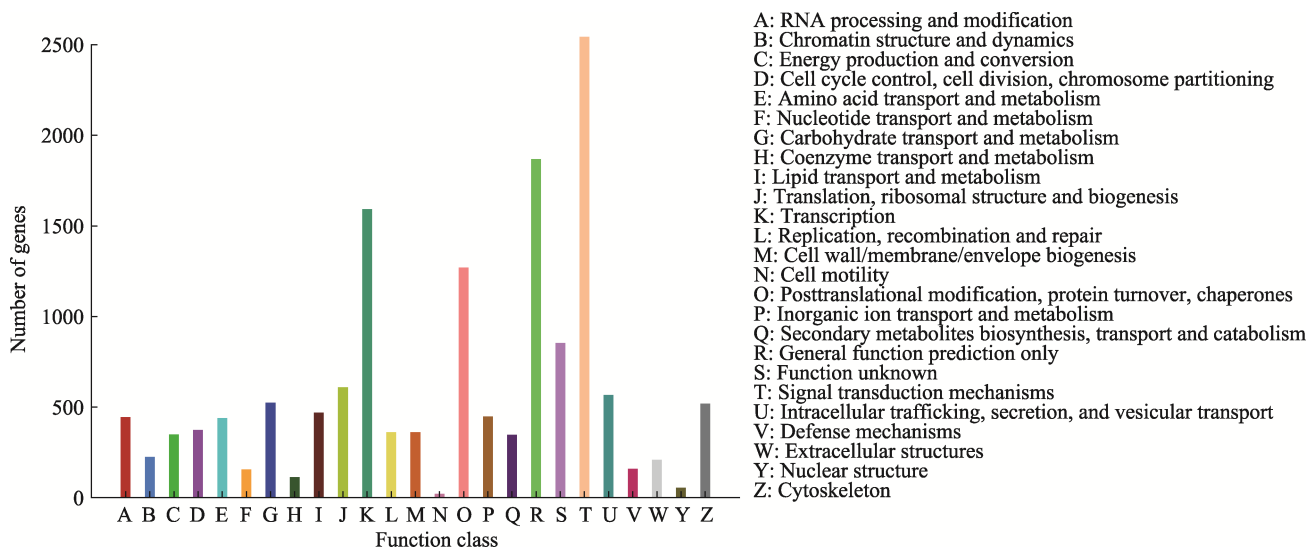


图 4 KOG 分类柱状图  
 Fig.4 Column chart of KOG classification

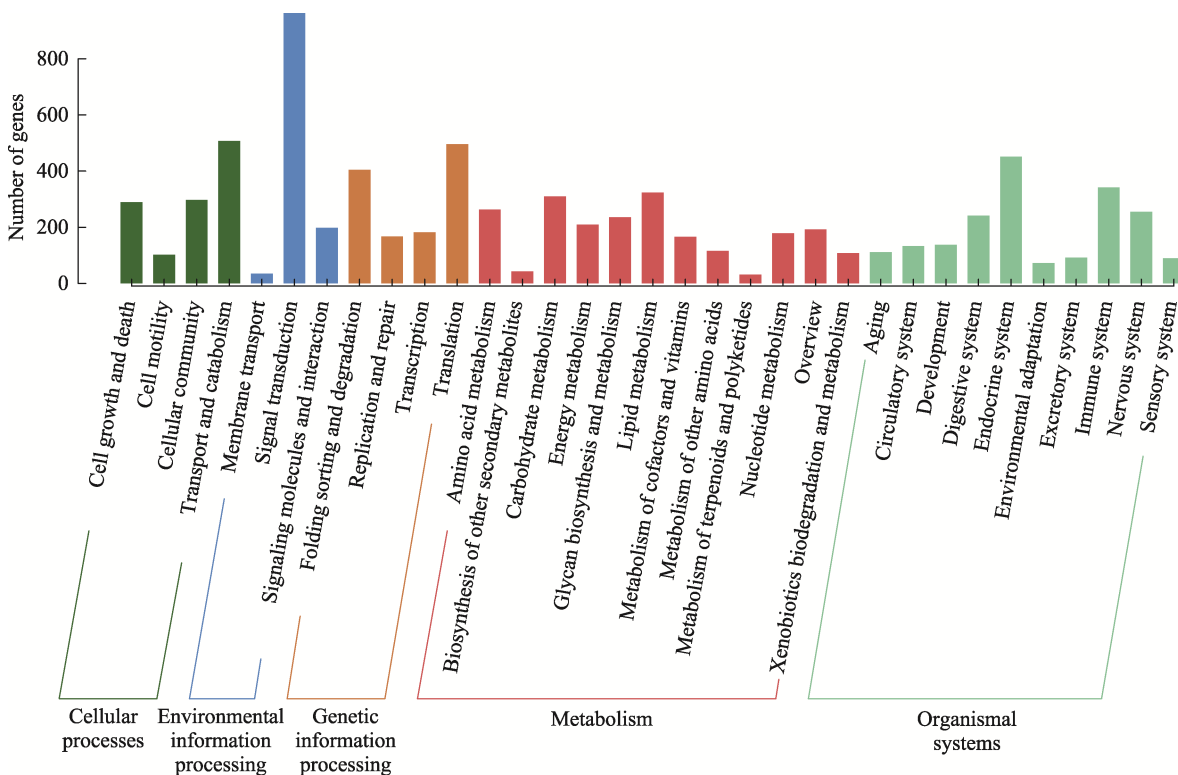


图 5 KEGG pathway 分类柱状图  
 Fig.5 KEGG pathway classification histogram

change 以及  $Q$ -value=0.05 为筛选标准,综合 3 次平行重复结果,共得到 176 个 DEGs,包括 64 条上调基因,112 条下调基因(图 6)。

### 2.7 DEGs 的 GO 功能富集分析

与对照组相比,低氧胁迫组中 DEGs 的 GO 功能富集分析结果在生物学过程上主要集中于几丁质代

谢过程(chitin metabolic process, GO: 0006030)、含氨基葡萄糖的复合代谢过程(glucosamine-containing compound metabolic process, GO: 1901071)和氨基糖代谢途径(amino sugar metabolic process, GO: 0006040)等;在细胞组成上主要集中于胶原三聚体(collagen trimer, GO: 0005581)等;在分子功能上主要集中于几丁质结合(chitin binding, GO: 0008061)、糖

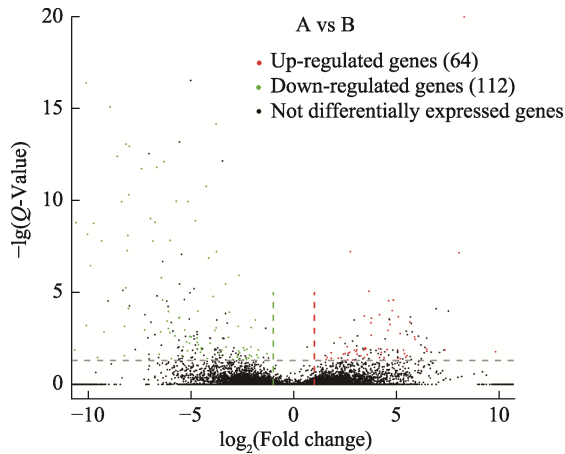


图6 A组和B组差异表达基因统计火山图  
Fig.6 Volcano plot of DEGs in A and B groups

A: 低氧胁迫组; B: 对照组  
A: Hypoxia group; B: Control group

衍生物结合(carbohydrate derivative binding, GO: 0097367)、细胞外基质结构组分(extracellular matrix structural constituent, GO: 0005201)和糖衍生物结合(carbohydrate derivative binding, GO: 0097367)等(图7)。

## 2.8 DEGs 的 KEGG pathway 富集分析

对中华圆田螺 DEGs 进行 KEGG pathway 富集分析, 其注释结果主要集中于环境信息处理(environmental information processing, 3)、遗传信息处理(genetic information processing, 4)、代谢(metabolism, 6)和生物系统(organismal systems, 7)这4大类通路(图8)。

在这些通路中, 信号转导(signal transduction, 3)、折叠排序与降解(folding sorting and degradation, 3)和内分泌系统(endocrine system, 4)的 DEGs 最多, 其次是运输和分解代谢(transport and catabolism, 1)、转录(transcription, 1)、氨基酸代谢(amino acid metabolism, 1)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 2)、脂质代谢(lipid metabolism, 1)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism, 1)、衰老(aging, 1)和免疫系统(immune system, 2)。在 KEGG pathway 中有 7 个 DEGs 表达量上调, 13 个 DEGs 表达量下调(表5)。

## 2.9 RT-qPCR 验证

为验证转录组结果, 选取 6 个 DEGs 进行 RT-qPCR 验证。热休克蛋白 70B2 与热休克蛋白  $\beta$ -6 基因表达水平上调; 几丁质酶蛋白 4 (chitinase-like

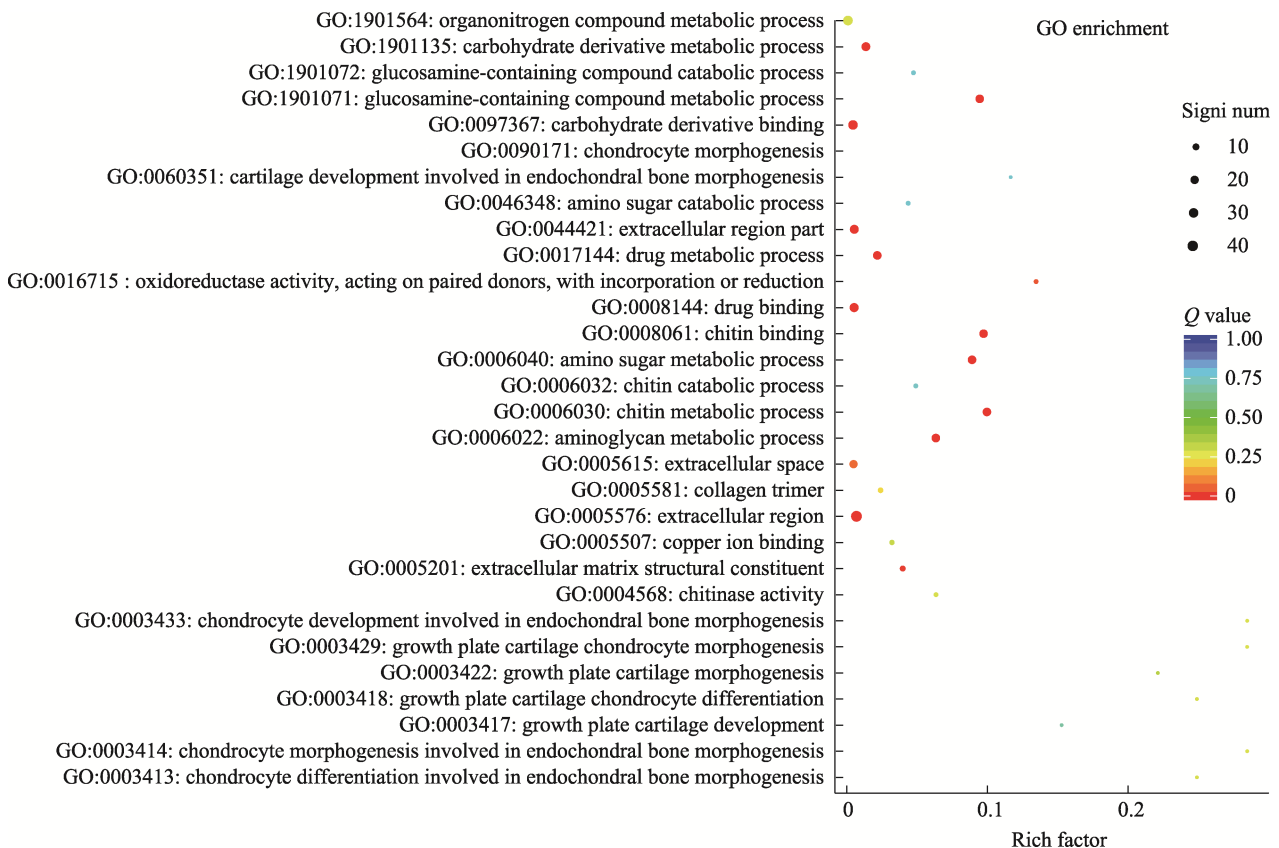


图7 低氧组中华圆田螺肝脏中差异表达基因的 GO 功能富集图

Fig.7 GO functional enrichment map of DEGs in liver of *C. cathayensis* under hypoxia group

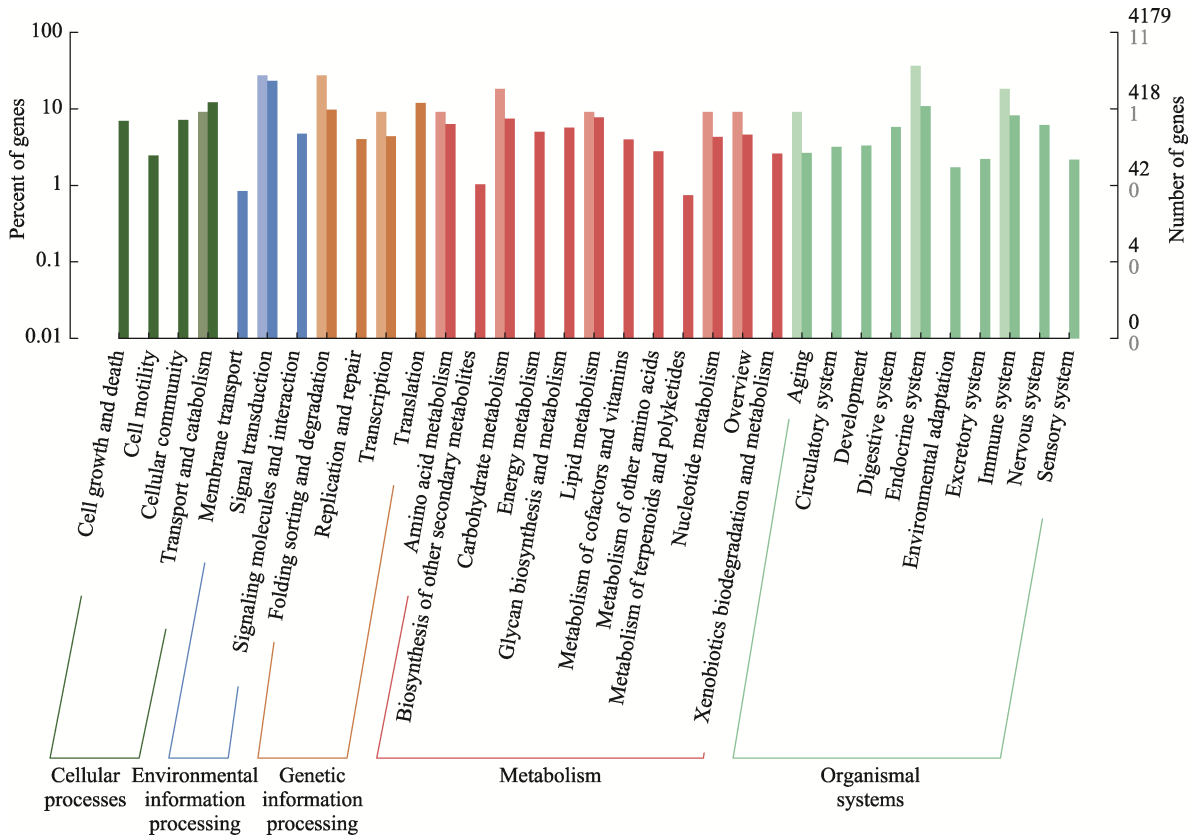


图 8 差异表达基因 KEGG 分类

Fig.8 KEGG classification map of differentially expressed genes

深色柱体表示所有基因的注释情况，浅色柱体表示差异表达基因的注释情况。

The dark column represents the annotation of unigenes, and the light column represents the annotation of DEGs.

表 5 差异表达基因的 KEGG 富集结果

Tab.5 Enrichment results of KEGG of DEGs

通路名称 KEGG pathway	差异表达基因数 Number of DEGs	通路名称 KEGG pathway	差异表达基因数 Number of DEGs
信号转导 Signal transduction	2	免疫系统 Immune system	1
折叠排序和降解 Folding sorting and degradation	2	运输和分解代谢 Transport and catabolism	1
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	1	信号转导 Signal transduction	1
下调 Down 碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	2	上调 Up 折叠排序和降解 Folding sorting and degradation	1
脂质代谢 Lipid metabolism	1	衰老 Aging	1
核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	1	转录 Transcription	1
内分泌系统 Endocrine system	3	内分泌系统 Endocrine system	1
免疫系统 Immune system	1		

protein 4)、 $\alpha$ -1 胶原蛋白(XIV)[collagen alpha-1 chain (XIV)]、 $\alpha$ -4 胶原蛋白(XIV)、5-磷酸酶蛋白(phosphatase-related protein type 5)基因表达水平下调。结果显示，虽然 RT-qPCR 定量和 RNA-seq 表达存在表达量上的偏差，但其变化趋势一致，由此证明

了本研究转录组分析结果的可靠性(图 9)。

### 3 讨论

高通量测序技术可用于检测基因表达量、揭示转录组复杂性、分析代谢的调控机制等。转录组学连接



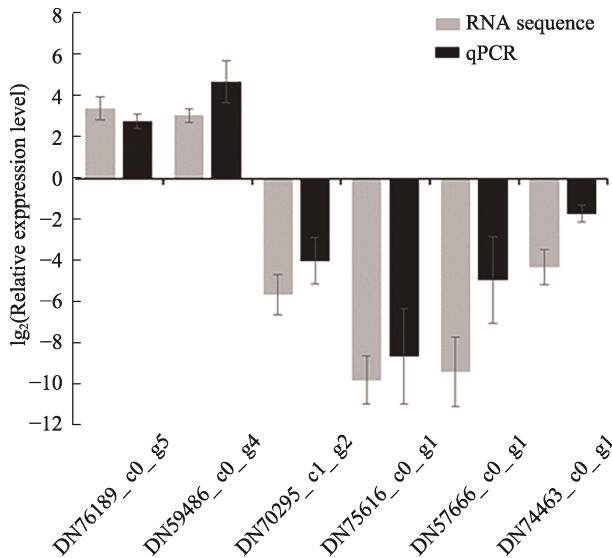


图9 中华圆田螺肝脏组织差异表达基因 RT-qPCR 验证  
Fig.9 Validation of DEGs in liver tissue of *C. cathayensis* by RT-qPCR

着生物的基因组遗传信息和蛋白质组功能信息,是基因表达与表型特征的桥梁(Zheng *et al*, 2011)。梁雪茹等(2022)研究发现,在马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)不同发育阶段的转录组中表达了 12 个组蛋白 H1 基因,表明组蛋白 H1 参与调控马氏珠母贝的生长发育。杨凯等(2020)采用 Illumina HiSeq-2500 分别对 5 个不同高温处理组的大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)肾脏组织进行转录组测序,得到 68 525 条 unigenes,初步建立了大菱鲂热应激肾脏转录组数据库。赵晓霞(2011)在基于 RNA 测序技术的马氏珠母贝珍珠囊转录组及数字基因表达谱分析中发现,被注释的 unigenes 仅有 35.99%。Meyer 等(2009)在研究珊瑚虫转录组中发现,只有 8.5%的 unigenes 得到注释,剩余 unigenes 未能得到注释。本研究中,中华圆田螺转录组组装得到的 232 379 条 unigenes,只有 11.46% unigenes 得到注释。部分基因未得到注释的原因可能与各类公共基因数据库收录相近物种基因信息较少、注释信息不够全面有关。对中华圆田螺 DEGs 进行 GO 功能富集分析,发现 DEGs 主要与生物学过程中的代谢有关,且集中在氨基糖代谢和几丁质代谢过程。同时,DEGs KEGG pathway 分析结果表明,中华圆田螺在低氧胁迫下,通过抑制细胞生长、加速细胞衰老凋亡来应对氧化应激。

### 3.1 低氧胁迫下热休克蛋白的调控作用

热休克蛋白(HSPs)是机体受到外界刺激后而产生的蛋白质,当生物体受到外界刺激时,体内细胞会

自动关闭正常的蛋白合成,转而合成一系列的 HSPs 来快速调整应激过程中细胞的存活性,协助细胞快速适应外界环境的变化,又称为应激蛋白(Zhang *et al*, 2016)。Yuan 等(2010)研究发现,小鼠急速运动后处于低氧状态时,腓肠肌中 Hsp70 表达量明显上升。HSPs 是低氧诱导因子(HIFs)的靶基因,在低氧状态下 HIF-1 能诱导 Hsp70 的转录表达(Yeh *et al*, 2010; Goel *et al*, 2010)。王婷(2017)通过转录组测序对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)低氧信号通路分子作用机制的研究,分析了 HIF 与羟化酶 PHD 的互作关系,发现 HIF- $\alpha$  是长牡蛎适应低氧过程的关键基因。曹梅等(2021)基于低氧胁迫下对脊尾白虾进行转录组学分析发现,低氧诱导因子 1 (HIF1) 2 个亚基 HIF1 $\alpha$  和 HIF1 $\beta$  表达量上调,推测脊尾白虾细胞在低溶氧环境下诱导 HIF 产生,刺激机体增加血液氧的供应能力。布会敏等(2011)在研究慢性间歇性低压低氧对发育大鼠心肌热休克蛋白表达中发现,大鼠通过增加 Hsp27、Hsp70 mRNA 的表达来保护心肌细胞免受低氧损伤。由此推测,处于低氧环境胁迫下的中华圆田螺通过提高 Hsp70 mRNA 的表达量来保护机体肝脏免受低氧损伤,协助机体快速适应环境的改变。本研究中,中华圆田螺肝脏中热休克蛋白 Hsp70 B2、Hsp $\beta$ -6、Hsp9 $\beta$  基因发生了显著上调,由此推测,肝脏中热休克蛋白受低氧胁迫时激发表达特性,从而使中华圆田螺尽可能地避免低氧带来的损伤,提高机体耐低氧能力与存活力。

### 3.2 低氧胁迫下几丁质的调控作用

几丁质又称甲壳质或甲壳素,是以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖为单体,通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成的高分子多聚物(姜竹峪等, 2016)。几丁质的降解与合成是甲壳类动物进行生长发育的重要生理过程,与机体的营养代谢、免疫病害防御等功能密切相关(吕黎等, 2011; Covi *et al*, 2012)。当水生甲壳类受到外源性刺激时,机体几丁质酶基因表达会发生显著变化,参与生物体的免疫防控(李旭光等, 2017)。王俊等(2017)研究栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)几丁质酶的功能鉴定中推测,几丁质酶通过水解几丁质来保证有机框架的有序性,从而对贝壳外形起到调控作用。宋柳等(2019)通过克隆三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) Group 5 的几丁质酶基因 *PtCht6*,分析 *PtCht6* 基因作为免疫基因参与机体的病原免疫防御机制。本研究中,通过 GO 功能富集分析得出低氧胁迫下中华圆田螺 DEGs 部分集中在几丁质代谢过程中,RT-qPCR 验证了几丁质酶蛋白 4、胶原  $\alpha$ -1 蛋白表达基因显著下调,表明

低氧胁迫影响了中华圆田螺肝脏中的几丁质、胶原蛋白的合成, 可能在软体动物外壳的非生物胁迫响应中起到重要作用。由于目前软体动物的非生物胁迫机理研究较为薄弱(Bueter *et al.*, 2013), 这一发现还需进一步验证是否与中华圆田螺耐低氧性状相关, 才能进行更深入的研究。

综上所述, 本研究为了解中华圆田螺在应对低氧胁迫过程中的生理调节机制, 从转录组层面对常氧组和低氧组的中华圆田螺肝脏组织进行研究分析。低氧胁迫24 h后, 相对于常氧组, 低氧组表达下调的DEGs数目多于表达上调, 且多集中于代谢过程, 说明中华圆田螺通过抑制更多的代谢通道来应对低氧胁迫下的氧化应激, 如降低氨基酸代谢和脂质代谢途径为机体保留能量; 而表达上调的HSPs基因说明中华圆田螺通过增强免疫代谢系统来避免机体受到低氧损伤。本研究结果为探究中华圆田螺低氧胁迫响应的分子调控机制提供了基础数据, 可为发展中华圆田螺健康养殖技术和进一步研究中华圆田螺低氧胁迫响应的性状提供参考。

## 参 考 文 献

- ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11(10): R106
- BU H M, WANG M L, SUN H, *et al.* Effect of heat shock proteins in cardiac protection of chronic intermittent hypobaric hypoxia in developing rats. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(1): 49–53 [布会敏, 王妹玲, 孙红, 等. 心肌热休克蛋白在发育大鼠慢性间歇性低压低氧中的心脏保护作用. *中国药理学通报*, 2011, 27(1): 49–53]
- BUETER C L, SPECHT C A, LEVITZ S M. Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(1): e1003080
- CHEN Y X, CHEN Y J, ZHANG W, *et al.* Nutrient ingredient analysis and economical value of four species of freshwater snails in Yunnan Province. *Sichuan Journal of Anatomy*, 2009, 17(2): 28–30 [陈元晓, 陈英杰, 张闻, 等. 云南省4种淡水贝类的营养成分和经济价值. *四川解剖学杂志*, 2009, 17(2): 28–30]
- 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]
- COVI J A, CHANG E S, MYKLES D L. Neuropeptide signaling mechanisms in crustacean and insect molting glands. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2012, 56(1): 33–49
- 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
- GOEL G, GUO M, DING J, *et al.* Combined effect of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and heat shock protein (HSP)-70 in reducing apoptotic injury in hypoxia: A cell culture study. *Neuroscience Letters*, 2010, 483(3): 162–166
- JIANG Z Y, CHEN Y, WEI J X, *et al.* Recent advances in research on chitinase. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2016, 33(5): 414–418 [姜竹峪, 陈羽, 魏锦兴, 等. 几丁质酶的研究进展. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(5): 414–418]
- LIAO J Y. Ecological cultivation technology of snail in paddy field. *Rural Technology*, 2020(14): 113–114 [廖建云. 稻田生态养殖田螺技术. *乡村科技*, 2020(14): 113–114]
- LI L P, CAI L, TU Z Y, *et al.* Effects of dissolved oxygen and body weight on the oxygen consumption rate of *Anodonta woodiana*. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(5): 61–65 [李丽萍, 蔡露, 涂志英, 等. 溶解氧和体重对背角无齿蚌耗氧率的影响. *水生态学杂志*, 2012, 33(5): 61–65]
- LI E, LI C. Use of RNA-seq in aquaculture research. *Poultry Fisheries and Wildlife Sciences*, 2014, 2: 2
- LIU T, QI M, GAO Y, *et al.* Transcriptome analysis of brain tissue of juvenile Qingtian paddy field carp (*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*) during acute changes in dissolved oxygen. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(1): 79–88 [刘韬, 齐明, 高阳, 等. 青田田鱼幼鱼脑组织在急性低氧胁迫、复氧恢复的转录组分析. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(1): 79–88]
- LIANG X R, CAO Y F, YANG S, *et al.* Identification and functional differentiation analysis of histone H1 gene family in *Pinctada fucata martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(3): 472–481 [梁雪茹, 曹艳飞, 杨帅, 等. 马氏珠母贝组蛋白H1基因家族的鉴定及功能分析. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(3): 472–481]
- LÜ L, NING Q J. Research advances on structures and functions of crustacean chitinase genes. *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]
- LI X G, ZHOU G, ZHOU J, *et al.* Research progresses in function and expression regulation of chitinase gene family of aquatic crustaceans. *Journal of Aquaculture*, 2017, 38(4): 26–30 [李旭光, 周刚, 周军, 等. 水生甲壳类几丁质酶类基因家族功能与表达调控的研究进展. *水产养殖*, 2017, 38(4): 26–30]
- MEYER E, AGLYAMOVA G V, SHI W, *et al.* Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSF1x. *BMC Genomics*. 2009, 10(1): 219
- SMALL K, KOPF R K, WATTS R J, *et al.* Hypoxia, blackwater and fish kills: Experimental lethal oxygen thresholds in juvenile predatory lowland river fishes. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94524
- SONG L, LÜ J J, WANG L, *et al.* Cloning of chitinase gene (*PtCht6*) in *Portunus trituberculatus* and its functional

- analysis in immunity. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1080–1090 [宋柳, 吕建建, 王磊, 等. 三疣梭子蟹几丁质酶基因(*PtCht6*)的克隆及其在免疫中的功能分析. *海洋与湖沼*, 2019, 50(5): 1080–1090]
- WANG C Z, LI Z, LIANG H W, *et al.* The effects of hypoxia stress on mitochondrial ATPase activity and the expression of F<sub>1</sub>- $\delta$  in *Hypophthalmichthys molitrix*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 454–463 [王春枝, 李忠, 梁宏伟, 等. 低氧胁迫对鲢线粒体 ATP 酶活性及 F<sub>1</sub>- $\delta$  基因表达的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 454–463]
- WANG X W, ZHU H, HU H X, *et al.* Effects of hypoxia on physiological status of siberian sturgeon *Acipenser baeri* juveniles. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 459–465 [王晓雯, 朱华, 胡红霞, 等. 低氧胁迫对西伯利亚鲟幼鱼生理状态的影响. *水产科学*, 2016, 35(5): 459–465]
- WANG H W, LI L F, ZHAO W B, *et al.* The effect of roxithromycin on the activity of ERND in *Cipangopaludina chinensis*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(3): 400–405 [王宏伟, 李林锋, 赵文博, 等. 罗红霉素对中国圆田螺 ERND 酶活性的影响. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(3): 400–405]
- WANG T. The molecular mechanism of hypoxia signal pathway in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2017 [王婷. 长牡蛎低氧信号通路分子作用机制研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2017]
- WANG J, GAO J, XIE J, *et al.* Cloning and mineralization-related functions of the chitinase gene in *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 189–197 [王俊, 高静, 谢军, 等. 栉孔扇贝几丁质酶基因的克隆及功能鉴定. *水产学报*, 2017, 41(2): 189–197]
- XU H, CHEN X M, WANG G Q, *et al.* Research progress of hypoxia on aquaculture. *Feed Industry*, 2016, 37(2): 33–37 [徐贺, 陈秀梅, 王桂芹, 等. 低氧胁迫在水产养殖中的研究进展. *饲料工业*, 2016, 37(2): 33–37]
- 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]
- YANG L P. Cultivation techniques of *Cipangopaludina chinensis*. *Inland Fisheries*, 2007, 32(1): 40 [杨立平. 中华圆田螺养殖技术. *内陆水产*, 2007, 32(1): 40]
- YANG K, HUANG Z H, MA A J, *et al.* Transcriptome study of kidney of turbot under high-temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 86–95 [杨凯, 黄智慧, 马爱军, 等. 高温胁迫条件下大菱鲆肾脏转录组研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 86–95]
- YUAN Z Q, ZHANG Y, LI X L, *et al.* HSP70 protects intestinal epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via a mechanism that involves the mitochondrial pathways. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 643(2/3): 282–288
- YEH C H, HSU S P, YANG C C, *et al.* Hypoxic preconditioning reinforces HIF- $\alpha$ -dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy. *Life Sciences*, 2010, 86(3/4): 115–123
- ZHU T, XU L F, LIU X Y, *et al.* Study on the inhibitive effect of polysaccharide in snail on tumor cells *in vitro*. *Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 39(1): 13–16 [朱涛, 许礼发, 刘小燕, 等. 田螺多糖抑制肿瘤细胞增殖生物活性的实验研究. *云南中医学院学报*, 2016, 39(1): 13–16]
- ZHAO J S, TONG C C, ZHOU J W, *et al.* A comparative study of phenoloxidase activity between *Cipangopaludina cathayensis* and *Oncomelania hupensis*. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2019, 31(2): 169–170, 181 [赵劲松, 童成成, 周佳维, 等. 湖北钉螺与中华圆田螺体内酚氧化酶活力比较. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(2): 169–170, 181]
- ZHENG W L, WANG Z Y, COLLINS J E, *et al.* Comparative transcriptome analyses indicate molecular homology of zebrafish swimbladder and mammalian lung. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24019
- ZHAO X X. Studies on transcriptome and digital gene expression of pearl sac in *Pinctada martensii* by RNA sequencing. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2011 [赵晓霞. 基于RNA测序技术的马氏珠母贝珍珠囊转录组及数字基因表达谱分析. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- ZHANG Q, SHANG M, ZHANG M, *et al.* Microvesicles derived from hypoxia/reoxygenation-treated human umbilical vein endothelial cells promote apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes. *BMC Cell Biology*, 2016, 17(1): 25

(编辑 冯小花)

## Transcriptome Analysis of Liver Tissue of *Cipangopaludina cathayensis* Under Hypoxic Stress

YIN Likun<sup>1</sup>, HUANG Kai<sup>1</sup>①, YU Kai<sup>1</sup>, SU Zhijian<sup>2</sup>, GUO Ruijie<sup>1</sup>, YANG Xuhong<sup>1</sup>, WU Yaoting<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Decheng Market Supervision Administration, Dezhou 253011, China)

**Abstract** *Cipangopaludina cathayensis* is a snail species unique to China. Domestic research on *C. cathayensis* has mainly focused on aquaculture technology, especially the paddy field breeding method, where water quality plays a critical role in the cultivation of *C. cathayensis*. Dissolved oxygen is one of the most important factors in the aquatic environment because it impacts a series of biological activities such as the growth and development, metabolism, reproduction, and breeding of aquatic animals. When the dissolution of oxygen in water is less than 2 mg/L, the water is in a low oxygen or anoxic state. Hypoxia can slow the growth and development of aquatic animals, reduce their disease resistance and reproductive ability, and, in serious cases, can lead to their death. In recent years, research on *C. cathayensis* has mainly focused on the anti-tumor mechanism, immune response, nutritional value evaluation, and antibiotic resistance. However, there is currently no report on the regulation of response to hypoxia in *C. cathayensis* either domestically or internationally. The purpose of this study was to explore the differential expression of genes in the liver of *C. cathayensis* under hypoxic stress.

In this study, healthy *C. cathayensis* without mechanical damage were cultured in a hypoxia stress group (2.5 mg/L) and a normoxia (control) group (6.9 mg/L), with 90 *C. cathayensis* in each group and 3 replicates. For the low oxygen stress treatment, dissolved oxygen was decreased from 6.9 mg/L to 2.5 mg/L within 1 h and maintained for 24 h. The liver tissue was taken as the experimental material in both the hypoxia stress group and normoxic group. The total RNA was extracted and an mRNA library was constructed. The liver tissue samples of *C. cathayensis* from both groups were sequenced and analyzed using an Illumina HiSeq-2500 technology platform, and unigenes were compared and annotated in GO, KOG, Nr, and KEGG databases. The differentially expressed genes were analyzed using DESeq. Bioinformatics analysis was performed on the function of GO and KEGG of differentially expressed genes, and the key differentially expressed genes were further validated by qPCR.

Transcriptome analysis results showed that 500 584 transcripts were assembled from the original data and 23 379 unigenes were obtained by sequencing, with an average length of 686.65 bp and N50 of 1 127 bp. Among the unigenes, 26 636 were found to be homologous to genes in the Nr protein database. Additionally, 22 907 unigenes were annotated in the GO database, 13 290 in the KOG database, and at least 4 179 in the KEGG database. Compared with the control group, 176 differentially expressed genes were screened in the hypoxia stress group, among which 64 and 112 were up- and down-regulated, respectively. Further, GO functional enrichment analysis found that the differential genes were mainly enriched in chitin metabolic and glucosamine-containing compound metabolic processes in the biological process. Differential genes were also enriched in collagen trimer

① Corresponding author: HUANG Kai, E-mail: hkai110@163.com

in the cellular component and chitin binding in the molecular function. The enrichment analysis results of the KEGG pathway mainly focused on four pathway categories, namely environmental information processing, genetic information processing, metabolism, and organismal systems. Finally, the qPCR results of six key differentially expressed genes were obtained by RT-qPCR. Among the up-regulated genes under hypoxic stress were the heat shock proteins 70B2 and beta-6, and the down-regulated genes were chitinase-like protein 4, collagen alpha-1 chain (XIV), collagen alpha-4 chain (XIV), and phosphatase-related protein type 5, which confirmed the reliability of the transcriptome sequencing results.

Studies have shown that, through transcriptome sequencing, the expression information of relevant functional genes in *C. cathayensis* liver tissues under hypoxic stress can be obtained. Among them, the expression of heat shock protein genes were up-regulated, indicating that hypoxic stress activated the physiological activities of *C. cathayensis* to adapt to hypoxia and protected the body from hypoxic damage. In addition, the down-regulated expression of related genes in the metabolic pathway indicates that the growth of *C. cathayensis* is affected under hypoxic environments. In conclusion, the results of this study provide basic data and a theoretical basis for the in-depth study of the regulatory mechanism of *C. cathayensis* in response to hypoxic stress.

**Key words** Cipangopaludina *cathayensis*; Hypoxia; Transcriptome; Differentially expressed genes; Heat shock protein



DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220214001

http://www.yykxjz.cn/

张林, 兰开勇, 宋荣群, 熊冬梅, 李瑞娇, 李军文, 姜海波, 邵俭. 秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色、光照强度及光色的选择行为. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 179-187

ZHANG L, LAN K Y, SONG R Q, XIONG D M, LI R J, LI J W, JIANG H B, SHAO J. Selective behavior of juvenile *Brachymystax tsinlingensis* depends on substrate color, light intensity, and light color. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 179-187

## 秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色、光照强度及光色的选择行为\*

张林<sup>1,4</sup> 兰开勇<sup>1</sup> 宋荣群<sup>1</sup> 熊冬梅<sup>2</sup> 李瑞娇<sup>3</sup>  
李军文<sup>5</sup> 姜海波<sup>1,4</sup> 邵俭<sup>1,4①</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室 贵州 贵阳 550025;  
2. 西北农林科技大学动物科技学院 陕西 杨凌 712100; 3. 中国水产科学研究院黄河水产研究所  
陕西 西安 710000; 4. 贵州大学特种水产研究所 贵州 贵阳 550025;  
5. 太白县水产工作站 陕西 宝鸡 722300)

**摘要** 光照、底质颜色是影响鱼类行为、生存的重要环境因子,为探究秦岭细鳞鲑(*Brachymystax tsinlingensis*)稚鱼对光照及底质颜色环境偏好,本研究以秦岭细鳞鲑子代为实验鱼[平均全长为(3.31±0.67) cm;平均体重为(0.42±0.18) g]开展了秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色、光照强度及光照颜色的选择行为。结果显示,秦岭细鳞鲑稚鱼个体与群体均对黑色底质偏好明显;个体对3种光照强度(弱光区为1~5 lx,过渡区为5~10 lx,强光区为10~25 lx)均无明显趋向性( $P>0.05$ ),而群体对强光(10~25 lx)有明显趋避性;在相同光照强度(1~3 lx)下,个体对4种光照颜色(黄、红、绿和蓝)无明显趋向性( $P>0.05$ ),而群体对绿光有明显趋避性( $P<0.05$ )。秦岭细鳞鲑个体和群体对光照强度和光照颜色的差异性表现可能与其信息传递特征或环境反应机制不同有关,而个体和群体均偏好黑色底质,其偏好光照强度为1~10 lx,对绿光具有趋避性,这可能与该物种生活环境特征相关。本研究结论可进一步为秦岭细鳞鲑苗种培育和增殖放流环境选择提供参考。

**关键词** 底质;光照;选择行为;秦岭细鳞鲑;稚鱼

**中图分类号** Q142.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0179-09

鱼类的行为和生存状况受栖息水域中诸多环境因子影响,如温度、光环境、水流、底质等(蔡厚才等,1998)。光环境作为重要的环境因子之一,主要包括光照强度、光照颜色和光周期,有研究表明,强光(>340 lx)显著促进了大西洋鲑(*Salmo salar*)的生长(Oppedal *et al.*, 1997),随后证实连续光照也能促进大西洋鲑的生长,并随着光照强度的升高,生长率提高

(Stefansson *et al.*, 1993)。顾孝连等(2009)研究发现,长江口中华鲟(*Acipenser sinensis*)幼鱼摄食率受光照强度影响不明显,但对光照强度具有正趋向性,其正趋光性有利于寻找食物丰富的栖息环境;而川陕哲罗鲑(*Hucho bleekeri*)在弱光(1.11 lx)下受精卵孵化率显著高于强光(570 lx),且孵出时间早于强光(王成友等, 2019)。与光照强度相似,光照颜色也可影响鱼类的

\* 国家自然科学基金项目(32002392)和贵州省科技计划项目([2020]4Y027)共同资助。张林, E-mail: zhanglin012656@163.com

① 通信作者:邵俭,副教授, E-mail: shaojian5098@163.com

收稿日期: 2022-02-14, 收修改稿日期: 2022-04-11



食行为明显,摄食效果达到最佳,可认定为已完全适应实验环境。实验开始前2 h对实验鱼不进行投喂,避免摄食因素影响实验结果。

## 1.2 实验装置与方法

**1.2.1 趋光性实验** 将水族箱(长 1.80 m × 宽 0.45 m × 高 0.50 m)分成面积相等的 3 个区域,再以 2 只 15 W 白炽灯提供唯一光源放在水族箱一端,调节 2 个白炽灯与水族箱的距离,使水族箱 3 个等面积区域照度为弱光区为 1~5 lx,过渡区为 5~10 lx,强光区为 10~25 lx (图 1)。光照强度由 Spectrum LightScout 光量子计(3415F)多次重复测定。每组实验后调换强光区弱区位置,消除位置适应性误差。

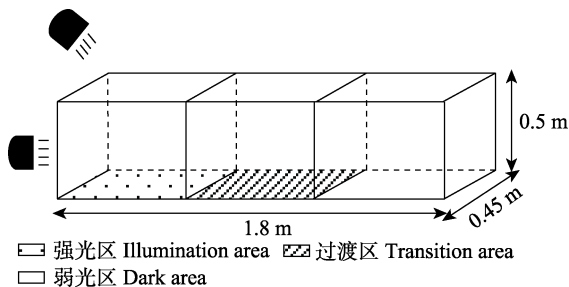


图 1 光照强度实验示意图

Fig.1 Sketch map for light intensity preference test

将水族箱进行清洗消毒后加入实验用水,水深为 20.06~21.50 cm,水质情况见表 1。

**个体实验:** 从暂养槽随机挑选 20 尾实验鱼进行实验,每次从水族箱中央(过渡区中央)放入 1 尾鱼,适应 2 min 后,利用摄像机连续录像 5 min,再新取出下一尾鱼按同样的方法进行实验;统计每尾鱼在 3 种不同照度区域中停留的时间,以实验鱼在不同照度区域中的时间百分比平均数作为个体对不同光照强度的选择性指标。

**群体实验:** 从暂养槽随机挑选 30 尾实验鱼并分为 5 组进行实验,每组 6 尾鱼同时放入水族箱中央,适应 2 min 后,每间隔 30 s 记录 1 次,记录在不同光照区域的实验鱼数量,每组记录 10 次,再新取出下一组实验鱼按同样的方法进行实验;计算不同光照强度区域中实验鱼的数量百分比,以各个区域中的数量百分比平均数作为群体对不同光照强度选择性的指标。

所有实验统计时,以实验鱼头部进入某个区域作为处于该区域的标准,开始计时或计数。

**1.2.2 底质颜色选择实验** 用白色、黑色、蓝色大小相等、不透光彩布(长 0.60 m × 宽 0.45 m)将水族箱底部铺设成面积相等的 3 个区域,再将 2 只 15 W 白

炽灯作为唯一光源置于水族箱的正上方,调节两灯间的位置,使 3 个等面积区域的光照强度均为 20~25 lx (图 2)。每组实验结束后交换底质位置,消除位置适应性误差。

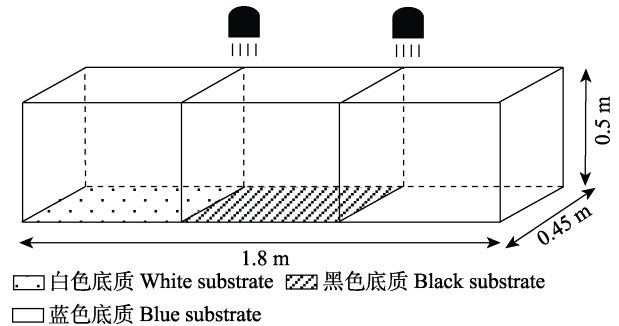


图 2 底质颜色实验示意图

Fig.2 Sketch map for substrate color preference test

底质颜色选择实验与趋光性实验类似。

**个体实验:** 随机选 20 尾实验鱼,每次放入 1 尾进行实验;统计每尾鱼在各个区域停留的时间,以实验鱼在各个区域的时间百分比平均数作为个体对不同底质颜色的选择性指标。

**群体实验:** 每组随机挑选 30 尾实验鱼,每次放入 6 尾进行实验;计算每次记录时各个区域实验鱼的数量百分比,以各个区域中的数量百分比平均数作为群体对不同底质颜色的选择性指标。

**1.2.3 光照颜色选择实验** 在水族箱内用 3 块面积相等的不透光挡板(长 0.45 m × 宽 0.20 m)将水族箱划分为 4 个等面积区域,再以 1 W 的黄色、红色、绿色和蓝色 4 种颜色的 LED 彩灯作为每个等面积区域内的唯一光源,置于水族箱正上方中心的同一平线上,使 4 个等面积区域的光照强度都为 1~3 lx (图 3)。每组实验结束后采用顺时针方向交换光色位置,消除位置适应性和光色组合带来的误差。

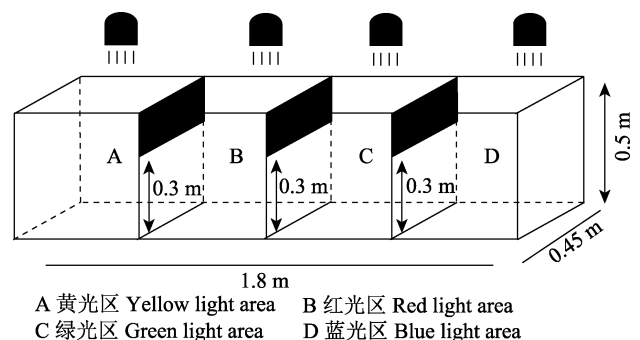


图 3 光照颜色选择实验示意图

Fig.3 Sketch map for light color preference test

个体实验：每次放入1尾实验鱼，共重复20次；统计每尾鱼在各个区域停留的时间，以实验鱼在各个区域的时间百分比平均数作为个体对不同光色的选择性指标。

群体实验：每次同时放入6尾实验鱼，共重复5次；计算每次记录时各个区域中实验鱼的数量百分比，以各个区域中的数量百分比平均数作为群体对不光色的选择性指标。该实验部分参照周显青等(2000)对鱼类光色偏好研究，光照颜色设计为黄色、红色、绿色和蓝色4种。

### 1.3 数据处理

运用非参数统计方法 Kruskal-Wallis Test 检验各区域内活动时间百分比和分布数量百分比差异显著性，利用单因素方差分析(one-way ANOVA)中 Duncan 法进行多重比较检验两两区域间显著性分析(王恒等, 2014)。数据使用 Excel 2016 和 SPSS 25 软件进行统计分析，结果均采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 趋光性行为

秦岭细鳞鲑稚鱼在3个照度区域(强光区、过渡区和弱光区)内的个体停留时间百分比为(35.49±27.88)%、(27.14±16.71)%和(37.37±31.43)%，实验发现，20尾稚鱼中的3尾行为个性显著，再次统计分析其余17尾的个体停留时间百分比则为(35.60±20.23)%、(32.51±11.81)%和(31.89±21.38)%；以上各照度区差异均不显著( $P>0.05$ )。群体分布尾数数量百分比为(21.33±10.24)%、(36.00±5.08)%和(42.67±10.24)%，群体在强光区的分布尾数数量百分比低于弱光区和过渡区，且差异显著( $P<0.05$ )，弱光区和过渡区间无显著性差异( $P>0.05$ )，表明群体对强光有负趋向性(图4)。

### 2.2 底质颜色选择

实验照度范围为20~25 lx，秦岭细鳞鲑稚鱼在3种颜色底质(白色、黑色和蓝色)内，个体停留时间百分比依次为(22.13%±17.46)%、(55.48±20.62)%和(22.39±14.45)%，在黑色底质区域活动时间百分比显著高于其他区域( $P<0.05$ )；群体分布尾数数量百分比依次为(16.00±10.58)%、(58.33±17.16)%和(25.67±12.05)%，群体在黑色底质的数量百分数高于白色底质和蓝色底质，且差异显著( $P<0.05$ )，白色底质和蓝色底质间无显著差异( $P>0.05$ )(图5)。结果表明，秦岭细鳞鲑稚鱼偏好于黑色底质，对白色底质和蓝色底质均偏好不明显。

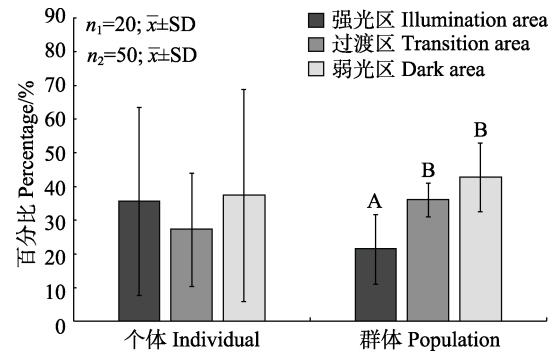


图4 秦岭细鳞鲑稚鱼趋光性

Fig.4 Preference for illumination intensity of juvenile *B. tsinlingensis*

$n_1$ 表示个体实验的样本量； $n_2$ 表示群体实验的样本量。

不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

$n_1$  denotes the sample size of individual experiments;  $n_2$  denotes the sample size of population experiments. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same as below.

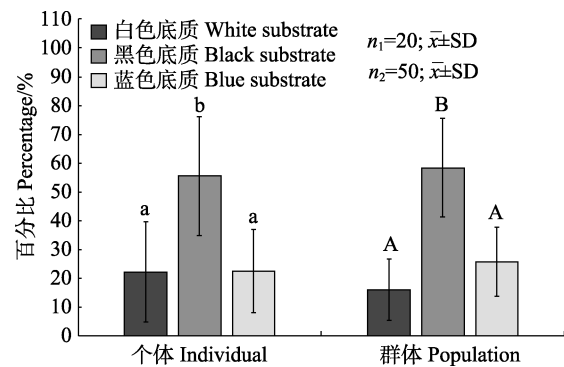


图5 秦岭细鳞鲑稚鱼对底质颜色的选择

Fig.5 Preference for substrate color of juvenile *B. tsinlingensis*

小写字母代表不同处理组个体之间的差异性；大写字母代表不同处理组群体之间的差异性。Lowercase letters represent the variability between individuals in different treatment groups, and uppercase letters represent the variability between groups in different treatment groups.

### 2.3 光照颜色选择

实验照度范围为20~25 lx，秦岭细鳞鲑稚鱼在黄、红、绿和蓝色4种光照颜色区域内，个体停留时间百分比依次为(26.15±23.72)%、(28.38±20.12)%、(24.29±17.81)%和(21.19±16.77)% (图6)，在蓝色区域的分布率(34.33±14.07)%最高，黄色(33.00±14.20)%次之，绿色区域的分布率最低，仅(12.67±3.65)%，蓝光和黄光显著高于绿光( $P<0.05$ )，对4种光照颜色的喜好排序：蓝色>黄色>红色>绿色。稚鱼在绿光分布尾数数量百分比低于其他光区，且差异显著( $P<0.05$ ) (表2)，蓝



光和黄光区间无显著性差异( $P>0.05$ ), 群体对绿光有负趋向性。

表2 秦岭细鳞鲑稚鱼在4种颜色区域的分布率及差异显著性

Tab.2 Distribution rate and significant difference of juvenile *B. tsinlingensis* in four kinds of color regions

光色 Color	分布尾数 Distribution number	分布率 $F$ Distribution rate $F$ /%	多重比较结果 Multiple comparison results
蓝色 Blue	103	34.33	A
黄色 Yellow	99	33.00	A
红色 Red	60	20.00	AB
绿色 Green	38	12.67	B

注: 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

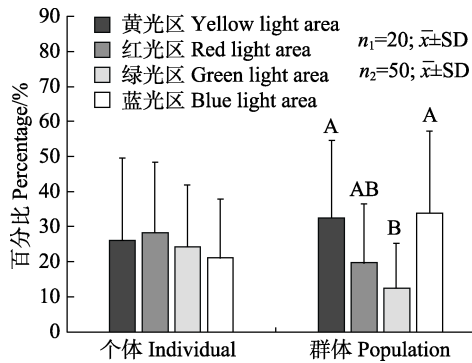


图6 秦岭细鳞鲑稚鱼对光照颜色的选择  
Fig.6 Preference for light color of juvenile *B. tsinlingensis*

### 3 讨论

#### 3.1 秦岭细鳞鲑稚鱼的光照强度选择

鱼类对光刺激产生定性运动的特征称为趋光性, 不同鱼类对光强的敏感性不同, 朝向光源运动称为正趋光性, 背离光源运动称为负趋光性(俞文钊, 1981)。鱼类对光照强度的选择是其对栖息选择的适应表现, 许多中上层鱼具有正趋光性, 如罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (杨弘等, 2011)、大西洋鲟(*Acipenser sturio*) (Kynard *et al*, 2002)、鲫(巩建华等, 2016)等。而底栖性鱼类由于栖息、索饵、繁殖于河底, 光线对其作用较弱, 对光照刺激呈现负趋光性(茅绍廉, 1985), 如瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*) (路波等, 2012)、大西洋鲑(Pinhorn *et al*, 1965)。本研究发现, 秦岭细鳞鲑稚鱼对光照强度呈负趋向性, 与秦岭细鳞鲑自然种群喜好遮蔽度高的山涧溪流深潭等昏暗环境相吻合。鱼

类的趋光性是鱼类探寻适宜照度的结果, 并经常在该照度的水域内集群(蔡厚才等, 1988), 四川裂腹鱼(*Schizothorax kolzovi*)常在 10.0~39.5 lx 照度范围内集群明显(董登攀等, 2021), 与秦岭细鳞鲑稚鱼在 1~10 lx 照度区域集群明显不一致。行为是生物长期进化的结果, 鱼类所选择的生活条件及行为也是其长期进化的结果(Clarke *et al*, 1981), 集群行为可以更快获取信息、有效躲避敌害、增强适应能力(周应祺等, 2013)。秦岭细鳞鲑稚鱼对光照强度的负趋向性以及弱照度下的集群行为都是其对栖息地选择的自然进化表现。鱼类视觉器官中视网膜形态组合与其生存的环境相适应, 其中, 视柱细胞对光照强度较为敏感, 可以分辨明暗(蔡厚才等, 1988), 秦岭细鳞鲑趋向弱光与视网膜形态结构的关系还有待后续研究。

#### 3.2 秦岭细鳞鲑稚鱼的底质颜色选择

秦岭细鳞鲑稚鱼游经黑色底质的水族箱区域时游动缓慢、停留时间长, 说明其对黑色底质有明显偏好, 与依靠嗅觉夜间摄食的革胡子鲶(*Clarias gariepius*) (汪留全等, 1990)、黑斑原鲌(席杰等, 2021)、黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*) (路波等, 2012)偏好一致。施德亮(2012)对秦岭细鳞鲑的摄食习性观察发现, 黄昏或黑暗条件下摄食效果最佳, 而此条件下难以依靠视觉发现食物或捕获饵料, 间接说明选择黑色底质可能更多作为寻找安全栖息地的信号。本研究中, 秦岭细鳞鲑稚鱼偏好黑色底质, 这可能是由于在光照环境下当光穿过水层照射在黑色底质时能形成相对较暗的水域环境, 有利于提供安全的藏匿环境。吴金明等(2017)研究表明, 秦岭细鳞鲑自然种群常选择两岸植被茂盛、遮蔽度高、石砾底质的山涧溪流深水区栖息, 而当光穿过栖息地同样会形成昏暗的环境。因此, 秦岭细鳞鲑稚鱼对黑色底质的偏好性是对栖息地适应性的选择, 其适应性意义主要是为了躲避敌害避免被捕食、提高生存能力。

#### 3.3 秦岭细鳞鲑稚鱼的光照颜色选择

秦岭细鳞鲑稚鱼在黄色、红色、绿色和蓝色4种光色区域具有选择性停留, 并且会尝试其他区域, 当其游经绿色区域时表现为游动突然加速通过该区域或者选择回避该区域, 表现出惊慌不安远离逃窜, 趋避行为明显; 在黄色区域表现出游泳缓慢、有序游动, 自主巡游, 活动稳定; 以上说明秦岭细鳞鲑对黄光具有正趋向性, 而对绿光具有负趋向性, 充分证明秦岭细鳞鲑具有一定的辨色能力。根据光谱理论可知, 由于水的吸收和反射作用, 太阳光穿过水层时, 大部分

红光会被滤掉(Volpato *et al.*, 2001; 张延青等, 2020), 水体底层主要以蓝绿光为主。秦岭细鳞鲑常栖息于黑色底层, 其视觉特征与自然栖息环境相适应。罗会明(1985)研究表明, 鱼类在游动过程中会对看到的灯光感到好奇, 因而产生探索性反射, 趋向光源。当红光突然出现时可能会与秦岭细鳞鲑喜好的栖息环境出现较大反差, 产生探索性反射而趋向光源。因此, 秦岭细鳞鲑对红光具有探索性趋向, 而对绿光具有趋避性, 在培育过程中避免使用红色和绿色光源, 可以降低秦岭细鳞鲑对环境的探索和趋避行为, 从而有效减少应激反应、提高成活率。

### 3.4 秦岭细鳞鲑稚鱼个体、群体间选择行为差异

鱼类个体行为在不同情境下表现出稳定的差异称为“个性”, 群体间的个体行为差异有利于集体协同作用(张东等, 2021)。本研究表明, 秦岭细鳞鲑个体、群体间的底质颜色选择结果保持一致, 而光照强度和光照颜色选择实验中个体、群体间的结果有趋向性分歧; 秦岭细鳞鲑稚鱼个体对光照强度和光照颜色趋向性不明显, 而群体对强光和绿光负趋向性明显。张婧等(2017)认为, 具有“冒险型个性”的个体能对环境进行快速探索, 因此, 在群体中通常占据主导地位。秦岭细鳞鲑与褐鳟(*Salmo trutta*)、虹鳟等群体中也有“冒险型”的个体(Fredrik *et al.*, 2004; Sneddon, 2003)。同时, 鱼类在集群中可以通过个体间相互传递信息(周应祺等, 2013), 秦岭细鳞鲑群体中“冒险型”个体将环境信息传递给其他鱼, 使其更快地趋避不利环境, 即减少探索时间, 有更多时间停留在适宜照度和光色区域, 导致群体趋避性明显(任为公, 1992)。个体和群体不同的现象原因有多种, Chan 等(1997)对海湾鲟(gulf sturgeons)研究发现, 群体间由于存在种内斗争会对卵石回避或无选择, 而个体选择卵石; 大型鱼类中华鲟群体由于部分进入亮光区的幼鱼进行适应性圆周运动, 迫使其他幼鱼更多停留在过渡区, 而个体更多停留在亮光区(王恒等, 2014)。本研究中, 秦岭细鳞鲑稚鱼群体能更快趋避强光区和绿光区, 停留时间较短, 而个体停留时间较长, 这可能是集群后群体与个体信息传递特征或环境反应机制不同所导致。

## 4 结论

秦岭细鳞鲑属冷水性鱼类, 生长缓慢, 应激性强, 基于研究结果并结合秦岭细鳞鲑早期生物学特性, 建议在秦岭细鳞鲑苗种培育与资源增殖过程中, 尤其是

在稚鱼期, 其光照强度设置为 1~10 lx, 使用黑色或深色底质的养殖设施, 避免使用绿色和红色光色的光源, 以上措施将会利于秦岭细鳞鲑稚鱼集群行为产生, 降低应激行为频次和减少能量消耗, 从而使其生长发育、摄食和存活率等方面得到改善。需要强调的是, 本研究仅针对秦岭细鳞鲑早期发育关键阶段, 关于其他发育阶段及其行为规律有待于后续进一步研究。

## 参 考 文 献

- CAI H C, HE D R. Fish behavioristics. Xiamen: Xiamen University Press, 1998, 1-12 [蔡厚才, 何大仁. 鱼类行为学. 厦门: 厦门大学出版社, 1998, 1-12]
- CHAN M D, DIBBLE E D, KILGORE K J. A laboratory examination of water velocity and substrate preference by age-0 gulf sturgeons. Transactions of the American Fisheries Society, 1997, 126(2): 104-115
- CLARKE W C, SHELHOURN T E, BRETT T R. Effect of artificial photoperiod cycles, temperature and salinity on growth and smolting in underyearling coho (*Oncorhynchus kisutch*), chinook (*O. tshawytscha*) and sockeye (*O. nerka*) salmon. Aquaculture, 1981, 22(4): 105-116
- DONG D P, LI F B, WAN D, *et al.* Studies on influence of illumination on schooling behavior of *Schizothorax kozlovi*. Transactions of Oceanology and Limnology, 2021, 43(2): 39-143 [董登攀, 李富兵, 万东, 等. 光照对四川裂腹鱼集群行为的影响研究. 海洋湖沼通报, 2021, 43(2): 39-143]
- FREDRIK S L, ERIK P, JOHAN H, *et al.* Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (*Salmo trutta*): Implications for dominance. Behavioral Ecology, 2004, 15(2): 192-198
- GONG J H, GUO C Y, TIAN Z, *et al.* Study on the selectivity of *Carassius auratus* under different environment colors and luminous intensities. Journal of Biology, 2016, 33(5): 13-18 [巩建华, 郭春阳, 田喆, 等. 红鲫鱼对环境颜色及光强的趋向性研究. 生物学杂志, 2016, 33(5): 13-18]
- GONG P, HOU J L, ZHUANG P, *et al.* Selective behavior of *Anguilla japonica* glass eel on substrate color and light intensity in the Yangtze estuary. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 510-516 [龚盼, 侯俊利, 庄平, 等. 长江口日本鳗鲡苗对底质颜色和光照强度的选择行为. 海洋渔业, 2015, 37(6): 510-516]
- GU X L, ZHUANG P, ZHANG L Z, *et al.* Illumination intensity preference and its effects on feeding efficiency of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* captured from the estuary of Yangtze River. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 778-783 [顾孝连, 庄平, 章龙珍, 等. 长江口中华鲟幼鱼趋光行为及其对摄食的影响. 水产学报, 2009, 33(5): 778-783]



- KYNARD B, HORGAN M. Ontogenetic behavior and migration of Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, and shortnose sturgeon, *A. brevirostrum*, with notes on social behavior. *Environmental Biology of Fishes*, 2002, 63(2): 137–150
- LI D P, ZHUANG P, WANG M X, *et al.* Preference of illumination and influence of different photoperiods on growth of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20(6): 564–567 [李大鹏, 庄平, 王明学, 等. 史氏鲟稚鱼的趋光性及不同光照周期对其生长的影响. *华中农业大学学报*, 2001, 20(6): 564–567]
- LI S Z. On a new subspecies of fresh-water trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis*, from Taipaishan, Shansi, China. *Zoological Systematics*, 1966, 3(1): 92–94 [李思忠. 陕西太白山细鳞鲑的一新亚种. *动物分类学报*, 1966, 3(1): 92–94]
- LU B, SHI X T, LIU D F, *et al.* White and black substrate preference and hiding behavior of *Pelteobagrus vachelli*. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(5): 36–40 [路波, 石小涛, 刘德富, 等. 瓦氏黄颡鱼对黑白底质颜色偏好和藏匿行为研究. *水生态学杂志*, 2012, 33(5): 36–40]
- LUO H M. The principle of phototropism of marine economic animals. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing Press, 1985, 4: 60–62 [罗会明. 海洋经济动物趋光原理. 福州: 福建科学技术出版社, 1985, 4: 60–62]
- MAO S L. Fish action and fishing techniques. Beijing: China Ocean Press, 1985, 119–157 [茅绍廉. 鱼类行动与捕鱼技术. 北京: 海洋出版社, 1985, 119–157]
- OPPEDAL F, TARANGER G L, JUELL E J, *et al.* Light intensity affects growth and sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts in sea cages. *Aquatic Living Resources*, 1997, 10(6): 351–357
- PINHORN A, ANDREWS C. Effect of photoperiods on the behavior of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in vertical and horizontal light gradients. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1965, 22(2): 369–383
- REN W G. Aims and methods of studying fish behavior. *Marine Fisheries*, 1992, 14(5): 221–224 [任为公. 研究鱼类行为的目的与方法. *海洋渔业*, 1992, 14(5): 221–224]
- SALWA M N, AMANY M D, RADY A M, *et al.* Effect of different monochromatic LED light colors on growth performance, behavior, immune-physiological responses of gold fish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 2021, 538(30): 73652–73661
- SHAO J, CHU Z P, LU B, *et al.* Effects of different baits on the growth and survival of seedling *Brachymystax tsinlingensis*. *Scientific Fish Farming*, 2018(8): 26–28 [邵俭, 褚志鹏, 陆斌, 等. 不同饵料对秦岭细鳞鲑苗种生长及存活的影响. *科学养鱼*, 2018(8): 26–28]
- SHAO J, LUO W, WEI Q W, *et al.* Assignment of parentage by microsatellite analysis in the endangered *Brachymystax lenok tsinlingensis* (Salmonidae). *Aquatic Biology*, 2017, 26: 69–73
- SHAO J, WEI Q W, WU J M, *et al.* An artificial breeding method for *Brachymystax lenok tsinlingensis*: 201410319444.1. 2014–09–17 [邵俭, 危起伟, 吴金明, 等. 一种秦岭细鳞鲑人工繁育方法: 201410319444.1. 2014–09–17]
- SHI D L, WEI Q W, SUN Q L, *et al.* Early ontogenesis of *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(4): 557–567 [施德亮, 危起伟, 孙庆亮, 等. 秦岭细鳞鲑早期发育观察. *中国水产科学*, 2012, 19(4): 557–567]
- SHI D L. Study on early ontogenesis of *Brachymystax lenok tsinlingensis*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012, 4–14 [施德亮. 秦岭细鳞鲑早期发育研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2012, 4–14]
- SNEDDON L U. The bold and the shy: Individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 2003, 62(4): 971–975
- STEFANSSON S O, HANSEN T J, TARANGER G L. Growth and parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under different light intensities and subsequent survival and growth in seawater. *Aquacultural Engineering*, 1993, 12(4): 231–243
- VOLPATO G L, BARRETO R. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001, 34: 1041–1045
- WANG C Y, DU H, WU J M, *et al.* Effect of illumination on the hatching of Sichuan taimen (*Hucho bleekeri kimura*) eggs. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(1): 62–65 [王成友, 杜浩, 吴金明, 等. 光照对川陕哲罗鲑受精卵孵化的影响. *淡水渔业*, 2019, 49(1): 62–65]
- WANG H, WEI Q W, LI W, *et al.* Light intensity preferences of 5-month and 7-month F<sub>2</sub> Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(7): 929–938 [王恒, 危起伟, 李伟, 等. 5月龄、7月龄中华鲟子二代光照偏好性研究. *水产学报*, 2014, 38(7): 929–938]
- WANG L Q, CHENG Y S. On the feeding habits and growth for larval of *Clarias lazera* under pond nursery. *Journal of Fisheries of China*, 1990, 14(2): 105–113 [汪留全, 程云生. 池养条件下草胡子鲶仔幼鱼摄食习性与生长的初步研究. *水产学报*, 1990, 14(2): 105–113]
- WEI P P, LI X, ZHANG J P, *et al.* Effects of LED spectra on morphological characters and gene expression of growth in *Takifugu rubripes* larvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 162–168 [魏平平, 李鑫, 张俊鹏, 等. LED光谱对红鳍东方鲟仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 162–168]
- WU J M, YANG H C, SHAO J, *et al.* Habitat environmental characteristics of *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 214–219 [吴金明, 杨焕超, 邵俭, 等. 秦岭细鳞鲑栖息地环境特征研究. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 214–219]

- XI J, ZHENG Z L, MOU Z B, *et al.* Study on the hiding behavior of the *Glyptosternum maculatum* larvae and juveniles. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(5): 1129–1137 [席杰, 郑宗林, 牟振波, 等. 黑斑原鲃仔稚鱼藏匿行为研究. *水生生物学报*, 2021, 45(5): 1129–1137]
- XUE C, WEI Q W, SUN Q L, *et al.* Age and growth of *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 743–749 [薛超, 危起伟, 孙庆亮, 等. 秦岭细鳞鲈的年龄与生长. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 743–749]
- YANG H, JIANG Y, XIAO W, *et al.* Studies on the photo taxis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during different growth stages. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(32): 61–65 [杨弘, 江苑, 肖炜, 等. 尼罗罗非鱼不同生长阶段的趋光性研究. *中国农学通报*, 2011, 27(32): 61–65]
- YU W Z. Investigations on the phototropism behaviour of fishes. *Journal of Psychologica Science*, 1981, 4(2): 11–16 [俞文钊. 鱼类的趋光行为研究. *心理科学通讯*, 1981, 4(2): 11–16]
- YUE P Q, CHEN Y Y. China red data book of endangered animals: Pisces. Beijing: Science Press, 1998, 35–37 [乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类). 北京: 科学出版社, 1998, 35–37]
- ZHANG D, WANG L P. Fish personality: Implications for ecology, aquaculture and fisheries. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1346–1358 [张东, 王莉平. 知鱼、识鱼、管鱼: 从个性研究开始. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1346–1358]
- ZHANG H G, ZHANG Y L, SONG H Q, *et al.* Effects of light color and photoperiod on growth and physiology of *Salmo salar* during smoltification. *Fishery Modernization*, 2020, 47(3): 16–21 [张海耿, 张宇雷, 宋红桥, 等. 光色和光照周期对大西洋鲑银化期生长及生理的影响. *渔业现代化*, 2020, 47(3): 16–21]
- ZHANG Q, FU S J, XIA J G. Recent progress on the personality of fish. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, 36(12): 3623–3628 [张婧, 付世建, 夏继刚. 鱼类“个性”行为及其研究进展. *生态学杂志*, 2017, 36(12): 3623–3628]
- ZHANG Y Q, QIN F, FEI F, *et al.* Analysis of propagation characteristics of LED light source in aquaculture water. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 153–161 [张延青, 秦菲, 费凡, 等. LED光源在海水养殖水体中传播特征解析. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 153–161]
- ZHAO X, LI L, DONG S L, *et al.* Effects of LED colors and melatonin treatment on antioxidant enzyme activities and relevant hormone concentrations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 44–54 [赵鑫, 李丽, 董双林, 等. LED光色及注射褪黑素对虹鳟抗氧化酶活性及相关激素含量的影响. *水产学报*, 2021, 45(1): 44–54]
- ZHOU X Q, NIU C J, LI Q F. Effects of light on feeding behavior, growth and survival of aquatic animals. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(2): 178–181 [周显青, 牛翠娟, 李庆芬. 光照对水生动物摄食、生长和存活的影响. *水生生物学报*, 2000, 24(2): 178–181]
- ZHOU Y Q, WANG J, QIAN W G, *et al.* Review of fish schooling behavior study. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 734–743 [周应祺, 王军, 钱卫国, 等. 鱼类集群行为的研究进展. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(5): 734–743]

(编辑 陈 辉)

## Selective Behavior of Juvenile *Brachymystax tsinlingensis* Depends on Substrate Color, Light Intensity, and Light Color

ZHANG Lin<sup>1,4</sup>, LAN Kaiyong<sup>1</sup>, SONG Rongqun<sup>1</sup>, XIONG Dongmei<sup>2</sup>,  
LI Ruijiao<sup>3</sup>, LI Junwen<sup>5</sup>, JIANG Haibo<sup>1,4</sup>, SHAO Jian<sup>1,4</sup><sup>①</sup>

(1. College of Animal Science; Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 3. Yellow River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Xi'an 710000, China; 4. Special Fishes Research Institute, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 5. Fishery Workstation of Taibai County, Baoji 722300, China)

**Abstract** *Brachymystax tsinlingensis* is a unique cold water fish locally distributed in China, belonging to Salmoniformes, Salmonidae and *Brachymystax*. It is mainly distributed in the mountain streams of the Qinling

① Corresponding author: SHAO Jian, E-mail: shaojian5098@163.com

mountain range, including the Shitouhe River in the northern foothills, the Heihe River in the eastern foothills and the Taibaihe and Xushuihe rivers in the southern foothills. *B. tsinlingensis* has high sensitivity owing to demanding natural habitat conditions and special biological properties. In the past few decades, environmental pollution, a variety of human-caused threats, and reduced resources has caused drastic declines in the wild populations of *B. tsinlingensis*. In 1998, the species was listed as a second-class state-protected wild animal in the China Red Data Book of Endangered Animals. Due to environmental disruption and human impacts, wild numbers of this species have declined quickly. In China, researchers have focused on *B. tsinlingensis* conservation. Artificial propagation is one of the most effective methods to restore the natural populations of *B. tsinlingensis*. In recent years, initial breakthroughs in artificial propagation techniques have aided this species, but the fry survival rate remains relatively low. During artificial breeding experiments, we identified the light environment and substrate conditions that are important factors affecting the survival rate of fry. Fry behavioral selection of light and substrate characteristics was highly significant. The aim of this study was to identify the habitat preferences and associated behavior of *B. tsinlingensis*. Behavioral experiments were conducted on the progeny of *B. tsinlingensis* in response to the light environment and substrate color. In this study, we randomly selected healthy juveniles from the same offspring batch obtained through artificial propagation as the experimental fish. The fry total length ranged from 2.23–4.57 cm, with an average of (3.31±0.67) cm. Fry weight ranged from 0.21–0.77 g, with an average weight of (0.42±0.18) g. The experimental fish were not fed 2 h before initiating the experiment. We undertook a combination of individual tests and population tests to investigate three different behavioral selection experiments on juveniles: substrate color preference with the substrate colors of black, white, and blue; light intensity preference with the light intensity of dark (from 1 lx to 5 lx), transition area (from 5 lx to 10 lx), and illuminated area (from 10 lx to 25 lx); light color preference with the light colors of yellow, red, green, or blue. The statistical analysis of the percentage of residence time and the distribution number of experimental fish in each area, enabled analysis using a selective index for the different light intensities, different light colors, and different substrate colors. All analyses used Excel 2016 and SPSS (V 25.0) software, and the statistical values were expressed as the mean ± standard deviation. The results showed that the percentage of time the individuals resided in the black substrate area was significantly higher than that in the white or blue area ( $P<0.05$ ). The percentage of the population distributed in the black substrate area was also significantly higher than that in the white or blue area ( $P<0.05$ ). Therefore, the majority of the fish preferred the black substrate. The fish swam slowly through the black substrate area in the substrate color experiments. Secondly, in the phototropism experiment, there was no significant variation in the duration of each individual in the three light intensity areas ( $P>0.05$ ), and the percentage of the population in the illuminated area was significantly lower than that in the dark area and the transition area ( $P<0.05$ ). There was no significant difference between the dark area and the transition area. The population had a negative tendency to the illuminated area, and fish were observed clustering in the dark area and the transition area. Moreover, individuals did not differ significantly in the percent of time they resided in the four light color areas ( $P>0.05$ ). However, the percentage of individuals in the green light area was significantly lower than that in other areas ( $P<0.05$ ). The population had a negative tendency towards the green light, and fish displayed sudden acceleration when swimming through the green area in the light color selection experiment. Consequently, the population had a more pronounced avoidance than the individual experiments, this might be related to the mutual transmission of information when residing in clusters, and the speed of information transmission in groups encouraging individuals to avoid the adverse environment. Juvenile *B. tsinlingensis* preferred a black substrate, avoided green light, and their optimum illumination range was 1–10 lx. The results provide scientific guidance for environmental fry rearing and releasing of *B. tsinlingensis*.

**Key words** Substrate environment; Light; Behavior selectivity; *Brachymystax tsinlingensis*; Juvenile

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220329003

http://www.yykxjz.cn/

杨帅帅, 朱筛成, 张冬冬, 潘祯祥, 李嘉尧, 吴旭干, 郑善玉. 2 种饵料模式对稻田养殖中华绒螯蟹幼蟹养殖性能和生理代谢的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 188–200

YANG S S, ZHU S C, ZHANG D D, PAN Z X, LI J Y, WU X G, ZHENG S Y. Effects of two feeding modes on the culture performance and physiological metabolism of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) reared in rice fields. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 188–200

## 2 种饵料模式对稻田养殖中华绒螯蟹幼蟹养殖性能和生理代谢的影响\*



杨帅帅<sup>1</sup> 朱筛成<sup>1</sup> 张冬冬<sup>1</sup> 潘祯祥<sup>1</sup>  
李嘉尧<sup>1</sup> 吴旭干<sup>1,2,3①</sup> 郑善玉<sup>4</sup>

(1. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 4. 淮安市淮阴区农业农村局 江苏 淮安 223300)

**摘要** 为优化稻田养殖中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹的饵料模式,本研究分别采用配合饲料和传统饵料(豆粕、麸皮、玉米和小麦)投喂稻田养殖中华绒螯蟹幼蟹 152 d, 每种投喂组各 3 个重复, 比较 2 种饵料模式对幼蟹养殖性能、蛋白质代谢、消化酶、抗氧化和免疫指标的影响。结果显示, 配合饲料组的雌蟹和雄蟹体质量均高于传统饵料组, 但差异不显著( $P>0.05$ ); 就养殖性能而言, 2 种饵料模式下, 配合饲料组正常幼蟹的平均体质量及产量、1 龄早熟蟹平均体质量及其产量、总产量和成活率均略高于传统饵料组, 饵料系数显著低于传统饵料组( $P<0.05$ ); 就蛋白质代谢而言, 配合饲料组雌蟹和雄蟹血淋巴中的总蛋白含量显著高于传统饵料组( $P<0.05$ ), 而传统饵料组雄蟹血淋巴中的尿素氮含量和胰腺中的谷草转氨酶活力显著高于配合饲料组( $P<0.05$ ); 配合饲料组雌蟹和雄蟹胰腺中的脂肪酶均显著高于传统饵料组( $P<0.05$ ), 而雄蟹的  $\alpha$ -淀粉酶活力显著低于传统饵料组; 配合饲料组的雌蟹血淋巴中总抗氧化能力、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶活力和胰腺中酸性磷酸酶活力均显著高于传统饵料组( $P<0.05$ )。综上所述, 投喂配合饲料可以提高稻田扣蟹的养殖性能、促进蛋白质沉积和脂类吸收、增强幼蟹抗氧化和免疫能力、提高蟹种质量。

**关键词** 中华绒螯蟹; 稻蟹共生; 饵料模式; 养殖性能; 生理代谢

**中图分类号** Q958 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0188-13

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的经济蟹类(He *et al.*, 2014)。据 2021 年渔业统计年鉴, 我国中华绒螯蟹扣蟹年产量为 6.54 万 t, 成蟹年产量为 77.5 万 t (农业农村部渔业渔政管理局等, 2021)。目前, 中华绒螯蟹的扣蟹和成蟹养殖在我国绝大部分地

区主要在池塘中进行(王少兵等, 2018), 稻田扣蟹养殖主要在东北地区(Bao *et al.*, 2022)。稻蟹共生具有“一水两用、稻蟹互利共生”的优点, 稻田中的天然饵料可以减少扣蟹养殖的饲料投入, 中华绒螯蟹的粪便和残饵又可以为水稻生长提供部分氮磷元素, 从而

\* 农业农村部和国家发改委产业强镇项目(发改农经 2019-245)、外交部亚洲合作资金项目(125A0607)和安徽省中央引导地方科技发展专项资金(01907d06020008)共同资助。杨帅帅, E-mail: 648671153@qq.com

① 通信作者: 吴旭干, E-mail: xgwu@shou.edu.cn

收稿日期: 2022-03-29, 收修改稿日期: 2022-04-25

减少饲料用量和水稻施肥量,为稻渔综合种养可持续发展提供了样板(Bao *et al.*, 2022)。尽管,我国已经在稻蟹养殖的田间工程、水稻种植方式、中华绒螯蟹养殖密度和生态效益方面取得了一定进展(孙富余等, 2010; 吕东锋等, 2010; Bao *et al.*, 2022),但关于稻蟹养殖模式下适宜的饵料投喂种类均未见报道,在河蟹池塘养殖过程中,投喂的饵料是以豆粕、玉米和小麦为主的传统饵料和配合饲料,现尚不清楚在稻田扣蟹养殖过程中适宜的投喂饵料种类以及不同饵料对中华绒螯蟹的生长和生理代谢的影响。

由于配合饲料具有营养全面、质量稳定和便于投喂等优点,因此,研发实用廉价的中华绒螯蟹配合饲料是促进中华绒螯蟹产业可持续发展的重要抓手(杨丽丽等, 2011)。尽管,科研工作者已经研发出中华绒螯蟹扣蟹和成蟹养殖阶段的系列化配合饲料(何杰等 2016),但由于养殖者的投喂习惯和饲料价格等原因,目前,我国扣蟹养殖过程中主要采用传统饵料(豆粕、菜粕、玉米、麸皮和小麦)或传统饵料和配合饲料混合投喂的饵料模式(姜晓东等, 2017)。尽管先前有大量研究表明,投喂中华绒螯蟹配合饲料有诸多优点,如提高幼蟹成活率(杨丽丽等, 2011)、降低幼蟹早熟率(Wu *et al.*, 2011)、提高幼蟹非特异性免疫力和抗病力(姜晓东等, 2017)、提高幼蟹种质量(姜晓东等, 2017)、养殖性能和经济效益(王少兵等, 2018)等,但这些研究都是在室内养殖条件或者池塘养殖条件下进行的。稻田与池塘的养殖环境差异较大,2 种养殖环境下扣蟹的饲料来源和环境胁迫可能也存在较大差异,因此,探讨稻田扣蟹养殖的饵料模式具有重要的现实意义。迄今为止,尚无稻田扣蟹养殖条件下饵料模式的相关研究,这不利于稻蟹养殖模式的优化和中华绒螯蟹产业高质量发展。鉴于此,本研究系统比较扣蟹在稻田养殖的条件下,投喂配合饲料和传统饵料对中华绒螯蟹幼蟹的养殖性能和生理代谢指标的影响,以期中华绒螯蟹稻田养殖技术优化和开发应用配合饲料提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计及实验用蟹

实验于上海海洋大学宣城基地的 6 个面积为 3 000 m<sup>2</sup> 稻田养殖池塘中进行,稻田池塘均呈“回”字形,四周为环沟,边台宽为 4 m,环沟宽为 3 m,沟深为 0.5 m,中间为平台区(长×宽=51.0 m×33.5 m),面积为 1 700 m<sup>2</sup>,每口稻田池塘外围均设置 35 cm 高的塑料防逃围板,防止实验蟹逃跑或者混杂。实验分

为配合饲料组和传统饵料组,每个组别分别设置 3 个平行实验池塘,配合饲料组的饵料模式根据幼蟹体质量,依次投喂不同粒径的配合饲料,其中,扣蟹 1#、2#和 3#饲料粒径分别为 1.2、1.6 和 1.8 mm(浙江澳华饲料有限公司),后期配合饲料与发酵饲料(浙江博仕佳生物科技有限公司)交替投喂。传统饵料组前期投喂豆粕和麸皮,中期投喂豆粕、玉米片和小麦,后期投喂豆粕和玉米片,根据食台饵料剩余量适当调整投喂量。具体的饵料投喂策略见表 1,不同饵料的常规生化组成见表 2。

每口稻田池塘中间平台于 2020 年 5 月 15 日均匀种植水稻,种植株距为 10 cm,行距为 25 cm。稻田四周环沟均匀栽植一定量的水花生(*Alternanthera philoxeroides*),为幼蟹提供隐蔽场所,水花生面积占稻田环沟的 50%左右。

2020 年 6 月中旬,从上海海洋大学宣城基地的扣蟹暂养池塘中用地笼捕捞出豆蟹(约 0.6 g/只)放入 6 个稻田实验池塘,每口稻田池塘按照 30 只豆蟹/m<sup>2</sup> 的密度(投放面积为稻田总面积)进行投放。

### 1.2 养殖管理

实验于 2020 年 6 月 15 日开始正式投喂,每日 16:00 左右投喂一次,20:00 左右检查残饵。根据水温 and 摄食情况灵活调整饵料投喂量,并记录各个稻田的每日实际投喂量;夏季及时梳理稻田中水花生,防止水花生密度过高影响中华绒螯蟹正常活动和摄食;每周进行 1 次池塘水体 pH、氨氮和亚硝酸盐含量的测定,根据水质情况,每半个月左右换水 1 次,换水量根据实际情况确定,并定期使用消毒剂或微生态制剂调节水质;每日 06:30 和 21:00 巡塘查看中华绒螯蟹活动情况。

### 1.3 样品和数据采集

**1.3.1 生长情况** 自 7 月开始,每月中下旬随机从每口稻田中用抄网各采集 200 只幼蟹,雌雄各占一半,用干毛巾轻轻擦拭蟹体表水分后,采用电子天平精确称重(精确到 0.01 g),准确记录每只蟹的体质量和性别。据此计算增重率(WGR)和特定生长率(SGR),计算公式如下:

$$WGR (\%) = 100 \times (W_t - W_{t-1}) / W_{t-1}$$

$$SGR (\%/d) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_{t-1}) / D$$

式中,  $W_t$  指第  $t$  月蟹的平均体质量,  $W_{t-1}$  指第  $t-1$  月蟹的平均体质量,  $D$  为采样的间隔天数。

**1.3.2 最终平均体质量、规格分布和养殖性能** 养殖实验于 11 月中旬停止,从每个池塘中随机捞出

表1 中华绒螯蟹幼蟹稻田养殖过程中的饵料投喂策略  
Tab.1 The feeding strategy of juvenile *E. sinensis* reared in rice fields

时间 Time	配合饲料组 Formulated feed group		传统饵料组 Traditional mixed feed group	
	饵料 Diet	投喂率 Feeding rate/%	饵料 Diet	投喂率 Feeding rate/%
2020-06-15—2020-07-12	破碎料 Broken diets	5~8	豆粕:麸皮=2:1 Soybean: Bran=2:1	7~10
2020-07-13—2020-07-15	扣蟹 1#饲料 Juvenile diets 1#	5~8	豆粕:麸皮=2:1 Soybean: Bran=2:1	7~10
2020-07-16—2020-07-20	扣蟹 1#饲料 Juvenile diets 1#	3~5	豆粕:玉米片:小麦=1:1:1 Soybean: Corn flake: Wheat=1:1:1	5~7
2020-07-21—2020-09-04	扣蟹 2#饲料和发酵饲料交替投喂 Feed alternately with juvenile diets 2# and fermented diets	2~4	豆粕:玉米片:小麦=1:1:1 Soybean: Corn flake: Wheat=1:1:1	3~5
2020-09-05—2020-09-22	扣蟹 2#饲料和发酵饲料交替投喂 Feed alternately with juvenile diets 2# and fermented diets	1~3	豆粕:玉米片=1:2 Soybean: Corn flake=1:2	1~3
2020-09-23—2020-11-20	扣蟹 3#饲料和发酵饲料交替投喂 feed alternately with juvenile diets 3# and fermented diets	0.5~2	豆粕:玉米片=1:2 Soybean: Corn flake=1:2	0.5~2

表2 不同饵料的常规生化组成(%，干重)  
Tab.2 The proximate composition of different diets (%，dry mass)

饵料名称 Diets	水分 Moisture	蛋白 Crude protein	脂肪 Total lipid	灰分 Ash
破碎料 Broken diets	10.42±0.23	44.12±0.18	8.53±0.28	10.21±0.17
扣蟹 1#饲料 Juvenile diets 1#	11.02±0.16	41.53±0.33	8.98±0.38	10.25±0.22
扣蟹 2#饲料 Juvenile diets 2#	9.58±0.15	36.02±0.19	6.77±0.29	9.08±0.26
扣蟹 3#饲料 Juvenile diets 3#	10.11±0.34	41.85±0.36	9.12±0.24	10.88±0.33
发酵饲料 Fermented diets	44.02±0.39	36.36±0.28	7.32±0.21	8.87±0.11
豆粕 Soybean meal	11.43±0.18	42.56±0.52	1.88±0.12	5.78±0.31
麸皮 Bran	13.77±0.22	14.02±0.19	4.38±0.23	3.65±0.11
小麦 Wheat	12.85±0.12	12.03±0.09	3.33±0.08	1.82±0.05
玉米 Corn	12.48±0.13	9.56±0.16	4.62±0.15	2.78±0.12

300只扣蟹，分别对每口稻田中雌雄扣蟹的体质量进行统计，并根据张列士等(2001)的方法判断扣蟹是否性成熟，由此计算每个池塘扣蟹的平均体质量和一龄性早熟率。对所有捕获的非早熟扣蟹按体质量进行规格划分： $<6\text{ g}$ 、 $6\sim<10\text{ g}$ 、 $10\sim<14\text{ g}$ 、 $14\sim<18\text{ g}$ 、 $\geq 18\text{ g}$ ，分别统计各规格区间比例。根据最终这6口稻田池塘的扣蟹销售量、平均规格和早熟蟹情况，分别计算每口稻田非早熟扣蟹产量、早熟蟹产量和总产量(早熟蟹+正常扣蟹)，并据此计算幼蟹成活率和早熟率。根据整个实验期间投喂的饵料总量和幼蟹总产量，计算饲料系数(FCR)：

$$\text{FCR} = \text{消耗饵料总重} /$$

$$(\text{最终产出蟹总重} - \text{实验初放养蟹总重})$$

**1.3.3 蛋白质代谢指标、消化酶指标和抗氧化免疫指标的测定** 9月中旬，分别从每口稻田中各取9只雌、雄幼蟹，将幼蟹放在冰上麻醉后，采用1 mL无菌注射器从第3步足基部抽取血淋巴，每口稻田中的3只幼蟹的血淋巴合并成一个样品装于2 mL的离心管中；然后解剖取出幼蟹肝胰腺，每口稻田中的3只幼蟹的肝胰腺合并装于一个冻存管中，所有肝胰腺和血淋巴样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存，用于幼蟹蛋白质代谢、消化酶和抗氧化及免疫指标测定。



样品测定时,称取 2 g 左右的肝胰腺,加入 10 mL (重量与体积比约为 1:5)预冷的生理盐水后,用 T10B 型微型匀浆器(IKA, 德国)匀浆 30 s,在 4 °C 12 000 r/min 条件下离心 20 min,取中间清液(上层为油脂,下层为组织沉淀)再次离心,取中间清液用于后续分析。血淋巴解冻后分别用微型匀浆器匀浆 30 s,然后在 4 °C 12 000 r/min 条件下离心 20 min,取出上清液(血清)待测。采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定总蛋白(total protein, TP, A045-2-2)、总氨基酸(total amino acid, TAA, A026-1-1)、尿素氮(urea nitrogen, BUN, C013-2-1)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT, C010-2-1)、谷丙转氨酶(glutamate pyruvic transaminase, GPT, C009-2-1)、胰蛋白酶(trypsin, C010-2-1)、脂肪酶(lipase, A054-1-1)、 $\alpha$ -淀粉酶(Amylase, C016-1-1)、纤维素酶(cellulase, A138-1-1)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC, A015-1-2)和超氧化物歧化酶(superoxyde dismutase, SOD, A001-4-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, A003-1-2)、碱性磷酸酶(alkalinephosphatase, AKP, A059-1-1)、酸性磷酸酶(acidphosphatase, ACP, A060-1-1)。

#### 1.4 统计分析

所有数据采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,用 Levene 方法进行方差齐性检测,当不满足使用齐性时,对数据进行反正弦或平方根处理,用 *t*-检验检查两实验组各指标间的差异性,当数据转换后仍不满足齐性方差时,采用 Mann-Whitney test 进行非参数检验。取  $P < 0.05$  为差异显著。利用 Excel 和 GraphPad

Prism 软件上绘制相关图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长指标

图 1 为 2 种饵料模式下在稻田扣蟹养殖阶段的体质量变化情况。无论雌雄,7—11 月配合饲料组的平均体质量均高于传统饵料组,其中,7 月份配合饲料组的雌蟹体质量显著高于传统饵料组( $P < 0.05$ )。扣蟹养殖期间的增重率变化如图 2 所示,整个养殖过程中,2 组扣蟹的增重率均呈下降趋势;就雌体而言,配合饲料组在 7—8 月和 9—10 月的增重率大于传统饵料组,而 8—9 月和 10—11 月期间传统饵料组的增重率大于配合饲料组;就雄体而言,配合饲料组的增重率仅在 10—11 月略大于传统饵料组,其他月 2 组的增重率基本一致。2 组扣蟹的体质量特定生长率变化趋势及差异情况与增重率基本一致(图 3)。

### 2.2 最终养殖性能和规格分布

表 3 为 2 种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹稻田养殖性能的影响。2 种饵料模式下正常幼蟹平均体质量、1 龄早熟蟹平均体质量、正常扣蟹产量、1 龄早熟蟹产量、总产量、1 龄早熟蟹比例和成活率均无显著差异( $P > 0.05$ )。整体上,传统饵料组的正常扣蟹和 1 龄早熟蟹单位面积产量和平均体质量均略低于配合饲料组。2 种饵料模式下,从豆蟹到养成扣蟹的成活率均在 20%左右,但传统饵料组的饲料系数显著高于配合饲料组( $P < 0.05$ )。

2 种饵料模式养成扣蟹的规格分布如图 4 所示。2 组扣蟹的优势规格都主要集中在 6~10 g,配合饲料组和传统饵料组分别为 38.33%和 40.17%。配合饲料

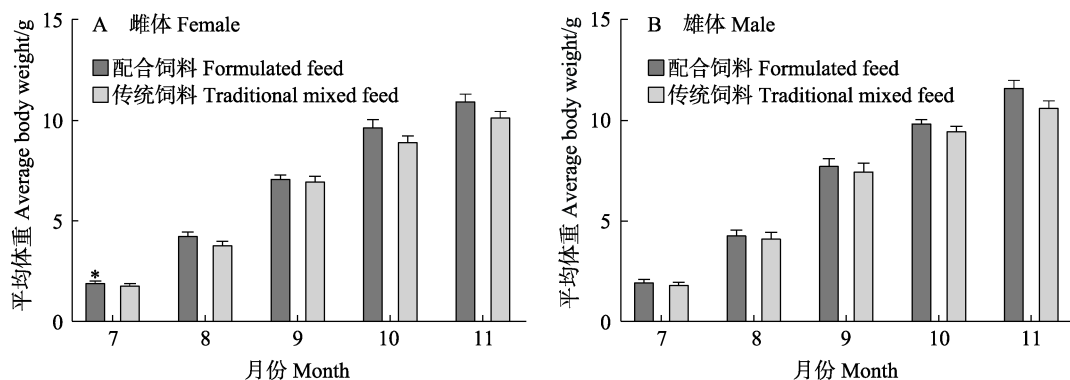


图 1 中华绒螯蟹 2 种饵料模式下在稻田扣蟹养殖阶段的体质量变化

Fig.1 Changes of body weight of rice field-reared juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

方柱标注“\*”表示两组间差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

The columns with “\*” indicate significant differences among different groups ( $P < 0.05$ ). The same as below.

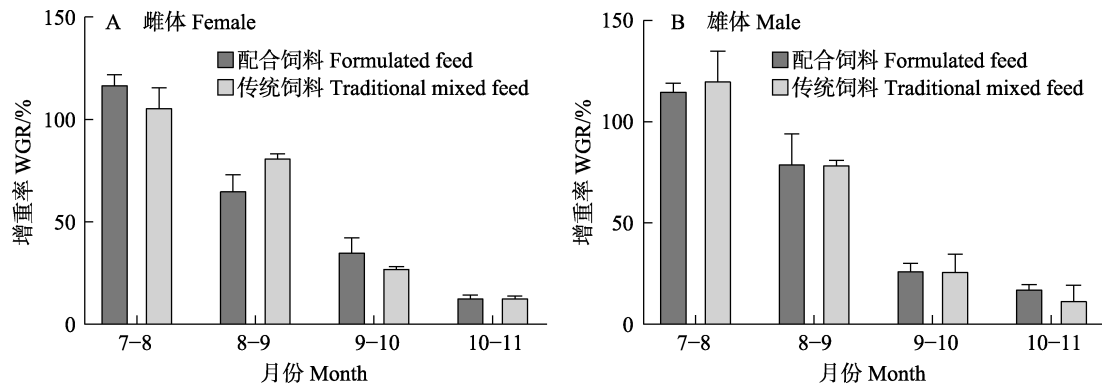


图2 中华绒螯蟹2种饵料模式下在稻田扣蟹养殖阶段的增重率变化  
Fig.2 Changes of weight gain rate of rice field-reared juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

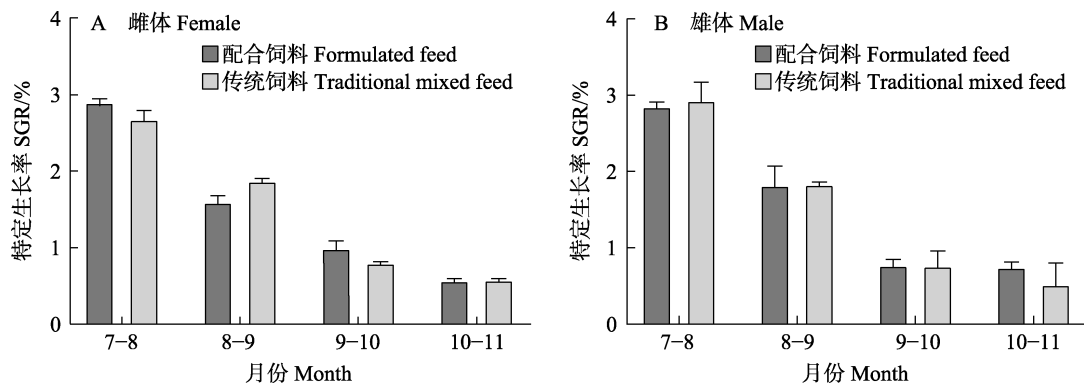


图3 中华绒螯蟹2种饵料模式下在稻田扣蟹养殖阶段的特定生长率变化  
Fig.3 Changes of specific growth rate of rice field-reared juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

表3 2种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹稻田养殖性能的影响  
Tab.3 Effects of two feeding modes on the culture performance of juvenile Chinese mitten crab reared in rice fields

项目 Items	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group
正常扣蟹平均体质量 Average body weight of normal juvenile crab/g	11.39±0.28	10.48±0.35
1龄早熟蟹平均体质量 Average body weight of precocious crab/g	24.97±0.09	24.54±0.16
正常扣蟹产量 Yield of normal juvenile crab/(kg/667 m <sup>2</sup> )	43.41±8.76	38.94±9.73
1龄早熟蟹产量 Yield of precocious crab/(kg/667 m <sup>2</sup> )	23.43±0.61	19.60±2.61
总产量 Total yield/(kg/667 m <sup>2</sup> )	66.84±9.38	58.53±12.34
1龄早熟蟹重量比 Yield percent of precocious crab/%	35.63±4.09	34.05±2.73
成活率 Survival rate/%	20.30±3.76	19.09±3.86
饵料系数 FCR	2.74±0.44	4.40±1.12*

注: 数据上带有“\*”表示同一性别下2种饵料组间差异显著( $P<0.05$ ), 下同。

Notes: Values with “\*” represent the significant difference between different feeding modes at ment groups at the same time point within the same row are significantly different ( $P<0.05$ ). The same as below.

料组在<6 g和6~<10 g区间内的扣蟹比例略低于传统饵料组,但在其他3种规格的扣蟹比例均高于传统饵料组,整体上,2种饵料模式对养成扣蟹规格分布无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 蛋白质代谢和消化酶指标

2种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹蛋白质代谢指标的影响见表4。就雌蟹而言,配合饲料组幼蟹血淋

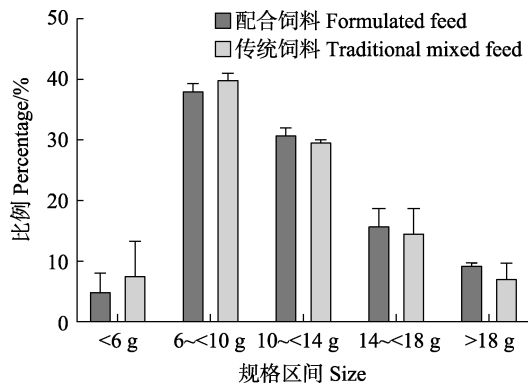


图 4 中华绒螯蟹 2 种饵料模式在稻田扣蟹养殖阶段的最终规格分布

Fig.4 The size distribution of different body weight ranges for juvenile Chinese mitten crab reared in rice fields

巴中的总蛋白(TP)含量显著高于传统饵料组( $P<0.05$ ), 而总氨基酸(T-AA)和尿素氮(BUN)含量以及肝胰腺中谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)活力均无显著差异( $P>0.05$ ); 就雄蟹而言, 传统饵料组血淋巴中的尿素氮(BUN)含量和肝胰腺中的 GOT 活力显著高

于配合饲料组( $P<0.05$ ), 而血淋巴中 TP 和 T-AA 含量及肝胰腺中的 GPT 活力均无显著差异( $P>0.05$ )。此外, 雄蟹血淋巴中尿素氮含量显著低于雌蟹, 而其肝胰腺中谷丙转氨酶活力较雌蟹高。

2 种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹消化酶代谢指标的影响见表 5。无论雌蟹还是雄蟹, 配合饲料组与传统饵料组的胰蛋白酶和纤维素酶均无显著差异( $P>0.05$ ), 而配合饲料组雌蟹和雄蟹肝胰腺中的脂肪酶均显著高于传统饵料组( $P<0.05$ ); 传统饵料组雄蟹的  $\alpha$ -淀粉酶活力显著高于配合饲料组, 而雌蟹  $\alpha$ -淀粉酶活力在配合饲料组和传统饵料组无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.4 抗氧化免疫指标

2 种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹抗氧化免疫指标的影响见表 6。就雌蟹而言, 配合饲料组血淋巴中的 T-AOC、AKP 和 ACP 活力以及肝胰腺中 ACP 显著高于传统饵料组( $P<0.05$ )。就雄蟹而言, 配合饲料组血淋巴中的 T-SOD 活力显著低于传统饵料组( $P<0.05$ ), 而血淋巴中的 MDA 含量显著高于传统饵料组

表 4 2 种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹蛋白质代谢指标的比较

Tab.4 The comparison of protein metabolism indices of juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

项目 Items	雌蟹 Female		雄蟹 Male	
	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group
血淋巴 Haemolymph				
总蛋白 TP/(mg/mL)	54.95±8.10*	39.97±9.30	50.94±9.40	45.43±10.38
总氨基酸 T-AA/( $\mu$ mol/L)	4.84±1.05	5.37±2.18	5.66±1.88	5.08±1.79
尿素氮 BUN/(mmol/L)	25.99±5.16	34.37±8.84	4.85±0.95	8.01±1.78*
肝胰腺 Hepatopancreas				
谷草转氨酶 GOT/(U/mL)	1.41±0.76	1.32±0.73	0.61±0.25	1.37±0.70*
谷丙转氨酶 GPT/(U/mL)	0.91±0.15	0.70±0.26	1.06±0.59	1.24±0.67

表 5 2 种饵料模式对中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺中消化酶活力的影响

Tab.5 The comparison of digestive enzyme activities of hepantopancreas in juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

项目 Items	雌蟹 Female		雄蟹 Male	
	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group
胰蛋白酶 Trypsin/(U/mg prot)	622.00±171.29	576.34±95.20	641.59±122.20	576.79±156.81
脂肪酶 Lipase/( $\mu$ mol/min/mg prot)	2.03±0.17*	0.76±0.12	1.82±0.27*	1.00±0.20
$\alpha$ -淀粉酶 Amylase/(U/g prot)	138.00±23.32	126.81±24.15	115.86±16.72	148.93±23.83*
纤维素酶 Cellulase/(U/mg prot)	74.74±23.02	85.24±16.57	71.36±31.20	77.40±29.32

表 6 2 种不同饵料模式下中华绒螯蟹幼蟹抗氧化和免疫指标的比较  
Tab.6 The comparison of antioxidant and immune indices of juvenile Chinese mitten crab under the two feeding modes

项目 Items	雌蟹 Female		雄蟹 Male	
	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group	配合饲料组 Formulated feed group	传统饵料组 Traditional mixed feed group
血淋巴 Haemolymph				
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	7.05±1.27*	4.79±1.00	5.77±2.05	3.95±1.04
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mL)	112.03±19.30	137.91±19.20*	76.88±34.09	148.47±26.58*
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	12.44±2.98	13.64±2.50	22.82±3.99*	11.50±2.52
碱性磷酸酶 AKP/(U/mL)	5.80±1.07*	3.34±1.16	2.23±0.42	2.84±1.06
酸性磷酸酶 ACP/(U/mL)	7.85±0.91*	2.08±0.62	1.89±1.39	1.56±0.46
肝胰腺 Hepatopancreas				
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg prot)	0.67±0.19	0.50±0.18	0.49±0.11	0.52±0.20
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mg prot)	1.88±0.57	1.83±0.81	2.08±0.69	2.59±0.56
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg prot)	3.72±0.82	3.55±0.79	3.80±0.28	3.66±0.61
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	2.61±0.91	3.34±0.97	2.84±0.92	3.53±1.25
碱性磷酸酶 AKP/(U/mg prot)	40.27±13.36	49.95±14.18	35.39±12.39	33.18±12.54
酸性磷酸酶 ACP/(U/mg prot)	5.34±1.36*	3.42±0.91	2.96±1.02	2.54±0.72

( $P < 0.05$ )。此外,无论是配合饲料组还是传统饵料组,雌蟹的血淋巴和肝胰腺中 AKP 和 ACP 均高于雄蟹。

### 3 讨论

#### 3.1 2 种饵料模式对稻田养殖扣蟹养殖性能的影响

体质量的增长情况是衡量扣蟹生长性能最重要的经济性状,影响蟹种在成蟹阶段的养殖性能以及最终经济效益(Racotta *et al*, 2003)。本研究发现,无论雌蟹还是雄蟹,每个月配合饲料组的蟹平均体质量都大于传统饵料组,且 7 月配合饲料组雌蟹的平均体质量显著大于传统饵料组,结果表明,稻田养殖下投喂配合饲料的中华绒螯蟹幼蟹可以获得较好的养殖性能,这也与之前一些中华绒螯蟹池塘养殖的相关研究结果相一致(王少兵等, 2018; 韩文峰等, 2021)。此外,郭永坚等(2015)在对鲮(*Mugil cephalus*)的研究中也发现类似的结论,投喂配合饲料的鲮有更好的生长性能,这可能是由于配合饲料的营养价值较传统饵料高。就蛋白质含量而言,传统饵料豆粕的粗蛋白含量一般为 44%~48%,玉米和麸皮的蛋白含量较低,分别为 8%~9.4%和 14%~15%(熊本海等, 2018; 王少兵等, 2018)。而有研究表明,幼蟹阶段适宜的蛋白需求为 34%~42%(陈立侨等, 1994; Mu *et al*, 1998; 刘兴国, 2001),因此,豆粕、麸皮和玉米这些传统饵料混合投喂无法满足幼蟹的营养需求。本研究中配合饲料是根据幼蟹不同生长阶段的营养需求设计的,营养较传

统饵料全面。其次,本研究中传统饵料主要有豆粕、麸皮、玉米和小麦 4 种饵料组成,这些饵料是重要的植物蛋白源,但与含有鱼粉和肉粉等动物蛋白源的配合饲料相比,豆粕、麸皮和玉米的氨基酸平衡性、蛋白质和氨基酸消化率要低于动物蛋白源(张璐等, 2007; 江星等, 2013)。此外,豆粕中含有一定量的单宁、蛋白酶抑制因子和大豆皂苷等抗营养因子(张璐, 2007),而本研究中传统饵料组的豆粕比例高达 33%~66%,显著高于配合饲料中比例。因此,传统饵料的抗营养因子含量可能高于配合饲料,从而降低了幼蟹对蛋白和氨基酸的利用,而配合饲料添加了如鱼粉等部分优质动物蛋白源,并根据原料氨基酸组成进行配比,使得饲料氨基酸更加平衡,从而导致配合饲料组幼蟹的体质量、增重率和特定生长率高于传统饵料组。配合饲料具有较好的适口性和诱食性,且含有一定量的蜕壳素和促生长剂,可以大大缩短扣蟹的蜕壳周期,提高蜕壳率(张丙群, 1992; 李洪宇等, 2013)。整体上,配合饲料组无论是扣蟹产量、早熟蟹产量和成活率都高于传统饵料组且饵料系数配合饲料组低于传统饵料组,说明投喂配合饲料可以提高饵料转化率和养殖效果。

中华绒螯蟹 1 龄性早熟是中华绒螯蟹幼蟹养殖过程中常见的问题,是由内因和外因共同作用的结果,主要与自身遗传特性以及环境温度、水质、放养密度和营养等外在因素有关(徐如卫等, 2001)。本研究中,在稻田养殖条件下 2 种饵料组 1 龄早熟蟹比例

(35%)比在池塘条件下养殖的幼蟹 1 龄早熟率(5%~15%)高很多(何杰等, 2015; 王少兵等, 2018; 王海宁等, 2020), 这可能与稻田低水位导致水温较高以及豆蟹放养密度低有关, 积温增高和中华绒螯蟹密度较低条件下可以增加中华绒螯蟹 1 龄性早熟比例(张列士等, 2001; 徐如卫等, 2001)。此外, 也可能与稻田里存在大量天然饵料有关(李岩等, 2013), 特别是水温较高情况下造成生物饵料大量繁殖(赵瀛, 2012), 导致中华绒螯蟹摄食量增加和营养过剩。徐如卫等(2001)研究表明, 营养过剩是中华绒螯蟹 1 龄性早熟的重要诱因。今后可以通过适当增加稻田水位和豆蟹放养密度以及适当降低投喂量来控制稻蟹模式下幼蟹的性早熟比例, 也为今后稻蟹模式的养殖和投喂技术优化提供研究方向。

### 3.2 2 种饵料模式对稻田养殖扣蟹生理代谢的影响

**3.2.1 蛋白质代谢和消化酶活力的比较** 肝胰腺是中华绒螯蟹氨基酸分解代谢中心, 而谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是肝脏中 2 种最重要的氨基转移酶, 转氨酶活性的升高, 说明了动物体内蛋白质的吸收和氨基酸的代谢更为旺盛(Fynn-Aikins *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 2018)。血淋巴中的总蛋白(TP)的含量能够反映动物体内蛋白质代谢和营养吸收的水平(许晨远等, 2019)。血清尿素氮(BUN)可以较准确反映动物体内蛋白质的代谢情况和饲料氨基酸平衡情况, 当饲料氨基酸不平衡时, 氨基酸脱氨降解, 导致血清中尿素氮含量升高(李彬等, 2014)。本研究中, 传统饵料组的雄蟹肝胰腺 GOT 活力和血清 BUN 含量显著高于配合饲料组, 而血清 TP 含量显著低于配合饲料组, 这表明传统饵料组的雄蟹体内氨基酸的分解代谢比配合饲料组的旺盛, 而蛋白沉积较配合饲料组少, 雌蟹也显示相同的趋势。这可能是造成传统饵料组雌蟹和雄蟹体质量均低于配合饲料组的原因, 也侧面反映了传统饵料的氨基酸组成平衡性比配合饲料差。

消化酶是底物适应性酶, 与饵料营养组成(蛋白水平、脂肪水平、碳水化合物水平、粗纤维含量)密切相关。研究表明, 动物体内胰蛋白酶和脂肪酶活性与饵料中的蛋白质水平(江洪波等, 2005; 陈壮等, 2014)和脂肪水平(迟淑艳等, 2005)呈正相关。本研究表明, 投喂配合饲料的雌、雄蟹肝胰腺中胰蛋白酶和脂肪酶活性均高于投喂传统饵料, 其中脂肪酶更为显著, 这与 Long 等(2022)研究池塘养殖条件下不同饵料投喂模式对成蟹消化酶活力影响的结果一致, 投喂配合饲料组的成蟹胰蛋白酶和脂肪酶活力均高于投喂配合饲料组, 这可能是由于配合饲料的粗蛋白和总

脂肪含量较传统饵料高。此外, 江洪波等(2005)研究发现, 饲料中蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹肝胰腺淀粉酶活性具有明显的抑制作用, 这与本研究的结果配合饲料组雄蟹肝胰腺中淀粉酶活性显著低于传统饵料组相一致。由此可见, 投喂配合饲料可以促进幼蟹对蛋白质和脂类物质的消化分解和吸收。此外, 本研究发现, 传统饵料组雌、雄蟹纤维素酶均高于配合饲料组, 这可能与传统饵料中玉米、麸皮等富含纤维素有关, 投喂富含纤维素的植物性饵料有利于幼蟹纤维素酶活性的提高(杨霞等, 2014; 韩文峰等, 2021)。

**3.2.2 抗氧化和免疫指标的比较** T-AOC 是用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, 其大小反映了机体抗氧化酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力及机体自由基代谢状况(郭婷, 2013)。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶之一, 可清除机体过多的自由基, 从而起到保护细胞免受损伤的作用, 其活力的高低反映了体内氧自由基水平的高低(朱筛成等, 2019)。本研究中, 传统饵料组的雌蟹和雄蟹的 T-SOD 活力显著高于配合饲料组, 这表明投喂传统饵料组幼蟹体内的氧化胁迫程度较配合饲料组高, 机体需要提高 SOD 酶活力来清除体内自由基。而雌、雄幼蟹的 T-AOC 均在配合饲料组较高, 推测可能与配合饲料中添加的鱼粉和维生素 C 等有关, 鱼粉中含有一定量的硒和类胡萝卜素(李宁等, 2017), 而这些物质具有提高机体抗氧化能力的作用。因此, 投喂配合饲料相较于投喂传统饵料能够提高幼蟹的抗氧化能力, 降低体内氧化应激。MDA 是细胞脂质氧化的代谢产物, 其含量的高低显示了机体脂质过氧化的程度(Long *et al.*, 2017)。而本研究中配合饲料组的雄蟹 MDA 含量显著高于传统饵料组, 且配合饲料组幼蟹的脂肪酶活力较传统饵料组高, 这与 Long 等(2022)结果类似, 池塘养殖条件下投喂配合饲料的雄性成蟹肝胰腺中 MDA 含量也高与投喂传统饵料组, 推测可能与配合饲料组幼蟹体内脂质积累较高有关, 使得更容易发生脂质过氧化反应(何志刚等, 2016)。

AKP 和 ACP 是生物体内 2 种重要的非特异性磷酸水解酶, 能催化磷酸单酯的水解及磷酸基团的转移反应, 不仅参与甲壳动物的磷、钙、蛋白质和脂质代谢, 且对机体免疫性能具有重要作用(刘树青等, 1999; Xue *et al.*, 2000)。本研究表明, 配合饲料组雌、雄蟹的血清和肝胰腺中 AKP 和 ACP 活力均显著高于传统饵料组, 这表明投喂配合饲料能够提高幼蟹的免疫性能, 此外, 配合饲料组幼蟹 AKP 活力增加可能与饲料中添加矿物质有关, 促进了钙、磷等物质在体内的吸收和转运(Zhou *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011)。这

与 Long 等(2022)的研究结果一致,投喂配合饲料组相比于投喂传统饵料能够提高中华绒螯蟹的非特异性免疫能力。

综上所述,在稻田养殖模式下,中华绒螯蟹幼蟹相较于投喂传统饵料,投喂配合饲料对幼蟹的生长、最终养殖性能和营养物质消化吸收以及抗氧化免疫性能具有明显的优势。此外,稻蟹模式下的中华绒螯蟹 1 龄性早熟率较池塘养殖条件下要高,今后可以进一步通过饲料配方优化,开发适合稻蟹模式下幼蟹的优质高效的实用配合饲料,通过营养调控手段进一步降低性早熟率以优化稻蟹养殖技术。

### 参 考 文 献

- BAO J, JIANG H B, LI X D. Thirty years of rice-crab coculture modes in China research progress and prospects. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(3): 1597–1612
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2021. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [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]
- CHEN L Q, DU N S, LAI W. Evaluation of soybean cake as a substitute for partial fish meal in formulated diets for Chinese mitten-crab juvenile. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(1): 24–31 [陈立桥, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹蟹种配饵中豆饼替代部分鱼粉的适宜含量. *水产学报*, 1994, 18(1): 24–31]
- CHEN Z, LIANG M Q, ZHENG K K, *et al.* Impact of dietary protein level on growth performance, body composition and protease activity of juvenile *Lateolabrax japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 51–59 [陈壮, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料蛋白水平对鲈鱼生长、体组成及胃蛋白酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 51–59]
- CHI S Y, YANG Q H, ZHOU Q C, *et al.* Activities of amylase and lipase in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) zoea, mysis and postlarvae. *Fisheries Science*, 2005, 24(4): 4–6 [迟淑艳, 杨奇慧, 周歧存, 等. 南美白对虾幼体和仔虾淀粉酶和脂肪酶活力的研究. *水产科学*, 2005, 24(4): 4–6]
- DUAN Y H, TAN B, LI J J, *et al.* Optimal branched-chain amino acid ratio improves cell proliferation and protein metabolism of porcine enterocytes *in vivo* and *in vitro*. *Nutrition*, 2018, 54: 173–181
- FYNN-AIKINS K, HUGHES S G, VANDENBERG G W. Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1995, 111(1): 163–170
- GUO T. Effect of Chromium on oxidative damage and antioxidant capacity of *Ctenopharyngodon idellus*. Master's Thesis of Southwest University, 2013, 23–27 [郭婷. 铬暴露对草鱼的氧化损伤及抗氧化能力的影响. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013, 23–27]
- GUO Y J, LUO Z L, YIN X L, *et al.* Effects of four types of diet on the growth and body composition of *Mugil cephalus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 48–53 [郭永坚, 罗昭林, 阴晓丽, 等. 4 种饲料投喂对鲢(*Mugil cephalus*) 生长及鱼体组成的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 48–53]
- HAN W F, SUN Y F, LIU J, *et al.* Effects of diet on growth, digestive enzymes, antioxidant enzymes, and immune enzymes of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(3): 314–325 [韩文峰, 孙云飞, 刘健, 等. 不同饵料投喂模式对中华绒螯蟹幼蟹生长和生理化的影响. *中国水产科学*, 2021, 28(3): 314–325]
- HE J, WU X G, CHENG Y X, *et al.* Comparison of the culture performance and profitability of wild-caught and captive pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles reared in grow-out ponds: Implications for seed selection and genetic selection programs. *Aquaculture*, 2014, 434: 48–56
- HE J, WU X G, LONG X W, *et al.* Culture performance and gonadal development of the first generation of selectively bred Chinese mitten crabs from wild and cultured populations. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 808–818 [何杰, 吴旭干, 龙晓文, 等. 长江水系中华绒螯蟹野生和养殖群体选育子一代养殖性能和性腺发育的比较. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 808–818]
- HE J, WU X G, ZHAO H L, *et al.* Growth performance and gonadal development of pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) fed formulated diets during the whole culture process. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 606–618 [何杰, 吴旭干, 赵恒亮, 等. 全程投喂配合饲料条件下池养中华绒螯蟹的生长性能及其性腺发育. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 606–618]
- HE Z G, WANG J L, WU Y A, *et al.* Effect of dietary lipid levels on serum biochemical indices, immune responses and antioxidant capability of juvenile Furong crucian carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 655–662 [何志刚, 王金龙, 伍远安, 等. 饲料脂肪水平对芙蓉鲤幼鱼血清生化指标, 免疫反应及抗氧化能力的影响. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 655–662]
- JIANG H B, CHEN L Q, WANG Q, *et al.* Effects of dietary protein on activities of digestive enzyme and trypsin mRNA abundance in *Eriocheir sinensis* juveniles. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 216–221 [江洪波, 陈立桥, 王群, 等. 饵料蛋白质对中华绒螯蟹仔蟹消化酶活性及胰蛋白酶 mRNA 丰度的影响. *水产学报*, 2005, 29(2): 216–221]



- JIANG X D, WU X G, ZHANG J B, *et al.* Effects of three feeding modes on early culture performance, non-specific immunity and disease resistance of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Chinese Journal of Zoology, 2017, 52(1): 85–96 [姜晓东, 吴旭干, 张金彪, 等. 三种饵料模式对中华绒螯蟹蟹种早期养殖性能, 非特异免疫性能及抗病力的影响. 动物学杂志, 2017, 52(1): 85–96]
- JIANG X, CHEN L Q, SUN S M, *et al.* Apparent digestibility of 10 feed ingredients for Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Marine Fisheries, 2013, 35(2): 209–216 [江星, 陈立侨, 孙盛明, 等. 中华绒螯蟹对 10 种常见饲料蛋白源的表观消化率. 海洋渔业, 2013, 35(2): 209–216]
- LI B, LIANG X F, LIU L W, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth, feed utilization and the enzymes activity on nitrogen metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(2): 233–240 [李彬, 梁旭方, 刘立维, 等. 饲料蛋白水平对大规模草鱼生长、饲料利用和氮代谢相关酶活性的影响. 水生生物学报, 2014, 38(2): 233–240]
- LI H Y, WU L X, CHEN W, *et al.* Effects of feeding frequency and food type on growth and energy budget of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(5): 475–480 [李洪宇, 吴立新, 陈炜, 等. 投饲频率和饵料种类对中华绒螯蟹幼蟹生长及能量收支的影响. 大连海洋大学学报, 2013, 28(5): 475–480]
- LI N, ZHENG Y H, WU X F, *et al.* Tolerance of selenium-yeast in diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(6): 1949–1960 [李宁, 郑银桦, 吴秀峰, 等. 大口黑鲈对饲料中酵母硒的耐受性研究. 动物营养学报, 2017, 29(6): 1949–1960]
- LI X W, LI Z J, LIU J S, *et al.* Growth, precocity, enzyme activity and chemical composition of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, fed different dietary protein-to-energy ratio diets. Aquaculture, 2011, 43(11): 1719–1728
- LI Y, WANG W, MA X Z, *et al.* Effect of rice-crab culture system on zoobenthos diversity in paddy field. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(7): 838–843 [李岩, 王武, 马旭洲, 等. 稻蟹共作对稻田水体底栖动物多样性的影响. 中国生态农业学报, 2013, 21(7): 838–843]
- LIU S Q, JIANG X L, MOU H J, *et al.* Effects of immunopoiysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis* serum. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 278–283 [刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278–283]
- LIU X G. Nutritional requirement and feed processing technique for *Eriocheir sinensis* in different growth periods. Fishery Modernization, 2001(6): 3–5 [刘兴国. 河蟹不同生长阶段的营养需求与饲料配制技术. 渔业现代化, 2001(6): 3–5]
- LONG X W, PAN J, WADE N M, *et al.* Effects of three feeding modes on the metabolism, antioxidant capacity, and metabolome of the adult male Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquaculture International, 2022, 30(3): 1101–1119
- 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
- LÜ D F, WANG W, MA X Z, *et al.* The effect of stocking density of Chinese mitten crab on yields of rice and crab in rice-crab culture system. Hubei Agricultural Sciences, 2010, 49(7): 1677–1680 [吕东锋, 王武, 马旭洲, 等. 稻蟹共生系统河蟹放养密度对水稻和河蟹的影响. 湖北农业科学, 2010, 49(7): 1677–1680]
- MU Y Y, SHIM K F, GUO J Y. Effects of protein level in isocaloric diets on growth performance of the juvenile Chinese hairy crab, *Eriocheir sinensis*. Aquaculture, 1998, 165(1/2): 139–148
- RACOTTA I S, PALACIOS E, IBARRA A M. Shrimp larval quality in relation to broodstock cond. Aquaculture, 2003, 227(1/2/3/4): 107–130
- SUN F Y, YU F Q, SUN W T, *et al.* Integration and demonstration technology of rice crab ecological cultivation. Liaoning Agricultural Sciences, 2010(5): 61–62 [孙富余, 于凤泉, 孙文涛, 等. 稻蟹生态种养生产技术集成与示范技术要点. 辽宁农业科学, 2010(5): 61–62]
- WANG H N, JIANG X D, WU X G, *et al.* Evaluation of culture and immunity performance of the second-year-old early-maturing and late-maturing strains of the fourth selective generation during the juvenile culture of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Journal of Fisheries of China, 2020, 44(5): 816–826 [王海宁, 姜晓东, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹二龄早熟和晚熟品系选育第四代在扣蟹阶段养殖性能和免疫性能的评价. 水产学报, 2020, 44(5): 816–826]
- WANG S B, JIANG X D, ZHANG J B, *et al.* Comparison of pond culture effects of juvenile *Eriocheir sinensis* under two feeding modes. Fisheries Science and Technology Information, 2018, 45(3): 162–166 [王少兵, 姜晓东, 张金彪, 等. 两种投饲模式下中华绒螯蟹扣蟹池塘养殖效果比较. 水产科技情报, 2018, 45(3): 162–166]
- WU X G, WANG Z K, 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
- XIONG B H, LUO Q R, ZHOU Z K, *et al.* Introduction of tables of feed composition and nutritive values in China (2018 twenty-ninth edition). China Feed, 2018(21): 63–73 [熊本海, 罗清尧, 周正奎, 等. 中国饲料成分及营养价值表(2018年第29版)制订说明. 中国饲料, 2018(21): 63–73]
- XU C Y, CHI C, ZHENG X C, *et al.* Effects of fermented feed on the growth performance, oxidation resistance, immune

- function and protein metabolism of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(10): 2209–2217 [许晨远, 迟骋, 郑肖川, 等. 发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化、免疫和蛋白代谢的影响. *水产学报*, 2019, 43(10): 2209–2217]
- XU R W, JIANG J P, LU K H, *et al.* A preliminary study on causes of sexual premature of *Eriocheir sinensis*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2001, 20(3): 195–198 [徐如卫, 江锦坡, 陆开宏, 等. 河蟹性早熟原因的初步研究. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2001, 20(3): 195–198]
- XUE Q G, RENAULT T. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(3): 155–163
- YANG L L, YANG X Z, ZHAO L L, *et al.* Effects of two different diets on the growth, digestive enzyme activity and haemocytes in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2011, 50(5): 619–624 [杨丽丽, 杨筱珍, 赵柳兰, 等. 冰鲜野杂鱼和配合饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、消化酶活力及血细胞的影响研究. *复旦学报: 自然科学版*, 2011, 50(5): 619–624]
- YANG X, YE J Y, ZHANG Y X, *et al.* Effects of fish meal replacement by common cottonseed meal and fermented cottonseed meal on growth performance, body composition and hepatopancreas digestive enzyme activities of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(3): 683–693 [杨霞, 叶金云, 张易祥, 等. 普通棉籽粕和发酵棉籽粕替代鱼粉对中华绒螯蟹幼蟹生长性能、体成分及肝胰腺消化酶活性的影响. *动物营养学报*, 2014, 26(3): 683–693]
- ZHANG B Q. Shelling additive and its application in *Penaeus orientalis* Kishinouye and *Eriocheir sinensis* feed. *Feed Industry Magazine*, 1992, 13(6): 44–45 [张丙群. 脱壳素类添加剂及其在虾蟹饲料中的应用. *饲料工业*, 1992, 13(6): 44–45]
- ZHANG L S, XU Q Y. Studies on sex maturity and early maturity of mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in natural and farming water. *Fisheries Science and Technology Information*, 2001, 28(3): 106–111 [张列士, 徐琴英. 自然及养殖水体河蟹性成熟和性早熟的研究. *水产科技情报*, 2001, 28(3): 106–111]
- ZHANG L, CHEN L Q, HONG M L, *et al.* Apparent digestibility of crude protein and amino acids of 11 feed ingredients for *Eriocheir sinensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(s1): 116–121 [张璐, 陈立侨, 洪美玲, 等. 中华绒螯蟹对 11 种饲料原料蛋白质和氨基酸的表观消化率. *水产学报*, 2007, 31(s1): 116–121]
- ZHANG L. The study of effect of dietary protein sources and anti-nutritional factors on physiology and chemistry in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of East China Normal University, 2007, 40–41 [张璐. 饲料蛋白源及抗营养因子对中华绒螯蟹生理生化影响的初步研究. *华东师范大学硕士研究生学位论文*, 2007, 40–41]
- ZHAO Y. Study on the impact of thermal discharge from power plant on phytoplankton based on hydrodynamic conditions Xiangshan Bay. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012, 39–47 [赵瀛. 基于水动力条件下象山港电厂温排水热污染对浮游植物影响研究. *上海海洋大学硕士研究生学位论文*, 2012, 39–47]
- ZHOU X W, CHEN Q X, CHEN Z, *et al.* Effects of oxidoperoxovanadate (V) complexes on the activity of green crab (*Scylla serrate*) alkaline phosphatase. *Biochemistry (Moscow)*, 2000, 65(12): 1424–1428
- ZHU S C, LONG X W, XIANG C L, *et al.* Effects of dietary fishmeal replacement with protein mixtures on growth performance, physiological metabolism and biochemical composition of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *South China Fisheries Science*, 2019, 15(2): 83–92 [朱筛成, 龙晓文, 向朝林, 等. 复合蛋白源替代鱼粉对中华绒螯蟹幼蟹生长性能、生理代谢和生化组成的影响. *南方水产科学*, 2019, 15(2): 83–92]

(编辑 陈 辉)

## Effects of Two Feeding Modes on the Culture Performance and Physiological Metabolism of Juvenile Chinese Mitten Crabs (*Eriocheir sinensis*) Reared in Rice Fields

YANG Shuaishuai<sup>1</sup>, ZHU Shaicheng<sup>1</sup>, ZHANG Dongdong<sup>1</sup>, PAN Zhenxiang<sup>1</sup>,  
LI Jiayao<sup>1</sup>, WU Xugan<sup>1,2,3①</sup>, ZHENG Shanyu<sup>4</sup>

(1. Shanghai Aquaculture Engineering Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Fish Nutrition and Environmental Ecology Research Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Agricultural and Rural Bureau of Huaiyin District, Huaian 223300, China)

**Abstract** The Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is an important economic crab in China. Across most of China, juvenile Chinese mitten crabs are cultured in earthen ponds. Juvenile crab cultured in rice fields is mainly restricted to the northeastern region. Rice-crab coculture is a new mode of sustainable development, which has developed over the past 30 years in China with progress in field engineering, culture density of the Chinese mitten crab, and ecological benefits. However, there are no reports on appropriate feeds in rice-crab coculture. Presently, crabs reared in an earthen pond consume a traditional diet (including soybean meal, corn, bran, and wheat) or formulated feed. Due to the numerous advantages of formulated feed (including comprehensive nutrition, stable quality, and ease of feeding) the development of practical and cheap formulated feed for Chinese mitten crab is the latest focus for promoting the sustainable development of the Chinese mitten crab industry. Although researchers have developed a series of formulated feed for Chinese mitten crab, traditional feed is more commonly used in the culture of Chinese mitten crab due to farmers feeding habits and the low price of traditional products. However, numerous studies have shown that feeding Chinese mitten crabs formulated diets has many advantages, for example: it improves the survival rate, reduces the early maturity rate, improves non-specific immunity and disease resistance of juvenile crabs, improves the quality and culture performance of crab species, and economic benefits, etc. However, research were usually conducted under indoor or pond culture conditions. The culture environment of rice fields and ponds are quite different to each other. The feed sources and environmental stress on juvenile crabs may also be quite different between the culture environments. Therefore, it is important to explore the feeding mode of juvenile crabs cultured in rice fields. However, the optimum feed and the effect of different diets on the growth and physiological metabolism of Chinese mitten crab reared in rice fields remains unclear. It is important to optimize the rice-crab breeding mode to achieve a high-quality Chinese mitten crab industry. Formulated diets and traditional diets (soybean meal, bran, corn, and wheat) were fed to juvenile *E. sinensis* cultured in a rice field for 152 days. Each feeding group included three replicates. This study was conducted to compare formulated diets with traditional diets using culture performance, protein metabolism, digestive enzymes, and the antioxidant and immune indexes of juvenile crabs. The results showed that: (1) the body weights of female and male crabs from the formulated diet group were higher than those in the traditional diet group, but the differences were not significant ( $P>0.05$ ) (Fig. 1–3); (2) in terms of culture performance, the average body weight and yield of juvenile crabs, 1-year-old precocious crabs, and the overall total yield and survival rate of juvenile crabs in the formulated diet group were slightly higher than those of the

① Corresponding author: WU Xugan, E-mail: xgwu@shou.edu.cn

traditional diet group. The feed conversion ratio of the formulated diet group was much lower than that of the traditional diet group ( $P<0.05$ ); (3) in terms of protein metabolism, the total protein content in the hemolymph of both female and male crabs fed the formulated diet was significantly higher than that in the traditional diet group ( $P<0.05$ ). Conversely, the contents of urea nitrogen in the hemolymph of male crabs and the activity of glutamic oxaloacetic transaminase in the hepatopancreas of the traditional diet group were significantly higher than those of the formulated diet group ( $P<0.05$ ); (4) lipase in the hepatopancreas of female and male crabs in the formulated feed group was significantly higher than that in the traditional diet group ( $P<0.05$ ). Conversely, the  $\alpha$ -amylase activity of the male crabs in the formulated diet group was significantly lower than that of the traditional diet group; (5) the total antioxidant capacity, alkaline phosphatase, and acid phosphatase activities in the hemolymph of female crabs and the acid phosphatase activity in the hepatopancreas of the formulated diet group were significantly higher than those of the traditional feed group ( $P<0.05$ ). In conclusion, feeding a formulated diet can improve the culture performance, promote protein deposition and lipid absorption, and enhance the antioxidant and immune capacity of juvenile *E. sinensis* reared in a rice field. These factors result in improved crab quality. This study provides a basis for optimizing the culture technology of Chinese mitten crab and the development of a formulated diet for improved rice-crab coculture.

**Key words** *Eriocheir sinensis*; Rice-crab co-culture; Feeding mode; Culture performance; Physiological metabolism

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220228002

http://www.yykxjz.cn/

王新月, 陈生熬, 王程欣, 訾方泽, 常德胜, 许豪, 李大鹏. 叶尔羌高原鳅耳石形态探究及群体判别分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 201-211  
WANG X Y, CHEN S A, WANG C X, ZI F Z, CHANG D S, XU H, LI D P. Otolith morphology and population discrimination of *Triplophysa yarkandensis*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 201-211

# 叶尔羌高原鳅耳石形态探究及群体判别分析\*

王新月<sup>1</sup> 陈生熬<sup>1,2①</sup> 王程欣<sup>1</sup> 訾方泽<sup>1</sup> 常德胜<sup>1</sup> 许豪<sup>1</sup> 李大鹏<sup>2</sup>

(1. 塔里木大学生命科学与技术学院 塔里木珍稀鱼类研究中心 新疆 阿拉尔 843300;

2. 华中农业大学水产学院 湖北 武汉 430070)

**摘要** 为进一步开展叶尔羌高原鳅(*Triplophysa yarkandensis*)不同地理群体分类判别、探明耳石与鱼类生活史的相关机制,本研究基于耳石形态学和鱼类生态学方法,对叶尔羌河、和田河和塔里木河的 734 尾叶尔羌高原鳅耳石与鱼体的形态指标进行了统计分析。结果显示,叶尔羌高原鳅耳石较小,左右微耳石形态无显著差异( $P>0.05$ );叶尔羌高原鳅耳石形态指标与体长、体质量呈对数函数关系, $R^2$  范围在 0.48~0.62;采用鱼体形态学、耳石形态测量法和椭圆傅里叶分析法分别对两两群体进行判别分析,和田河群体与塔里木河群体判别准确率分别为 96.0%、61.4%和 82.2%,叶尔羌河群体与和田河群体判别准确率分别为 93.0%、79.5%和 87.9%,叶尔羌河群体与塔里木河群体判别准确率分别为 96.5%、77.5%和 86.8%。叶尔羌高原鳅耳石形态与鱼体生长的关系极大程度地反映了其个体发育对栖息环境的适应性,且不同地理群体叶尔羌高原鳅耳石形态特征存在显著差异( $P<0.05$ )。本研究将耳石形态学首次应用于叶尔羌高原鳅种群的鉴别分析,为进一步开展高原鳅属进化分类提供参考,为高原渔业种质资源保护提供了科学依据。

**关键词** 叶尔羌高原鳅;耳石;形态差异;判别分析

**中图分类号** Q954 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0201-11

叶尔羌高原鳅 *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day, 1877), 隶属鲤形目 (Cypriniformes)、鳅科 (Cobitidae)、条鳅亚科 (Nemachilinae)、高原鳅属 (*Triplophysa*)、鼓鳔鳅亚属 (*Hedinichthys*), 是塔里木河水系特有鱼类(郭焱等, 2012), 新疆维吾尔自治区二级重点保护水生动物。目前,其研究主要集中在生长繁殖、养殖及毒性实验、遗传多样性等方面,对其不同地理群体开展分类鉴别仅见鱼体形态学及分子手段(Chen *et al*, 2016、2020; 陈生熬, 2019; 王锦秀等, 2021; 王新月等, 2022)。基

于耳石是稳定硬组织的特点及其良好的信息储存功能,耳石不仅作为普遍的鱼龄鉴定材料,近年来国内外学者还将其广泛地应用于鱼类物种鉴别、种群结构、微化学生境履历分析和生活史策略等(Mesa *et al*, 2020; 谭博真等, 2020; Battaglia *et al*, 2010; 欧利国, 2020; 彭艳等, 2018; 王继隆等, 2019; 李孟孟等, 2017)。较鱼体形态学,耳石形态学具有易保存、操作重复性强、受环境影响小等优点,可作为其他组织的有效补充;较分子手段,基于耳石形态学开展群体鉴别成本更低、更便捷。故本研究将耳石形态学引入叶尔羌高原鳅的群体鉴

\* 国家自然科学基金项目(31360635)、农业农村部财政专项(西北地区重点水域渔业资源与环境调查)、兵团科技局项目(2017DB003)和华中农业大学-塔里木大学联合基金(HNLH202006)共同资助。王新月, E-mail: 1072247070@qq.com

① 通信作者: 陈生熬, 教授, E-mail: chenshengao@163.com

收稿日期: 2022-02-28, 收修改稿日期: 2022-04-18



别, 为其微化学分析和生活史策略的研究打下基础。

本研究以探究叶尔羌高原鳅耳石特征, 比对耳石形态学对其不同地理群体鉴别的有效性为出发点, 拟合耳石形态与体长和体质量的关系, 为叶尔羌高原鳅的生长繁殖及资源管理提供理论支持, 为进一步研究其种群组成和洄游生长提供参考; 通过鱼体形态学、耳石形态测量法、椭圆傅里叶分析法比较不同河流叶尔羌高原鳅的种内差异, 为传统形态分类提供有效补充, 为高原渔业种质资源保护提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2019—2021年秋季在叶尔羌河(Yarkand River, Y)、和田河(Hotan River, H)和塔里木河(Tarim River, T), 用地笼(网目 2a=2.00 cm)随机采集叶尔羌高原鳅样本 734 尾(表 1), 现场进行生物学测定(殷名称, 1995)并解剖取出耳石, 其他组织用 10% 甲醛溶液固定, 带回实验室进行后续处理。

表 1 叶尔羌高原鳅样本信息  
Tab.1 Sample information of *T. yarkandensis*

群体 Population	采样时间 Sampling time	采样点 Sampling site	样本量 Sample number	体长 Body length/mm		体质量 Body weight/g	
				范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD	范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD
叶尔羌河 Yarkand River	2019.10	E 29°90' N 38°00'	120	51.15~133.92	73.42±17.97	2.49~34.03	7.11±6.09
和田河 Hotan River	2020.10	E 80°80' N 38°32'	321	43.34~137.34	90.41±13.49	1.09~35.11	11.06±4.84
塔里木河 Tarim River	2021.10	E 81°88' N 40°80'	313	48.84~93.70	70.91±8.61	1.23~12.57	5.58±2.20

### 1.2 方法

**1.2.1 鱼体形态学** 传统形态学数据包括体质量(body weight)、全长(total length)、体长(body length)、体高(body height)、体宽(body width)、头长(head length)、吻长(snout length)、眼径(eye diameter)、眼间距(eye interval)、尾柄长(caudal peduncle length)和尾柄高(height of caudal peduncle)。框架法坐标点选择及框架数据指标选择见图 1。

采用数显游标卡尺(CD67-S15PS)测量长度(精度为 0.01 mm), 电子天平(LE403E)称量体质量(精度为 0.01 g)。

**1.2.2 耳石形态学** 使用体式显微镜(SMZ1270i)和 NIS Element 软件对叶尔羌高原鳅微耳石(图 2)进行拍照及形态指标测量, 得到 6 个形态指标: 耳石周长(otolith perimeter, OP)、耳石面积(otolith area, OA)、耳石长(otolith length, OL)、耳石宽(otolith width, OW)、耳石最大半径(maximum radius of otolith,  $R_{max}$ )、耳石最小半径(minimum radius of otolith,  $R_{min}$ )。

**1.2.3 傅里叶分析法** 椭圆傅里叶分析(Elliptic Fourier Descriptors, EFDs), 经灰阶转换、二值化图像

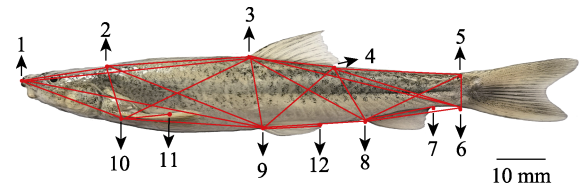


图 1 叶尔羌高原鳅的框架测量  
Fig.1 Frame measurement of *T. yarkandensis*

1: 吻端; 2: 枕后; 3: 背鳍起点;  
4: 背鳍后基; 5: 尾鳍背部起点; 6: 尾鳍腹部起点;  
7: 臀鳍后基; 8: 臀鳍起点; 9: 腹鳍起点; 10: 胸鳍起点;  
11: 胸鳍后基; 12: 腹鳍后基。两坐标点间距离构成 24 项框架指标: 1-2、2-3、3-4、4-5、5-6、6-8、8-9、9-10、10-1、1-9、2-10、2-9、3-1、3-10、3-9、3-8、3-6、4-9、4-8、4-6、5-8、10-11、9-12、8-7。  
1: Tip of snout; 2: The last end of the frontal maxilla;  
3: Origin of dorsal fin; 4: Terminus of dorsal fin; 5: Dorsal origin of caudal fin; 6: Ventral origin of caudal fin;  
7: Terminus of anal fin; 8: Origin of anal fin; 9: Insertion of pelvic fin; 10: Insertion of pectoral fin; 11: Terminus of pectoral fin; 12: Terminus of pelvic fin. Twenty-four truss parameters are constructed by distance measurements between two coordinate points: 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-8, 8-9, 9-10, 10-1, 1-9, 2-10, 2-9, 3-1, 3-10, 3-9, 3-8, 3-6, 4-9, 4-8, 4-6, 5-8, 10-11, 9-12, 8-7.



图 2 叶尔羌高原鳅左耳石外侧面示意图

Fig.2 View of external surface of the left lapillus otoliths of *T. yarkandensis* illustrating various features

处理、消除噪音、提取链码，每个耳石轮廓生成 20 个傅里叶谐波，每个谐波由 4 个系数(a、b、c、d)组成，共得到 80 个 EFDs 系数。因标准化时 a1 固定为 1，b1 和 c1 无限趋近于 0，故每个耳石整体形态轮廓信息一般由 77 个 EFDs 系数表达(欧利国等, 2019)。

### 1.3 数据处理

**1.3.1 鱼体形态指标** 为消除样本规格差异对鱼体形态学指标的影响，每尾样本的所有实测长度数据采用头部特征除以头长、其他特征除以体长的方法予以校正，得到除体质量和体长外的 31 项比例性状。数据处理采用 Excel 软件。

**1.3.2 耳石形态特征** 采用 Shapiro-Wilk 检验，基于偏度(Sk)、峰度(Ku)数值对耳石形态各指标进行正态性检验；参照谢桢桢等(2019)的方法，将 6 个耳石形态指标转化为 6 个形态因子和 7 个形态指数，见表 2。数据处理采用 NIS Element、SPSS18.0 软件。

**1.3.3 耳石形态与体长、体质量的关系** 通过线性模型、幂函数模型、多项式模型、指数回归模型及对数模型拟合耳石主要形态指标与叶尔羌高原鳅体长、体质量的关系，依据 AIC (Akaike information criterion) 准则选取最适模型，计算公式如下(Burnham *et al.*, 2002):

$$AIC=n \times \ln(RSS/n)+2k$$

式中，*n* 为样本数量；*k* 为方程中参数常数的数量；RSS 为残差平方和。数据处理采用 NIS Element、SPSS18.0、Origin9.0 软件。

**1.3.4 群体判别** 采用逐步判别分析法，提取形态差异作用最显著的多项参数建立判别公式，计算判别

准确率。数据处理采用 NIS Element、SPSS18.0 和 Shape 软件。

表 2 叶尔羌高原鳅耳石的形态因子与形态指标  
Tab.2 Shape factors and morphological indices for otoliths of *T. yarkandensis*

形态因子 Shape factor	形态指标 Morphological index
F1=OP/(OA) <sup>1/2</sup>	圆度 Roundness=4OA/πOL <sup>2</sup>
F2=OP/OL	形态因子 Format factor=4πOA/OP <sup>2</sup>
F3=OP/OW	环率 Circularity=OP <sup>2</sup> /OA
F4=(OA) <sup>1/2</sup> /OL	矩形趋近率 Rectangularity=OA/(OL×OW)
F5=(OA) <sup>1/2</sup> /OW	椭圆率 Ellipticity=(OL+OW)/(OL-OW)
F6=OW/OL	半径比 Radius ratio=R <sub>max</sub> /R <sub>min</sub> 幅形比 Aspect ratio=OL/OW

## 2 结果

### 2.1 耳石形态特征

叶尔羌高原鳅微耳石较小，近似椭圆形，中间较厚，逐渐向外边缘变薄，外侧面中央具明显突起。耳石长明显大于耳石宽，主间沟不明显，基叶发达，耳石腹部边缘较为光滑，呈浅弧形，耳石背部有波浪状突起。

配对样本 *t* 检验显示，叶尔羌高原鳅左右微耳石形态无显著差异(*P*>0.05)，本研究统一使用左耳石(表 3)。Shapiro-Wilk 检验表明，耳石面积(Sk=0.915, Ku=1.181)、耳石最小半径(Sk=0.499, Ku=0.153)、耳石最大半径(Sk=0.533, Ku=0.182)、耳石周长(Sk=0.517, Ku=0.288)、耳石长(Sk=0.562, Ku=0.209)和耳石宽(Sk=0.578, Ku=0.569)等各指标均不符合正态分布。

### 2.2 耳石形态与体长、体质量的关系

依据 AIC 值最小原则(表 4、表 5)，叶尔羌高原鳅耳石形态指标与体长、体质量的关系以对数函数为最佳拟合方程(图 3、图 4)建立回归方程(*n*=734)，进行相关性分析，*R*<sup>2</sup> 范围在 0.48~0.62，相关性不高，拟合效果无显著差异(*P*>0.05)，体长与叶尔羌高原鳅耳石形态指标相关性略高于体质量。

### 2.3 叶尔羌高原鳅不同群体判别比较

基于 Shape 软件提取叶尔羌高原鳅耳石外轮廓(图 5)，不同群体叶尔羌高原鳅存在耳石形态差异，进一步开展判别分析。由表 6 可知，常规的鱼体形态

表3 叶尔羌高原鳅耳石形态参数值  
Tab.3 Morphological parameters of otolith in *T. yarkandensis*

形态参数 Morphological parameter	叶尔羌河 Yarkand River		和田河 Hotan River		塔里木河 Tarim River	
	范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD	范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD	范围 Range	平均值±标准差 Mean±SD
耳石面积 OA/mm <sup>2</sup>	0.39~1.54	0.87±0.18	0.29~1.06	0.56±0.14	0.24~0.84	0.53±0.14
耳石最小半径 R <sub>min</sub> /mm	0.62~1.19	0.86±0.09	0.53~1.03	0.72±0.08	0.49~0.94	0.69±0.09
耳石最大半径 R <sub>max</sub> /mm	0.85~1.75	1.33±0.15	0.71~1.49	1.03±0.15	0.66~1.32	1.01±0.14
耳石周长 OP/mm	2.36~4.84	3.58±0.41	1.97~3.91	2.86±0.38	1.88~5.17	2.86±0.48
耳石长 OL/mm	0.86~2.66	1.34±0.20	0.70~1.49	1.02±0.15	0.65~1.28	0.99±0.14
耳石宽 OW/mm	0.62~1.83	0.89±0.13	0.53~1.05	0.73±0.08	0.49~0.91	0.69±0.09

表4 叶尔羌高原鳅耳石形态指标与体长关系拟合方程的AIC值比较

Tab.4 Comparison of morphological parameters of otolith with AIC values of different growth equations for body length

形态参数 Morphological parameter	线性方程 Linear	对数方程 Logarithmic	幂函数方程 Power	指数方程 Exponential
耳石面积 OA	-3 050.174 70	-3 052.386 64	-3 041.717 08	-321.129 24
耳石最小半径 R <sub>max</sub>	-2 080.816 76	-3 749.732 48	-3 747.555 44	-442.776 39
耳石最大半径 R <sub>min</sub>	-3 100.088 22	-3 120.882 21	-3 111.152 43	114.347 46
耳石周长 OP	-1 512.862 69	-1 533.823 43	-1 524.229 67	1 598.858 19
耳石长 OL	-2 937.542 39	-2 952.680 46	-2 945.122 56	105.191 67
耳石宽 OW	-3 524.074 73	-3 531.114 78	-3 529.892 82	-422.780 94

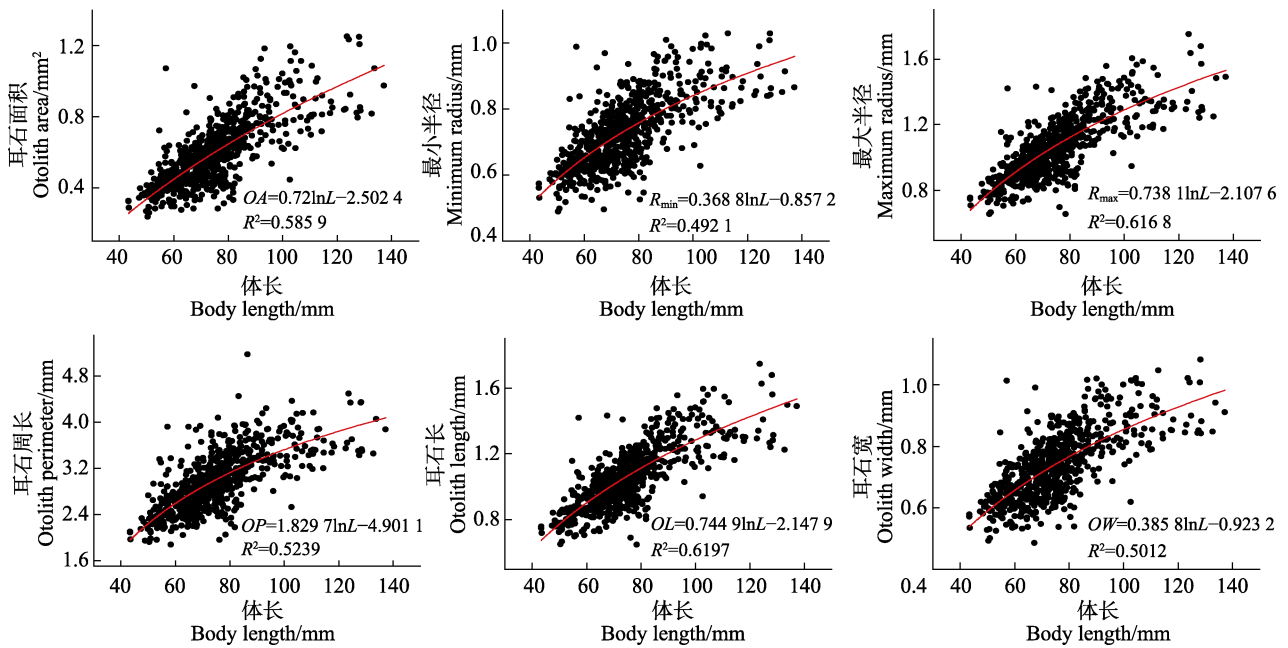


图3 叶尔羌高原鳅耳石形态参数与体长的关系

Fig.3 Relationship between morphological parameters of otolith and body length of *T. yarkandensis*

学判别准确率均大于 90.0%，基于耳石形态的椭圆傅里叶分析法准确率均大于 80.0%，可作为叶尔羌高原鳅群体判别鉴定方法。

2.3.1 和田河群体与塔里木河群体比较 基于鱼体形态学方法对叶尔羌高原鳅和田河和塔里木河群

体进行判别分析，筛选判别系数最大的参数即形态差异作用最显著，分别是头长、眼径、8-9、3-6、4-8、5-8、9-12、7-8，以 X<sub>1</sub>-X<sub>8</sub> 代替，建立判别式：

$$Y_H = -754.363 + 1.083.724X_1 + 334.874X_2 + 279.518X_3 + 272.926X_4 + 267.890X_5 + 263.520X_6 - 253.284X_7 + 400.190X_8;$$

表 5 叶尔羌高原鳅耳石形态指标与体质量关系拟合方程的 AIC 值比较

Tab.5 Comparison of morphological parameters of otolith with AIC values of different growth equations for body weight

形态参数 Morphological parameter	线性方程 Linear	对数方程 Logarithmic	幂函数方程 Power	指数方程 Exponential
耳石面积 OA	-291.594 16	-3 024.812 57	-3 013.910 78	-684.761 13
耳石最小半径 $R_{\max}$	-3 626.861 08	-3 736.881 90	-3 735.044 95	-442.776 39
耳石最大半径 $R_{\min}$	-2 911.459 40	-3 072.187 51	-3 066.261 07	120.350 09
耳石周长 OP	-1 376.495 75	-1 507.315 32	-1 503.050 33	1 598.858 19
耳石长 OL	-2 776.462 59	-2 909.166 40	-2 904.399 40	111.191 48
耳石宽 OW	-3 424.907 80	-3 513.422 09	-3 512.379 29	-422.780 94

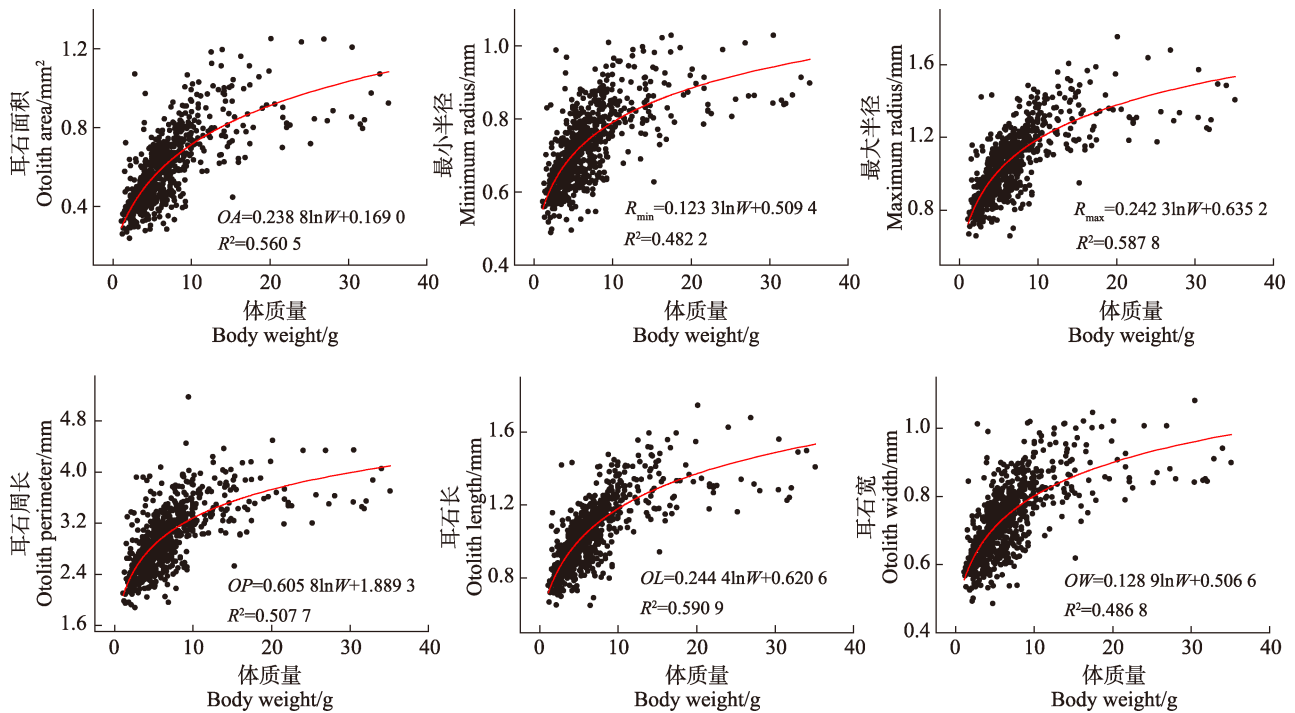


图 4 叶尔羌高原鳅耳石形态参数与体质量的关系

Fig.4 Relationship between morphological parameters of otolith and body weight of *T. yarkandensis*

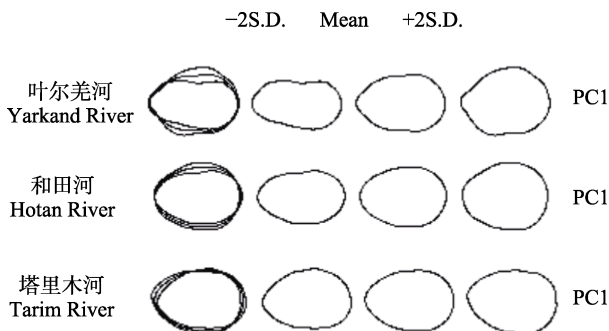


图 5 不同河流叶尔羌高原鳅耳石外轮廓

Fig.5 Outer contour of otolith for *T. yarkandensis* collected from different rivers

$$Y_1 = -765.345 + 1080.053X_1 + 407.084X_2 + 315.256X_3 + 238.547X_4 + 238.434X_5 + 231.260X_6 - 449.899X_7 + 419.197X_8;$$

基于耳石形态测量法进行判别分析，筛选判别系数最大的参数是形态因子、圆度、幅形比、椭圆率、F2，以  $X_1 \sim X_5$  代替，建立判别式：

$$Y_{1H} = -44367.499 + 26121.376X_1 - 86564.057X_2 + 51480.547X_3 - 163355.968X_4 + 39357.468X_5;$$

$$Y_{1L} = -44369.703 + 26136.450X_1 - 86612.301X_2 + 51471.603X_3 - 163426.585X_4 + 39362.058X_5;$$

基于椭圆傅里叶分析法进行判别分析，筛选判别系数最大的参数是 a13、a16、a18、a19、a20、b14、b15、b17、b18、c15、c16、c18、d20，以  $X_1 \sim X_{14}$  代替，建立判别式：

$$Y_{1H} = -199.932 + 758.738X_1 - 2102.559X_2 + 726.672X_3 - 1107.394X_4 - 962.014X_5 - 754.826X_6 - 1177.008X_7 - 940.482X_8 + 2193.824X_9 + 1195.518X_{10} - 918.204X_{11} - 1850.064X_{12} - 1107.443X_{13} + 661.465X_{14};$$



表6 叶尔羌高原鳅不同判别方法下的判别分析结果

Tab.6 Results of discriminant analysis for *T. yarkandensis* by different discriminant methods

群体 Population	判别方法 Discrimination method		
	鱼体形态 Fish body morphology	耳石形态测量法 Otolith morphology measurement	椭圆傅里叶分析法 Elliptic Fourier descriptors
和田河与塔里木河 Hotan River and Tarim River	96.0%	61.4%	82.2%
和田河与叶尔羌河 Hotan River and Yarkand River	93.0%	79.5%	87.9%
塔里木河与叶尔羌河 Tarim River and Yarkand River	96.5%	77.5%	86.8%

$$Y_I = -199.640 + 783.528X_1 - 1951.237X_2 + 683.243X_3 - 1138.197X_4 - 112.959X_5 - 700.998X_6 - 152.762X_7 - 894.934X_8 + 2218.983X_9 + 1291.767X_{10} - 123.028X_{11} - 1973.454X_{12} - 1082.204X_{13} + 724.591X_{14}$$

**2.3.2 叶尔羌河群体与和田河群体比较** 基于鱼体形态学方法对叶尔羌高原鳅和田河和叶尔羌河群体进行判别分析, 筛选判别系数最大的参数是体宽、眼径、2-3、8-9、10-1、1-9、4-9、4-6, 以  $X_1 \sim X_8$  代替, 建立判别式:

$$Y_{II} = -668.713 + 389.423X_1 + 265.391X_2 + 486.391X_3 + 447.592X_4 + 396.093X_5 + 539.875X_6 + 570.868X_7 + 675.140X_8;$$

$$Y_Y = -681.434 + 288.918X_1 + 264.054X_2 + 538.090X_3 + 447.764X_4 + 370.297X_5 + 521.379X_6 + 587.450X_7 + 670.824X_8;$$

基于耳石形态测量法判别分析, 筛选判别系数最大的参数是圆度、幅形比、椭圆率、F2、F3, 以  $X_1 \sim X_5$  代替, 建立判别式:

$$Y_{II} = -55356.713 - 22149.057X_1 + 62324.801X_2 + 42712.676X_3 + 48381.766X_4 - 27766.797X_5;$$

$$Y_Y = -55394.983 - 22190.885X_1 + 62387.283X_2 + 42529.960X_3 + 48393.094X_4 - 27767.867X_5;$$

基于椭圆傅里叶分析法进行判别分析, 筛选判别系数最大的参数是 a12、a13、b11、b12、b18、c14、c15、c16、d16、d18, 以  $X_1 \sim X_{10}$  代替, 建立判别式:

$$Y_{II} = -416.030 + 4455.567X_1 + 3352.006X_2 - 3978.189X_3 - 5440.704X_4 + 6959.784X_5 - 6403.301X_6 - 3937.816X_7 - 8695.303X_8 - 4967.260X_9 - 7673.580X_{10};$$

$$Y_Y = -400.877 + 4455.259X_1 + 3317.600X_2 - 3809.155X_3 - 5480.003X_4 + 6839.061X_5 - 6672.229X_6 - 4243.988X_7 - 8830.099X_8 - 4917.392X_9 - 7642.107X_{10}.$$

**2.3.3 叶尔羌河群体与塔里木河群体比较** 基于鱼体形态学方法对叶尔羌高原鳅叶尔羌河和塔里木河群体进行判别分析, 筛选判别系数最大的参数是尾柄高、1-2、2-3、3-4、5-6、8-9、1-9、4-6, 以  $X_1 \sim X_8$  代替, 建立判别式:

$$Y_Y = -459.682 + 602.652X_1 + 411.037X_2 + 358.023X_3 + 590.587X_4 + 304.627X_5 + 281.896X_6 + 223.528X_7 + 479.519X_8;$$

$$Y_I = -457.459 + 472.565X_1 + 358.121X_2 + 338.437X_3 + 536.212X_4 + 147.591X_5 + 320.927X_6 + 242.390X_7 + 467.632X_8;$$

基于耳石形态测量法进行判别分析, 筛选判别系数最大的参数是形态因子、幅形比、椭圆率、F4, 以  $X_1 \sim X_4$  代替, 建立判别式:

$$Y_Y = -36264.928 - 21268.574X_1 + 27706.671X_2 + 50957.276X_3 + 171304.008X_4;$$

$$Y_I = -36120.795 - 21251.167X_1 + 27632.731X_2 + 50969.229X_3 + 171072.841X_4;$$

基于椭圆傅里叶分析法进行判别分析, 筛选判别系数最大的参数是 a15、a16、a18、a19、a20、b14、b15、b16、b17、b18、b20、c15、c16、c18、d19, 以  $X_1 \sim X_{15}$  代替, 建立判别式:

$$Y_Y = -189.680 + 1031.189X_1 - 2027.467X_2 + 1212.271X_3 - 1751.883X_4 - 960.044X_5 - 1778.774X_6 - 1038.040X_7 - 909.234X_8 + 2547.771X_9 + 1542.394X_{10} - 1001.411X_{11} - 1284.393X_{12} - 1640.681X_{13} - 1034.732X_{14} - 121.346X_{15};$$

$$Y_I = -205.272 + 1003.808X_1 - 1942.790X_2 + 1100.498X_3 - 1975.260X_4 - 1076.922X_5 - 1794.153X_6 - 1024.873X_7 - 1089.052X_8 + 2650.965X_9 + 1671.729X_{10} - 1018.921X_{11} - 1405.119X_{12} - 1642.858X_{13} - 1014.032X_{14} - 195.007X_{15}.$$

### 3 讨论

#### 3.1 鱼类耳石形态与生长的相关性

水生动物生长发育过程中, 不同生境下水体中矿物质元素在机体内的沉积有所不同, 尤其体现在耳石等硬组织上, 提取耳石形态特征不仅可以完成年龄识别, 也是分类鉴别的有效手段(Sergio, 2007)。鱼类耳石形态的变化响应特定基因引导机制, 也受水温、摄食行为、饵料丰度等因子影响(Ding *et al.*, 2019; Morrison *et al.*, 2019; Milošević *et al.*, 2021)。耳石上元素的沉积决定耳石的形态和生长, 随水域环境的变化, 耳石生长与鱼类生长速度成线性相关(Souza *et al.*, 2020)。叶尔羌高原鳅曾广泛分布于塔里木河水系,

栖息海拔较高、生境温度低,加之生存在高盐碱劣化水体等,在饵料生物极度贫瘠水域环境中,鱼体生长缓慢,耳石生长也较慢,这与 Souza 等(2020)和 Morrison 等(2019)等对河鲈(*Perca fluviatilis*)及花羔红点鲑(*Salvelinus malma*)开展耳石生长研究时得到的结论相似。本研究中,叶尔羌高原鳅唯冬季越冬时才进入深水区,其他季节喜沿边游动。Lombarte 等(2007)研究表明,随鱼类栖息水域深度变化,耳石大小随之呈正比变化,故栖息深度浅是造成叶尔羌高原鳅耳石规格过小的主要原因。

鱼类年龄鉴定中,可通过耳石半径来推算鱼类生长,表现出鱼体生长和耳石形态结构间的线性相关性(张涛等, 2017; 麻秋云等, 2013; 彭露等, 2018)。在统计分析中, $R^2$ 可反映其相关性高低。本研究中的叶尔羌高原鳅耳石形态与体长、体质量的相关性 $R^2 < 0.7$ 。Battaglia 等(2010)和 Souza 等(2020)开展 16 种地中海深海鱼类和欧洲鲈鱼(*Perca fluviatilis*)体长、体质量与耳石形态关系的研究中 $R^2 > 0.8$ 。段咪等(2018)研究表明,在阿拉斯加狭鳕(*Gadus chalcogrammus*)的耳石形态与体长、体质量关系中 $R^2$ 仅为 0.5,这与本研究中叶尔羌高原鳅耳石形态与体长、体质量较低的相关性相类似。Morrison 等(2019)研究指出,造成这种现象的原因是鱼类的洄游行为,鱼类洄游区域的变化继而引起摄食行为的变化,当洄游至优越的水体环境,获得更丰富营养饵料,机体快速生长,这与生物补偿性生长理论一致,即鱼类从完全或部分食物剥夺中再恢复时,其躯体倾向于加速生长(Fey, 2006; Mangel *et al.*, 2005)。然而洄游区域停留时间较短,水体中矿物质元素无法在短期内实现快速沉积,机体生长加速不能完整呈现在耳石生长上,导致了耳石生长异速现象。陈生熬(2012)研究也指出,为集聚能量,叶尔羌高原鳅在洄游产卵前出现抢食行为,短期快速的补偿性生长影响了耳石和鱼体生长的相关性。以上研究都佐证了生境片段化条件下的短距离洄游行为是影响叶尔羌高原鳅耳石与鱼体生长相关性的主要原因。

### 3.2 耳石在鱼类群体鉴定分类中的应用

鱼类耳石形态具有高度物种特异性和群系特异性,不仅体现在不同物种间,同一物种不同生存环境下种群间及同一物种不同群体间也存在一定差异,这对鱼种识别及系统分类具有重要意义(王英俊, 2010)。Cerdea 等(2021)评估了颈瘤鳎属(*Auchenionchus*) 2 种同域鱼类矢耳石形状,证实了矢耳石形态测量法在海洋鱼类鉴别中的有效性。Zhuang 等(2015)的研究也表明,基于耳石形态反映出的亲缘关系与其种内系统发

育关系相吻合,为耳石与系统发育体系构建打下基础。

基于耳石形态开展鱼类群体划分,通过判别分析对不同种类的鉴别效果进行评价,结果也有所不同。宋超等(2020)研究发现,不同地理群体凤鲚(*Coilia mystus*)矢耳石形态指标存在显著差异( $P < 0.05$ ),判别准确率依次为温州群体(96.7%)、崇明群体(66.7%)、吕四群体(60.0%)和舟山群体(58.3%)。Zhuang 等(2015)基于耳石形态指标法和傅里叶分析法鉴别多群体鳎科(Pleuronectidae)判别准确率大于 95.00%。杨林林等(2020)研究发现,蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)海州湾和吕四渔场群体、象山湾和沙埕湾群体不存在显著差异( $P > 0.05$ ),渤海、黄海和东海群体间存在极显著差异( $P < 0.01$ ),综合判别率为 71.07%。本研究与上述分析方法一致,可对鉴别效果进行有效评估。不同群体叶尔羌高原鳅鱼体及耳石形态存在显著差异( $P < 0.05$ ),基于耳石形态测量法和椭圆傅里叶分析进行群体判别分析,和田河与塔里木河群体判别准确率分别为 61.4%和 82.2%,叶尔羌河与和田河群体分别为 79.5%和 87.9%,叶尔羌河与塔里木河群体分别为 77.5%和 86.8%,然而判别准确率不同,这与 3.1 涉及耳石生长异速现象的影响因素基本相同。

对比鱼体形态学,孙志成等(2020)通过 2 种方法判别斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)和黄鳍刺虾虎鱼(*A. flavimanus*),准确率均为 100.0%,证明了不同判定方法的有效性,但在鱼体生长受限或机体损伤情况下,耳石形态可成为更有力的鉴别方法。本研究基于鱼体形态学判别叶尔羌高原鳅的准确率(>90.0%)略高于椭圆傅里叶分析法(>80.0%),二者都可作为判别依据。叶尔羌高原鳅耳石规格过小是导致对总体样本开展耳石形态差异探究时判别准确率略低的重要原因,然而耳石形态学较传统鱼体形态学具有易保存、操作重复性强、受环境影响小等优点,尤其在肉食性鱼类内容物的食性分析、古脊椎动物探究等方面有着良好的应用前景(潘晓哲等, 2010),故将耳石形态引入叶尔羌高原鳅的群体识别具有重要的研究价值。

耳石形态的种内差异受多因素影响,如宋超等(2020)研究发现,不同群体凤鲚间耳石形态差异大小与其洄游习性和地理阻隔程度密切相关,该短距离洄游性鱼类产卵主要选择在就近的近岸河口,地理位置相近群体耳石形态差异较小。结合叶尔羌高原鳅洄游习性和对塔里木河水系的调查,发现水利工程建设导致叶尔羌高原鳅原有生境破碎化,严重影响其生殖洄游行为,形成不同地理群体,这与上述研究结果相吻合,故耳石形态差异与鱼类行为和栖息环境有关。鉴于耳石在叶尔羌高原鳅群体分类判别中的有效性,可



进一步在高原鱼类鉴定分类中应用。

#### 4 结 论

叶尔羌高原鳅耳石形态与机体的生长相关性较强,以对数方程为最佳拟合关系,反映个体发育对水域环境的适应,而洄游行为则是影响其耳石形态与鱼体形态关系的主要原因。不同物种或同一物种不同地理群体鱼类耳石形态存在差异,是因为个体发生和环境因子共同作用,叶尔羌高原鳅耳石的变化与塔里木河水减少、盐碱加剧及饵料缺乏等特殊生态环境密切相关。叶尔羌高原鳅不同地理群体多种方法判别比较中,基于鱼体形态学的各群体判别准确率均高于90.0%,基于耳石形态的椭圆傅里叶分析法的判别准确率均高于80.0%,证实了耳石形态差异对群体划分的可行性。本研究为构建高原特有鱼类耳石系统分类检索体系积累数据,进一步夯实高原鳅属分类学数据库建设,为渔业资源动态评估和管理提供依据,推动水产种业可持续发展。

#### 参 考 文 献

- BATTAGLIA P, MALARA D, ROMEO T, *et al.* Relationships between otolith size and fish size in some mesopelagic and bathypelagic species from the Mediterranean Sea (Strait of Messina, Italy). *Scientia Marina*, 2010, 74(3): 605–612
- BERMEJO S. Fish age classification based on length, weight, sex and otolith morphological features. *Fisheries Research*, 2007, 84(2): 270–274
- BURNHAM K P, ANDERSON D R. Model selection and multi-model inference: A practical information–Theoretical approach. Springer, 2002
- CERDA J M, PALACIOS-FUENTES P, DÍAZ-SANTANA-ITURRIOS M, *et al.* Description and discrimination of sagittae otoliths of two sympatric labrisomid blennies *Auchenionchus crinitus* and *Auchenionchus microcirrhys* using morphometric analyses. *Journal of Sea Research*, 2021, 173: 102063
- CHEN S A, HOU J L, YAO N, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Triplophysa yarkandensis* in response to salinity and alkalinity stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 33: 100629
- CHEN S A, YAO N, XIE C X, *et al.* Complete mitochondrial genome of the *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* (Day). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 2016, 1(1): 235–236
- CHEN S A. Early development and physiological mechanism of salinity-alkalinity adaption of *Triplophysa yarkandensis* (Day). Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 [陈生熬. 叶尔羌高原鳅早期发育及盐碱适应生理机制. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2019]
- CHEN S A. Study on population ecology of *Triplophysa yarkandensis* (Day) in Tarim River. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012 [陈生熬. 塔里木河叶尔羌高原鳅种群生态学研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- DING L Y, TAO J, DING C Z, *et al.* Hydrogeomorphic factors drive differences in otolith morphology in fish from the Nu-Salween River. *Ecology of Freshwater Fish*, 2019, 28(1): 132–140
- DUAN M, WEI L, ZHU G P. Morphometric features of sagittal otolith for Alaska pollock *Gadus chalcogrammus* in the western Bering Sea. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, 33(4): 492–498 [段咪, 魏联, 朱国平. 西伯利亚阿拉斯加狭鳕耳石形态特征研究. 大连海洋大学学报, 2018, 33(4): 492–498]
- FEY D P. The effect of temperature and somatic growth on otolith growth: The discrepancy between two clupeid species from a similar environment. *Journal of Fish Biology*, 2006, 69(3): 794–806
- GUO Y, ZHANG R M, CAI L G. Fishes of Xinjiang. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2012 [郭焱, 张人铭, 蔡林刚. 新疆鱼类志. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2012]
- LI M M, JIANG T, KHUMBANYIWA D D, *et al.* Reconstructing habitat history of *Coilia nasus* from the Hexian section of the Yangtze River in Anhui Province by otolith microchemistry. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 1054–1061 [李孟孟, 姜涛, KHUMBANYIWA Davison Daniel, 等. 基于耳石微化学的长江安徽和县江段刀鲚生境履历重建. 水生生物学报, 2017, 41(5): 1054–1061]
- LOMBARTE L A, CRUZ A. Otolith size trends in marine fish communities from different depth strata. *Journal of Fish Biology*, 2007, 71(1): 53–76
- MA Q Y, XUE Y, XU B D, *et al.* Relationships between otolith size and fish size for twelve prey fish species from Jiaozhou Bay. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 481–487 [麻秋云, 薛莹, 徐宾铎, 等. 胶州湾12种饵料鱼类耳石大小与体长的关系. 水生生物学报, 2013, 37(3): 481–487]
- MANGEL M, MUNCH S B. A life-history perspective on short-and long-term consequences of compensatory growth. *American Naturalist*, 2005, 166(6): E155–E176
- MESA M L, GUICCIARDI S, DONATO F, *et al.* Comparative analysis of otolith morphology in icefishes (Channichthyidae) applying different statistical classification methods. *Fisheries Research*, 2020, 230: 105668
- MILOŠEVIĆ D, BIGOVIĆ M, MRDAK D, *et al.* Otolith morphology and microchemistry fingerprints of European eel, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) stocks from the Adriatic Basin in Croatia and Montenegro. *Science of the Total Environment*, 2021, 786(1): 147478

- MORRISON C M, KUNEGEL-LION M, GALLAGHER C P, *et al.* Decoupling of otolith and somatic growth during anadromous migration in a northern salmonid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2019, 76(11): 1940–1953
- OU L G, LIU B L, FANG Z. Identification of sagittal otolith morphology and sulcus morphology based on elliptic Fourier transform. *Marine Fisheries*, 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*, 2019, 41(4): 385–396]
- OU L G. Identification of Carangidae species in Dongsha Islands of the South China Sea based on otolith morphological information. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 [欧利国. 基于耳石形态信息的南海东沙海域鲹科鱼类识别. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- PAN X Z, GAO T X. Sagittal otolith shape used in the discrimination of fishes of the genus *Sillago* in China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(4): 799–805 [潘晓哲, 高天翔. 基于耳石形态的鱈属鱼类鉴别. *动物分类学报*, 2010, 35(4): 799–805]
- PENG L, JIANG Y E, XU S N, *et al.* Otolith morphology of *Nemipterus virgatus* and its relation to body length and mass in continental shelf of northern South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(6): 27–33 [彭露, 江艳娥, 徐姗楠, 等. 南海北部陆架区金线鱼矢耳石形态及其与体长、体质量关系. *南方水产科学*, 2018, 14(6): 27–33]
- PENG Y, ZENG Y, ZHANG C, *et al.* Otolith morphology of *Saurogobio dabryi* and the variance in different sections of Jialing River. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(12): 1896–1905 [彭艳, 曾燊, 张臣, 等. 嘉陵江不同江段蛇鮈耳石形态特征及差异. *水产学报*, 2018, 42(12): 1896–1905]
- SONG C, YANG Q, ZHAO F, *et al.* Otolith morphological variations among four geographic populations of *Coilia mystus* in the Yangtze estuary and its adjacent waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(10): 1125–1135 [宋超, 杨琴, 赵峰, 等. 长江口及邻近海域4个不同地理群体凤鲚矢耳石形态差异. *中国水产科学*, 2020, 27(10): 1125–1135]
- SOUZA A T, SOUKALOVÁ K, DĚD V, *et al.* Ontogenetic and interpopulation differences in otolith shape of the European perch (*Perca fluviatilis*). *Fisheries Research*, 2020, 230: 105673
- SUN Z C, LI Y D, SONG C Y, *et al.* Comparative studies on morphology and genetics between *Acanthogobius ommaturus* and *Acanthogobius flavimanus*. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(8): 1237–1248 [孙志成, 李亚东, 宋晨雨, 等. 斑尾刺虾虎鱼和黄鳍刺虾虎鱼的形态学、遗传学比较. *水产学报*, 2020, 44(8): 1237–1248]
- TAN B Z, YANG X F, YANG R B. Age structure and growth characteristics of *Gymnocypris waddelli* in the Zhegu Lake, Tibet. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(8): 879–885 [谭博真, 杨学芬, 杨瑞斌. 西藏哲古错高原裸鲤年龄结构与生长特性. *中国水产科学*, 2020, 27(8): 879–885]
- WANG J L, LIU W, WANG C, *et al.* Microchemistry analysis of otoliths of *Coregonus ussuriensis* from the Heilong River Basin. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(4): 825–831 [王继隆, 刘伟, 王臣, 等. 基于耳石微化学的乌苏里白鲑生境履历分析. *水生生物学报*, 2019, 43(4): 825–831]
- WANG J X, REN D Q, WANG X Y, *et al.* The analysis of genetic diversity of *Triplophysa yarkandensis* (Day) from five geographic populations in the Tarim River Basin. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 46–54 [王锦秀, 任道全, 王新月, 等. 塔里木河流域5个地理种群的叶尔羌高原鳅遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 46–54]
- WANG X Y, ZHANG Y J, LIU F, *et al.* Analysis on the morphological differences of *Triplophysa yarkandensis* in different geographic populations. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(6): 199–206 [王新月, 张永杰, 刘斐, 等. 叶尔羌高原鳅不同地理群体形态差异分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(6): 199–206]
- WANG Y J. The application of Fourier analysis in the research of otolith morphology. Master's Thesis of Ocean University of China, 2010 [王英俊. 傅里叶分析在鱼类耳石形态学中的应用研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010]
- XIE Z Z, ZHANG H H, HU L X, *et al.* Comparative studies on multivariate morphometrics of asteriscus of four culters. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(1): 82–90 [谢桢桢, 张化浩, 胡良雄, 等. 4种鲃的星耳石形态度量学比较. *华中农业大学学报*, 2019, 38(1): 82–90]
- YANG L L, JIANG Y Z, LIU Z L, *et al.* Morphological comparison in the sagittal otolith of spawning population of *Scomberomorus niphonius* in coastal water of China. *Marine Fisheries*, 2020, 42(3): 287–295 [杨林林, 姜亚洲, 刘尊雷, 等. 中国沿海蓝点马鲛繁殖群体的耳石形态差异. *海洋渔业*, 2020, 42(3): 287–295]
- YIN M C. *Fish ecology*. Beijing: China Agriculture Press, 1995 [殷名称. 鱼类生态学. 北京: 中国农业出版社, 1995]
- ZHANG T, WANG H H, BI X J, *et al.* Sagittal otolith growth and development at different development stages in larval and juvenile *Coilia mystus* in the Yangtze estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1315–1322 [张涛, 王焕焕, 毕学娟, 等. 长江口凤鲚仔稚鱼不同发育阶段矢耳石生长. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1315–1322]
- ZHUANG L C, YE Z J, ZHANG C. Application of otolith shape analysis to species separation in *Sebastes* spp. from the Bohai Sea and the Yellow Sea, northwest Pacific. *Environmental Biology of Fishes*, 2015, 98(2): 547–558

## Otolith Morphology and Population Discrimination of *Triplophysa yarkandensis*

WANG Xinyue<sup>1</sup>, CHEN Sheng'ao<sup>1,2①</sup>, WANG Chengxin<sup>1</sup>, ZI Fangze<sup>1</sup>,  
CHANG Desheng<sup>1</sup>, XU Hao<sup>1</sup>, LI Dapeng<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Tarim Research Center of Rare Fishes, Alar 843300, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** To study the classification, identification, and discrimination between different geographical populations of *Triplophysa yarkandensis* and explore the related otolith morphology and fish life history, this study statistically analyzed the morphological otolith indices and fish bodies of 734 *T. yarkandensis* from the Yarkand River, Hotan River, and Tarim River using otolith morphology and fish ecology methods. The results showed that otoliths were small in *T. yarkandensis*, approximately elliptic, thicker in the middle, gradually thinning to the outer edge, and with a prominent protrusion in the center of the external surface. Otolith length was obviously larger than otolith width while the excisural notch was not obvious, wherein the rostrum was developed, the ventral otolith edge was smooth with a shallow arc, and the otolith dorsal had a crest-like ridge. No significant difference between left and right lapillus morphology was observed ( $P>0.05$ ). The otolith morphological indices followed a logarithmic function with the body length and weight ( $R^2=0.48\sim 0.62$ ). It reflects the ontogenetic adaptation to the environment, and migration behavior mainly affects the relationship between otolith morphology and fish body morphology. The SHAPE software was used to extract the outer otolith contour of *T. yarkandensis*, revealing morphological differences between *T. yarkandensis* populations. The parameter with the largest discriminant coefficient, *i.e.*, the one in which the morphological difference has the greatest significant effect, was screened. Therewith, the discriminant formula was set up to calculate the discriminant accuracy. Discriminant analysis between groups using fish morphology, otolith morphometry and elliptical Fourier analysis, respectively. The discriminant accuracy of the Hotan River and Tarim River populations was 96.0%, 61.4%, and 82.2%; the Yarkand River and Hotan River was 93.0%, 79.5%, and 87.9%; the Yarkand River and Tarim River populations was 96.5%, 77.5%, and 86.8%. Environmental factors such as water temperature, spatial niche adaptation, and habitat depth were the main causes of the otolith morphological changes, also affecting the behavior characteristics of typical *T. yarkandensis* life history, especially fish migration. In this study, the *T. yarkandensis* was found to live in high altitude, low habitat temperature, and high salinity and alkaline waters, so the fish body growth and the elements deposition rate onto otoliths were low. *T. yarkandensis* belongs to the sub-cold water and benthic fish group, which only enters deep water during overwintering in winter. In other seasons, it swims along the edge and rests in shallow depth waters, so the otolith grows slowly and has a small size. The relationship between otolith and body growth reflected the *T. yarkandensis* ontogenetic adaptability to its habitat. As the *T. yarkandensis* residence time is short in the migration area, mineral elements in the water body cannot be rapidly deposited in a short period of time, and the accelerated body growth is not completely reflected in the otolith growth. Therefore, the short-distance migration behavior under habitat fragmentation mainly affects the correlation between otolith and fish growth in *T. yarkandensis*. The fish otolith morphology is highly species-specific and population-specific. *T. yarkandensis* otolith morphology

① Corresponding author: CHEN Sheng'ao, E-mail: chenshengao@163.com

was significantly different among the geographically different populations ( $P < 0.05$ ). In this study, the accuracy rate ( $>90.0\%$ ) was slightly higher than that of elliptic Fourier analysis ( $>80.0\%$ ), both of which could be used as the discrimination basis parameter. However, the traditional fish otolith morphology is easy to record, as repetitive operations are robust and less affected by the environment, especially in the contents of a carnivorous fish feeding analysis; therefore, vertebrate paleontology explore has a useful application prospect in these aspects. Moreover, it could serve as an effective tool to identify fish intraspecific differences in the case of growth restriction or bodily injury. Therefore, it is of great research value to introduce the otolith morphology into the population identification of *T. yarkandensis*. This study explored the *T. yarkandensis* morphological characteristics and compared otolith morphologies to effectively identify the geographically different population, co-relating otolith shape with *T. yarkandensis* growth (*i.e.*, body length and quality) and resource management, providing theoretical support to further researches about the composition and migratory population growth. The *T. yarkandensis* intraspecies differences in different rivers were also compared concerning fish body morphology, otolith measurements, and elliptic Fourier analysis, providing strong evidence for traditional morphological classification. The effective utilization and cost control of incomplete fish samples was greatly favored by this study. Otolith morphology was applied for the first time in the classification and population identification of *T. yarkandensis*, which laid a foundation for the development and research of its microchemical features and life history strategy, presenting a reference for further identification and evolutionary classification of *Triplophysa*, strengthening the taxonomic foundation of aquatilia, and providing scientific basis for protecting the plateau fishery germplasm resources.

**Key words** *Triplophysa yarkandensis*; Otolith; Morphological difference; Discriminant analysis

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20220403002

http://www.yykxjz.cn/

刘义, 梁洲瑞, 张朋艳, 袁艳敏, 吴宇坤, 段茂宏, 刘福利, 戴宏亮. 海带孢子囊发育过程中的形态结构与生理生化变化研究. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 212-222

LIU Y, LIANG Z R, ZHANG P Y, YUAN Y M, WU Y K, DUAN M H, LIU F L, DAI H L. The morphological structure, physiological and biochemical changes during sorus development of *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 212-222

# 海带孢子囊发育过程中的形态结构 与生理生化变化研究\*



刘义<sup>1</sup> 梁洲瑞<sup>1</sup> 张朋艳<sup>1</sup> 袁艳敏<sup>1</sup>  
吴宇坤<sup>1</sup> 段茂宏<sup>1</sup> 刘福利<sup>2①</sup> 戴宏亮<sup>3</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. 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 山东 青岛 266003;
3. 烟台丰泓海洋苗业有限公司 山东 烟台 265617)

**摘要** 本研究以海带(*Saccharina japonica*)杂交品系“玉带1号”为研究对象,根据孢子囊形成过程中的外观形态,将孢子囊形成与发育过程分为5个阶段,系统观察了孢子囊形成过程中的外观形态和组织结构变化,研究了孢子囊发育不同阶段生理生化特征的变化规律。结果显示,在孢子囊发育过程中,孢子体表面依次出现光滑、磨砂、突起、破皮和光滑等表观现象,伴随着表皮细胞的突起、隔丝的伸长、孢子母细胞的分化与发育,以及游孢子的形成和释放等组织变化过程;另外,在孢子囊发育过程中,海带孢子体对氮的积累持续增加,蛋白含量呈先显著增加到释放游孢子阶段又有所降低的趋势;过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和超氧阴离子含量的变化趋势相似,在孢子囊形成初期,其含量呈先上升到后期又有所下降;不同抗氧化酶在孢子囊形成过程中的活性变化存在差异,其中,超氧化物歧化酶(MDA)活性总体呈下降趋势,而抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性均呈先上升后下降的趋势,丙二醛(MDA)含量无显著变化;在孢子囊发育过程中,1,5-二磷酸核酮糖羧化酶活性呈先降低后升高的趋势,苹果酸脱氢酶(MDH)活性无显著变化。本研究有助于加深对海带杂交品种孢子囊形成过程及生理生化特征的理解,可为海带杂交品种孢子囊的人工诱导提供理论依据。

**关键词** 海带; 孢子囊; 发育过程; 形态结构; 生理生化

**中图分类号** S968.42+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0212-11

海带(*Saccharina japonica*)的生活史属于异型世代交替类型,包含大型的孢子体世代和微观的配子体世代。成熟期的海带孢子体在表面形成具有生殖能力的孢子囊结构,孢子囊作为海带孢子体重要的生殖器官,对于完成海带生活史、保证群体延续等具有重要

作用。海带杂交新品种具有优良的经济性状,在养殖生产中的应用潜力巨大,但一些杂交新品种尤其是远缘杂交品种形成孢子囊的特点十分接近其野生亲本,而不同于常规养殖品种的亲本,即相较于常规的海带品种早熟,其形成孢子囊的时间大大延迟,错过了海

\*山东省农业良种工程项目(2021LZGC004)和国家藻类产业技术体系(CARS-50)共同资助。刘义, E-mail: yiliu055@163.com

① 通信作者: 刘福利, 教授, E-mail: liufuli@ouc.edu.cn

收稿日期: 2022-04-03, 收修改稿日期: 2022-04-27

带育苗生产中的种海带采孢子时间(苏丽等, 2017), 限制了具有优良生产性状的海带杂交品种的应用与推广。因此, 了解海带孢子囊发育过程中的外观形态、组织结构和生理生化变化过程, 对研究海带杂交品种晚熟的调控机制具有重要指导意义。

苏丽等(2018)研究表明, 提前采苗时间不能促进海带杂交品种提前产生孢子, 但晚熟海带的孢子囊可通过改变孢子体的养殖条件获得。关于环境影响海带孢子囊发育的研究有较多报道, 其中, 温度(Su *et al.*, 2020)、营养盐浓度(Kumura *et al.*, 2010; Mizuta *et al.*, 1998)等多种环境因素均影响海带孢子囊的形成。除培养条件的影响因素外, 海带孢子体组织部位(Lüning *et al.*, 1988; Shao *et al.*, 2004)、脱落酸含量(Nimura *et al.*, 2002; Schaffelke *et al.*, 1995)和孢子体的碳氮比值(C:N)(Harries *et al.*, 1932)也是孢子囊发育的内在影响因素。另外, 形成孢子囊的孢子体长时间在培养温度为 23 °C 时受到胁迫, 影响游孢子的释放和发育(李霞等, 2016)。在大型褐藻孢子囊发育过程中, 伴随着光合作用减弱、呼吸作用增强(Aruga *et al.*, 1990; Matsuyama *et al.*, 1983; Nimura *et al.*, 2001; Sakanishi *et al.*, 1991)、褐藻多酚积累(Alstyne *et al.*, 1999)以及 RNA/DNA 比率增加(Nimura *et al.*, 2001)等生物学过程。Mizuta 等(2010)研究表明, 活性氧(ROS)清除机制和碘外排的抗氧化机制在海带孢子囊发育过程中也发挥着重要作用。在以往对海带孢子囊的研究中, 多以野生海带为研究对象, 对人工培育的海带杂交品种孢子囊形成的研究较少。Su 等(2020)研究了光周期和温度等对海带杂交品种孢子囊的诱导作用, 尚未有关于人工培育的海带杂交品种孢子囊形成过程与生理生化特征的研究。

本研究通过室内培养海带孢子体的组织块样品, 系统观察海带孢子囊形成与发育过程中的外观形态和组织结构变化, 探明海带孢子囊发育过程中生化组分的变化过程与特征, 相关结果有利于加深对海带杂交品种孢子囊形成的过程及生理生化特征的理解, 可为进一步解决海带杂交品种孢子囊晚熟问题、探索孢子囊形成诱导新方法提供理论依据和数据支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

本研究的海带是以中国养殖海带品种海带“黄官1号”和日本野生海带为父母本的杂交后代, 具有孢子囊晚熟的典型特征。2021年6月在海带养殖筏架上选取3株长势相近、长度为3.0~3.5 m的厚成期海带

孢子体, 于保温箱中12 h内带回实验室, 使用灭菌海水清洗干净后, 在孢子体叶片距离基部40~60 cm处的中部靠近边缘部分, 使用打孔器获得直径为2 cm的海带孢子体圆片状的组织块。圆片状的海带组织块于冷光源低温光照培养箱(DGXM-508B)中使用2 L充气烧瓶(自制)作为培养容器进行培养。充气装置为V-30型超静强力气泵。

### 1.2 实验设计

**1.2.1 培养条件** 设置海带孢子体形成孢子囊的环境条件: 白光, 光周期8(L):16(D), 光照强度为0~100  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 温度为17 °C, 煮沸冷却的自然海水中添加外源N浓度为5.0 mg/L, 外源P浓度0.5 mg/L作为培养液。每天观察海带孢子体变化。

**1.2.2 生化指标测定样品的取样** 基于前期研究对孢子囊发育过程的观察, 在1.2.1条件下分别选取营养生长期(SA)样品: 培养2 d, 孢子体未形成孢子囊; 孢子囊发育初期(SB)样品: 培养约10 d, 显微镜下观察发现, 海带表面形成轻度磨砂状突起(肉眼观察情况下不明显); 孢子囊发育中期(SC)样品: 培养约19 d, 海带表面形成明显突起, 且在水中观察到由褐色向黄色转变; 孢子囊成熟期(SD)样品: 培养约24 d, 海带孢子囊表皮形成泡状胶质突起并逐渐脱落; 游动孢子释放期(SE): 培养约30 d, 阴干后孢子囊释放游动孢子。每个阶段的样品均设置3个生物学重复, 取样的时间为涵盖海带孢子囊发育前、中、后的整个过程。

### 1.3 组织结构观测与生化指标测定

对SA、SB、SC、SD和SE样品制作组织切片, 使用苏木精-伊红(HE染色)对组织染色, 使用OLYMPUS SZ61解剖镜(日本)、Nikon ECLIPSE E800显微镜(日本)对染色组织切片观察, 并通过NIS-Elements D 3.1软件拍照记录, 使用Image-Pro Plus 5.1软件对孢子体最外层细胞(后期发育为隔丝细胞)和孢子母细胞(发育形成孢子囊)长度进行测量。

将无孢子囊结构的孢子体(SA)和表面带有孢子囊的孢子体样品(SB~SE)使用液氮冷冻15~20 min, 随后-80 °C保存。总氮(TN)使用凯氏定氮法测定, 可溶性蛋白(BCA法)、叶绿素、1,5-二磷酸核酮糖(RUBP)羧化酶(RUBP carboxylase, RubisCO)、超氧阴离子(superoxide anion)使用比色法测定, 相关试剂盒均购于苏州科铭生物技术有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)(WST-1法)、过氧化氢酶(CAT)(钼酸铵法)、丙



二醛(MDA)(硫代巴比妥酸法, TBA 法), 抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、植物苹果酸脱氢酶(MDH)等使用比色法, 各指标测定使用的试剂盒购于南京建成生物公司。每个测量实验均设置3个平行, 测定 TN 含量时, 每个平行称取 0.3 g 样品, 其余指标称取 0.1 g 样品, 并按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1:10 的比例获取提取液, 测定叶绿素时, 组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1:100, 严格按照对应试剂盒操作步骤进行各个指标的测定。

#### 1.4 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件对孢子囊发育过程中细胞长度变化和各项生理生化指标进行单因素方差分析(onw-way ANOVA)和 Duncan 多重比较,  $P < 0.05$  表示差异显著, 并使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 孢子囊不同发育阶段的外观形态和组织结构变化

在孢子囊发育过程中, 不同阶段的表观形态发生了明显变化(图 1)。海带孢子体在形成孢子囊前表面光滑(SA); 随着孢子囊逐渐形成, 表皮细胞开始向外突出, 海带表面开始形成磨砂状凸起(SB), 随后表皮

细胞继续延伸, 在表面形成增厚突起, 海带表面在水中观察由褐色变黄色(SC); 随着培养时间的延长, 胶质组成的保护膜形成凸起并开始脱落, 此时, 阴干后不释放游动孢子(SD); 随着保护层的脱落, 海带孢子囊表面变得光滑, 阴干处理后大量释放游动孢子(SE)。

海带孢子囊的组织结构变化见图 2。从图 2 可以看出, 由表皮细胞分化形成的上层细胞延伸形成隔丝细胞(p), 组织结构切片显示, 隔丝细胞在孢子囊发育整个时期不断伸长, 其顶端形成透明胶质薄膜(d); 隔丝之间形成隔丝腔(pc), 在隔丝腔中, 基部细部分化形成孢子母细胞, 随后孢子母细胞经历减数和有丝分裂, 孢子母细胞不断伸长; 在孢子母细胞发育过程中发现, SD 阶段形成孢子囊帽状结构(cl), 此时, 未形成游动孢子; 当在单个孢子母细胞形成 32 个细胞核时, 每个细胞核与一个色素体及其周边的原生质结合形成一个游动孢子, 孢子囊帽状结构(cl)结构不显著, 隔丝腔空间被孢子母细胞填充而减少。此时, 能释放游动孢子, 但基细胞仍在分化形成孢子母细胞, 说明孢子母细胞发育的不同步, 这可能是孢子囊能连续和多次释放游动孢子的原因。

### 2.2 孢子囊发育不同阶段的表皮细胞长度变化

对孢子囊发育不同阶段的最外层细胞(后期分化

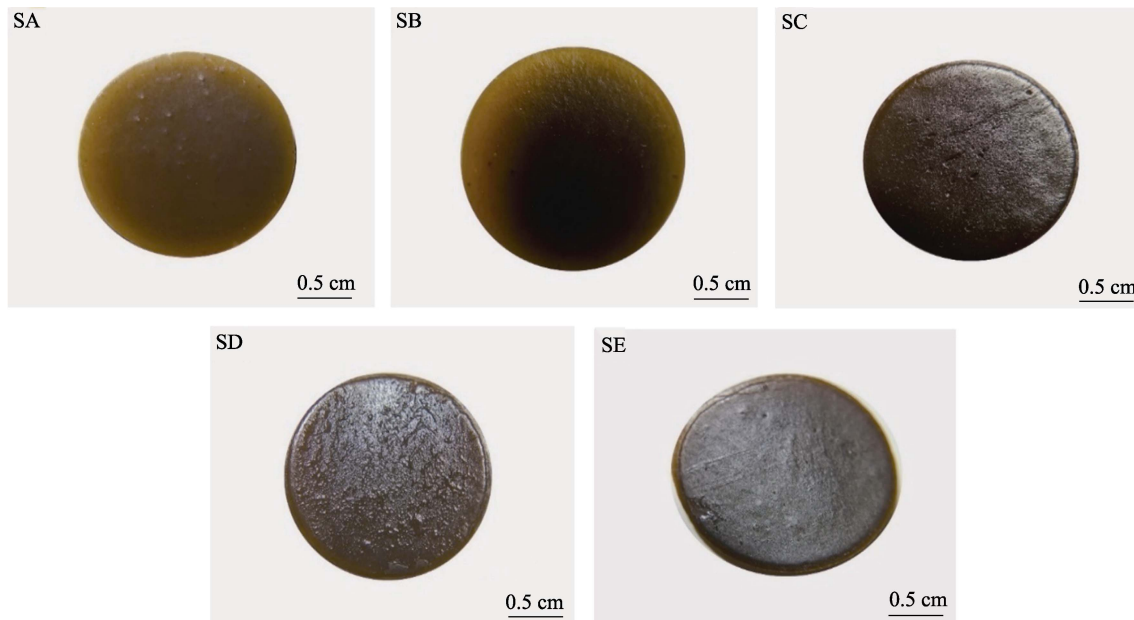


图 1 海带孢子囊发育过程中的外观形态特征变化

Fig.1 Changes in morphological characteristics during the sorus formation process of *S. japonica*

SA: 营养生长期; SB: 孢子囊发育初期; SC: 孢子囊发育中期; SD: 孢子囊成熟期; SE: 游动孢子释放期; 下同。

SA: Vegetative stage; SB: Early development stage of sorus; SC: Middle development of sorus;

SD: Sorus maturity stage; SE: Release stage of zoospores. The same as below.

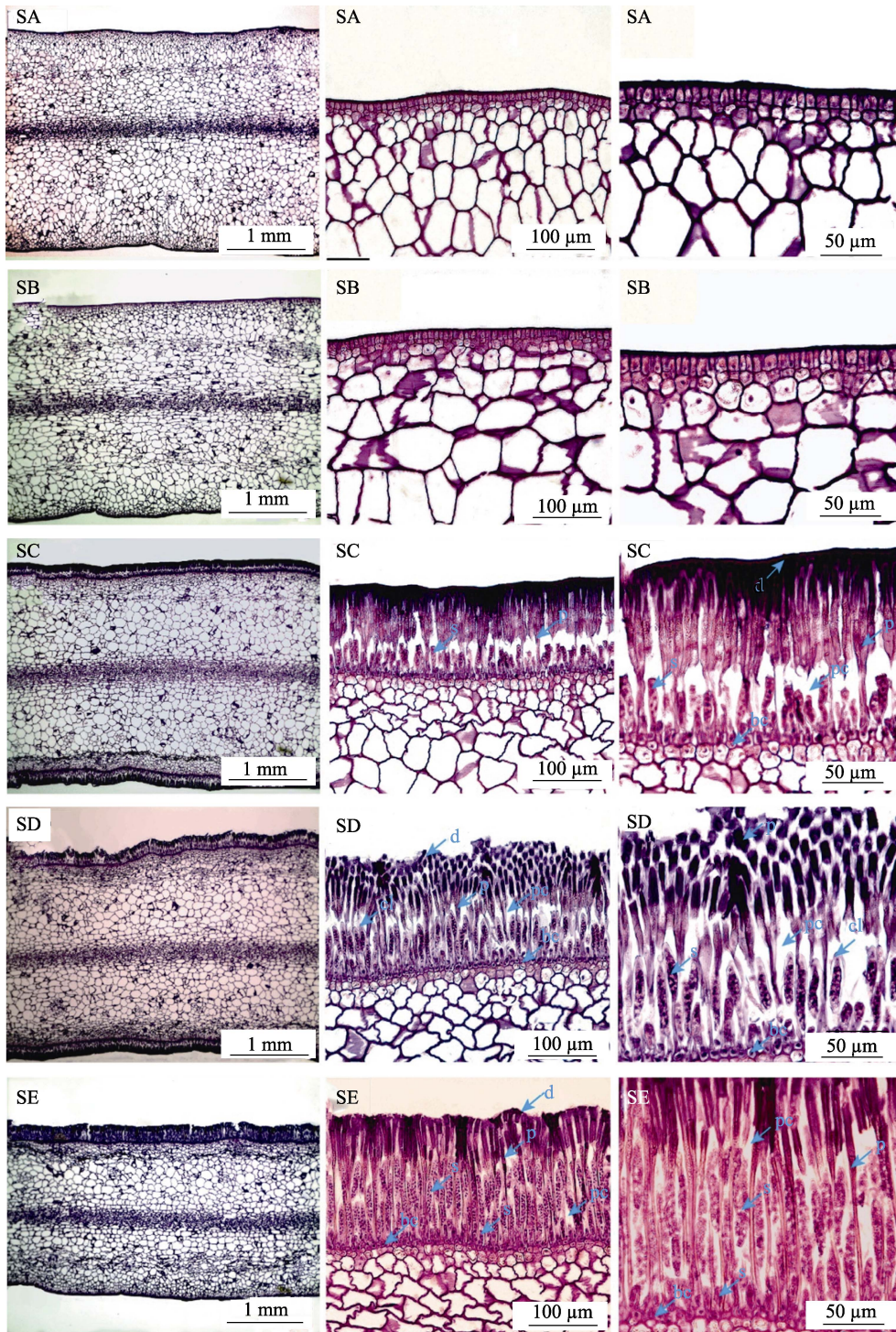


图 2 海带孢子囊发育过程中的组织结构变化

Fig.2 Changes of tissue structure during the sorus formation of *S. japonica*

bc: 基细胞; cl: 孢子囊帽状结构; d: 隔丝细胞顶端的胶质层; p: 隔丝; s: 孢子母细胞或孢子囊。  
 bc: Basal cell; cl: Cap-like structures of sours; d: Cuticle at the apex of the paraphysis cells;  
 p: Paraphyses; s: Sporoblast or sporangium.

为隔丝细胞)和孢子母细胞(后期发育成孢子囊细胞)长度变化统计结果见图 3。从图 3 可以看出,在孢子

囊发育整个时期,分化成隔丝的细胞长度在各阶段均显著增加( $P < 0.05$ ),在 SC 阶段分化形成的孢子母细



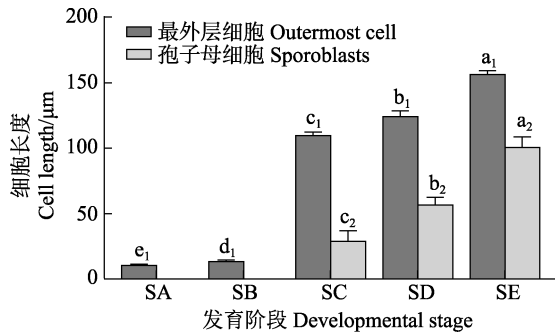
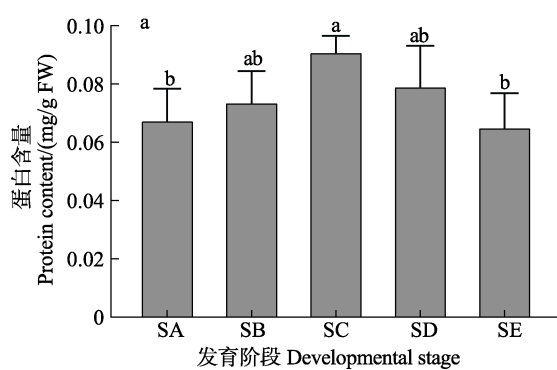


图3 海带孢子囊发育阶段细胞长度的变化

Fig.3 Changes of cell length during sorus development of *S. japonica*

柱状图上的字母下标为相同数字的作为同一组进行多重比较,同一组的不同字母表示在  $P < 0.05$  水平具有显著性差异。

The same subscript number at the letters represent the same group. The measured value in the same group are compared. The different letters in the same group represent significant differences ( $P < 0.05$ ).



胞不断延伸,在各阶段显著增加( $P < 0.05$ ),尤其在游动孢子形成阶段,孢子囊细胞长度约为SD阶段的2倍。

### 2.3 孢子囊发育不同阶段的可溶性蛋白与氮含量变化

从图 4a 可以看出,在孢子囊发育过程中,可溶性蛋白含量呈先升高后降低的变化趋势。其中,从SA~SC阶段蛋白含量逐渐增加,SB > SA,但相比差异不显著( $P < 0.05$ ),SC阶段蛋白含量显著高于其他阶段( $P < 0.05$ )。SC~SE阶段蛋白含量逐渐降低,且SE阶段蛋白含量最低,与SC阶段相比差异显著( $P < 0.05$ )。从图 4b 可以看出,在孢子囊发育过程中,氮含量总体呈上升趋势,SA与SB阶段、SB与SC阶段海带组织氮含量相比无显著差异( $P > 0.05$ ),SC阶段相对于SA阶段氮含量显著升高( $P < 0.05$ ),随着孢子囊的持续形成,SD和SE阶段氮含量显著高于SC阶段( $P < 0.05$ ),SD发育至SE阶段过程中的氮含量相比无显著变化( $P > 0.05$ )。

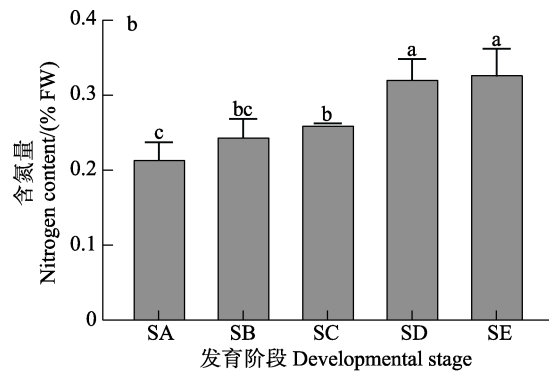


图4 海带孢子囊发育不同阶段蛋白和氮含量变化

Fig.4 Changes of soluble protein and nitrogen content during different development stages of *S. japonica* sorus

不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), the same as below.

### 2.4 孢子囊发育不同阶段的叶绿素含量变化

从图 5 可以看出,在孢子囊发育过程中,SA与SB阶段的叶绿素a含量无显著变化( $P > 0.05$ ),发育到SC阶段时,叶绿素a含量相比于SB阶段显著增加( $P < 0.05$ )。同时,叶绿素a含量在孢子囊发育的SC~SE阶段相比无显著变化( $P > 0.05$ )。

### 2.5 孢子囊发育不同阶段的活性氧(ROS)含量变化

从图 6a 可以看出,海带孢子囊发育前期的SA阶段到形成初期的SB阶段,超氧阴离子含量有所下降( $P > 0.05$ ),SB阶段发育至SC阶段超氧阴离子含量显著升高( $P < 0.05$ ),并在SD和SE阶段保持较高水平,

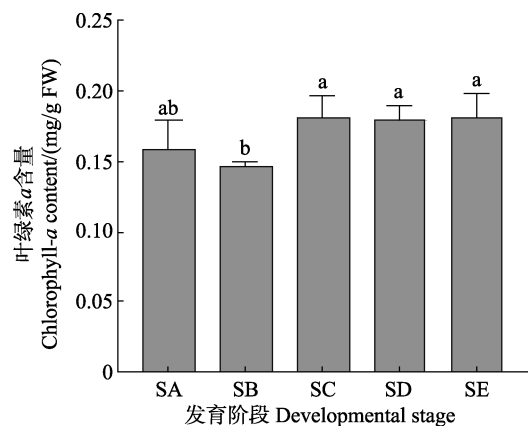


图5 海带孢子囊发育阶段叶绿素a含量变化

Fig.5 Changes of Chlorophyll-a content during different development stages of *S. japonica* sorus

且显著高于SB阶段( $P < 0.05$ )。从图6b可以看出,  $H_2O_2$ 含量变化呈明显的先升高后下降趋势。孢子囊未形成前的SA阶段  $H_2O_2$ 含量最低, 随着孢子囊的发育, SB阶段  $H_2O_2$ 含量显著升高( $P < 0.05$ ), 在发育到SD阶段时达到峰值, 随后在SE阶段显著降低( $P < 0.05$ ), 但仍显著高于SA阶段( $P < 0.05$ )。

## 2.6 MDA含量变化

从图7可以看出, MDA含量在海带表皮形成磨砂状突起阶段(SB)相对于SA阶段有所增加, 在SB到SC阶段MDA含量下降, 从SC~SE阶段MDA含量持续增加, 但整个过程相比无显著变化( $P > 0.05$ )。鉴于海带孢子囊发育过程中活性氧水平升高, 但未出现膜脂氧化而导致MDA含量升高, 这说明活性氧受

到抗氧化系统的合理调控。

## 2.7 孢子囊发育不同阶段抗氧化酶类变化

孢子囊发育不同阶段抗氧化酶类变化见图8。从图8a可以看出, SOD活力随着孢子囊的发育而降低, 在SA和SB阶段SOD活力下降, 但相比无显著差异( $P > 0.05$ ), 当发育到SC阶段时, SOD活力与SA阶段相比显著降低( $P < 0.05$ ), 并始终低于未形成孢子囊时的酶活力。CAT与POD活力在孢子囊发育前期有所增加, 在形成隔丝细胞与孢子母细胞阶段(SC)明显降低, 透明胶状保护膜脱落和孢子母细胞发育阶段(SD)升高, 在释放游动孢子阶段(SE)时降低(图8b和图8c)。APX活力与POD活力变化趋势相似(图8d), 但在孢子囊发育的SD和SE阶段的酶活性显著下降( $P < 0.05$ )。

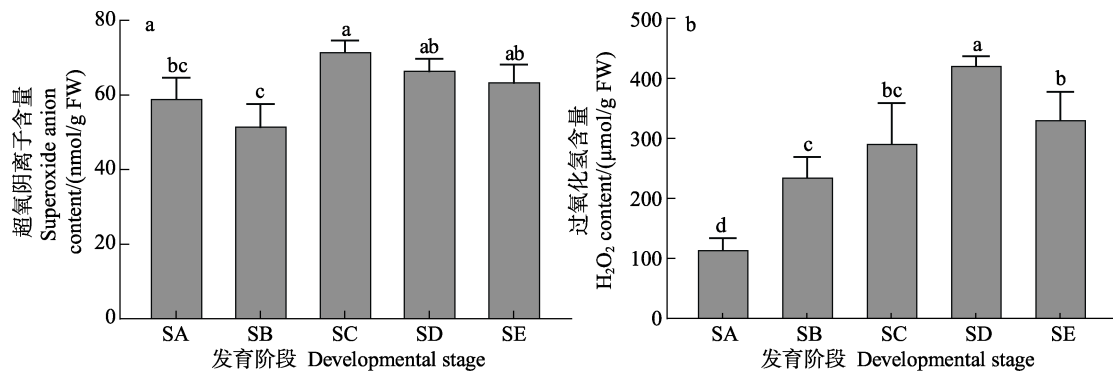


图6 海带孢子囊发育阶段超氧阴离子和  $H_2O_2$  含量变化

Fig.6 Changes of superoxide anion and  $H_2O_2$  content during different development stages of *S. japonica* sorus

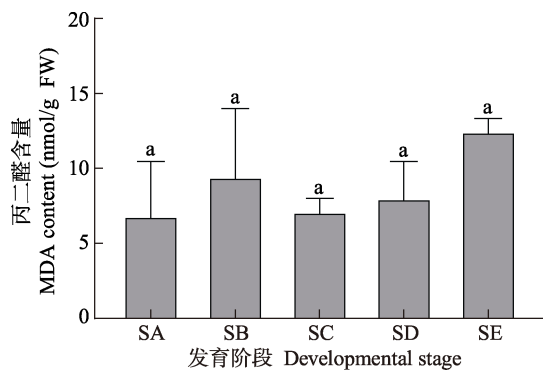


图7 海带孢子囊发育阶段MDA含量变化

Fig.7 Changes of malondialdehyde (MDA) content during different development stages of *S. japonica* sorus

## 2.8 孢子囊发育不同阶段的RubisCO、MDH变化

从图9可以看出, RubisCO活力在孢子囊发育过程中表现为先降低后升高的趋势。海带表面由光滑(SA)到表面形成磨砂状突起(SB)阶段显著降低( $P < 0.05$ ), SC阶段相比于SB阶段有所降低, 但相比

无显著差异( $P > 0.05$ )。随着孢子囊发育到SD阶段, RubisCO酶活力显著增加( $P < 0.05$ )且达到整个发育过程的最大值。MDH活力在孢子囊发育整个过程中变化不显著( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

海带孢子囊的发育伴随着隔丝细胞与孢子母细胞的形成(Abe *et al.*, 1939)。本研究发现, 孢子囊开始发育时, 隔丝细胞开始伸长, 此时, 表观结构发生变化, 表现为孢子体表面变成磨砂状表面, 直到能够释放游动孢子, 隔丝细胞长度持续增加。当基细胞形成孢子母细胞时, 孢子母细胞在隔丝腔中不断延伸, 且在不同发育阶段表现出显著变化, 尤其在游动孢子形成及释放阶段, 孢子母细胞长度比未释放游动孢子(表层保护膜凸起并脱落阶段)时延长近1倍。

可溶性蛋白主要是植物体中生理代谢相关酶类等物质, 可溶性蛋白含量的多少可以反映植物体内代谢水平的高低。蛋白含量在孢子囊发育过程中, SA~SC

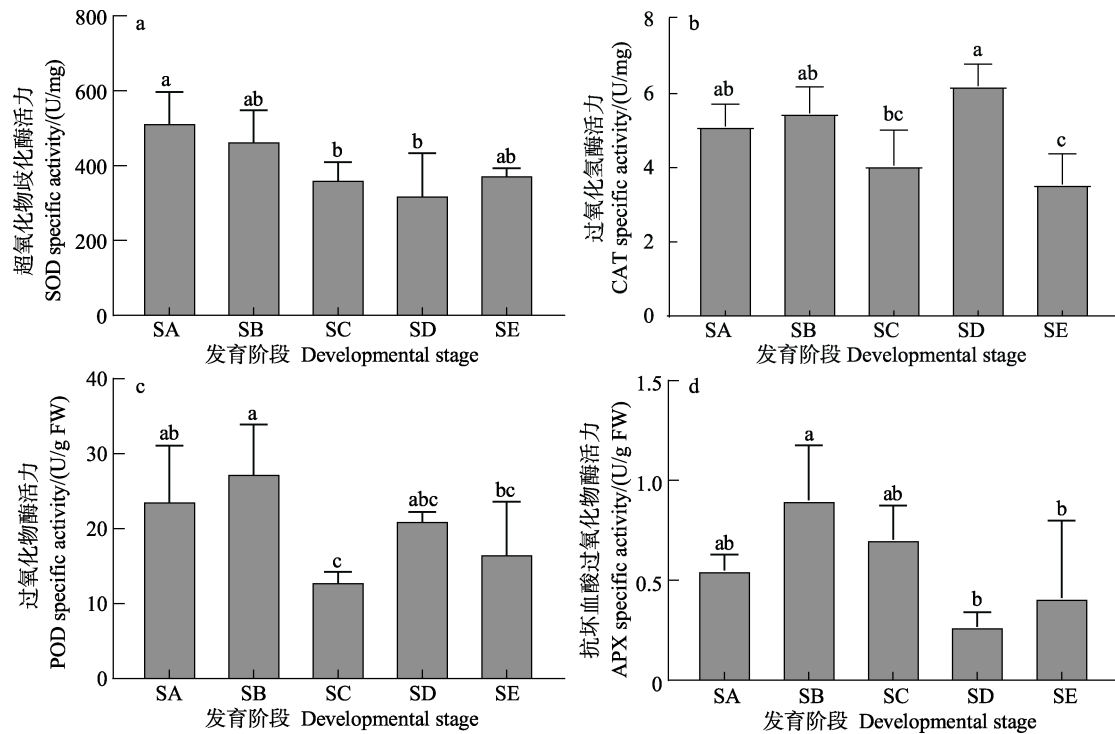


图8 海带孢子囊发育阶段抗氧化酶类的酶活力

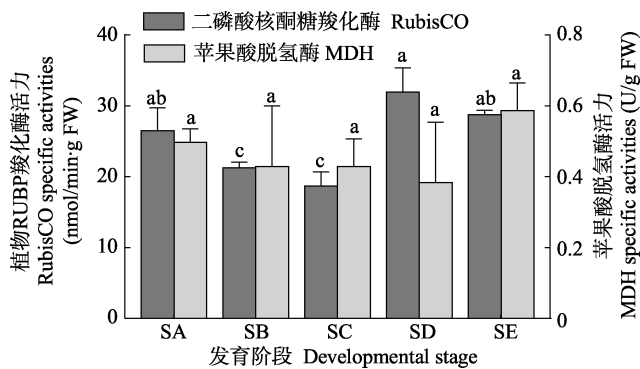
Fig.8 Enzyme activity of antioxidant enzymes during different stages of *S. japonica* sorus development

图9 海带孢子囊发育阶段 RubisCO 和 MDH 活性

Fig.9 The activities variation of RubisCO and MDH during different stages of *S.a japonica* sorus development

阶段逐渐升高, SC~SE 阶段逐步下降。孢子囊发育过程中的表皮形成突起、细胞伸长形成单细胞隔丝及孢子母细胞形成等生命活动都需要较高的代谢水平来支撑,而在孢子囊发育过程后期,主要包括游孢子的形成和释放等生命过程,可溶性蛋白含量降低。在高等植物中, Kong 等(2016)研究指出,营养期积累的氮会在繁殖和衰老期通过高分子物质降解,如蛋白含量降低,从而实现物质转移。本研究发现,在释放游孢子阶段,蛋白含量降低到未形成孢子囊(SA)阶段时的含量以下,这可能与孢子囊发育过程中对氮的需求较大,从而出现对氮的再分配,使蛋白含量有所降低有关。

海带中叶绿素含量的高低反映出光合作用的强弱,并影响植物体内能量和物质的转化(黄健等, 2002; 文滨滨等, 2019),同时,影响着光合作用的捕获、传递和转化(胡单等, 2011; 杨昕宇等, 2019; 周竹青等, 2001)。Aruga 等(1990)研究表明,孢子囊部分和非孢子囊部分叶绿素 *a* 含量相比无明显差异。本研究发现,叶绿素 *a* 含量在孢子囊发育前期有所降低,但在发育后期显著升高。叶绿素 *a* 在隔丝细胞形成后均显著高于未形成孢子囊时的初始值( $P < 0.05$ ),说明孢子囊在发育过程中,尤其在隔丝细胞、孢子母细胞、游孢子的形成和释放阶段伴随着叶绿素的大量积累。但也有研究认为,在孢子囊发育过程中,光合作用降低,呼吸作用增强(Aruga *et al*, 1990; Matsuyama *et al*, 1983; Nimura *et al*, 2001; Sakanishi *et al*, 1991),孢子囊部分的光补偿点升高。活化的 RubisCO 在一定程度上能表征光合作用的强弱。本研究发现, RubisCO 活性在孢子囊发育前期降低,但发育到 SD 和 SE 阶段时,酶活性升高。由于净光合速率的强弱不仅与叶绿素含量有关,对于光需求量较少的阴生植物来说,光照强度较高时,光合作用的强弱主要受到光合电子传递关键组分和碳同化关键酶等限制因素的影响(许大全等, 2002)。因此,在孢子囊发育过程中,叶绿素含量虽然显著升高,但可能由其他限速条件引起光合作用在孢子囊发育前期(SB 和 SC 阶段)下降。MDH 参与线

粒体能量代谢(汪新颖等, 2009), 本研究发现, MDH 活力在孢子囊发育过程中变化不大, 仅在 SE 阶段活性有所升高, 可能与释放游孢子等生命活动需要能量支撑有关。

孢子囊发育受到氮和磷含量的影响, 较低的氮含量能延迟孢子囊的形成并减少孢子囊的面积, 孢子囊发育时间、位置与孢子体的生长程度和氮含量有关(Mizuta *et al.*, 1998), 孢子体中足够的营养物质积累能促进孢子囊发育(Kumura *et al.*, 2010)。本研究发现, 在孢子囊发育过程中, 氮积累持续增加, 尤其在 SC 与 SA 阶段氮含量显著增多, SD 和 SE 阶段持续保持较高水平。研究显示, 长海带(*L. longissimi*)孢子囊中的蛋白质、脂质和糖类含量高于其他部分, 当叶片组织中的 C/N 值较低时, 会形成孢子囊(Harries *et al.*, 1932; Hosoda *et al.*, 1970)。另外, Sasaki 等(1969)研究发现, 当单位面积鲜重比超过 58 mg/cm<sup>2</sup> 时, *L. angustata* var. *longissima* 开始形成孢子囊, 说明孢子囊的形成需要营养物质积累为前提。

ROS 包括单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和羟基自由基(HO•), 对植物细胞既有毒害作用, 也在植物生长、防御、激素信号传导方面发挥着重要作用(Mittler *et al.*, 2004)。Mizuta 等(2010)研究发现, 相比于未形成孢子囊的部分, 孢子囊部分细胞内 ROS 产量升高并伴随着 ROS 的释放, 抗氧化物和 ROS 清除酶活性显著升高。另外, ROS 能促进细胞壁松动诱导细胞生长(Fry *et al.*, 1998; Liskay *et al.*, 2004; Potikha *et al.*, 1999), 并在孢子囊发育时促进细胞的伸长。本研究发现, 在整个发育过程中, SOD 活性逐渐降低, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量持续增加, 这表明海带孢子囊发育可能需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的参与。在高温胁迫下, 海带孢子体中 MDA 含量显著增加(凌晶宇等, 2016), 但在温度为 17 °C 培养孢子囊的过程中, MDA 含量在孢子囊发育过程虽然呈动态变化, 与未形成孢子囊时期相比无显著差异, 说明在此过程中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的变化并未对海带孢子体生长发育形成胁迫。另外, ROS 不仅与胁迫耐受性有关(Choo *et al.*, 2004; Collén *et al.*, 2010a、b、c), ROS 作为生物和非生物胁迫的信号物质发挥作用(Breusegem *et al.*, 2006)。因此, 在孢子囊发育过程中, 各种抗氧化酶类的活性在孢子囊发育不同阶段的动态变化, 精准调控 ROS 保持在合理的水平, 既不会对细胞造成伤害, 又能保障 ROS 作为信号分子参与孢子囊发育的分子调控过程。

#### 4 结论

海带孢子囊形成时伴随着孢子体表皮细胞的分

化, 隔丝细胞和孢子母细胞的变化引起海带孢子体表面特征的变化。在孢子囊发育过程中, 伴随着 N、蛋白含量、叶绿素含量的增加, 在抗氧化酶类的动态调节下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量持续增加, 说明在孢子囊发育过程中, 较高含量的 ROS 可能在孢子囊发育过程中发挥重要作用。

#### 参 考 文 献

- ABE K. Mitosen im sporangium von *Laminaria japonica* Aresch. Science Reports of the Tohoku Imperial University (Biology), 1939, 8(14): 327–329
- ALSTYNE K L V, MCCARTHY J J, HUSTEAD C L, *et al.* Phlorotannin allocation among tissues of northeastern Pacific kelps and rockweeds. Journal of Phycology, 1999, 35(3): 483–492
- ARUGA Y, TOYOSHIMA M, YOKOHAMA Y. Comparative photosynthetic studies of *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyta) bladelets with and without zoosporangial sori. Hydrobiologia, 1990, 204/205(1): 473–477
- BREUSEGEM F V. Reactive oxygen species in plant cell death. Plant Physiology, 2006, 141(2): 384–390
- CHOO K S, SNOEIJIS P, PEDERSEN M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 298(1): 111–123
- COLLÉN J, DAVISON I R. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). Journal of Phycology, 2010b, 35(1): 62–69
- COLLÉN J, DAVISON I R. Reactive oxygen production and damage in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). Journal of Phycology, 2010a, 35(1): 54–61
- COLLÉN J, DAVISON I R. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. Plant, Cell and Environment, 2010c, 22(9): 1143–1151
- FRY S C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. Biochemical Journal, 1998, 332: 507–515
- HARRIES, R. An investigation by cultural methods of some of the factors influencing the development of the gametophytes and the early stages of the sporophytes of *Laminaria digitata*, *L. saccharina*, and *L. clonstoni*. Annals of Botany, 1932, 46(4): 893–928
- HOSODA K. Studies on the components of Naga-kombu, *Laminaria longissima*-I general components. Nippon Suisan Gakkaishi, 1970, 36(7): 698–701
- HU D, YANG Y H. Effects of different application rates of nitrogen on photosynthetic pigment, biomass and yield of winter highland barley seedlings. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(24): 14561–14563, 14585 [胡单, 杨永红. 不同施氮对冬青稈幼苗光合色素·生物量及产量的影



- 响. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 14561–14563, 14585]
- HUANG J, TANG X X, DUAN D L, *et al.* Physiological effect of light on kelp. *Marine Sciences*, 2002, 26(4): 55–58 [黄健, 唐学玺, 段德麟, 等. 不同光照条件下海带体内各种化合物的含量及光合作用和呼吸作用的变化. *海洋科学*, 2002, 26(4): 55–58]
- KONG L A, XIE Y, HU L, *et al.* Remobilization of vegetative nitrogen to developing grain in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 2016, 196: 134–144
- KUMURA T, YASUI H, MIZUTA H. Nutrient requirement for zoospore formation in two alariaceous plants *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar and *Alaria crassifolia* Kjellman (Phaeophyceae: Laminariales). *Fisheries Science*, 2010, 72(4): 860–869
- LI X, PANG S J, SU L. Performance of spore release, gametogenesis and growth of sporophytes resulted from sorus cultured under different temperature and culture periods. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 111–119 [李霞, 逢少军, 苏丽. 温度和时间对海带(*Saccharina japonica*)孢子囊孢子放散及后期生长发育的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 111–119]
- LING J Y, LIANG Z R, WANG F J, *et al.* Effects of high temperature on the antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters of *Saccharina japonica*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 120–125 [凌晶宇, 梁洲瑞, 王飞久, 等. 高温对海带(*Saccharina japonica*)抗氧化酶及叶绿素荧光参数的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 120–125]
- LISZKAY A, ZALM E, SCHOPFER P. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2\cdot 2$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 2004, 136(2): 3114–3123
- LÜNING K. Photoperiodic control of sorus formation in the brown alga *Laminaria saccharina*. *Marine Ecology Progress Series*, 1988, 45(1/2): 137–144
- MATSUYAMA K. Photosynthesis of *Undaria pinnatifida* Suringar f. *Distans* Miyabe et Okamura (Phaeophyceae) from Oshoro Bay. II. Photosynthetic in several portions of the thallus. *Hokkaido-ritsu Suisan Shikenjo hokoku=Scientific reports of Hokkaido Fisheries Experimental Station*, 1983, 25: 195–200
- MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490–498
- MIZUTA H, HAYASAKI J, YAMAMOTO H. Relationship between Nitrogen content and sorus formation in the brown alga *Laminaria japonica* cultivated in Southern Hokkaido, *Japanese Fisheries Science*, 1998, 64(6): 909–913
- MIZUTA H, YASUI H. Significance of radical oxygen production in sorus development and zoospore germination in *Saccharina japonica* (Phaeophyceae). *Botanica Marina*, 2010, 53(5): 409–416
- NIMURA K, MIZUTA H. Differences in photosynthesis and nucleic acid content between sterile and fertile parts of the sporophyte of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Algae*, 2001, 16: 151–155
- NIMURA K, MIZUTA H. Inducible effects of abscisic acid on sporophyte discs from *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 2002, 14(3): 159–163
- POTIKHA T S, COLLINS C C, JOHNSON D I, *et al.* The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 849–858
- SAKANISHI Y, YOKOHAMA Y, ARUGA Y. Photosynthetic capacity of various parts of the blade of *Laminaria longissima* Miyabe (Phaeophyceae). *Japanese Journal of Phycology*, 1991, 39: 239–243
- SASAKI, S. An ecological study of *Laminaria angustata* var. *Longissima* (M.) MIY ABE on the coast of Kushiro Prov, Hokkaido. 1. On the life of winter population. *Scientific Reports*, 1969, 10: 1–42
- SCHAFFELKE B. Abscisic acid in sporophytes of three laminaria species (Phaeophyta). *Journal of Plant Physiology*, 1995, 146(4): 453–458
- SHAO J P, LÜNING K. Breaking seasonal limitation: Year-round sporogenesis in the brown alga *Laminaria saccharina* by blocking the transport of putative sporulation inhibitors. *Aquaculture*, 2004, 240(1/2/3/4): 531–541
- SU L, PANG S J, GAO S Q. Investigation of sorus formation in the new *Saccharina japonica* hybrid cultivar b013. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2017, 19(2): 119–123 [苏丽, 逢少军, 高素芹. 杂交海带新品系 b013 孢子囊形成规律初探. *中国农业科技导报*, 2017, 19(2): 119–123]
- SU L, SHAN T F, LI J, *et al.* Aquaculture of the hybrid cultivars of *Saccharina japonica*: Removing the obstacle of sori production by photoperiodic control. *Aquaculture*, 2020, 519: 734917
- SU L. The study on reproduction and cultivation problems related to variety breeding of the economic seaweed *Saccharina japonica*. *Doctoral Dissertation of the University of Chinese Academy of Sciences*, 2018 [苏丽. 与海带品种培育相关的繁殖与栽培问题的研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2018]
- WANG X Y, WANG B, HOU S T. Structure and function of malate dehydrogenases. *Journal of Biology*, 2009, 26(4): 69–72 [汪新颖, 王波, 侯松涛, 等. 苹果酸脱氢酶的结构及功能. *生物学杂志*, 2009, 26(4): 69–72]
- WEN B B, ZHANG X H, SHEN H Y, *et al.* Effects of nitrate nitrogen on chlorophyll synthesis and related genes expression of 'Gala 3' in tissue culture. *Journal of Shandong*

- Agricultural University (Natural Science), 2019, 50(2): 179–185 [文滨滨, 张新昊, 沈红艳, 等. 硝态氮对组培‘嘎拉3’叶绿素合成及相关基因表达的影响. 山东农业大学学报(自然科学版), 2019, 50(2): 179–185]
- XU D Q. Photosynthetic efficiency. 4th edition. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2002, 47 [许大全. 光合作用效率. 第4版. 上海: 上海科学技术出版社, 2002, 47]
- YANG X Y, KANG Y C, CAO L. Nitrogen application and slow-release urea are beneficial to the improvement of yield and quality of pepper. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(22): 7507–7512 [杨昕宇, 康益晨, 曹莉, 等. 施氮与缓释尿素有利于辣椒产量及品质的提升. 分子植物育种, 2019, 17(22): 7507–7512]
- ZHOU Z Q, ZHANG Q L. Study on the change of chlorophyll contents and its relationships with photosynthetic leaf area among the different types of wheat cultivars (Lines). *Journal of Hubei Engineering University*, 2001(6): 5–8 [周竹青, 张清良. 小麦品种(系)叶绿素含量变化及其与光合叶面积关系研究. 孝感学院学报, 2001(6): 5–8]

(编辑 陈 严)

## The Morphological Structure, Physiological and Biochemical Changes During Sorus Development of *Saccharina japonica*

LIU Yi<sup>1</sup>, LIANG Zhourui<sup>1</sup>, ZHANG Pengyan<sup>1</sup>, YUAN Yanmin<sup>1</sup>,  
WU Yukun<sup>1</sup>, DUAN Maohong<sup>1</sup>, LIU Fuli<sup>2①</sup>, DAI Hongliang<sup>3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Yantai Fenghong Marine Seeds Co., LTD, Yantai 265617, China)

**Abstract** The reproductive characteristics of some hybrids from crosses of cultivated strains with wild populations are more similar to their wild parents. These hybrids form sorus twice a year in spring and autumn, unlike the conventional cultivars, which formed sorus once a year in summer. The *S. japonica* seedling industry begins in August in the north of China. However, hybrids form sorus in September or later. Therefore, these hybrids cannot be used as parental stock in the cultivation of summer seedlings in the north of China, hindering the promotion and application of these hybrids with excellent traits. Unfortunately, very few studies have focused on the induction and mechanism of sorus formation in kelp. It was of great significance to explore artificial induction technology for sorus formation of kelp hybrids and ensure the timely formation of sorus when the summer seedling cultivation based on an understanding of the biological process of sorus development. At present, research on the biological processes and characteristics of hybrid kelp sorus were limited. This study investigated the hybrid variety "Yudai No. 1". Discs from the kelp sporophytes were cultured in inflatable bottles. The sorus development process was divided into five stages (SA~SE) based on the appearance and morphological changes of the sorus. Samples for each stage were collected separately. The appearance, morphology, and tissue structure changes during the formation and development of sorus were systematically observed. Changes in the physiological and biochemical characteristics at different stages were also quantitatively studied. During sorus development, the surface of the sporophyte was smooth at stage SA, frosted in stage SB, noticeably protruded at stage SC, the cuticle at the apex of the paraphysis cells broken at stage SD, and the cuticle was smooth again in stage SE. The process was accompanied by the protrusion of epidermal cells (SB), the elongation of paraphysis cell (SC), the differentiation and development of sporoblast (SC, SD), and

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufuli@ouc.edu.cn

the formation and release of zoospores (SE). The cells (paraphysis cell and sporoblast) varied significantly and were constantly elongating at all stages ( $P < 0.05$ ). The cells were especially elongated during the stage of zoospore formation and release (SE), zoospore cells were nearly 1-fold longer than the zoospores that were not released at stage SD. During the development of *S. japonica* sorus, the accumulation of nitrogen by sorus continued to increase, and there was little change after reaching the maximum level at stage SD. The formation of sorus was accompanied by the accumulation of nutrients. The protein content increased significantly in the early stages of sorus development and decreased at the stage of zoospore release. The protein content was significantly higher in the SC stage than that at stage SA ( $P < 0.05$ ). Subsequently, the decline began after the SC stage, indicating the development of the sorus was the main biological activity, and the metabolic level was gradually reduced. Unlike that in previous studies, we identified a significant increase in the chlorophyll content during sorus development, which probably ensured all zoospores include chloroplasts. Meanwhile, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide anions showed similar trends of initially increasing at the beginning of sorus formation and decreasing in the later stages. Changes in the  $H_2O_2$  content were highly significant in sorus formation. There were differences in the activity of different antioxidant enzymes in the process of sorus formation, among which superoxide dismutase (SOD) activity had a general downward trend, while ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD), and catalase (CAT) showed a trend of rising in the early stages and then declining in the later stages. Moreover, POD, APX, and CAT activity had the significantly lowest levels at stage SC, SD, and SE, whereas the maximum levels of POD and APX were at stage SB, and maximum CAT levels were at stage SD. However, the malondialdehyde (MDA) content did not vary significantly during the whole development process. SOD activity gradually decreased throughout development, and the  $H_2O_2$  content continued to increase, suggesting kelp sorus development may require hydrogen peroxide involvement. The activities of various antioxidant enzymes changed dynamically at different stages of sporangia development, and accurately regulated the oxygen species (ROS). The ROS increase in the process of sorus development did not harm any cells and ROS participated as a signaling molecule in the molecular regulation process of sorus development. In sorus development, the activity of RuBP carboxylase (RubisCO) initially decreased at stage SB and SC and then increased. There was no significant variation in the plant malate dehydrogenase activity. This study deepened the understanding of the hybrid kelp sorus formation process, physiological, and biochemical characteristics, and provided a theoretical basis for the artificial induction of hybrid kelp sorus formation in the future.

**Key words** *Saccharina japonica*; Sorus; Development process; Morphological structure; Physiology and biochemistry

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220801001

http://www.yykxjz.cn/

刘静静, 李贵阳, 晋怀远, 高晔, 王会林, 李杰. 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 223-233

LIU J J, LI G Y, JIN H Y, GAO Y, WANG H L, LI J. Development of a PCR method to detect the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 223-233

# 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种 PCR 检测方法的建立\*



刘静静<sup>1,2</sup> 李贵阳<sup>1</sup> 晋怀远<sup>1,3</sup> 高晔<sup>1</sup> 王会林<sup>1,3</sup> 李杰<sup>1,3</sup>①

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 3. 天津农学院水产学院 天津 300384)

**摘要** 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)是一种重要的鱼类致病菌,可以感染多种海淡水鱼类。杀鲑气单胞菌包括 5 个亚种,目前常用的生理生化特征和 16S rDNA 序列分析方法很难实现亚种的快速精确区分。为实现杀鲑气单胞菌亚种的快速鉴定和检测,针对我国常见的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)和杀日本鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *masoucida*),本研究开发了其特异性的 PCR 检测方法。根据 Gene Bank 已公布的杀鲑气单胞菌基因组信息,选择杀鲑亚种 *phoB* 基因和杀日本鲑亚种 *LOC111476736* 基因作为目标基因,根据其序列设计特异性引物,进一步对 PCR 反应的退火温度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度和酶浓度 5 个方面进行了优化,并测试了该方法的特异性、敏感性和应用效果。结果显示,2 对引物分别可以扩增出杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 522 bp 的 *phoB* 特异性基因片段和杀日本鲑亚种 515 bp 的 *LOC111476736* 特异性基因片段。杀鲑亚种特异性引物最适退火温度为 64 °C, 10 μmol/L 引物、2 mmol/L dNTPs、25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 1 U/μL KOD 酶的最适添加量分别为 1.5、2、1.5 和 0.5 μL。杀日本鲑亚种特异性引物最适退火温度为 64 °C, 10 μmol/L 引物、2 mmol/L dNTPs、25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 1 U/μL KOD 酶的最适添加量分别为 0.75、1、1.5 和 0.5 μL。以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)、杀鲑气单胞菌其他亚种等 14 种其他水产病原菌或常见环境菌为模板进行 PCR 检测,均无特异性条带。该方法对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测灵敏度为 12.8 CFU/反应(菌体)或 17.6 fg/反应(DNA),对杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种的检测灵敏度为 23.8 CFU/反应(菌体)或 27.2 fg/反应(DNA)。利用杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种分别对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)进行人工感染实验,感染后取病鱼组织进行 PCR 检测,结果显示,本方法可以从感染后的大菱鲆中分别检测到相应病原。综上所述,本研究建立了杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的特异性 PCR 检测方法,该检测方法为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的流行病学调查和快速诊断提供了支撑。

**关键词** 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种; PCR; 检测

**中图分类号** S942.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0223-11

\* 国家重点研发计划(2019YFD0900103)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022021003)和国家自然科学基金-山东省人民政府联合基金(U1706205)共同资助。刘静静, Email: 1181264027@qq.com

① 通信作者: 李杰, 副研究员, Email: lijie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-08-01, 收修改稿日期: 2022-08-14

杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*),为兼性好氧或需氧革兰氏阴性菌(Najimi *et al*, 2008),主要分为 5 个亚种:杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)、史氏亚种(*A. salmonicida* subsp. *smithia*)、无色亚种(*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*)、杀日本鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *masoucida*)和溶果胶亚种(*A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*) (Pavan *et al*, 2000)。杀鲑气单胞菌在国内已报道可以感染多种养殖鱼类并引起疖疮病(张晓君等, 2006; 李绍戊等, 2015; 周冬仁等, 2015; 王晓冉等, 2017)。传统的杀鲑气单胞菌鉴定方法主要根据生理生化特征、菌株形态和培养特性等特征,这些方法繁琐耗时且易与其他病原菌发生交叉反应(Lee *et al*, 2002; Keeling *et al*, 2013)。16S rRNA 基因扩增已用于杀鲑气单胞菌的鉴定(del Cerro *et al*, 2002; Hiney *et al*, 1998; Miyata *et al*, 1996),其他常规 PCR (Byers *et al*, 2002)、多重 PCR (Altinok *et al*, 2008)、荧光定量 PCR (Fernández-Álvarez *et al*, 2016)、环介导等温扩增技术(LAMP) (Kulkarni *et al*, 2009)和免疫学技术(Adams *et al*, 1990)也有广泛报道,但这些方法只能鉴定属或种,无法鉴定到亚种。目前,仅有 2 篇关于杀鲑气单胞菌杀鲑亚种快速检测方法的报道,但根据最新的基因组信息数据,这些方法均具有一定的局限性。Miyata 等(1996)利用 PCR 方法建立了杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测方法,但加拿大分离的杀鲑亚种中缺少该方法的目标基因; Fernández-Álvarez 等(2016)建立了 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法检测杀鲑气单胞菌杀鲑亚种,灵敏度可达到 21 fg,但在部分杀日本鲑亚种基因组中也存在检测的目标基因。

基于上述原因,为建立杀鲑气单胞菌亚种的检测方法,本研究以实验室前期分离到的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种为研究对象,通过分析已公布的杀鲑气单胞菌基因组序列信息,选取 *phoB* 基因和 *LOC111476736* 基因设计特异性引物,建立杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的 PCR 检测方法,为杀鲑气单胞菌病原的快速检测和亚种区分提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株及培养条件

本实验用菌株见表 1,其中,杀鲑气单胞菌、鳃气单胞菌(*Aeromonas encheleia*)在 TSA 培养基 20 °C 培养,大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基 37 °C 培养,杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)、嗜水

气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等其他菌株在 TSA 培养基中 28 °C 培养。杀鲑气单胞菌标准菌株购自美国菌种保藏中心(ATCC),其他菌株由本实验室临床分离并鉴定。

### 1.2 提取细菌基因组 DNA

本实验使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根,中国)按照说明书步骤提取细菌基因组 DNA。

### 1.3 特异性引物设计和筛选反应条件

对 GenBank 中已公布的 48 株确定亚种的杀鲑气单胞菌基因组信息进行比较基因组学分析,筛选杀鲑气单胞菌亚种的特异性基因,并将特异性基因的序列与其他病原进行比较分析。根据分析结果,最终选择杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 *phoB* 基因和杀日本鲑亚种 *LOC111476736* 基因作为目标基因。利用 Primer-BLAST 设计特异性引物,并通过 BLAST 筛选,排除引物与其他微生物和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和褐鳟(*Salmo trutta*)等杀鲑气单胞菌敏感宿主基因组的非特异性结合,选取最适引物用于后期检测(表 2)。按照 KOD 酶(TOYOBO, 上海)说明书配制 25 μL PCR 体系: 2.5 μL 10×PCR buffer、0.75 μL 10 μmol/L 正/反向引物、1 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、0.5 μL 1 U/μL KOD 酶、1 μL DNA 模板、17 μL ddH<sub>2</sub>O,空白对照以 ddH<sub>2</sub>O 作为模板。引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 的 PCR 条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s,分别采用 52、54、56、58、60、62 和 64 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 15 s, 35 个循环; 68 °C 充分延伸 7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后测序验证。

### 1.4 PCR 体系的优化

为优化杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的 PCR 扩增条件,分别对反应体系中的 dNTPs 浓度、引物浓度、MgSO<sub>4</sub> 浓度和酶浓度进行优化,优化条件见表 3。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后比较产物的亮度差异。

### 1.5 PCR 的灵敏度检测

以平板计数法测定杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 和杀日本鲑亚种 ATCC27013 的菌液浓



表 1 本研究使用菌株  
Tab.1 Bacterial strains used in this study

种 Strain	编号 No.	宿主(来源) Host (Source)
杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	ATCC27013 ASM20200505RZ2L ASM20160705RZ6S ASM20181222LN1G	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i>
杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ASS20180101GZ ASS20200608XZ11L ATCC33658	鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i> 亚东鲑 <i>Salmo trutta fario</i> 大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>
杀鲑气单胞菌无色亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	ATCC33659	褐鳟 <i>Salmo trutta</i>
杀鲑气单胞菌史氏亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	ATCC49393	拟鲤 <i>Rutilus rutilus</i>
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	本实验室 This laboratory
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	AH20200705GX6L	鲟鱼 <i>Acipenser sinensis</i>
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	VH20200505RZ4L	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
哈氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	VH20171120ZGHYDX VH20210117QD2S	条纹斑竹鲨 <i>Chiloscyllium plagiosum</i> 绿鳍马面鲀 <i>Thamnaconus modestus</i>
鳗鱼气单胞菌 <i>Aeromonas encheleia</i>	AE20181222IN1K	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	PD20190927JS2L PD20191102HN	许氏平鲉 <i>Sebastes schlegelii</i> 海水样品 Sea water sample
<i>Vibrio salmonicida</i>	VS20180305RZ4S	硬头鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
海豚链球菌 <i>Streptococcus iniae</i>	SI20200705GX7L	鲟鱼 <i>Acipenser sinensis</i>
副乳房链球菌 <i>Streptococcus parauberis</i>	SP20191120LZ3Z	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SD20191105HN2K	豹纹鳃棘鲈 <i>Plectropomus leopardus</i>
杀鱼爱德华氏菌 <i>Edwardsiella piscicida</i>	ET20180101HLD1S	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	BS20180724QD5Y	海水样品 Sea water sample

表 2 本研究中所用引物  
Tab.2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	长度 Length /bp	亚种 Subspecies
<i>A. masoucida</i> F2	ATCCACAGCAGCCATCAATAGAGG	515	杀日本鲑亚种
<i>A. masoucida</i> R2	ACACAGAACAGAAGACGAACACAGT		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>
<i>A. salmonicida</i> F1	CGGTCATCGCGTTAAACGAT	522	杀鲑亚种
<i>A. salmonicida</i> R1	AGGCAACCGATCAAATCACTG		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>

表 3 PCR 体系的优化(25  $\mu$ L)

Tab.3 Optimization of PCR reaction system (25  $\mu$ L)

成分 Component	体积 Volume / $\mu$ L
2 mmol/L dNTPs	1.0, 2.0, 3.0, 4.0
25 mmol/L MgSO <sub>4</sub>	1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0
10 $\mu$ mol/L 引物 Primer	1.25、1.00、0.75、0.50
1 U/ $\mu$ L KOD 酶	0.25、0.50、0.75、1.00

度,用 PBS 将 ATCC33658 菌液梯度稀释至  $1.28 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^0$  CFU/ $\mu$ L, 将 ATCC27013 菌液梯度稀释至  $1.19 \times 10^5 \sim 1.19 \times 10^0$  CFU/ $\mu$ L, 分别取 1  $\mu$ L 稀释的菌液

用于 PCR 扩增并进行电泳检测。

使用 NanoDrop 2000 测定杀鲑气单胞菌的基因组 DNA 浓度, 用 ddH<sub>2</sub>O 将基因组梯度稀释至  $1.76 \times 10^3 \sim 1.76 \times 10^0$  fg/ $\mu$ L (ATCC33658) 和  $2.72 \times 10^3 \sim 2.72 \times 10^0$  fg/ $\mu$ L (ATCC27013)。每个稀释梯度的 DNA 溶液分别取 1  $\mu$ L 作为模板用于 PCR 扩增检测。

### 1.6 PCR 特异性检测

本实验所用细菌见表 1, 用 PBS 将过夜培养的细菌稀释至约  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 95  $^{\circ}$ C 加热 5 min, 取 1  $\mu$ L 作为模板, 以同样浓度的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种

ATCC33658 和杀日本鲑亚种 ATCC27013 菌体为阳性对照, 以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照, 利用引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 对 23 株菌进行 PCR 扩增, 并进行电泳检测, 确定 PCR 检测方法的特异性。

### 1.7 鱼体中的病原检测

大菱鲂购于莱阳某养殖场, 体重为 50~60 g, 实验前养殖于 100 L 循环海水养殖系统中, 水温为 18 °C。感染实验前随机取 5 尾鱼解剖, 取肝脏、脾脏和肾脏匀浆涂布于 TSA 培养基, 确定实验鱼未携带病原。将实验鱼随机分为 2 组, 每组 10 尾。利用 PBS 缓冲液将培养好的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ASS20200608XZ11L 和杀日本鲑亚种 ASM20160705RZ6S 菌液浓度调整至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。采用背部肌肉注射方法, 每尾大菱鲂注射 0.1 mL, 对照组注射 0.1 mL 的 PBS 缓冲液, 饲养于相同条件下。取 50 mg 发病鱼组织加入 PBS 研磨, 95 °C 加热 10 min, 取 1 μL 作为模板, ASS20200608XZ11L 和 ASM20160705RZ6S 菌体 DNA 为阳性对照。按照上述反应体系和程序进行 PCR。

## 2 结果

### 2.1 PCR 检测的最适反应条件

利用引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ATCC27013 进行 PCR, 测序结果显示, *A. salmonicida* F1/R1 引物扩增的片段为 522 bp, *A. masoucida* F2/R2 引物扩增的片段为 515 bp, 与预测结果一致, 且经比对后与 GenBank 中 *phoB*、*LOC111476736* 基因的序列完全一致。以引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 进行

PCR, 退火温度为 52~64 °C 时均能扩增出特异性条带 (图 1), 亮度无明显差异且无杂带。为保证特异性, 2 对引物均以 64 °C 作为退火温度。

### 2.2 PCR 检测最佳反应体系

为提高灵敏度, 对 25 μL PCR 体系进行优化, 结果表明, 以 *A. salmonicida* F1/R1 为引物的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 PCR 检测体系中, 2 mmol/L dNTPs 最适添加量为 2.0、3.0、4.0 μL (图 2a), 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 最适添加量为 1.5、2.0、2.5 μL (图 2b), 10 μmol/L 引物最适添加量为 1.5 μL (图 2c), 1 U/μL 酶最适添加量为 0.50、0.75 μL (图 2d)。因此, 后期引物 *A. salmonicida* F1/R1 采用的反应体系为 2.5 μL 10×PCR buffer、2 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1.5 μL 10 μmol/L 正/反向引物、0.5 μL 1 U/μL 酶、15.5 μL ddH<sub>2</sub>O、1 μL 模板。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s、64 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 15 s, 35 个循环; 68 °C 充分延伸 7 min。

以 *A. masoucida* F2/R2 为引物的杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 PCR 检测体系中, 2 mmol/L dNTPs 最适添加量为 1.0、2.0、3.0 μL (图 2e); 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 最适添加量为 1.5、2.0、2.5、3.0 μL (图 2f); 10 μmol/L 引物的添加量为 0.75、1.00、1.50 μL (图 2g); 1 U/μL 酶最适添加量为 0.50、0.75、1.00 μL (图 2h)。因此, 后期引物 *A. masoucida* F2/R2 采用的反应体系为 2.5 μL 10×PCR buffer、1 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、0.75 μL 10 μmol/L 正/反向引物、0.5 μL 1 U/μL 酶、17 μL ddH<sub>2</sub>O、1 μL 模板。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s、64 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 15 s, 35 个循环; 68 °C 充分延伸 7 min。

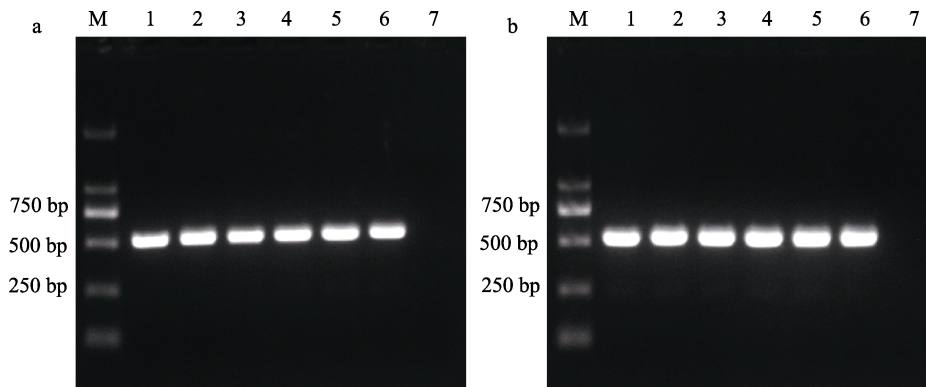


图1 引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a)和 *A. masoucida* F2/R2 (b)退火温度筛选

Fig.1 Screening annealing temperature of primers *A. salmonicida* F1/R1 (a) and *A. masoucida* F2/R2 (b)

M: DL 2000 marker; 1~6: 退火温度为 52、54、56、58、60、62、64 °C; 7: 空白对照。

M: DL 2000 marker; 1~6: Annealing temperature of 52, 54, 56, 58, 60, 62, and 64 °C; 7: Negative control.

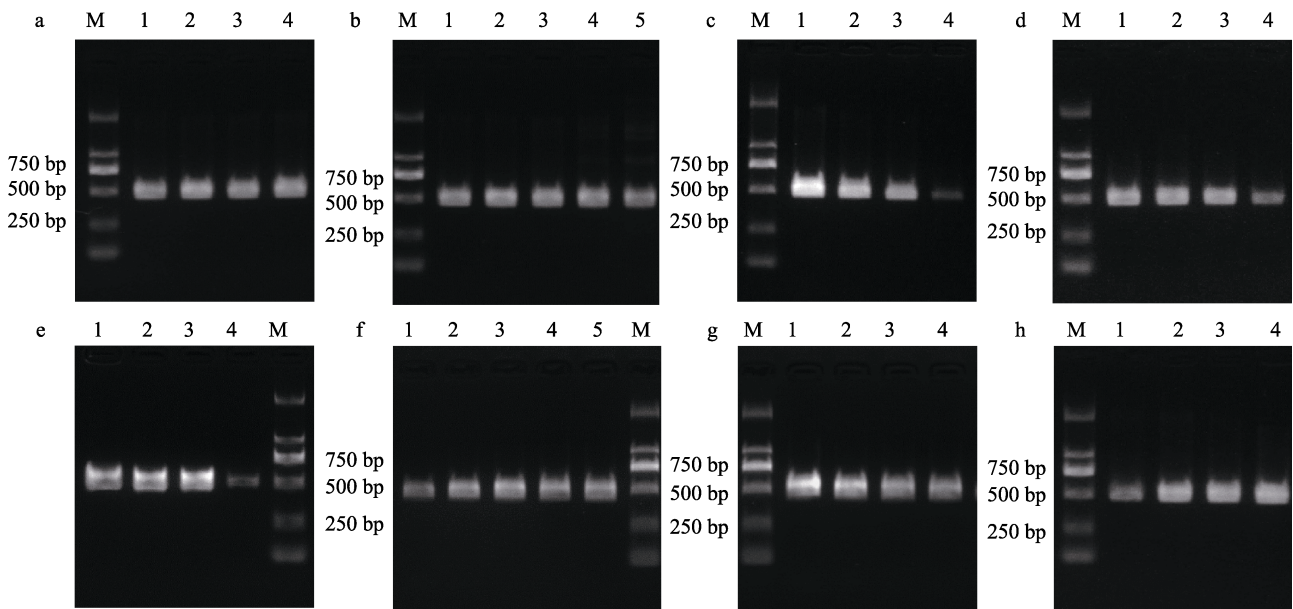


图 2 引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a、b、c、d)和 *A. masoucida* F2/R2 (e、f、g、h) PCR 体系优化

Fig.2 PCR system optimization of primers *A. salmonicida* F1/R1 (a, b, c, d) and *A. masoucida* F2/R2 (e, f, g, h)

a, e: 2 mmol/L dNTPs, 1~4: 1, 2, 3, 4  $\mu$ L; b, f: 25 mmol/L  $MgSO_4$ , 1~5: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0  $\mu$ L; c, g: 10  $\mu$ mol/L primer, 1~4: 1.50, 1.00, 0.75, 0.50  $\mu$ L; d, h: 1 U/ $\mu$ L KOD, 1~4: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00  $\mu$ L. M: DL 2000 marker.

### 2.3 PCR 检测灵敏度

以杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 梯度稀释的菌液为模板, 菌液浓度为  $1.28 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^1$  CFU/ $\mu$ L 时均可扩增出目的条带, 但当菌液浓度为 1.28 CFU/ $\mu$ L 时未扩增到目的条带, 因此, 本方法针对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测灵敏度为 12.8 CFU/反应(图 3a)。以 DNA 为模板, 当浓度为 1.76 fg 时未扩增到目的条带, 其他浓度均可检测到条带。因此, *A. salmonicida* F1/R1 引物的 PCR 检测方法检出下限为 17.6 fg/反应(图 3b)。

以杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ATCC27013 梯度稀释的菌液为模板, 菌液浓度为  $1.19 \times 10^5 \sim 2.38 \times 10^1$  CFU/ $\mu$ L 时均可扩增出目的条带, 但当菌液浓度低至  $1.19 \times 10^1$  CFU/ $\mu$ L 时未扩增出目的条带, 因此, 本方法针对杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种的检测灵敏度为 23.8 CFU/反应(图 3c)。以 DNA 为模板, 当浓度为 2.72 fg 时未扩增到目的条带, 其他浓度均可检测到条带。因此, *A. masoucida* F2/R2 引物的 PCR 检测检出下限为 27.2 fg/反应(图 3d)。

### 2.4 PCR 特异性检测

选取表 1 中的 23 株菌, 包括 4 株杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种、3 株杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和 14 种其他菌属细菌, 检测引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 的特异性, 以 *A. salmonicida*

F1/R1 为引物进行 PCR 时, 仅在杀鲑气单胞菌杀鲑亚种中扩增出特异性目的条带(图 4a)。以 *A. masoucida* F2/R2 为引物进行 PCR 时, 仅杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种扩增出特异性目的条带(图 4b), 2 对引物从其他细菌的 DNA 中未扩增出预期 DNA 条带。因此, 本研究设计的 2 对引物能够特异性地检测杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种。

### 2.5 病鱼组织检测

以杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ASS20200608XZ11L 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ASM20160705RZ6S 肌肉注射感染大菱鲆, 7 d 内大菱鲆全部死亡。组织检测结果显示, *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 均能检测到病鱼组织中的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种或杀日本鲑亚种, 而在健康鱼组织中未扩增出预期条带(图 5), 表明引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 可以从发病的鱼中检测到杀鲑气单胞菌病原。

## 3 讨论

杀鲑气单胞菌是水产养殖过程中最为常见的病原菌之一, 最早在欧洲的鲑鳟类发现, 严重影响了鲑鳟类的养殖健康。近年来, 杀鲑气单胞菌的感染病例越来越多, 威胁多种海、淡水养殖鱼类。目前, 杀鲑气单胞菌病原的鉴定和亚种区分主要依靠病原培养、生理生化检测和管家基因分析, 如 Long 等(2020)运



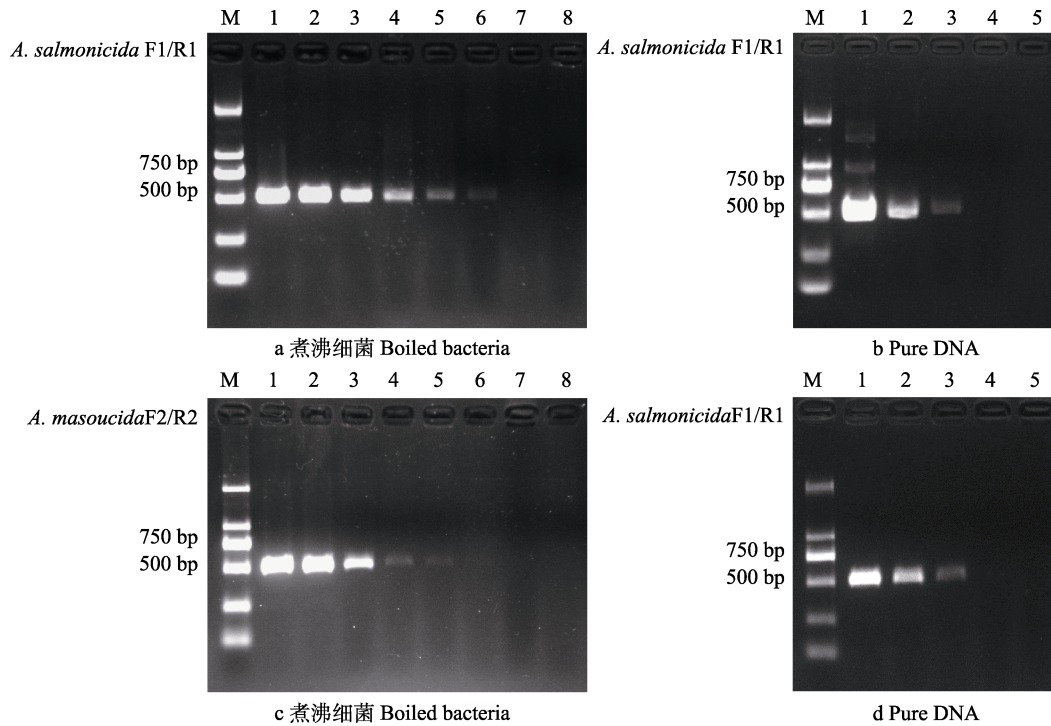


图3 以细菌(a、c)和DNA(b、d)为模板进行PCR灵敏度检测

Fig.3 PCR sensitivity detection using bacteria (a, c) and DNA (b, d) as templates

a: 1~7: 使用引物 *A. salmonicida* F1/R1, 每反应以  $1.28 \times 10^5$ 、 $1.28 \times 10^4$ 、 $1.28 \times 10^3$ 、 $1.28 \times 10^2$ 、 $0.256 \times 10^2$ 、 $1.28 \times 10^1$  和  $1.28 \times 10^0$  CFU 的 ATCC33658 菌体为模板进行 PCR; 8: 空白对照。b: 1~4: 使用引物 *A. salmonicida* F1/R1, 每反应以  $1.76 \times 10^3$ 、 $1.76 \times 10^2$ 、 $1.76 \times 10^1$ 、 $1.76 \times 10^0$  fg 的 ATCC33658 基因组 DNA 为模板进行 PCR; 5: 空白对照。c: 1~7: 使用引物 *A. masoucida* F2/R2, 每反应以  $1.19 \times 10^5$ 、 $1.19 \times 10^4$ 、 $1.19 \times 10^3$ 、 $1.19 \times 10^2$ 、 $0.238 \times 10^2$ 、 $1.19 \times 10^1$  和  $1.19 \times 10^0$  CFU 煮沸细菌 ATCC27013 为模板进行 PCR; 8: 空白对照。d: 1~4: 使用引物 *A. masoucida* F2/R2, 每反应以  $2.72 \times 10^3$ 、 $2.72 \times 10^2$ 、 $2.72 \times 10^1$ 、 $2.72 \times 10^0$  fg 的 ATCC27013 基因组 DNA 为模板进行 PCR; 5: 空白对照。M: DL2000 marker。

a: 1~7: Using primers *A. salmonicida* F1/R1 and  $1.28 \times 10^5$ ,  $1.28 \times 10^4$ ,  $1.28 \times 10^3$ ,  $1.28 \times 10^2$ ,  $0.256 \times 10^2$ ,  $1.28 \times 10^1$  and  $1.28 \times 10^0$  CFU boiled bacteria ATCC33658 as template for each PCR; 8: Negative control. b: 1~4: Using primer *A. salmonicida* F1/R1 and  $1.76 \times 10^3$ ,  $1.76 \times 10^2$ ,  $1.76 \times 10^1$ , and  $1.76 \times 10^0$  fg of ATCC33658 genomic DNA as the template for each PCR; 5: Negative control. c: Using primers *A. masoucida* F2/R2 and  $1.19 \times 10^5$ ,  $1.19 \times 10^4$ ,  $1.19 \times 10^3$ ,  $1.19 \times 10^2$ ,  $0.238 \times 10^2$ ,  $1.19 \times 10^1$  and  $1.19 \times 10^0$  CFU boiled bacteria ATCC27013 as template for each PCR; 8: Negative control. d: 1~4: Using primers *A. masoucida* F2/R2 and  $2.72 \times 10^3$ ,  $2.72 \times 10^2$ ,  $2.72 \times 10^1$  and  $2.72 \times 10^0$  fg of ATCC27013 genomic DNA as templates for each PCR; 5: Negative control. M: DL2000 marker.

用生理生化检测、6个管家基因和16S rRNA系统发育分析等方法, 鉴定了圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)中感染的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 刘宁等(2015)利用生化鉴定和16S rRNA序列分析等方法鉴定了细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)中感染的杀鲑气单胞菌无色亚种; 我国的国家标准(GB/T 15805.6-2008)也采用了生理生化特征为检测指标, 作为鉴定杀鲑气单胞菌和区分亚种的标准。但生理生化实验需要经过微生物纯化和培养过程, 用时长, 且部分新发现的临床菌株生理生化反应并不完全符合亚种鉴定标准, 给鉴定带来了一定的困难。16S rRNA测序是细菌鉴定和系统发育研究的最有力方法(李志刚等, 2001), 对区分大多数气单胞菌的分类具有重要参考价值(Martinez-Murcia

*et al*, 1992), 但测序会增加病原检测和鉴定的周期, 且无法区分杀鲑气单胞菌亚种。

在杀鲑气单胞菌的快速检测方面, PCR技术已经得到了广泛应用, 如常规PCR(Beaz-Hidalgo *et al*, 2008)、多重PCR(Onuk *et al*, 2010)、实时荧光定量PCR(Bartkova *et al*, 2017; 刘帅等, 2017)等。其中, *vapA*基因编码A层蛋白(A-layer protein)是杀鲑气单胞菌的重要毒力蛋白, *vapA*基因也是杀鲑气单胞菌鉴定和分型的重要分子标记(Lago *et al*, 2012)。通过对*vapA*基因序列的进化发育分析, 可以将杀鲑气单胞菌分为14个亚型以及缺乏*vapA*基因的溶果胶亚种(Gulla *et al*, 2019)。Gustafson等(1992)建立了基于*vapA*基因的杀鲑气单胞菌PCR检测方法, 检测下限

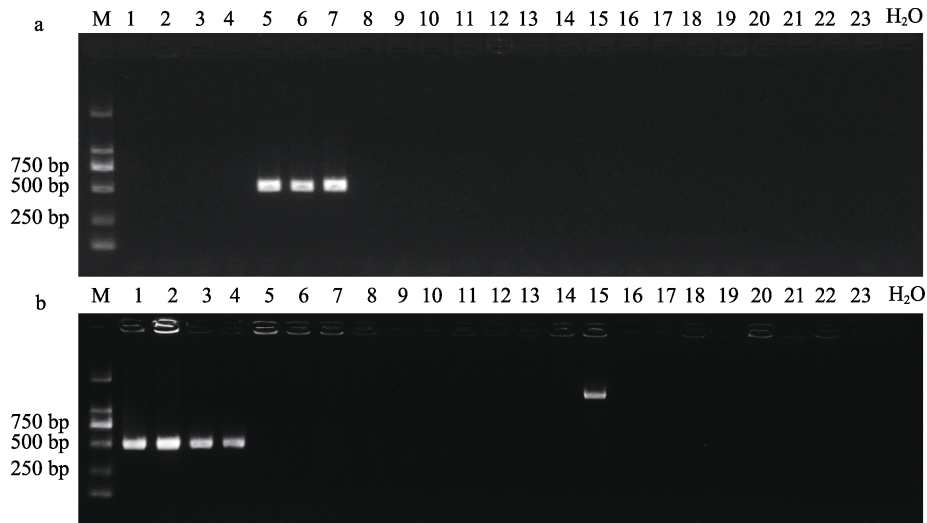


图 4 PCR 检测引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a)和 *A. masoucida* F2/R2 (b)的特异性  
Fig.4 Specificity of PCR detection with primers *A. salmonicida* F1/R1 (a) or *A. masoucida* F2/R2 (b)

M: DL 2000 marker; 1~4: 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种; 5~7: 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 8: 杀鲑气单胞菌无色亚种; 9: 杀鲑气单胞菌史氏亚种; 10: 大肠杆菌; 11: 嗜水气单胞菌; 12: 鳗弧菌; 13~14: 哈氏弧菌; 15: 鳗鱼气单胞菌; 16: 美人鱼发光杆菌; 17: 美人鱼发光杆菌; 18: 杀鲑弧菌; 19: 海豚链球菌; 20: 副乳房链球菌; 21: 停乳链球菌; 22: 杀鱼爱德华氏菌; 23: 芽孢杆菌; 24: 空白对照。

M: DL 2000 marker; 1~4: *A. salmonicida* subsp. *masoucida*; 5~7: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; 8: *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; 9: *A. salmonicida* subsp. *smithia*; 10: *E. coli*; 11: *A. hydrophila*; 12: *V. anguillarum*; 13~14: *V. harveyi*; 15: *A. encheleia*; 16: *P. damsela*; 17: *P. damsela*; 18: *V. salmonicida*; 19: *S. iniae*; 20: *S. parauberis*; 21: *S. dysgalactiae*; 22: *E. piscicida*; 23: *Bacillus* sp.; 24: Blank control.

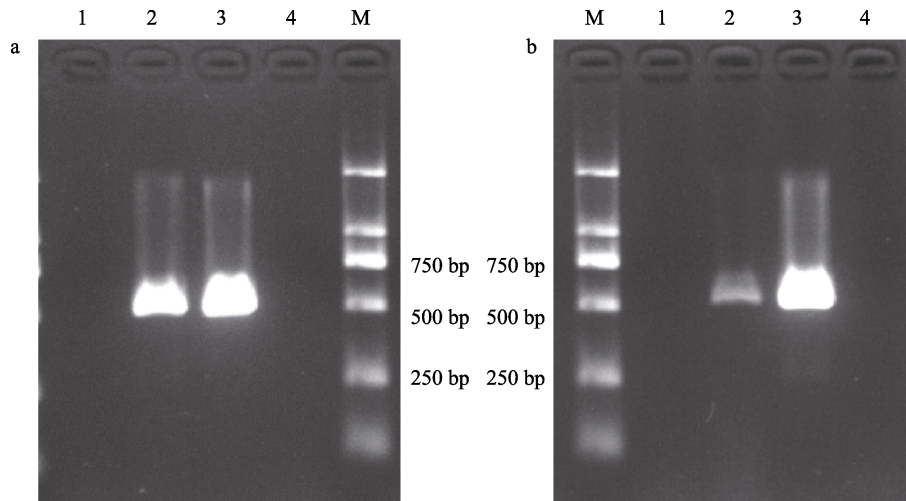


图 5 以发病大菱鲃组织为模板进行 PCR  
Fig.5 PCR with infected turbot tissue as template

a: 引物为 *A. salmonicida* F1/R1 进行的 PCR; b: 引物为 *A. masoucida* F2/R2 进行的 PCR;  
1: 健康鱼组织液; 2: 病死鱼组织液; 3: 阳性对照; 4: 空白对照; M: DL 2000 marker。

a: PCR with primer *A. salmonicida* F1/R1; b: PCR with primer *A. masoucida* F2/R2;  
1: Healthy fish tissue fluid; 2: Infected fish tissue fluid; 3: Positive control; 4: Blank control; M: DL 2000 marker.

为 5 fg。我国出入境检验检疫行业标准(SN/T 2095-2010)也以 *vapA* 基因为靶点进行 PCR 检测来鉴定杀鲑气单胞菌。但目前大多数杀鲑气单胞菌的特异性 PCR 检测方法只能检测到种,无法确定亚种,亚种鉴

定还需要依靠生理生化分析和基因序列进化分析。

不同的杀鲑气单胞菌亚种在毒力、宿主偏好性和疫苗交叉免疫等方面均有差异,因此,确定其亚种对于疾病的诊断、治疗和预防具有重要意义。目前,杀



鲑气单胞菌亚种的快速检测方法非常少,只有 2 种针对杀鲑亚种的检测(Miyata *et al*, 1996; Fernández-Álvarez *et al*, 2016),但随着更多的菌株基因组测序,通过 GenBank 中最新的基因组序列信息分析发现,这 2 种方法在检测中均存在一定的不足,可能漏检某些地理区域的临床株,或发生非特异性扩增。本研究针对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 *phoB* 基因和杀日本鲑亚种 LOC111476736 基因设计了引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2,可以特异性地检测杀鲑气单胞菌的杀鲑亚种和杀日本鲑亚种。经过反应体系优化,该方法检测灵敏度在 DNA 水平上分别达到 17.6 和 27.2 fg,在细胞水平达到 12.8 和 23.8 CFU/反应,与 Høie 等(1997)以质粒序列为靶基因建立的 PCR 检测方法的检测灵敏度相当,具有较高的检测灵敏度。同时,本方法以 23 株水产常见的其他病原菌和环境菌株进行了特异性检测,结果显示,只有杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种检测到特异性条带,其他细菌中无特异性条带,说明该检测方法具有较高的特异性。本方法也可以从人工感染发病鱼的组织中检测到杀鲑气单胞菌的 2 个亚种,具有较好的产业应用性。综上所述,本研究建立的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的特异性检测方法具有较高的灵敏度和特异性,且应用方便,可作为流行病学调查和疾病快速诊断的一个重要依据。

## 参 考 文 献

- ADAMS A, THOMPSON K. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, 2(4): 281–288
- ALTINOK I, CAPKIN E, KAYIS S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(3/4): 332–338
- BARTKOVA S, KOKOTOVIC B, SKALL H F, *et al*. Detection and quantification of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(2): 231–242
- BEAZ-HIDALGO R, MAGI G E, BALBOA S, *et al*. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology*, 2008, 128(3/4): 386–394
- BYERS H, GUDKOV N, CRANE M. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets for detection and identification. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 49(2): 129–138
- DEL CERRO A, MARQUEZ I, GUIJARRO J A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5177–5180
- FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ C, GONZÁLEZ S F, SANTOS Y. Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(24): 10585–10595
- GULLA S, BAYLISS S, BJÖRNSDÓTTIR B, *et al*. Biogeography of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* inferred by *vapA* genotyping. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(7): 1–7
- GUSTAFSON C E, THOMAS C J, TRUST T J. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 3816–3825
- HINEY M P, SMITH P R. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: Framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture*, 1998, 162(1/2): 41–68
- HØIE S, HEUM M, THORESEN O F. Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Aeromonas salmonicida* ss *salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, 30(1): 27–35
- KEELING S, BROSNAHAN C, JOHNSTON C, *et al*. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(5): 495–503
- KULKARNI A, CAIPANG C M, BRINCHMANN M F, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification-An assay for the detection of atypical furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2009, 17(4): 476–489
- LAGO E P, NIETO T P, FARTO R. Virulence factors of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 99(2): 145–151
- LEE C, CHO J C, LEE S H, *et al*. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(6): 976–985
- LI S W, WANG D, LIAN H M, *et al*. Isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 234–240 [李绍戊, 王荻, 连浩森, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和致病性研究. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 234–240]
- LI Z G, YANG G P, ZHU Y H. The relationship between

- polymorphism of bacterial 16S rDNA restriction fragment length and community structure of aquatic bacteria. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(2): 111–115 [李志刚, 杨官品, 朱艳红. 水环境细菌 16S rDNA 限制性片段长度多型性及群落结构分析. *水生物学报*, 2001, 25(2): 111–115]
- LIU N, SHI X, DU Y C, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* from diseased *Brachymystax lenok*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 88–92 [刘宁, 时晓, 杜迎春, 等. 患病细鳞鱼杀鲑气单胞菌的分离与鉴定. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 88–92]
- LIU S, LU T Y, WANG D, *et al.* Establishment and application of SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Aeromonas salmonicida*. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(7): 2884–2891 [刘帅, 卢彤岩, 王荻, 等. 杀鲑气单胞菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(7): 2884–2891]
- LONG M, LI T T, JIANG Y, *et al.* Isolation and characterization of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) cage-cultured in the upper reaches of Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 153–161
- MARTINEZ-MURCIA A J, BENLLOCH S, COLLINS M D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42(3): 412–421
- MIYATA A, INGLIS V, AOKI T. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 1996, 141(1/2): 13–24
- NAJIMI M, LEMOS M L, OSORIO C R. Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2341–2348
- ONUKE E E, CIFTCI A, FINDIK A, *et al.* Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in culture fisheries. *Journal of Veterinary Science*, 2010, 11(3): 235–241
- PAVAN M E, ABBOTT S L, ZORZOPULOS J, *et al.* *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(3): 1119–1124
- WANG X R, CHEN S Q, MO Z L, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* associated with furunculosis in cultured sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 25–31 [王晓冉, 陈四清, 莫照兰, 等. 养殖裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)疥疮病原菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 25–31]
- ZANG X J, FANG H, CHEN C Z, *et al.* Biological characterization and phylogenetic analysis of pathogenic new subspecies of *Aeromonas salmonicida* isolated from stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 917–923 [张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 杀鲑气单胞菌一新亚种的生物学特性及系统发育学分析. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 917–923]
- ZHOU D R, LUO Y Z, HANG X Y *et al.* Isolation and identification of pathogens *Aeromonas salmonicida* subsp. from northern snakehead (*Ophicephalus argus*). *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 64–70 [周冬仁, 罗毅志, 杭小英, 等. 1 株乌鳢源杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的分离与鉴定. *海洋湖沼通报*, 2015(3): 64–70]

(编辑 马瑰艳)

## Development of a PCR Method to Detect the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*

LIU Jingjing<sup>1,2</sup>, LI Guiyang<sup>1</sup>, JIN Huaiyuan<sup>1,3</sup>, GAO Ye<sup>1</sup>, WANG Huilin<sup>1,3</sup>, LI Jie<sup>1,3</sup>①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract** *Aeromonas salmonicida* is an important pathogen that can infect a variety of marine and freshwater fish. There are five subspecies of *Aeromonas salmonicida*: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, and *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*. Traditionally, the detection of *A. salmonicida* has been based on 16S rRNA sequencing and physiological and biochemical characterization, but it is difficult to identify the subspecies using these methods. Outer membrane protein (A-layer protein, VapA), which is encoded by the *vapA* gene and regulated by the *luxS* gene, is an important secretion protein of *A. salmonicida*. It is involved in bacterial self-agglutination induction, macrophage phagocytosis resistance, and provides protection against chemicals such as antibiotics and disinfectants. In addition, the *vapA* gene is also an effective molecular marker for the identification of *A. salmonicida* subspecies, however, gene sequencing and phylogenetic analysis are required for subspecies determination. To establish an accurate and sensitive rapid detection of *A. salmonicida* subspecies, in this study we tried to establish a specific PCR method for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and *A. salmonicida* subsp. *masoucida* identification. Based on genome analysis, the *phoB* and *LOC111476736* genes were used as molecular markers for PCR amplification with specific primers designed according to the sequences in the GenBank database. The target gene was amplified using the genomic DNA of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, and the method was optimized to improve the efficiency and accuracy of distinguishing these two subspecies from other pathogens in aquaculture. First, the annealing temperature, primer concentration, dNTPs concentration, Mg<sup>2+</sup> concentration, and enzyme dosage of the PCR system were optimized to improve the sensitivity of the detection method. The results showed that the primers could amplify the *phoB* gene fragment of 522 bp and the *LOC111476736* gene fragment of 515 bp. The optimal annealing temperature of specific primers for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was 64 °C, and the optimal volume of 10 μmol/L primers, 2 mmol/L dNTPs, 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, and 1 U/μL enzyme were 1.5 μL, 2.0 μL, 1.5 μL, and 0.5 μL (25 μL reaction system), respectively. The optimum annealing temperature of specific primers for *A. salmonicida* subsp. *masoucida* was 64 °C, and the optimum volume of 10 μmol/L primers, 2 mmol/L dNTPs, 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, and 1 U/μL enzyme were 0.75 μL, 1.00 μL, 1.50 μL, and 0.50 μL (25 μL reaction system), respectively. The sensitivity of the detection method was determined using a gradient diluted *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658 bacterin as the template, and the target band could not be amplified when the bacterin concentration was lower than 12.8 CFU/reaction. The detection limit of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* based on the *phoB* gene sequence established in this study was 12.8 CFU/reaction. With DNA as the template, when the concentration of the

① Corresponding author: LI Jie, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

DNA template was lower than 17.6 fg/reaction, the target band could not be amplified. Thus, the detection limit of specific primers based on the *phoB* gene sequence for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was 17.6 fg/reaction. When the gradient dilution of *A. salmonicida* subsp. *masoucida* ATCC27013 bacterin was used as the template, the target band could not be amplified when the bacterin concentration was lower than 23.8 CFU/reaction. Thus, the detection limit of the method for *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, based on the *LOC111476736* gene sequence was 23.8 CFU/reaction. With DNA of ATCC27013 as the template, when the concentration of the DNA template was lower than 27.2 fg/reaction, the target band could not be amplified. Thus, in this study, the detection limit of DNA for *A. salmonicida* subsp. *masoucida* using specific primers designed according to the *LOC111476736* gene sequence was 27.2 fg/reaction. The specificity of the detection method using specific primers based on the *phoB* and *LOC111476736* genes was also determined in this study. Aquaculture pathogens or environmental bacteria, such as *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Edwardsiella piscicida*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas encheleia*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Bacillus subtilis*, were used as templates for specificity testing. No specific products were found for any of the other pathogens tested. The specific PCR products could only be amplified from the bacterins of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida*. We also tested the application of detection methods using an experimentally infected turbot as a model. Turbot was infected with *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain ASS20200608XZ11L or *A. salmonicida* subsp. *masoucida* strain ASM20160705RZ6S by intramuscular injection. All turbot died within 7 days post-infection, and the liver, spleen, and kidney of moribund fish were used as templates. The results showed that the established method could accurately detect *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida* in the turbot, without nonspecific amplification in the tissues of the healthy turbot. In conclusion, we established a specific PCR method to detect two subspecies of *A. salmonicida*, and these methods could be used as effective tools for investigating the epidemiology of *A. salmonicida*.

**Key words** *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*; *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*; PCR; Detection

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220303002

http://www.yykxjz.cn/

贾俊琦, 张悦, 廖月琴, 林慧敏. 2种乌贼肌肉的营养成分及品质评价. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 234-243  
JIA J Q, ZHANG Y, LIAO Y Q, LIN H M. Evaluation of the nutritional composition and quality of muscles in two cuttlefish species. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 234-243

## 2种乌贼肌肉的营养成分及品质评价\*

贾俊琦 张悦 廖月琴 林慧敏<sup>①</sup>

(浙江海洋大学食品与药学院 浙江 舟山 316022)

**摘要** 为了探究2种乌贼肌肉营养成分及品质差异,评价其营养价值,本研究对浙江舟山地区捕获量较大的日本无针乌贼(*Sepiella japonica*)和金乌贼(*Sepia esculenta*)的常规营养成分、质构特性、蒸煮损失率、甲醛含量、氨基酸和脂肪酸组成及矿物元素进行了分析。结果显示,日本无针乌贼肌肉的粗蛋白、粗脂肪含量与金乌贼相比无显著差异( $P>0.05$ ),水分含量显著低于金乌贼( $P<0.05$ ),粗灰分含量显著高于金乌贼( $P<0.05$ )。金乌贼肌肉的硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性和内聚性均显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ )。2种乌贼肌肉的甲醛含量分别为0.56和1.18 mg/kg,均符合国家卫生标准。氨基酸测定结果显示,2种乌贼的肌肉中均检测出17种水解氨基酸,第一限制性氨基酸均为色氨酸;其中,必需氨基酸占总氨基酸的比例均高于31%,金乌贼与FAO/WHO推荐的理想蛋白模式更接近,其必需氨基酸指数(EAAI)高达82.99。脂肪酸测定结果显示,2种乌贼的肌肉中均检测出20种脂肪酸;其中,C20:5n-3(EPA)和C22:6n-3(DHA)的总含量均高于40%,且日本无针乌贼显著高于金乌贼( $P<0.05$ )。2种乌贼肌肉富含人体所需的多种无机元素,常量元素中K和P含量最高,微量元素中Zn和I含量最高。研究表明,2种乌贼肌肉的营养成分及品质存在一定的差异,但均属于优质的低脂蛋白,具有较好的开发利用价值。本研究为开发利用东海头足类海洋资源提供了一定的依据和参考。

**关键词** 乌贼;营养成分;氨基酸;脂肪酸;品质评价

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0234-10

乌贼(Cuttlefish)又名墨鱼、乌鱼,属软体动物门(Mollusca),分布于我国渤海、黄海、东海、南海、日本列岛以及菲律宾群岛海域,产量极高,被列为“四大海产”之一(张涛等,2018)。根据中国渔业统计年鉴(2021),2020年中国头足类的捕捞量达56.49万t。研究发现,头足类动物具有繁殖能力强、能快速适应新的栖息地并适应气候变化的特点。与许多鱼类种群相比,所有头足类动物种群产量逐年升高,且在过去60年中一直呈上升趋势(Doubleday *et al*, 2016)。日本无针乌贼(*Sepiella japonica*)别名曼氏无针乌贼

(*Sepiella maindroni*)(王鹏帅等,2016),又称墨鱼、血墨,广泛分布在我国浙江和福建沿海,为东海“四大海产”之一,其肉质鲜美、营养价值高,深受广大消费者喜爱。金乌贼(*Sepia esculenta*)又称乌鱼、针墨鱼,广泛分布于日本沿海、南海及东海海域,具有生长发育快、生命周期短等优点,曾为中国四大海洋渔业的捕捞对象之一,是我国北方渔业中重要的经济头足类(郝振林等,2007)。

迄今为止,许多学者对乌贼肌肉的营养成分进行了研究(宋超霞等,2009;蒋霞敏等,2012;曹子豪等,

\* 国家重点研发计划资助(2020YFD0900900)和浙江省“万人计划”科技创新人才培养项目(2020R52027)共同资助。

贾俊琦, E-mail: jiajunqi233@163.com

① 通信作者: 林慧敏, 教授, E-mail: linhuixiaomin@126.com

收稿日期: 2022-03-03, 收修改稿日期: 2022-04-05



2015; 刘长琳等, 2016), 但对乌贼的品质差异鲜见报道。同时, 人们生活水平日渐提高, 对食物的要求也越来越高, 红肉中含有大量的饱和脂肪酸、胆固醇和脂肪等, 长期食用会增加患心血管疾病和结肠癌的风险(McAfee *et al*, 2010)。头足类属于低脂、高蛋白的水产品, 比禽畜肉更易消化吸收, 广受消费者欢迎。因此, 消费者对其肌肉品质的要求越来越高, 乌贼肌肉的品质成为影响其产品价值的重要因素。本研究主要对浙江舟山捕获量较高的 2 种乌贼肌肉的营养成分及品质评价比较, 分析 2 种乌贼的营养价值, 为消费者提供一定的参考, 同时, 为 2 种乌贼开发低脂产品和精深利用加工提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用日本无针乌贼和金乌贼均购于浙江舟山国际水产城, 其中, 日本无针乌贼样品平均胴体长为(104.00±0.24) mm, 平均体重为(134.00±0.11) g; 金乌贼样品平均胴体长为(162.00±0.17) mm, 平均体重为(356.00±0.09) g。每个样本设 3 个平行测定, 取其胴体肌肉-80 °C 冷冻后备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 常规营养成分的测定** 水分含量的测定采用 105 °C 烘干恒重法(GB/T 5009.3-2016); 粗蛋白含量采用凯氏定氮仪(KDN816, 上海)参照(GB 5009.5-2016)《食品中蛋白质的测定》(第一法)凯氏定氮法测定; 粗脂肪含量采用粗脂肪测定仪(SZF-06A, 上海)参照(GB/T 5009.6-2016)酸水解法测定; 粗灰分含量的测定采用链式电阻炉 550 °C 灼烧法(GB/T 5009.4-2016)。

**1.2.2 质构特性测定** 取乌贼胴体中心部位的肌肉, 切成 1 cm×1 cm×1 cm 的方块, 采用质构分析(texture profile analysis, TPA)模型进行测定: 测探头型号为 P/50, 测试前、中、后速度均为 60 mm/min, 压缩程度为 30%, 压缩时间间隔 5 s, 测定乌贼肌肉的硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性和内聚性。

**1.2.3 蒸煮损失测定** 将乌贼肌肉切成 1 cm×1 cm×1 cm 的方块, 吸干表面水分称重, 然后放入聚乙烯塑料袋, 浸入 85 °C 水浴中 20 min, 取出冷却 5 min, 吸干表面水分称重, 蒸煮损失率按以下公式计算:

$$\text{蒸煮损失率}/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $m_1$  为蒸煮前乌贼肌肉质量(g);  $m_2$  为蒸煮后乌贼肌肉质量(g)。

**1.2.4 甲醛(FA)的测定** FA 的测定参考(SC/T 3025-2006)《水产品中甲醛的测定》中高效液相色谱法。取 5 g 样品, 加水混匀, 置于 40 °C 恒温振荡箱中 2 h, 取出后冷却至室温过滤, 取 5 mL 滤液加入 2,4-二硝基苯肼(2 mL)、乙腈(3 mL), 混匀后 60 °C 加热 20 min, 冷却后过滤, 利用液相色谱仪(Agilent 1260, 上海)测定。

**1.2.5 氨基酸测定** 氨基酸含量参考 GB/T 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》, 取适量样品加入 6 mol/L HCl 溶液(10 mL), 冷冻后 5 min 后充氮封管, 置于 110 °C 的烘箱中水解 22 h, 减压蒸干, 采用 1.0 mL pH=2.2 的柠檬酸钠缓冲溶液复溶, 利用氨基酸自动分析仪(LA8080, 上海)测定; 另一样品用 4.3 mol/L NaOH 水解, 利用液相色谱仪(Agilent 1260, 上海)测定。

**1.2.6 牛磺酸测定方法** 取 5 g 样品加入 40 mL 温水, 超声提取 10 min, 加入 500 μL  $K_4Fe(CN)_6$ 、 $(CH_3COO)_2Zn$  溶液, 混匀定容至 50 mL, 离心 10 min (6 000 r/min), 取 1 mL 上清液, 加入 1 mL  $Na_2CO_3$  缓冲液、1 mL 丹磺酰氯溶液, 充分混合, 避光衍生 2 h (1 h 后需摇晃 1 次), 加入 0.1 mL 盐酸甲胺溶液涡旋混匀, 终止反应, 避光静置至沉淀完全。取上清液过滤膜(0.45 μm)后上机待测。

**1.2.7 脂肪酸测定** 脂肪酸含量采用(GB 5009.168-2016)酸水解法提取脂肪, 经过皂化甲酯化利用气相色谱仪(Agilent 7890A, 上海)测定。

**1.2.8 矿物质元素测定** 矿物质元素参考 GB 5009.268-2016, 称取适量样品置于消解罐中, 加入 5 mL 硝酸, 静置直至反应结束, 密封后放入微波消解仪, 冷却后在通风橱中用超纯水润洗, 转移至容量瓶中, 使用超纯水稀释定容, 微量元素使用电感耦合等离子体质谱仪(Thermo iCAPQ, ICP-MS, 美国)测定, 常量元素使用电感耦合等离子光谱仪(Perkin Elmer optima 8000, ICP-OES, 美国)测定。

**1.2.9 营养价值评定方法** 根据 1973 年联合国粮农组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)提出的理想蛋白质必需氨基酸评分模式和全鸡蛋蛋白质氨基酸模式, 按公式(2)~(4)分别计算出各乌贼的化学评分(CS)、氨基酸评分(AAS)和必需氨基酸指数(EAAI)。参照周建设等(2020)的方法, 根据公式(5)~(6)计算动脉粥样硬化指数(IA)和血栓形成指数(IT), 评估 2 种乌贼肌肉脂肪酸对人类心血管疾病发生的影响程度。

氨基酸评价模式如下:

$$CS = \frac{aa}{AA(\text{Egg})} \quad (2)$$

$$AAS = \frac{aa}{AA \left( \frac{FAO}{WHO} \right)} \quad (3)$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{A_E} \times \frac{100B}{B_E} \times \frac{100C}{C_E} \times \dots \times \frac{100H}{H_E}} \quad (4)$$

式中, aa 为乌贼氨基酸含量(mg/g), AA(Egg)为全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/g), AA(FAO/WHO)为评分标准模式中同种氨基酸含量(mg/g),  $n$  为比较的必需氨基酸个数,  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $\dots$ 、 $H$  为乌贼肌肉每克蛋白质各种必需氨基酸含量(mg/g),  $A_E$ 、 $B_E$ 、 $C_E$ 、 $\dots$ 、 $H_E$  为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(mg/g)。

脂肪酸评价模型如下:

$$IA = (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / (\Sigma MUFA + \Sigma PUFA) \quad (5)$$

$$IT = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / \left[ 0.5 \times \Sigma MUFA + 0.5 \times \left[ \Sigma PUFA(n-6) + 3 \times \Sigma PUFA(n-3) + \left( \frac{\Sigma PUFA(n-6)}{\Sigma PUFA(n-3)} \right) \right] \right] \quad (6)$$

式中, C12:0 为十二烷酸, C14:0 为十四烷酸, C16:0 为十六烷酸, C18:0 为十八烷酸,  $\Sigma MUFA$  为总单不饱和脂肪酸,  $\Sigma PUFA$  为总多不饱和脂肪酸,  $\Sigma PUFA(n-3)$  为  $n-3$  系列多不饱和脂肪酸;  $\Sigma PUFA(n-6)$  为  $n-6$  系列多不饱和脂肪酸。

### 1.3 数据分析

实验数据采用 Excel 2019 软件进行整理, 采用 SPSS 25.0 软件进行独立样本  $T$  检验(independent-samples  $T$  test)分析,  $P < 0.05$  为显著水平, 结果以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 2种乌贼肌肉的基本营养组成

2种乌贼肌肉的基本营养成分见表1, 金乌贼水分含量显著高于日本无针乌贼( $P < 0.05$ )。2种乌贼的

表1 2种乌贼肌肉的基本营养组成/%

Tab.1 Basic nutritional composition of muscle of two species of cuttlefish /%

营养成分 Nutritive components	日本无针乌贼 <i>S. japonica</i>	金乌贼 <i>S. esculenta</i>
水分 Moisture	80.08 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	81.42 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
粗蛋白 Crude protein	15.64 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	14.77 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>
粗脂肪 Crude lipid	1.28 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>
粗灰分 Crude ash	1.81 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

注: 同行数据标注不同小写字母表示差异显著, 字母相同表示差异不显著, 下同。

Note: Data marked with different lowercase letters indicate significant difference, and the same letters indicate no significant difference, the same as below.

粗蛋白、粗脂肪含量均无显著性差异( $P > 0.05$ )。日本无针乌贼的粗灰分含量显著高于金乌贼( $P < 0.05$ )。

### 2.2 2种乌贼的常规肌肉品质

由表2可知, 在质构特性方面, 金乌贼肌肉的硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性和内聚性均显著高于日本无针乌贼( $P < 0.05$ ), 通常情况下弹性大、肉质紧实的肌肉口感更好, 日本无针乌贼的蒸煮损失率显著高于金乌贼( $P < 0.05$ ), 而蒸煮损失率与弹性、内聚性有关。新鲜鱿鱼自身就含有甲醛, 并且贮藏和运输过程中也会产生甲醛(段文佳, 2011), 其中, 金乌贼肌肉的甲醛含量的本底值显著高于日本无针乌贼( $P < 0.05$ )。

表2 2种乌贼的常规肌肉品质  
Tab.2 Conventional muscle qualities of two cuttlefish species

项目 Items	日本无针乌贼 <i>S. japonica</i>	金乌贼 <i>S. esculenta</i>
硬度 Hardness/g	23.46 $\pm$ 3.22 <sup>b</sup>	37.26 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup>
弹性 Springiness/mm	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.97 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
胶粘性 Adhesiveness/(g/mm)	10.64 $\pm$ 2.19 <sup>b</sup>	20.68 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>
咀嚼性 Chewiness/(g/mm)	8.55 $\pm$ 2.27 <sup>b</sup>	20.22 $\pm$ 3.19 <sup>a</sup>
内聚性 Cohesiveness	0.30 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
蒸煮损失率 Cooking loss rate/%	29.12 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	25.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
甲醛 Formaldehyde/(mg/kg)	0.56 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

### 2.3 氨基酸的组成及含量

由表3可知, 2种乌贼肌肉中均检测出17种水解氨基酸、色氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和少量牛磺酸, 其中, 必需氨基酸(EAA) 8种, 半必需氨基酸(HEAA) 2种、非必需氨基酸(NEAA) 11种。2种乌贼肌肉中谷氨酸(2.67~2.79 g/100 g)和天冬氨酸(1.75~1.83 g/100 g)含量最高, 其次是谷氨酰胺(1.68~1.75 g/100 g)、亮氨酸(1.51~1.62 g/100 g)、精氨酸(1.40~1.43 g/100 g)和赖氨酸(1.39~1.43 g/100 g), 半胱氨酸(0.12~0.13 g/100 g)和色氨酸(0.08~0.09 g/100 g)含量最低。2种乌贼肌肉中鲜味氨基酸含量(6.17~6.51 g/100 g)占氨基酸总量的比例均超过32%, 且金乌贼鲜味氨基酸含量高于日本无针乌贼。谷氨酸是主要呈味氨基酸, 这也是2种乌贼味道鲜美的原因。金乌贼(19.74 g/100 g)的氨基酸总量(TAA)显著高于日本无针乌贼(19.05 g/100 g) ( $P < 0.05$ ), 必需氨基酸含量(EAA)(6.40 g/100 g)也显著

高于日本无针乌贼(6.07 g/100 g)( $P<0.05$ )。根据 FAO/WHO 的理想模式(刘胜男等, 2022),  $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{TAA}$  接近 40%,  $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{NEAA}$  接近 60%, 符合优质蛋白的判定标准。金乌贼(32.42)的  $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{TAA}$  值高于日本无针乌贼(31.86), 金乌贼(54.98)的  $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{NEAA}$  值也高于日本无针乌贼(53.91)。因此, 金乌贼比日本无针乌贼更接近理想模式。

表 3 氨基酸的组成及含量(g/100g)

Tab.3 Composition and content of amino acids (g/100g)

氨基酸 Amino acid	含量 Contents	
	日本无针乌贼 <i>S. japonica</i>	金乌贼 <i>S. esculenta</i>
苏氨酸 Thr*	0.75±0.12 <sup>a</sup>	0.79±0.22 <sup>a</sup>
缬氨酸 Val*	0.62±0.13 <sup>a</sup>	0.67±0.18 <sup>a</sup>
蛋氨酸 Met*	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.45±0.02 <sup>a</sup>
异亮氨酸 Ile*	0.61±0.04 <sup>a</sup>	0.67±0.03 <sup>a</sup>
亮氨酸 Leu*	1.51±0.02 <sup>b</sup>	1.62±0.05 <sup>a</sup>
苯丙氨酸 Phe*	0.65±0.01 <sup>a</sup>	0.69±0.21 <sup>a</sup>
赖氨酸 Lys*	1.39±0.14 <sup>a</sup>	1.43±0.09 <sup>a</sup>
色氨酸 Trp*	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>
精氨酸 Arg**	1.43±0.05 <sup>a</sup>	1.40±0.06 <sup>a</sup>
组氨酸 His**	0.29±0.05 <sup>a</sup>	0.30±0.01 <sup>a</sup>
谷氨酸 Glu <sup>※</sup>	2.67±0.04 <sup>b</sup>	2.79±0.02 <sup>a</sup>
甘氨酸 Gly <sup>※</sup>	0.73±0.04 <sup>b</sup>	0.83±0.01 <sup>a</sup>
丙氨酸 Ala <sup>※</sup>	1.02±0.16 <sup>a</sup>	1.06±0.03 <sup>a</sup>
天冬氨酸 Asp <sup>※</sup>	1.75±0.03 <sup>a</sup>	1.83±0.14 <sup>a</sup>
酪氨酸 Tyr	0.39±0.02 <sup>b</sup>	0.49±0.05 <sup>a</sup>
脯氨酸 Pro	1.11±0.01 <sup>a</sup>	0.92±0.02 <sup>b</sup>
丝氨酸 Ser	0.73±0.11 <sup>a</sup>	0.81±0.12 <sup>a</sup>
天冬酰胺 Asn	0.78±0.17 <sup>a</sup>	0.81±0.19 <sup>a</sup>
谷氨酰胺 Gln	1.68±0.10 <sup>a</sup>	1.75±0.18 <sup>a</sup>
半胱氨酸 Cys	0.13±0.02 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>
牛磺酸 Tau	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.23±0.05 <sup>a</sup>
氨基酸总量 $\Sigma\text{TAA}$	19.05±0.26 <sup>b</sup>	19.74±0.23 <sup>a</sup>
必需氨基酸 $\Sigma\text{EAA}$	6.07±0.12 <sup>b</sup>	6.40±0.14 <sup>a</sup>
半必需氨基酸 $\Sigma\text{HEAA}$	1.72±0.13 <sup>a</sup>	1.70±0.14 <sup>a</sup>
非必需氨基酸 $\Sigma\text{NEAA}$	11.26±0.17 <sup>b</sup>	11.64±0.16 <sup>a</sup>
鲜味氨基酸 $\Sigma\text{DAA}$	6.17±0.05 <sup>b</sup>	6.51±0.14 <sup>a</sup>
鲜味氨基酸/氨基酸总量 $\Sigma\text{DAA}/\Sigma\text{TAA}$	32.39	32.98
必需氨基酸/氨基酸总量 $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{TAA}$	31.86	32.42
必需氨基酸/非必需氨基 酸总量 $\Sigma\text{EAA}/\Sigma\text{NEAA}$	53.91	54.98

注: \*必需氨基酸, \*\*半必需氨基酸, ※鲜味氨基酸。

Note: \*: Essential amino acids; \*\*: Semi-essential amino acids; ※: Flavor amino acids.

## 2.4 肌肉蛋白质的营养价值评价

必需氨基酸营养价值评估结果表明(表 4), 2 种乌贼肌肉中赖氨酸的 AAS 和 CS 皆是最高。根据 AAS、CS 评分可知, 日本无针乌贼的异亮氨酸、缬氨酸、色氨酸含量均低于 FAO/WHO 标准, 但金乌贼除缬氨酸和色氨酸外, 其余氨基酸含量均高于 FAO/WHO 标准(Seligson *et al*, 1984)。2 种乌贼除色氨酸 AAS 评分较低, 其他氨基酸评分均大于或者趋近于 1, 因此, 2 种乌贼的第一限制性氨基酸均为色氨酸。根据 CS 评分可知, 2 种乌贼的苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸较鸡蛋蛋白含量更高。其中, 金乌贼的 EAAI 指数(82.99)高于日本无针乌贼(75.37), 表明金乌贼的氨基酸营养价值更高。

## 2.5 脂肪酸的组成及含量

由表 5 可知, 2 种乌贼脂肪酸种类丰富, 且含有相同种类的饱和脂肪酸(SFA)共有 9 种, 不饱和脂肪酸(UFA)11 种, 其中, 单不饱和脂肪酸(MUFA)4 种, 多不饱和脂肪酸(PUFA)7 种。2 种乌贼肌肉的饱和脂肪酸中 C16:0 含量最高, 其次是 C18:0, C23:0 含量最低; 单不饱和脂肪酸中, 日本无针乌贼的 C20:1 含量最高, 金乌贼的 C18:1n9c 含量最高, 二者 C24:1 含量均最低; 多不饱和脂肪酸中, 2 种乌贼的 DHA 含量最高, 且日本无针乌贼的 DHA、EPA 含量均显著高于金乌贼( $P<0.05$ ), 其中, 日本无针乌贼的 DHA、EPA 含量分别占总脂肪酸的 27.98%和 14.06%, 金乌贼分别占总脂肪酸的 26.98%和 13.13%。金乌贼的血栓形成指数 IT 值(0.30)与日本无针乌贼(0.29)相比无显著差异( $P>0.05$ ), 日本无针乌贼的动脉粥样硬化指数 IA 值(0.63)与金乌贼(0.60)相比差异显著( $P<0.05$ )。根据脂肪酸品质评价结果, 2 种乌贼均可作为预防心血管疾病的优质脂肪酸来源。

## 2.6 矿物元素的组成及含量

由表 6 可知, 日本无针乌贼、金乌贼肌肉均检测了 10 种矿物元素, 各种矿物元素含量均有差异。2 种乌贼肌肉中 K、P、Mg 和 Ca 含量最为丰富, 其中, P 的含量差距最大, 且金乌贼肌肉中的 P (2 260 mg/kg) 含量显著高于日本无针乌贼(1 970 mg/kg)( $P<0.05$ ), 日本无针乌贼肌肉的 Zn 含量显著低于金乌贼( $P<0.05$ ), 其含量分别达到 10.4 和 14.5 mg/kg, I 元素的含量显著高于金乌贼( $P<0.05$ ), 其含量分别达到 13.6 和 9.2 mg/kg。Mn、Cu、Fe 和 Se 为 2 种乌贼肌肉中含量较低的矿物元素, 其中, 金乌贼肌肉中的 Mn

表4 肌肉蛋白质的营养价值评价

Tab.4 Evaluation of nutritional value of muscle protein

必需氨基酸 Essential amino acid	FAO/WHO 评分模式 FAO/WHO scoring pattern/(mg/g)	鸡蛋蛋白 Egg protein (mg/g)	氨基酸评分 AAS		化学评分 CS	
			日本无针乌贼	金乌贼	日本无针乌贼	金乌贼
			<i>S. japonica</i>	<i>S. esculenta</i>	<i>S. japonica</i>	<i>S. esculenta</i>
苏氨酸 Thr	250	292	1.20	1.34	1.03	1.14
缬氨酸 Val	310	411	0.80	0.91	0.60	0.69
异亮氨酸 Ile	250	331	0.98	1.13	0.74	0.86
亮氨酸 Leu	440	534	1.37	1.56	1.13	1.28
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	380	565	1.09	1.31	0.74	0.88
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	220	386	1.05	1.10	0.60	0.62
赖氨酸 Lys	340	441	1.63	1.78	1.26	1.37
色氨酸 Trp	60	99	0.60	0.56	0.36	0.34
总量 Total	2 250	3 059	8.72	9.69	6.46	7.18
必需氨基酸指数 EAAI		75.37			82.99	

表5 脂肪酸的组成及含量/%

Tab.5 Composition and content of fatty acids /%

脂肪酸 Fatty acids	日本无针乌贼 <i>S. japonica</i>	金乌贼 <i>S. esculenta</i>
<C14:0	—	—
C14:0	2.14±0.03 <sup>a</sup>	2.08±0.06 <sup>a</sup>
C15:0	0.67±0.13 <sup>a</sup>	0.95±0.11 <sup>a</sup>
C16:0	27.18±0.55 <sup>a</sup>	24.90±0.46 <sup>b</sup>
C17:0	0.94±0.06 <sup>b</sup>	1.90±0.16 <sup>a</sup>
C18:0	10.31±0.41 <sup>b</sup>	11.82±0.36 <sup>a</sup>
C20:0	1.16±0.15 <sup>b</sup>	1.54±0.11 <sup>a</sup>
C22:0	0.54±0.08 <sup>a</sup>	0.63±0.09 <sup>a</sup>
C23:0	0.13±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>
C24:0	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>b</sup>
C16:1	0.62±0.22 <sup>a</sup>	0.59±0.25 <sup>a</sup>
C20:1	2.95±0.16 <sup>a</sup>	2.54±0.14 <sup>b</sup>
C24:1	0.54±0.14 <sup>a</sup>	0.36±0.03 <sup>a</sup>
C18:1n9c	2.86±0.16 <sup>a</sup>	2.81±0.11 <sup>a</sup>
C18:2n6c	0.31±0.04 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>
C18:3n3	0.49±0.12 <sup>b</sup>	0.81±0.11 <sup>a</sup>
C20:2	0.27±0.05 <sup>b</sup>	0.63±0.06 <sup>a</sup>
C20:3n3	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.41±0.17 <sup>a</sup>
C20:4n6	6.11±0.32 <sup>a</sup>	6.47±0.22 <sup>a</sup>
C20:5n3(EPA)	14.06±0.14 <sup>a</sup>	13.13±0.03 <sup>b</sup>
C22:6n3(DHA)	27.98±0.26 <sup>a</sup>	26.98±0.21 <sup>b</sup>
DHA/EPA	1.99±0.02 <sup>a</sup>	2.05±0.05 <sup>a</sup>
EPA+DHA	42.04±0.27 <sup>a</sup>	40.11±0.31 <sup>b</sup>
ΣSFA	43.52±0.20 <sup>a</sup>	44.41±0.28 <sup>a</sup>
ΣMUFA	6.97±0.11 <sup>a</sup>	6.30±0.08 <sup>b</sup>
ΣPUFA	49.53±0.31 <sup>a</sup>	48.79±0.33 <sup>b</sup>
Σn-3 PUFA	42.84±0.22 <sup>a</sup>	41.33±0.17 <sup>b</sup>
Σn-6 PUFA	6.42±0.02 <sup>a</sup>	6.83±0.22 <sup>a</sup>

注: SFA: 饱和脂肪酸; MUFA: 单不饱和脂肪酸; PUFA: 多不饱和脂肪酸。

Note: SFA: Saturated fatty acid; MUFA: Monounsaturated fatty acid; PUFA: Polyunsaturated fatty acid.

表6 矿物元素的组成及含量(mg/kg)

Tab.6 Composition and content of mineral elements (mg/kg)

元素 Elements	日本无针乌贼 <i>S. japonica</i>	金乌贼 <i>S. esculenta</i>
钾 K	2 640±140.83 <sup>a</sup>	2 870±137.12 <sup>a</sup>
钙 Ca	133.43±12.14 <sup>a</sup>	145±10.12 <sup>a</sup>
镁 Mg	525.49±26.09 <sup>a</sup>	552±22.33 <sup>a</sup>
磷 P	1 970±133 <sup>b</sup>	2 260±135 <sup>a</sup>
锰 Mn	0.280±0.020 <sup>b</sup>	0.356±0.023 <sup>a</sup>
锌 Zn	10.4±1.06 <sup>b</sup>	14.50±1.13 <sup>a</sup>
铁 Fe	2.97±0.13 <sup>a</sup>	2.89±0.24 <sup>a</sup>
铜 Cu	1.37±0.02 <sup>b</sup>	5.19±0.12 <sup>a</sup>
硒 Se	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.22±0.07 <sup>a</sup>
碘 I	13.60±1.29 <sup>a</sup>	9.20±0.17 <sup>b</sup>

和 Cu 含量显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ ), 其余元素二者含量偏低且无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 2种乌贼肌肉的常规营养成分

肉类价值的关键指标包括蛋白质、脂肪等。本研究中, 2种乌贼肌肉的蛋白质含量为 14.77%~15.64%, 脂肪含量为 1.28%~1.40%, 属于低脂高蛋白的水产品。其中, 蛋白质是头足类动物中最丰富的宏量营养素, 2种乌贼的蛋白质含量均高于日本枪乌贼(9.29%) (刘玉锋等, 2011), 较其他淡水鱼和海水鱼类有较低的脂肪, 如鲤(*Cyprinus carpio*)(5.91%) (王玉林等, 2019)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(5.10%) (许星鸿等, 2013)、罗非鱼(*Oreochromis* spp.)(4.49%) (王玉林等, 2019) 等。本研究表明, 2种乌贼与大多数海洋乌贼相同, 具备低脂肪、高蛋白的优点, 是一种优良的水产品,

具有较高的营养价值。

不同种类的乌贼肌肉其营养成分存在显著差异(蒋霞敏等, 2012; 陈道海等, 2014; 王峥等, 2020), 同一品种由于摄食种类和栖息地环境的不同个体间也有差异(常抗美等, 2008; 宋超霞等, 2009; 曹子豪等, 2015; 刘长琳等, 2016), 同一生长环境但处于不同的生长阶段, 其各营养组分均有差异(樊甄姣等, 2009)。本研究产生差异也可能是2种乌贼生长环境、捕捞期、摄食的饵料种类和数量的不同导致。

### 3.2 2种乌贼肌肉的品质差异

除营养成分外, 质构、蒸煮损失、甲醛含量均会影响消费者的接受度。影响水产品质构特性的因素有硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性和内聚性。其中, 硬度、弹性、咀嚼性是评价肉质新鲜度的重要指标(陈依萍等, 2020)。金乌贼的硬度、弹性和咀嚼性均显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ ), 因此, 金乌贼肌肉的品质更好。胶粘性指克服食物表面和与食物接触的部位(如舌头、牙齿等)表面之间的吸引力的特性, 胶粘性与样品的多汁性相关, 多汁性与含水量相关(殷俊等, 2011), 金乌贼的含水量显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ ), 因此, 金乌贼的胶粘性高于日本无针乌贼。内聚性指样品的内部结合强度, 而内聚性越大, 样品口感就越好(邓丽等, 2014)。蒸煮损失反映样品在蒸煮过程中保持水分的能力, 而蒸煮损失率越高, 其弹性、内聚性越低(朱琳等, 2021)。对蒸煮损失过大的肉来说, 加工成干制品更有利(赵改名等, 2020), 因此, 大部分新鲜乌贼被加工成乌贼干、乌贼丝等干制品。本研究中, 金乌贼的质构特性均优于日本无针乌贼且日本无针乌贼的蒸煮损失率要高于金乌贼。综上所述, 金乌贼肌肉的口感更好。

甲醛的含量也可以反映肌肉的品质, 甲醛是一种毒性极强的物质, 摄入小剂量会引起疼痛、呕吐和昏迷, 大剂量能引起死亡。在保藏和加工过程中, 水产品自身也会产生甲醛(李颖畅等, 2012)。李娟等(2018)研究表明, 乌贼属于甲醛本底值含量较低的海产品。我国农业部规定水产品中甲醛含量应小于10 mg/kg, 2种乌贼均未超过此安全限量。

### 3.3 2种乌贼肌肉的氨基酸比较

乌贼肌肉的营养价值由必需氨基酸的种类、数目决定。本研究中, 日本无针乌贼中必需氨基酸含量为6.07 g/100 g, 占氨基酸总量的31.86%; 金乌贼中必需氨基酸含量为6.40 g/100 g, 占总量的32.42%, 与FAO/WHO推荐的优质蛋白标准相近, 2种乌贼均属于

优质蛋白。金乌贼肌肉中 $\Sigma EAA/\Sigma TAA$ 值高于日本无针乌贼, 说明其氨基酸价值更高。其中, 2种乌贼肌肉中非必需氨基酸含量最高的是谷氨酸, 谷氨酸具有调节神经功能、促进智力发育、提高记忆力等功效, 与Loppies等(2021)研究的谷氨酸含量总是最高的结果相一致。金乌贼中谷氨酸的含量显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ ), 谷氨酸是鲜味最强的呈味氨基酸, 其组成和含量决定了水产品的鲜美程度, 可见, 金乌贼的肉质更加鲜美。除谷氨酸外, 2种乌贼肌肉中天冬氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸和精氨酸含量较高, 与虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)研究结果相一致(陈道海等, 2014)。因此, 2种乌贼均属于氨基酸含量丰富的水产品, 但金乌贼氨基酸营养价值更高。

牛磺酸具有调节机体正常生理活动、提高机体免疫能力等功能, 摄入适量的牛磺酸可显著降低肝脏和血清胆固醇水平(Masaaki *et al*, 2021)。其中, 日本无针乌贼肌肉的牛磺酸含量(0.27 g/100 g)高于金乌贼(0.23 g/100 g)。谭乐义等(2000)研究表明, 牛磺酸在贝类、甲壳类和头足类中含量更丰富, 其中, 真鲷(*Pagrus major*)(0.11 g/100 g)、鲱鱼(*Clupea pallasii*)(0.11 g/100 g)等鱼的肌肉牛磺酸含量均低于本研究的2种乌贼。由于人体内合成牛磺酸的能力较低, 为了满足人体需要, 可以每天摄入适量水产品, 头足类肌肉的牛磺酸含量虽低于贝类, 但远高于虾、禽畜类和蛋类, 属于牛磺酸含量较为丰富的水产品。

AAS、CS和EAAI是比较和分析动物肌肉EAA的组成, 评价其蛋白质营养价值的常用指标。AAS是指样品中某种EAA的含量与FAO/WHO推荐的理想蛋白同种氨基酸含量的值, 如果样品所有EAA的AAS均 $>1$ , 说明该样品的蛋白质营养价值较高(徐杰等, 2021)。赖氨酸是2种乌贼的AAS和CS评分最高的氨基酸, 二者均超过FAO/WHO模式标准含量。本研究中, 2种乌贼肌肉中色氨酸的AAS和CS评分最低, 因此, 2种乌贼的第一限制性氨基酸均为色氨酸。这与陈道海等(2014)的研究结果不同, 可能由于乌贼的种类不同其氨基酸含量也有所差异。本研究表明, 除了色氨酸外, 2种乌贼肌肉中其他必需氨基酸的AAS均接近或 $>1$ ; 而CS评分值均 $>0.5$ 。EAAI表示不同乌贼蛋白质的品质, 一定程度上也反映蛋白质的消化率(Liu *et al*, 2018)。从EAAI指数可以看出, 金乌贼的分值较高, 为82.99, 进一步验证了金乌贼的氨基酸营养价值相对较高。

### 3.4 2种乌贼肌肉的脂肪酸比较

2种乌贼肌肉的饱和脂肪酸中棕榈酸(C16:0)和



硬脂酸(C18:0)含量较高。唐传核等(2000)研究表明,硬脂酸(C18:0)对胆固醇无上升作用,棕榈酸(C16:0)与神经发育、离子调节、躯体生长和生殖有关。日本无针乌贼肌肉的单、多不饱和脂肪酸含量均显著高于金乌贼( $P<0.05$ ),其中,多不饱和脂肪酸中 DHA 含量最高。郑娅等(2021)研究显示,不饱和脂肪酸可以从营养代谢调控等方面发挥对其机体的保护作用,必需脂肪酸所占比例越高其营养价值越高。EPA 和 DHA 对人体心血管系统等有着显著的功效,是有益的营养成分(郝颖等, 2006),其中,日本无针乌贼的 EPA 和 DHA 总量显著高于金乌贼( $P<0.05$ )。虽然头足类含有含量较低的脂肪,但 n-3PUFA 含量却十分丰富,占脂肪酸总量的 41.33%~42.84%。研究表明,富含 n-3PUFA 的饮食可以减少脂肪积累、抑制脂肪细胞的分化、抵消多余的脂肪组织堆积(Ballester *et al*, 2020; Kim *et al*, 2021)。Rudolph 等(2017)研究表明, n-6/n-3PUFA 的值越低,越易产生更多的脂联素,降低脂肪的生成。其中,日本无针乌贼的 n-3PUFA 含量显著高于金乌贼( $P<0.05$ )且 n-6/n-3PUFA 值低于金乌贼,所以,日本无针乌贼的脂肪含量更低。成年人食用 n-6/n-3PUFA 比值越低的水产品可以增强肥胖抵抗力,摄入更低的能量。不饱和脂肪酸含量越高,越有利于蛋白的积累(宋益贞, 2012),但其嫩度、多汁性及总体可接受度越低;而 SFA+MUFA 含量越高,其评分越高。日本无针乌贼的不饱和脂肪酸含量显著高于金乌贼( $P<0.05$ ), SFA+MUFA 含量低于金乌贼,因此,日本无针乌贼的脂肪酸评分更高,金乌贼的肉质更加鲜嫩多汁。

### 3.5 2种乌贼肌肉的矿物质比较

2种乌贼的胴体肌肉中含有较多的 K、P 等矿物质元素,含量分别高达 2 640~2 870、1 970~2 260 mg/kg, Mikkelsen 等(2021)研究表明,缺 K 降低基因表达、影响蛋白质合成和生长;P 参与能量转化,在糖和脂肪的代谢中起重要作用。2种乌贼的 Mg 含量较高,达到 525.49~552.00 mg/kg, Mg 具有保护心脏和增强记忆力的作用。Cu、Mn 和 Zn 被认为是生物抗氧化剂(Aubourg *et al*, 2021),金乌贼含量均显著高于日本无针乌贼( $P<0.05$ ),可见金乌贼的抗氧化性较好。因此,2种乌贼肌肉富含人体所需的多种无机元素,常量元素中, K 和 P 含量最高;微量元素中, Zn 和 I 含量最高。

## 4 结论

综上所述,金乌贼与日本无针乌贼均是高蛋白、

低脂肪的水产品,其氨基酸种类丰富,与 FAO/WHO 模式推荐的标准相近,属于优质蛋白。从品质特性来看,金乌贼的质构特性优于日本无针乌贼,口感更好。从必需氨基酸指数来看,金乌贼高于日本无针乌贼。而从 EPA 和 DHA 的总量来看,日本无针乌贼显著高于金乌贼,2种乌贼均含有丰富的 PUFA,其中, EPA 和 DHA 的总含量占脂肪酸的含量均高于 40%。2种乌贼均属于营养价值高的水产品。研究结果可为2种乌贼开发低脂高蛋白的产品提供理论依据,为消费者提供参考。

## 参 考 文 献

- AUBOURG S P, TRIGO M P, RICARDO C G, *et al*. Nutritional and healthy value of chemical constituents obtained from Patagonian squid (*Doryteuthis gahi*) by-products captured at different seasons. *Foods*, 2021, 10(9): 2144
- BALLESTER M, QUINTANILLAR, ORTEGA F J, *et al*. Dietary intake of bioactive ingredients impacts liver and adipose tissue transcriptomes in a porcine model of prepubertal early obesity. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5375
- CAO Z H, CHI C F, LIU H H, *et al*. Comparison of nutritional compositions in *Sepiella japonica* muscle from different wild populations. *Food Science*, 2015, 36(4): 101-105 [曹子豪, 迟长风, 刘慧慧, 等. 不同地理群体曼氏无针乌贼肌肉营养成分分析比较与评价. *食品科学*, 2015, 36(4): 101-105]
- CHANG K M, ZHU A Y, ZHANG J S, *et al*. Comparison in biochemistry of tissues of wild and cultured *Sepiella japonica*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(2): 145-151 [常抗美, 朱爱意, 张建设, 等. 曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)野生及养殖群体的生化特征及其形成机制的研究. *海洋与湖沼*, 2008, 39(2): 145-151]
- CHEN D H, WEN J, ZHAO Y Y, *et al*. Analysis of nutritional components in muscle of cultivated and wild *Sepia pharaonis*. *Food Science*, 2014, 35(7): 217-222 [陈道海, 文菁, 赵玉燕, 等. 野生与人工养殖的虎斑乌贼肌肉营养成分比较. *食品科学*, 2014, 35(7): 217-222]
- CHEN Y P, CUI W X, GAO R C, *et al*. Changes in quality of sturgeon fillet during 4°C and -3°C partial freezing storage. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 178-186 [陈依萍, 崔文萱, 高瑞昌, 等. 冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 178-186]
- DENG L, LI Y, DONG X P, *et al*. Chemical interactions and textural characteristics of abalone pleopod muscle protein during hearting. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(18): 307-316 [邓丽, 李岩, 董秀萍, 等. 热加工过程中鲍鱼腹足蛋白间作用力及其质构特性. *农业工程学报*, 2014, 30(18): 307-316]
- DENG Y, WANG X X, HU S H, *et al*. Comparison of fatty acid composition and principal component analysis of beef cattle

- in western area of Yellow River. *Modern Food Science and Technology*, 2021(2): 290–297 [郑娅, 王晓璇, 胡生海, 等. 河西肉牛脂肪酸成分比较及主成分分析. *现代食品科技*, 2021(2): 290–297]
- DOUBLEDAY Z A, PROWSE T A A, ARKHIPKIN A, *et al.* Global proliferation of cephalopods. *Current Biology*, 2016, 26: 406–407
- DUAN W J. Primary study on exposure assessment and risk management of formaldehyde in aquatic products. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [段文佳. 水产品中甲醛的暴露评估与风险管理研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- FAN Z J, LÜ Z M, ZHOU X M, *et al.* Analysis and evaluation of protein and fatty acids in wild *Sepia esculenta*. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2009, 31(5): 513–515 [樊甄姣, 吕振明, 周晓敏, 等. 野生金乌贼蛋白质和脂肪酸成分分析与评价. *营养学报*, 2009, 31(5): 513–515]
- HAO Y, WANG Z H. Nutritive function and safety analysis of EPA and DHA. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(3): 180–183 [郝颖, 汪之和. EPA、DHA的营养功能及其产品安全性分析. *现代食品科技*, 2006, 22(3): 180–183]
- HAO Z L, ZHANG X M, ZHANG P D. Biological characteristics and multiplication techniques of *Sepia esculenta*. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(4): 601–606 [郝振林, 张秀梅, 张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术. *生态学杂志*, 2007, 26(4): 601–606]
- JIANG X M, PENG R B, LUO J, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient composition in different tissues of wild *Sepia lycidas*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(12): 2393–2401 [蒋霞敏, 彭瑞冰, 罗江, 等. 野生拟目乌贼不同组织营养成分分析及评价. *动物营养学报*, 2012, 24(12): 2393–2401]
- KIM M, VOY B H. Fighting fat with fat: n-3 polyunsaturated fatty acids and adipose deposition in broiler chickens. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 755317
- LI J, CHEN B, YOU J J, *et al.* Investigation on the background value of formaldehyde content in aquatic products and water-based product. *Modern Food*, 2018(24): 190–196 [李娟, 陈斌, 游京晶, 等. 水产品及水发产品中甲醛含量本底值的调查研究. *现代食品*, 2018(24): 190–196]
- LI Y C, ZHU J L, LI J R. Research progress on producing and control of endogenous formaldehyde in aquatic products. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(8): 406–408 [李颖畅, 朱军莉, 励建荣. 水产品中内源性甲醛的产生和控制研究进展. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 406–408]
- LIU C L, RUAN F T, QIN B, *et al.* Analysis and evaluation of nutritive composition of the muscle of wild adult *Sepia esculenta*. *Marine Sciences*, 2016, 40(8): 42–48 [刘长琳, 阮飞腾, 秦博, 等. 野生金乌贼成体肌肉的营养成分分析及评价. *海洋科学*, 2016, 40(8): 42–48]
- LIU L W, LIANG X F, LI J, *et al.* Effects of supplemental phytic acid on the apparent digestibility and utilization of dietary amino acids and minerals in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(2): 850–857
- 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]
- LIU Y F, MAO Y, WANG Y H, *et al.* Analysis of the nutritional components of *Loligo japonica*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2011, 41(S1): 341–343 [刘玉锋, 毛阳, 王远红, 等. 日本枪乌贼的营养成分分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2011, 41(S1): 341–343]
- LOPPIES C R M, APITULEY D A N, TENTUA E. Nutrition content and amino acid profile of paper squid. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 797(1): 012020
- MASAAKI M, TOMOYUKI T, KAZUHO T, *et al.* Cholesterol-lowering effects of taurine through the reduction of ileal FXR signaling due to the alteration of ileal bile acid composition. *Amino acids*, 2021, 53(10): 1523–1532
- MCAFEE A J, MCSORLEY E M, CUSKELLY G J, *et al.* Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 2010, 84(1): 1–13
- MIKKELSEN A C D, THOMSEN K L, VILSTRUP H, *et al.* Potassium deficiency decreases the capacity for urea synthesis and markedly increases ammonia in rats. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2021, 320(4): G474–G483
- RUDOLPH M C, JACKMAN M R, PRESBY D M, *et al.* Low neonatal plasma n-6/n-3 PUFA ratios regulate offspring adipogenic potential and condition adult obesity resistance. *Diabetes*, 2017, 67(4): 651–661
- SELIGSON F H, MACKKEY L N. Variable predictions of protein quality by chemical score by amino acid analysis and reference pattern. *The Journal of Nutrition*, 1984, 114(4): 682–691
- SONG C X, WANG C L, SHAO Y W, *et al.* The nutritional compositions and evaluation of muscle between wild and cultivated *Sepiella japonica*. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2009, 31(3): 301–303 [宋超霞, 王春琳, 邵银文, 等. 野生与养殖曼氏无针乌贼肌肉的营养成分和评价. *营养学报*, 2009, 31(3): 301–303]
- SONG Y Z. Effects of different lipid sources on growth and muscle qualities of tilapia. Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 [宋益贞. 不同脂肪源对罗非鱼生长特性和肌肉品质的影响. 江南大学硕士研究生学位论文, 2012]
- TAN L Y, ZHANG C H, XUE C H, *et al.* Biological activity of

- taurine and its distribution in marine organisms. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2000, 20(3): 75–79 [谭乐义, 章超桦, 薛长湖, 等. 牛磺酸的生物活性及其在海洋生物中的分布. *湛江海洋大学学报*, 2000, 20(3): 75–79]
- TANG C H, XU J X, PENG Z Y. Recent study on nutrition and function of fatty acids. *China Oils and Fats*, 2000, 25(6): 20–23 [唐传核, 徐建祥, 彭志英. 脂肪酸营养与功能的最新研究. *中国油脂*, 2000, 25(6): 20–23]
- WANG P S, XU J C, JIANG X M, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth performance and main composition of muscle in *Sepiella japonica*. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2016, 29(1): 1–6 [王鹏帅, 徐军超, 蒋霞敏, 等. 饲料蛋白质水平对日本无针乌贼生长性能和肌肉营养成分的影响. *宁波大学学报(理工版)*, 2016, 29(1): 1–6]
- WANG Y L, LIN W L, LI L H, *et al.* Basic nutrient composition analysis of freshwater fish muscles based on four orders and thirteen species. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(11): 277–283 [王玉林, 林婉玲, 李来好, 等. 4目13种淡水鱼肌肉基本营养成分分析. *食品工业科技*, 2019, 40(11): 277–283]
- 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, LIAO J, LIN Z A, *et al.* Amino acid composition analysis and nutrition value evaluation of peptide power from grouper muscle. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(23): 221–226 [徐杰, 廖津, 林泽安, 等. 石斑鱼肉肽粉的氨基酸组成分析与营养价值评价. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 221–226]
- XU X H, LIU X. Nutritional composition of muscles from 8 species of economic fishes. *Food Science*, 2013, 34(21): 75–82 [许星鸿, 刘翔. 8种经济鱼类肌肉营养组成比较研究. *食品科学*, 2013, 34(21): 75–82]
- YIN J, MEI C H, CHEN B, *et al.* Sensory evaluation and instrumental measurement of meatballs. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(1): 50–55 [殷俊, 梅灿辉, 陈斌, 等. 肉丸品质的质构与感官分析. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 50–55]
- ZHANG T, SHI H L, PING H L, *et al.* Present status for propagation and culture of *Sepiella japonica* de Rochebrune. *Scientific Fish Farming*, 2018(12): 49–50 [张涛, 史会来, 平洪领, 等. 曼氏无针乌贼繁育养殖现状. *科学养鱼*, 2018(12): 49–50]
- ZHAO G M, WANG K, ZHU C Z, *et al.* Study on meat quality differences of different parts of Qinghai high-prototype yak. *Food Research and Development*, 2020, 41(13): 60–65 [赵改名, 王可, 祝超智, 等. 青海高原型牦牛不同部位肉的品质差异研究. *食品研究与开发*, 2020, 41(13): 60–65]
- ZHOU J S, WANG Q L, WANG W L, *et al.* Compositions of fatty acids and minerals in muscle of blackspot sisord catfish *Glyptosternum maculatum*. *Fisheries Science*, 2020, 39(3): 414–419 [周建设, 王且鲁, 王万良, 等. 黑斑原肌肉脂肪酸及无机盐组成特征分析. *水产科学*, 2020, 39(3): 414–419]
- ZHU L, ZHENG Y, ZHOU F, *et al.* Establishment of evaluation model and analysis of quality deteriorating factors of frozen scallop sold in Shanghai. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 165–175 [朱琳, 郑尧, 周纷, 等. 上海市售扇贝冻品品质评价模型构建及关键影响因素分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 165–175]

(编辑 陈 辉)

## Evaluation of the Nutritional Composition and Quality of Muscles in Two Cuttlefish Species

JIA Junqi, ZHANG Yue, LIAO Yueqin, LIN Huimin<sup>①</sup>

(College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract** *Sepiella japonica* is widely distributed on Zhejiang and Fujian coasts and is one of the four major fishery products in the East China Sea. Its meat is delicious, has high nutritional value, and is loved by consumers. *Sepia esculenta* is widely distributed on the Japanese coasts and South and East China Sea waters, with the advantages of fast growth and development, short life cycle. Hence, it is an important economic cephalopod in China's northern fisheries. With the improvement of people's living standards,

① Corresponding author: LIN Huimin, E-mail: linhuixiaomin@126.com

there is a higher demand for food quality. Red meat contains high levels of saturated fatty acids and cholesterol, which increase the risk of cardiovascular disease and colon cancer when consumed for an extended period. Cephalopods are low-fat and high-protein aquatic products, which are easier to digest and absorb than livestock meat and are widely welcomed by consumers. The quality of cuttlefish muscle is an essential factor affecting the value of cuttlefish products. So far, many scholars have studied the nutritional composition of cuttlefish muscle, but few reports have been made on its quality differences. Therefore, this study aimed to investigate the nutritional composition and quality differences of two cuttlefish muscles and evaluate their nutritional value. For that, the conventional nutrient composition, textural characteristics, cooking loss rate, formaldehyde (FA) content, amino acid and fatty acid composition, and mineral elements of *S. japonica* and *S. esculenta* were analyzed from specimens caught in large quantities in the Zhoushan area. Ten cuttlefish of each species were collected, each as an independent sample. The average carcass length for *S. japonica* was (104.00±0.24) mm and the average body weight (134.00±0.11) g, while for *S. esculenta* specimens, the averages were (162.00±0.17) mm and (356.00±0.09) g. The fresh samples were transported to the laboratory within 30 min. The basic nutrients of cuttlefish muscle were determined by the national standard method, texture characteristics by the TPA model, FA content by HPLC, amino acids content using the amino acid autoanalyzer, fatty acid content by gas chromatography, and mineral content by microwave digestion. The results showed that the crude protein and crude fat contents of *S. japonica* muscles were not significantly different from those of *S. esculenta* ( $P>0.05$ ). The moisture content was significantly lower in *S. japonica* than that of *S. esculenta* ( $P<0.05$ ), and the crude ash content was significantly higher than that of *S. esculenta* ( $P<0.05$ ). The hardness, elasticity, adhesive, masticatory, and cohesive properties of *S. esculenta* muscles were significantly higher than those of *S. japonica* ( $P<0.05$ ). The FA contents of the two cuttlefish muscles were 0.56 mg/kg and 1.18 mg/kg, respectively, following the national health standards. Muscles of both cuttlefish species showed 17 hydrolyzed amino acids, and the first limiting amino acid was tryptophan. Also, for both species, the ratio of essential amino acids to total amino acids was higher than 31%, and the ratio of essential amino acids to non-essential amino acids was higher than 53%. *S. esculenta* was closer to the ideal protein pattern recommended by the FAO/WHO, and its essential amino acid index (EAAI) was as high as 82.99. Twenty types of fatty acids were detected in the muscles of both cuttlefishes. The total contents of C20:5n-3 (EPA) and C22:6n-3 (DHA) were higher than 40% in *S. japonica*, which were significantly higher than in *S. esculenta* ( $P<0.05$ ). The muscles of both cuttlefish species were rich in many inorganic elements required by humans. The two cuttlefish muscles were rich in K, P, Mg, and Ca, with the greatest difference observed for P. The P and Zn contents of *S. esculenta* muscles were significantly higher than those of *S. japonica* ( $P<0.05$ ), while the I content of *S. japonica* muscles was significantly higher than that of *S. esculenta* ( $P<0.05$ ), reaching 13.6 mg/kg and 9.2 mg/kg, respectively. Macronutrients had the highest content of K and P and the trace elements, Zn and I. Overall, this study showed differences in the nutritional composition and quality of the two cuttlefish muscles, but both were high-quality and low-fat protein sources with good exploitation value. This study provides the scientific basis for utilizing the cephalopod marine resources in the East China Sea.

**Key words** Cuttlefish; Nutrients; Amino acids; Fatty acids; Quality evaluation

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220321002

http://www.yykxjz.cn/

陈胜军, 高芳芳, 王迪, 冯阳, 邓建朝, 潘创, 赵永强, 李春生. 甲壳类水产品中氨基脲的来源及生成机理研究进展. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 244-253

CHEN S J, GAO F F, WANG D, FENG Y, DENG J C, PAN C, ZHAO Y Q, LI C S. Progress on the origin and formation mechanism of semicarbazide in crustacean aquatic products. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 244-253

# 甲壳类水产品中氨基脲的来源 及生成机理研究进展\*



陈胜军<sup>1①</sup> 高芳芳<sup>1,2</sup> 王迪<sup>1</sup> 冯阳<sup>1</sup> 邓建朝<sup>1</sup>  
潘创<sup>1</sup> 赵永强<sup>1</sup> 李春生<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 国家水产品加工技术研发中心  
农业农村部水产品加工重点实验室 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 氨基脲(semicarbazide, SEM)通常作为判断水产品中是否滥用呋喃西林的标志物,在动物体内能与蛋白质结合形成稳定的结合物,摄入过多对人体有一定的危害。研究发现,甲壳类水产品未使用呋喃西林仍能检测到SEM,现已确认的SEM来源包括内源存在和外源摄入,外源摄入途径有生长环境和饲料引入、加工过程中使用次氯酸盐消毒和偶氮二甲酰胺的分解产生。对于SEM广泛的来源途径,目前,对SEM形成机理的研究相对较少。甲壳类水产品中SEM的天然存在给呋喃西林药物检测带来了严重的干扰。本文对甲壳类水产品中SEM的来源途径进行总结并推测可能的生成机理,可为甲壳类水产品质量控制及内源性SEM的生成机理提供理论参考。

**关键词** 甲壳类水产品;氨基脲;来源;生成机理

**中图分类号** S912 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0244-10

呋喃西林是人工合成的广谱抗菌药物,能破坏细菌的糖代谢和氧化酶系统,早期在水产和畜牧养殖中用来治疗畜禽疾病和防治病虫害。呋喃西林进入动物体内后迅速代谢,其代谢物氨基脲(semicarbazide, SEM)与蛋白质结合后在动物体内长期稳定存在(范清涛等, 2020)。Vass等(2008a、b)研究发现,动物源性食品中残留的SEM可通过食物链传递给人类,长期摄入对人体有致癌、致畸等副作用。对SD大鼠(*Rattus norvegicus*)的研究表明,SEM造成大鼠多个组织器官发生病变,包括子宫、胰脏和甲状腺等,同时,表现出致变性和弱遗传毒性效应(Maranghi *et al*, 2009;

朱乐玫等, 2012)。对妊娠期大鼠腹腔注射40 mg/kg SEM, 21 d后大鼠腹中胎儿组织和骨骼发生畸变,同时多个脏器出现核酸水平显著降低的现象(李嘉, 2008)。SEM在组织形态学上导致多种组织器官形态改变,也对神经系统、内分泌系统的功能产生影响。美国、澳大利亚、加拿大、日本、新加坡、欧盟等已禁止在食品工业中使用该类药物,并严格执行对水产品中呋喃西林的残留监测(龚路军等, 2019)。呋喃西林也已被我国列入首批《兽药地方标准废止目录》中,在《关于开展2016年国家产地水产品质量安全监督检查工作的通知》中,将SEM的残留限量值定为1.0 μg/kg。

\* 国家自然科学基金(32072147)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD69)和广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金(2022KJ151)共同资助。

① 通信作者: 陈胜军, 研究员, E-mail: chenshengjun@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-21, 收修稿日期: 2022-05-06



近年来,我国对甲壳类水产品药物残留进行检测发现,SEM的检出超标率高达50%(于慧娟等,2012)。2002—2003年期间,欧盟食品和饲料快速预警系统(Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF)发布了300余份来自泰国、文莱、巴西等国家的虾类等SEM残留事件的通报,数百吨水产品因此被销毁。SEM在不同甲壳类水生动物中的本底含量差异较大,几乎在所有甲壳中均不同程度的检出SEM,包括日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir*

*sinensis*)等,其壳中SEM检出率为100%,且含量远高于1.0 μg/kg。在甲壳类肌肉可食组织中,SEM含量差异较大,如凡纳滨对虾、中华绒螯蟹等肌肉中未检出SEM,而日本沼虾和罗氏沼虾肌肉中SEM检出率极高(于慧娟等,2012;张睿等,2012;李东利等,2015;王鼎南等,2016;彭婕等,2019;曹爱玲等,2020;范清涛等,2020)(表1)。SEM严重超标的现状引发了人们对甲壳类水产品安全性的思考。本文针对甲壳类水产品中SEM的不同来源进行总结,概述有关SEM来源的研究现状及生成机理,以期对甲壳类水产品中SEM的检测提供理论根据。

表1 不同品种甲壳类水产品不同检测部位SEM含量(μg/kg)  
Tab.1 SEM content in different test sites of different crustacean aquatic products (μg/kg)

不同品种 Different breeds	拉丁名 Scientific name	不同检测部位 Different test sites		
		甲壳 Carapace	肌肉 Muscle	其他组织 Other tissues
虾类 Shrimp	日本沼虾 <i>M. nipponense</i>	30.00~315.30	1.38~11.87	58.60~81.30
	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	26.38~64.16	1.63~4.41	2.41~6.43
	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1.50~10.27	ND	ND
	中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	<1	<1	<1
	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	3.50±0.09	0.44~0.68	1.97~2.15
	斑节虾 <i>Penaeus monodon</i> Fabricius	3.04~15.36	0~0.76	0.88~1.02
蟹类 Crab	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	5.48~24.31	0~2.05	ND
	海蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	13.80~26.50	ND	ND
	锯缘青蟹 <i>Scylla serrata</i>	81.80±7.00	ND	ND
	珍宝蟹 <i>Dungeness crab</i>	46.30±4.80	ND	ND
鳖类 Turtle	中华鳖 <i>Trionyx sinensis</i>	1.36±0.04	ND	ND

注: ND: 未检出。

Note: ND: Not detected.

## 1 甲壳类水产品中SEM的来源

### 1.1 甲壳类水产品中内源性SEM的来源

赵芸等(2019)研究发现,许多不曾接触呋喃西林药物的养殖甲壳类水生动物体内(以虾蟹为代表)含有SEM。此外,研究人员多次从生活在天然水域的虾蟹中检测出SEM,推测SEM具有内源性。Saari等(2004)在未食用呋喃西林的克氏原螯虾中检测到SEM最高含量为12 μg/kg,首次提出了甲壳动物自身可以产生SEM的观点。McCracken等(2013)通过对孟加拉国野生淡水明虾(*Macrobrachium agwi*)研究发现,虾肉和虾壳均有SEM检出,相较于虾肉,虾壳中SEM含量更高,这与van Poucke等(2011)对罗氏沼虾、王鼎南等(2016)对日本沼虾、倪永付等(2012)对微山湖小青虾SEM检测结果一致。这些结果证明了甲壳类水产品中内源性SEM的存在。彭婕等(2019)在中华绒螯

蟹脱壳后新长出的软壳中检测到了SEM,而蟹肉中未检出SEM,推测水生动物甲壳可能是其内源性SEM的主要来源。

### 1.2 甲壳类水产品中外源性SEM的来源

**1.2.1 生长环境或食物摄入SEM** 自然界中,甲壳类动物的生存环境会因人类经济活动的影响而受到SEM污染。于召强等(2013)研究发现,SEM作为一种新的水体污染物在水体和沉积物中长时间存在并不断富集,最终进入生物体内。徐英江等(2010)在潮河河口水和河流沉积物中检测到SEM大量存在;田秀慧(2018)分别在山东省金城湾、四十里湾和莱州湾西部3个水域的水体、沉积物中检测到SEM存在,且所监测水域中的贝类、虾蟹等SEM均有不同程度的检出,表明水体环境中的SEM对水生动物富集污染。其次,甲壳类水生动物可通过摄食自然界中的藻类或喂食饲料引入SEM,田秀慧(2018)通过对月菱

形藻(*Nitzschia closterium*)、扁藻(*Platymonas*)和叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)中的 SEM 进行监测,发现 SEM 在藻类中有很强的富集能力,富集系数为 145.3~200.0。同样, Hoenicke 等(2004)在红藻(*Rhodophyta*)、褐藻(*Phaeophyta*)中检测到了 SEM。水生动物食用这些天然食物后,体内会产生 SEM 残留。

### 1.2.2 养殖过程中非法使用呋喃西林引入 SEM

呋喃西林作为广谱抗菌药物,具有良好的抗菌效果和价格低廉等优点。某些养殖户为了降低水产品疾病发生率(比较典型的疾病:赤皮、烂鳃和肠炎)、获得更大的经济利益,违反呋喃西林使用规定。呋喃西林进入动物体内后,可以在弱酸性条件下迅速分解成 SEM (Leitner *et al*, 2001),从而与蛋白形成难以代谢的结合体。Kwon(2017)研究表明,在混合养殖的过程中,一些养殖户会用从出生开始就被投喂了呋喃西林等抗生素的家禽垫料对池塘施肥,从而对养殖水体造成 SEM 污染进而进入养殖动物体内。索纹纹等(2013)研究发现,通过对养殖斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的水体进行呋喃西林泼洒后,水体、底泥和鱼体均出现了 SEM 蓄积,水体底泥蓄积量显著高于鱼体( $P<0.05$ )。樊新华等(2010)、蒋原等(2008)、谭志军等(2008)分别对中华绒螯蟹、克氏原螯虾、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)进行不同的呋喃西林给药方式处理,以研究体内 SEM 的蓄积和消除规律,结果发现,无论哪种给药方式,呋喃西林进入动物体内后代谢迅速,而 SEM 残留时间可长达 180 d。丁春燕(2019)、Pak-Sin 等(2008)、黄宣运等(2017)、丁军伟等(2018)发现水生动物摄入含有呋喃西林的饲料后,无法实现完全代谢,代谢物 SEM 会长期残留在动物源性食品中,最终对人体产生毒副作用。

**1.2.3 次氯酸盐消毒产生 SEM** 次氯酸盐因具有强氧化性广泛用于水产品的卫生消毒(李会生等, 2001)。袁涛等(2011)研究发现,次氯酸盐浸泡的水产品中 SEM 含量显著高于清水浸泡的水产品。杨曦等(2011)、王建(2015)发现水产品中 SEM 含量与次氯酸盐的质量浓度、作用持续时间和食品接触物表面积成正比。Zhang 等(2016)采用次氯酸盐处理凡纳滨对虾、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和哈氏仿对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)后发现, SEM 含量与次氯酸盐浓度存在剂量依赖性且次氯酸盐对不同水产品的 SEM 含量具有差异。

**1.2.4 偶氮二甲酰胺加工产生 SEM** 偶氮二甲酰胺(azodicarbonamide, ADC)在人类生产生活中有 2 种用途:一是用作食品添加剂,增强面粉团的柔韧性;

二是作为食品级玻璃罐密封垫圈的原材料(黄晓姝等, 2018)。ADC 在高温高压条件下,受热快速分解产生 SEM,对与其接触的食品产生污染。

某些生产厂家为迎合消费者口感需求会对水产品裹粉以促进销售,如面包虾等,使用含 ADC 的面粉作为甲壳类水产品的裹粉原料是导致甲壳类水产品 SEM 超标的原因之一。Pereira 等(2004)在含有 ADC 添加剂的面粉中检出 SEM,含量约为 2~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。胡荷等(2018)、阮莎莎等(2019)等对市售的面粉及面制品中的 ADC 和 SEM 的含量进行监测发现,面粉及面制品中均有 ADC 检出,面制品中 SEM 的含量高于面粉,且面包中 SEM 的含量高达 139~1 288  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,说明 ADC 经高温反应生成了 SEM。另外, SEM 可通过包装材料对与之接触的食品造成污染。Stadler 等(2004)从水产品罐头、蜂蜜、调味品和婴儿食品罐头中均检测到了 SEM,最高含量可达 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;陈志锋等(2009)研究发现,食品接触垫圈经过加热可分解产生 SEM;赵天祯等(2019)在蜂蜜中检测出 SEM,通过模拟性实验推断是蜂蜜罐垫圈的内溶物外溶所致。Hoenicke 等(2004)将玻璃罐垫圈进行加热并检测 SEM 含量,发现垫圈中的 ADC 在高温条件下降解成 SEM,且 SEM 可从垫圈迁移到食品中。因此,甲壳类水产品加工运输过程中应当尽量避免与 ADC 接触,以防受到外源性 SEM 的污染。

## 2 甲壳类水产品中 SEM 的生成机理

### 2.1 内源性 SEM 生成机理

甲壳类水产品中壳的 SEM 含量普遍大于肉,而壳的主要成分是甲壳素(几丁聚糖)。因此,相关研究对内源性 SEM 是否来源于甲壳中的甲壳素进行了论证。

周萍等(2008)研究发现,未使用任何药物的蜂蛹在生长后期体内的 SEM 含量随着甲壳素含量的增加而逐渐增加,推测内源性 SEM 的形成或与内源甲壳素有关。McCracken 等(2013)研究发现,在虾壳和虾肉之间存在着一层分泌甲壳素的单细胞表皮层,靠近该表皮层虾肉的 SEM 含量是内层虾肉检出量的 3 倍以上,由此推断虾肉中的 SEM 主要来自于产生甲壳素的细胞表皮层。然而,彭婕等(2015)通过对中华绒螯蟹蟹壳中的甲壳素研究发现,内源性 SEM 的产生与甲壳素无关,可能是蟹壳中的结合蛋白水解后,产生了在一定条件下能转化为 SEM 的氨基酸。对于以上实验结果,彭婕等(2019)进一步研究了不同蟹壳中

的主要成分与 SEM 残留的相关性, 发现不同部位蟹壳中甲壳素含量与 SEM 残留水平呈明显的正相关性, 蛋白质含量及氨基酸组成与 SEM 残留水平呈负相关性, 这可能是甲壳素和氨基酸在之前处理过程中产生了 SEM, 是导致中华绒螯蟹中内源性 SEM 残留的原因。

目前, 关于甲壳类水产品内源性 SEM 的形成机理已有一定进展。一种被认可的说法是内源性 SEM 形成可能与甲壳中的结合蛋白及氨基酸有关。曹爱玲等(2019、2020)研究发现, 中华鳖壳中 SEM 含量随着烘干温度的上升而上升, 但其蛋白含量随烘干温度的上升而下降, 对其丰度差异蛋白质进行筛选, 发现球蛋白、角蛋白等 13 种蛋白与 SEM 含量的变化显著相关, 此类蛋白涉及细胞碳代谢、焦点黏附等生物过程, 由此猜测这些蛋白随热能的增加转化成了 SEM。Samsonova 等(2008)对动物体内含有 SEM 残基的蛋白进行鉴定, 发现白蛋白中含有高浓度 SEM 残基, 并且在以谷胱甘肽 S-转移酶为主要成分的蛋白质混合物中也发现含有高浓度的 SEM 残基, 表明 SEM 的形成可能与 SEM 结合的谷胱甘肽有关联。谢冬冬等

(2014)研究表明, 甲壳类水产品中内源 SEM 不仅与样品中的蛋白质有关, 而且与样品中的氨基酸组成有关联。Noonan 等(2008)证实甲壳类水产品中含量最丰富的氨基酸是精氨酸。精氨酸酶可将精氨酸水解为鸟氨酸和尿素进入尿素循环, 尿素和 SEM 在结构上有一定的相似性。Hoenicke 等(2004)认为 SEM 是由含氮物质(如精氨酸、组氨酸、瓜氨酸和肌酐)与酰胺或尿素反应形成。Abernethy 等(2015)研究表明, 胍作为参与尿素循环的重要中间物质, 可与酸根离子反应生成 SEM, 因此, 某些高氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )含量的食品可在酸性条件下形成 SEM。由此推测, 精氨酸可能是动物内源性 SEM 的前体。Yu 等(2019)在凡纳滨对虾生长期间对参与尿素循环的相关物质含量进行检测后认为, 虾体内的精氨酸等物质通过尿素循环最终形成 SEM。

精氨酸是内源性 SEM 形成的重要潜在前体。精氨酸等参与甲壳类水生动物的尿素循环, 通过恶嗪啉中间体产生了 SEM, 结合尿素循环中主要物质的含量变化分析, 内源性 SEM 的形成与精氨酸的胍基和酰胺基、瓜氨酸和尿素的酰胺结构密切相关, 内源性 SEM 可能的生成机理如图 1 所示。

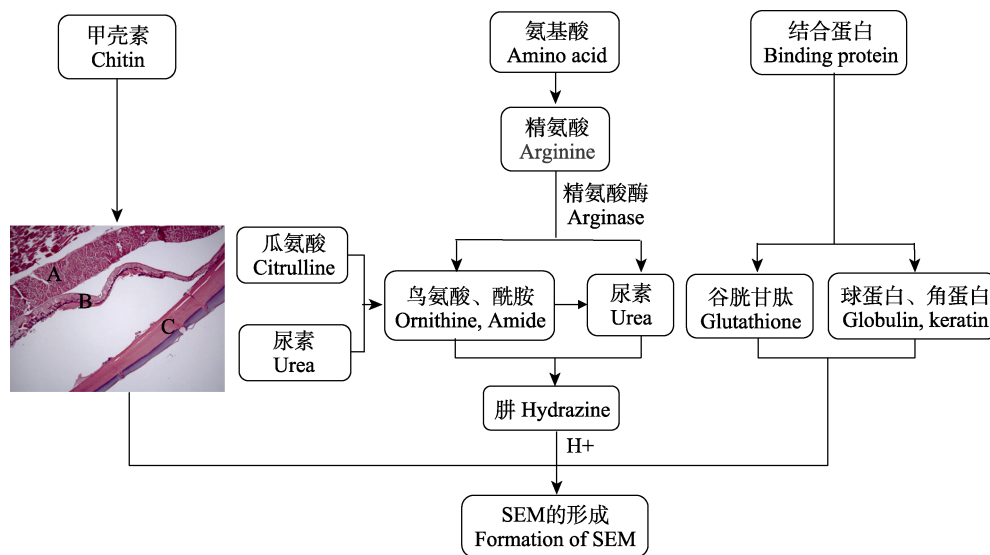


图 1 内源性 SEM 在甲壳类水产品中可能的生成机理

Fig.1 Possible formation mechanism of endogenous SEM in crustacean aquatic products

A: 虾肉; B: 虾表皮层; C: 虾壳。

A: Shrimp meat; B: Shrimp epidermal layer; C: Shrimp shell.

## 2.2 外源性 SEM 生成机理

**2.2.1 次氯酸盐引入 SEM 生成机理** Hoenicke 等(2004)研究不同浓度的次氯酸盐对北海虾、鱼制品、蛋白粉、红藻、鸡肉和蜂蜜的 SEM 检出的影响发现,

随着有效氯含量不断增加, 6 种样品的 SEM 含量均有不同程度的增加, 其中, 以蛋白粉最为显著, 检出量为  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。考虑到水产品中富含的精氨酸、组氨酸、瓜氨酸、肌酐等多种具有脒基或脒基结构的含

氮化学物质结构与 SEM 化学结构相近, Hoenicke 等(2004)认为这些含氮化学物质经过次氯酸盐溶液的处理后, 发生降解反应最终形成了 SEM。Abernethy 等(2015)推测次氯酸盐溶液中的氨基甲酸根离子可能与水产品中的氨或酸性酰胺反应生成胼, 胼通过尿素循环与尿素及其他化合物反应生成 SEM。Bendall (2009)认为 SEM 是次氯酸盐和尿素在一定条件下发生霍夫曼反应产生的。由此推测, 水产品中的 SEM 可能来自体内以及次氯酸盐中的氨, 次氯酸盐引入 SEM 可能生成机理见图 2。

**2.2.2 ADC 生成 SEM 机理** 温度可能对 SEM 的生成有影响。Pereira 等(2004)研究发现, 在面粉中添加 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 ADC, 所检样品的 SEM 含量为 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 转化率约为 0.1%。Ye 等(2011)研究发现, 经高温烘焙后, 面粉中添加的 ADC 会分解成 SEM, 且面制品外部的 SEM 含量要高于内部, 说明温度对 SEM 的生成有积极影响。姚敬等(2016)、蒋志红等(2014)通过实验证明了 ADC 在湿热条件下可生成 SEM。Noonan 等(2008)研究 ADC 面粉及面制品中的 SEM 生成情况时发现, 生面团不含 SEM, 而面制品中有 SEM 检出, 进一步研究发现 SEM 含量与温度成正比。

ADC 在高温条件下先降解为联二脲, 联二脲再经过水解反应转化为 SEM (李金强等, 2009)。考虑到呋喃西林与联二脲分子结构的差异性, 可排除呋喃西林代谢产生联二脲的推测。从现有的研究看, ADC 是联二脲的唯一生物来源, 因此, 可将联二脲作为 ADC 相应的目标检出物, ADC 引入 SEM 生成机理见图 2。

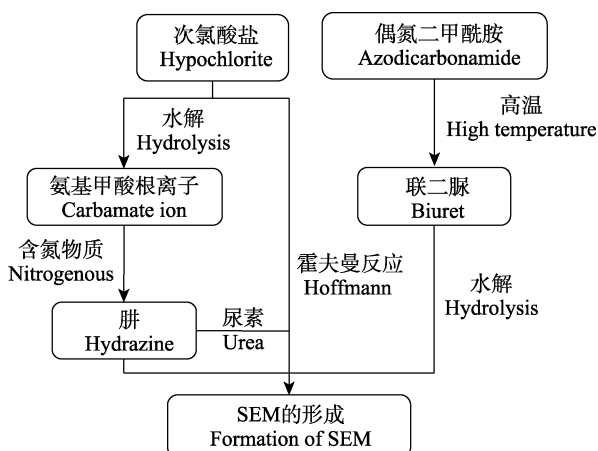


图 2 外源性 SEM 在甲壳类水产品中可能的生成机理  
Fig. 2 Possible formation mechanism of exogenous SEM in crustacean aquatic products

### 3 结论与展望

SEM 在自然界中的来源广泛, 甲壳类水产品中检出的 SEM 非呋喃西林唯一代谢产生, 水体环境及加工过程的污染等均可导致 SEM 超标。对于 SEM 的生成机理, 目前研究相对较少, 当前对于内源性 SEM 的生成机理有 2 种推测: 一是富含蛋白质的甲壳类水产品中的含氮物质如精氨酸等参与尿素循环等过程形成 SEM; 二是来源于单细胞表皮层的甲壳素转化。对于外源性 SEM 的生成机理也有 2 种推断: 一是甲壳类水产品经次氯酸盐的处理生成的胼进入尿素循环, 增加了 SEM 生成量; 二是加工过程中外加的 ADC 经高温降解为 SEM, 导致 SEM 过量残留。深入分析研究甲壳类水产品中 SEM 的主要来源及形成作用机理对于保障我国水产养殖业健康发展具有重大意义。对甲壳类水产品内源性 SEM 的形成机理进行研究, 可为我国制定甲壳类水产品中 SEM 最大残留限量提供科学数据。

### 参 考 文 献

- ABERNETHY G A. Generation of semicarbazide from natural azine development in foods, followed by reaction with urea compounds. *Food Additives and Contaminants, Part A. Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 2015, 32(9): 1416–1430
- BENDALL J. Semicarbazide is non-specific as a marker metabolite to reveal nitrofurazone abuse as it can form under Hofmann conditions. *Food Additives and Contaminants, Part A. Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 2009, 26(1): 47–56
- CAO A L, CHEN Y L, CAI L Y, *et al.* The effects of different drying temperatures on the detectable amount of semicarbazide in crustacean aquatic products. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2020, 37(1): 94–99 [曹爱玲, 陈怡琳, 蔡路昀, 等. 不同烘干温度对甲壳类水产品中氨基脲检出量的影响. *中国动物检疫*, 2020, 37(1): 94–99]
- CAO A L, YU Z F, CHEN Y L, *et al.* Research progress on nitrofurazone and its metabolite of semicarbazide in animal-derived food. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2019, 36(6): 62–67 [曹爱玲, 余招锋, 陈怡琳, 等. 动物源食品中呋喃西林及其代谢物氨基脲研究进展. *中国动物检疫*, 2019, 36(6): 62–67]
- CHEN Z F, LI C, SUN L, *et al.* SEM problems in food contact materials. *Food and Machinery*, 2009, 25(2): 5–7 [陈志锋, 李成, 孙利, 等. 食品接触材料中的氨基脲问题. *食品与机械*, 2009, 25(2): 5–7]

- DING C Y. Study on the detection of nitrofurane metabolites residues in shrimps. Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2019, 48–51 [丁春燕. 青虾中硝基呋喃代谢物残留的检测研究. 浙江工业大学硕士研究生学位论文, 2019, 48–51]
- DING J W, DENG J C, YANG X Q, *et al.* Accumulation and elimination of four nitrofurane metabolites in muscle of grouper (*Epinephelus awoara*). South China Fisheries Science, 2018, 14(1): 60–67 [丁军伟, 邓建朝, 杨贤庆, 等. 4种硝基呋喃类代谢物在青石斑鱼肌肉中的富集与消除规律. 南方水产科学, 2018, 14(1): 60–67]
- FAN Q T, CHEN S J, DENG J C, *et al.* Research progress on the production and control of semicarbazide in crustacean aquatic products. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(5): 1439–1445 [范清涛, 陈胜军, 邓建朝, 等. 甲壳类水产品中氨基脲产生及控制方法研究进展. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1439–1445]
- FAN X H, ZHEN H, QIAN W, *et al.* Study on SEM attenuation of nitrofurazone metabolites in *Eriocheir sinensis*. Jiangsu Agricultural Science, 2010(6): 368–370 [樊新华, 郑浩, 钱伟, 等. 呋喃西林代谢物氨基脲在中华绒螯蟹体内的衰减研究. 江苏农业科学, 2010(6): 368–370]
- GONG L J, YANG L S, WANG J L, *et al.* Lecture on quality and safety of aquatic products: Lecture II Nitrofurans and quality and safety of aquatic products (1). Guide to Enrichment in Fisheries, 2019(10): 58–60 [龚路军, 杨兰松, 王将来, 等. 《水产品质量安全》讲座第二讲: 硝基呋喃类药物与水产品质量安全(1). 渔业致富指南, 2019(10): 58–60]
- HOENICKE K, GATERMANN R, HARTIG L, *et al.* Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment: Is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse? Food Additives and Contaminants, 2004, 21(6): 526–537
- HU H, LIU X L, YU H, *et al.* Monitoring and analysis of semicarbazide contamination in flour products in Jiangxi. Chinese Journal of Health Inspection, 2018, 28(3): 340–342 [胡荷, 刘小玲, 于晖, 等. 江西省面制品中氨基脲污染监测分析. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(3): 340–342]
- HUANG X S, GUAN M X, HANG Y P, *et al.* Study on degradation of flour additive azodicarbamide to semicarbazide under heat treatment. Journal of Instrumental Analysis, 2018, 37(8): 977–980 [黄晓姗, 关铭鑫, 杭义萍. 面制品添加剂偶氮甲酰胺热处理下转化为氨基脲的研究. 分析测试学报, 2018, 37(8): 977–980]
- HUANG X Y, SHEN X S, HUANG D M, *et al.* Elimination rules of nitrofurazone metabolite residue in *Eriocheir sinensis* cultured in outdoor ponds. Marine Fisheries, 2017, 39(6): 674–681 [黄宣运, 沈晓盛, 黄冬梅, 等. 室外池塘自然养殖条件下呋喃西林代谢物在中华绒螯蟹体内残留和消除规律. 海洋渔业, 2017, 39(6): 674–681]
- JIANG Y, DING T, XU J Z, *et al.* Dynamical changes of Nitrofurane metabolites in crawfish. Animal Husbandry and Veterinarian, 2008(2): 34–37 [蒋原, 丁涛, 徐锦忠, 等. 硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中消除规律的研究. 畜牧与兽医, 2008(2): 34–37]
- JIANG Z H, WU X P, WANG M X, *et al.* relationship of added azodicarbamide with the formation of semicarbazide in heated flour and deep-fried breaded shrimp. Food Science, 2014, 35(19): 91–95 [蒋志红, 吴晓萍, 王明兴, 等. 偶氮甲酰胺与氨基脲在面粉及面包虾中的形成关系. 食品科学, 2014, 35(19): 91–95]
- KWON J W. Semicarbazide: Natural occurrence and uncertain evidence of its formation from food processing. Food Control, 2017(72): 268–275
- LEITNER A, ZOLLNER P, LINDNER W. Determination of the metabolites of nitrofurane antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2001, 939(1/2): 49–58
- LI D L, LI J, CHANG Z Q, *et al.* The elimination rules of nitrofurazone metabolites and its effects on activities of metabolic enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(5): 87–94 [李东利, 李健, 常志强, 等. 呋喃西林代谢产物在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内的消除规律及其对代谢酶活性的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 87–94]
- LI J Q, GUO H X, CAO P, *et al.* Study of the correlation about azodicarbamide decomposing to semicarbazide. Chemical Analysis and Meterage, 2009, 18(6): 34–36 [李金强, 郭海霞, 曹鹏, 等. 偶氮甲酰胺分解产生呋喃西林代谢物的相关性研究. 化学分析计量, 2009, 18(6): 34–36]
- LI H S, WANG L. Application of chlorine dioxide in aquaculture industry. Inland Fisheries, 2001(1): 39–39 [李会生, 王玲. 二氧化氯在水产养殖业中的应用. 内陆水产, 2001(1): 39–39]
- LI J. Toxicology study on semicarbazide of food additive by-production. Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2008 [李嘉. 食品添加剂副产物氨基脲的毒理学研究. 吉林农业大学硕士研究生学位论文, 2008]
- MARANGHI F, TASSINA R, LAG A V, *et al.* Effects of the food contaminant semicarbazide following oral administration in juvenile Sprague-Dawley rats. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(2): 472–479
- MCCRACKEN R, HANNA B, ENNIS D, *et al.* The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 825–832
- NI Y F, ZHU L P, WANG Y, *et al.* Determination of nitrofurazone metabolite in every part of Weishan Lake shrimp. Food and Fermentation Science and Technology, 2012, 48(1): 86–88 [倪永付, 朱莉萍, 王勇, 等. 微山湖小青虾各部分呋喃西林代谢物含量测定. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 86–88]



- NOONAN G O, BEGLEY T H, DIACHENKO G W. Semicarbazide formation in flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(6): 2064–2067
- PAK-SIN C, MAYDA I L, ANN A, *et al.* Residue depletion of nitrofurans and their tissue-bound metabolites in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after oral dosing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(17): 8030–8034
- PENG J, GAN J H, CHEN J W, *et al.* Distribution and formation mechanism of semicarbazide in *Eriocheir sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(4): 108–112 [彭婕, 甘金华, 陈建武, 等. 中华绒螯蟹中氨基脒的分布及产生机理分析. *淡水渔业*, 2015, 45(4): 108–112]
- PENG J, LÜ L, YU Y L, *et al.* Study on the formation approach of endogenous semicarbazide in *Eriocheir sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(3): 108–112 [彭婕, 吕磊, 喻亚丽, 等. 中华绒螯蟹中内源性氨基脒的产生途径研究. *淡水渔业*, 2019, 49(3): 108–112]
- PEREIRA A S, DONATO J L, DE N G. Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. *Food Additives and Contaminants*, 2004, 21(1): 63–69
- RUAN S S, LIU G H, ZHU Z, *et al.* Dietary exposure assessment of azocarbamide and its transformation products in flour and flour products in Shenzhen. *Journal of Food Safety Quality*, 2019, 10(12): 3857–3862 [阮莎莎, 刘桂华, 朱舟, 等. 深圳市面粉与面制品中偶氮甲酰胺及其转化产物膳食暴露评估. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3857–3862]
- SAARI L, PELTONEN K. Novel source of semicarbazide: Levels of semicarbazide in cooked crayfish samples determined by LC/MS/MS. *Food Additives and Contaminants*, 2004, 21(9): 825–832
- SAMSONOVA J V, DOUGLAS A J, COPER K M, *et al.* The identification of potential alternative biomarkers of nitrofurazone abuse in animal derived food products. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(5): 1548–1554
- STADLER R H, MOTTIER P, GUY P, *et al.* Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide in the gaskets of certain food jars. *Analyst*, 2004, 29(3): 276–281
- SUO W W, LIU Y T, AI X H, *et al.* Elimination rules of the semicarbazide in environment and assessment of semicarbazide in the channel catfish (*Ictalurus nebulosus*) tissue. *Journal of Agricultural Environmental Science*, 2013, 32(4): 681–688 [索纹纹, 刘永涛, 艾晓辉, 等. 环境中氨基脒消解规律及对斑点叉尾鲷残留评估. *农业环境科学学报*, 2013, 32(4): 681–688]
- TAN Z J, ZHAI Y X, LENG K L, *et al.* The depuration rules of the metabolites of furazolidone and nitrofurazone in turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2008, 47(S1): 63–69 [谭志军, 翟毓秀, 冷凯良, 等. 呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律. *中山大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(S1): 63–69]
- TIAN X H. Temporal and spatial distribution in three typical mariculture bays of northern Shandong Province and biological toxicity in *Apostichopus japonicus* semicarbazide. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy Sciences (Yantai Coastal Institute, Chinese Academy of Sciences), 2018, 73–89 [田秀慧. 山东北部三个典型养殖海湾氨基脒的时空分布及对刺参的生物毒性效应研究. 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所)博士学位论文, 2018, 73–89]
- VAN POUCKE C, DATEVERNIER C, WILLE M, *et al.* Investigation into the possible natural occurrence of semicarbazide and carbazide in prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(5): 2107–2112
- VASS M I, DIBLIKOVA I, CERNOCH M, *et al.* ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination. *Analytica Chimica Acta*, 2008a, 608(1): 86–94
- VASS M, HRUSKA K, FRANEK M. Nitrofurans antibiotics: A review on the application prohibition and residual analysis. *Journal of Veterinary Medical*, 2008b, 53(9): 469–500
- WANG D N, ZHOU F, LI S Y, *et al.* Background value survey and source analysis of semicarbazide in shellfish. *China Fisheries Quality and Standards*, 2016, 6(6): 6–11 [王鼎南, 周凡, 李诗言, 等. 甲壳类水产品中呋喃西林代谢物氨基脒的本底调查及来源分析. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 6–11]
- WANG J. Researches of nitrofurazone and semicarbazide in marine crustaceans. Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2015, 53–59 [王建. 甲壳类水产中呋喃西林及氨基脒的研究. 浙江工商大学硕士研究生学位论文, 2015, 53–59]
- XIE D D, WAN Z G, SHEN J C, *et al.* Study on semicarbazide content difference from different organizations chicken generated by sodium hypochlorite. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014, 5(11): 3394–3399 [谢冬冬, 万志刚, 沈金灿, 等. 不同鸡组织经次氯酸钠处理后氨基脒生成量差异研究. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(11): 3394–3399]
- XU Y J, SUN Y Z, SONG X K, *et al.* Survey of semicarbazide contamination in coastal waters adjacent to the Chaohe River estuary. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 538–542 [徐英江, 孙玉增, 宋秀凯, 等. 潮河口邻近海域氨基脒污染现状调查研究. *海洋与湖沼*, 2010, 41(4): 538–542]
- YANG X, LI H G. Study on formation of semicarbazide (SEM) in aquatic products by hypochlorite treatment. *Science and Technology for Food Industry*, 2011, 32(4): 158–159 [杨曦, 李红光. 水产品用消毒水作用下产生呋喃西林代谢物的

- 研究. 食品工业科技, 2011, 32(4): 158-159]
- YAO J, HUANG W X, LI S X, *et al.* Detection of SEM in wheat flour products and study on the conversion rule with azocarbamide. Chinese Journal of Health Inspection, 2016, 26(18): 2600-2602 [姚敬, 黄伟雄, 李少霞, 等. 小麦粉制品中氨基脲的检测及与偶氮甲酰胺的转化规律研究. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(18): 2600-2602]
- YE J, WANG X H, SANG Y X, *et al.* Study on the determination of semicarbazide in flour products and the transformation law between azodicarbamide and semicarbazide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(17): 9313-9318
- YU H J, LI B, CAI Y Q, *et al.* Determination of semicarbazide content in crustaceans by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(10): 1530-1535 [于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基脲的含量. 分析化学, 2012, 40(10): 1530-1535]
- YU W L, LIU W H, SANG Y X, *et al.* Analysis of endogenous semicarbazide during the whole growth cycle of *Litopenaeus vannamei* and its possible biosynthetic pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(29): 8235-8242
- YU Z Q, XU Y J, TIAN X H, *et al.* Semicarbazide bioaccumulation in seashells of Sishili Bay. Marine Environmental Science, 2013, 32(1): 39-42 [于召强, 徐英江, 田秀慧, 等. 四十里湾海洋贝类对氨基脲的生物富集特性. 海洋环境科学, 2013, 32(1): 39-42]
- YUAN T, TIAN G H, WU W, *et al.* Effect of sodium hypochlorite, alcohol and bamboo swab on nitrofurazone metabolite in chicken products. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(30): 18733-18735 [袁涛, 田国华, 吴伟, 等. 次氯酸钠、酒精及穿串用竹签对鸡肉产品中呋喃西林代谢物检测结果的影响. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18733-18735]
- ZHANG R, ZHANG X Y, WU B, *et al.* Determination and source analysis of semicarbazide in crustacean aquatic products. Environmental Chemistry, 2012, 31(6): 915-916 [张睿, 张晓燕, 吴斌, 等. 甲壳类水产品中氨基脲的测定和来源分析. 环境化学, 2012, 31(6): 915-916]
- ZHANG X J, CHEN X, XU H, *et al.* Identification and occurrence of endogenous semicarbazide in prawns and rabs from Zhejiang Province, China. Food Additives and Contaminants, Part A: Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment, 2016, 33(2): 252-258
- ZHAO T Y, MA Z F, ZHANG Y. Study on the source of semicarbazide in honey. Journal of Food Safety Quality Testing, 2019, 10(11): 3401-3404 [赵天祯, 马占峰, 张莹. 蜂蜜中氨基脲本底来源研究. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3401-3404]
- ZHAO Y, WENG L P, ZHANG L. Preliminary study on the source of SEM in river shrimp. Hangzhou Agriculture and Science and Technology, 2019(4): 43-44 [赵芸, 翁丽萍, 张乐. 河虾中氨基脲的来源初探. 杭州农业与科技, 2019(4): 43-44]
- ZHOU P, HU F L, ZHANG Z T, *et al.* Determination of nitrofurazone metabolites in drone pupae and reasons for their exceeding the standards. Apiculture of China, 2008, 59(7): 5-9 [周萍, 胡福良, 章征天, 等. 雄蜂蛹中硝基呋喃类代谢物含量的测定及超标原因分析. 中国蜂业, 2008, 59(7): 5-9]
- ZHU L M, YUAN P, ZHANG B B, *et al.* Antagonistic of procyanidins on semicarbazide-induced reproductive toxicity in male mice. Practical Preventive Medicine, 2012, 19(2): 165-168 [朱乐玫, 袁萍, 张贝贝, 等. 原花青素对氨基脲致雄性小鼠生殖毒性的拮抗作用. 实用预防医学, 2012, 19(2): 165-168]

(编辑 陈 辉)

## Progress on the Origin and Formation Mechanism of Semicarbazide in Crustacean Aquatic Products

CHEN Shengjun<sup>1</sup>①, GAO Fangfang<sup>1,2</sup>, WANG Di<sup>1</sup>, FENG Yang<sup>1</sup>, DENG Jianchao<sup>1</sup>,  
PAN Chuang<sup>1</sup>, ZHAO Yongqiang<sup>1</sup>, LI Chunsheng<sup>1</sup>

(1. National Aquatic Products Processing Technology Research and Development Center;  
Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;  
South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;  
2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** Nitrofurazone is a synthetic antimicrobial drug developed by the Eaton Institute in the United States in the 1950s. Nitrofurazone can play an inhibitory or bactericidal role by interfering with the glucose metabolism process and oxidase system in bacteria. Due to its strong bactericidal ability, wide antibacterial spectrum, and low price, it was widely used in animal husbandry and aquaculture. Nitrofurazone is detected in animals because it is rapidly metabolized, with a half-life of only a few hours. Semicarbazide (a typical metabolite of nitrofurazone) is detected in food-borne products in a linear proportion to the amount of nitrofurazone added to the animal. Semicarbazide binds to animal proteins to generate stable residues and is difficult to metabolize completely. The United States, European Union, China, and other countries detect and monitor semicarbazide as a marker of nitrofurazone drugs. Nitrofurazone (and its metabolite semicarbazide) have teratogenic and carcinogenic effects on the human body. Any residues in animal-derived foods can be transmitted to humans through the food chain. Long-term intake of semicarbazide in humans will cause anemia, liver necrosis, neuritis, and damages the eyeball and DNA. Therefore, the United States, the European Union, and other countries have explicitly banned its use in the food industry. China has listed nitrofurazone as a banned drug and specified that nitrofurazone and its metabolites should not be detected in animal-derived foods. Over the years, the detection of semicarbazide has been limited by the detection methods and instruments. The Ministry of Agriculture has stated the residual limit of semicarbazide as 1.0 µg/kg and assigned a supervision and sampling inspection program.

Existing studies have identified the semicarbazide detected in crustacean aquatic products combines the residue caused by nitrofurazone metabolism and other obvious sources of semicarbazide, which include: 1) the presence of endogenous sources in crustacean aquatic animals; 2) the growth environment and feed intake; and 3) aquatic product processing. Previously, semicarbazide residues were generally considered to be the result of excessive nitrofurazone drug use by farmers. In recent years, the farmers state they have not used nitrofurazone during aquaculture. However, semicarbazide has been present in seafood. In 2004, Saari *et al.* detected semicarbazide in *Procambarus clarkii* that did not consume nitrofurazone and provided the first report that crustaceans may naturally produce semicarbazide, which is causing the detection of semicarbazide in many cultured crustacean aquatic animals that have not been fed nitrofurazone drugs (represented by shrimp and crab). This research confirms the presence of endogenous semicarbazones in crustacean aquatic products. In addition, the natural living environment of crustacean aquatic animals is polluted with semicarbazide due to economic human activities. Many scientists have detected the presence of semicarbazide in the waters and sediments in various regions. Concurrently,

① Corresponding author: CHEN Shengjun, E-mail: chenshengjun@scsfri.ac.cn

semicarbazides also contaminate aquatic plants. Semicarbazide is a new water pollutant that exists in water bodies and plants, which is continuously enriched and enters organisms. Nitrofurazone is a commonly used antibiotic for aquaculture products and is often detected when the amino residues exceed the standard levels due to illegal addition by farmers. Studies have shown that semicarbazide is also introduced through processing aquatic products, such as sodium hypochlorite disinfection resulting in an increase in the levels of semicarbazide, by azodicarboxamide through thermal decomposition producing semicarbazide and so on. The biological toxicity of semicarbazide and the food chain transfer effect have ensured semicarbazide is now an important environmental and food pollutant.

In the current aquatic trade in China, the presence of endogenous semicarbazide in crustacean aquatic products has serious impacts and interferes in the detection of nitrofurazone drugs, resulting in an inability to accurately determine semicarbazide sources. It is of great importance to thoroughly analyze and understand the main sources and formation mechanism of SEM in crustacean aquatic products to ensure the healthy development of the aquaculture industry in China. At present, there are two statements on the formation mechanism of endogenous semicarbazide: arginine is involved in the urea cycle of crustacean aquatic animals and semicarbazide is produced through the oxadine intermediate. An analysis of content changes in the main substances of the urea cycle revealed the formation of endogenous semicarbazide is closely related to the guanidinyll and amide groups of arginine, citrulline, and the amide structure of urea. Arginine is a potentially important factor in the formation of endogenous semicarbazide; secondly, SEM is derived from a single cell epidermis that produces chitin. There is a single cell epidermal layer secreting chitin between the shrimp shell and shrimp meat, and the detection level of semicarbazide in the shrimp meat close to this epidermal layer was more than three times higher than the inner shrimp meat. Therefore, the semicarbazide in shrimp meat mainly originates from the epidermal layer cells producing chitin. Two inferences on the formation mechanism of exogenous semicarbazide are: the carbamate ions in hypochlorite solution may react with ammonia or acid amide in aquatic products to generate hydrazine, and hydrazine reacts with urea and other compounds through the urea cycle to generate semicarbazide, increasing the production of semicarbazide; the azodicarbonamide added in processing is degraded to biurea at high temperatures, and biurea is then converted to semicarbazide by the hydrolysis reaction. Considering the different molecular structures between nitrofurazone and biurea, the speculation that nitrofurazone is metabolized to produce biurea can be ruled out. From existing studies, azodicarbonamide is the only biological source of biurea, so biurea can be used as the corresponding target detector of azodicarbonamide. To solve the problem that endogenous and exogenous semicarbazide cannot be distinguished in aquatic products in China, the endogenous and exogenous pathways of semicarbazide and the corresponding possible formation mechanisms are reviewed in this paper. The formation pathways of endogenous semicarbazide are speculated to help solve the formation mechanism of semicarbazide in crustacean aquatic products and provide scientific data for the standardization of semicarbazide residue limits in China.

**Key words** Crustacean aquatic products; Semicarbazide; Source pathways; Generation mechanism

## 《渔业科学进展》投稿须知

《渔业科学进展》主要刊载水产领域各学科的基础理论和应用研究成果，设研究论文、研究简报，也刊载反映水产学科发展方向的优秀综述文章，但不接收第一作者为硕士生的综述。对于创新性高的论文，本刊承诺在最短时间内予以优先发表。经本刊审定录用的稿件均可在知网版优先发表，并视同正式发表。

期刊使用在线稿件处理系统 <http://www.yykxjz.cn>。请至本刊主页“作者登录”注册、登录，根据提示提交 Word 稿件。投稿前，请进行以下确认：

1. 该论文为作者原创，享有自主知识产权，无抄袭问题，无学术伪造，不涉及泄密。
2. 该论文的相关内容无一稿多投，也未在其他任何刊物上发表。
3. 该论文作者的署名及顺序经每位作者确认，属实且准确，作者之间无署名及排序纠纷。
4. 该论文的研究符合道德准则及学术伦理，并遵守国家相应的法律法规；该论文用做实验的动物享受了其应有的福利及人道处理。

### 审稿及发表事项

1. 本刊实行同行专家双盲审，您可推荐相关专家若干名，并列明专家姓名、单位、研究方向及邮箱等。
2. 论文经 2 位以上专家审阅、编委会审定，编辑部在 2 个月内将审稿意见反馈给作者，期间作者不得将该论文投往他刊。
3. 论文出版后将收取版面费，300 元/版(≤10 版)，450 元/版(>10 版)，如印刷彩图，费用另计。稿件刊登后酌付稿酬，并赠送 2~3 本当期期刊。

### 论文写作要求

1. 在摘要里需明确该论文的创新点 1~2 个。英文摘要的字数应不少于 800 单词，需详细描述研究背景、目的、方法、结果、结论及研究的意义，即将英文摘要撰写为一篇小论文，比中文摘要更详细、更丰富，“拥有与论文同等量的主要信息”。
2. 作者单位的中英文需对应，需写明系或学院全称，请写明各层次的重点实验室名称，并核实其准确性。
3. 在文稿首页的脚注处注明资助项目及编号(请同时提供中文和英文)，并注明第一作者的 E-mail 和通讯作者的职称、E-mail。
4. 文章各部分的格式，请参考网站最新发表的文章，无需考虑文章的格式排版。
5. 物种在文中首次出现，应同时写出其拉丁文名。
6. 注意区分蛋白和基因的大小写、正斜体，蛋白用大写、正体，基因用小写、斜体。

### 7. 图的要求

- (1) 图中不同图例之间要易于区分，如较难区分，可制作彩图。
- (2) 图中所有内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中、英文双语。
- (3) 横、纵坐标需符合规范，包括中英文标目、单位(如有)。如：磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/(mg/L)
- (4) 图中的数据、方程等要与文中的描述一致。
- (5) 图件请插入论文 Word 文档的相应位置，供审稿专家审阅。
- (6) 投稿时，请将所有图的原始图打包，作为附件上传，方便排版时调整图中文字的字体和字号。线条图、柱状图等可提供原始软件制作的矢量图，如 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件。照片图可提供 ppt 文件，每张照片单独成张，图中的线、点、箭头、文字等可编辑。

### 8. 表格的要求

- (1) 请制作成三线表(顶线、表头线、底线)。
- (2) 表题、表注等需用中、英文双语标注。
- (3) 表格中的数据精确度(小数点后的位数)保持一致，一般情况下，小数点后的数字不超过 3 位。

### 9. 参考文献的要求

- (1) 对国内外发表的相关论文，特别是近期的研究成果应充分引用。所有文献按字母顺序排列。
- (2) 中文参考文献需列出对应英文信息，请从数据库查阅其英文题目、期刊名称等。
- (3) 文中提及的文献需和文后列出的文献相对应，请仔细核对：正文中引用的文献，是否在正文后的参考文献部分中列出；参考文献部分中列出的，是否已在正文中引用。
- (4) 参考文献的卷、期(如有)、页码均需详细列出。参考文献的作者需列出前 3 位。英文参考文献，请注意区分外国作者的 Last name 和 First name，姓在前，名在后，名用缩写。英文的姓名所有字母均大写，名的两个字母之间空一格。英文刊名请使用全称。



# 《渔业科学进展》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 包振民 BAO Zhenmin 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	叶乃好 YE Naihao	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰) REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李军(美) LI Jun	李纯厚 LI Chunhou
李健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng	张国范 ZHANG Guofan
陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美) CHEN Yong	邵长伟 SHAO Changwei	林洪 LIN Hong
周永灿 ZHOU Yongcan	单秀娟 SHAN Xiujuan	赵宪勇 ZHAO Xiaoyong	俞志明 YU Zhiming
秦启伟 QIN Qiwei	秦松 QIN Song	徐跑 XU Pao	徐皓 XU Hao
黄健 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 叶乃好 YE Naihao

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44卷 第4期 2023年8月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.44 No.4 Aug. 2023

主管单位	中华人民共和国农业农村部	Administrated	by	Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China
主办单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产学会	Sponsored	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences China Society of Fisheries
出版单位	科学出版社 地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717	Published	by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
编辑单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所 地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071 电话: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn	Edited	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Add:106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn; E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn
主编	金显仕	Editor-in-Chief		Jin Xianshi
印刷	青岛国彩印刷股份有限公司	Printed	by	Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
国内发行	中国邮政集团公司山东省分公司	Domestic Distributed	by	China Post Group Corporation Shandong Branch
订购	全国各地邮政局	Subscription		Post Offices All Over China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址: 北京399信箱 邮编: 100044	Overseas Distributed	by	China International Book Trading Corporation P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行人

定价: 40.00元



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869



9 772095 986231