

中国科技核心期刊  
中文核心期刊

ISSN 1000-7075  
CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第36卷

VOL. 36

第1期 NO. 1

# 2015

中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会  
科学出版社

主办  
出版

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第 36 卷 第 1 期

2015 年 2 月

中国科技核心期刊

中文核心期刊

全国优秀农业期刊

中国水产核心期刊

中文科技期刊数据库来源期刊

中国期刊全文数据库(CJFD)来源期刊

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期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

中国生物学文献数据库来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学和渔业文摘》(ASFA)收录期刊

## 目 录

### 研究论文

- 莱州湾小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)丰度分布周年变动 ..... 王秀霞 左 涛 吴 强 陈瑞盛 (1)
- 海水人工湿地脱氮效果与系统内基质酶、微生物分析 ..... 周 强 崔正国 王加鹏 曲克明 马绍赛 毛成全 (10)
- 臭氧对赤点石斑鱼神经坏死病毒 RNA 破坏效果的评价方法的建立与应用 ..... 李 晋 史成银 王胜强 栗子丹 (18)
- 基于 Roche 454 GS FLX 的钝吻黄盖鲽(*Pleuronectes yokohamae*)微卫星标记的开发 ..... 潘 婷 张 岩 张 辉 高天翔 肖永双 姜云荣 (26)
- 三倍体牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)群体遗传多样性的微卫星分析 ..... 刘 慧 吴志昊 李 桢 朱香萍 尤 锋 宋宗诚 李 军 胡金伟 (33)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Activin 基因两种  $\beta$  亚基的启动子克隆及生物信息学分析 ..... 刘蒙蒙 王 晶 高金宁 马丽曼 张全启 (41)
- 4 种饲料投喂对鲢(*Mugil cephalus*)生长及鱼体组成的影响 ..... 郭永坚 罗昭林 阴晓丽 李俊伟 朱长波 颀晓勇 (48)
- 棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的快速筛选 ..... 孙晓飞 郭伟良 谢珍玉 王世锋 胡文婷 李富盛 王文慧 周永灿 (54)
- 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 3 号”新品种的培育 ..... 李 健 何玉英 王清印 刘 萍 李吉涛 王学忠 (61)
- 采用 OIE 标准检测养殖对虾中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的 PCR 检出类型 ..... 袁颜颜 杨 冰 万晓媛 刘 笋 刘天齐 黄 捷 (67)
- 解放眉足蟹(*Blepharipoda liberate* Shen)形态特征观察 ..... 王雪梅 (74)
- 海湾扇贝晚苗池塘底播及在褐潮暴发海区筏式养殖效果 ..... 王东哲 毛玉泽 方 笑 杜美荣 张福崇 方建光 (79)
- 急性病毒性坏死病毒魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 克隆和生物信息学分析 ..... 张 帅 王崇明 岳志芹 宋晓玲 白昌明 尹伟力 黄 捷 (85)
- 低盐环境对 3 种规格刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长与消化酶活力的影响 ..... 赵 斌 胡 炜 李成林 韩 莎 董晓亮 王 波 姜 涛 (91)
- 多棘海盘车(*Asterias amurensis*)对 5 种双壳贝类的摄食选择性及摄食节律 ..... 代克涛 李 娇 关长涛 张 媛 赵学伟 (97)
- 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)生物扰动对混养系统沉积物及间隙水中营养物质的影响 ..... 李俊伟 朱长波 郭永坚 颀晓勇 黄国强 陈素文 (103)
- 刺参养殖池环境细菌群落对底质改良剂的响应 ..... 李晓龙 李秋芬 姜妮妮 刘淮德 王晓红 宋娴丽 安鑫龙 (111)
- 多巴胺复合超滤膜的制备及其在海水养殖废水处理中的应用 ..... 王 栋 徐 佳 单宝田 宋 迪 刘瑞聪 (119)
- 研究综述
- 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的热点问题 ..... 金显仕 窦硕增 单秀娟 王震宇 万瑞景 卞晓东 (124)
- 海胆早期多巴胺能神经系统的发育及功能研究进展 ..... 汝少国 王翠翠 (132)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.36 No.1 February 2015

- Annual dynamic distributions of *Paracalanus parvus* (Copepoda Calanoida) in Laizhou Bay, China ..... WANG Xiuxia, ZUO Tao, WU Qiang, CHEN Ruisheng (1)
- Substrate Enzyme, Microbe Distribution and Denitrification Effects of the Constructed Sea Water Wetland ..... ZHOU Qiang, CUI Zhengguo, WANG Jiapeng, QU Keming, MA Shaosai, MAO Chengquan (10)
- Development and Application of the LR RT-PCR Method for Evaluating Destructive Effects of Ozone on Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus ..... LI Jin, SHI Chengyin, WANG Shengqiang, SU Zidan (18)
- Microsatellite Loci Isolated by Roche 454 GS FLX in *Pleuronectes yokohamae* ..... PAN Ting, ZHANG Yan, ZHANG Hui, GAO Tianxiang, XIAO Yongshuang, JIANG Yunrong (26)
- Genetic Diversity Analysis on Artificial Triploid Stock of *Paralichthys olivaceus* using Microsatellite DNA Marker ..... LIU Hui, WU Zhihao, LI Zhen, ZHU Xiangping, YOU Feng, SONG Zongcheng, LI Jun, HU Jinwei (33)
- Bioinformatic Characterization of Promoters of Two Activin- $\beta$  Subunit Genes in *Paralichthys olivaceus* ..... LIU Mengmeng, WANG Jing, GAO Jinning, MA Liman, ZHANG Quanqi (41)
- Effects of Four Types of Diet on the Growth and Body Composition of *Mugil cephalus* ..... GUO Yongjian, LUO Zhaolin, YIN Xiaoli, LI Junwei, ZHU Changbo, XIE Xiaoyong (48)
- Rapid Screening of Chinese Herbal Immunostimulants for *Epinephelus fuscoguttatus* ..... SUN Xiaofei, GUO Weiliang, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, LI Fusheng, WANG Wenhui, ZHOU Yongcan (54)
- Selective Breeding of Fast-Growing and Ammonia Toxicity-Resistant Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ..... LI Jian, HE Yuying, WANG Qingyin, LIU Ping, LI Jitao, WANG Xuezhong (61)
- PCR Detecting Types by the OIE Standards for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Farmed Shrimp ..... YUAN Yanyan, YANG Bing, WAN Xiaoyuan, LIU Sun, LIU Tianqi, HUANG Jie (67)
- The Morphological Characteristics of the *Blepharipoda liberate* Shen ..... WANG Xuemei (74)
- Studies on Bottom Sowing Culture in Pond and Longline Aquaculture of Late Seedling in Bay Scallop *Argopecten irradians* ..... WANG Dongzhe, MAO Yuze, FANG Xiao, DU Meirong, ZHANG Fuchong, FANG Jianguang (79)
- Full Length cDNA Cloning and Bioinformatics Analysis of Acute Viral Necrosis Virus IAP-86 Gene From *Anadara uropygimelana* ..... ZHANG Shuai, WANG Chongming, YUE Zhiqin, SONG Xiaoling, BAI Changming, YIN Weili, HUANG Jie (85)
- The Effects of Low Salinity on the Growth and Activities of Digestive Enzymes in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* ..... ZHAO Bin, HU Wei, LI Chenglin, HAN Sha, DONG Xiaoliang, WANG Bo, JIANG Tao (91)
- Selective Feeding on Five Species of Bivalves and Feeding Rhythm of *Asterias amurensis* ..... DAI Ketao, LI Jiao, GUAN Changtao, ZHANG Yuan, ZHAO Xuewei (97)
- Influence of Bioturbation of *Sipunculus nudus* on the Nutrients of Sediment and Pore Water in the Polyculture System of *S. nudus* and *Mugil cephalus* ..... LI Junwei, ZHU Changbo, GUO Yongjian, XIE Xiaoyong, HUANG Guoqiang, CHEN Suwen (103)
- Responses of Bacterial Community to the Sediment Improver in the Environment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds ..... LI Xiaolong, LI Qiufen, JIANG Weiwei, LIU Huaide, WANG Xiaohong, SONG Xianli, AN Xinlong (111)
- Preparation of Composite Ultrafiltration Membrane With Dopamine and Its Application in the Wastewater Treatment in Aquaculture ..... WANG Dong, XU Jia, SHAN Baotian, SONG Di, LIU Ruicong (119)
- Hot Spots of Frontiers in the Research of Sustainable Yield of Chinese Inshore Fishery ..... JIN Xianshi, DOU Shuozeng, SHAN Xiujuan, WANG Zhenyu, WAN Ruijing, BIAN Xiaodong (124)
- Progress on the Research of the Development and Function of the Dopaminergic Nervous System of Sea Urchin in the Early Developmental Stage ..... RU Shaoguo, WANG Cuicui (132)

# 莱州湾小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*) 丰度分布周年变动\*



王秀霞<sup>1,2</sup> 左涛<sup>2①</sup> 吴强<sup>2</sup> 陈瑞盛<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室  
山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 利用 2011 年 5 月-2012 年 4 月(除冰期 12 月和翌年 1-2 月外)在渤海莱州湾逐月由底至表垂直拖网(网孔目 160  $\mu\text{m}$ )获得的浮游动物样品,开展小拟哲水蚤丰度分布周年季节变动研究。结果显示,小拟哲水蚤季节变化呈单峰型,7-10 月份丰度较高,高峰值出现在 8 月份;水平分布以湾中部偏东侧丰度较集中,其次为湾口站位,湾顶站位为相对低值区。应用 Primer 6.0 软件中的 BIOENV 程序分析发现,小拟哲水蚤总丰度的月变化主要受水温影响、特别是 1 月前的水温,可能还受黄河径流量的间接影响;水平分布则与盐度、水深关系密切。

**关键词** 小拟哲水蚤; 季节变化; 水平分布; 莱州湾; 渤海

**中图分类号** Q178 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0001-09

莱州湾位于渤海南部,平均水深 9 m,面积约为 7000 km<sup>2</sup>。湾内及邻近水域有中国内陆第二大河黄河和其他 10 余条河流入海径流,是黄、渤海许多重要经济渔业生物的传统产卵、孵育和索饵场(金显仕等, 2000)。莱州湾水交换能力较差,水环境极易受人类活动和气候变化的影响。在过去 50 年中,莱州湾生态系统的生物群落组成已发生了明显的更替和转变。上层营养级的优势种已由 20 世纪 50 年代较大个体和较高经济价值的大黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、带鱼(*Trichiurus haumela*)和中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 80 年代后转变成生命周期短、小型中上层鱼类的黄鲫(*Setipinna taty*)和鳀(*Engraulis japonicus*), 转为 2000 年之后的无脊椎动物如口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*) (Jin *et al.*, 2013)。浮游动物中的小型(体长小于 1mm)桡足类数量大、生命周期短,是将初级生产力向高营养级传递重要的枢纽组成部分(Turner, 2004)。它们的时空分布和数量组成不仅对环境变化具有指示作用,而且其出现季节、粒级和数量优势对

于上层鱼类的补充有着更为重要的生态意义(王荣等, 2002)。因此开展莱州湾小型桡足类的研究,了解和掌握它们作为鱼类特别是幼鱼的饵料生物的种类组成和时空变动,有助于理解莱州湾鱼类早期补充机制和群落结构动态变化的生态响应。

小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)是偏暖温带近海分布较广的小型桡足类,它不仅在渤、黄、东海较为常见(毕洪生等, 2000; 高露姣等, 2003; 张芳等, 2006),在许多河口、海湾亦为主要种类(孙松等, 2008; 洪一川等, 2009; 吴玲玲等, 2012; 盖建军等, 2013)。它与双刺纺锤水蚤(*Acartia bifilosa*)、长腹剑水蚤(*Oithona* sp.)、强额拟哲水蚤(*Pavocalanus crassirostris*)是包括莱州湾在内的渤海水域小型浮游动物中的优势种类(毕洪生等, 2000; 王荣等, 2002),且其在上层经济鱼类的仔、稚鱼的开口饵料组成中占有绝对数量比例(孟田湘, 2001)。较其他海区如海洲湾(盖建军等, 2013)、胶州湾(Sun *et al.*, 2008)、南黄海中部(张芳等, 2006),渤海以及莱州湾小拟哲水蚤的研究多见于报

\* 国家重点基础研究发展规划项目(2011CB403604)和山东省自然科学基金(ZR2009EQ010)共同资助。王秀霞, E-mail: xiuxia.888@163.com

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

收稿日期: 2014-03-13, 收修改稿日期: 2014-03-25

道,包括摄食(杨纪明,1998)、垂直分布(韩希福等,2001)、季节变化(王荣等,2002; Wang *et al*, 2002),但更多基于 2000 年之前较早时期样品。莱州湾生物群落发生较大更替的 2000 年之后的相关研究还是较少(刘爱英等,2012)。

本研究依托农业部下拨的、由黄海水产研究所承担的“渤海渔业监测项目”,于莱州湾 2011 年 5 月–2012 年 4 月逐月所采集的浮游动物样品,分析莱州湾小拟哲水蚤丰度周年时空变化;比较其时空变动与水文、生物环境因子的关系,从而掌握该水域小拟哲水蚤丰度分布变动季节规律,为该水域的鱼类早期补充机制研究提供饵料生物基础资料,同时亦为中国近海湾口小型浮游动物种群研究提供更多有用参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查海区和样品采集

2011 年 5–11 月、2012 年 3 月和 4 月租用渔船“鲁昌渔 4193 号”在莱州湾海域进行了 9 个航次的逐月定点综合调查,设 18 个取样站位(图 1)。2011 年 12 月、2012 年 1 月和 2 月因莱州湾海面结冰未调查。采用中型浮游生物网(网孔径为 160  $\mu\text{m}$ ,网口面积为 0.2  $\text{m}^2$ )从底至表垂直拖网采集浮游动物样品。样品采集后固定保存于 5%的甲醛海水溶液,带回实验室分析。

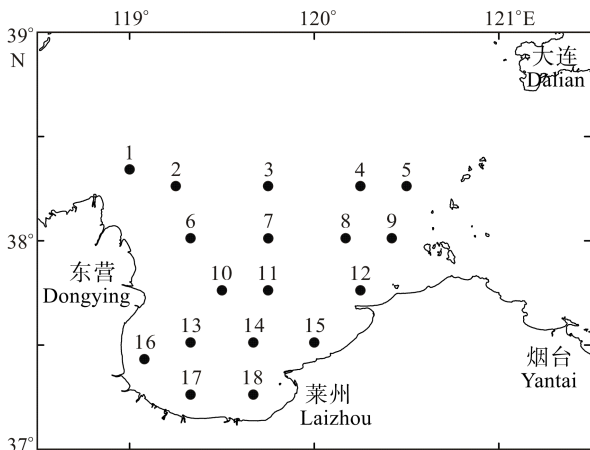


图 1 调查海区和站位分布

Fig.1 The map of the study area and sampled stations

每个作业站位,还进行浮游植物、渔业生物、水文样采集。莱州湾的水深较浅,大部分站位水文要素垂直分布都比较均匀(高会旺等,2003),本调查使用指标水质分析仪(YSI Proplus, USA)同期仅测定了表层水的酸碱度(pH)、盐度(S)、温度(T)、溶解氧(DO)。

### 1.2 样品分析

浮游动物样品在 Nikon SMZ1500 体式显微镜下

镜检、计数,记录个体体长和发育期。小拟哲水蚤的鉴定及发育期判定参考高尚武等(1986),因受分类技术水平所限,本研究仅包括桡足幼体,包括 CI-CV、CVI(F)和 CVI(M),无节幼体未纳入本研究。各发育期个体计数结果转化为丰度,用海面下个体数(ind/ $\text{m}^2$ )表示。

### 1.3 数据分析

收集到的环境因子数据包括同期以及 1–2 个月前的表层水温度、表层盐度、酸碱度和黄河月径流量。黄河月径流量摘自《2011 年中国河流泥沙公报》和《2012 年中国河流泥沙公报》。

参考周红等(2010),应用 PRIMER6.0 软件包进行系列多元统计分析。首先,小拟哲水蚤丰度和环境原始数据分别经对数和正态化转化,消除数据极差及相关数据的无量纲化。计算不同发育期小拟哲水蚤数量在各月、站位的 Bray-Curtis 相似性指数,进行组平均连接的聚类分析(Cluster analysis)和多维定标排序分析(Multidimensional scale, MDS);再用单因素相似性分析(One-Way ANOSIM)检验聚类组的结构差异显著性,确定小拟哲水蚤的丰度季节空间分布模式。环境数据的多变量排序采用主成分分析(PCA),以确定调查海域的环境时空变化梯度;最后,运用生物–环境 BIOENV(Biota-Environment)模块,计算小拟哲水蚤丰度分布与环境因子的 Weighted Spearman 相关系数,明确影响小拟哲水蚤丰度分布的最佳匹配(最大相关)环境因子或因子组合,其匹配(相关)显著性通过 RELATE 程序进行检验。

平面分布图运用 Surfer 9(Golden Software, USA)绘制。

## 2 结果

### 2.1 总丰度的月变化

所调查月份中,小拟哲水蚤都有出现。由图 2 可见,小拟哲水蚤总丰度周年变化曲线为单峰型,其丰度自 6 月开始增加,至 8 月出现峰值( $1.27 \times 10^5$  ind/ $\text{m}^2$ ),随后逐月减少。丰度大幅升高始于 7 月,其值约为 6 月的 13 倍。最低值出现于 2012 年 3 月,仅  $1.82 \times 10^3$  ind/ $\text{m}^2$ 。鉴定的各发育期中,CI–CII 幼体出现于 2011 年的 7–11 月和 2012 年 3 月,其他 3 个月较少或不出现。CIII–CV 期以及成体的丰度峰值亦出现于 8 月。

### 2.2 水平分布

如图 3 所示,2011 年 5 月、6 月和 8 月小拟哲水蚤丰度分布集中、密集中心位于近岸区域:5 月以西侧、近东营广利河河口的 16 站位居多,其丰度达  $1.85 \times 10^4$  ind/ $\text{m}^2$ ;6 月丰度分布呈现东高西低的趋势,

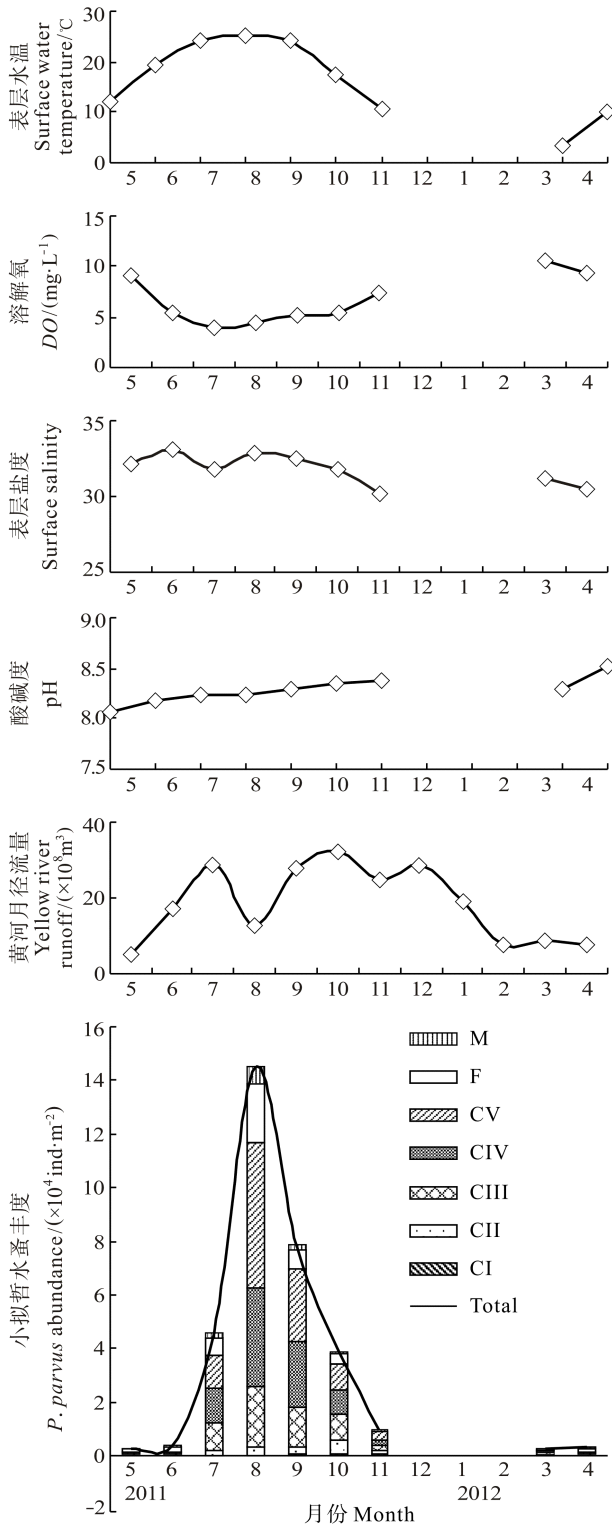


图 2 莱州湾表层水温度、溶解氧、表层盐度、酸碱度、黄河月径流量和小拟哲水蚤平均丰度月变化

Fig.2 Monthly variations of environmental factors including surface water temperature, dissolved oxygen concentration, surface water salinity, pH, the Yellow River runoff and mean abundance of *P. parvus* in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012

密集中心转移至湾东侧近岸的 15 站位; 8 月, 整个调查区的丰度普遍增加, 相对高密度区仍位于湾东侧近岸站位, 15 和 12 站位丰度最高, 分别为  $4.46 \times 10^5 \text{ ind/m}^2$  和  $4.48 \times 10^5 \text{ ind/m}^2$ 。2011 年 7 月、9 月-11 月及 2012 年 4 月密集区位于在离岸站位、湾中部海域, 沿湾西南至东北沿线分布。2012 年 3 月, 大部分个体均匀分布于湾口  $38^\circ\text{N}$  附近, 近岸海域丰度极少。

聚类分析得到(图 4), 调查所涉 9 个月在 82%相似水平可分为 M1(7-11 月)和 M2(3-6 月)两聚类组。调查所涉 18 个站在 67%相似水平被分为 3 个聚类组 S1、S2 和 S3 组, 分别位于湾口、湾中部和湾顶。两聚类结果的 MDS 压力系数(Stress)分别为 0.06 和 0.10, 均小于 0.20, 且各聚类组间差异(One-Way ANOSIM)均达极显著水平( $P < 0.01$ ), 两聚类分组均达可接受水平。

### 2.3 与环境因子关系

各环境因子的周年变化见图 2。表层水温度自 3 月逐渐升高, 8 月达到最高值  $25.1^\circ\text{C}$ 。溶解氧变化趋势与表层水温相反, 二者呈显著负相关(Pearson  $R = -0.90$ ,  $P < 0.05$ ); 黄河径流量和海水的 pH 呈显著正相关; 表层盐度在 5-11 月间呈下降趋势。图 5 和图 6 为各月份表层水温和盐度水平分布。总体而言, 表层水温度从湾顶向湾口逐渐降低, 与之相反, 表层盐度除 7 月外均表现为从湾顶向湾口递增的趋势, 7 月表层水的盐度从湾顶向湾口递减, 近岸盐度高于湾口。

环境因子 PCA 分析显示(图 7-a 和图 7-b), 调查月份可分为两组, 一组为表层水温度高、表层盐度高、溶解氧低的 6-11 月, 另一组为表层水温度低、表层盐度低、溶解氧高的 3-5 月。调查站位 3 个聚类组的环境特点对应为高盐、高溶解氧、低温的湾口深水, 高温、低盐、低溶解氧的近岸浅水湾顶, 介于前二者间的湾中部。RELATE 检验显示, 小拟哲水蚤季节和站位丰度矩阵分别与相应的环境变量矩阵的相关性都达极显著水平( $R = 0.822$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ ;  $R = 0.535$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ )。

由 BIOENV 分析可见, 影响小拟哲水蚤丰度月变化的最佳环境因子组合为当月的表层水温度; 1 个月前的酸碱度、表层水温度、溶解氧; 2 个月前的表层盐度、酸碱度, 相关性检验达显著水平(表 1)。

通过 BIOENV 分析, 对小拟哲水蚤站位间丰度差异影响最大的环境因子组合为水深和当月表层盐度, 相关性水平显著。

## 3 结论

渤海浮游动物存在着显著的优势种季节更替。与

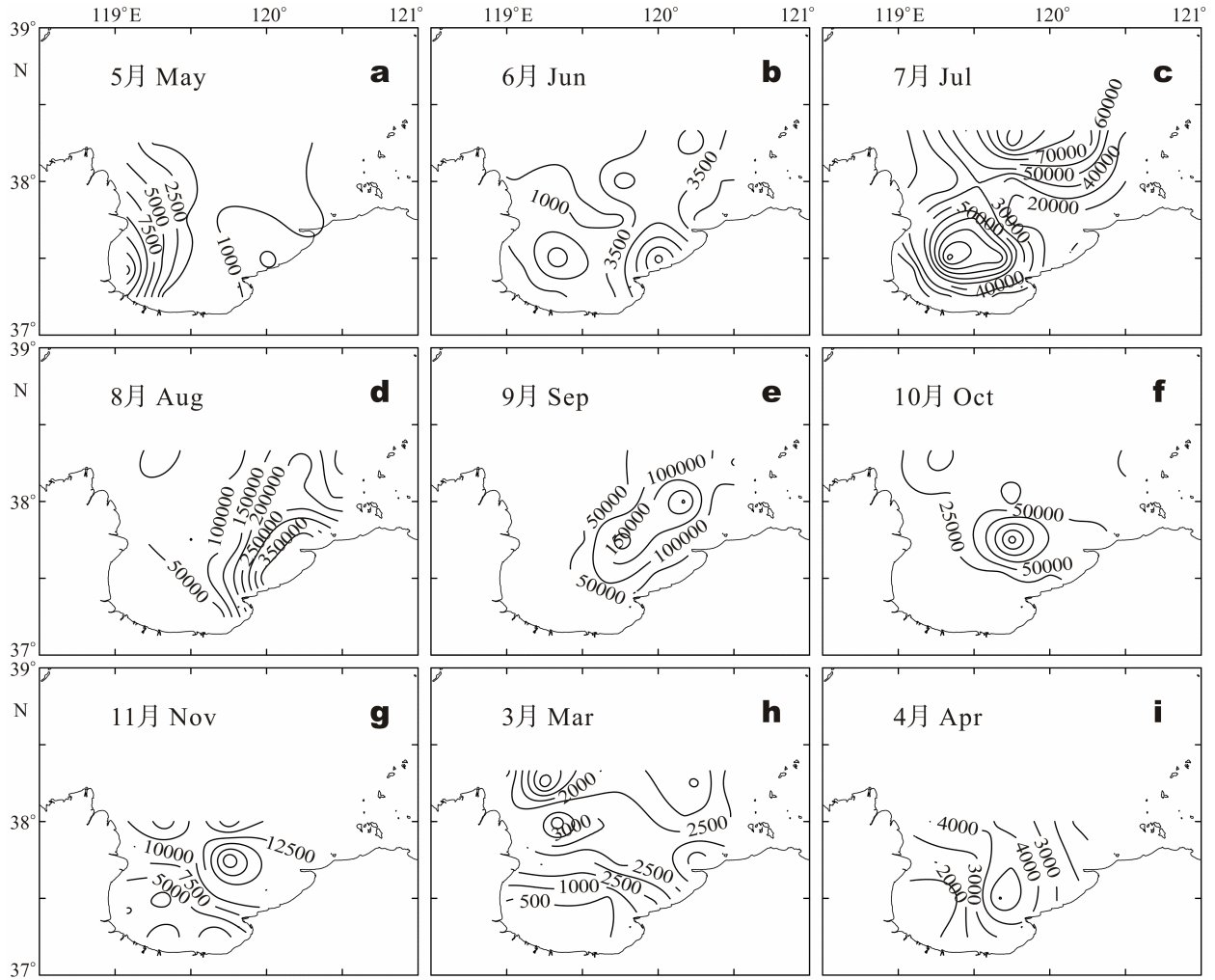


图3 2011年5月至2012年4月莱州湾小拟哲水蚤丰度(ind/m<sup>2</sup>)的水平分布  
 Fig.3 Spatial abundance(ind/m<sup>2</sup>)distribution of *P. parvus* in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012

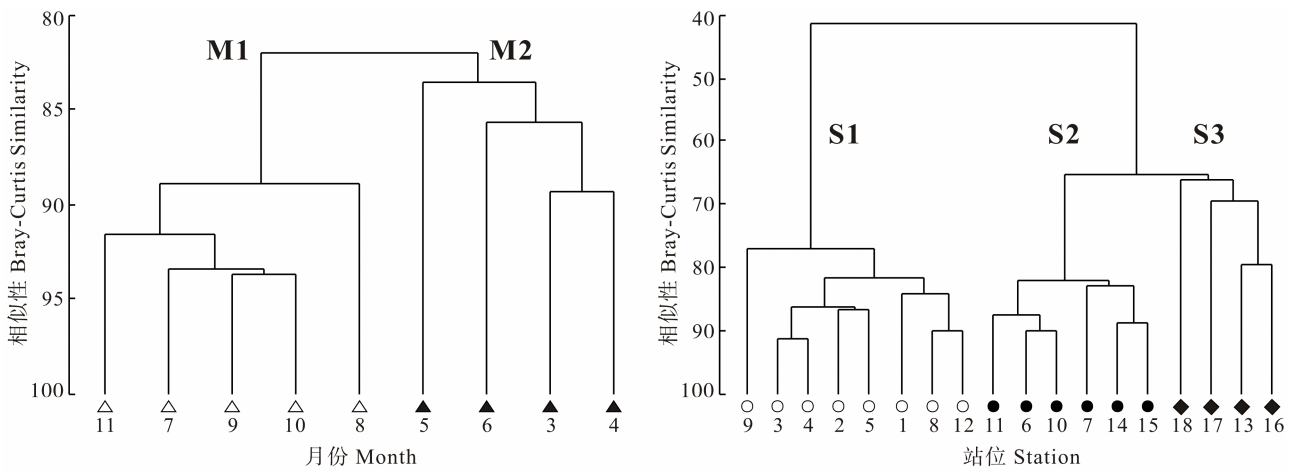


图4 小拟哲水蚤丰度季节和站位分布聚类  
 Fig.4 Plots of temporal-spatial cluster analysis based on the monthly abundance of *P. parvus* in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012

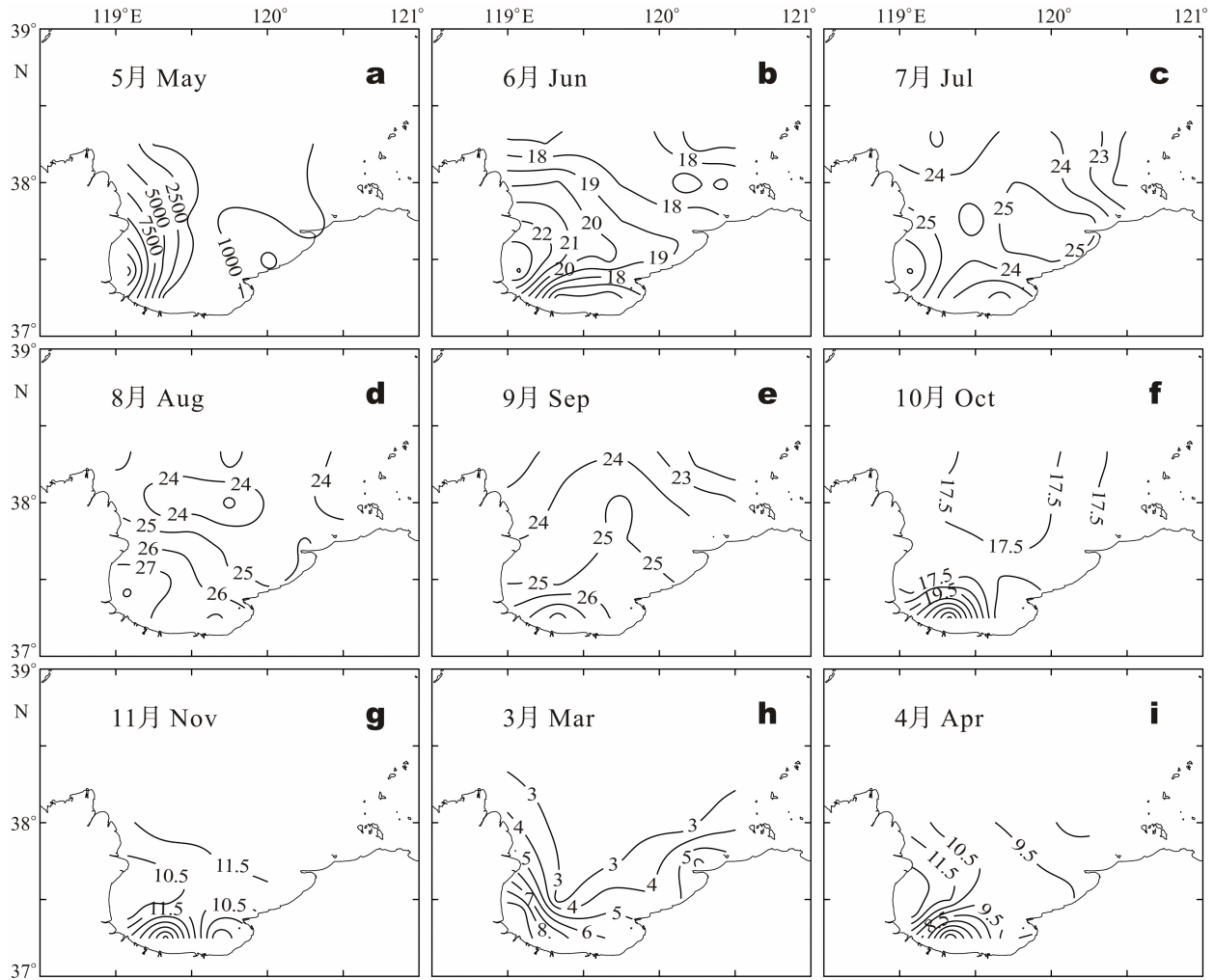


图 5 表层水温度水平分布

Fig.5 Distributions of surface water temperature in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012

之作为渤海夏、秋季主要优势种(毕洪生等, 2000、2001; 张武昌等, 2002)相适, 小拟哲水蚤在莱州湾表现明显的季节丰度变更, 3-6 月丰度较低, 而在 7-11 月丰度较高, 最高值出现于 8 月(图 2)。调查的 18 个站中, 有 11 个站的小拟哲水蚤丰度峰值均出现于 8 月, 其他站则出现于 7、9、10 月(图 3)。由此, 莱州湾小拟哲水蚤丰度周年变化呈现单峰型, 以夏、秋丰度较高, 峰值出现的季节应主要为 8 月。这与毕洪生等(2001)报道的渤海中部小拟哲水蚤的周年变动规律基本相似, 但其报道的小拟哲水蚤数量峰值出现季节为 7 月, 早于莱州湾。毕洪生等(2001)亦指出, 小拟哲水蚤在莱州湾大量繁殖始于 7 月份, 晚于在渤海西部的春季。Wang 等(2002)和王荣等(2002)报道 1959 年渤海小拟哲水蚤出现高峰季节为 6-10 月。黄海南部胶州湾的中部和近岸, 小拟哲水蚤的丰度高峰则发生于 8 月, 但其周年的丰度波动为双峰型, 即在 2-4 月还有一个数量小高峰(仲学锋等, 1992; Sun *et al.*,

2008)。日本濑户内海湾、黄海中部以及胶州湾整个水域小拟哲水蚤丰度均值的最高峰出现在 6、7 月(Liang *et al.*, 1996; 张芳等, 2006; 黄凤鹏等, 2010), 日本濑户内海湾在 9-12 月份还出现 1-2 个较小的高峰。另外, 近长江口外海小拟哲水蚤也以 8 月数量居多(高露姣等, 2003)。总体而言, 小拟哲水蚤在渤、黄、东海的丰度高值多出现在 6-8 月。比较而言, 莱州湾小拟哲水蚤的周年丰度变化呈单峰型、峰值出现季节较晚的特点, 应与该水域水温季节变化有关(图 7-a 和表 1)。莱州湾冬季水温低, 12 月-翌年 1、2 月常处于冰期, 3-5 月水温亦多低于 13°C(图 5)。而小拟哲水蚤在黄海中部丰度高密集区的水温多为 13-24°C(张芳等, 2006)以及温度大于 22.5°C 的渤海湾和莱州湾邻近水域(张武昌等, 2002)。莱州湾冬、春季的低温抑制了小拟哲水蚤桡足幼体和成体生长, 因而该种不易在此季出现丰度峰值。6 月莱州湾水温虽上升至 17-22°C, 但其当月丰度并没有显著的大幅增加, 而是



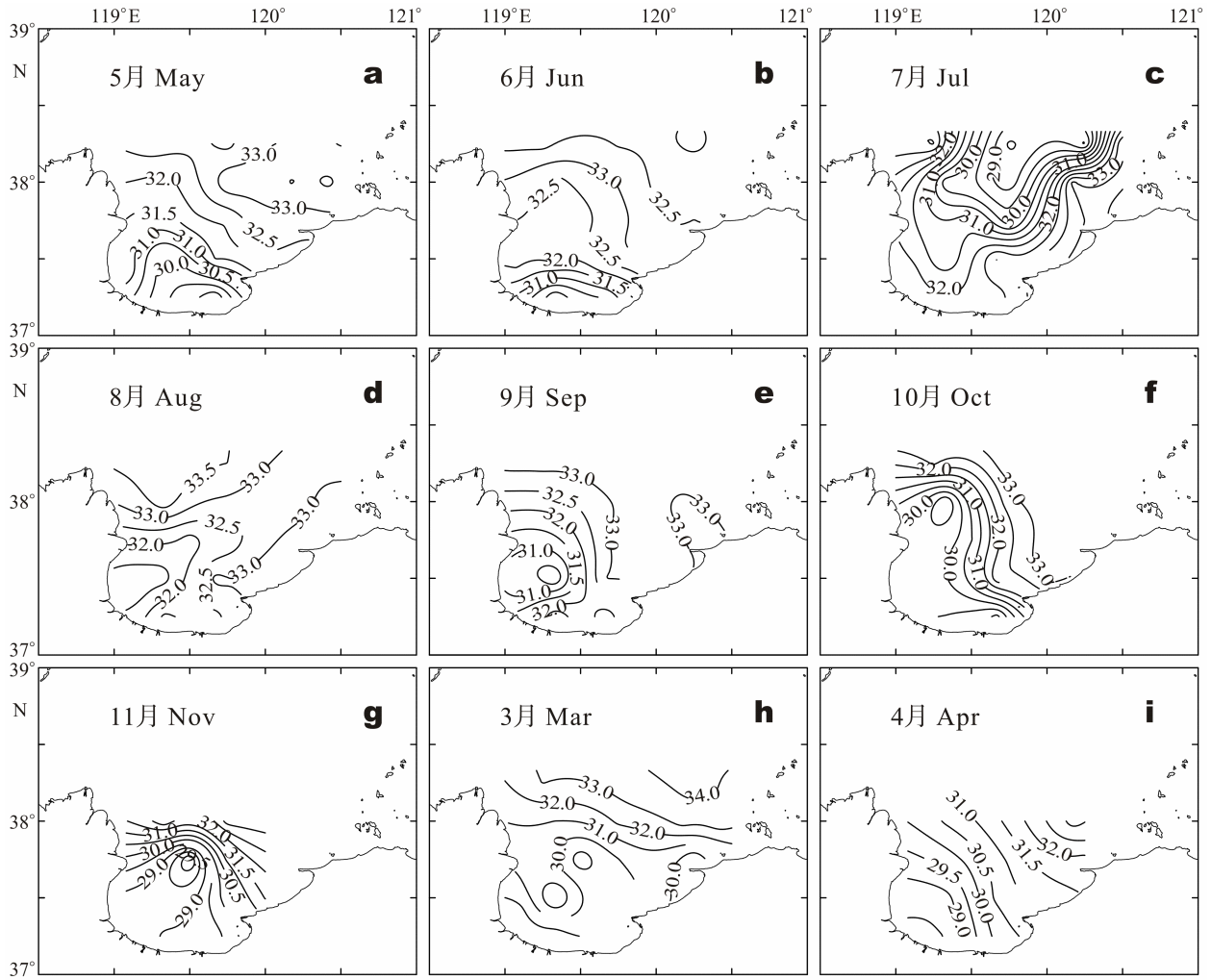


图6 表层盐度水平分布

Fig.6 Distributions of surface water salinity in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012

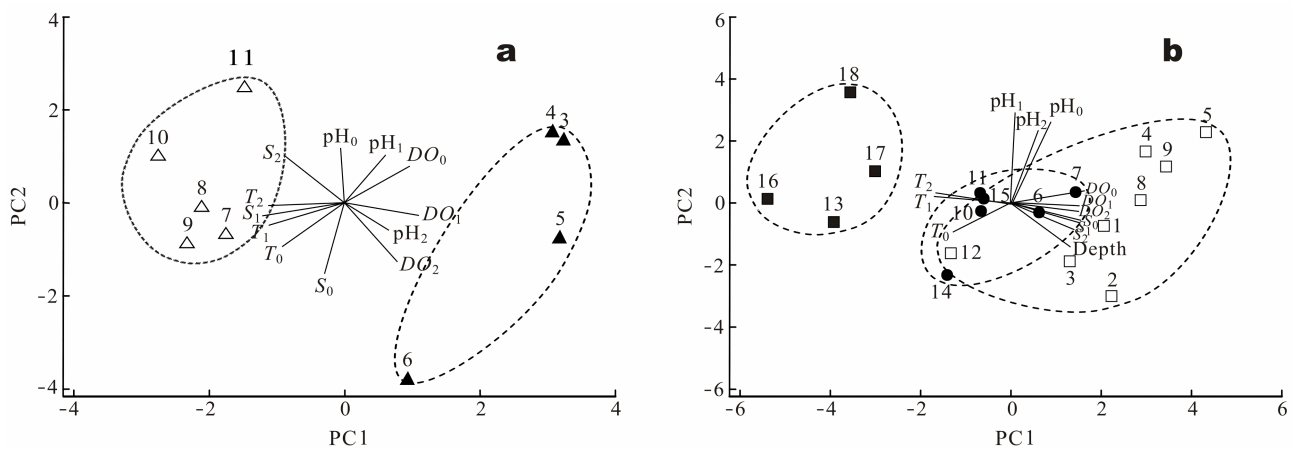


图7 环境因子 PCA 排序(a 月份; b 站位)

Fig.7 Results of PCA ordination of environmental variables in the Laizhou Bay from May 2011 to April 2012 based on variations among months (a) and stations (b)

发生在7月(图2)。这可能因为,小拟哲水蚤的世代周期长短受水温影响,在20℃以下需20-44 d、20℃以上

则15-24 d (Liang *et al*, 1996)。水温上升,缩短了小拟哲水蚤的世代周期,从而为其之后的丰度激增提供了

表 1 小拟哲水蚤丰度与环境因子组合 **Weighted Spearman** 相关系数的最佳匹配  
 Tab.1 Best combinations of *P. parvus* abundance and environmental factors similarity matrices based on the Weighted Spearman rank correlation ( $\rho$ ) analysis

编号	环境变量 Environmental variables	相关系数 $\rho$	
		月丰度 Monthly abundance	每站位的丰度 Abundance of each station
	水文 Hydrography		
1	1 月前酸碱度 pH before one month	0.518	-0.094
2	1 月前表层水温度 Surface temperature before month	0.515	0.443
3	2 月前表层水温度 Surface temperature before two months	0.475	0.457
4	1 月前溶解氧 DO before one month	0.359	0.209
5	2 月前表层盐度 Surface salinity before two months	0.325	0.499
6	当月表层水温度 Surface temperature	0.293	0.190
7	2 月前酸碱度 pH before two months	0.164	-0.109
8	当月酸碱度 pH	0.101	0.088
9	当月溶解氧 DO	0.092	0.186
10	1 月前表层盐度 Surface salinity before one month	0.015	0.532
11	2 月前溶解氧 DO before two months	-0.072	0.182
12	当月表层盐度 Surface salinity	-0.125	0.571
13	水深 Depth	—	0.676
最佳组合 Best combination		0.84*(1, 2, 4-7)	0.766*(12, 13)

\*相关性达显著水平( $P<0.05$ ) Related coefficient reached significant level ( $P<0.05$ )

可能。由此可推测,小拟哲水蚤的丰度增加较水温变化有一定的时滞,与 1 月以内的水温同时。小拟哲水蚤对温度的耐受也是有一定限制的。Liang 等(1996)认为,在  $20^{\circ}\text{C}$  以上拟哲水蚤的生长率不再增加。王荣等(2002)发现,当近岸水温高于  $26^{\circ}\text{C}$  时,小拟哲水蚤高值区有外移趋势。本研究亦发现,在 7-9 月,小拟哲水蚤高丰度( $>10^5$  ind/ $\text{m}^2$ )出现在站位的表层,水温介于  $17-25^{\circ}\text{C}$ ,且主要介于  $21-25^{\circ}\text{C}$  之间。

莱州湾水文主要受黄河以及沿岸陆地径流、渤海水流分布和季节风向变化等影响。湾口更多受外海水流影响通常表现较高盐。而湾内受黄河和沿岸陆地径流以及外海海流的影响叠加程度不同,东、西侧的环境差异较大(宋万先等, 1990; 万修全等, 2004; 刘义豪等, 2011)。西侧受黄河入海径流影响,特别是夏季丰水期(7-10 月)存在明显的黄河口低盐水舌,常表现相对低盐、高营养盐等;东部受外海水影响较多。即使夏季,由于东南风的盛行,莱州湾内海水从湾口西北方向向渤海中央扩展,此时外海高盐水以补偿形式从湾口东部进入湾东部,形成相对高盐,从而将莱州湾东侧与西侧水文区分开来。与水文特点相适应,莱州湾的生物群落一般可分为受外海水影响较大的近渤海中部莱州湾湾口群落、陆地径流影响较大的莱州湾及黄河口邻近的湾顶群落以及介于前二者之间莱州湾

偏东侧的中部群落(周红等, 2010; 刘爱英等, 2012)。本研究结果中,莱州湾小拟哲水蚤空间丰度分布组群划分与之基本相似。比较图 3 和图 6 可以发现,小拟哲水蚤的高丰度( $>10^5$  ind/ $\text{m}^2$ )出现站位的表层盐度多为  $32.0-33.2$ 。除 5 月其丰度相对高值出现在湾内西侧湾顶站位外,其他月该种的密集程度依次为湾中部偏东侧(水深介于  $10-15$  m)丰度最高、其次为湾口站位(水深 $>15$  m),最少的位于湾顶站位( $<10$  m)。由 PCA 结果(表 1 和图 7),亦证实小拟哲水蚤在莱州湾内更多分布于相对高盐和水深的水域。小拟哲水蚤在莱州湾内偏高盐、水深的水平分布特点与其作为暖温带近海类型种的生态习性是相符的。此外,渤海海流经由莱州湾湾口外出渤海、进入黄海(赵保仁等, 1995),在黄河口东南部的流场亦为顺岸流出湾外(黄大吉等, 2002),二者共同作用亦可能造成小拟哲水蚤在莱州湾东侧的聚集。从本研究结果可知,小拟哲水蚤时空分布除与水温 and 盐度有明显的关系外,还与 1 个月前水体的 pH 值呈明显的正相关(表 1)。而 pH 值与黄河径流量呈显著的正相关,因此,推测 1 月前的黄河径流量也可能是影响小拟哲水蚤的时空分布的间接因素。

小拟哲水蚤的分布不仅与温、盐具有一定关系,它还可能受食物、捕食者等其他生物因素的影响。如,小拟哲水蚤营浮游植物食性,但其对浮游植物的摄食

具有一定的选择性,且摄食强度具有季节变化(杨纪明,1998)。此外,莱州湾鱼类产卵盛期虽为5-6月,而营浮游动物食性的鱼类,如鳀的仔稚鱼以8月居多(万瑞景等,1998)。而与本研究同期调查所获的鱼类营养结构分析显示,莱州湾浮游动物桡足类食性的鱼类,如赤鼻棱鳀、许氏平鲉和青鳞沙丁鱼等以7-10月居多(张波等,2013),这与小拟哲水蚤的丰度峰值出现时期基本吻合,也证实了小拟哲水蚤作为鱼类开口饵料所具备的出现季节优势(王荣等,2002)。目前鉴于分析资料局限性,要深入探求小拟哲水蚤的丰度分布与其他生物间关系尚存在一定困难。我们将在进一步收集和完善的同期调查所获的仔稚鱼、浮游植物资料的基础上,继续开展莱州湾小拟哲水蚤丰度分布与仔稚鱼、浮游植物等相关关系的研究,以更好地了解和明确该桡足类在莱州湾生态系统的功能地位。

**致谢:** 本研究海上样品采集和处理还得到孙坚强、陈峻峰以及农业部黄渤海渔业资源环境重点野外科学观测试验站工作人员的帮助,谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- 万修全,吴德星,鲍献文,等. 2000年夏季莱州湾主要观测要素的分布特征. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(1): 7-12
- 万瑞景,姜言伟. 渤海硬骨鱼类鱼卵和仔稚鱼分布及其动态变化. 中国水产科学, 1998, 5(1): 43-50
- 王荣,张鸿雁,王克,等. 小型桡足类在海洋生态系统中的功能作用. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 453-460
- 孙松,周克,杨波,等. 胶州湾浮游动物生态学研究 I. 种类组成. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 1-7
- 毕洪生,孙松,高尚武,等. 渤海浮游动物群落生态特点 I. 种类组成和群落结构. 生态学报, 2000, 20(5): 715-721
- 毕洪生,孙松,高尚武,等. 渤海浮游动物群落生态特点 II. 桡足类数量变动与分布. 生态学报, 2001, 21(2): 177-185
- 刘义豪,杨秀兰,靳洋,等. 莱州湾海域营养盐现状及年际变化规律. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 1-5
- 刘爱英,宋秀凯,刘丽娟,等. 夏季莱州湾浮游动物群落特征. 海洋科学, 2012, 36(10): 61-67
- 仲学锋,肖贻昌. 胶州湾3种哲水蚤种群动态的研究. 海洋科学, 1992(1): 44-48
- 吴玲玲,朱艾嘉,郭娟,等. 珠江口夏季中、小型浮游动物生态特征研究. 海洋通报, 2012, 31(6): 689-694
- 杨纪明. 渤海小拟哲水蚤摄食的初步研究. 现代渔业信息, 1998, 13(5): 5-9
- 宋万先,姜太良,刘建军. 莱州湾的温、盐状况. 海洋科学进展, 1990, 8(4): 41-46
- 周红,华尔,张志南. 秋季莱州湾及邻近海域大型底栖动物群落结构的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(8): 80-87
- 金显仕,邓景耀. 莱州湾渔业资源群落结构和生物多样性的变化. 生物多样性, 2000, 8(1): 65-72.
- 张芳,孙松,杨波,等. 黄海小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)丰度的季节变化. 海洋与湖沼, 2006, 37(4): 322-329
- 张波,吴强,金显仕. 莱州湾鱼类群落的营养结构及其变化. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 1-9
- 张武昌,王克,高尚武,等. 渤海春季和秋季的浮游动物. 海洋与湖沼, 2002, 33(6): 630-639
- 孟田湘. 山东半岛南部鳀鱼产卵场鳀鱼仔、稚鱼摄食的研究. 海洋水产研究, 2011, 22(2): 21-25
- 洪一川,陈栩,朱长寿. 湄洲湾中、小型浮游动物的分布. 台湾海峡, 2009, 28(2): 238-243
- 赵保仁,庄国文,曹德明,等. 渤海的环流、潮余流及其对沉积物分布的影响. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 466-473
- 黄大吉,苏纪兰. 黄河三角洲岸线变迁对莱州湾流场和对虾早期栖息地的影响. 海洋学报, 2002, 24(6): 104-111
- 高会旺,吴德星,白洁,等. 2000年夏季莱州湾生态环境要素的分布特征. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2003, 33(2): 185-191
- 高尚武,林雅蓉. 胶州湾桡足类的生物学研究 I. 小拟哲水蚤桡足幼体的变态. 海洋科学, 1986, 10(1): 51-59
- 高露姣,杨元利,李丁成,等. 黄海南部及东海中小型浮游桡足类生态学研究IV. 拟哲水蚤属. 水产学报, 2003, 27(增刊): 23-30
- 黄凤鹏,孙爱荣,王宗灵,等. 胶州湾浮游动物的时空分布. 海洋科学进展, 2010, 28(3): 332-341
- 盖建军,袁广旺,李琴. 海州湾渔场小拟哲水蚤的生态学研究. 淮海工学院学报, 2013, 22(3): 89-92
- 韩希福,王荣,王军萍. 渤海中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)和小拟哲水蚤(*Paracalanus Parvus*)种群垂直移动生态适应性模型研究. 生态学报, 2001, 21(5): 820-826
- Jin XS, Shan XJ, Li XS, et al. Long-term changes in the fishery ecosystem structure of Laizhou Bay, China. Science China (Earth Sciences), 2013, 56(3): 366-374
- Liang D, Uye S. Population dynamics and production of the planktonic copepods in a eutrophic inlet of the Inland Sea of Japan. III. *Paracalanus* sp. Mar Biol, 1996, 127(2): 219-227
- Sun XH, Sun S, Li CL, et al. Seasonal and spatial variation in abundance and egg production of *Paracalanus parvus* (Copepoda: Calanoida) in/out Jiaozhou Bay, China. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2008, 79(4): 637-643
- Turner JT. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. Zool Stud, 2004, 43(2): 255-266
- Wang R, Zhang HY, Wang K, et al. Distribution and population dynamics of *Paracalanus parvus*, *Paracalanus crassirostris*, and *Acartia bifilosa* (copepod, calanoida) in the Bohai Sea. Chin J Oceanol Limnol, 2002, 20(4): 348-357

## Annual dynamic distributions of *Paracalanus parvus* (Copepoda Calanoida) in Laizhou Bay, China

WANG Xiuxia<sup>1,2</sup>, ZUO Tao<sup>2①</sup>, WU Qiang<sup>2</sup>, CHEN Ruisheng<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** Small copepod *Paracalanus parvus* is the dominant zooplankton species for early larvae of fishes as food in the critical spawning and nursery habitat of Laizhou Bay, Bohai Sea. Annual dynamic distributions of the species in the bay were studied based on the zooplankton samples that were collected from May 2011 to April 2012 by a net with 50 cm diameter and 160 micron mesh size. In this study, stage-specific abundance of *P. parvus* from the original sorting was transformed before the multiple analysis including cluster analysis and multidimensional scale. Principal component analysis (PCA) and RELATE modules of BIOENV in software Primer 6.0 were used to seek the best matches of environmental factors that affect distribution of *P. parvus*. As the most common copepod in Laizhou Bay, *P. parvus* was observed at all stations during the investigated period. The species was more abundant from July to October compared with other seasons and its abundance peaked in August. By cluster analysis based on the copepod stage-specific abundance, three stations groups were recognized. The one was located on outside of Laizhou Bay near the central Bohai Sea; the second was located to the runoff inlet of the west of the bay; the third was appeared in the transition area of the two mentioned groups before. The abundance of *P. parvus* reached the highest in the transition group and the lowest in the group outside the runoff inlet. According to the results of BIOENV analysis, the surface water temperature and pH co-regulated seasonal distributions of *P. parvus*, while seawater salinity and depth had stronger effects on the spatial distributions. The significant correlations between seawater pH and Huanghe River runoff suggest that runoff one month earlier may be a possible indirect factor that affects the temporal variations of the *P. parvus*.

**Key words** *Paracalanus parvus*; Spatial distribution; Temporal variation; Laizhou Bay; Bohai Sea

---

① Corresponding author: ZUO Tao, E-mail: zuotao@ysfri.ac.cn

# 海水人工湿地脱氮效果与系统内基质酶、微生物分析\*



周强<sup>1,2</sup> 崔正国<sup>2</sup> 王加鹏<sup>1,2</sup> 曲克明<sup>2①</sup> 马绍赛<sup>2</sup> 毛成全<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 海阳市黄海水产有限公司 烟台 265122)

**摘要** 利用人工湿地系统探讨了海水养殖外排水中不同形态氮的去除效果,分析了系统内部微生物空间分布、基质酶活性对氮去除效率的影响,深入研究了系统内部各微生物间相互作用、基质酶活性与微生物空间分布关系。选择互花米草为人工湿地植物,种植密度为64株/m<sup>2</sup>;基质填料选择细纱、高炉矿渣和珊瑚石。在3种不同工况条件下,研究人工湿地系统中氮的去除效果、微生物数量和基质酶活性。结果显示,系统对TN、NH<sub>4</sub>-N平均去除率分别为(25.02±12.69)%、(82.91±17.51)%;系统中不同基质层次的微生物数量和脲酶、脱氢酶活性不同,基质中、上层好氧微生物数量和脲酶、脱氢酶活性显著大于下层,系统下行池中、上层硝化细菌、亚硝化细菌显著高于下层,中、上层反硝化细菌数量明显低于下层;细菌总数与TN( $R^2=0.50$ )和NH<sub>4</sub>-N( $R^2=0.61$ )去除率存在一定正相关性,基质脲酶与TN去除率存在显著正相关性( $R^2=0.86$ )。研究结果将有助于理解海水人工湿地处理系统中氮的迁移转化机制。

**关键词** 人工湿地; 脱氮; 去除率; 酶活性; 微生物

**中图分类号** X714 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0010-08

人工湿地系统净化污水主要是通过植物、微生物、基质间发生一系列的物理、化学及生化反应,达到净化废水的目的(Hammer, 1988; 王加鹏等, 2014)。多数学者认为,湿地系统中微生物对污水净化起着决定作用(Smith, 1997; Greenway, 1997; Pinney *et al.*, 2000)。湿地系统内部微生物数量的空间分布会直接影响着整个系统对养殖废水的去除效果,不同微生物菌落集聚于不同空间,形成了相互交错的微生态环境“小室”,在净化养殖废水的作业区内扮演着重要的角色(Correa-Galeote *et al.*, 2013)。基质酶作为一种生物催化剂,来源于系统内部微生物、动物以及植物根系,其功能是加速系统中有机物的化学反应,从而有助于提高湿地系统净化功能(梁威等, 2003; 李智等, 2005),还有研究表明,基质酶的存在有效提高了人

工湿地处理系统对养殖外排水NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、TN的去除率(Kadlec *et al.*, 1996; Kir, 2001; Schmidt, 2003)。目前,国内外学者对于淡水人工湿地水处理系统中基质酶活性和微生物空间分布的研究较多(岳春雷等, 2004; Schmidt *et al.*, 2003; Stottmeister *et al.*, 2003; Fleming *et al.*, 2002; Menon *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2011),而对于海水人工湿地系统净化养殖外排水中酶活性和微生物空间特征的研究相对较少。本研究利用人工湿地净化海水养殖外排水的实验,测定了人工湿地系统内不同层次的基质酶活性和微生物数量,并结合氮的去除率,探讨了人工湿地系统脱氮效果与基质微生物、酶活性分布的关系,以期为深入研究海水养殖外排水人工湿地处理系统的脱氮机理奠定理论依据。

\* 国家自然科学基金青年基金(31101906)和国家科技支撑计划课题(2011BAD13B04)共同资助。周强, E-mail: zhouqiang15849584841@126.com

① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-18, 收修改稿日期: 2014-03-20

## 1 材料与方法

### 1.1 人工湿地系统构建

在实验室构建小型人工湿地模拟系统(图 1-a)。人工湿地长 0.6 m、宽 0.4 m、高 0.7 m。系统由上、下行池组成,下行池填充基质 0.5 m,由下到上依次是粗珊瑚石、炉渣、细砂,上行池填充基质 0.4 m,填充基质类型与下行池相同,系统底部均设排污系统。系统内耐盐植物采自山东省烟台市海阳滩涂互花米草,其生长盐度为 26–33,种植密度为 64 株/m<sup>2</sup>。

### 1.2 设计与方法

海水养殖外排水由饵料和海水配制而成,根据实验需要添加适量 3.83 mg/L NH<sub>4</sub>Cl、0.43 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.5 g/L 葡萄糖。其进水水质,温度为 25–31℃,pH 为 7.4–8.5,盐度为 29–33,溶解氧为 1.5–5.5 mg/L, NH<sub>4</sub>-N 浓度范围为 0.30–0.40 mg/L, TN 1.4–2.5 mg/L, 悬浮物为 6–12 mg/L, 浊度为 0.06–0.12。养殖外排水采用循环水处理方式,运行周期为 9–10 d,达到预期效果后,再重新注入养殖外排水循环处理。系统稳定运行 60 d 后,设置 3 个水力停留时间分别为 16 h(工况 1)、24 h(工况 2)、36 h(工况 3)。每天监测出水口 NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N 和 NO<sub>3</sub>-N 的浓度变化情况,pH、温度、溶氧、盐度等采用美国 YSI 多参数分析仪测定。NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、TN 等指标的测定依据《海洋监测规范》(GB12763 4-2007);NH<sub>4</sub>-N 采用纳氏试剂分光光度法,NO<sub>3</sub>-N 采用锌镉还原法,NO<sub>2</sub>-N 采用乙二胺分光光度法,TN 采用过硫酸钾氧化法,悬浮物采用重量法,浊度采用分光光度法。其数据采用软件 SPSS 10 进行方差分析,用软件 Origin 8 作图。

基质样品采集设置上、下行池 3 层 6 个采样点(图 1-b),样品采集后混合,以备测定。基质附着微生物测定选取与系统脱氮反应有关测定方法按参考文献(许光辉等,1986)进行。基质脲酶的测定采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定,脱氢酶采用 TTC 紫外分光光度法测定(赵连梅等,2009),微生物数量采用稀释平板计数法,细菌采用 2216E 培养基(苗婷婷等,2012)培养周期为 7 d。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工湿地脱氮效果与影响因素分析

**2.1.1 脱氮效果** 人工湿地系统中 NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N 和 TN 的变化情况,如图 2、图 3 所示。人工湿地对 NH<sub>4</sub>-N 具有良好的去除效果,在一个运行周期内(9–10 d),循环水处理系统内的 NH<sub>4</sub>-N 浓度总体呈下降趋势。NH<sub>4</sub>-N 的进水浓度为 0.30–0.40 mg/L,当系统处理 2 d 后,试验中 NH<sub>4</sub>-N 的浓度基本上降低到 0.10 mg/L 以下,去除率在 70% 以上;循环到第 4 天时,NH<sub>4</sub>-N 浓度降到 0.05 mg/L 以下,去除率超过 80%;至第 9、10 天,NH<sub>4</sub>-N 平均去除率为(92.63±4.29)%,最高达到 98.27%。随着水力停留时间的增加,NH<sub>4</sub>-N 的去除率不断增加。水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,NH<sub>4</sub>-N 的平均去除率分别为(79.40±5.49)%、(82.44±2.63)%、(87.84±1.81)%。系统对 TN 的去除效果稍差,至第 8 天左右,TN 平均去除率为(31.83±10.08)%,最高达到 53.91%。系统内 TN 有时会出现浓度升高的情况,这可能与 TN 的累积、植物和微生物的新陈代谢等因素有关。水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,循环周期结束时,TN 的平均去除率分别为(38.42±12.64)%、(25.97±1.30)%、(26.22±9.37)%。

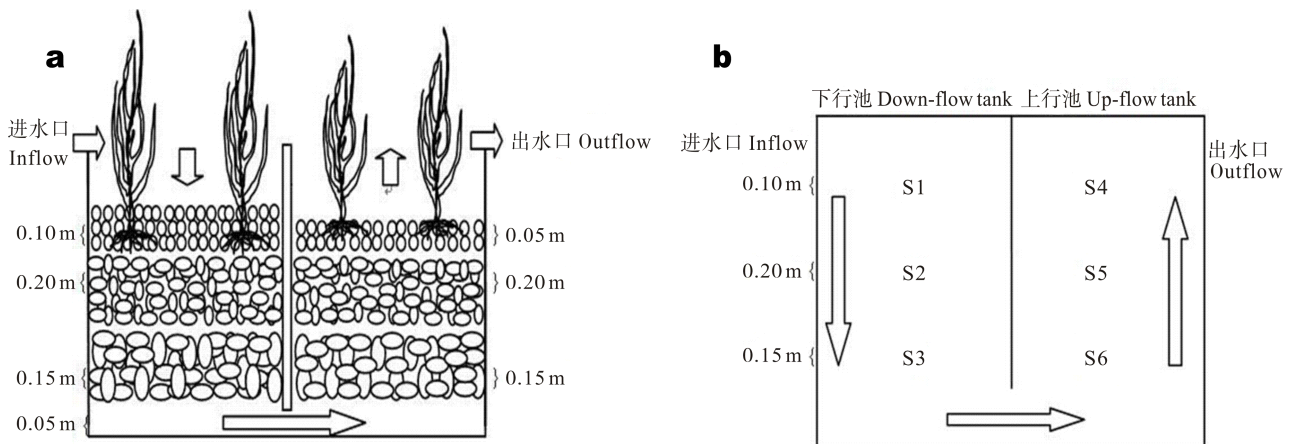


图 1 人工湿地处理系统

Fig.1 The constructed wetland treatment system

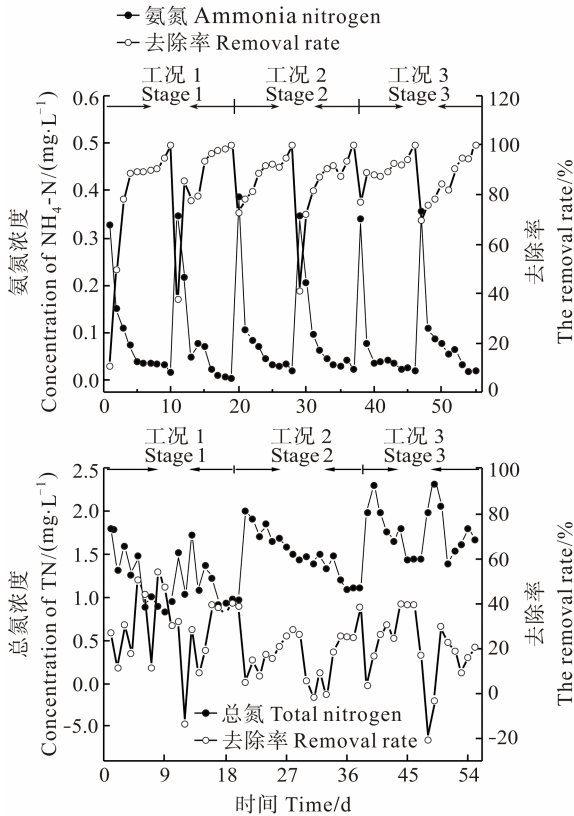


图2 海水人工湿地系统中 NH<sub>4</sub>-N、TN 变化情况  
Fig.2 The variation of ammonia nitrogen and total nitrogen in the constructed wetland

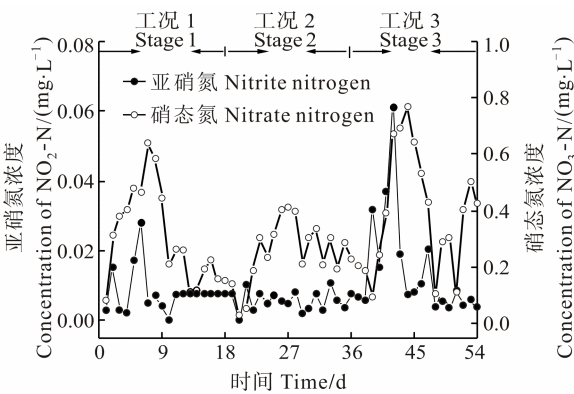


图3 海水人工湿地系统中 NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N 变化情况  
Fig.3 The variation of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in the constructed wetland

整体来看随着系统的运行, 水体中 NH<sub>4</sub>-N 浓度逐渐降低, NO<sub>3</sub>-N 浓度逐渐升高, 系统运行到每个工况的第5天, NO<sub>3</sub>-N 浓度值达到波峰, 最高为 0.80 mg/L, 其后浓度开始降低。NO<sub>3</sub>-N 浓度随着系统的处理呈先升高后降低的趋势, 这种波动趋势与张海耿等(2012)的研究极为相似, 可能与系统内部氧化还原环境有关。系统内 NO<sub>2</sub>-N 浓度较低, 一般在 0.005–0.010 mg/L 内波动。

**2.1.2 硝化反应对脱氮的影响** 多数研究者认为, 硝化过程共分为两步进行(Schmidt *et al*, 2003; 许光辉等, 1986), 是自养型细菌将氨转化为亚硝酸盐和硝酸盐的过程。第一步, 亚硝化细菌将系统中大部分 NH<sub>4</sub>-N 转化为亚硝酸盐, 反应时间较长, 所以系统运行初期 NO<sub>2</sub>-N 的含量几乎没有, 第二步则由兼性的硝化细菌将亚硝酸盐快速转化为硝酸盐。运行初期, 系统中无机氮以 NH<sub>4</sub>-N 为主, 随着反应时间的加长, NO<sub>3</sub>-N 比例不断增加, 至第 7 天, 系统内 NO<sub>3</sub>-N 的比例超过 90%。整个循环周期内, NO<sub>2</sub>-N 浓度总体上变化不大, 所占比例在 0.37%–7.92%, 平均为 2.34%(图 4)。随着停留时间的增长, 循环周期末期系统内 NO<sub>3</sub>-N 所占比例有所增加, 水力停留时间为 36 h, 当系统运行到第 8 天, NO<sub>3</sub>-N 所占比例达到 95%。由此可见, 延长水力停留时间有利于系统内氨态氮向硝态氮充分转化。此外, 湿地植物互花米草自身生命活动也会吸收部分 NO<sub>3</sub>-N, Balmér(2012)认为, 生长在湿地中的不同植物在湿地净化废水过程中对无机氮的吸收能力大小不同, 通常根系发达的水生植物生命活动中所需外界提供的营养物质相对较多, 进而更多的参与湿地系统对水质中氮的有效降解活动中。根据硝化过程的质量平衡显示(Sun *et al*, 2007), 湿地系统中被氧化的 NH<sub>4</sub>-N 应近似等于 NO<sub>2</sub>-N 和 NO<sub>3</sub>-N 产生的量加上植物吸收的少量的氮。

一般认为, 硝化反应会受到温度、pH、DO、无机碳源、微生物群落以及系统中 NH<sub>4</sub>-N 浓度等多种因素的影响, 系统进水采取喷洒式, 有效地增加了水体中的溶解氧, 加之互花米草特有发达的根系泌氧功能, 使得系统中、上层的好氧型硝化细菌发生一系列

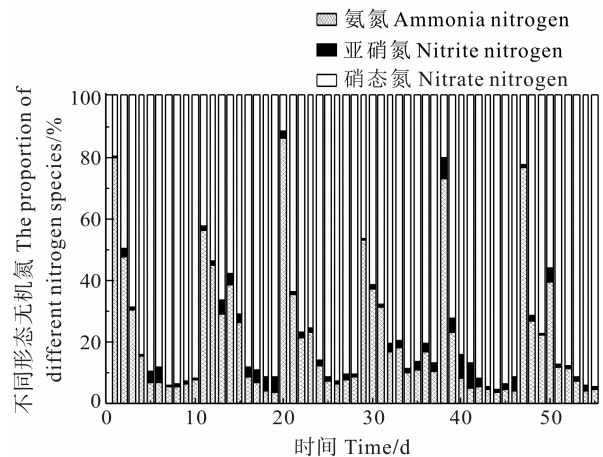


图4 人工湿地系统中 NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N 比例变化情况

Fig.4 The variation of percentages of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in the constructed wetland

的生化反应,加速了含 N 物质间的相互转化,便于被植物、动物、微生物吸收利用。系统内温度始终处于 25–31℃ 之间,对其整个系统内部植物、微生物的生命活动和新陈代谢的影响不明显。研究发现,异养菌也可以在硝化反应中扮演着重要的角色(Reddy *et al.*, 1997)。

**2.1.3 反硝化反应对脱氮的影响** 硝化反应产生的  $\text{NO}_3\text{-N}$  在厌氧的条件下被反硝化细菌还原为  $\text{N}_2$  和  $\text{N}_2\text{O}$ ,因而系统中  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度取决于硝化反应产生的  $\text{NO}_3\text{-N}$  和反硝化反应消耗的  $\text{NO}_3\text{-N}$  两个方面。一般情况下,系统的上层植物区域溶氧较高,加之植物根区泌氧,反硝化反应会受到抑制,系统中下层有利于反硝化反应进行。系统运行初期,反硝化作用较小,系统中  $\text{NO}_3\text{-N}$  比例不断增加,到第 8 天,  $\text{NO}_3\text{-N}$  比例开始下降,反硝化作用增强。此时, TN 去除率亦相对较高,达到 30%。基质上层的互花米草在对  $\text{NO}_3\text{-N}$  的去除过程中也起到一定作用。Kirk(2001)的研究表明,由于湿地植物根部的泌氧,即便在  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量占有绝对优势的情况下,植物也能吸收  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,植物主要以吸收离子氮为主,也包括一些小分子含氮有机物如氨基酸等。但总的说来,植物吸收的作用相对有限,微生物硝化/反硝化脱氮依然是整个湿地系统处理外排水的主要途径(Sun *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2005),而 Liang 等(2000)和 Bachand 等(2000)研究表明,人工湿地氮的迁移转化过程中硝化作用能够彻底改变氮的存在形态从而降低  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量,反硝化在脱氮过程中发挥了至关重要的作用。

反硝化会受到温度、pH、DO、有机碳等因素的影响(Kuschik *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004)。试验中添加适量饵料和葡萄糖可为反硝化细菌提供有机碳源,有利于  $\text{NO}_3\text{-N}$  的去除。反硝化过程中产生的  $\text{N}_2\text{O}$  含量取决于反硝化氮的量以及产生的  $\text{N}_2$  和  $\text{N}_2\text{O}$ 。多数研究者(Fleming *et al.*, 2002; Vymazal, 1999; Zheng *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2000; Gerke *et al.*, 2001; Vymazal, 2007; Horne, 1995; Gao *et al.*, 1990; Vymazal *et al.*, 1998)认为,当 pH 值较低时,反硝化的第二步则受抑制,造成硝酸盐大量积累,当  $\text{pH}<4.0$  时,产生  $\text{N}_2\text{O}$  为主,  $\text{pH}>6.0$  时,以产生  $\text{N}_2$  为绝对优势,因此用于污水处理的人工湿地的基质的 pH 值应高于 6.0,而本试验所测指标 pH 范围为 7.4–8.5,故此条件有利于反硝化脱氮的有效发挥。此外,越来越多的研究表明,在有氧条件下,反硝化反应依然可以进行(Laanbroek, 1990)。

**2.1.4 氨化反应对脱氮的影响** 系统中的氨化反应是将有机氮转化为氨的过程,但不是系统脱氮的关键环节。氨化细菌会受到温度、pH、溶氧、可利用

的能量物质的影响(Gerke *et al.*, 2001)。氨化反应属于好氧过程,会与硝化反应竞争部分氧气,所以溶解氧对于  $\text{NH}_4\text{-N}$  的去除影响较大。系统内部的氨化细菌将有机氮通过多步生化反应转化为氨,其本质是氨基酸的分解过程,溶氧高的区域氨化细菌异常活跃。当系统出水口溶氧为 4.5 mg/L 时,  $\text{NH}_4\text{-N}$  的去除率为 61.3%,明显高于溶氧为 2.0 mg/L 时的 25.4%。试验开始阶段 pH 值在 7.5 上下波动,而后随着系统的处理, pH 值有所升高。pH 值在 7.5–8.5 之间,氨挥发作用明显,当 pH 值小于 7.5 即可忽略(Gao *et al.*, 1990; Verhoeven *et al.*, 1999)。

## 2.2 酶活性

**2.2.1 脲酶** 人工湿地系统中不同采样点的基质脲酶活性见图 5。在下行池的 S1、S2、S5、S6 采样点脲酶活性较高,下行池的 S3 和上行池的 S4 脲酶活性相对较低。造成这种现象的原因可能是系统中上层微生物数量及有机物含量较高(梁威等, 2003; 李智等, 2005),另外下层温度较低,可能也是造成脲酶活性较低的原因之一。上层区域的互花米草产生大量根际分泌物刺激了较为敏感的脲酶,使其活性大小比较为  $\text{S2}>\text{S1}$ ,  $\text{S6}>\text{S5}$ ,所以植物根区的分泌物在系统净化机理中不容忽视。

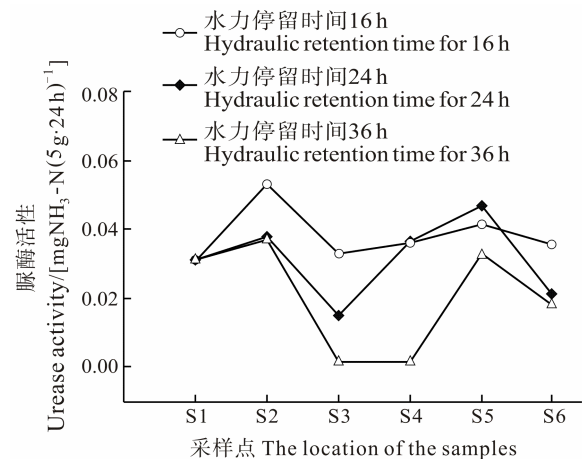


图 5 人工湿地系统不同采样点脲酶活性对比  
Fig.5 The comparison of urease activity at different sampling positions of the constructed wetland

在水力停留时间为 16 h 条件下,各层次脲酶活性均达到  $0.03 \text{ mg NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$  以上,且活性分布均匀。 $\text{mg NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$  为 24 h 后 5 g 基质中  $\text{NH}_3\text{-N}$  的毫克数,表示脲酶活性。而水力停留时间为 24 h 和 36 h 条件下的系统各层次脲酶活性呈现明显高低分布,活性最低为  $0.002 \text{ mg NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$ ,最高可达到  $0.047 \text{ mg NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$ 。由于水力停留时间较小,



使得系统内部各个微环境有机物含量均匀分布,避免了系统内部有机物局部堆积,充分为各层次微生物、植物、动物新陈代谢提供营养物质;另一方面,系统内外排水的快速流转对于水质升温也会产生一定影响。如果水体流速过大,水环境中的胞外酶物质会随着水体流出净化作业区,酶物质的流失量会大大降低系统对水质的净化作用,因此水流量的控制对于系统内部微生物数量的空间分布情况具有直接影响。

水力停留时间为 16 h,上、下行池脲酶活性相当,差异不显著( $P>0.05$ )。水力停留时间为 24 h,上行池脲酶活性明显高于下行池。水力停留时间为 36 h,下行池脲酶活性高于上行池。整体而言,较小的水力停留时间内脲酶活性高于较大的水力停留时间的脲酶活性,在水力停留时间为 16 h 条件下系统脲酶活性分别是 24 h、36 h 的 1.22、1.53 倍,差异显著( $P<0.05$ )。下行池添加基质多与上行池也影响着系统内微生物分布,基质水溶性、比表面积也与脲酶空间分布有关。基质脲酶变化与 TN 去除率亦存在显著相关关系,拟合方程为  $y=0.65x-0.15(R^2=0.79)$ 。

**2.2.2 脱氢酶** 根据图 6 数据显示,人工湿地系统内下行池和上行池区域 S1、S2、S5、S6 基质脱氢酶活性高于 S3、S4,特别是水力停留时间为 16 h 条件下的 S2 区域内的脱氢酶活性达到最高,为  $2.5 \mu\text{g/ml TPF}$ ( $\mu\text{g/ml TPF}$ :以每克基质生成的 TPF 为脱氢酶的一个活性单位)以上,这是由于系统中、上层基质是粒径较小的细珊瑚石、细砂,所以比表面积远远大于下层的粗珊瑚石,增大了内部脱氢酶附着点,另外互花米草的根区主要位于 S1、S2、S5、S6,这部分区域由于进水溶氧和根部泌氧的原因造成溶氧含量较高,形成了好氧环境,同时植物根区分泌物会刺激微生物的生命活动和生物量的增加,适合系统中好氧微生物的新陈代谢和生命活动,而微生物作为系统胞外酶的生产者,从而使系统中、上层酶活性较高。在水力停留时间为 24 h 和 36 h 条件下,下行池 S1、S2 与上行池 S5、S6 层脱氢酶活性相当,差异不显著( $P>0.05$ )。

水力停留时间 16 h 条件下,系统各层次脱氢酶活性明显高于 24、36 h 条件下的脱氢酶活性,差异极显著( $P<0.01$ ),可能是由于开始阶段植株生长逐渐茂盛,植株根系发达,上层根区氧化还原电位也出现增高的趋势,所以整体提高了上层区域基质脱氢酶活性,不难看出互花米草的生长刺激了系统基质脱氢酶活性。随着水力停留时间为增加到 24、36 h 阶段植物生长缓慢,可能造成了植物根区氧化还原电位较低,使得脱氢酶活性明显下降。

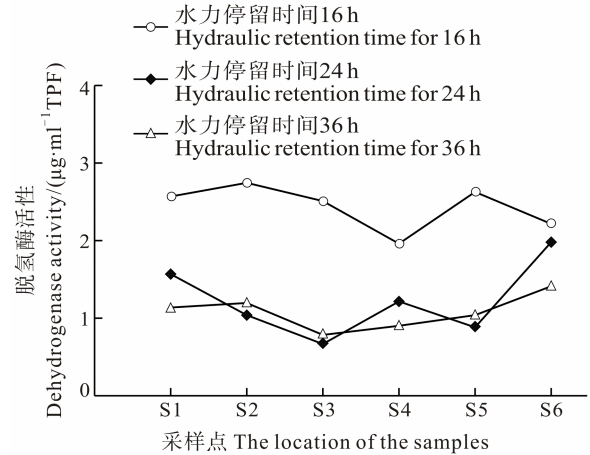


图 6 人工湿地系统不同采样点脱氢酶活性对比  
Fig.6 The comparison of dehydrogenase activity at different sampling positions of the constructed wetland

水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,上、下行池间脱氢酶活性基本一样,差异不显著( $P>0.05$ )。停留 16 h 条件下,系统下行池脱氢酶活性明显高于 24、36 h,分别是其 2.41、2.51 倍。下行池脱氢酶活性明显高于 24、36 h,分别是其 1.22、2.05 倍。不同水力停留时间下,停留 16 h 系统内脱氢酶活性远远高于停留 24、36 h 脱氢酶活性,分别是其 2.00、2.28 倍。

研究结果显示,人工湿地系统内的基质酶作为一种生物催化剂,加速了系统内部有机物质的化学反应,基质酶同微生物共同推动着物质转化,这也符合张巍等(2010)在人工湿地中酶活性对微生物功能体现的研究成果,各种酶在系统内部基质表层的附着积累是基质微生物、动物、耐盐植物生命活动的结果体现。脲酶可以酶促含氮有机物的水解。脱氢酶作为湿地系统内一种重要的有机质转化酶,能促使碳水化合物、有机物等发生脱氢反应,起着氢的中间传递体的作用(郭明等,2000)。因此,人工湿地中脲酶和脱氢酶活性的变化在很大程度上影响着系统对污染物的去除效果。

### 2.3 微生物分布

近几年来,关于湿地生态系统中微生物群落结构及分布、微生物降解机制等方面的研究日益受到研究者的重视(Huang *et al.*, 2012; Truu *et al.*, 2009)。微生物是人工湿地净化废水的主要作用者,它们把有机质作为营养源转化为组成物质和能量。Zhou 等(2009)在研究复合垂直流人工湿地时发现,系统表层的微生物数量显著高于其下层的数量。人工湿地处理污水时,有机物的降解和转化主要由植物根区微生物生命活动来完成。耐盐植物通过通气组织的运输,将氧气输送到根区,在植物根须周围微环境中依次出现好氧区、

兼氧区和厌氧区,为好氧微生物和厌氧微生物大量存在提供了条件。人工湿地中微生物的种类和数量极其丰富,这为人工湿地污水处理系统提供了足够的分解者。图 7 显示了水力停留时间 16、24、36 h 海水人工湿地基质表层微生物数量(单位  $\text{Lg}/\text{N}\cdot\text{g}$ :表示每克基质中微生物数量的对数)的空间分布,其中下行池亚硝酸盐细菌、硝酸盐细菌和氨化细菌数量高于上行池,差异不显著( $P>0.05$ )。外排水刚进入系统时,主要发生硝化反应,氨氮和亚硝酸盐被氧化,硝化细菌和亚硝化细菌得到增殖,位于中上层的 S1、S2、S5、S6 硝化和亚硝化细菌的数量远远高于反硝化细菌,故在好氧环境的表层附近亚硝化细菌、硝化细菌增多,这与好氧微生物自身生命活动有直接关系。

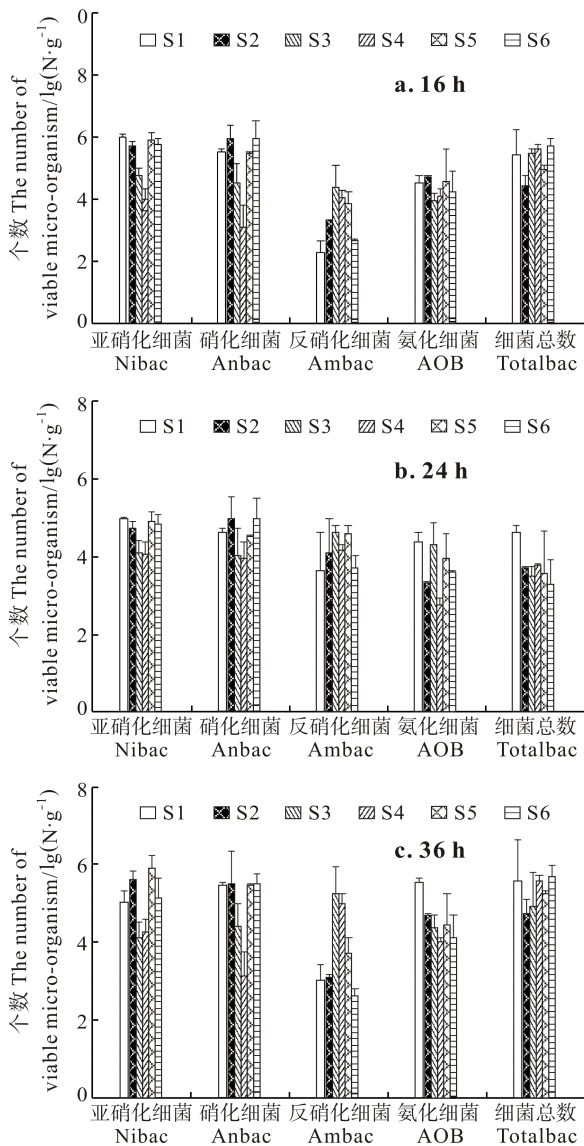


图 7 海水人工湿地系统内微生物空间分布  
Fig.7 The spatial distributions of microbes in the constructed wetland

下行池 S3 区域内反硝化细菌数量明显高于上行池 S4, 由于实验中添加的适量饵料和葡萄糖, 随着系统内基质的吸附阻截, 有机物含量逐渐降低, 严重影响了厌氧型反硝化细菌的有机碳源供给, 造成反硝化细菌数量逐渐减少, 形成的这种趋势与黄有志等(2013)研究的极其相似。水力停留 36 h 系统内部 S3、S4 反硝化细菌数量高于停留 24、16 h, 表明在此流量条件下湿地系统内部存在一定的厌氧区域, 正好有利于反硝化细菌的形成, 作用于  $\text{NO}_3\text{-N}$  的去除(将  $\text{NO}_3\text{-N}$  转化为  $\text{N}_2$ )过程。

在水力停留 16、36 h 条件下系统内氨化细菌的数量多于 24 h, 差异不显著( $P>0.05$ )。在停留 36 h 条件下氨化细菌数量多于停留 16、24 h, 停留时间较长意味着水流速度缓慢, 水中溶氧量相对较低, 表明在兼性厌氧环境下也可以培养氨化细菌, 为今后对于好氧型微生物适应兼性厌氧、厌氧环境下生存的研究提供有利数据。

水力停留时间为 36 h 系统中细菌总数超过 16、24 h, 水力停留时间较长一方面有利于系统内部长时间的稳定微环境, 有利于厌氧型微生物(反硝化细菌)和好氧型微生物(硝化细菌)的增殖;另一方面缓慢的水流流速避免了因水流过大而破坏系统内部成熟的微生物膜结构。但是间歇时间过长, 对于系统内部好氧型微生物的培养会造成一定影响。细菌总数与 TN、 $\text{NH}_4\text{-N}$  去除率存在正相关关系, 细菌总数越多, TN、 $\text{NH}_4\text{-N}$  的去除率越高。细菌总数与 TN、 $\text{NH}_4\text{-N}$  去除率之间的关系方程分别为  $y=1.32x-0.83(R^2=0.50)$ 、 $y=0.80x-0.27(R^2=0.61)$ 。

由图 7 可知, 海水人工湿地系统内部硝化细菌与亚硝化细菌数量远远多于反硝化细菌数量, 充分证明了在此实验过程中, 海水人工湿地系统内部微生物的硝化作用大于反硝化作用。

### 3 结论

(1)海水人工湿地系统对养殖外排水中  $\text{NH}_4\text{-N}$  的平均去除率为(82.91±17.51)%, TN 平均去除率为(25.02±12.69)%。

(2)系统中不同基质层次的微生物数量和脲酶、脱氢酶活性不同, 基质中上层好氧微生物数量和脲酶、脱氢酶活性显著大于下层;系统下行池好氧微生物数量和脲酶活性大于上行池;系统下层脱氢酶活性低于中上层。

(3)海水人工湿地净化养殖外排水系统下行池中上层硝化细菌、亚硝化细菌显著高于下层, 中上层反硝化细菌数量明显低于下层。

(4)系统内全部微生物数量和 TN 去除率存在一定相关性,  $R^2=0.50$ ; 系统内基质脲酶与 TN 去除率存在显著相关性,  $R^2=0.86$ ; 系统内微生物总数和  $\text{NH}_4\text{-N}$  去除率存在一定相关性,  $R^2=0.61$ 。

## 参 考 文 献

- 王加鹏, 崔正国, 周强, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水效果和微生物群落分析. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 1-9
- 李智, 杨在娟, 岳春雷. 人工湿地基质微生物和酶活性的空间分布. 浙江林业科技, 2005(3): 1-5
- 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986
- 张海耿, 崔正国, 马绍赛, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水影响因素与效果实验研究. 海洋环境科学, 2012, 31(1): 20-24
- 张巍, 赵军, 郎成明, 等. 人工湿地系统微生物去除污染物的研究进展. 环境工程学报, 2010, 4(4): 721-728
- 岳春雷, 常杰, 葛滢, 等. 人工湿地基质中土壤酶空间分布及其水质净化效果之间的相关性. 科技通报, 2004, 20(4): 112-116
- 苗婷婷, 刑翔, 杜宗军, 等. 柄海鞘共附生细菌的分离培养与系统发育多样性研究. 海洋科学进展, 2012, 30(1): 111-118
- 郭明, 陈红军, 王春蕾. 四种农药对土壤脱氢酶活性的影响. 环境化学, 2000, 19(6): 523-527
- 赵连梅, 池勇志, 张春青. TTC-脱氢酶活性测定中标准曲线的影响因素研究. 实验室科学, 2009, (4): 71-74
- 梁威, 胡洪营. 人工湿地净化污水过程中的生物作用. 中国给水排水, 2003, 19(10): 28-31
- 黄有志, 刘永军, 熊家晴, 等. 北方地区表流人工湿地冬季污水脱氮效果及微生物分布分析. 水处理技术, 2003, 39(1): 55-59
- Balmér P, Hellstrom D. Performance indicators for wastewater treatment plants. Water Sci Technol, 2012, 65(7): 1304-1313
- Bachand PAM, Horne AJ. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. Ecol Engin, 2000, 14(1-2): 17-32
- Bai JH, Ou YH, Deng W. A review on nitrogen transmission process in natural wet-lands. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(2): 326-333
- Correa-Galeote D, Marco DE, Tortosa G, *et al.* Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. FEMS Microbiol Ecol, 2013, (2): 340-351
- Ding JH, Shu Q. Application of constructed wet lands for wastewater treatment. Agro-Environmental Protection, 2000, 19(5): 320
- Fleming SMS, Horne AJ. Enhanced nit rate removal efficiency in wetland microcosms using an episediment layer for denitrification. Environment Science Technol, 2002, 36: 1231-1237
- Gao ZM, Li XF, Wang ST. Treatment for Municipal Wastewater Treatment. Beijing: Standard Press of China, 1990, 458
- Gerke S, Baker LA, Xu Y. Nitrogen transformations in a wet land receiving lagoon effluent: sequential model and implications for water reuse. Water Res, 2001, 35(16): 3857-3866
- Greenway M. Nutrient content of wetland plants in constructed wetlands receiving municipal effluent in tropical Australia. Water Sci Technol, 1997, (5): 135-142
- Horne AJ. Nitrogen removal from waste treatment pond or activated sludge plant effluents with free surface wetlands. Water Sci Technol, 1995, 31(12): 341-351
- Hammer DA. Constructed wetlands for wastewater treatment municipal, industrial and agricultural. Proc. 1st internal conference on constructed wetlands for wastewater treatment. Chattanooga, USA, Lewis Publishing, Chelsea, 1988
- Huang L, Gao X, Liu M. Correlation among soil microorganisms, soil enzyme activities, and removal rates of pollutants in three constructed wetlands purifying micro-polluted river water. Ecol Engin, 2012, 46: 98-106
- Kadlec RH, Knight RL. Treatment Wetlands. Boca Raton, FL: Lewis CRC Press, 1996
- Kirk GJD. Plant-mediated processes to acquire nutrient s: nitrogen up take by rice plants. Plant and Soil, 2001, 232: 129-134
- Kusch P, Winner A, Kappelmeyer U, *et al.* Annual cycle of nitrogen removal by a pilot-scale subsurface horizontal flow in a constructed wetland under moderate climate. Water Res, 2003, 37: 4236-4242
- Huang F, Han T, Qin L. East China Normal University. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2011, 36(14): 1945-1950
- Laanbroek HJ. Bacteria cycling of minerals that affect growth in waterlogged soils: a review. Aquat Bot, 1990, 38: 109-125
- Liang W, Wu ZB. Review of removal mechanism in constructed wetland treating nitrogen and phosphorus from wastewater. Environmental Science Trends, 2000, (3): 32-37
- Lu SY, Zhang PY, Yu G, *et al.* Stabilization pond-plant bed composite system treatment of farmland irrigation and drainage water. China Environmental Science, 2004, 24(5): 605-609
- Menon R, Jackson CR, Holland MM. The influence of vegetation on microbial enzyme activity and bacterial community structure in freshwater constructed wetland sediments. Wetlands Vol, 2013, 33(2): 365-378
- Pinney ML, Westerhoff PKM, Bakerm L. Transformations in dissolved organic carbon through constructed wetlands. Water Res, 2000, 34(6): 1897-1911
- Reddy KR, D'Angelo EM. Biogeochemical indicators to evaluate pollution removal efficiency in constructed wetlands. Water Sci Technol, 1997, 35(5): 1-10
- Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, *et al.* New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal from wastewaters. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27: 481-492
- Smith ID. Athermal analysis of absue vertical flow constructed wetland. Water Science & Technology, 1997, (5): 55-62
- Song K, Lee SH, Kang H. Denitrification rates and community

- structure of denitrifying bacteria in newly constructed wetland. *Eur J Soil Biol*, 2011, 47(1): 24–29
- Stottmeister U, Wiener A, Kuschik P, *et al.* Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotech Adv*, 2003, 22(1–2): 93–117
- Sun GZ, Austin D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: Evidence from a mass balance study. *Chemosphere*, 2007, 68:1120–1128
- Truu M, Juhanson J, Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(13): 3958–3971
- Verhoeven JTA, Meuleman AFM. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecol Engin*, 1999, 12(1–2): 5–12
- Vymazal J. Nitrogen removal in constructed wetlands with horizontal sub surface flow can we determine the key process? In: Vymazal J ed. *Nutrient cycling and retention in natural and constructed wetlands*. Leiden: Backhuys Publishers, 1999, 1–17
- Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 2007, 380: 48–65
- Vymazal J, Brix H, Cooper PF. Removal mechanisms and types of constructed wetlands. In: Vymazal J, Brix H, Cooper PF, *et al* eds. *Constructed wet lands for wastewater treatment in Europe*. Leiden: Backhuys Publishers, 1998, 17–66
- Zheng XC, Li YX. *Technology of phosphorus and nitrogen removal from wastewater*. Beijing: China Architecture & Building Press, 1998
- Zhou QH, He F, Zhang L, *et al.* Characteristics of the microbial communities in the integrated vertical-flow constructed wetlands. *J Environ Sci*, 2009, 21(9): 1261–1267

(编辑 陈严)

## Substrate Enzyme, Microbe Distribution and Denitrification Effects of the Constructed Sea Water Wetland

ZHOU Qiang<sup>1,2</sup>, CUI Zhengguo<sup>2</sup>, WANG Jiapeng<sup>1,2</sup>, QU Keming<sup>2①</sup>, MA Shaosai<sup>2</sup>, MAO Chengquan<sup>3</sup>

(1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306*; 2. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071*; 3. *Haiyang Yellow Sea Aquatic Product Co., Ltd, Yantai 265122*)

**Abstract** The substrate enzyme activity and the spatial distribution of microorganisms are important factors affecting the degradation of pollutants in water treatment system of the constructed wetland. The present study using a laboratory scale constructed wetland system in three different conditions to measure the removal effects of nitrogen, the relationship between the removal efficiency and the spatial distributions of microorganisms and the substrate enzyme activity. *Spartina alterniflora* was selected as the plant of the constructed wetland, and the density of reed was 64 per square meter. The substrates were filled with fine sand, coral rock and blast furnace slag. In three different conditions, the removal rate of different forms of nitrogen, the quantity and activity of microorganisms, the substrate activity were investigated. The results showed that the average removal rate of TN and NH<sub>4</sub>-N were (25.02±12.69)% and (82.91±17.51)% in the constructed wetland system during two-month stable operation, respectively. The quantities of microorganisms in different depths were obviously different, and the activities of substrate urease and dehydrogenase were different with depths. The quantities of aerobic microorganisms, the activities of urease and dehydrogenase in the upper and middle layer were significantly higher than those in the lower layer of the system. In the down flow tank of the system, the quantities of nitrifying and nitrite bacteria in the upper and middle layer were higher than those in the lower layer; however, the distribution of denitrifying bacteria was opposite. There were positive correlations between the removal rate of nitrogen and the quantity of bacteria and the enzyme activity ( $R^2=0.50$  and  $0.61$ , respectively). There was a significant positive correlation between the total nitrogen removal rate and the activity of urease ( $R^2=0.86$ ). The results contribute to the migration mechanism of nitrogen in the constructed wetland system of treating marine aquaculture waste waters.

**Key words** Constructed wetland; Nitrogen; Removal rate; Enzyme activity; Microbial

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

# 臭氧对赤点石斑鱼神经坏死病毒 RNA 破坏效果的评价方法的建立与应用\*



李 晋<sup>1,2</sup> 史成银<sup>1①</sup> 王胜强<sup>1,2</sup> 栗子丹<sup>1,2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究依据赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) RNA2 的序列, 在其 3'端设计反转录引物, 在 5'端设计 PCR 扩增引物, 构建了一种可以评价 RNA 链相对完整性的 RT-PCR 方法, 命名为 LR RT-PCR(Left reverse transcript Right amplify RT-PCR), 并对该方法的引物浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTPs 浓度、退火温度 4 个重要参数进行了优化。结果显示, 优化后的 LR RT-PCR 反应体系为: 引物浓度 0.2 μmol/L、Mg<sup>2+</sup>浓度 4 mmol/L、dNTPs 浓度 0.5 nmol、退火温度 60℃。本研究建立的 LR RT-PCR 方法灵敏度高, 可以检出 1 pg 的 RGNNV RNA2 标准品; 该方法特异性强, 与 RSIV 等鱼类常见病毒、鳃弧菌等常见水产病原菌以及石斑鱼 RNA 均不产生交叉反应。应用建立的 LR RT-PCR 方法对臭氧破坏 RGNNV RNA2 的效果进行评价, 发现当臭氧浓度由 0.3 mg/L 依次增加为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时, LR RT-PCR 的扩增产物逐渐减少, 直至消失。结果表明, 建立的 LR RT-PCR 方法可以快速、准确地评价臭氧对 RGNNV RNA2 的破坏效果, 适用于养殖场评估臭氧对 RGNNV 的消毒效果, 并对 RGNNV 进行检测和监控。

**关键词** 赤点石斑鱼神经坏死病毒; RT-PCR; 检测; 臭氧; 消毒

**中图分类号** S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0018-08

臭氧作为一种强氧化剂, 主要通过破坏病毒核酸并使其断裂, 从而达到杀灭病毒的作用(Roy *et al*, 1981; Shin *et al*, 2003; Thurston-Enriquez *et al*, 2005)。但是臭氧对病毒的杀灭效果, 除了细胞培养和动物感染法之外, 还没有合适的方法可以进行评价。对于单链 RNA 病毒, 国内外通常使用 RT-PCR 方法进行病毒检测, 即采用随机引物或反向特异性引物对病毒反转录, 然后选取部分反转录片段进行 PCR 扩增(Dalla *et al*, 2000; Grotmol *et al*, 2000; Mu *et al*, 2013)。但是, 被臭氧处理后断裂的病毒 RNA, 虽然已失去感染活性, 随机引物仍可与之结合并启动反转录, 然后通过 PCR 获得扩增产物, 产生假阳性结果。利用反向特异

性引物进行反转录则更为局限, 只要断裂的病毒 RNA 上还存在 RT-PCR 目标扩增区域, 就可以被反向引物反转录成 cDNA 并继而进行 PCR 扩增。上述两类常规 RT-PCR 方法均不能区分完整和断裂的病毒核酸, 对于核酸链已断裂从而失活的病毒仍可扩增出阳性结果, 因此不能用于评价臭氧对病毒的杀灭效果(Rodriguez *et al*, 2009)。

赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)是一种单链 RNA 病毒, 隶属于野田村病毒科(Nodaviridae)、乙型野田村病毒属(*Betanodavirus*), 是海水养殖鱼类主要的病毒性病原之一(Thiéry *et al*, 2012)。该病毒呈世界性分

\* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022012009)共同资助。

李 晋, E-mail: lj311@126.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-02, 收修改稿日期: 2014-06-17

布, 主要流行于东亚、东南亚等地区, 对我国福建、广东、海南以及台湾地区的养殖石斑鱼苗危害尤其严重, 患病鱼苗死亡率达 60%–100% (陈信忠等, 2004; 龚艳清等, 2006)。到目前为止, 由于缺乏有效的疫苗, 在赤点石斑鱼神经坏死病毒的防治方面, 主要利用臭氧对鱼卵进行消毒来阻断病毒的垂直传播 (Grotmol *et al*, 2000), 同时利用臭氧对养殖池以及工具的消毒来阻断水平传播。因此, 臭氧处理成为目前最常用且最有效的控制神经坏死病毒病的方法。

RGNNV 的基因组由两条正义单链 RNA 组成 (RNA1 和 RNA2), 其中 RNA2 全长为 1433 nt (Thiéry *et al*, 2012)。本研究设计了一种特殊的 RT-PCR 方法, 命名为 LR RT-PCR (Left reverse transcript Right amplify RT-PCR)。即在 RGNNV RNA2 的 3' 末端设计反转录引物, 在 5' 末端设计 PCR 引物, 通过 LR RT-PCR 可以将完整的和断裂的 RGNNV RNA2 进行区分。该方法的原理是, RNA 病毒核酸链 3' 端断裂则不能启动反转录, 5' 端或中间断裂虽能启动反转录但不能进行 PCR 扩增。因此, 断裂的 RNA 病毒核酸片段不能被扩增, 只有完整的 RNA 病毒核酸链才能得到扩增产物。本研究应用建立的 LR RT-PCR 方法对臭氧破坏 RGNNV RNA 的效果成功进行了评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用毒株和菌株

2012 年 8 月, 自某育苗场采集患神经坏死病的半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 鱼苗, 使用世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的 RT-PCR 检测方法确认病原为 RGNNV 基因型, 命名为 RGNNV CsCN128 分离株。取患病鱼苗头部组织冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

用于测试本方法的灵敏度和特异性的青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 采集于育苗场中, 并通过 RT-PCR 检测方法确定其为 RGNNV 阴性。鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) (保藏编号: CGMCC7198)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) (保藏编号: CGMCC7197) 均为本实验室分离、鉴定和保存。流行性造血器官坏死病毒 (EHNV) 和真鲷虹彩病毒 (RSIV) 为本实验室保存。

### 1.2 引物设计

依据已测定的 RGNNV CsCN128 分离株 RNA2 核酸序列 (GenBank 检索号: KJ541748), 并参考已报道的 RGNNV 中国株 RNA2 核酸序列 (GenBank 检索

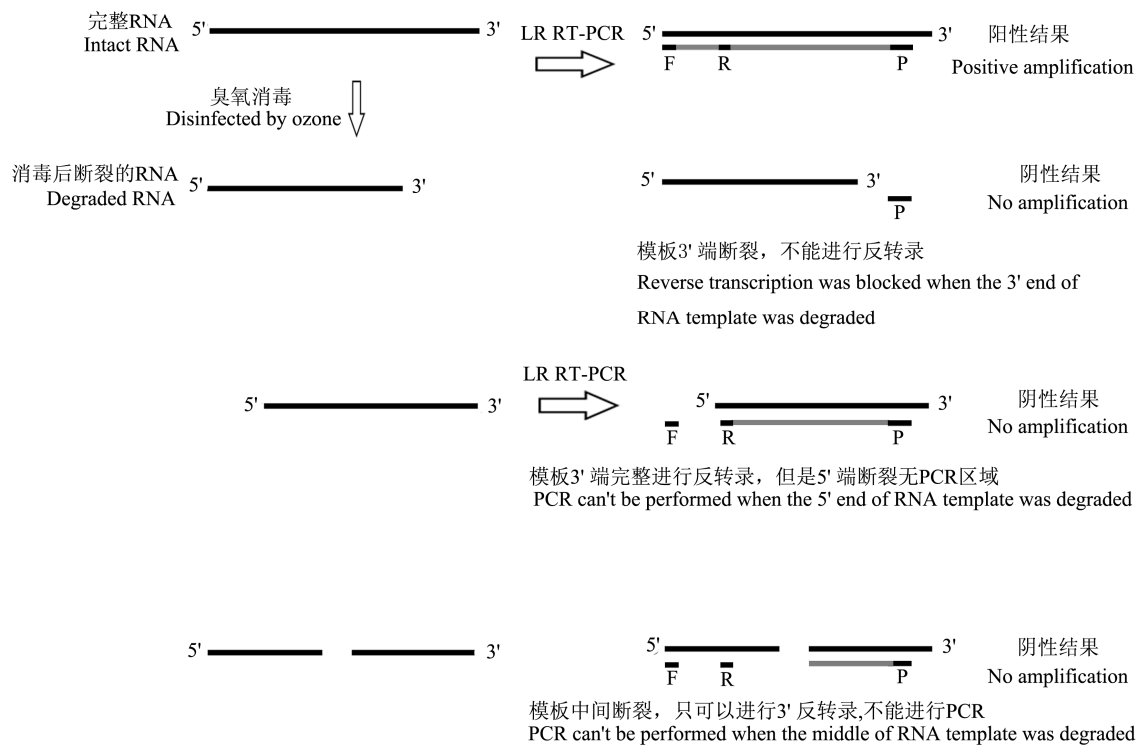


图 1 LR RT-PCR 方法的检测原理

Fig.1 The schematic diagram of LR RT-PCR

表1 实验所用引物及其序列  
Tab.1 Primers used in this study

名称 Name	序列 Sequence (5'-3')	位置 Location	用途 Application
FL	TACGCAAAGGTGAGAAGAA	31-49	制备 RNA2 标准品
RL	CCAACAAGCCCAAAGAG	1345-1361	制备 RNA2 标准品
P	CGAGTCAACCTGGTGCAGACAG	1012-1034	LR RT-PCR 中 3'端反转录
F	CGACTGTGACTGGATTTGGAC	154-174	LR RT-PCR 中 5'端 PCR
R	GGTCGGACTGTTCTGCTTTC	486-505	LR RT-PCR 中 5'端 PCR
P1	CGAGTCAACACGGGTGAAGACAG	1012-1034	常规 RT-PCR 的反转录
P2	ACCGCTCCCATCATGACAAA	681-701	常规 RT-PCR 的 PCR
P3	AACAGGCAGCAGAATTTGACG	987-1007	常规 RT-PCR 的 PCR

号: EF558369), 在序列比对后, 选择保守区进行 LR RT-PCR 引物设计。共设计了 5 条引物 FL、RL、P、F、R, 其中 FL 和 RL 用于制作 RGNNV RNA2 标准品, P 用于从 RNA2 3'端启动反转录, F 和 R 用于 RNA2 cDNA 5'端的 PCR 扩增, 目标产物大小为 352 bp(图 1)。依据 Mu 等(2013)合成了检测 RGNNV 的常规 RT-PCR 引物, 包括反转录引物 P1、PCR 引物 P2 和 P3, 常规 RT-PCR 的目标产物大小为 327 bp。上述引物的序列及其在 RGNNV RNA2 上的位置见表 1。

### 1.3 RGNNV RNA2 标准品的制备

为保证检测方法的可靠性及稳定性, 本研究采用 RNA 体外转录技术制备了 RGNNV RNA2 标准品。具体方法: 取 1.1 中保存的病鱼头部组织 50 mg, 依据 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa 公司)说明书提取总 RNA, 用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen 公司)合成 cDNA 模板; 使用引物对 FL/RL 通过 PCR 扩增 RGNNV RNA2 并纯化、克隆入含 SP6 Promoter 的转录载体 T-Vector pMD20(TaKaRa 公司)中, 然后将阳性重组质粒转入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆扩大培养, 提取重组质粒, 并使用 *EcoR* I (TaKaRa 公司)进行单酶切, 使质粒线性化, 然后使用 SP6 RNA Polymerase (TaKaRa 公司)进行体外转录, 转录产物经 DNase I 处理、酚/氯仿抽提后, 溶解于 DEPC 水中, 定量并保存于 -80℃ 冰箱中备用。

### 1.4 LR RT-PCR 方法反应体系的建立及参数优化

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 使用引物 P 反转录成 cDNA, 然后以引物对 F/R 进行 PCR 扩增。20  $\mu$ l 的反转录体系: 0.05-5  $\mu$ g RGNNV RNA2 标准品, 10 pmol 引物 P, TransScript RT/RI Enzyme Mix (TransGen 公司) 1  $\mu$ l, 2 $\times$ TS Reaction Mix 10  $\mu$ l; 反转录程序为: 42℃ 保温 30 min, 85℃ 灭活 5min。

25  $\mu$ l 的 PCR 反应体系: cDNA 模板 1  $\mu$ l、10 pmol 引物对 F/R、5 nmol dNTPs Mixture、25 pmol Mg<sup>2+</sup>、0.5 U *Ex Taq*、10 $\times$ *Ex Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2.5  $\mu$ l (TaKaRa 公司)。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果并拍照。

针对上述 LR RT-PCR, 分别进行了 PCR 扩增体系的引物浓度、退火温度、Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTPs 浓度等 4 个参数的优化。其中引物终浓度分别为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05  $\mu$ mol/L, 退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃, Mg<sup>2+</sup>终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L, dNTPs 终浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L。通过比较扩增结果, 确定最佳反应参数。

### 1.5 LR RT-PCR 方法的灵敏度和特异性

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 10 倍梯度稀释为 10 ng/ $\mu$ l、1 ng/ $\mu$ l、100 pg/ $\mu$ l、10 pg/ $\mu$ l、1 pg/ $\mu$ l、100 fg/ $\mu$ l。各取上述稀释液 1  $\mu$ l, 依照 1.4 中优化得到的反应参数, 分别进行 LR RT-PCR 扩增, 测试该方法的检测灵敏度。

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)基因组 RNA 以及鳃弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌、流行性造血器官坏死病毒、真鲷虹彩病毒等 6 种 DNA 样品, 依照 1.4 中优化得到的反应参数, 分别进行 LR RT-PCR 扩增, 测试该方法的特异性。

### 1.6 应用 LR RT-PCR 方法评价臭氧对 RGNNV RNA2 的破坏效果

#### 1.6.1 不同浓度臭氧处理的 RGNNV RNA2 标准品

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 用 DEPC 水稀释成 10 ng/ $\mu$ l 的溶液, 然后用臭氧发生器(国林

公司)产生的臭氧进行处理 10 min。共设置 4 个实验组和 1 个对照组, 每组设两个平行。通过碘量法标定出各实验组的臭氧浓度分别为 0.3、0.5、1.0、2.0 mg/L, 对照组不用臭氧处理, 臭氧浓度为 0 mg/L。

### 1.6.2 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 的对比分析

使用本研究建立的 LR RT-PCR 及 Mu 等(2013)报道的检测 RGNNV 的常规 RT-PCR, 对上述臭氧处理的 RGNNV RNA2 标准品进行扩增, 使用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果并进行比较分析。

## 2 结果

### 2.1 LR RT-PCR 反应体系和参数的优化

当退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃ 时, LR RT-PCR 的扩增结果见图 2-A。结果显示, 当退火温度为 60℃ 时, 目标扩增产物量最高。因此, 60℃ 是最佳退火温度。当 dNTPs 终浓度分别为 0.30、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05 mmol/L 时, PCR 的扩

增结果见图 2-B, 结果显示, dNTPs 终浓度的变化对扩增结果影响不大。当  $Mg^{2+}$  终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L 时, PCR 扩增结果见图 2-C。可以看出, 目标扩增产物的量随着  $Mg^{2+}$  终浓度的减少呈现先上升后下降的趋势; 当  $Mg^{2+}$  终浓度为 4 mmol/L 时, 目标产物扩增量达到最大; 当  $Mg^{2+}$  终浓度在 1 mmol/L 时, 目标产物完全没有扩增。因此最佳的  $Mg^{2+}$  终浓度为 4 mmol/L。当 PCR 的引物终浓度为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05  $\mu$ mol/L 时, PCR 扩增结果见图 2-D。在引物浓度大于 0.2  $\mu$ mol/L 时, 目标扩增产物的量变化不明显; 但当引物浓度低于 0.2  $\mu$ mol/L 时, 扩增产物随着引物浓度的下降而明显减少。因此选择 0.2  $\mu$ mol/L 作为 PCR 反应的最佳引物浓度。

综合以上实验结果, 优化后的 PCR 反应体系: 在 25  $\mu$ l 的反应体积中, dNTPs 各 0.5 nmol,  $Mg^{2+}$  终浓度 4 mmol/L, 引物终浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, *Ex Taq* 0.5 U, DNA 模板 1  $\mu$ l。反应的退火温度为 60℃。

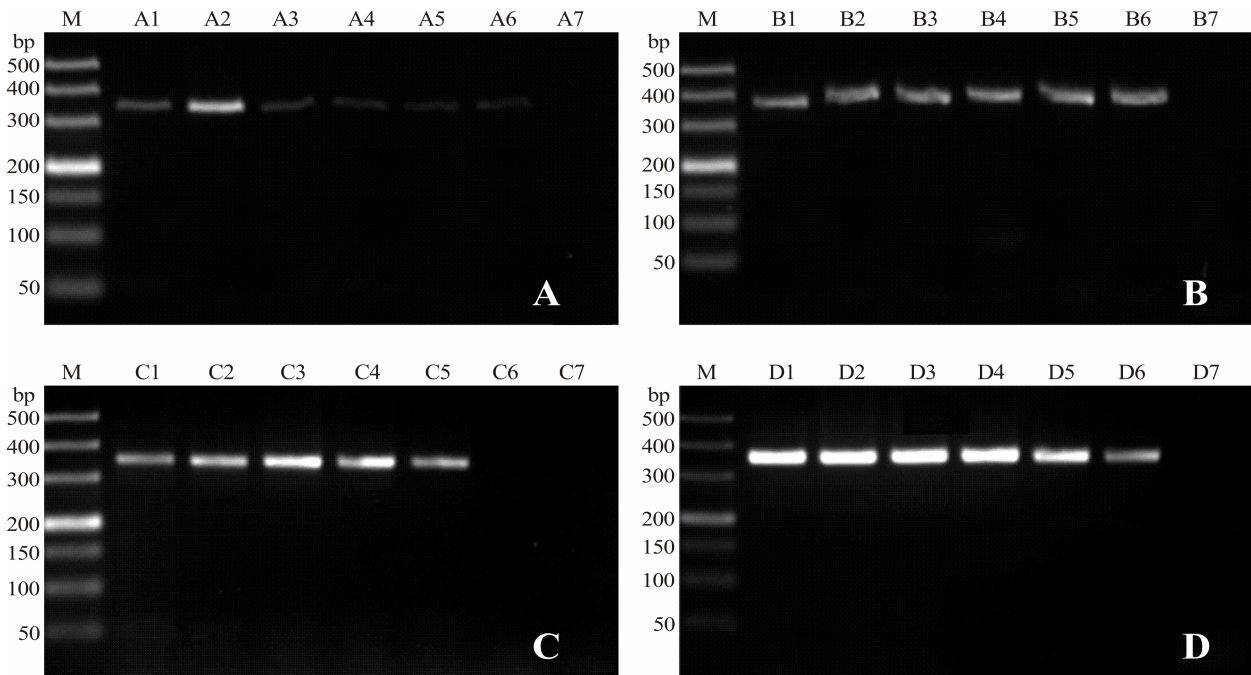


图 2 LR RT-PCR 中 PCR 各反应参数的优化

Fig.2 Amplification results in different PCR parameters of the LR RT-PCR

A. 退火温度; B. dNTPs 浓度; C.  $Mg^{2+}$  浓度; D. 引物浓度

M: DL 500<sup>TM</sup> DNA Marker; A1-A6: 退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃; B1-B6: dNTPs 分别为 0.30、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05 mmol/L; C1-C6:  $Mg^{2+}$  终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L; D1-D6: 引物终浓度分别为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05  $\mu$ mol/L; A7、B7、C7、D7: 阴性对照

A. Annealing temperature; B. Concentration of dNTPs; C. Concentration of  $Mg^{2+}$ ; D. Concentration of primers

Lane M: DL 500<sup>TM</sup> DNA marker. A1-A6: the annealing temperature was 62, 60, 58, 56, 54, and 52℃, respectively; B1-B6: the concentration of dNTPs was 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, and 0.05 mmol/L, respectively; C1-C6: the concentration of  $Mg^{2+}$  was 6, 5, 4, 3, 2, and 1 mmol/L, respectively; D1-D6: the concentration of primer was 0.80, 0.60, 0.40, 0.20, 0.10, and 0.05  $\mu$ mol/L, respectively. A7, B7, C7, and D7: Negative control



## 2.2 LR RT-PCR 检测方法的灵敏度及特异性

用梯度稀释的 RGNNV RNA2 标准品作为模板,测试 LR RT-PCR 方法的灵敏度,实验结果如图 3 所示。结果显示,随着标准品浓度的降低,LR RT-PCR 的扩增产物量逐渐减少。当标准品浓度为 10 ng/μl、1 ng/μl、100 pg/μl、10 pg/μl、1 pg/μl 时,均可以扩增出 352 bp 的目标片段。但当标准品浓度为 100 fg/μl 时,扩增结果为阴性(图3)。因此,该方法对 RGNNV RNA2 标准品的检测灵敏度为 1 pg/μl,相当于  $8 \times 10^3$  个单链 RNA 模板可以被检出。

应用本研究建立的 LR RT-PCR 方法,对鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌等常见水

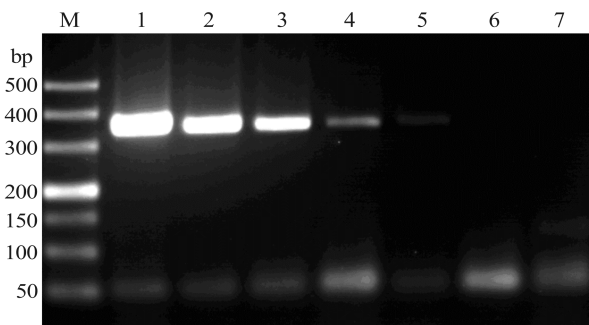


图3 LR RT-PCR 检测方法的灵敏度

Fig.3 The sensitivity of LR RT-PCR

M: DL 500<sup>TM</sup> DNA Marker; 1-6: 浓度分别为 10 ng/μl、1 ng/μl、100 pg/μl、10 pg/μl、1 pg/μl、100 fg/μl 的 RGNNV RNA2 标准品; 7: 阴性对照

Lane M: DL 500<sup>TM</sup> DNA marker; 1-6: the concentration of RGNNV RNA2 standard sample was 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, and 100 fg/μl, respectively; 7: Negative control

产病原菌, EHNV、RSIV 等鱼类病毒, 以及健康青石斑鱼基因组 RNA、RGNNV RNA2 标准品等进行检测, 扩增结果见图 4。结果显示, 该检测方法可以从 RGNNV RNA2 标准品中扩增出目标产物, 不能从上述细菌、病毒及健康青石斑鱼基因组中扩增出产物。由此证明, 该 LR RT-PCR 方法对 RGNNV 具有特异性。

## 2.3 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 对臭氧破坏 RGNNV RNA 效果的对比分析

RGNNV RNA2 标准品经各浓度的臭氧处理后, 分别使用本研究建立的 LR RT-PCR 方法和文献报道的检测 RGNNV 的常规 RT-PCR 进行扩增, 电泳结果见图 5。结果显示, 对于未经臭氧处理的对照组(0 mg/L 组), 常规 RT-PCR 和 LR RT-PCR 的扩增产物量基本一致, 证明两种检测方法的扩增效率相差不大。臭氧浓度较低的两个实验组(0.3 mg/L 组和 0.5 mg/L 组)中, 常规 RT-PCR 扩增产物虽略有减少, 但与对照组相比均无显著性差异; 而这两组的 LR RT-PCR 扩增产物却比对照组显著减少。由此证明常规 RT-PCR 扩增产物量与臭氧处理相关性不明显, 不适用于评价臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果; LR RT-PCR 扩增产物量与臭氧处理的相关性高, 能更准确地判断臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果。此外, 随着臭氧浓度的升高, 即断裂 RNA 逐渐增加, 完整的 RNA 逐渐减少时, 两种 RT-PCR 的扩增产物虽然都逐渐减少, 但各实验组常规 RT-PCR 的扩增产物量均明显高于同组的 LR RT-PCR 的扩增产物量; 当臭氧浓度达到 2.0 mg/L 时, 常规 RT-PCR 方法仍有少量扩增产物, 而 LR RT-PCR 方法不能得到扩增产物。上述结果证明, LR RT-PCR 比常规 RT-PCR 能更灵敏地反映臭氧对 RNA 的破坏

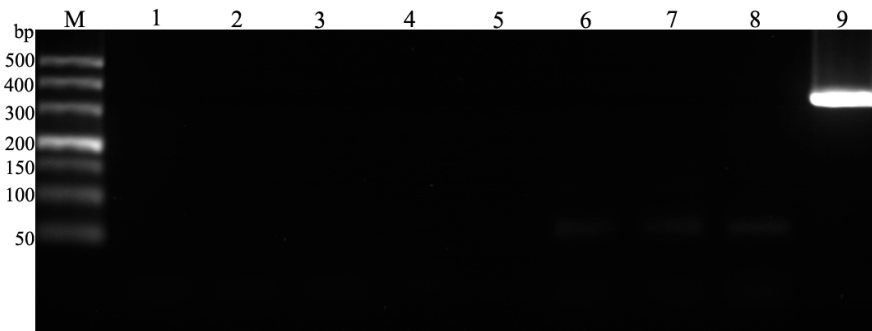


图4 LR RT-PCR 检测方法的特异性

Fig.4 The specificity of LR RT-PCR

M: DL 500<sup>TM</sup> DNA Marker; 1-9: 空白对照、鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌、EHNV、RSIV、青石斑鱼基因组 RNA、RGNNV RNA2 标准品

Lane M: DL 500<sup>TM</sup> DNA marker; 1: Negative control; 2: *V. anguillarum*; 3: *V. harveyi*; 4: *V. parahaemolyticus*; 5: *E. tarda*; 6: EHNV; 7: RSIV; 8: *Epinephelus awoara* genomic RNA; 9: RGNNV RNA2 standard sample

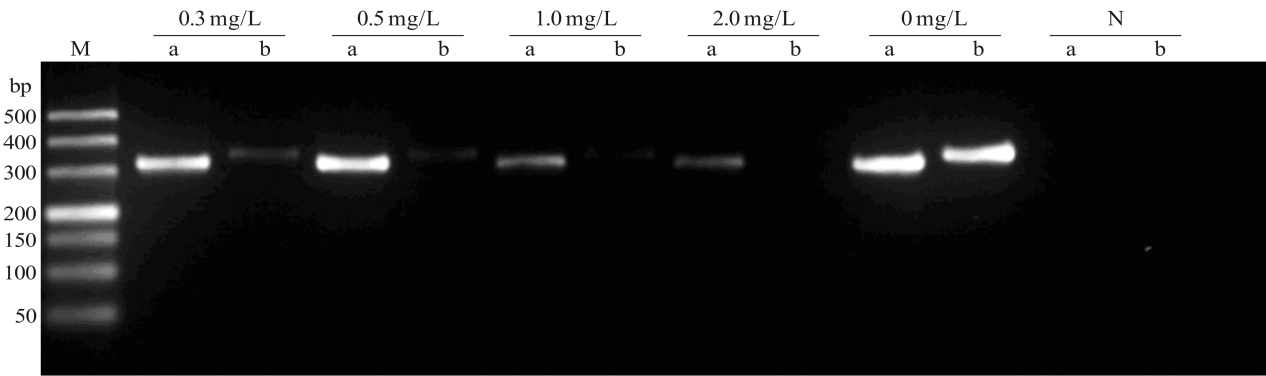


图 5 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 对臭氧破坏 RGNNV RNA 效果的对比分析

Fig.5 The comparison of LR RT-PCR and routine RT-PCR detecting the RGNNV RNA damage caused by ozone

a. 常规 RT-PCR; b. LR RT-PCR; N. 阴性对照  
a. Routine RT-PCR; b. LR RT-PCR; N. Negative control

效果。

### 3 讨论

病毒性神经坏死病作为一种严重危害我国养殖石斑鱼仔鱼和幼鱼的流行性传染病, 对其进行有效的防控是目前亟需解决的难题。我国广泛的水产苗种交易及引种育种升级(李巍等, 2006), 更为该病的传播提供了良好的条件。由于刚孵化的仔鱼和幼鱼免疫系统未发育完全, 无法使用疫苗对该病进行防控。因此, 对鱼卵和育苗设施进行臭氧消毒, 已成为降低该病发生率的重要手段。然而在育苗生产中, 通常只能依靠统计鱼苗的孵化率及死亡率来判定臭氧对病毒的杀灭效果(Grotmol *et al*, 2000), 费时费力且不够准确。总之, 缺乏快速、有效的评估臭氧消毒效果的方法。

林克冰等(2011)用神经坏死病毒 RT-PCR 检测试剂盒测试了聚维酮碘、盐酸吗啉胍等化学药物对石斑鱼卵、轮虫、桡足类携带的病毒杀灭效果, 但其未对试剂盒的灵敏度和准确性进行分析。

本研究设计的 LR RT-PCR 方法, 从 RGNNV RNA2 的 3'末端进行反转录, 对包含 RGNNV RNA2 5'末端序列的 cDNA 才进行 PCR 扩增, 从而可以排除断裂的病毒 RNA 的干扰, 仅对相对完整的病毒 RNA 进行 RT-PCR 扩增。实验结果证实, 与未经臭氧处理的对照组(0 mg/L 组)相比, RGNNV RNA2 标准品被臭氧处理 10 min 后, 0.3 mg/L 和 0.5 mg/L 臭氧处理组的常规 RT-PCR 扩增产物量基本上没有变化, 而各实验组的 LR RT-PCR 扩增产物量均大幅度减少甚至消失。考虑到 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 的扩增效率相差不大, 上述结果表明因臭氧处理而断裂的 RNA 仍然能被常规 RT-PCR 扩增, 即常规 RT-PCR 不

能有效区分完整的和断裂的病毒 RNA, 不能用于评价臭氧对 RGNNV 的杀灭效果。相反, LR RT-PCR 不能扩增断裂的病毒 RNA, 从而能可靠地判断 RGNNV RNA2 核酸链的完整性, 可以用于评估臭氧对病毒 RNA 的破坏效果。

虽然在理论上可以设计 RT-PCR 引物对病毒 RNA 全长进行扩增, 以此判断病毒 RNA 链的完整性。但在实际操作中, 一方面由于病毒 RNA 序列的限制, 多数情况下难以设计出合适的可扩增病毒 RNA 全长的 RT-PCR 引物; 另一方面, 即使勉强设计出这样的引物, 扩增长序列的 RT-PCR 也存在扩增效率明显偏低, 容易产生假阴性。本课题组实验研究也证实, 对于有感染活性的样品, 使用可扩增 RGNNV RNA2 全长的引物进行 RT-PCR, 扩增结果全部为阴性(结果未展示), 而 LR RT-PCR 检测结果为阳性。因此, 扩增病毒 RNA 全长的 RT-PCR 方法并不适用于评估臭氧对病毒 RNA 的破坏效果。

Thurston-Enriquez 等(2005)报道, 使用臭氧对肠道腺病毒和猫杯状病毒进行消毒时, 0.3 mg/L 的臭氧即可有效灭活肠道腺病毒, 0.06 mg/L 的臭氧即可有效灭活猫杯状病毒。本研究显示, 与未用臭氧处理相比, 当臭氧浓度为 0.3 mg/L 时, LR RT-PCR 的扩增产物量明显减少; 当臭氧浓度为 2 mg/L 时, 观察不到扩增产物。这说明臭氧可以有效破坏单链 RNA, 2 mg/L 臭氧处理 10 min 即可对 RGNNV 有效灭活。

本研究建立的 LR RT-PCR 与常规 RT-PCR 相比, 能有效地判断病毒核酸链的完整性, 灵敏度高、可靠性强, 可以用于评估臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果, 并对 RGNNV 进行检测和监控。而且, 通过设计特异性的 3'端反转录引物和 5'端 PCR 引物, 该 LR

RT-PCR 方法还可以用于评估其他单链 RNA 病毒核酸链的完整性, 具有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究. 福建水产, 2011, 33(5): 15-19
- 陈信忠, 龚艳清, 苏永全, 等. 闽南地区紫石斑(*Epinephelus lanceolatus*)幼鱼爆发性传染病的病原学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(4): 557-562
- 李巍, 胡红浪. 分析我国水产苗种产业发展规律预测未来发展趋势. 中国水产, 2006, 373(12): 66-70
- 龚艳清, 陈信忠, 王军, 等. 福建南部养殖石斑鱼暴发性疾病流行调查. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(5): 532-537
- Dalla VL, Zanella L, Patarnello P, *et al.* Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. J Fish Dis, 2000, 23(5): 321-327
- Grotmol S, Totland GK. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Dis Aquat Organ, 2000, 39(2): 89-96
- Grotmol S, Nerland AH, Biering E, *et al.* Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. Dis Aquat Organ, 2000, 39(2): 79-88
- Mu Y, Lin K, Chen X, *et al.* Diagnosis of nervous necrosis virus in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, by a rapid and convenient RT-PCR method. Acta Oceanologica Sinica, 2013, 32(10): 88-92
- Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(2): 297-307
- Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, *et al.* Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. Appl Environ Microbiol, 1981, 41(3): 718-723
- Shin GA, Sobsey MD. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 3975-3978
- Thiéry R., Johnson KL, Nakai T, *et al.* Family Nodaviridae. In: Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012, 1061-1066
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, *et al.* Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. Water Res, 2005, 39(15): 3650-3656

(编辑 冯小花)

## Development and Application of the LR RT-PCR Method for Evaluating Destructive Effects of Ozone on Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus

LI Jin<sup>1,2</sup>, SHI Chengyin<sup>1</sup>①, WANG Shengqiang<sup>1,2</sup>, SU Zidan<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) is one major pathogen of aquaculture. It mainly affects the larvae and juveniles of groupers. RGNNV is composed of two single stranded RNA (RNA1 and RNA2). Ozone can inactivate RNA virus by degradation of viral genome. So treatment by ozone is a common measure to disinfect RGNNV in farms. But it has no efficient methods to evaluate the disinfection effect of ozone up to now. In this report, a special RT-PCR named as LR RT-PCR (Left reverse transcript Right amplify RT-PCR) was developed and optimized to evaluate degradation effects of RGNNV RNA2 by ozone. Based on the 3' end and 5' end of RGNNV RNA2, a special reverse transcription primer and a set of PCR primers were designed respectively. The concentration of primers, Mg<sup>2+</sup>, dNTPs as well as annealing temperature of LR RT-PCR was optimized in this study. The sensitivity and specificity of LR RT-PCR also were confirmed. Finally the LR RT-PCR method was used to evaluate degradation effects of RGNNV RNA2 by ozone. With summarizing the results of the experiment, in 25  $\mu$ l of reaction volume, the optimized parameters of LR RT-PCR were primers 0.2  $\mu$ mol/L, Mg<sup>2+</sup> 4 mmol/L, dNTPs 0.5 nmol, *Ex Taq* 0.5 U and cDNA template 1  $\mu$ l. The annealing temperature was 60°C. The sensitivity of LR RT-PCR was 1 pg to RGNNV RNA2 and there were no cross reactions with genomic RNA from healthy groupers, DNA from common bacteria and viruses of aquaculture. Comparative analysis of LR RT-PCR and routine RT-PCR was carried out to evaluate the destructive effects by ozone. As the concentration of ozone increased from 0.3 mg/L to 2 mg/L in solution of RGNNV RNA2, the amplified product of LR RT-PCR decreased and finally was undetected. Former reported routine RT-PCR method for RGNNV detection did not reflect above tendency. This report demonstrated that the LR RT-PCR can quickly and accurately evaluate disinfection effects of RGNNV by ozone and can be widely used in hatcheries of groupers.

**Key words** Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV); RT-PCR; Detection; Ozone; Disinfection

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

# 基于 Roche 454 GS FLX 的钝吻黄盖鲽 (*Pleuronectes yokohamae*) 微卫星标记的开发\*



潘 婷<sup>1,2</sup> 张 岩<sup>2①</sup> 张 辉<sup>4</sup> 高天翔<sup>3</sup> 肖永双<sup>4</sup> 姜云荣<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003;  
4. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 利用 Roche 454 GS FLX 平台测序技术进行了钝吻黄盖鲽微卫星引物筛选, 并采用聚类分析的方法对得到的 5641 个微卫星位点进行类比分析, 得到 247 种多态性位点, 其中完美型占 52.22%, 非完美型占 20.24%, 复合型占 27.54%, (AC)<sub>n</sub>、(AG)<sub>n</sub> 两碱基重复类型的比例是 44%, 重复次数在 10 次以上的占总数的 87.5%。随机选取 11 个位点的微卫星引物, 采用 5 个野生个体, 利用荧光标记和毛细管电泳进行多样性评价, 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 不同位点得到的等位基因范围为 3–8, 平均等位基因数为 5.0。平均观望杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )及平均多态性信息含量(PIC)分别为 0.588、0.788 和 0.670。结果表明, 454 GS FLX 提供了一种直观、高效开发微卫星的方法。

**关键词** Roche 454 GS FLX; 钝吻黄盖鲽; 开发; 微卫星标记

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2015)01-0026-07

钝吻黄盖鲽(*Pleuronectes yokohamae*)隶属鲽科、黄盖鲽属, 分布于太平洋西部近海, 在我国黄海和渤海均产, 是重要的鱼类资源。国内外相关研究主要集中在钝吻黄盖鲽的形态学(张岩等, 2010)、同工酶(Fujio *et al*, 1979; 张岩等, 2007)、RAPD(张岩等, 2008)和 AFLP(Zhang *et al*, 2012), 目前未见关于开发钝吻黄盖鲽微卫星标记的报道。微卫星标记(SSRs, Simple Sequence Repeats)是一种广泛应用于科学领域的 DNA 分子标记(Sunnucks, 2000), 可用于生物的遗传多样性分析、遗传图谱的建立、亲子鉴定及遗传育种等(苗贵东等, 2011; 游翠红等, 2012; 樊佳佳等, 2012)。常见微卫星 DNA 筛选的方法有 4 种: 构建小插入片段基因组文库(徐鹏等, 2001); 构建微卫星 DNA 富集文库筛选微卫星标记; 利用近缘种之间引物通用性, 得到目的物种的微卫星标记(Morishima *et al*, 2009; 胡龙洋等, 2014); 从已经公布的序列中筛查微卫星

DNA (Akagi, 1996)。

最初采用构建和插入小片段基因组文库是 Tokuko 等(1998)在研究东南亚热带雨林树种龙脑香科植物 *Shorea curtisii* 时, 从 6000 个克隆中只获得 4 个阳性克隆, 最后只得到 1 个 SSR 引物对, 可见这种传统的方法阳性克隆得率很低, 成功获得引物的几率更低。为了提高 SSR 阳性克隆的得率, 人们利用 SSR 探针杂交技术对基因组 DNA 片段富集, 微卫星的富集方法有滤膜富集法和磁珠富集法, Karagyozov 等(1993)提出的滤膜富集法依然需要小插入片段基因组 DNA, 而 Kandpal 等(1994)提出的磁珠富集法利用亲和素能够与生物素偶联的因素, 高效富集微卫星位点, 然而此方法需要构建文库以及克隆测序等繁琐过程, 同时不能保证每个微卫星序列之侧翼序列的有效分离。利用近缘种的微卫星序列依赖于近缘种的微卫星研究结果以及引物通用性的质量, 大大限制了其应

\* 国家科技基础条件平台项目(2006DKA30470-006)资助。潘 婷, E-mail: mdpanting@163.com

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

收稿日期: 2014-01-06, 收修改稿日期: 2014-03-17

用(孙波等, 2009)。虽然当前三大 DNA 数据库(GenBank、EMBL、DDBJ)有丰富的 DNA 原序列, 但并不能保证所有物种的有效基因信息含量。

454 GS-FLX Titanium platforms 作为第二代测序技术的一种, 已广泛应用于动植物全基因组测序(Star *et al.*, 2011)、基因组重测序(Xia *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009)、转录组测序(Graham *et al.*, 2010)、小 RNAs 测序(Li *et al.*, 2011)和表观基因组测序(Xiang *et al.*, 2010)等方面。通过建立大型 Shotgun 基因组文库与合成的生物素探针进行杂交, 利用 454 测序平台读长目前达到 400<sub>nt</sub> 的优势, 不仅能够直接读出含有微卫星位点的多态 DNA 序列, 而且保证了开发的数量, 使微卫星标记的开发进入了一个新的时代(June *et al.*, 2012)。本研究利用 Roche 454 GS FLX 技术对钝吻黄盖鲈进行了微卫星标记开发, 可为进一步研究钝吻黄盖鲈群体遗传结构提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

11 个钝吻黄盖鲈样品来自 2005 年 4 月的朝鲜近海, 3 个样品来自 2012 年 9 月的山东威海近海, 分别取肌肉放入 95% 的乙醇中低温冰箱保存, 其中 5 个朝鲜近海野生个体用于多态性检测。

### 1.2 DNA 的提取、片段化和连接

用 DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司提供)分别提取基因组 DNA 后, 将朝鲜近海的 6 个个体基因组 DNA 混合形成 1 个混合样, 另外 3 个威海个体单独测序。根据 454 测序平台读长的要求, 采用高压氮气的方法, 进行 DNA 的片段化, 高压条件是 0.35 MPa, 持续 50 s。片段化的 DNA 进行末端修复, 修复体系由 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ PNK Buffer、2.5  $\mu$ l ATP、1  $\mu$ l dNTP、1  $\mu$ l T4 polymerase、1  $\mu$ l PNK、1  $\mu$ l *Taq* 组成。修复后的 DNA 片段进行切胶回收。片段范围为 400–700 bp, 主峰在 500–600 bp 之间。回收后的片段与连接接头连接, 连接接头是 Roche Rapid Library Prep Kit (Roche 公司)中的标准接头序列。连接产物利用磁珠纯化后, 得到 DNA shotgun 文库, 通过 PCR 扩大 shotgun 文库产量。引物分别是 Primer A (5'-CCATCTCATCCCT-GCGTGTCTCCGACGACT-3')和 Primer B (5'-CCTAT-CCCCTGTGTGCCTTG-3')。PCR 反应体系为 94 $^{\circ}$ C 3 min、18 循环(94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min)、72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.3 SSR 探针的合成、文库变性

SSR 探针依据 Zane 等(2002)和 Toth 等(2000)的方法合成, 探针序列分别为(AC)<sub>12</sub>、(AG)<sub>12</sub>、(AAT)<sub>12</sub>、

(AGG)<sub>8</sub>、(AGC)<sub>8</sub>、(AGAT)<sub>8</sub>和(ACAG)<sub>6</sub>, 并在 5'端加入生物素, 将合成的 7 种生物素探针等量混合与 DNA shotgun 文库中的单链 DNA 片段进行杂交。杂交温度为 58 $^{\circ}$ C, 杂交的缓冲液为终浓度为 6 $\times$ SSC+0.1% SDS。

### 1.4 SSR 文库磁珠富集、清洗及洗脱

将结合有生物素修饰探针的文库片段与链霉菌亲和素磁珠结合, 室温孵育 30 min。孵育后的杂交液在常温下用 6 $\times$ SSC+0.1% SDS 清洗两次, 于 58 $^{\circ}$ C 下用 3 $\times$ SSC+0.1% SDS 清洗两次, 58 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。在室温下 6 $\times$ SSC+0.1% SDS 清洗两次。加入超纯水悬浮磁珠, 室温放置 2 min, 吸除上清液。此时去除未结合的 DNA 文库片段以及非特异结合的片段。加入 Elution Buffer 充分混匀, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立即放置磁力架上, 静置 2 min 澄清, 吸取上清液得到分离的 SSR 产物。

### 1.5 SSR 富集及纯化

洗脱产物通过 PCR 扩增产量。PCR 反应体系, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 18 次循环包括 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。引物 A (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACGACT-3')以及引物 B (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTG-3')。利用配制的新鲜乙醇进行 PCR 产物的清洗, 25  $\mu$ l Elution Buffer 进行 PCR 最终产物的溶解至澄清, 转移至 PCR 管, 准备上机。

### 1.6 Roche 上机

SSR 文库利用 PicoGreen 和荧光分光光度计, 对文库进行定量。定量结果应在 PicoGreen 的标准曲线范围内, 且足够后续的 emPCR 使用。emPCR 是基于 Roche 454 的测序技术, 将一条 DNA 片段锚定到一个磁珠上, 磁珠被单个油水混合小滴包被后, 在这个小滴里进行独立的扩增, 而没有其他的竞争性或者污染性序列的影响, 从而实现了所有 DNA 片段进行平行扩增。emPCR 之后进行 Roche 上机, 上机条件是根据一定大小分区上对应的磁珠数目。对于本实验的 1/4 区而言, 上机 79 万磁珠。

### 1.7 数据分析

Agilent 2100 生物分析仪以及 High Sensitivity DNA kit 用于检测片段大小分布。使用 MISA 程序进行 SSR 位点的搜索, 使用 Primer 3 进行引物设计, 并限制扩增产物长度在 100–400 bp 之间, 退火温度接近 60 $^{\circ}$ C。利用 perl 程序屏蔽序列上的重复序列(用

字母 R 代替), 过滤掉侧翼序列短于 20 bp 的 SSR 位点(侧翼序列过短则无法进行相似性比对)。利用 Cluster 3.0 对过滤后的序列进行多序列聚类, 并在多重比对过程中限制: 扩增产物长度在 100–400 bp; 微卫星位点的侧翼序列长于 20 bp; 序列进行对齐, 其相似度要超过 95%; 退火温度接近 60℃。微卫星 DNA 序列若符合如上条件则认为是相同的 DNA 序列, 并最终获得 SSR 多态性位点种类。

### 1.8 多态性检测

随机选取 11 个 SSR 位点引物, 利用 FAM、HEX、TAMRA 进行标记, 对微卫星扩增产物进行毛细管电泳检测。PCR 反应程序为 94℃ 5 min 预变性, 接下来 94℃ 变性 30 s、引物特定退火温度(表 1) 30 s、72℃ 延伸 30 s 进行 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 7 min。扩增产物在 ABI3730xl 基因分析仪上检测。利用 Popgene 32 计算观望杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )以及多态信息含量( $PIC$ ):

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left( \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

式中,  $P_i$ 、 $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因频率,  $n$  为等位基因数目。运用 Hardy-Weinberg 平衡检测法分析无效等位基因。

## 2 结果

### 2.1 高通量测序结果

Roche 454 GS FLX 测序结果共得到 18955 条微卫星序列。通过 Primer 3 设计引物, 排除位点是单碱基重复的类型, 共得到 5461 个 SSR 引物。利用 perl 和 UCLUST 对 SSR 引物进行界定, 运用 Mega 5.0 进行聚类相似性比较, 共得到 247 种相似的多态性位点, 完美型占 52.22%, 其中重复次数在 10 次以上的占总数的 87.5%, 最高次数可达到 31 次, 非完美型占 20.24%, 复合型占 27.54%。

表 1 钝吻黄盖鲈的 11 个微卫星位点的基本信息

Tab.1 Characterization information of 11 novel microsatellite markers from *P. yokohamae*

位点 Loci	重复单位 Repeats	引物序列 Sequence (5'-3')	产物 Product(bp)	退火温度 (°C)	观望杂合 度 $H_o$	期望杂合 度 $H_e$	$PIC$
PTH1	(GA) <sub>11</sub> gc(GA) <sub>6</sub>	CAGAGCTTGCAATCAAAC CA AAAGGACTGCTACTTTTGGGA	137–151	61.5	0.8	0.844	0.730
PTH2	(GT) <sub>8</sub> g(GT) <sub>7</sub>	TGACAGACCATTTGTGAAAGAAG GATGGTACAGCCCTTGTGGT	186–208	61.5	1.0	0.689	0.548
PTH3	(TG) <sub>11</sub>	GTAAGGCAGGGGGCTAAAAT CAGGCCAATTAGCCCAGATA	358–364	61.0	0.6	0.711	0.581
PTH4	(GT) <sub>7</sub> ggatg(GT) <sub>7</sub>	TGACAGACCATTTGTGAAAGAAG GTACAGCCCTTGTGGTTGCT	175–204	61.0	0.8	0.778	0.645
PTH5	(AC) <sub>10</sub>	TTGACAACAGCACGTCACAA TCAGCAGTCGTCCAATTCAG	217–224	61.0	0	0.622	0.499
PTH6	(AC) <sub>11</sub>	CAGCTCGTGTCTCAATCAGC TGAGGTGGTGTCTGGGTGTA	257–324	61.0	0.6	0.844	0.730
PTH7	(AC) <sub>13</sub>	CTTGATTAGCCTGCACACGA ATCTGCAAGATGCTTACGGG	205–219	61.0	0.2	0.644	0.535
PTH8	(GT) <sub>18</sub>	ACAATGTGCTTCGGTCACTG CCTCCCTTCACTCTTTCCC	320–339	61.5	1.0	0.822	0.701
PTH9	(GT) <sub>13</sub>	TAAAGCGTGTGCTGCTGGTTG TTGACCCGAGTGGAGTTACC	133–153	56.0	1.0	0.933	0.820
PTH10	(AC) <sub>10</sub>	GAACATGTGCACACCGAATC TGGTCATGTGCTGAGAGGAG	121–153	56.0	0	0.622	0.499
PTH11	(GT) <sub>10</sub>	ATCTGCAGTGTGAATGTGC CTGCCTGCCATGACTCAGTA	305–335	58.0	0.8	0.933	0.820

### 2.2 微卫星位点片段分布大小的总体情况

通过 Agilent 2100 和 High Sensitivity DNA kit, 检测微卫星位点片段大小范围 10–19 bp 之间(图 1)。A+C 碱基比例占 50%。

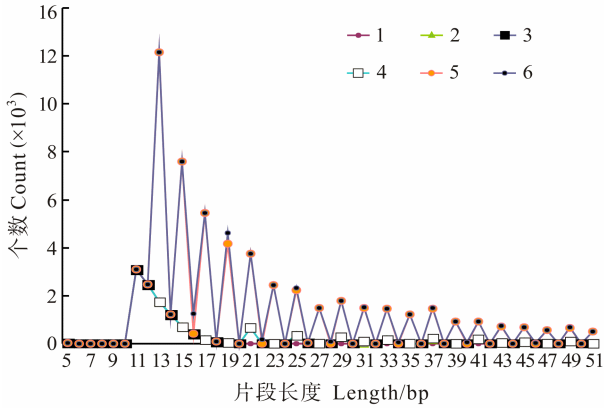


图 1 SSR 位点片段大小分布

Fig.1 Fragment size distribution of microsatellite locus

### 2.3 毛细管电泳荧光标记检测

5 个样品的 11 个微卫星 DNA 位点均采用毛细管电泳检测。图 2 是位点 PTH8 的 5 个样品 PCR 产物在 ABI3730xl 仪器上经毛细管电泳检测后用 Genemapper 分析的结果(荧光标记是 TAMRA)。其基因型(等位基因的片段大小)分别是 324/332、320/324、320/332、320/339、320/330。

### 2.4 位点多态性检测

利用 Popgene 32 计算观望杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、多态信息含量(PIC)(表 1), 其中 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 探针的选择

微卫星又称简单重复序列, 广泛存在真核生物基因组中的简单重复 DNA 片段, 在动物体中以双核苷酸(CA/GT)<sub>n</sub> 最为常见(Maguire, 2000)。本研究选用(CA)<sub>12</sub>、(AG)<sub>12</sub>、(AAT)<sub>12</sub>、(AGG)<sub>8</sub>、(AGC)<sub>8</sub>、(AGAT)<sub>8</sub> 和(ACAG)<sub>6</sub> 7 种生物素探针分离微卫星座位, 结果获得(CA)/(GT)、(AG)/(TA)<sub>n</sub> 二碱基微卫星重复类型的比例是 44%, (AAT)<sub>12</sub>、(AGG)<sub>8</sub>、(AGC)<sub>8</sub>、(AGAT)<sub>8</sub> 和(ACAG)<sub>6</sub> 碱基重复类型的比例是 5%。在得到的微卫星重复类型中还观察到 5.8%的(GA)/(TC), 说明 Roche 454 不仅能够获得所需要的微卫星数目, 而且能够得到难以分离的微卫星序列。

### 3.2 聚类分析

由于高通量测序获得的数据大多为一致性序列数据, 即重复序列较多, 从而增加了后期筛选的工作量。从目前发表的文献看, 通过高通量测序得到的一致性序列数据中, SSR 位点的概率非常低。如 Hou 等(2011)利用 454 高通量测序技术分析了虾夷扇贝不同发育阶段和成体不同组织的转录组特征, 从获得的 80.5 万条序列中仅鉴别了(0.03%) 2700 个 SSR 标记, 仅占序列总数的 0.03%。吴琼等(2012)利用 454 GS FLX 对东北红豆杉的 20557 条一致性序列数据挖掘, 获得了 753 个微卫星标记(占总序列数的 3.7%)。

聚类分析的目标就是在相似的基础上收集数据来分类。目前微卫星聚类分析已经应用在系谱亲缘关系分析(刘建建等, 2004)和品种鉴定(王伟等, 2010)等方面。为了减少后期筛选 SSR 位点的工作量, 本研

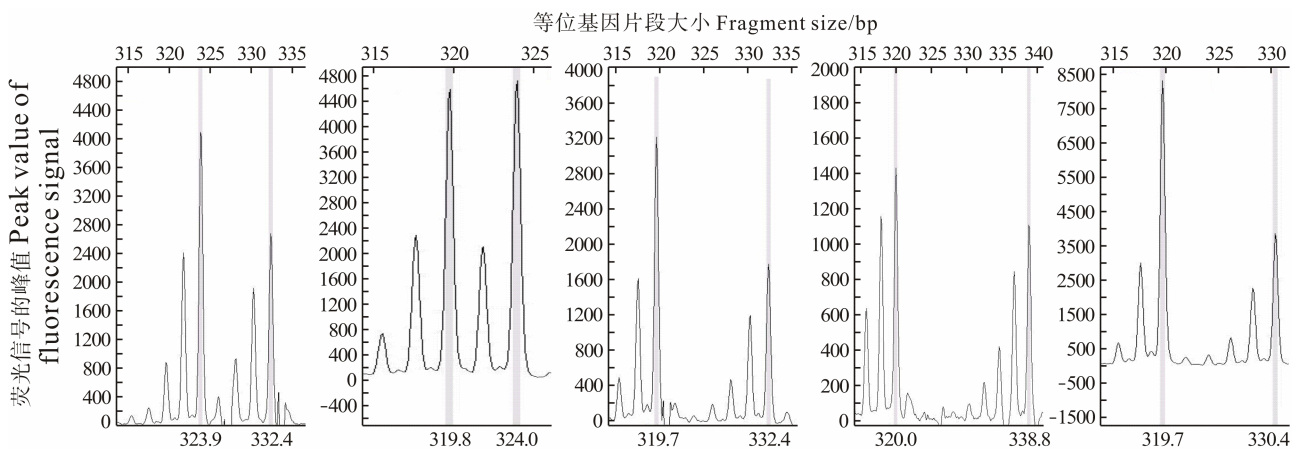


图 2 钝吻黄盖鲈位点 PTH8 的 5 个个体毛细管电泳

Fig.2 Capillary electrophoresis patterns of five individual locus PTH8 of *P. yokohamae*



究首次将聚类相似对比分析应用到微卫星标记的开发中,对获得的 5641 个微卫星位点进行了聚类相似对比分析。

如果 SSR 标记的侧翼序列过短则无法进行相似性比对,Weber(1990)认为,只有在双碱基重复序列次数大于 12 次时,微卫星标记才有可能表现出较高的 PIC 值,才可以进行相应的多态性分析;孙效文等(2005)也认为,重复数在 10 次以上的微卫星序列对于筛选多态性信息含量高的分子标记是有利的。因此在聚类分析时决定用 Perl 程序过滤掉侧翼序列短于 20 bp 的 SSR 位点。在用 UCLUST 对过滤后的序列进行聚类多序列对齐时,主要考虑了以下因素:

(1) 由于小于 100 bp 的序列在琼脂糖电泳时很难与二聚体分开,且 454 高通量测序的读长可达到 400<sub>nt</sub>,因此在聚类分析时选择了扩增产物长度在 100–400 bp;

(2) 在进行多重对比时还要求微卫星核心序列重复次数应当达到较高的水平,以避免重复基因座位导致微卫星标记的多态比例过低而造成浪费。本研究规定其相似度要超过 95%,至于低于 95%的相似度能否保证较低的重叠率还需要进一步的分析验证。

基于以上的参数设定,获得的 5641 个微卫星位点通过聚类分析分为了 247 种类型,可以认为是 247 个不同的 SSR 位点。为了验证分析结果,从中随机选取了 11 个在两个地点样品共有的 SSR 位点进行了多态性分析,结果表明选取的 11 个位点均为多态性位点,取得了良好的效果。

### 3.3 Roche 454 开发微卫星位点的优势

根据 Weber(1990)的分类方法,微卫星可以分为三类:完美型、非完美型和混合型。在本研究所获得的 247 个微卫星序列中,完美型占 52.22%,非完美型占 20.24%,复合型占 27.54%。Smulders 等(1997)认为,重复次数多的微卫星既能在种间也能在种内产生多态性,但重复次数少的微卫星,仅能在种间产生多态性。Xu 等(1990)曾在斑节对虾进行微卫星引物设计,最后的结果表明,凡是核心序列重复次数较少的微卫星标记,其结果或单态或等位基因数目非常少, PIC 值也偏低。本研究基于 Roche 454 测序技术获得的微卫星序列重复数在 10 次以上的占总数的 87.5%,表明本方法与传统方法相比,能获得更多多态性信息含量高的分子标记,这可能是由于目前 Roche 454 读长较长导致获得微卫星序列比较长,重复次数较多的缘故。

运用传统的筛选小插入片段基因组文库的方法

分离微卫星 DNA(Zane *et al.*, 2002)开发耗时费力,多态性也不尽如人意,如战爱斌等(2008)菌落原位杂交共得到 532 个阳性克隆,开发的位点只有 56.92%表现为多态性;袁慧等(2008)磁珠富集法构建岩原鲤(*Procypris rabaudi*)微卫星文库只得到 61 个微卫星序列,60%的引物对能产生特异性的目的片段;而本研究利用 Roche GS FLX 得到 18955 条微卫星序列,同时随机筛选的被检测的引物多态性表现为 100%,远远高于其他方法。郝卓然等(2012)采用磁珠富集法筛选新疆扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*)的微卫星标记,并进行扁吻鱼群体遗传多样性分析,得到 1000 个 SSR 位点,平均多态信息含量(PIC)为 0.535。龚小玲等(2009)采用小片段克隆法对澳洲鳗鲡(*Anguilla australis*)微卫星筛选,得到 76 位点,澳洲鳗鲡的 1 个群体平均多态性信息含量的分别为 0.737。本研究通过 454 测序平台得到 5641 个微卫星位点,平均多态信息含量(PIC)为 0.67(>0.5)。因此,454 高通量测序不仅能够得到大量的微卫星位点,而且筛选的微卫星位点均为高度多态位点。

综上所述,与其他微卫星开发方法相比,高通量测序可以筛选到更多的微卫星位点,聚类分析可以有效减少后期筛选 SSR 位点的工作量,且筛选的微卫星位点多态信息含量较高。随机选取的 11 个微卫星位点均为多态性位点,适合用于钝吻黄盖鲈遗传多样性、种群遗传结构等研究的重要分子标记,可为钝吻黄盖鲈资源的管理和合理开发利用、种质资源的保护等提供理论依据,并为钝吻黄盖鲈遗传育种等研究提供参考资料。

## 参 考 文 献

- 王伟,杨文鹏,冯浪,等.利用聚类分析筛选玉米杂交种 SSR 指纹库中鉴别能力强的标记.种子,2010,29(10):35–40
- 刘世建,荣廷昭,杨俊品,等.四川地方玉米种质的 SSR 聚类分析.作物学报,2004,30(3):221–226
- 孙效文,贾智英,魏东旺,等.磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究.中国水产科学,2005,12(2):126–131
- 孙波,鲍毅新,张龙龙,等.大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增.动物学杂志,2009,44(6):145–150
- 吴琼,段小群,陈旭,等.基于高通量测序的红豆杉 EST-SSRs 标记研究.中国中药杂志,2012,37(24):3728–3733
- 张岩,肖永双,高天翔,等.钝吻黄盖鲈不同群体形态学比较研究.渔业科学进展,2010,31(5):15–21
- 张岩,肖永双,高天翔.钝吻黄盖鲈野生群体遗传多样性分析.水产学报.2008,32(3):492–496
- 张岩,高天翔,刘曼红,等.钝吻黄盖鲈同工酶组织特异性及群体遗传结构的初步研究.中国海洋大学学报(自然科学

- 版), 2007, 37(2): 235–242
- 苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 44(Z1/2): 97–106
- 胡龙洋, 栾生, 毛勇, 等. 日本对虾养殖群体两个世代遗传结构的微卫星分析. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 74–82
- 郝卓然, 梁利群, 常玉梅, 等. 扁吻鱼微卫星的筛选及群体遗传多样性分析. 水产学杂志, 2012, 25(3): 20–25
- 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记. 水产科学, 2008, 32(3): 353–361
- 袁慧, 张修月, 宋昭彬, 等. 岩原鲤微卫星富集文库的构建及微卫星分子标记的筛选. 四川动物, 2008, 27(2): 210–215
- 贾志英, 全迎春, 梁利群. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特征的研究. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 11–15
- 徐鹏, 加建斌, 相建海. 中国对虾微卫星的筛选. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255–259
- 龚小玲, 李思发, 蔡完其, 等. 澳洲鳎微卫星分子标记的筛选与检测. 中国水产科学, 2009, 16(1): 133–138
- 游翠红, 童金苟, 俞小牧. 大鳞副泥鳅 7 个群体遗传变异的微卫星分析. 水生态学杂志, 2012, 33(1): 84–91
- 樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析. 水生生物学报, 2012, 36(4): 600–609
- Akagi H. Microsatellite DNA marker for rice chromosome. Theor Appl Genet, 1996, 93: 1071–1077
- Arden WR, Borer S, Thrower F, et al. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. J Hered, 1990, 90: 529–536
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, et al. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. Am J Hum Genet, 1993, 52(5): 922–927
- Fujio Y, Koto Y. Genetic in fish population. Soc Scient Fish, 1979, 45(9): 1169–1178
- Graham IA, Besser K, Blumer S, et al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science, 2010(15), 327: 328–331
- Hou R, Bao ZM, Wang S, et al. Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. PloS one, 2011, 6(6): e21560–21561
- Huang XH, Feng Q, Qian Q, et al. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. Genome Res, 2009, 19(6): 1068–1076
- June EZ, Hugo C, Huayu Z, et al. Using next-generation sequenced application to isolate Simple Sequence Repeat (SSR) loci in the plant sciences. Botany, 2012, 99(2): 193–208
- Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones and hybridization selection for region specific markers. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(1): 88–92
- Karagyozov L. Construction of random small-inster genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. Nucleic Acid Res, 1993, 21(16): 3911–3912
- Lam HM, Xu X, Liu X, et al. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. Nature Genetics, 2010, 42(12): 1053–1059
- Li T, Li H, Zhang YX, et al. Identification and analysis of seven H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Nucleic Acids Res, 2011, 39(7): 2821–2833
- Morishima K, Arai K. Cross-species amplification of microsatellite markers for the brown sole in the family Pleuronectidae. Fish Sci, 2009, 75: 1103–1107
- Maguire TL, Edwards KJ, Saenger P. Characterization and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). Theor Appl Genet, 2000, 101(1): 279–285
- Sang-Gyu K, Kagayaki M, Katsutoshi A. Cross-species amplification of microsatellite markers for the brown sole in the family Pleuronectidae. Fisheries Sci, 2009, 75(5): 1103–1107
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. Mol Ecol, 1999, 8(3): 407–417
- Smulders MJ, Bredemeijer G, Rus-kortekaas W, et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 1997, 94(2): 264–272
- Star B, Nederbragt AJ, Jentoft S, et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. Nature, 2011, 477(7363): 207–210
- Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. Trends Ecol Evol, 2000, 15(5): 199–203
- Tokuko U, Kawahara T, Tsumura Y, et al. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. Heredity, 1998, 81(4): 422–428
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellite in different eukaryotic genome: survey and analysis. Genome Res, 2000, 10(7): 967–981
- Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. Genomics, 1990, 7(4): 524–530
- Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). Newslett Sericultural Sci, 2009, 29(3): 1–6
- Xiang H, Zhu J, Chen Q, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. Natl Biotechnol, 2010, 28(5): 516–520

- Xu Z, Dhar AK, Wyrzykowski J, *et al.* Identification of abundant and information microsatellites from shrimp genome. *Anim Genet*, 1990, 30(2): 1–7
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 2002, 11(1): 1–16
- Zhan AB, Bao ZM, Wang XL, *et al.* Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. *Fisheries Sci*, 2005, 71(6): 1341–1346
- Zhang H, Yu H, Gao TX, *et al.* Analysis of genetic diversity and population structure of *Pleuronectes yokohamae* indicated by AFLP markers. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 44(8): 102–108

(编辑 冯小花)

## Microsatellite Loci Isolated by Roche 454 GS FLX in *Pleuronectes yokohamae*

PAN Ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>2①</sup>, ZHANG Hui<sup>4</sup>, GAO Tianxiang<sup>3</sup>, XIAO Yongshuang<sup>4</sup>, JIANG Yunrong<sup>1,2</sup>

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

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** Roche 454 GS FLX, the second-generation sequencing technique, can read longer fragments accurately and isolate SSR markers, and thus has been widely used in many fields of research. In this study, we applied Roche 454 GS FLX to isolate the microsatellite loci and developed the identification of microsatellites markers in *Pleuronectes yokohamae*. (AC)<sub>12</sub>, (AG)<sub>12</sub>, (AAT)<sub>12</sub>, (AGG)<sub>8</sub>, (AGC)<sub>8</sub>, (AGAT)<sub>8</sub> and (ACAG)<sub>6</sub> were hybridized with shotgun library of DNA samples. This SSR library was constructed through magnetic beads enrichment, cleaning, elution and purification. The SSR library was then sequenced with Roche 454 GS FLX. MISA was used to search for microsatellite motifs and primer 3 was used to design the primers for *P. yokohamae*. FAM, HEX, and TAMRA were used to label the microsatellite primers (5'), which were used in the triplex PCR or the nested PCR to identify the genotype of the microsatellite loci. The cluster similarity comparison method was first used to analyze 5641 loci that we obtained, and 247 types of loci with high polymorphism were screened. Among these loci, 52.22% were perfect, 20.24% were imperfect and the rest 27.54% were compound. The percentage of (AC)<sub>n</sub> and (AG)<sub>n</sub> was 44% in these loci, and 87.5% of them were more than 10-time repeats. Eleven pairs of fluorescent primers were designed according to the selected loci (more than 10-time repeats) and were applied in 5 individuals. The number of alleles per locus ranged from 3 to 8 with an average value of 5. The average values of  $H_o$ ,  $H_e$  and  $PIC$  were 0.588, 0.788 and 0.670 respectively. Four loci among 11 deviated from Hardy-Weinberg. The results of this research indicated that 454 GS FLX was an intuitive and efficient technique for microsatellite isolating. Our study provides essential information about the population genetic diversity of *P. yokohamae*, and helps improve the artificial breeding.

**Key words** Roche 454 GS FLX; *Pleuronectes yokohamae*; Isolating; Microsatellite markers

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

# 三倍体牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)群体遗传多样性的微卫星分析\*



刘 慧<sup>1</sup> 吴志昊<sup>2</sup> 李 桢<sup>1①</sup> 朱香萍<sup>1</sup> 尤 锋<sup>2①</sup>  
宋宗诚<sup>3</sup> 李 军<sup>4</sup> 胡金伟<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学 青岛 266109; 2. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室  
中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 3. 威海圣航水产科技有限公司 威海 264200;  
4. 海洋生物工程技术研究发展中心 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用微卫星遗传标记技术对三倍体牙鲈群体及二倍体对照群体进行比较分析。取 2012 年冷休克诱导和培育至 11 月龄的三倍体及同期二倍体对照牙鲈个体各 32 尾, 通过高盐法提取肌肉组织总 DNA; 利用筛选得到的 21 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 并经 14% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分型后, 进行人工判读和分析。结果显示, 21 个微卫星位点均为多态, 二倍体和三倍体群体的平均等位基因数( $A$ )、基因型总数、平均有效等位基因数( $a_e$ )、平均观测杂合度( $H_O$ )和平均期望杂合度( $H_E$ )分别为 5.6 和 5.0、190 和 142、3.7 和 2.8、0.613 和 0.868、0.681 和 0.629。二倍体和三倍体群体的多态信息含量( $PIC$ )分别为 0.642 和 0.589, 个体识别率( $DP$ )为 0.660 和 0.609, 非父排除率( $PPE$ )为 0.482 和 0.399, 其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.999, 表明所选座位均属中高识别力的遗传标记, 可以将它们应用于今后牙鲈雌核发育群体的遗传变异分析以及进一步的遗传育种的研究中。二倍体和三倍体群体间的遗传距离( $D$ )为 0.312, 遗传相似系数( $I$ )为 0.732, 基因分化系数( $G_{ST}$ )为 0.971。以上结果说明, 三倍体诱导对牙鲈的遗传结构造成了一定影响, 导致三倍体遗传多样性水平相对二倍体有所下降, 二倍体和三倍体牙鲈的基因型也存在一定差异。

**关键词** 牙鲈; 三倍体; 人工诱导; 微卫星; 遗传多样性

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0033-08

三倍体鱼类通常性腺发育异常, 可将性腺发育所需的能量转换到生长上, 一般具有较高的生长速度; 同时, 因其不育或低育, 也可避免品种混杂和退化, 对控制养殖鱼类的过度繁殖和保护天然种质资源具有极其重要的意义。早在 1943 年, Makino 等开始了人工诱导三倍体鲤(*Cyprinus carpio*)的研究。1958 年, Swarup 等成功将三倍体刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)培育至成鱼, 并比较了它们与正常二倍体在生长和性

腺发育方面的异同。经过 60 多年的研究, 鱼类三倍体诱导技术已经比较成熟, 并在大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等几十种鱼类中取得成功, 有的甚至已经应用于养殖生产。目前, 对鱼类三倍体的研究多集中在诱导和生长观察上(楼允东, 1984; Maxime, 2008), 关于遗传结构的报道较少。刘琳(2008)<sup>1</sup>利用同

\* 国家 863 计划资助项目(2012AA10A402)、山东省自然科学基金项目(ZR2011CM035)、山东省科技发展计划项目(2013GHY11526)和鲆鲽类产业技术体系和苗种繁育项目科学家课题(NYCYTX-50)共同资助。刘 慧, E-mail: liuhuifeifei@126.com

① 通讯作者: 李 桢, 副教授, E-mail: zacheryli2012@126.com; 尤 锋, 研究员, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

收稿日期: 2014-03-20, 收修改稿日期: 2014-06-25

1) 刘琳. 应用 DNA 及同工酶遗传标记检测分析二、三倍体鲫鱼的遗传结构. 天津师范大学硕士学位论文, 2008, 22-35

工酶对鲫鱼(*Carassius auratus*)的二、三倍体的遗传结构进行了检测, Liu 等(1996)也利用同工酶对三倍体鲶鱼(*Silurus asotus*)进行了比较分析, 发现人工诱导导致三倍体部分等位基因缺失, 并使其遗传多样性下降。

微卫星具有共显性、多态性高、重复性好等优点(田吉腾等, 2013), 已在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang *et al*, 2008)、牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Garnier-Géré *et al*, 2002)等三倍体群体的遗传变异分析进行应用。在鱼类中, 微卫星分子标记已用于三倍体染色体来源分析(Alves *et al*, 2004; Nomura *et al*, 2006)和遗传连锁图谱构建等方面(蔡明夷等, 2010), 而用微卫星分析三倍体遗传结构的研究还较少, 仅见于三倍体花鲢(*Poecilia formosa*)的遗传多样性分析(Lampert *et al*, 2005), 国内尚未见到利用微卫星分子标记对三倍体鱼类的遗传多样性进行分析的报道。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)作为一种重要的海洋经济鱼类, 在中国、日本和韩国的渔业中占有重要地位, 也是我国沿海工厂化、池塘和网箱养殖的主要品种之一(臧坤等, 2013)。早在 20 世纪 80 年代, 日本学者就开始了牙鲆三倍体的研究, 并对诱导成功的三倍体牙鲆进行了存活率和生长情况观察(Kazoo *et al*, 1989)。三倍体牙鲆在国内于 1995 年诱导成功, 并开展了核型分析(尤锋等, 1995)、生长(Xu *et al*, 2010)及性腺发育(王磊等, 2011)等方面的研究。本研究用微卫星分子标记对二倍体及三倍体牙鲆群体遗传多样性进行比较, 以期明确三倍体与二倍体群体遗传结构的差异, 并进行鉴别, 可为三倍体牙鲆的深入研究及生产应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

牙鲆三倍体于 2012 年在山东威海圣航水产公司用冷休克法诱导(尤锋等, 1995), 并用同批精卵受精获得的二倍体受精卵作为对照组同步进行培育比较。在初孵仔鱼期, 使用流式细胞仪检测 DNA 含量的方法对三倍体诱导组样品进行倍性检测。取初孵仔鱼 30 尾, 分别轻轻匀浆获得细胞悬浮液, 经分散液分散、DAPI 染色后, 用流式细胞仪(Partec, 德国)测定峰值, 同时以二倍体为对照, 确定诱导组个体的倍性、计算诱导率(蔡明夷等, 2010), 测得本实验三倍体组诱导

率为 100%。对照组与三倍体组牙鲆在相同条件下培育至 11 月龄时, 平均全长分别为(17.80±1.41) cm 和 (19.40±1.72) cm, 平均体重分别为(60.7±14.4) g 和 (85.7±23.6) g。分别随机取 32 尾鱼, 用流式细胞仪再次验证倍性后, 取肌肉组织, 保存于-20℃冰箱中备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 分别剪取上述保存的肌肉组织约 50 mg, 用高盐法提取全基因组 DNA(汪永庆等, 2001), 分别用 1%琼脂糖电泳及 Nanodrop 1000 分光光度计(Thermo, 美国)检测其质量和浓度, 稀释至 50 ng/μl 待用。

**1.2.2 PCR 反应和电泳** 本研究从 Sekino 等(2000)、Kim 等(2003)和高峰涛(2012)<sup>1)</sup>报道的牙鲆微卫星引物中选取 35 对引物, 筛选出 21 对多态性较高的引物用于群体遗传分析(表 1)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系: 2×PCR mix (KCl 100 mmol/L、Tris-HCl 20 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L、dNTPs 400 μmol/L) 12.5 μl, 引物各 4.0 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 50 ng, 加水补至 25 μl。PCR 反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测后, 用 14%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型。电泳完毕后用硝酸银进行银染, 照相分析。

**1.2.3 数据统计及分析** 将电泳谱带中的每 1 条 DNA 片段作为该位点的 1 个等位基因来处理, 在相同的迁移位置, 出现 1 条扩增带记录为 1, 无扩增带记录为 0。针对三倍体可能由于 3 个等位基因中有两个等位基因相同而出现两条电泳条带的情况, 可以通过比较银染条带染色的深浅来判断, 认为染色较深的电泳条带为两个等位基因的叠加, 记录为 2。参照王伟等(2004), 计算了每个微卫星座位的平均等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、多态座位观测杂合度( $H_o$ )与无偏倚预期值( $H_e$ )、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )以及群体平均杂合度( $H$ )来考察群体内的遗传变异水平; 同时计算遗传相似性系数( $I$ )、遗传距离( $D$ )和基因分化系数( $G_{ST}$ )来研究三倍体与二倍体对照群体间的遗传变异水平; 并计算了每个座位上的多态信息含量( $PIC$ )、个体识别率( $DP$ )和非父排除率( $PPE$ ), 用来评价所选标记在个体识别和亲权鉴定上的应用价值。

1) 高峰涛. 牙鲆微卫星遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学博士学位论文, 2012, 36-56

表 1 实验所用 21 个微卫星标记、退火温度及其引物序列

Tab.1 Annealing temperatures and primer sequences of 21 microsatellite loci used in the study

序号 No.	位点 Locus	退火温度 Annealing temperature (°C)	引物序列 Primer sequence (5'-3')
1	kop7	67	F: GTGACACACCTCTGCTTCCTG R: GAGGACGTGGTTGAGATCACAG
2	kop8	67	F: ACTTCACCCCAGAGACAAGCC R: GGCTGTCAGGAACTGTGGAG
3	kop12	65	F: CTTGGCTGTCAGGAACTGTG R: CTTCCAGCAGCAACAGGTTTAC
4	kop15	62	F: ACTGGATGCCTCACTTATAACC R: GATTCTCACGTTTCCATGTC
5	kop18	67	F: GAAGGATCTGGACTCATGGTGAC R: CAGCAGCAAAGGCAGAAAGAG
6	kop22	62	F: GTGTATGTGTTTCGTTTCCTGC R: TGAAGGCTGTTGTGTGTAG
7	kop23	65	F: TCGATGAGTGCCTCGCAACTA R: ACCGCAGTCTGCAGTTCCTCT
8	kop26	60	F: CAGTAAAACAGTCCCTCCTGAAC R: GGAGTCTGGAACCAAATGTCTG
9	po-str1	58	F: GATTGTTTCAGTACCTGTTCAACCTG R: TCATTAACAGACGGAGCACCC
10	po1	55	F: GCCTTTTGTTCAGCCATTAACAGAGC R: CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT
11	po13	58	F: CGGCCTAAACCTGGACATCCTCTCTA R: CGGGACAACGGAGGTTTGACTGAC
12	po42	55	F: CGAGCGCTGTTTCAACTACGGTTCATT R: ATGATGATCTAACCGTCCGGCTCCAT
13	po48	55	F: GCCTCCAGAAACATTTATGGGG R: TGTCTTGCCTCTGGTCCTTCTT
14	po56	55	F: TCGAGCGTAAACAAACCAGCTAACA R: GCTGAAAATCGCTTTAGCTTCCCAT
15	po89	60	F: ATCAGAAGTCATCCATGCACTGGCAC R: AGCTACTTATCCACAGGTGTCGACGG
16	po91	55	F: AGGTTTCAAGGTGTTTCATTGCGAGTC R: TAAAGGAAGTGCCTCACTGTGGAGAA
17	jn900512	57.5	F: CCTCACAATGATGGCATTGAACC R: AGCCTAATGGTCAGCTGTGTT
18	jn900519	57.5	F: CCTGAGCATGACACTTGACG R: GTTTCTGTTCAGGTGCGTGAG
19	jn900522	57.5	F: TCACAGCCATGATGAGGAGTTTC R: CATCAACTGAGGGATGTCGCTA
20	jn900527	57.5	F: TTAAGTCTCAGTGGGAACTGG R: CCTTTCTATGGATCTGGGTCCG
21	jn900530	57.5	F: GAGTCATAGATGGGAACCTGCA R: TGATATGTGGCATCCTGGCA

## 2 结果

使用 21 对微卫星引物对二倍体和三倍体牙鲆群体各 32 尾进行分析,二倍体个体的等位基因数为 1-2 个,三倍体个体的等位基因数为 1-3 个。部分引物的扩增图谱见图 1,两个群体的 21 个微卫星位点的等位基因频率见表 2。

二倍体和三倍体牙鲆群体每个位点的等位基因数、有效等位基因数、多态位点杂合度的观测值、无偏倚预期值及遗传偏离指数见表 3。二倍体在 21 个微卫星位点检测到等位基因 3-10 个,三倍体检测到等位基因 3-7 个;有效等位基因数分别为 3.7 和 2.8;二倍体和三倍体群体的平均期望杂合度分别为

0.681、0.629。二倍体群体在 15 个位点遗传偏离指数为负值,而三倍体中仅有两个。

在二倍体和三倍体群体中,21 个微卫星位点的 *PIC* 分别为 0.115-0.828 和 0.328-0.781, *DP* 分别为 0.119-0.834 和 0.400-0.788, *PPE* 分别为 0.103-0.707 和 0.169-0.627,其累积个体识别率和非父排除率都大于 0.999,属于中高识别力的遗传标记系统(表 4)。二倍体和三倍体的遗传距离为 0.312,遗传相似系数为 0.732,基因分化系数为 0.971。

## 3 讨论

微卫星 DNA 在基因组中广泛而随机分布,具有

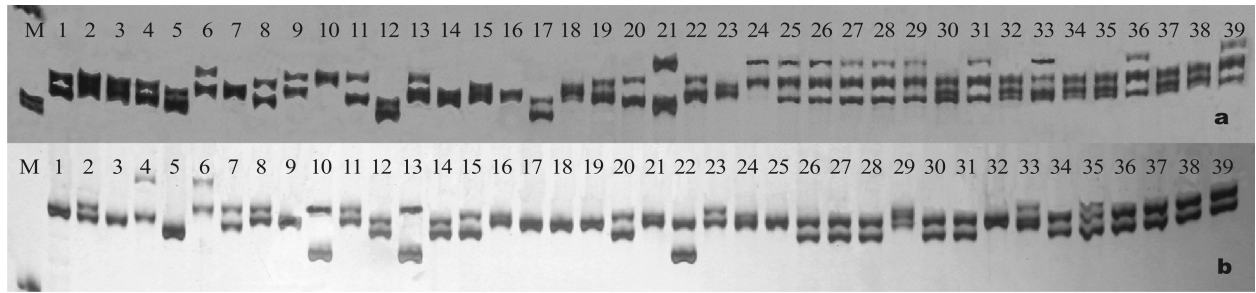


图1 二倍体和三倍体牙鲈部分个体微卫星引物 jn900519(a)、po56(b)扩增电泳图谱

Fig.1 The electrophotographs of microsatellite markers, jn900519(a) and po56(b) in diploid and triploid *Paralichthys olivaceus*

M: DNA 100 bp ; 1、5: 父本 ; 2-4、6、7: 母本 ; 8-23: 二倍体 ; 24-39: 三倍体

M: DNA 100 bp ladder; 1, 5: Paternal; 2-4, 6, 7: Maternal; 8-23: Diploid; 24-39: Triploid

表2 二倍体和三倍体牙鲈21个微卫星位点的等位基因频率

Tab.2 Allele frequencies of 21 microsatellites loci in diploid and triploid *P. olivaceus*

位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid	位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid
kop7	1	0.000	0.229	po13	1	0.047	0.021
	2	0.078	0.021		2	0.047	0.010
	3	0.016	0.010		3	0.093	0.229
	4	0.156	0.000		4	0.063	0.031
	5	0.156	0.042		5	0.063	0.063
	6	0.219	0.656		6	0.375	0.500
	7	0.375	0.042		7	0.312	0.146
kop8	1	0.093	0.000	po42	1	0.110	0.000
	2	0.016	0.302		2	0.359	0.281
	3	0.000	0.021		3	0.046	0.344
	4	0.891	0.677		4	0.453	0.052
5	0.016	0.021	5		0.031	0.323	
kop12	2	0.047	0.302	po48	1	0.062	0.010
	3	0.937	0.677		2	0.000	0.261
	4	0.016	0.021		3	0.172	0.000
kop15	1	0.078	0.000	po56	4	0.766	0.729
	2	0.141	0.010		1	0.141	0.052
	3	0.187	0.625		2	0.078	0.094
	4	0.141	0.052		3	0.500	0.573
	5	0.359	0.292		4	0.031	0.042
	6	0.094	0.021		5	0.125	0.239
kop18	1	0.031	0.021	po89	6	0.125	0.000
	2	0.156	0.042		1	0.031	0.010
	3	0.203	0.239		2	0.250	0.073
	4	0.250	0.094		3	0.297	0.156
	5	0.266	0.583		4	0.375	0.125
	6	0.094	0.021		5	0.047	0.636
kop22	1	0.141	0.104	po91	1	0.031	0.490
	2	0.078	0.125		2	0.063	0.052
	3	0.234	0.104				

续表 2

位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid	位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid
kop23	4	0.234	0.052	jn900512	3	0.156	0.000
	5	0.063	0.563		4	0.031	0.010
	6	0.250	0.052		5	0.391	0.219
	1	0.187	0.000		6	0.266	0.125
	2	0.203	0.292		7	0.062	0.104
	3	0.109	0.094		1	0.125	0.031
	4	0.078	0.260		2	0.312	0.469
kop26	5	0.063	0.000	3	0.422	0.292	
	6	0.219	0.312	4	0.094	0.177	
	7	0.141	0.042	5	0.047	0.031	
	1	0.250	0.240	1	0.000	0.188	
	2	0.110	0.010	2	0.141	0.333	
	3	0.063	0.083	3	0.187	0.177	
	4	0.031	0.104	4	0.281	0.302	
po-str1	5	0.047	0.219	5	0.250	0.000	
	6	0.250	0.042	6	0.141	0.000	
	7	0.234	0.302	1	0.000	0.021	
	1	0.063	0.000	2	0.016	0.010	
	2	0.063	0.000	3	0.016	0.177	
	3	0.063	0.000	4	0.234	0.042	
	4	0.297	0.229	5	0.734	0.750	
po1	5	0.109	0.000	1	0.047	0.302	
	6	0.218	0.000	2	0.125	0.021	
	7	0.031	0.000	3	0.640	0.302	
	8	0.047	0.302	4	0.047	0.031	
	9	0.047	0.333	5	0.000	0.302	
	10	0.047	0.136	6	0.141	0.042	
	1	0.156	0.250	1	0.235	0.323	
po1	2	0.344	0.063	2	0.250	0.000	
	3	0.172	0.063	3	0.203	0.625	
	4	0.172	0.250	4	0.156	0.042	
	5	0.063	0.010	5	0.125	0.000	
	6	0.093	0.364	6	0.031	0.010	

多态性高、共显性等优点, 已经成为分子系统学、种群遗传学及生态学研究中最重要分子标记之一。遗传标记的应用价值可用多态信息含量  $PIC$  来衡量。一般情况下,  $PIC$  能反映出某一个遗传标记所包含的或所能提供的遗传信息的容量, 当  $PIC > 0.5$  时, 表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性; 当  $0.25 < PIC < 0.5$  时, 表明该遗传标记能够较为合理地提供遗传信息; 而当  $PIC < 0.25$  时, 表明该遗传标记可提供的遗传信息性较差(侯仕营等, 2011)。本研究对牙鲆二

倍体及三倍体群体微卫星分析的结果显示, 二、三倍体的多态信息含量  $PIC > 0.5$  的位点分别有 17 个和 16 个, 可提供较多的遗传信息。二倍体群体中有两个位点的  $PIC < 0.25$ , 但在三倍体群体中, 这两个位点的  $PIC > 0.25$ , 仍能够提供合适的遗传信息, 故本研究中并未将这两个位点舍弃。

遗传杂合度是反映群体遗传变异的重要参数, 可从一定程度上代表该群体的遗传多样性水平。本研究中牙鲆二倍体群体的平均期望杂合度为 0.681。王伟



表3 二倍体和三倍体牙鲆在21个微卫星位点的等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、多态座位观测杂合度( $H_o$ )、无偏倚预期值( $H_e$ )和Hardy-Weinberg遗传偏离指数( $d$ )

Tab.3 Number of allele ( $A$ ), number of effective allele ( $a_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Hardy-Weinberg genetic deviation index ( $d$ ) at the 21 microsatellite loci assessed in diploid and triploid *P. olivaceus* stocks

位点 Locus	二倍体 Diploid					三倍体 Triploid				
	$A$	$a_e$	$H_o$	$H_e$	$d$	$A$	$a_e$	$H_o$	$H_e$	$d$
kop7	6	4.1	0.719	0.781	-0.080	6	2.1	0.813	0.531	0.531
kop8	3	1.2	0.188	0.204	-0.082	3	1.8	0.875	0.456	0.919
kop12	3	1.1	0.125	0.123	0.020	3	1.8	0.906	0.464	0.951
kop15	6	4.6	0.719	0.806	-0.109	5	2.1	0.938	0.538	0.742
kop18	6	4.8	0.906	0.817	0.109	6	2.4	0.969	0.610	0.588
kop22	6	4.9	0.781	0.824	-0.052	6	2.8	0.594	0.659	-0.099
kop23	7	6.0	0.656	0.861	-0.238	5	3.8	1.000	0.763	0.311
kop26	7	5.0	0.719	0.825	-0.128	7	4.6	0.875	0.808	0.083
po-str1	10	5.5	0.656	0.846	-0.224	4	3.7	0.938	0.750	0.250
po1	6	4.7	0.875	0.811	0.079	6	3.8	0.906	0.762	0.190
po13	7	3.9	0.844	0.765	0.104	7	3.2	0.969	0.714	0.358
po42	5	2.9	0.500	0.671	-0.255	4	3.3	0.938	0.718	0.306
po48	3	1.6	0.500	0.393	0.273	3	1.7	0.813	0.413	0.966
po56	6	3.2	0.625	0.714	-0.125	5	2.5	0.906	0.621	0.460
po89	5	3.4	0.656	0.728	-0.099	5	2.2	0.563	0.569	0.021
po91	7	3.9	0.594	0.767	-0.225	6	3.2	0.594	0.705	-0.158
jn900512	5	3.3	0.531	0.720	-0.262	5	3.0	1.000	0.683	0.464
jn900519	5	4.6	0.656	0.809	-0.189	4	3.7	1.000	0.755	0.325
jn900522	6	5.0	0.719	0.826	-0.130	4	2.0	1.000	0.520	0.925
jn900527	5	2.4	0.406	0.596	-0.318	6	3.6	1.000	0.748	0.336
jn900530	4	1.7	0.500	0.419	0.195	5	1.7	0.625	0.417	0.499
平均 Average	5.6	3.7	0.613	0.681	-0.083	5.0	2.8	0.868	0.629	0.426

等(2004)用10个微卫星位点对1个牙鲆养殖群体进行检测,其平均期望杂合度为0.731,略高于本研究结果;其平均等位基因数、平均有效等位基因数及平均观测杂合度也均略高于本研究所分析的牙鲆二倍体。这可能是由于本研究的牙鲆二倍体群体属于养殖群体,经过多年的累代养殖,导致其遗传多样性水平略有下降。但总体来说,本研究中二倍体和三倍体牙鲆的遗传多样性水平尚可。

本研究中,由于二倍体细胞中含有两套染色体组,因此个体中含有两个等位基因,若为纯合子,则电泳图谱为1条带,若为杂合子,则电泳图谱为2条带;同理,三倍体细胞中含有三套染色体组,电泳图谱表现为1-3条带。对两个群体的遗传多样性指标进行比较,发现三倍体的遗传多样性水平略低,其平均等位基因数、平均有效等位基因数及平均期望杂合度均低于三倍体群体。由于三倍体是通过冷休克诱导的方式获得的,这一诱导过程可视为对群体进行的人工

选择,一些含有特定等位基因或基因型的个体对低温诱导较为敏感,不能存活,导致该等位基因的缺失。本研究中,三倍体群体相对其二倍体对照群体,在kop7、kop8、kop15、kop23、po-str1、po42、po48、po56、jn900519、jn900530等10个位点均出现等位基因缺失,甚至在po-str1位点等位基因缺失所占比例超过50%。由表2看出,三倍体群体中,个别等位基因在二倍体群体中没有出现,比例占3.23%,其原因可能是由于分析的样品量(30尾)较少,部分稀有等位基因未在二倍体群体中被检测到,还是由于无效等位基因的原因,尚需要进一步研究。

同时,二倍体群体的基因型数目也明显高于三倍体群体,如图1-a引物jn900519在二倍体中扩增出8种基因型、6个等位基因,而在三倍体仅扩增出3种基因型、4个等位基因。21对引物在二倍体群体中共扩增出190种基因型,而三倍体仅有142种。类似的结果也出现在三倍体多米尼亚花鲈(*P. formosa*)

表 4 二倍体和三倍体牙鲆 21 个微卫星位点上的多态信息含量(PIC)、个体识别率(DP)和非父排除率(PPE)

Tab.4 The value of polymorphism information content (PIC), power of discrimination (DP) and probability of paternity exclusion (PPE) at 21 microsatellite loci in diploid and triploid *P. olivaceus* stocks

位点 Locus	二倍体 Diploid			三倍体 Triploid		
	PIC	DP	PPE	PIC	DP	PPE
kop7	0.739	0.756	0.564	0.512	0.514	0.300
kop8	0.197	0.198	0.103	0.456	0.456	0.236
kop12	0.115	0.119	0.059	0.366	0.450	0.193
kop15	0.771	0.781	0.609	0.519	0.521	0.299
kop18	0.774	0.791	0.608	0.584	0.591	0.387
kop22	0.790	0.798	0.630	0.634	0.638	0.464
kop23	0.828	0.834	0.689	0.723	0.739	0.532
kop26	0.790	0.799	0.632	0.781	0.783	0.627
po-str1	0.815	0.819	0.707	0.693	0.727	0.495
po1	0.771	0.786	0.608	0.737	0.738	0.552
po13	0.712	0.741	0.538	0.680	0.691	0.474
po42	0.645	0.650	0.435	0.676	0.696	0.514
po48	0.346	0.380	0.194	0.328	0.400	0.169
po56	0.688	0.692	0.511	0.594	0.601	0.398
po89	0.669	0.706	0.467	0.537	0.551	0.352
po91	0.720	0.743	0.545	0.680	0.683	0.493
jn900512	0.657	0.698	0.465	0.619	0.662	0.418
jn900519	0.764	0.784	0.593	0.711	0.731	0.514
jn900522	0.785	0.800	0.624	0.420	0.503	0.236
jn900527	0.566	0.577	0.345	0.725	0.725	0.491
jn900530	0.346	0.405	0.187	0.402	0.404	0.234
平均 Average	0.642	0.660	0.482	0.589	0.609	0.399

(Lampert *et al.*, 2005)和三倍体牡蛎(*C. gigas*) (Garnier-Géré *et al.*, 2002)中,三倍体部分基因型缺失,表现出遗传多样性的下降。由表 3 可以看出,三倍体群体中的平均观测杂合度多高于二倍体群体。鱼类卵子排出体外时处于第二次减数分裂中期,与精子体外受精后的一段时间内排出第二极体,形成二倍体受精卵(Maxime, 2008; Piferrer *et al.*, 2009)。由于第一次减数分裂时同源染色体之间发生了交换,造成基因重组,卵刚排出体外时所含的两套遗传物质可能不完全相同,也即第二极体中的遗传物质与卵子的遗传物质并不完全一致,由于三倍体牙鲆是通过冷休克处理抑制第二极体的排放而获得的,这使得三倍体中除了来自父本的遗传物质之外,还包含两套来自母本的存在一定差异的遗传物质,导致其杂合度增高。除此之外,理论上在二倍体中出现的基因型都有可能出现在三倍体中,而三倍体由于多一套染色体可能出现更多的基因型。本研究的三倍体群体中,部分基因型在二倍

体群体中没有出现(表 2),这可能最终导致了三倍体群体较高的期望杂合度。

二倍体牙鲆 21 个位点有 15 个的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数  $d$  为负值,这可视为杂合子缺失,即实际纯合子过量。这主要因为本研究使用的是养殖牙鲆,较少数量的亲本之间近交所致(王伟等, 2004)。但有趣的是,三倍体牙鲆却仅有两个位点的  $d$  为负值,这可能是三倍体含有三套染色体,三条染色体上都是同一个等位基因的概率大大下降,纯合子出现的机会减少,并非其遗传多样性水平高。

此外,二倍体和三倍体群体间的遗传距离为 0.312,由于本研究使用的二倍体和三倍体牙鲆亲本相同,其遗传距离本应较小,而根据群体中各位点等位基因频率计算出的遗传距离相对较大,甚至高于野生和养殖牙鲆群体之间的遗传距离 0.156(王伟等, 2004),这是否与冷休克处理导致等位基因缺失有关,因在冷休克处理过程中,一些对低温不耐受的个体死亡,而对低温较为耐受的个体存活,导致相关等位基因及其频率发生变化,抑或是别的原因尚需进一步研究。

综上所述,本研究用微卫星标记对牙鲆二倍体和三倍体群体的遗传结构和纯合度进行分析,发现两个群体有一定的遗传分化。在三倍体牙鲆群体中,等位基因的缺失造成遗传多样性不升反降。这种遗传多样性的下降是否会对牙鲆三倍体后代的生长及抗逆性能造成影响尚需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 山东近海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 350-357
- 王磊, 陈松林, 谢明树, 等. 牙鲆三倍体批量化诱导及其生长和性腺发育观察. 水产学报, 2011, 35(8): 1258-1265
- 尤锋, 刘静. 三倍体牙鲆的核型证明. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 115-118
- 田吉腾, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传多样性微卫星分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 59-67
- 汪永庆, 王国新, 徐来祥, 等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进. 动物学杂志, 2001, 36(1): 27-29
- 侯仕营, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆 4 个引进地理群体遗传多样性的微卫星分析. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 16-23
- 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 1984, 8(4): 343-356
- 蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析. 水产学报, 2010, 34(11): 1629-1635
- 臧坤, 徐永江, 柳学周, 等. 两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 36-42
- Alves MJ, Gromicho M, Collares-Pereira MJ, *et al.* Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae). J Exp Zool, Part A: Ecol Genet Physiol, 2004, 301(7): 552-558

- Garnier-Géré PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, *et al.* Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol*, 2002, 11(8): 1499–1514
- Kazoo T, Shigeaki G, Yoshihiro K. Growth, survival and maturation in the induced triploid hirame *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 1989, 36(4): 267–276
- Kim WJ, Kim KK, Lee JH, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(4): 491–493
- Lampert KP, Lamatsch DK, Epplen JT. Evidence for a monophyletic origin of triploid clones of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Evolution*, 2005, 59(4): 881–889
- Liu Q, Goudie CA, Simco BA, *et al.* Isozyme expression and gene-centromere distances in diploid and triploid hybrid catfish. *Trans Am Fish Soc*, 1996, 125(1): 56–65
- Makino S, Ozima Y. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of the carp, *Cyprinus carpio*. *Cytologia*, 1943, 13: 55–60
- Maxime V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish*, 2008, 9(1): 67–78
- Nomura K, Morishima K, Tanaka H, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by half-tetrad analysis using induced triploid families. *Aquaculture*, 2006, 257(1): 53–67
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, *et al.* Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 2009, 293(3): 125–156
- Sekino M, Hara M. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes, Pleuronectoidei, Paralichthyidae). *Mol Ecol*, 2000, 9(12): 2201–2203
- Swarup H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus*(L). *J Genet*, 1958, 56: 129–141
- Xu T, Chen S. Induction of all-triploid Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by cold shock. *Isr J Aquacult-Bamid*, 2010, 62(1): 43–49
- Wang H, Li F, Xiang J, *et al.* Microsatellite-centromere distances and microsatellite diversity in different ploidy classes of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Genetica*, 2008, 132(1): 43–50

(编辑 冯小花)

## Genetic Diversity Analysis on Artificial Triploid Stock of *Paralichthys olivaceus* using Microsatellite DNA Marker

LIU Hui<sup>1</sup>, WU Zhihao<sup>2</sup>, LI Zhen<sup>1①</sup>, ZHU Xiangping<sup>1</sup>, YOU Feng<sup>2①</sup>, SONG Zongcheng<sup>3</sup>, LI Jun<sup>4</sup>, HU Jinwei<sup>2</sup>

(1. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Weihai Shenghang Aquatic Science and Technology Co., Ltd., Weihai 264200; 4. R & D Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study, we compared the extent of genetic diversity of the triploid and diploid flounders using the microsatellite method. The triploid were induced using cold shock method in 2012, and then they were cultured under the same conditions as their diploid control. Genomic DNAs were isolated using the high salt-extraction method from the muscle tissues of 32 triploid and 32 diploid flounders of 11-month old. The genetic variations of the triploid and diploid flounders were assessed based on the selected 21 microsatellite loci. The PCR products were isolated using 14% PAGE electrophoresis, and the microsatellite alleles were artificially identified and analyzed. The results showed that in the triploid and diploid stocks, the average numbers of alleles per locus ( $A$ ) were 5.6 and 5.0; the total numbers of genotype were 190 and 142; the average numbers of effective alleles per locus ( $a_e$ ) were 3.7 and 2.8; the values of average observed heterozygosity ( $H_o$ ) were 0.613 and 0.868; and the unbiased expected heterozygosity ( $H_E$ ) were 0.681 and 0.629, respectively. The values of the polymorphism information content ( $PIC$ ), the power discrimination ( $DP$ ) and the probability of paternity exclusion ( $PPE$ ) in the triploid and diploid stocks were 0.642 and 0.589, 0.660 and 0.609, 0.482 and 0.399, respectively. The accumulation of  $PIC$  and  $PPE$  both achieved 0.999, which indicated that these microsatellite loci were very sensitive and could be used in the parentage and kinship determination in future genetic breeding studies. The genetic distance ( $D$ ), the genetic similarity ( $I$ ) and the coefficient of gene differentiation ( $G_{ST}$ ) between the triploid and the diploid stocks were 0.312, 0.732 and 0.971 respectively. The genetic diversity of the triploid stock was moderately reduced compared to the diploid stock. There were also some differences in the genotypes between the triploid and diploid flounders.

**Key words** *Paralichthys olivaceus*; Triploid; Artificial induction; Microsatellite DNA marker; Genetic variation

① Corresponding author: LI Zhen, E-mail: zacheryli2012@126.com; YOU Feng, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

# 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Activin 基因两种 $\beta$ 亚基的启动子克隆及生物信息学分析\*



刘蒙蒙 王 晶 高金宁 马丽曼 张全启<sup>①</sup>

(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 青岛 266003)

**摘要** 以牙鲆为研究对象,利用染色体步移(Genome walking)获得了 Activin 两个  $\beta$  亚基基因的上游部分启动子序列,并对其进行了转录调控元件的生物信息学预测分析。获得了 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  两个亚基的启动子部分序列,长度分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb;在预测的 Activin  $\beta_B$  转录起始位点(+1 位)的上游 31 bp 处有 1 个典型的 TATA box,而在 Activin  $\beta_A$  中未发现 TATA box 的存在。两个基因的启动子上发现了多个转录因子 Sp1、Oct-1、C/EBP、CREB、GATA-1、HNF-3、HNF-1、USF 等结合位点,还发现了与内分泌相关的 Pit-1、ER、PR、GR、RAR、RXR 等结合位点,但肌性转录因子 MyoD、myogenin 和雄性的性别决定基因 SRY 结合位点仅在 Activin  $\beta_A$  启动子中发现。生物信息学分析显示,牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  表达受到多种潜在因子的调控,二者在调控上有所差异。

**关键词** 牙鲆; 激活素; 启动子; 生物信息学分析

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0041-07

Activin 首次从猪卵泡液中分离出来,是一种糖蛋白激素,属于 TGF- $\beta$  超家族中的一员,由于它可以特异性刺激垂体分泌及合成卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH),因而被命名为激活素。随后人们发现 Activin 是由两种不同的  $\beta$  亚基( $\beta_A$  和  $\beta_B$ ),通过二硫键连接组成的同二聚体或异二聚体糖蛋白,分别为 Activin A( $\beta_A$ - $\beta_A$ )、Activin B( $\beta_B$ - $\beta_B$ )和 Activin AB( $\beta_A$ - $\beta_B$ ) (Knight, 1996)。Activin 在动物体内分布极为广泛,但以性腺和脑组织最为丰富,可以通过 Activin/Inhibin 系统参与下丘脑-垂体-性腺轴调控来调节生殖细胞的发育和成熟(兰干球等, 2007)。Activin 不仅能够有效地促进促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的分泌活动(Calogero *et al*, 1998),还能够拮抗 Inhibin 的作用,在垂体局部调节并促进 FSH 的分泌(Knight *et al*, 2001)。此外, Activin 还能调节精原细胞和颗粒细胞的增殖、类固醇激素的生成以及滤泡细胞的发育和成熟,对卵

巢和睾丸有着多重调节作用(Mather *et al*, 1997)。除了在生殖方面起重要作用外, Activin 还在组织细胞分化、骨形成、胚胎发育、红细胞生成、免疫调节、组织损伤修复及炎症反应中均发挥重要作用。由于 Activin 重要的生物学作用,近年来成为研究的热点。

牙鲆属(*Paralichthys*)鱼类俗称比目鱼、牙片、偏口,在南、北美洲东西岸较多,已知的有近 20 种,在我国只有一种褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)。其肉质鲜美、营养价值较高,深受消费者青睐,并且生长快、繁殖能力强,具有很好的经济价值,是我国重要的海水养殖鱼类(臧坤等, 2013; 刘芝亮等, 2013)。本研究克隆了牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  基因的部分启动子序列,并利用生物信息学方法对其潜在的转录因子结合位点进行分析,为进一步了解 Activin 基因在生长和繁殖中的功能及其潜在的基因表达调控机制提供基础资料。

\* 国家 863 计划课题(2012AA10A402; 2012AA10A408)资助。刘蒙蒙, E-mail: liumeng19880101@163.com

① 通讯作者: 张全启, 教授, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-04-10, 收修改稿日期: 2014-06-24

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验用成体牙鲆于2013年4月由山东烟台海阳黄海水产有限公司提供。Genome Walking Kit 购自大连 TaKaRa 公司, 克隆载体 pMD18-T 和感受态细胞 Trans 5 $\alpha$  购自北京全式金生物技术有限公司, DNA 胶回收试剂盒购自 ZYMO(美国)。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, DNA 测序由华大基因科技股份有限公司完成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采用常规的酚-氯仿提取法。取牙鲆肌肉组织约 50 mg, 放入 1.5 ml 离心管, 用手术剪将组织块尽量剪碎, 加入 550  $\mu$ l TNES 裂解缓冲液和 10  $\mu$ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)。混匀后置于 56 $^{\circ}$ C 水浴中直至组织消化完全。裂解物用等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)和氯仿/异戊醇(24: 1)各抽提两次, 12000 r/min 离心 15 min。取上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 700  $\mu$ l 异丙醇, 置于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2-3 h, 4 $^{\circ}$ C、12800 r/min 离心 20 min。沉淀物用无水乙醇洗涤两次, 室温自然干燥。待乙醇挥发完全后, 用适量的 TE 溶液溶解。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 染色体步移** 根据本实验室前期已克隆得到的牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  的 DNA 序列和染色体步移试剂盒的特异性引物设计原则, 使用 Primer 5.0 软件从距离转录起始点较远的一端按 3' $\rightarrow$ 5'端方向分别依次设计 3 条反向特异性引物 SP1、SP2、SP3(表 1)。正向接头引物 AP1-AP4 由试剂盒提供。PCR 反应条件均按照该试剂盒中说明书上的步骤设置。

表 1 牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子克隆所需引物

Tab.1 Primers for cloning of the promoters of *P. olivaceus* Activin  $\beta_A$  and  $\beta_B$

名称 Name	序列 Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
SP1(ACT $\beta_A$ )	CCTCTTCACCGCTTCCACCACATCT
SP2(ACT $\beta_A$ )	TGAGGATGGACGGTCAGAGAAAGCG
SP3(ACT $\beta_A$ )	TAAGACGGACATGACGGCGGCAGAT
SP1(ACT $\beta_B$ )	TTGGGGATCTCCACCCTCCCGT
SP2(ACT $\beta_B$ )	ACGGGACCGGGTGCGTGATGTT
SP3(ACT $\beta_B$ )	AGAGGACGCAAGCCACGAGGAGT

表 2 牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  预测的转录起始位点

Tab.2 The predicted transcription start site of *P. olivaceus* Activin  $\beta_A$  and  $\beta_B$

名称 Name	位置 Location	分值 Score	序列 Sequence
Activin $\beta_A$	1137-1187	0.94	TCAACAGGTTTAAATAATGAGCCGTTGTTATTTCATCTCTCCGTGAGGAAGAGCCCTG
Activin $\beta_B$	1888-1938	0.99	AATATAAAGCGGAGGAGAGAGAGAGGAGGCTGCAGAGTCTCG

扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后进行切胶回收、载体连接、转化、PCR 筛选, 选取阳性克隆进行测序。

**1.2.3 启动子序列的生物信息学分析** 利用 NCBI 在线 blastn 软件对所得序列和本实验室前期克隆得到的 Activin  $\beta_A$  与  $\beta_B$  的 cDNA 序列重叠区域进行比对。然后, 将所获得启动子序列利用 NNPP([http://fruitfly.org:9005/seq\\_tools/promoter.html](http://fruitfly.org:9005/seq_tools/promoter.html))进行预测, 最终确定转录起始位点 TSS(表 2)。利用在线软件 Alibaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), TFSEARCH (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)以及 Matinspector (<http://www.genomatix.de/cgi-bin//matinspector>)进行启动子区域序列的元件预测分析, 获得潜在的转录因子结合位点。所用参数均为在线设置的默认参数。

## 2 结果

### 2.1 牙鲆 Activin $\beta_A$ 和 $\beta_B$ 启动子序列的克隆

通过染色体步移方法, 得到 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  的部分启动子序列, 分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb (GenBank ID 分别为 KJ000423 和 KJ000424)。

### 2.2 牙鲆 Activin $\beta_A$ 和 $\beta_B$ 启动子区域序列的生物信息学分析

将测序结果分别与两个基因的 cDNA 序列和染色体步移得到的序列进行比对, 并以 NNPP 软件辅助分析, 最终确定了转录起始位点。结果显示, 在预测的 Activin  $\beta_B$  转录起始位点(+1 位)的上游 31 bp 处有一个典型的 TATA box, 而在 Activin  $\beta_A$  中却未发现 TATA box 的存在。

通过 Alibaba 2.1、TFSEARCH 和 Matinspector 等在线软件分析, 预测结果如图 1、图 2 所示。在得到的启动子序列中存在多个与基因的激活和增强相关的转录因子结合位点: 特异性蛋白 Sp1、CCAAT/增强子结合蛋白 C/EBP、cAMP 反应元件结合蛋白 CREB、细胞内转录激活因子 AP-1、上游刺激因子 USF; 发现了许多与胚胎和组织的发育、器官的发生相关的转录因子结合位点: 肝细胞核因子 HNF-1、HNF-3、肌性转录因子 MyoD、myogenin、八聚体结

1 ACACACACACTCTCGTCCCAACGCTTCTTCACTTCTCTCAGAAATAAACATCAAACCTGTGATTTTCAAAGATTTTC  
 81 AAAGACACATGAAAAATATTCTGCTGCATCACCTTCTAGAAATTTGACCCAAATTCAGACATCGTATGGAACCTTTGTGAAA  
   USF  
 161 ACTTTAGGCTCTGAGGTTGTAACAACAACAGGACGACGACTTCAGAGTTGAAGAGCGGGCTTTCTCCGTCAATTTCT  
 241 CCTGGCAGATGTGAAGCTTACTTTAAAAACCAGGCGTTCTGCTGACGACAGGTTCCATGACTCACAGGTTGTGAGTTATTT  
   HNF-1  
 321 AAAAGAAACCACCAGTGAAGACACGTTTCAGATCACAATACACAACCCAACGCCTTTATAAGGCAACTGAGCGAGCGTGAG  
   ER  
 401 CTCACAGACATGAGCTGGAGGTTCTTCTCCTCAAAGAAAACTGACGAGTCAACACACACATTTCCCCCGCAGTATG  
   RXR Sp1  
 481 ATGTCATCACAGCAGAGGGTGAATCCAGACGTCGTGATTCCTCTGTAACCTGCGTCTTCTCTGTTTCTCCTCACACTCAG  
   Ap-1  
 561 CTGTGACTCCGTTCTCTGGGTTCTCCGTTGTCAGACCACATGTGGGAGAGAGACAGGAACTTACACTATCTCTAAGAACA  
   USF GATA-1 GATA-1  
 641 TTGAAAACCTGACAGAAGTTCCAGAACCAGGACCTAACCTAACCTCCATTCTTTCAGCTTCACCTAAAGAACCCCTTT  
   C/EBP GR  
 721 AGAAACTGATCCGACATTTCTTCAAACACTTAGTAAATAATGCATGTTTAGAAGCTACTAGAACCACTACAACCTGCAGAAC  
   PR GR Pit-1  
 801 ATCTGTGGAAGCAGCAAACCTTCTTTAGAACCTGTAAACTGTGAGAACCTCTGAACCTTTAACTACTTTTAGAACATTTTC  
   GR  
 881 GAATCCTGAGGACCTTAACTGCTGGTGTTCTCTTCTCAGCTGAAACCCTTTTGTTTTCATCTATAAAGTCTCATTGACA  
   Myogenin HNF-3  
 961 TTTGAAGCTTAATCATGTGAGATGTTCCATCCTGCAGGATCCTCAGAAGTTCCAGAACCCAGTGAACTCTTCCAGAACCCTCA  
   RAR  
 1041 TGATGAGTCTCGGTGTTTTAAGAGTAAAAAGATTCAGTTCACGCTCAGAATCATTTTTAGAACAACCTTTTAAATCAGG  
   Ap-1 TSS  
 1121 TTGAATTCAGAAGATATCAACAGGTTTTAAATAATGAGCCGTTGTTATTTTCATCTCTCCGTGAGGAAGACGATGAAGACAG  
 1201 ACATTACTCTGACTCAGCAGTCAACTTACACAAACACAATGACCAACAGCGTCCAGCGCTCCAGCAGGAATGACGGGGCTG  
   ER HNF-3 MyoD C/EBP  
 1281 ATGGGAAATGAAGTGAGACAAACGCTTGGAGAGATGGTGAGGCGTTCATGATGAAGACGAGGATGATAAGGATGAAGA  
   GATA-1 Sp1 Oct-1  
 1361 AGAAGATGATCTCCTAATAAGGTCATGCTTGCTTGTGGTTTTTACTTTGATGTCGACTGAGATGAATGGATGAATAAAGG  
   Ap-1 GATA-1  
 1441 ACAGATGGACCGATGGAGGTGTGTAGGCTAAGTTATGATGTTTTACTAGTTCTCAAATAAATGTTAAACATCGCAGCT  
   Sp1 Sp1 HNF-1  
 1521 GATGAACTGATGAATCTTTACGAACAAGTTCACCTCATCACACCGACCACGACAGAACTACTCGAACTTTAGCTTCACA  
   Ap-1  
 1601 ACAGCTTCTGTAGACGTGACCATGACAACGAAAACTGGGGGGGGTGATAGAGTGATAGAAAGACTGATAGAGTGAT  
   PR CREB Sp1 GATA-1  
 1681 AGAAAGACTGATAGAGTGATAGAGTGATAGACAGGAGAGTACAGGCAAAGAATAAGTCCATCCTAAGATTTTCCCTCAAC  
   GATA-1 GATA-1 C/EBP  
 1761 ACGTAACCTATTACAGACGGAACGAGGAGCGGAGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGATGAAGGAATCCAGCTTT  
   SP1  
 1841 GCTCCATTAACAGTGAACCAGGAGGGAAGTCTCAGGAGGGGAGGAAATGAATAAAGAGAGAGAGCGGAGGAGGAGGGT  
   Pit-1 Sp1 Sp1  
 1921 GAAGGTAAAAGTTGGAAGTGTATGAGTCCAGAGCGGAGATGGGAGGAGACTGGAGTGAAGAGGGAGAGAGAGAGAGAT  
   ER Sp1 GATA-1 Sp1  
 2001 GGAGTGAGGTATAATATGTTAGGAGGCTGCCAGGGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGAGGAGAAAGAAAGA  
   Sp1 Sp1  
 2081 CGAGAGCGAGGAGAGAGAGAGTCCAGCCCCTCCGGTAAACCATTCAACTGGTGAAGGAAATGCATTCGCCACAGA  
   Sp1  
 2161 GAGAGAGAGAGGAAAAGAGGTAAAAGAGAGAGAGAAAGGAACCTCCCTTCGTCTGGGAAAACTAGTGAACACACACTCTG  
   GR GR  
 2241 AACACACCTGCGAGGACTTCATCAAGGATCCTTCTGCTCTCCACCGTCTCTCCTTCTATGCTTTTTCATCATCCATTCA  
   Sp1  
 2321 TCACATCTGAGTTTTGTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCTCGTTTTGTTTTTTCTTTCTTTCTTTCTTGTGACGCCTCCA  
   PR HNF-3 ER Sp1  
 2401 CATTTTCCAGCCACTCTGTCCCTAAAGATAAGGATTACTCATTCTCTCTGCGCGTGTGTTTTCTTTGTTGCTCCT  
   GR Ap-1  
 2481 CTCTCTCGTTTCTTACAGATTTTTTCCCTCCGTTTTTTCGAGGTTGGACTCTGAGCTGAGCTGAACTTTGCAGCTTCCAA  
   ER RAR  
 2561 ACTTTTGCAGAGCGAGTGAGCGAGGGAAGGAAGACAAGACAGACGGAGAGAGAGAGAGATCTTTCTTATTCTGTA  
   SRY  
 2641 ACCAGTTTTTTCTTTTGGTCAAAAACCTTTCTTCTCTGCTGCTCTGCTCAGCACCAGCTCCAGC  
   USF

图 1 牙鲆 *Activin*  $\beta_A$  启动子序列及对部分潜在转录因子结合位点预测结果

Fig.1 Nucleotide sequence of *P. olivaceus* *Activin*  $\beta_A$  promoter and prediction of potential transcription factor binding site region

潜在的转录起始位点用 TSS 表示；部分启动子序列用黑体表示；与基因的激活和增强相关的转录因子结合位点用单下划线表示；与胚胎和组织的发育、器官的发生相关的转录因子结合位点用方框表示；与内分泌和性腺的功能相关的转录因子结合位点用双下划线表示

Potential transcription initiation site is marked by TSS; partial promoter sequences are highlighted in bold; potential transcription factor binding sites related to the activation and enhancement of genes are single-underlined; potential transcription factor binding sites related to development of tissue, embryo and organogenesis are shown in the boxes; potential transcription factor binding sites regarding endocrine and gonadal function are double-underlined



合蛋白 Oct-1 和珠蛋白转录因子 GATA-1; 同时还预测到了大量与内分泌和性腺功能相关的转录因子结合位点: 垂体特异性转录因子 Pit-1、雄性的性别决定基因 SRY、视黄醇受体 RXR、视黄酸受体 RAR、雌激素受体 ER、黄体酮激素受体 PR、糖皮质激素受体 GR 等。在 Activin  $\beta_B$  中未发现 MyoD、myogenin 和 SRY 三个结合位点。

### 3 讨论

启动子作为基因表达调控的关键序列区域, 是转基因工程研究的热点。因此, 研究启动子功能序列, 对于基因表达调控机制的研究是十分必要的(陈维宇等, 2008; 刘秀霞等, 2009)。迄今为止, 有关 Activin 的研究多集中在其结构特征、生理功能、对生殖的作用及其与受体的作用方式等(West *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 2012), 而有关 Activin 表达调控机制的研究较为薄弱。本研究利用染色体步移方法在牙鲆中克隆得到 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  上游的序列, 长度分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb, 并对其进行了一系列的生物信息学分析。发现两个基因启动子区域潜在的转录因子结合位点主要是与基因的激活和增强、胚胎和组织的发育、器官的发生以及内分泌和性腺功能相关, 结合位点大多数都相同, 但同时也存在差异。

早期的研究认为, TATA box 是所有真核生物结构基因所必需的。随着基因组大规模测序计划的完成, 越来越多的真核生物基因序列被测定, 发现许多基因的 5'侧翼区没有 TATA box (张小辉等, 2008)。对果蝇 205 个核心启动子分析显示, 只有 43% 的结构基因的启动子中存在 TATA box (Kutach *et al.*, 2000)。对人 1031 个潜在的核心启动子分析显示, 只有 32% 的结构基因存在 TATA box (Suzuki *et al.*, 2001)。本研究发现只有牙鲆 Activin  $\beta_B$  上游序列存在 1 个 TATA box, 而牙鲆 Activin  $\beta_A$  上游序列则不存在 TATA box, 这种现象可能是正常的, 可以由转录因子来弥补。对得到的结合位点进行筛选, 保留了 Sp1、C/EBP、CREB、MyoD、myogenin、Pit-1、RXR、ER、PR 等作为重点进行讨论。

Sp1(Specificity Protein 1)属于 Sp/KLF 转录因子家族, 含有 1 个锌指蛋白结构域, 能与 DNA 直接结合, 对氧化磷酸化、核酸代谢相关基因等许多持家基因均有重要的调控作用(Zaid *et al.*, 1999), 尤其是对启动子中缺乏 TATA box 的基因的表达具有决定性的作用。Activin  $\beta_A$  上游序列没有 TATA box, 但是却存在许多 Sp1 结合位点, 也正好印证了这一点。

在 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子序列中都存在 C/EBP 的结合位点, C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)是一种具有“亮氨酸拉链”结构的 DNA 结合蛋白, 能够与一些增强子元件结合。作为真核细胞转录调控因子, 通常以二聚体的形式结合在 DNA 上调控细胞增殖、分化和细胞特异性基因的表达。另有研究显示, Activin (Meunier *et al.*, 1988; Tuuri *et al.*, 1994)和 Activin 受体(Mathews, 1994)在全身的很多组织中都有表达, 尤其 Activin  $\beta_A$  在脂肪组织中有很高的表达量(Vejda *et al.*, 2002)。前脂肪细胞的分化主要受控于 C/EBP 和 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptors) (Gregoire *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 2000), 所以这也暗示了 Activin 基因还可能参与脂肪细胞的分化过程。

研究表明, 垂体中 Activin 不仅可以对促性腺激素起作用, 还能抑制生长激素 GH、促肾上腺皮质激素 ACTH 和 GH 释放激素 GHRH 对胞内 cAMP 表达水平的提高(Ying, 1988; Mather *et al.*, 1997)。在 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子序列中都存在 cAMP 反应元件结合蛋白 CREB, 这表明它们的基因表达受第二信使 cAMP 的调控。但基因表达的具体调节机制有待进一步深入研究。

研究表明, MyoD 控制肌细胞的生长与分化。Activin A 能通过抑制 MyoD 的表达而抑制鸡胚胎肌肉前体细胞的分化。所以, 在 Activin A 的处理下只有少量前体肌细胞发生分化, 并且这些分化的肌细胞不能融合形成肌管, 但是前体肌细胞随着 Activin A 效果的减弱又可以开始继续分化(He *et al.*, 2005), 由此推测除了 myostatin, Activin  $\beta_A$  更有可能是肌肉生长抑制的候选基因。Activin  $\beta_A$  启动子序列中存在肌性转录因子 MyoD 和 myogenin 的结合位点, 这也就更加肯定了其在肌肉发育中的功能。牙鲆 myostatin、follistatin、MyoD、myogenin 等肌肉发育相关基因已经被克隆(Zhang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008), 研究 Activin 与这些基因间的相关作用将会进一步促进认识其在肌肉生长和发育中的功能。

在 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子序列中还存在着 Pit-1 和 RXR 的转录因子结合位点, 它们同属于 POU domain factor。Pit-1 在垂体特异表达并且指导 GH、PRL、TSH 等多种垂体特异性基因的表达。在牙鲆垂体中检测到大量 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  mRNA 表达, 推测 Pit-1 可能是 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  在垂体中的表达增强子。RXR 是一类激素核受体家族的成员, 可以通过形成同源二聚体或者异源二聚体而发挥不同的作用。但 RXR 是如何调控 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  转录的还不清楚, 相关研究很少或未见报道。



Activin 能够有效地促进 GnRH 的分泌活动 (Calogero *et al*, 1998), 在垂体局部调节并促进 FSH 的分泌 (Knight *et al*, 2001), 在未分化的大鼠颗粒细胞中还可促进其表达芳香化酶、FSH 和 LH 受体, 刺激雌激素和孕酮的分泌 (Xiao *et al*, 1991)。不仅如此, 激活素还能调节精原细胞的增殖、颗粒细胞的增殖, 对睾丸和卵巢有着多重调节作用 (Mather *et al*, 1997)。本研究发现, Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子序列中存在多个雌激素受体 ER 和孕激素受体 PR 的结合位点, 同时还发现了雄性的性别决定基因 SRY 的结合位点。ER 和 PR 可以与 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  DNA 调控区域结合, 表明 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  的合成与分泌亦受到性类固醇激素的调控 (Kipp *et al*, 2007)。SRY 结合位点的存在进一步表明 Activin 参与了性腺的分化和发育。这些结果与以往的研究结论相一致。

然而, 肌性转录因子 MyoD、myogenin 和性别决定蛋白 SRY 结合位点并不是在两个基因启动子内都存在, 这可能是由于不同类型的 Activin  $\beta$  亚基受不同的机制调控从而发挥着不同功能的结果。

另外, 在 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  启动子上发现的转录因子结合位点中, 存在较多的 AP-1、USF、Oct-1 和 GATA-1 结合位点, 它们的功能非常广泛, 在很多组织和器官中起作用。已有的研究发现, Activin 还有其他更广泛的生物学功能: 参与机体急性期反应调节、参与组织损伤和炎症修复、调节神经细胞分化、诱导胚胎中胚层形成、免疫调节功能、调节成骨细胞功能、调节红细胞生成等。Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  能够在牙鲆的鳃、肾、肠、脾、心脏等成体组织中表达, 可能就是这些转录因子的作用, 这些结合位点的存在, 佐证了该基因功能的分子基础。

综上所述, 本研究克隆并分析了牙鲆 Activin  $\beta_A$  和  $\beta_B$  上游启动子的序列, 利用生物信息学网站预测了可能存在的转录因子结合位点并对其进行初步的分析, 为进一步系统研究 Activin 的功能及其他相关转录因子的调控网络奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 兰干球, 黄雄军, 郭亚芬, 等. 广西巴马小型猪活化素  $\beta_A/\beta_B$  基因 cDNA 克隆与序列分析. 实验动物科学, 2007, 24(6): 1-5
- 刘秀霞, 梁旭方, 王琳, 等. 鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)  $\beta$ -肌动蛋白基因 cDNA 全序列与 5'侧翼区的克隆与分析. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 102-108
- 刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. T 型标志牌标记牙鲆苗种. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 80-86
- 张小辉, 祁艳霞. 真核生物启动子 TATA-box · GC-box 和 CAAT-box 的分析. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1380-1381, 1395
- 陈维宇, 李卫东, 柯才焕. 杂色鲍肌动蛋白的克隆与序列分析. 厦门大学学报, 2008, 47(5): 624-629
- 臧坤, 徐永江, 柳学周, 等. 两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 36-42
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, *et al*. Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. J Endocrinol, 1998, 156(2): 269-274
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev, 1998, 78(3): 783-809
- He L, Vichev K, Macharia R, *et al*. Activin A inhibits formation of skeletal muscle during chick development. Anatomy Embryol, 2005, 209(5): 401-407
- Kipp JL, Kilen SM, Woodruff TK, *et al*. Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36755-36765
- Knight PG. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. Front Neuroendocrinol, 1996, 17(4): 476-509
- Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. Reproduction (Cambridge, England), 2001, 121(4): 503-512
- Kutach AK, Kadonaga JT. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. Mol Cell Biol, 2000, 20(13): 4754-4764
- Mather JP, Moor A, Li RH, *et al*. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 215: 209-222
- Mathews LS. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. Endocr Rev, 1994, 15: 310-325
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, *et al*. Gonadal and extragonadal expression of inhibin  $\alpha$ ,  $\beta_A$ , and  $\beta_B$  subunits in various tissues predicts diverse functions. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 247-251
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, *et al*. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes & Dev, 2000, 14(11): 1293-1307
- Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, *et al*. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. Genome Res, 2001, 11(5): 677-684
- Tuuri T, Eramaa M, Hilden K, *et al*. The tissue distribution of activin  $\beta_A$ - and  $\beta_B$ -subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78: 1521-1524
- Vejda S, Cranfield M, Peter B *et al*. Expression and dimerization of the rat activin subunits  $\beta_C$  and  $\beta_E$ : evidence for the formation of novel activin dimers. J Mol Endocrinol, 2002, 28: 137-148
- Walton KL, Makanji Y, Harrison CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. Mol Cell Endocrinol, 2012, 359: 2-12
- Xiao S, Findlay JK. Interactions between activin and follicle-

- stimulating hormone-suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1991, 79(1-3): 99-107
- Xu P, Tan X, Zhang Y, *et al.* Cloning and expression analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem & Mol Biol*, 2007, 147(1): 135-145
- Ying SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 1988, 9(2): 267-293
- Zaid A, Li R, Luciakova K, *et al.* On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenergetics Biomembranes*, 1999, 31(2): 129-135
- Zhang Y, Tan X, Zhang PJ, *et al.* Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. *Mar Biotechnol (New York)*, 2006, 8(2): 139-148
- Zhong Q, Zhang Q, Chen Y, *et al.* The isolation and characterization of myostatin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Ubiquitous tissue expression and developmental specific regulation. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 247-255

(编辑 冯小花)

## Bioinformatic Characterization of Promoters of Two Activin- $\beta$ Subunit Genes in *Paralichthys olivaceus*

LIU Mengmeng, WANG Jing, GAO Jinning, MA Liman, ZHANG Quanqi<sup>①</sup>

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Activin is a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family and regulates sex hormones. It was originally discovered in pig ovarian follicular fluid. Activin contains two  $\beta$  subunits and plays a vital role in the hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG). It regulates the secretion of pituitary gonadotropin, the production of steroid hormones and the maturation of oocyte in ovary. *Paralichthys olivaceus* is a type of important commercial fish species that has advantageous traits in aquaculture such as the fast growth rate. Better understanding of its reproduction mechanism is essential for the guidance of the breeding of *P. olivaceus*. In this study, we analyzed the expression and regulation of Activin gene related to the reproductive endocrinology of *P. olivaceus*. Our data should provide important information for future studies on biological functions of Activin and for the practice in the culture of *P. olivaceus*. We used the genome walking method to obtain the partial sequence of promoters located in the upstream of Activin  $\beta_A$  and  $\beta_B$  genes of *P. olivaceus*, and predicted the binding sites of transcriptional regulation elements using the bioinformatical method. The promoters of these two genes were 2.7 kb and 2.4 kb in length respectively. The results showed that the TATA box of Activin  $\beta_B$  was located at 31 bp in the upstream region of the transcription initiation site, however this structure was not found in Activin  $\beta_A$ . We found in the two promoters a number of binding sites of the transcription factors including Sp1, Oct-1, C/EBP, CREB, GATA-1, c-Jun, HNF-3, HNF-1, and USF. Moreover, we also found multiple transcription binding sites of endocrine-related factors such as Pit-1, ER, PR, GR, RAR, and RXR. However, the binding sites of MyoD, myogenin and SRY were only found in Activin  $\beta_A$ . In conclusion, the bioinformatical analysis suggested that the basic and hormone-inducing expression of both Activin  $\beta_A$  and  $\beta_B$  was regulated by a variety of factors; however, the mechanisms of the regulation were different between the two genes.

**Key words** *Paralichthys olivaceus*; Activin; Gene promoter; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: ZHANG Quanqi, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

## 4种饲料投喂对鲮(*Mugil cephalus*)生长及鱼体组成的影响\*



郭永坚 罗昭林 阴晓丽 李俊伟 朱长波<sup>①</sup> 颀晓勇

(中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室  
广东省渔业生态环境重点实验室 广州 510300)

**摘要** 以初始体重(25.0±1.59) g的鲮为研究对象,通过8周的生长实验,研究不同饲料投喂对鲮的生长及鱼体生化组成的影响。处理组分别为面粉组(T1)、米糠组(T2)、虾料组(T3)和鱼料组(T4)。研究结果显示,在室内水族缸内单一地使用面粉或米糠投喂,鲮几乎不生长,但仍能维持较高的成活率(>80%)。虾料组的特定生长率(1.46%/d)和饲料效率(48.62%)均为各组最高,约为鱼料组的两倍,且两组的特定生长率和饲料效率均显著高于面粉组和米糠组( $P<0.05$ )。面粉组和米糠组的周均日摄食量在第4周后迅速降低(<0.80 g/d),而整个养殖期间虾料组和鱼料组普遍高于0.80 g/d,且在第8周明显升高。养殖结束时全鱼的粗蛋白以米糠组最高(18.62%±1.36%),粗脂肪以虾料组最高(10.52%±0.36%)。面粉组有较明显的粗脂肪积累(8.01%±0.42%)。研究结果表明,碳水化合物(面粉)水平的提高会促进鲮全鱼脂肪的积累,用米糠代替配合饲料投喂时可维持鲮的粗蛋白含量水平。

**关键词** 鲮; 饲料; 蛋白; 脂肪; 摄食

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0048-06

鲮(*Mugil cephalus*)为鲮科鱼类最主要的经济代表种,具有生长迅速、肉质鲜美、食性广杂、适应性强的特点,兼具较好的生态与经济价值,是中国沿海咸淡水池塘中鱼、虾混养的主要品种(邱丽华等, 2000; 陈雄杰, 2012)。目前在鲮的组织形态学(李静晶等, 2011; 李加儿等, 2014; 区又君等, 2014)、新陈代谢(于娜等, 2011; 吴庆元等, 2014)等方面开展的研究较多,但对鲮营养方面的研究工作仍不够系统和深入(彭士明等, 2008)。随着近年来凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖业的病害频发(Dastridar *et al.*, 2013; 徐孝栋等, 2014; 葛红星等, 2014),鲮-虾混养模式病害少、水质优、效益高的特点受到业内重视(朱长波等, 2014; 郭永坚等, 2015),在此背景下,对鲮的营养因子开展进一步研究,探索不同饲料投喂下

的生长状况,有助于鲮-虾混养模式的改进和推广,为对虾产业健康发展提供一定的参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验饲料

实验用的面粉、米糠采购自广西北海鑫宏东海蔬菜批发市场。虾料为“海轩”牌中虾3号料(广东粤海饲料有限公司)。鱼料为“健马”牌金鲳鱼膨化配合饲料(福建天马科技集团股份有限公司)。饲料主要组分见表1。

#### 1.2 养殖系统及养殖条件

实验在16个装有进出水开关的长方形玻璃缸(80 L)内进行,上覆纱网防止鲮跳出。采用小型气泵

\* 国家科技支撑计划(2011BAD13B03)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)(2013TS02; 2014ZD01)共同资助。郭永坚, E-mail: gyjidhx@scsfri.ac.cn

① 通讯作者: 朱长波, 副研究员, E-mail: changbo@ecowin.org

收稿日期: 2014-08-25, 收修改稿日期: 2014-09-15

充气, 每 2 d 换水 1 次。每周采用 YSI 556 型多参数水质仪监测水温、溶氧、pH 和盐度。实验期间水温为(19.21–28.81)℃, 溶氧为 6.5–7.9 mg/L, pH 为 7.6–7.9, 盐度为 26.2–31.4。实验初始时,  $\text{NH}_4\text{-N}$ <0.02 mg/L,  $\text{NO}_2\text{-N}$ <0.001 mg/L。

表 1 实验饲料主要化学组成(%干物质)

Tab.1 Proximate composition of the experimental diets (% dry matter)

饲料 Diets	粗蛋白 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude lipid(%)	灰分 Ash(%)
面粉 Flour	8.71	1.42	0.61
米糠 Rice bran	13.78	2.61	2.00
虾料 Shrimp feed	36.85	5.22	10.80
鱼料 Fish feed	30.14	2.09	7.32

### 1.3 实验用鱼及饲养

实验鲮苗种由广西海洋研究所提供, 分别用相应的饲料驯养 7 d, 于每天的 08:00 和 18:00 饱食投喂。实验开始时, 实验鱼经饥饿 24 h 后, 挑选平均尾重(25.0±1.59) g 的个体分别称重后随机放入 16 个鱼缸中, 每缸 5 尾。根据投喂饲料的不同, 分为 4 个处理组, 分别为面粉组(T1)、米糠组(T2)、虾料组(T3)、鱼料组(T4), 各设置 4 个重复。面粉用少量水和成面团并捏成细条投喂; 米糠组用少量水浸湿后捏成小团投喂; 虾料和鱼料直接投喂。生长实验持续 8 周, 实验期间投喂时间均为每天的 08:00 和 18:00, 投喂后 1 h 收集残饵。根据每日的残饵量酌情增减投喂量。

### 1.4 取样及样品分析

实验开始时, 随机取 10 尾作为初始样, 于-20℃保存用作鱼体生化组成分析。实验结束时, 将鱼饥饿 24 h 后再称重, 每缸取 3 尾鱼用作全鱼生化成分分析。

实验饲料和全鱼的粗蛋白、粗脂肪和灰分参照 AOAC(1984)的方法进行测定; 样品经 105℃烘箱干

燥后, 粗蛋白采用 FOSS 定氮仪(2300 Kjeltac Analyzer Unit)测定; 粗脂肪采用索氏抽提仪(Soxtec system HT6, Tecator, Hoganas, Sweden)进行测定; 灰分在马福炉中 550℃燃烧 5 h, 用失重法测定。主要计算公式:

存活率(Survival rate) (%)=100×终末实验鱼数量/初始实验鱼数量

饲料效率(Feed efficiency, FE) (%)=100×(终末体重-初始体重)/摄食量

特定生长率(Specific growth rate, SGR) (%/d)=100×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/实验天数

摄食率(Feed intake, FI) (%/d)=100×摄食饲料干重×2[终末体重+初始体重]/实验天数

日摄食量(Daily food intake, DFI) (g/d)=(投喂量-残饵量)/实验天数

### 1.5 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理和统计分析。不同处理先做单因素方差分析(One-Way ANOVA), 再通过 Duncan 比对差异, 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。百分比数据(如存活率、饲料效率等)对原数据进行反正弦转换后再进行显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 生长及饲料利用

实验结束时, 鱼料组(T4)的存活率为 100%, 虾料组(T3)次之, 面粉组(T1)最低(80%)。各组的摄食率不存在显著差异, 但面粉组(T1)、米糠组(T2)的特定生长率和饲料效率均显著低于虾料组(T3)及鱼料组(T4) ( $P < 0.05$ )。整体而言, 虾料组(T3)生长情况最优, 而面粉组(T1)最差(表 2)。

由图 1 可知, 随着养殖周数的延长, 不同处理组鲮的每周平均(以下简称周均)日摄食量变化规律差异明显: 实验初始时, 面粉组(T1)和米糠组(T2)周均日

表 2 投喂 4 种不同饲料对鲮全鱼生长和饲料利用的影响(平均值±标准差)

Tab.2 Growth and feed utilization of *M. cephalus* fed with four diets (Mean±SD)

生长指标 Growth index	处理组 Treatments			
	T1	T2	T3	T4
终末体重 Final body weight(g)	27.45±2.17 <sup>a</sup>	26.76±4.34 <sup>a</sup>	54.35±5.92 <sup>b</sup>	42.81±8.01 <sup>c</sup>
存活率 Survival rate(%)	80.00±16.33 <sup>a</sup>	85.00±10.00 <sup>ab</sup>	95.00±10.00 <sup>ab</sup>	100.00±0.00 <sup>b</sup>
特定生长率 SGR(%/d)	0.23±0.06 <sup>a</sup>	0.24±0.16 <sup>a</sup>	1.46±0.14 <sup>b</sup>	0.79±0.14 <sup>c</sup>
摄食率 FI (%/d)	1.53±0.44	1.45±0.24	1.47±0.12	1.58±0.14
饲料效率 FE(%)	7.54±1.73 <sup>a</sup>	11.89±0.99 <sup>a</sup>	48.62±5.84 <sup>b</sup>	24.01±2.79 <sup>c</sup>

注: 表中同行数据后的不同上标英文字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different superscripts within each row represent significant differences ( $P < 0.05$ )

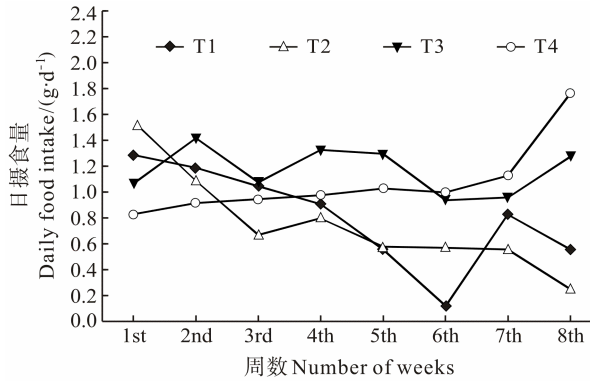


图 1 投喂 4 种不同饲料时鲮的周均日摄食量  
Fig.1 The weekly average daily food intake (DFI) of *M. cephalus* fed with four diets

摄食量水平较高, 依次为(1.28±0.01)、(1.54±0.01) g/d, 此后周均日摄食量迅速降低, 第 4 周以后基本低于 0.80 g/d。与之相比, 虾料组(T3)和鱼料组(T4)的周均日摄食量普遍高于 0.80 g/d。实验前中期虾料组(T3)的周均日摄食量较高, 但呈波动起伏, 而鱼料组(T4)较稳定; 第 6 周以后鱼料组(T4)的周均日摄食量迅速升高, 第 8 周时已达 1.76 g/d。

### 2.2 生化组成

由表 3 可知, 不同饲料投喂条件下, 鱼体粗蛋白含量以面粉组(T1)最低(16.48%), 而以米糠组(T2)最高(18.62%) ( $P < 0.05$ ); 粗脂肪含量则以米糠组(T2)最低(6.82%), 虾料组(T3)最高(10.52%) ( $P < 0.05$ ); 虾料组(T3)灰分含量显著低于其他组 ( $P < 0.05$ ), 米糠组(T2)则显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ); 各组的水分含量较为接近, 差异性不显著。

## 3 讨论

### 3.1 不同饲料投喂对鲮生长的影响

多数研究认为(Vayan *et al.*, 1988; 李大鹏等,

表 3 投喂 4 种不同饲料对鲮全鱼生化组分的影响  
(平均值±标准差)

Tab.3 The body composition of *M. cephalus* fed with four diets (Mean±SD)

处理组 Treatments	粗蛋白 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude lipid(%)	灰分 Ash(%)	水分 Moisture (%)
T1	16.48±1.09 <sup>a</sup>	8.01±0.42 <sup>a</sup>	4.39±0.75 <sup>a</sup>	70.99±0.52
T2	18.62±1.36 <sup>bc</sup>	6.82±0.11 <sup>b</sup>	4.83±0.70 <sup>b</sup>	65.56±8.70
T3	17.32±0.71 <sup>ab</sup>	10.52±0.36 <sup>c</sup>	3.43±0.23 <sup>c</sup>	70.65±6.10
T4	18.08±1.51 <sup>c</sup>	7.77±1.03 <sup>a</sup>	4.43±0.20 <sup>a</sup>	68.71±2.07

注: 表中同列数据后的不同上标英文字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different superscripts within each column represent significant differences ( $P < 0.05$ )

2004; 邵邻相等, 2005), 鱼类的终末体重、特定生长率等生长指标随养殖密度的增加而显著降低, 且初始体重越小特定生长率越高。不同养殖条件下(表 4), 单养实验中(王资勋等, 2011; 殷帅文等, 2007), 鲮的养殖密度往往较高, 其特定生长率也相应较低; 鲮-虾混养实验中(孔谦, 2011<sup>1)</sup>; 朱长波等, 2014), 由于池塘以凡纳滨对虾为主养品种, 鲮的养殖密度通常较小, 其特定生长率明显高于单养的结果。

与上述数据相比, 本实验中室内养殖条件下面粉组和米糠组的鲮特定生长率较低, 仅稍高于殷帅文等(2007)的实验结果, 但虾料组的特定生长率(1.46 %/d)则普遍高于文献报道。虾料组鲮的生长状况与鲮-虾混养池塘的鲮(以对虾残饵为主要食物来源)相近(孔谦, 2011<sup>1)</sup>。实验虾料与鱼料均为配合饲料, 但虾料的粗蛋白及粗脂肪含量为各实验组最高, 尤其是粗脂肪含量高达其他饲料的两倍以上, 因此其生长指标相应最佳。

面粉中缺少赖氨酸且含有抗营养因子非淀粉多糖, 可影响胃肠道的正常蠕动并减少消化液与食糜的

表 4 鲮生长情况的文献比较

Tab.4 Growth performance of *M. cephalus* compared with references

养殖密度 Stocking density (ind/m <sup>2</sup> )	初始体重 Initial body weight (g)	终末体重 Final body weight (g)	成活率 Survival rate (%)	特定生长率 SGR (%/d)	参考文献 Reference
13.3	150	450	-	0.55	王资勋等(2011)
60	220.6	240.3	-	0.15	殷帅文等(2007)
1	100-150	420	80.30	> 1.0	孔谦(2011) <sup>1)</sup>
0.07-0.24	300	500	62.00-65.67	0.91	朱长波等(2014)
12	67.8	123	-	0.85	Lupatsch 等(2003)
1.5	0.55	39.50-95.71	76.4-83.2	2.84-3.44	Biswas 等(2012)
41.7	25.0	26.76-54.35	80-100	0.23-1.46	本实验

1) 孔谦. 凡纳滨对虾与鲮鱼混养中精养池的理化生物因子的研究. 广东海洋大学硕士学位论文, 2010, 27-72

接触, 从而影响肠胃对营养元素的消化吸收(叶林等, 2013)。因此, 面粉不合作为作为主要饲料组分使用。米糠脂肪含量高(16%–18%)且多为不饱和脂肪酸, 是动物必需脂肪酸的良好来源(杨锁华等, 2006), 但不同鱼类对米糠的消化率相差极大: 韩庆伟等(2011)报道鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)对米糠的能量表观消化率与白鱼粉相当, 可达 98%; 而明建华等(2012)报道青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)对米糠的粗脂肪与总磷的表观消化率较低, 仅为 78.93%。由于面粉和米糠中蛋白及脂肪含量的不足, 鱼体需要通过大量摄食来满足其能量需求(宋益贞等, 2012), 因此两组鳊的周均日摄食量初期较高(图 1)。但作为单一饵料源的面粉和米糠只能提供不均衡的植物性蛋白, 难以满足鳊快速生长的需要, 养殖后期的周均日摄食量也迅速下降, 鳊的生长速度显著低于配合饲料组(虾料组和鱼料组), 饲料效率也相应降低, 这与朱耀强等(2012)进行的饲喂蚕豆(*Vicia faba* Linn.)对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)生长的影响结果相似。

### 3.2 不同饲料投喂对鱼体组成的影响

限食实验(殷帅文等, 2007)显示, 在能源物质的利用方面, 鳊优先利用糖原, 其次为脂肪, 而非蛋白质。因此, 米糠组与虾料组粗蛋白含量无显著性差异( $P > 0.05$ ), 但虾料组粗脂肪含量(10.52%)则显著高于米糠组(6.82%) ( $P < 0.05$ )。

鱼类在摄食较低水平的饲料蛋白的同时, 摄进较高水平的碳水化合物, 会促进糖原转变为脂肪并贮存于肝、腹腔内的脂肪组织及胴体等部位(Mohanty *et al.*, 1996)。谭肖英等(2005)发现, 较高的碳水化合物(面粉为主)水平(23%)会促进大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的肌肉脂肪沉积。陈建明等(2014)通过增加糊精用量下调饲料蛋白水平, 摄食后青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)的全鱼脂肪显著升高( $P < 0.05$ )。因此, 本实验中, 投喂粗脂肪含量仅为 1.42%的面粉, 面粉组的鱼体粗脂肪含量显著高于米糠组( $P < 0.05$ )。

此外, 鳊的生长指标并不一定与鱼体主成分含量的高低呈正相关。Biswas 等(2012)的室外池塘养殖试验中, 尽管施肥-投喂综合处理(FE)的特定增长率等生长指标显著高于施肥处理(FR)、投喂处理(FD), 但该组的鱼体粗蛋白和粗脂肪含量均低于单一处理组(FR 和 FD), 且显著低于 FR 组( $P < 0.05$ )。

### 3.3 不同饲料投喂在混养模式中的应用潜力

高密度的对虾养殖造成营养物质及有机废物的过量积累, 远超过池塘沉积物的承载能力(Su *et al.*,

2011), 而残饵是对虾池塘有机物的主要来源, 池塘底部残饵的腐烂分解使 DO 下降, 硫化物大量释放, 导致水质恶化(杨庆霄等, 1999)。随着养殖活动的推移, 对虾池塘的投饵量持续增加, 养殖后期产生的残饵量极高。鳊主要吞食沉积物表层的碎屑(44.81%), 还可摄食水中的对虾类甲壳动物(6.49%)、微藻(5.06%)、底栖硅藻(4.09%) (Soyinka *et al.*, 2008)。混养模式下, 鳊可以充分利用残留的鱼料(Lupatsch *et al.*, 2003)和虾料(朱长波等, 2014), 满足自身生长, 提高饲料效率。鳊还能吞食病弱虾作为食物, 切断病害传染途径, 降低病害发生率。此外, 鳊可以通过摄食养殖池塘中的天然饵料来部分补充投喂饲料的不足, 以满足其生长(Tawwab *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2012)。

在鳊-虾混养模式中, 混养开始前以面粉配鸡蛋制成面粉团, 粘在漂浮于水面的竹竿上作为鳊苗(体长  $< 5$  cm)饲料的暂养方式较为普遍(卢连明, 2011)。尽管本实验中面粉组及米糠组的增重率极小, 但其成活率仍高于 80%。鳊具有较强的饥饿耐受能力, 殷帅文等(2007)报道, 经过 28 d 的限食处理再进行 28 d 的正常投喂, 实验组鳊体重不断上升, 表现为完全补偿生长, 主要生长指标及鱼体生化组分与对照组(饱食组)相比不存在显著差异( $P > 0.05$ )。本实验前 28 d 各处理组鳊的周均日摄食量也较为接近, 若在养殖后期恢复适当投喂, 面粉组和米糠组的鳊生长及鱼体组成应可恢复至正常水平。因此, 在养殖前期采用面粉、米糠等低蛋白饲料投喂, 养殖后期依靠对虾池塘丰富的残饵辅以天然饵料, 鳊应当可以较好地生长并发挥其生态作用, 维持对虾的良好生长, 提高经济效益。

## 参 考 文 献

- 于娜, 李加儿, 区又君, 等. 盐度胁迫及昼夜变化对鳊鱼幼鱼消化酶活力的影响. 南方水产科学, 2011, 7(6): 52–57
- 王资勋, 黄帅. 鳊鱼都市型室外高密度循环水养殖模式与效益. 农技服务, 2011, 28(4): 503, 514
- 区又君, 李加儿, 谢菁, 等. 鳊早期发育阶段鳃的超微结构及其呼吸表面积的研究. 南方水产科学, 2014, 10(4): 52–57
- 卢连明. 南美白对虾与鳊鱼兑淡混养技术. 福建水产, 2011(12): 26–27
- 叶林, 杨小平, 陈冰玲, 等. 不同水平面粉替代对小鳄龟生长的影响研究. 当代水产, 2013(5): 88–89
- 朱长波, 郭永坚, 颜晓勇, 等. 凡纳滨对虾-鳊网围分隔混养模式下经济与生态效益评价. 南方水产科学, 2014, 10(4): 1–8
- 朱耀强, 李道友, 赵思明, 等. 饲喂蚕豆对斑点叉尾鲷生长性能和肌肉品质的影响. 华中农业大学学报, 2012, 31(6):

771-777

- 李大鹏, 庄平, 严安生, 等. 光照、水流和养殖密度对史氏鲟稚鱼摄食、行为和生长的影响. 水产学报, 2004, 28(1): 54-61
- 李加儿, 曹守花, 区又君, 等. 鲮嗅囊的组织形态结构观察及功能探讨. 动物学杂志, 2014, 49(3): 399-406
- 李静晶, 刘森林, 王春红. 鲮鱼解剖学模型剂量计算机整体模型比较. 原子能科学技术, 2011, 45(2): 150-155
- 杨庆霄, 蒋岳文, 张昕阳, 等. 虾塘残饵腐解对养殖环境影响的研究. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 11-15
- 杨锁华, 刘伟民, 杨小明, 等. 米糠应用研究进展. 粮油加工与食品机械, 2006(4): 70-75
- 吴庆元, 蒋玫, 李磊, 等. 低盐度胁迫对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼耗氧率和排氨率的影响. 海洋环境科学, 2014, 33(2): 177-181
- 邱丽华, 吴进锋, 张汉华, 等. 海水池塘鲮鱼、斑节对虾混养的初步研究. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(4): 69-71
- 宋益贞, 过世东, 牛华欣. 不同脂肪源对吉富罗非鱼生长和饲料利用的影响. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 200-202
- 陈建明, 沈斌乾, 潘茜, 等. 饲料蛋白和脂肪水平对青鱼大规格鱼种生长和体组成的影响. 水生生物学报, 2014, 38(4): 699-705
- 陈雄杰. 石斑鱼精养池套养鲮鱼、南美白对虾高产增效技术. 河北渔业, 2012(2): 21-24
- 邵邻相, 谢炜, 叶菲菲. 养殖密度对地图鱼幼鱼生长发育的影响. 水产科学, 2005, 24(4): 7-9
- 明建华, 叶金云, 张易祥, 等. 青鱼对 8 种饲料原料中营养物质的表观消化率. 动物营养学报, 2012, 24(10): 2050-2058
- 殷帅文, 林学群, 陈洁辉. 限食(含饥饿)以及再充分投喂对鲮鱼生理参数的影响. 水产科学, 2007, 26(7): 373-376
- 徐孝栋, 栾生, 罗坤, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育种核心群体在连续排污养殖模式下的生长和存活性能分析. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 32-38
- 郭永坚, 朱长波, 阴晓丽, 等. 凡纳滨对虾-鲮网围分隔混养池塘浮游植物群落结构特征的研究. 南方水产科学, 2015, 11(1): 45-54
- 彭士明, 施兆鸿, 陈超, 等. 鲮梭鱼营养与环境因子方面的研究现状及展望. 海洋渔业, 2008, 30(4): 356-362
- 韩庆炜, 梁萌青, 姚宏波, 等. 鲈鱼对 7 种饲料原料的表观消化率及其对肝脏、肠道组织结构的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 32-39
- 谭肖英, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饲料中碳水化合物水平对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长、鱼体营养成分组成的影响. 中山大学学报(自然版), 2005, 44(增刊): 258-263
- 葛红星, 李健, 陈萍, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 76-82
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 14th Ed, Arlington, Virginia: AOAC, 1984, 1184
- Biswas G, De D, Thirunavukkarasu AR, et al. Effects of stocking density, feeding, fertilization and combined fertilization-feeding on the performances of striped grey mullet (*Mugil cephalus* L.) fingerlings in brackishwater pond rearing systems. Aquaculture, 2012, 338-341: 284-292
- Dasriddar PG, Mallik A, Mandal N. Contribution of shrimp disease research to the development of the shrimp aquaculture industry: an analysis of the research and innovation structure across the countries. Scientometrics, 2013, 97(3): 659-674
- Lupatsch I, Katz T, Angel DL. Assessment of the removal efficiency of fish farm effluents by grey mullets: a nutritional approach. Aquaculture Research, 2003, 34(15): 1367-1377
- Soyinka, Olufemi O. The feeding ecology of *Mugil cephalus* (Linnaeus) from a high brackish tropical lagoon in Southwest, Nigeria. Afr J Biotechnol, 2008, 7(22): 4192-4198
- Su YP, Ma S, Lei JL. Assessment of pollutant reducing effect by poly-culture and bioremediation in sediment of marine shrimp ponds. Procedia Environmental Sciences, 2011, 10(Part B): 1559-1567
- Tawwab AM, Eid AHM, Abdelghany AE, et al. The assessment of water quality and primary productivity in earthen fishponds stocked with striped mullet (*Mugil cephalus*) and subjected to different feeding regimes. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2005, 5(1): 1-10
- Vayan MM, Leatherland JF. Effect of stocking density on the growth and stress-response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture, 1988, 75(1-2): 159-170

(编辑 冯小花)

## Effects of Four Types of Diet on the Growth and Body Composition of *Mugil cephalus*

GUO Yongjian, LUO Zhaolin, YIN Xiaoli, LI Junwei, ZHU Changbo<sup>①</sup>, XIE Xiaoyong

(Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

**Abstract** Grey mullet (*Mugil cephalus*) grazes on plant detritus and microflora and is an omnivorous fish species of ecological importance in both mono- and poly-culture due to its unique feeding habit. However, little is known about the effects of different diets on the growth and body composition of *M. cephalus*. To address this question we carried out an 8-week feeding experiment on *M. cephalus* with initial weight of (25.0±1.59) g. The experimental subjects were fed with four groups of diets that were flour (T1), rice bran (T2), shrimp feed (T3) and fish feed (T4). The results showed that the specific growth rate (SGR) and the feed efficiency (FE) in T1 and T2 were significantly lower than those in T3 and T4 ( $P < 0.05$ ). The SGR and FE in T3 were 1.46 %/d and 48.62% respectively which were 2-fold of those in T4. Fish fed with a single diet of either flour or rice bran barely grew in size but had higher survival rates (> 80%). The weekly average daily food intake (DFI) of T1 and T2 decreased to below 0.80 g/d after 4 weeks, whereas the weekly average DFIs of T3 and T4 were above 0.80 g/d and obviously increased in the 8th week during the experiment. The whole body crude protein was the highest in T2 (18.62%±1.36%), and crude lipid was the highest in T3 (10.52%±0.36%). There was apparent accumulation of crude lipid in T1 (8.01%±0.42%), which indicated that the higher carbohydrates (flour) level could enhance the lipid accumulation in the whole body of the fish. Moreover, the level of whole body crude protein could be well maintained when the formula feeds were replaced with rice bran. Flour or rice bran alone may not be sufficient to support the rapid growth of *M. cephalus* because of the lack of balanced proteins; however, they might help promote the survival rate at early rearing stage. Therefore a partial diet replacement with flour or rice bran in shrimp ponds could be a useful trial.

**Key words** *Mugil cephalus*; Diet; Protein; Lipid; Feeding

① Corresponding author: ZHU Changbo, E-mail: changbo@ecowin.org



# 棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的快速筛选\*



孙晓飞 郭伟良 谢珍玉 王世锋 胡文婷 李富盛 王文慧 周永灿<sup>①</sup>

(热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海南大学海洋学院 海口 570228)

**摘要** 采用离体外周血白细胞与中草药水提液共同孵育法,快速筛选棕点石斑鱼中草药免疫增强剂。39种生药量浓度为100 mg/ml的中草药水提液及添加5.0 mg/ml酵母聚糖的中草药水提液分别与棕点石斑鱼外周血白细胞孵育后,采用氮蓝四唑(NBT)还原法检测各种中草药水提液对棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的影响,再以吞噬乳胶微球法检测具有显著增强白细胞氧呼吸爆发活性效果的中草药对棕点石斑鱼白细胞吞噬活性的影响,筛选中草药免疫增强剂,并将其拌料饲喂棕点石斑鱼,考察其对棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性的影响。结果显示,39种中草药中有10种对棕点石斑鱼离体白细胞氧呼吸爆发活性显著提高15%以上,3种酵母聚糖添加组对白细胞氧呼吸爆发活性提高70%以上;筛选出可同时提高棕点石斑鱼离体白细胞的氧呼吸爆发活性和吞噬活性的3种中草药,它们分别为鸡血藤、黄柏和墨旱莲。拌料饲喂实验结果显示,饲喂1%的鸡血藤、黄柏和墨旱莲可显著提高棕点石斑鱼体内外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性。

**关键词** 棕点石斑鱼; 中草药; 免疫增强剂; 氧呼吸爆发活性; 吞噬活性

**中图分类号** S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0054-07

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)又称为褐点石斑鱼,隶属于鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*),俗称老虎斑,属于暖水性岛礁鱼类。其肉质好、口感佳、营养价值高,深受消费者青睐。随着棕点石斑鱼人工繁殖技术的突破,快速促进了其养殖业的发展,养殖规模不断扩大、养殖产量日益增加(孔祥迪等, 2014; 陈超等, 2014),但随之而来的是其疾病种类越来越多,造成的损失也越来越大。病害成为目前我国棕点石斑鱼等石斑鱼养殖可持续健康发展的主要限制因素之一,在我国各主要石斑鱼养殖区,已有大量关于石斑鱼疾病及其造成危害的报道(黄志坚等, 2002; 陈晓燕等, 2003; 覃映雪等, 2004; 陈信忠等, 2004)。2008年以来,在海南陵水新村、万宁东奥和黎安、乐东莺歌海等地的网箱养殖和工厂化养殖棕点石斑鱼均陆续发生了较严重的暴发性疾病,

造成了巨大经济损失(徐先栋等, 2012; 戴小连等, 2012)。

中草药作为绿色天然药物,具有毒副作用小、多组分多靶点多功效、不易诱发病原菌耐药性、低污染等优势,在水产无公害养殖病害防治中具有广阔的应用前景(邢跃楠等, 2007; 李明等, 2007)。目前国内外已有大量关于中草药作为免疫增强剂或抗病原药物用于水产疾病防治的报道(陈孝焯等, 2003; 温周瑞等, 2004; Citarasu, 2010; Bairwa *et al.*, 2012; 李华等, 2013),但已有的报道主要借鉴人用或畜禽用中草药的使用效果,集中于少数几种中药单方或复方的研究,水产动物不论从生活环境还是自身免疫功能都与陆生动物有显著差异,有必要针对水产动物从数量庞大的中草药中筛选出更合适的中草药防治药物。为此,本研究以棕点石斑鱼为研究对象,利用离体外周血白细胞与中草药水提液共同孵育方法,通过检测不同中草药

\* 国家自然科学基金(31260644)、国家海洋公益性项目(201205025)、高等学校博士点基金(20124601110006)、海南省重大科技项目(ZDZX2013009)、海南省自然科学基金(312068)和海南省产学研一体化专项资金项目(CXY20130058; CXY20130028)共同资助。共同第一作者: 孙晓飞, E-mail: sunxiaofei0532qd@163.com; 郭伟良, E-mail: guowl07@mails.jlu.edu.cn

<sup>①</sup> 通讯作者: 周永灿, 教授, E-mail: zychnu@163.com

收稿日期: 2014-04-05, 收修改稿日期: 2014-06-23

对离体外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性等影响, 从 39 种中草药中筛选适合棕点石斑鱼的免疫增强剂, 为棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的应用与开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中草药包括墨旱莲(*Herba ecliptae prostratae*)、白术(*Rhizoma atractylodis macrocephalae*)、白鲜皮(*Cortex dictamni radialis*)、白芷(*Radix angelicae formosanae*)、姜黄(*Rhizoma curcumae longae*)、薄荷(*Herba menthae haplocalycis*)、补骨脂(*Psoraleae fructus*)、布渣叶(*Microcos paniculata* L.)、草豆蔻(*Alpinia katsumadai hayata*)、大黄(*Chinese rhubarb*)、大血藤(*Caulis sargentodoxae*)、丹参(*Radix salviae miltiorrhizae*)、当归(*Radix angelicae sinensis*)、覆盆子(*Fructus rubi*)、甘草(*Radix glycyrrhizae*)、黄柏(*Cortex phellodendri amurensis*)、鬼箭羽(*Ramulus euonymi*)、黄芪(*Radix astragali mongolici*)、荷叶(*Folium nelumbinis*)、红花(*Flos carthami*)、牛膝(*Radix achyranthis bidentatae*)、黄连(*Rhizoma coptidis*)、黄芩(*Radix scutellariae baicalensis*)、藿香(*Wrinkled gianthysop*)、鸡血藤(*Caulis spatholobi*)、降香檀(*Lignum dalbergiae odoriferae*)、绞股蓝(*Herba seu radix gnostemmatis pentaphylli*)、菊花(*Chrysanthemum*)、连翘(*Fructus forsythiae suspensae*)、良姜(*Rhizoma alpiniae officinari*)、麻黄(*Chinese ephedra*)、牛蒡子(*Great burdock fruit*)、肉桂(*Cortex cinnamomi cassiae*)、山楂(*Fructus crataegi pinnatifidae*)、土北芪(*Radix fici palmatilobae*)、土沉香(*Lignum aquilariae resinatum*)、菟丝子(*Semen cuscutae*)、五味子(*Fructus schisandrae chinensis*)、益母草(*Herba leonuri japonici*)，共 39 种，购自海口某中药店。

实验于 2013 年 4—8 月进行。棕点石斑鱼由海南定大养殖公司提供, 全长(19.0±1.0) cm, 体重(35.0±2.0) g, 从养殖场充氧运至实验室后暂养于玻璃水族箱 80 cm×50 cm×60 cm(长×宽×高)中, 外贴黑纸避光, 每个水族箱养 15 尾, 连续充氧, 每天 10:00 换水 1/3, 水温(28±2)℃, 盐度 25, 每天 08:00 按鱼体质量 1%投喂基础饲料 1 次, 暂养 14 d 后用于各项实验。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 中草药提取液样品制备

将各中草药于烘

箱中 60℃烘干 10 h 以上, 粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 制成中草药粉末样品。称取 1.00 g 于 15 ml 离心管, 加去离子水 10 ml, 混匀, 室温浸泡提取 72 h, 期间不时摇动; 8500×g 离心 10 min, 取上清液, 过无菌 0.22 μm 微孔滤膜, 制成生药量浓度为 100 mg/ml 中草药提取液样品。

#### 1.2.2 棕点石斑鱼血液样品制备

取经 14 d 暂养的棕点石斑鱼, 用丁香酚麻醉, 以含有 0.5 ml 肝素钠的 2.5 ml 无菌注射器从尾静脉取血, 转移到 15 ml 无菌离心管中, 加入等体积的细胞培养基 L-15, 制成棕点石斑鱼血液样品。

#### 1.2.3 外周血白细胞分离混合液选择及白细胞样品制备

将无菌生理盐水和 Percoll 细胞分离液不同比例混合, 制成密度分别为 1.097、1.090、1.089、1.086、1.084、1.077、1.076、1.070、1.069 和 1.066 g/ml 的细胞分离混合液。分别取 1.5 ml 混合液于 10 ml 离心管中, 沿管壁缓慢加入 3 ml 棕点石斑鱼血液样品, 室温 800×g 离心 20 min, 取中间白细胞层于新的 10 ml 离心管中, 加入 1 ml 细胞培养液 L-15, 轻轻混匀; 取 20 μl 细胞, 加入等体积的台盼蓝染色后, 以血球计数板计数, 分别计算不同混合液分离的白细胞浓度, 每种比例的混合液平行测定 3 次, 选择最适混合液分离制备棕点石斑鱼白细胞样品。

#### 1.2.4 提高白细胞氧呼吸爆发活性中草药筛选

参照戴小连等(2012)的方法略作修改测定氧呼吸爆发活性。取 96 孔板, 每 1 行为 1 组, 每组又分 L、N 和 Z 各 3 个亚组, 每个亚组 3 个孔, 即每行的 1—3 孔为 L 亚组、4—6 孔为 N 亚组, 7—9 孔为 Z 亚组。96 孔板的第 1 行(A 行)为空白对照组, 其余各行(B—H 行)为中草药提取液样品组。每孔加入白细胞悬液( $1 \times 10^5$  CFU/ml) 100 μl; 中草药样品组的各孔再加入制备的中草药提取液 100 μl、空白对照组的各孔加入 PBS 100 μl、阳性对照组(A 行 7—9 孔)的各孔加入 5.0 mg/ml 酵母聚糖 100 μl; 此后, 所有样品组的 Z 亚组各孔再加 5.0 mg/ml 酵母聚糖 100 μl, 再用 PBS 将所有各孔补齐到 300 μl; 室温孵育 2 h 后, 每孔吸去上清液 100 μl, 用 100 μl 细胞培养液 L-15 洗涤 3 次; L 亚组各孔添加细胞培养基 L-15 50 μl, N 亚组和 Z 亚组各孔添加细胞培养液 L-15 和氮蓝四唑(NBT)各 50 μl, 再用 PBS 将所有各孔补齐到 200 μl。室温孵育 1 h 后, 每孔吸去 100 μl 上清液, 加 100 μl 甲醇固定 3 min, 再吸去 100 μl 上清液, 用 100 μl 70%甲醇洗涤 3 次。小心吸去各孔内的所有液体, 室温风干, 每孔加入 2 mol/L KOH 100 μl 和 DMSO 200 μl; 用酶标仪测定各孔

$OD_{630nm}$  值, 分别计算 N 组相对氧呼吸爆发活性 (Oxygen Respiratory Burst Activity of N Group,  $ORB_N$ )、Z 组相对氧呼吸爆发活性 ( $ORB_Z$ )、N 组氧呼吸爆发活性提高率 (Elevation of Oxygen Respiratory Burst Activity of N Group,  $EORB_N$ )、Z 组氧呼吸爆发活性提高率 ( $EORB_Z$ ) 及 Z 与 N 组氧呼吸爆发活性差值 ( $ORB_{Z-N}$ ), 计算方法如下:

$$ORB_N = OD_N - OD_L$$

$$ORB_Z = OD_Z - OD_L$$

$$EORB_N(\%) = (\text{试验组 } ORB_N - \text{空白对照组 } ORB_N) / \text{空白对照组 } ORB_N \times 100$$

$$EORB_Z(\%) = (\text{试验组 } ORB_Z - \text{空白对照组 } ORB_Z) / \text{空白对照组 } ORB_Z \times 100$$

$$EORB_{Z-N} = EORB_Z\% - EORB_N\%$$

式中,  $OD_L$  为 L 亚组  $OD_{630nm}$  值,  $OD_N$  为 N 亚组  $OD_{630nm}$  值,  $OD_Z$  为 Z 亚组  $OD_{630nm}$  值,  $ORB_N$  指剔除细胞培养液 L-15 作用, 外周血白细胞的氧呼吸爆发活性;  $ORB_Z$  指剔除细胞培养液 L-15 作用后, 与酵母聚糖共同作用下白细胞氧呼吸爆发活性;  $EORB_N > 0$  表明中草药提取液具有提高白细胞氧呼吸爆发活性,  $EORB_N$  越大表明中草药提取液样品或酵母聚糖提高白细胞氧呼吸爆发活性越强;  $EORB_Z > 0$  指中草药提取液与酵母聚糖协同作用具有提高白细胞氧呼吸爆发活性。筛选  $EORB_N > 10\%$  且中草药组与空白组  $ORB_N$  具有显著性差异 ( $t$  检验  $P < 0.05$ ) 的中草药 (具有较强的免疫增强效果); 或  $EORB_Z > 10\%$ 、 $EORB_{Z-N} > 0$ , 且中草药组与空白组  $ORB_Z$  具有显著性差异 ( $t$  检验  $P < 0.05$ ) 的中草药 (与酵母聚糖具有较强的协同免疫增强效果), 进行后续棕点石斑鱼外周血细胞吞噬活性实验。

**1.2.5 提高血白细胞吞噬活性中草药筛选** 参考戴小连等 (2012) 方法检测筛选中草药对外周血白细胞吞噬活性的影响。取无菌 1.5 ml 离心管, 加入 100  $\mu$ l 白细胞悬液 ( $5 \times 10^5$  CFU/ml), 此后, 中草药组添加中草药浸提液 100  $\mu$ l, 空白对照组加 PBS 100  $\mu$ l, 室温孵育 1 h; 每管加入 100  $\mu$ l 0.133 g/ml 的乳胶微球, 轻轻混匀, 取 100  $\mu$ l 滴于带凹槽载玻片的凹槽内, 室温孵育 1 h, 吸去凹槽中的液体, 加戊二醛 100  $\mu$ l, 室温固定 5 min, 吸去液体, 加入 Giemsa 染色 0.5 h, 蒸馏水冲洗, 自然晾干。油镜下分别取 5 个视野观察计数, 每种中草药平行检测两次, 计算吞噬活性率 ( $PA$ ) 和吞噬指数 ( $PI$ ):

$$PA = \text{吞噬乳胶球的白细胞数} / \text{总白细胞数} \times 100\%$$

$$PI = \text{被吞噬的乳胶球总数} / \text{吞噬乳胶球的白细胞总数}$$

根据  $PA$  和  $PI$  测定结果, 筛选能同时提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的中草药。

**1.2.6 中草药免疫增强剂的体内免疫效果验证** 将能同时提高棕点石斑鱼离体外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的中草药分别拌料投喂棕点石斑鱼, 饲料中中草药生药含量为 1% (对照组为无中草药的基础饲料), 连续投喂 28 d 后, 按 1.2.4 方法检测各组棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性差异。

**1.2.7 数据处理** 采用软件 Origin Pro 8.0 对数据进行统计分析, 采用  $t$  检验进行组间显著性分析, 显著水平为  $P < 0.05$ , 极显著水平为  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 棕点石斑鱼外周血白细胞分离液的筛选

不同混合比例的生理盐水与 Percoll 细胞分离液制备的混合液对棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果影响研究结果显示 (图 1), Percoll 细胞分离液密度为 1.084 g/ml 时, 棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果最好, 其次为 1.077 g/ml。为此, 选择生理盐水与 Percoll 细胞分离液密度为 1.084 g/ml 用于后续各项实验的棕点石斑鱼外周血白细胞分离。

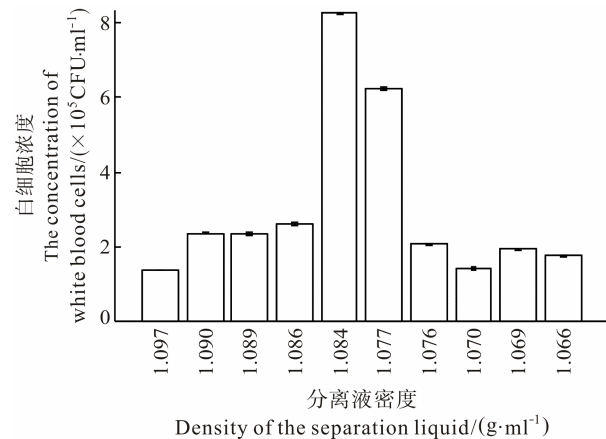


图 1 不同密度的 Percoll 细胞分离液对棕点石斑鱼外周血细胞分离的影响

Fig.1 The effects of density of Percoll gradient solution on the separation of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

### 2.2 提高棕点石斑鱼白细胞氧呼吸爆发活性中草药筛选

墨旱莲等 39 种中草药提取液对棕点石斑鱼离体外周血白细胞体外氧呼吸爆发活性影响研究结果显示 (图 2), 丹参和墨旱莲两种中草药的  $ORB_N$  值与对照组有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 其  $EORB_N$  分别为 91.61%

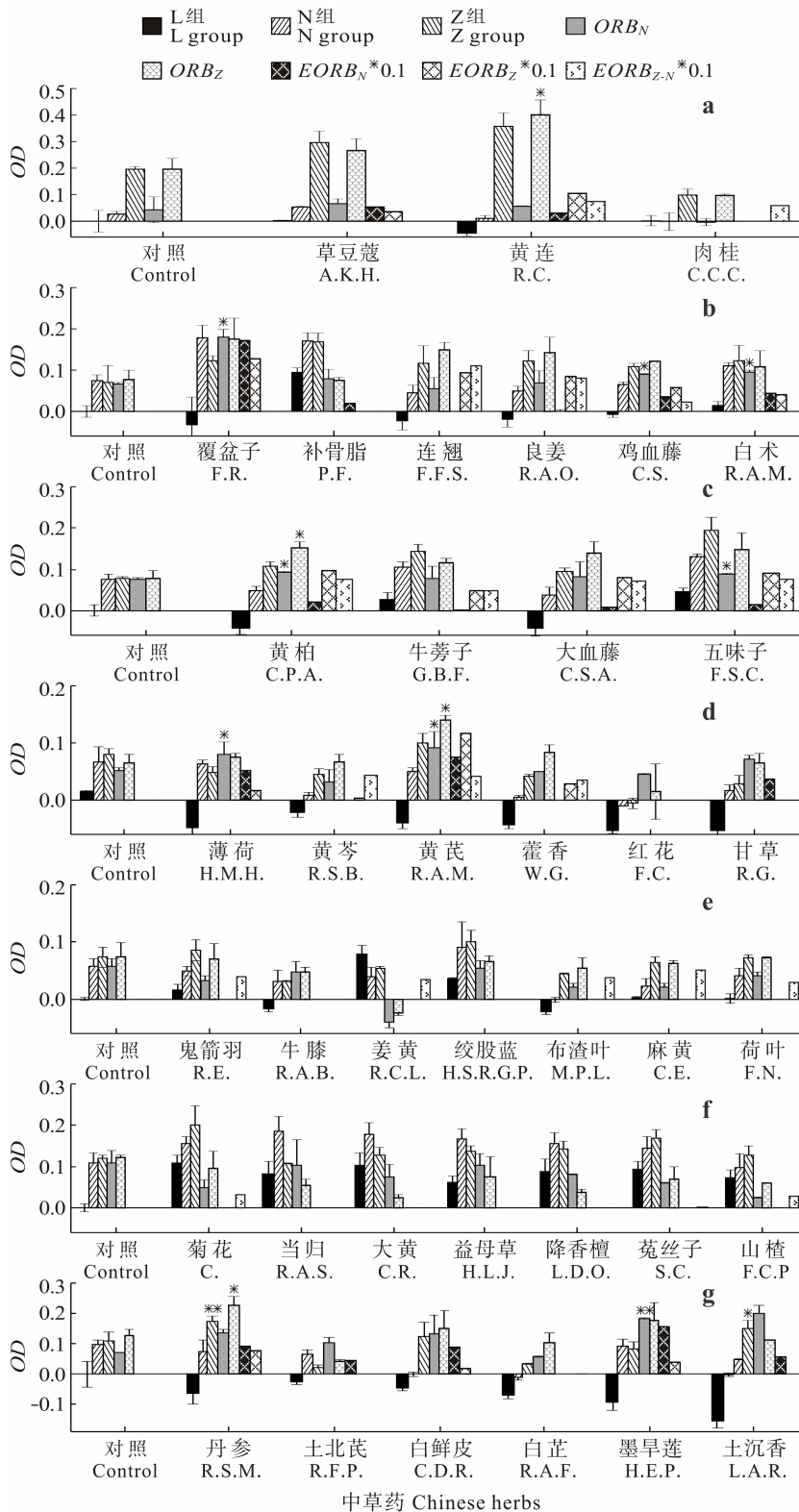


图 2 不同中草药提取液对棕点石斑鱼外周血细胞体外产氧负离子能力的影响

Fig.2 The effects of the extraction of different Chinese herbs on the activity of superoxide anion production of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

和 157.34%; 覆盆子、鸡血藤、白术、黄柏、五味子、薄荷、黄芪和土沉香 8 种中草药的  $ORB_N$  值与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 它们的  $EORB_N$  分别为 171.70%、35.09%、43.40%、20.26%、15.03%、51.92%、75.00% 和 111.19%, 均大于 15%。说明以上 10 种中草药提取液能够显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性。黄连、黄柏和黄芪 3 组中草药的  $ORB_Z$  与对照组有显著性差异,  $EORB_Z$  为 104.59%、79.22% 和 116.22%, 且  $EORB_{Z-N}$  分别为 74.36%、75.84% 和 41.22%, 均大于 10%, 说明这 3 种中草药与酵母聚糖具有协同提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的功能, 不过, 在这 3 种中草药中, 黄柏和黄芪单独使用也可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性, 而黄连单独使用对棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性影响并不显著。

图 2 中  $EORB_N$ 、 $EORB_Z$  和  $EORB_{Z-N}$  若为负值则自动归零。与对照组进行双边  $t$  检验, \* 表示  $P < 0.05$ , 显著差异; \*\* 表示  $P < 0.01$ , 极显著差异。

### 2.3 提高棕点石斑鱼白细胞吞噬活性中草药筛选

对上述筛选的单独使用或与酵母聚糖联合使用可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞体外氧呼吸爆发活性的 11 种中草药, 进一步检测其对棕点石斑鱼外周血白细胞吞噬活性的影响。结果显示 (图 3), 五味子对棕点石斑鱼外周血白细胞的吞噬活性的激活有抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 土沉香对棕点石斑鱼外周血白细胞的吞噬活性有抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 鸡血藤可极显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的  $PI$  值 ( $P < 0.01$ ), 墨旱莲和黄柏可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的  $PI$  值 ( $P < 0.05$ )。表明鸡血藤、墨旱莲和黄柏这 3 种中草药可同时显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的体外氧呼吸爆发活性和体外吞噬活性。

### 2.4 中草药对棕点石斑鱼体内免疫增强效果验证

对能同时提高棕点石斑鱼离体白细胞的体外氧呼吸爆发活性和吞噬活性的鸡血藤、墨早莲和黄柏, 分别按 1%生药添加量拌料投喂棕点石斑鱼 28 d 后, 其外周血白细胞和头肾白细胞氧呼吸爆发活性如图 4 所示。结果显示, 投喂鸡血藤、墨早莲、黄柏后, 棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性均极显著高于对照组, 而投喂墨早莲后棕点石斑鱼头肾白细胞氧呼吸爆发活性极显著高于对照组、投喂黄柏显著高于对照组。

## 3 讨论

### 3.1 细胞分离液对外周血白细胞分离效果的影响

鱼类属于低等脊椎动物, 血细胞的组成和血液指数因种类不同而差异较大, 以细胞分离液进行外周血白细胞分离时, 因鱼类种类不同分离条件也存在差异, 银大麻哈鱼、日本鳗、草鱼、真鲷、鲤等鱼类外周血白细胞分离条件研究已有报道(丰培金等, 2004), 其中, 草鱼、真鲷、鲤可将外周血白细胞有效分离出来的分离液密度分别为: 1.080-1.085、1.07、1.085 mg/ml, 而本研究对棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果显示, 最佳的 Percoll 细胞分离液密度为 1.077-1.084 mg/ml, 与草鱼和鲤的外周血白细胞分离液密度较为相近。

### 3.2 中草药免疫增强剂筛选

随着水产健康和安全养殖发展的要求, 中草药等安全高效药物的研究与开发日愈迫切。盛竹梅等(2013)考察了由麻黄等 6 味中草药组成的复方制剂不同剂量投喂对鲫鱼免疫力的影响并得出该复方可有效提高鲫鱼血液白细胞吞噬活性等非特异免疫力的结论; 简纪常等(2002)用添加以黄

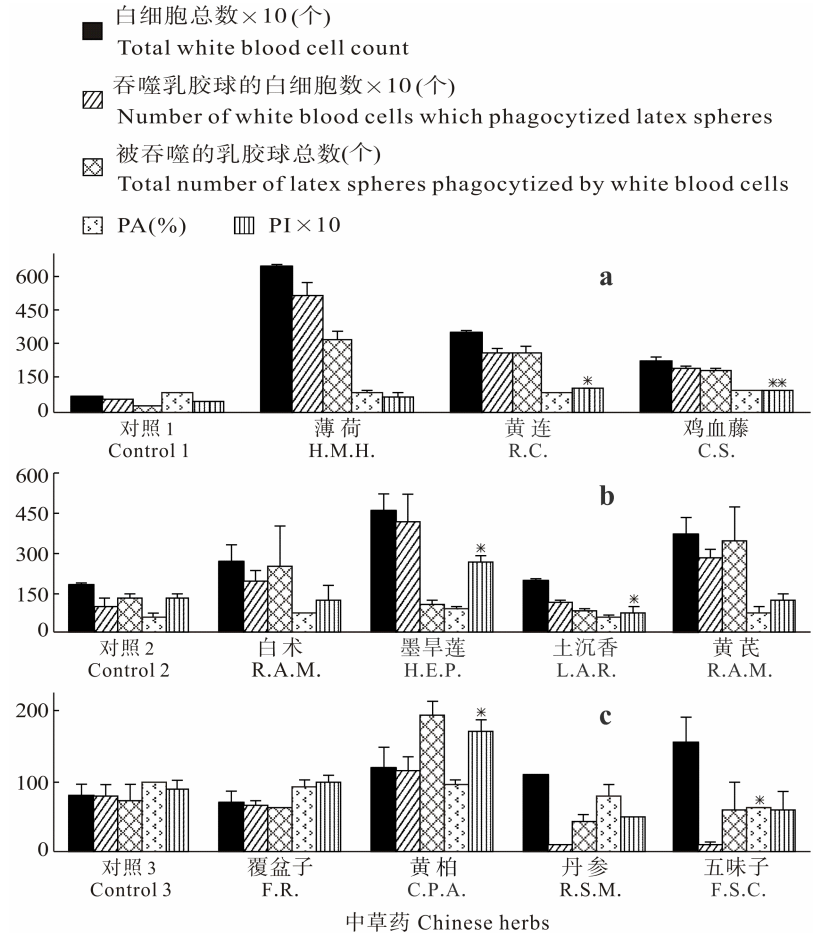


图3 不同中草药对棕点石斑鱼外周血白细胞体外吞噬活性的影响  
 Fig.3 The effects of different Chinese herbs on the phagocytic activity of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

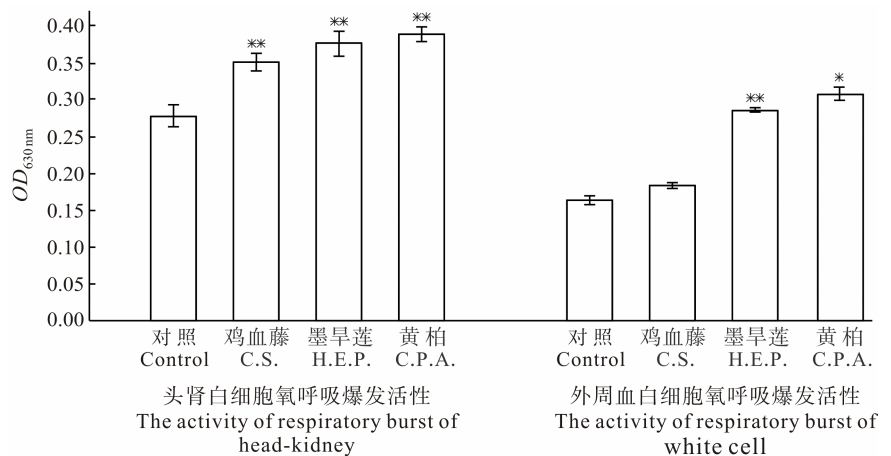


图4 饲喂不同中草药对棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性的影响  
 Fig.4 The effects of different Chinese herbs on the respiratory burst activity of the white blood cells and head kidney white cells of *E. fuscoguttatus*

芪为主药的中草药的配合饲料饲喂建鲤后, 测定了建鲤非特异性免疫指标 NBT 阳性细胞和溶菌酶活力均显著提高; 张照红等(2011)研究由黄芪等 7 味中草药

组成的复方不同剂量投喂对奥尼罗非鱼血液 NBT 阳性细胞数量、血清中超氧化物歧化酶等非特异性免疫功能的影响, 结果显示投喂 1.5% 复方中草药可显著提高奥尼罗非鱼非特异性免疫力; Christyapita 等(2007)以单方中草药牛膝和早莲草分别投喂罗非鱼, 结果表明能显著提高罗非鱼的免疫力; 李超等(2011)采用拌料投喂的方法筛选增强草鱼免疫功能的复方中草药免疫增强剂, 结果表明由黄芪等 10 味中草药组成的复方的效果最佳。

本研究采用离体外周血白细胞与中草药提取液共孵育, 通过综合考察中草药对离体白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的影响, 从 39 种中草药中筛选出可以显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的 10 种中草药。已有报道认为黄芪可提高奥尼罗非鱼血液 NBT 阳性细胞数量和血清中超氧化物歧化酶活性(张照红等, 2011)和建鲤的 NBT 阳性细胞数量和溶菌酶活力(简纪常等, 2002), 还可提高草鱼的多种非特异性免疫功能(李超等, 2011)和黄颡鱼头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性(吴旋等, 2011); 筛选出鸡血藤、墨旱莲和黄柏这 3 种中草药既可同时提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性和吞噬活性, 采用拌料投喂的实验方法对所筛选的 3 种中草药进行体内免疫增强效果考察, 结果显示该 3 种中草药均可极显著或显著提高棕点石斑鱼白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性, 说明离体筛选结果与体内投喂实验验证结果一致, 利用该离体筛选方法进行中草药免疫增强剂筛选是可行的。而且, 已有研究表明鸡血藤水提液可提高小鼠淋巴因子活化杀伤细胞和 NK 细胞的活性(胡利平等, 1997), 其主要活性成分有黄酮类、萜类、甾醇类、萜醌类、内酯类、苷类等(符影等, 2011), 其中黄酮类化合物可促进 IL-3 的分泌及调节促红细胞(EPO)水平(邓家刚等, 2007), 促进白细胞生成(应军等, 2011), 为此, 鸡血藤对棕点石斑鱼免疫增强作用的主要成分可能是其黄酮类化合物。有研究表明墨旱莲中具有黄酮成分——木樨草素和榭皮素, 这类黄酮类成分具有增强免疫功能作用(张梅等, 1997), 可刺激小鼠脾淋巴细胞增殖转化, 提高小鼠的血清溶血素水平, 增强小鼠的单核-腹腔巨噬细胞的吞噬能力和 NK 细胞活性等(王彦武等, 2008), 可显著提高溶菌酶, 补体等非特异性免疫功能(Christyapita *et al.*, 2007)。黄柏能显著提高点带石斑鱼血液中 NBT 阳性细胞数(赵晶晶等, 2012), 其主要活性成分为生物碱类物质(侯小涛等, 2007); 采用离体筛选方法省去了投喂的过程, 并且避免了投喂过程中因不同个体摄食

量的差异而对结果产生的影响。相对于拌料投喂的筛选方法, 本研究所采用的离体筛选方法具有结果客观、筛选速度快捷、筛选成本低等优点, 非常适合大量样品的快速筛选。

## 参 考 文 献

- 孔祥迪, 陈超, 李炎璐, 等. 4 种常用消毒药物对棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)受精卵孵化的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 122-127
- 丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养. 中国兽医学报, 2004, 24(4): 369-371
- 王彦武, 李凤文, 黄超培, 等. 墨旱莲提取物对小鼠免疫调节作用的研究. 应用预防医学, 2008, 14(6): 354-356
- 邓家刚, 梁宁, 林启云. 鸡血藤总黄酮对血虚模型小鼠造血功能的影响. 中草药, 2007, 38(7): 1055-1056
- 邢跃楠, 赵文. 中草药在水产养殖中的应用的研究进展. 中国水产, 2007(4): 64-66
- 李华, 张太娥, 李强. 复方中草药对大菱鲆非特异性免疫力的影响. 大连水产学院学报, 2013, 28(2): 115-120
- 李明, 董晓慧. 中草药在水产养殖中的研究进展. 饲料研究, 2007(2): 56-58
- 李超, 张其中, 杨莹莹, 等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 534-540
- 吴旋, 白东清, 朱国霞, 等. 长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响. 动物营养学报, 2011, 23(5): 887-892
- 应军, 肖百全, 杨威, 等. 鸡血藤提取物对环磷酰胺致白细胞低下大鼠的影响. 中草药, 2011, 42(4): 752-755
- 张梅, 邱晓辉, 刘梅. 旱莲草中黄酮类成分的免疫调节作用. 中草药, 1997, 28(10): 615-615
- 张照红, 林旋, 张伟妮, 等. 复方中草药对奥尼罗非鱼血液非特异性免疫功能的影响. 水产科学, 2011, 30(1): 1-5
- 陈孝焯, 吴志新, 殷居易, 等. 大黄、穿心莲、板蓝根和金银花对异育银鲫免疫机能的影响. 中国水产科学, 2003, 10(1): 36-40
- 陈信忠, 苏亚玲, 龚艳清, 等. 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 5 种养殖石斑鱼的神经坏死病毒. 中国水产科学, 2004, 11(3): 202-207
- 陈晓燕, 胡超群, 陈偿, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定. 海洋科学, 2003, 27(6): 68-72
- 陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 135-144
- 赵晶晶, 陈成勋, 王庆奎, 等. 黄柏对点带石斑鱼生理生化指标的影响. 饲料工业, 2012, 33(6): 15-19
- 胡利平, 樊良卿, 杨锋, 等. 鸡血藤对小鼠 LAK、NK 细胞的影响. 浙江中医药大学学报, 1997, 21(6): 29-30
- 侯小涛, 戴航, 周江煜. 黄柏的药理研究进展. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 498-500
- 徐先栋, 谢珍玉, 欧阳吉隆, 等. 褐点石斑鱼脱鳞病原菌的分离与鉴定. 海洋科学, 2012, 36(2): 67-74
- 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性.

- 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 64-67
- 盛竹梅, 马志宏, 黄文, 等. 复方中草药对鲫鱼免疫力的影响. 四川农业大学学报, 2012, 30(4): 463-467
- 符影, 程悦, 陈建萍, 王冬梅. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234
- 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302
- 温周瑞, 刘慧集, 骆敏, 等. 中草药对水产动物免疫作用研究进展. 水利渔业, 2004, 24(2): 1-3
- 简纪常, 吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响. 大连水产学院学报, 2002, 17(2): 114-119
- 戴小连, Thawonsuwan J, 李宏, 等. 中药和泰药提取物对褐点石斑鱼的免疫效果. 海南大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 133-140
- Bairwa MK, Jakhar JK, Satyanarayana Y, *et al.* Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. J Nat Plant Resour, 2012, 2(3): 397-400
- Christybapita D, Divyagnaneswari M, Michael RD. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 23(4): 840-852
- Citarasu T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquacult Int, 2010, 18(3): 403-414

(编辑 冯小花)

## Rapid Screening of Chinese Herbal Immunostimulants for *Epinephelus fuscoguttatus*

SUN Xiaofei, GUO Weiliang, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, LI Fusheng, WANG Wenhui, ZHOU Yongcan<sup>①</sup>

(State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Biotic Resources, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228)

**Abstract** *Epinephelus fuscoguttatus* is a new culturing breed with great commercial values and broad market prospects. Frequent invasion of disease restricts the development of *E. fuscoguttatus* industry. With the characteristics of pollution-free, low-toxic, and low residuals, Chinese herbs as immunostimulants may be candidates for the prevention and control the diseases among *E. fuscoguttatus*. In this study, Chinese herbal immunostimulants were screened using nitroblue tetrazolium (NBT) reduction method by incubating the isolated white blood cell with water extracts from Chinese herbs. Water extracts from 39 kinds of 100 mg/ml Chinese herbs mixed with or without 5.0 mg/ml zymosan were utilized. Phagocytizing latex beads was employed to determine the effect of water extracts on the respiratory burst activity of the white blood cells on the phagocytic activity. The screened Chinese herbal immunostimulants were mixed with the feedstuff to feed *E. fuscoguttatus*. The results showed that 10 Chinese herbs extracts significantly increased the respiratory burst of white blood cells more than 15% compared to those in the control group. Three Chinese herbs extracts mixed with zymosan significantly increased the respiratory burst of white blood cells more than 70%. The water extracts from *Caulis spatholobi*, *Cortex phellodendri amurensis* and *Herba ecliptae prostratae* simultaneously elevated the respiratory burst and the phagocytic activity of white blood cell of *E. fuscoguttatus*. The *in vivo* experiments also demonstrated that the water extracts from *Caulis spatholobi*, *Cortex phellodendri amurensis* and *Herba ecliptae prostratae* significantly elevated the respiratory burst and the phagocytic activity of white blood cell and head kidney white cells of *E. fuscoguttatus*. In this study, 3 Chinese herbal immunostimulants were screened, which significantly enhanced the immune responses in *E. fuscoguttatus*. These results provide evidence to the development and application of new, safe and effective immunostimulants of *E. fuscoguttatus*.

**Key words** *Epinephelus fuscoguttatus*; Immunostimulant; Chinese herb; Respiratory burst activity; Phagocytic activity

① Corresponding author: ZHOU Yongcan, E-mail: zychnu@163.com

# 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)

## “黄海3号”新品种的培育\*



李健<sup>1①</sup> 何玉英<sup>1</sup> 王清印<sup>1</sup> 刘萍<sup>1</sup> 李吉涛<sup>1</sup> 王学忠<sup>2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司 昌邑 261300)

**摘要** 2006年收集中国对虾“黄海1号”保种群以及海州湾、莱州湾2个野生群体为基础群体构建核心育种群,采用群体选育技术以仔虾I期耐氨氮胁迫成活率和收获时对虾体重为选育指标,经过连续5代选育,培育出中国对虾“黄海3号”新品种。新品种耐氨氮胁迫能力强,仔虾I期成活率较商品苗种提高21.2%,养殖成活率提高15.2%;生长速度快,收获对虾平均体重较商品苗种提高11.8%。AFLP技术分析获得5代选育群体的平均多态位点比例分别为42.28%、40.64%、40.32%、39.95%和38.05%。研究结果显示,随着选育世代的增加,选育群体的遗传多样性呈现下降趋势,但随着选育时间的延长,世代之间的分化逐渐降低,群体的遗传结构开始趋于稳定。

**关键词** 中国对虾;群体选育;黄海3号;氨氮胁迫

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0061-06

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)又称东方对虾,俗称对虾、明虾,主要分布于黄渤海(包括朝鲜西岸),以及东海北部的嵎泗列岛和舟山群岛一带。自20世纪50年代我国就对中国对虾的繁殖和发育进行了研究,并开展了大规模的育苗和养殖技术研究。20世纪80年代以来,通过对虾养殖技术攻关,中国对虾养殖业开始大规模发展,到1991年养殖产量达20万t,成为我国最主要的对虾养殖品种。1993年由于受白斑综合征病毒(WSSV)病的重创,中国对虾养殖生产严重滑坡(王清印等,1998)。病害暴发的原因是多方面的,其中原因之一是由于当时养殖的中国对虾是未经选育的野生种,抗逆性差。自1997年开始,中国水产科学研究院黄海水产研究所先后选育出具有优良生长和抗病性状的中国对虾“黄海1号”(李健等,2005)和“黄海2号”(孔杰等,2012)新品种。

目前中国对虾的育种目标主要集中于生长和抗病两个性状,而对养殖环境胁迫引起的抗性育种研究

尚未开展。近年来由于渔业水域环境的恶化以及养殖自身有机污染物的积累引起的环境胁迫严重影响着中国对虾的生长。环境胁迫降低了中国对虾对养殖环境的适应性(Capy *et al*, 2000; Moullac *et al*, 2000),增加了对病原微生物的易感性。另外,环境胁迫可激活致病基因,使潜在的病原体引起疾病(Miller *et al*, 2005)。氨氮是对虾养殖环境中最主要的污染物质,在养殖水体中以离子氨(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)和非离子氨(NH<sub>3</sub>)两种形式存在。其中,非离子氨具有脂溶性,能穿透细胞膜毒害鳃组织,毒性是离子氨的300-400倍(Thurston *et al*, 1980)。水体中氨氮超过对虾耐受限度时,氨氮能直接损害对虾的鳃组织,使肾和肝组织结构发生病理变化,影响对虾的呼吸、代谢、神经、免疫、渗透调节、排泄及蜕皮和生长,导致对虾对病原微生物抵抗力的下降,严重时导致死亡(姜令绪等,2004;邱德全等,2008;梁俊平等,2012;Wickins, 1976;Chen *et al*, 1990; Racotta *et al*, 2000)。孙舰军等(1999)的研究结

\* 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)、山东省自主创新专项(2013CX80202)和国家自然科学基金项目(31172401)共同资助

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

收稿日期: 2014-04-01, 收修改稿日期: 2014-05-29



果表明,中国对虾养殖在 2.5 mg/L 氨氮水体中经 20 d 左右,其血细胞数量( $2.40 \times 10^5$ )显著低于养殖在氨氮含量为 0.4 mg/L 水体中对虾的血细胞数( $7.15 \times 10^5$ ),且对副溶血弧菌的易感性提高。Kleber 等(2009)的研究结果表明,当非离子氨浓度 $\geq 0.033$  mg/L 时,保罗美对虾头胸甲长和湿重降低,影响生长。Chen 等(1988)发现,在对虾集约化养殖过程中氨氮浓度可达 46 mg/L,严重超过了对虾的耐受程度,给对虾养殖业造成重大损失。因此,培育高产、抗逆的中国对虾新品种抵抗养殖环境带来的胁迫是当前水产种业主要任务之一。

本课题组自 2006 年采用群体选育技术开展了耐氨氮胁迫能力强的中国对虾新品种选育研究工作,经过连续 5 代的群体选育,获得我国第一个水产抗逆新品种——中国对虾“黄海 3 号”,并于 2013 年通过全国水产原种和良种审定委员会审定(品种登记号:GS-01-002-2013)。

## 1 材料与方法

### 1.1 基础群体的组建

2006 年 3 月收集了昌邑(CY)、唐海(HB)和日照(RZ) 3 个不同地区的中国对虾“黄海 1 号”保种群体亲虾 3200 尾、海洲湾(HZ)海区亲虾 1520 尾以及莱州湾(LZ)海区亲虾 1360 尾,共计 6080 尾亲虾组建基础群体。

### 1.2 氨氮胁迫实验及核心育种群的组建

对收集的基础群体单独进行育苗,每个基础群体对 15 批次(每一批次 10 万尾)以上的仔虾 I 期进行氨氮胁迫实验,实验氨氮浓度采用 64 mg/L。氨氮胁迫后从每个基础群体的存活个体中随机取 8–10 万尾仔虾放入室外的围隔中单独养殖,统一投喂和日常管理,尽量降低养殖环境影响。秋天收获后,以体重为指标,从每个养殖群体挑选 1000–1500 尾亲虾进行留种,混合组建核心育种群。

### 1.3 中国对虾“黄海 3 号”的群体选育

对构建的核心育种群进行群体内闭锁繁育,在选育过程中,每年以仔虾 I 期耐氨氮胁迫成活率和收获时对虾体重(年留种率控制在 3%–5%,约 5000 尾亲虾)为选育指标对核心育种群进行 2 次选择。对照群体采用当地野生商品苗种,用于评估群体选育进展。

### 1.4 新品种与商品苗种的生产性对比实验

为评估选育效果,于 2012–2013 年在日照开航水产有限公司进行了中国对虾“黄海 3 号”的生产性对比单养实验,每个池塘面积 3.96 hm<sup>2</sup>,新品种与对照各放养 5 个池塘。对照分别采用当地野生商品苗种和中国对虾“黄海 1 号”苗种,养殖密度均为 10 尾/m<sup>2</sup>。前期投喂丰年虫成体,中、后期投喂鲜活蓝蛤、杂鱼等。收获时随机测量 100 尾中国对虾的体重,统计成活率。

### 1.5 新品种不同选育世代的遗传多样性检测

利用 6 对 AFLP 引物组合检测了中国对虾“黄海 3 号”连续 5 代选育群体的遗传结构,计算了选育世代群体间的遗传相似系数和遗传距离。

## 2 结果

### 2.1 中国对虾“黄海 3 号”群体选育结果

采用群体选育技术对构建的核心育种群体进行连续 5 代的选育,在选育过程中每年统计核心育种群仔虾 I 期耐氨氮胁迫成活率、收获时成活率及收获时的平均体重(表 1),用于估计选育效果。对照群体采用当地野生亲虾培育的商品苗种。

经过连续 5 代的群体选育,中国对虾“黄海 3 号”仔虾 I 期氨氮胁迫后成活率较商品苗种提高 21.2%,养殖成活率提高 15.2%,收获对虾平均体重较商品苗种提高 11.8%。

### 2.2 生产性对比实验结果

2012–2013 年对新品种进行了生产性对比养殖实验,放苗时间分布为 2012 年 4 月 6 日和 2013 年 4 月 10 日,收获时间分别为当年的 10 月 19–20 日,实验结果见表 2 和表 3。

从表 2 中可以得知,在相同养殖条件下,2012 年中国对虾“黄海 3 号”新品种体重较“黄海 1 号”苗种降低 3.00%,成活率提高 12.5%,养殖产量提高 8.69%;2013 年中国对虾“黄海 3 号”新品种体重较“黄海 1 号”苗种降低 1.2%,成活率提高 15.2%,养殖产量提高 13.79%。

在相同养殖条件下,2012 年中国对虾“黄海 3 号”新品种体重较野生商品苗种提高 10.40%,成活率提高 13.9%,养殖亩产量提高 25.78%;2013 年中国对虾“黄海 3 号”新品种体重较野生商品苗种提高 13.3%,成活率提高 16.3%,养殖产量提高 31.72%。

表 1 中国对虾“黄海 3 号”群体选育结果  
Tab.1 Comparison of traits between “Huanghai No.3” and commercial seedlings

年 Year	仔虾 I 期成活率			养殖成活率			平均收获后体重		
	Survival rate of post-larvae I (%)			Survival rate of farming (%)			Average body weight after harvest(g)		
	黄海 3 号 Huanghai No.3	对照 Control	提高值 Increased value (%)	黄海 3 号 Huanghai No.3	对照 Control	提高值 Increased value(%)	黄海 3 号 Huanghai No.3	对照 Control	提高值 Increased value(%)
2007	31.2	29.9	4.3	30.2	29.2	3.5	32.33	30.42	6.3
2008	29.8	30.2	-1.3	28.8	29.0	-0.7	33.67	31.02	8.5
2009	31.8	28.6	11.2	33.0	30.6	7.8	34.62	31.35	10.4
2010	37.2	32.9	13.1	35.5	31.3	13.4	35.10	31.53	11.3
2011	42.8	35.3	21.2	36.3	31.5	15.2	35.50	31.76	11.8

表 2 中国对虾“黄海 3 号”与“黄海 1 号”生产性对比养殖实验统计结果  
Tab.2 Comparison of harvest results between “Huanghai No.3” and “Huanghai No.1”

性状 Traits	2012			2013		
	黄海 3 号 Huanghai No.3	黄海 1 号 Huanghai No.1	提高值 Increased value(%)	黄海 3 号 Huanghai No.3	黄海 1 号 Huanghai No.1	提高值 Increased value (%)
平均收获体重 Average body weight after harvest (g)	34.26	35.46	-3.00	35.52	35.95	-1.2
成活率 Survival rate (%)	35.1	31.2	12.5	37.2	32.3	15.2
养殖产量 Farming yield (kg/hm <sup>2</sup> )	1082.25	995.7	8.69	1189.2	1045.05	13.79

表 3 中国对虾“黄海 3 号”与野生对照生产性对比养殖实验统计结果  
Tab.3 Comparison of harvest results between “Huanghai No.3” and wild seedlings

性状 Traits	2012			2013		
	黄海 3 号 Huanghai No.3	野生对照 Wild seedlings	提高值 Increased value(%)	黄海 3 号 Huanghai No.3	野生对照 Wild seedlings	提高值 Increased value(%)
平均个体体重 Average body weight after harvest (g)	34.26	31.04	10.40	35.52	31.35	13.3
成活率 Survival rate (%)	35.1	30.8	13.9	37.2	32.0	16.3
养殖亩产量 Farming yield(kg/hm <sup>2</sup> )	1082.25	860.4	25.78	1189.2	902.85	31.72

“黄海 3 号”新品种在生产性能上较野生商品苗种具明显优势(表 3)。

### 2.3 中国对虾“黄海 3 号”不同选育世代的遗传稳定性分析

利用 6 对 AFLP 引物组合检测了中国对虾“黄海 3 号”连续五代选育群体的遗传结构, 计算了选育世代群体间的遗传相似系数和遗传距离。结果表明, 5 代选育群体的平均多态位点比例分别为 42.28%、40.64%、40.32%、39.95%和 38.05%(表 4), 有 89.13% 是来源于群体内, 有 10.87% 是来源于群体间。随着选

育世代的增加, 选育群体的遗传多样性呈现下降趋势, 但随着选育时间的延长, 世代之间的分化逐渐降低, 群体的遗传结构开始趋于稳定。

### 3 讨论

种业作为水产养殖业发展的第一产业要素, 是确保水产品有效供给的重要物质基础。发达国家养殖业发展经验表明, 新品种是推动养殖产品产量和质量大幅提高的主要因素之一。美国是世界上最早开展对虾遗传改良和选择育种研究的国家, 由美国农业部支持的“海产对虾养殖计划”从 1989 年开始研究和培育凡

表4 6个引物对的总扩增位点数及多态位点数  
Tab.4 Polymorphic loci/Total loci number from 6 AFLP primer set

引物对 Primer set	多态位点数/总位点数 Polymorphic loci/Total loci number				
	G1	G2	G3	G4	G5
EM1	35/74	29/61	25/72	28/59	26/57
EM2	31/69	33/74	29/70	33/74	30/72
EM3	26/66	29/69	27/61	28/68	26/66
EM4	29/77	26/78	23/62	24/79	23/77
EM5	34/59	18/56	18/45	15/53	14/52
EM6	23/76	30/68	30/67	31/67	29/65
总和 Total	178/421	165/406	152/377	159/398	148/389
多态位点比例 Percentage of polymorphic loci(%)	42.28	40.64	40.32	39.95	38.05

纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的“无特异病原虾(SPF)”,选育的主要性状是生长和抗 TSV 性状,经过选育使凡纳滨对虾的生长速度提高了 21.00%,而抗 TSV 性状提高了 18.40%,有效地减轻了对虾病毒病的发生(Argue *et al.*, 2002)。Moss 等(2012)已完成 15 代的抗 TSV 的选育,并且找到了几个 TSV 攻毒后成活率在 65%–100%的家系,通过选育在养殖生产过程中 TSV 不再作为一种严重的病害来对待。美国高健康养殖公司通过对凡纳滨对虾抗 TSV 性状的选育,每代成活率增加 15.00%,经过连续 4 代选择,存活率可达到 92%–100%,而对照组的存活率只有 31.00%,对生长速度的选择已使凡纳滨对虾个体体重达到 22–25 g,这表明选择育种可明显改进养殖对虾的生长表现(Wyban, 2000)。Donato 等(2005)通过对凡纳滨对虾委内瑞拉系大规模选育的 11 代(1990–2001)产量记录进行分析发现产量相关参数得到了显著增长:年平均存活率从 59%增至 76%,生长速率从 0.76 增至 0.87 g/周,饲料转换率(FCR)从 1.86:1 增至 1.51:1,产量从 1.20 增至 2.10 t/hm<sup>2</sup>,畸形率从 29.00%降至 1.00%,终重的变异系数从 19.70%降至 11.60%。Hetzl 等(2000)报道了经过一代选育,日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)生长性状的平均选择反应增加了 10.7%。Goyard 等(1999)报道了细脚滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)经过 4 代和 5 代选育后,其生长性状分别较未选育对虾提高 18%和 21%。这些研究均表明了选择育种在对虾中是切实可行的,尤其是在低选择强度(29%)的群体中。

与国外相比,我国对虾育种工作开展得较晚。

1997 年中国水产科学研究院黄海水产研究所首次采用“大群体、多群组、高强度”选育方法进行了中国对虾快速生长新品种的选育工作,并于 2003 年获得我国第一个人工培育的海水养殖动物新品种——中国对虾“黄海 1 号”,体长较对照组平均增长 8.40%,体重平均增长 26.86%;养殖成功率超过 90%,而未经选育的对照池养殖成功率不足 70%,显示了良好的选育前景(李健等, 2005)。随后在国家“863”、国家科技支撑计划等项目的支持下,水产育种工作获得蓬勃发展,相继培育出“科海 1 号”、“中兴 1 号”、“中科 1 号”、“桂海 1 号”4 个凡纳滨对虾新品种(邓伟等, 2013),中国对虾“黄海 2 号”(孔杰等, 2012)以及斑节对虾“南海 1 号”新品种等等,为我国对虾养殖业的可持续发展提供了重要的种质保障,在一定程度上带动了我国对虾养殖产业的发展。

目前在高投入、高产出的对虾养殖模式中大量投饵、施肥使池塘中含氮有机废物数量增加,以及因放养密度大,生物代谢旺盛,排泄废物氨的数量增多,致使氨在水中积累严重超过了对虾的耐受程度,而使对虾生长缓慢,适应性下降,对病的易感性增加,严重时可导致对虾的大规模死亡。针对上述问题,本课题组收集中国对虾“黄海 1 号”保种群,以及海洲湾、莱州湾两个野生群体亲虾组建基础群体,通过每年对核心育种群的两次选择,经过连续 5 代的群体选育,培育出中国对虾“黄海 3 号”新品种,耐氨氮胁迫能力强,仔虾 I 期成活率提高 21.2%,可显著提高对养殖水体环境变化的适应力;生长速度快,收获对虾平均体重较野生商品苗种提高 11.8%,规格整齐;养殖成活率高,池塘养殖成活率提高 15.2%,池塘连片养殖成功率达 90%。自 2010 年以来中国对虾“黄海 3 号”逐渐辐射推广到山东、河北、辽宁、天津和江苏连云港等沿海地区,合计推广养殖面积 3000 hm<sup>2</sup>以上,平均亩产量提高 21.00%。

目前,还需要深入弄清养殖过程中中国对虾如何适应和抵抗环境因子带来的各种胁迫和不良刺激以及其适应机制,为抗逆新品种的选育提供基础依据。

## 参 考 文 献

- 王清印, 李健. 从持续发展角度展望对虾养殖业的发展趋势. 现代渔业信息, 1998, 13(3): 1–7
- 邓伟, 黄太寿, 张振东. 我国南美白对虾种业发展现状及对策建议. 中国水产, 2013, 12: 22–25
- 孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海 2 号”的培育. 水产学报, 2012, 36(12): 1854–1862
- 李健, 刘萍, 何玉英, 等. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1

- 号”的人工选育. 水产学报, 2005, 29(1): 1-5
- 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272
- 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455-461
- 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537-541
- 梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验. 水产科学, 2012, 31(9): 526-529
- Argue BJ, Arce SM, Lotz JM, *et al.* Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*, 2002, 204: 447-460
- Capy P, Gasperi G, Biemont C. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites. *Heredity*, 2000, 85(2): 101-106
- Chen JC, Liu PC, Lei SC. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture*, 1990, 89(2): 127-137
- Chen JC, Liu PC, Lin YT. Super intensive culture of red-tail shrimp *Penaeus penicillatus*. *J Word Aquacul Soc*, 1988, 19: 127-131
- Donato MD, Manrique R, Ramirez R, *et al.* Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* in Venezuela. *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 159-167
- Goyard E, Patrois J, Reignon JM, *et al.* IFREMER's shrimp genetics program. *Global Aquacult Advocate*, 1999, 2(6): 26-28
- Hetzel DJS, Crocos PJ, Davis GP, *et al.* Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicas*. *Aquaculture*, 2000, 181: 215-223
- Jim W. Breeding shrimp for fast growth and virus resistance. *The Advocate*, 2000, 3(6): 32-33
- Keleber CM, Grasiela LLP, Wilson WJ. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp Biochem Physiol, Part C*, 2009: 377-382
- Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 2000, 191: 121-131
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Rev Microbiol*, 2005, 3(1): 36-46
- Racotta IS, Hernandez-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp Biochem Physiol, Part A*, 2000, 125: 437-443
- Shaun MM, Dustin RM, Steve MA, *et al.* The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *J Invertebrate Pathol*, 2012, 110: 247-250
- Thurston RV. Some factor affecting the toxicity of ammonia to fishes. *EPA Ecol Res*, 1980, 118-137
- Wickins JF. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*, 1976, 9: 19-37

(编辑 江润林)

## Selective Breeding of Fast-Growing and Ammonia Toxicity-Resistant Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

LI Jian<sup>1</sup>①, HE Yuying<sup>1</sup>, WANG Qingyin<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LI Jitao<sup>1</sup>, WANG Xuezhong<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Haifeng Aquaculture co., Ltd, Changyi 261300)

**Abstract** Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) is one of the most commonly farmed species in China since the 1970s. However, the pond survival and the total output of *F. chinensis* have been low because of the deteriorated pond environment and other factors. Ammonia, as undissociated for (NH<sub>3</sub>), is one of the most toxic substances produced during intensive shrimp farming and may reach concentrations high enough to seriously damage the health and growth of *F. chinensis*. To address this issue we collected wild samples of conserved “Huanghai No.1” from two geographical populations in the Haizhou bay and the Laizhou bay for the construction of fundamental stock in 2006. Mass selection was applied to obtain the characteristics of fast growth and high resistance to ammonia at concentrations between 3% and 5%. Five generations, namely “Huanghai No.3”, were selected successively and approved by China National Aquaculture Variety Approval Committee. “Huanghai No.3” displayed traits such as stress tolerance and fast growth. Under the same cultivation conditions, the survival rate of Post-larvae I increased by 21.2%, the survival rate increased by 15.2%, and the average body weight after harvest increased by 11.8%. The proportions of polymorphic loci were 42.28%, 40.64%, 40.32%, 39.95% and 38.05% in the five selective populations respectively, which implied the reduced genetic diversity. However, in later selected generations, there were fewer differences between populations and the genetic structure became more stable. Compared to “Huanghai No.1”, the average body weight and the survival rate of “Huanghai No.3” increased by 2.1% and 13.85% respectively. Compared to the wild seedings, the average body weight and the survival rate increased by 11.85% and 15.1% respectively. These results showed obvious improvement in the production. To the date, the pioneer scale to grow the new strain of “Huanghai No.3” has reached 400 hectares in the coastal areas of northern Jiangsu province since 2009.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Mass selection; Huanghai No.3; Ammonia stress

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

# 采用 OIE 标准检测养殖对虾中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的 PCR 检出类型\*



袁颜颜<sup>1,2</sup> 杨冰<sup>1,2①</sup> 万晓媛<sup>1</sup> 刘笋<sup>1</sup> 刘天齐<sup>1</sup> 黄捷<sup>1</sup>

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

**摘要** 利用世界动物卫生组织(OIE)推荐的4对引物(389F/R、392F/R、77012F/77353R和309F/R),通过普通PCR方法,对本实验室2011-2012年采集于国内不同地区的对虾样品进行IHHNV(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)检测,并对国内存在的IHHNV检出类型进行初步分析。检测结果显示,在凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾中均检测出了IHHNV,而在脊尾白对虾中未检出。其中凡纳滨对虾阳性率最高,中国对虾阳性检测率最低。对虾样品2011年阳性率高于2012年,华东地区高于华北、华南两地。此外,根据4对引物的检测结果,得到国内IHHNV的4种PCR检出类型。

**关键词** 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV); PCR; OIE标准; 对虾

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0067-07

传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)于1981年在美国夏威夷地区的细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中被发现,危害全球对虾养殖业,世界动物卫生组织(OIE)将其收录为需要通报的甲壳类重要疫病之一(OIE, 2012)。IHHNV能够感染多种对虾,尤其对幼虾危害明显(Kalagayan *et al*, 1991)。细角滨对虾对IHHNV有较高的致病性,感染死亡率可达100%(Lightner *et al*, 1983a、b),该病毒可使凡纳滨对虾(*L. vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)患慢性矮小残缺综合征(Runt deformity syndrome, RDS)(Kalagayan *et al*, 1991; Chayaburakul *et al*, 2004; Primavera *et al*, 2000; Bell *et al*, 1984)。

IHHNV是已知对虾病毒中最小的病毒,病毒粒子大小在20-22 nm之间,基因组序列长约4.1 kb,隶属细小病毒科(Bonami *et al*, 1990)。核酸为单链线性DNA,主要以负链的形式存在(Mari *et al*, 1993)。目前,GenBank已收录部分IHHNV地理株基因组序

列,包括了所有编码序列和大部分非编码序列,尚缺少两末端非编码序列。地理株分布于美国(GenBank: AF218266、AF273215)、中国(GenBank: AY355306、AY355307、AY355308、EF633688、JX258653)、越南(GenBank: JN616415、KC513422、JX840067)、澳大利亚(GenBank: GQ475529)、厄瓜多尔(GenBank: AY362548)、韩国(GenBank: JN377975)、泰国(GenBank: AY102034)和印度(GenBank: GQ411199)等地。

IHHNV基因型分为感染型和非感染型两种,其中感染型包括1型和2型;非感染型包括3A和3B型(Tang *et al*, 2002、2003)。1型分布于美国和东亚,主要是菲律宾;2型分布于东南亚;3A型分布于东非、印度和澳大利亚;3B型分布于印度太平洋地区包括马达加斯加、毛里求斯和坦桑尼亚(Tang *et al*, 2006、2003)。1型和2型可感染凡纳滨对虾和斑节对虾,3A型在非洲养殖斑节对虾中被发现了2个病毒镶嵌片段(Tang *et al*, 2003),后被发现于马达加斯加和

\* 国家自然科学基金(31101935)、中央级公益性科研业务费专项资金(20603022011009)、国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)和“泰山学者”建设工程专项经费共同资助。袁颜颜, E-mail: yyshzbd@126.com

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

收稿日期: 2014-03-19, 收修改稿日期: 2014-04-10

澳大利亚的斑节对虾样品中(Krabsetsve *et al*, 2004); 3B 发现于坦桑尼亚的斑节对虾样品中(Tang *et al*, 2006、2007)。Saksmerprome 等(2010)通过设计重叠引物用于扩增 IHNV 完整基因组片段, 支持了 IHNV 部分基因片段镶嵌于对虾基因当中的假设。Tang 等(2006)证实了嵌入片段(3A 和 3B)并非来源于感染性病毒, 其中 3A 是斑节对虾基因组的一部分, 对对虾没有感染性。

本研究采用 OIE 标准推荐的 4 对引物对我国近年来养殖对虾感染 IHNV 情况进行筛查, 确定病毒感染类型, 以期为该病在我国的流行病学研究和疫情监测提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 对虾及病毒样品

待检样品为 2011–2012 年间在沿海主要对虾养殖地区采集的养殖对虾仔虾、幼虾、成虾及亲虾样品。IHNV DNA 为本实验室提供。

### 1.2 试剂与材料

根据 OIE 《水生动物疾病诊断手册》(2012 版)第

2.2.2 章(OIE, 2012)的 IHNV 诊断标准中推荐的 5 对引物(表 1), 由上海生工生物工程有限公司合成。

其中, 引物对 389F/389R、309F/309R 和 392F/392R 设计于 IHNV 非结构蛋白编码区(ORF1)序列, 77012F/77353R 设计于结构蛋白和非结构蛋白(衣壳蛋白)之间区域序列(图 1), 引物对 MG831F/MG831R 设计于 IHNV 嵌入斑节对虾基因组的相应序列。

### 1.3 DNA 的提取

亲虾、成虾和幼虾样品取鳃丝, 仔虾样品取头胸部或个体, 样品重量约 25–50 mg, 按照 DNA 提取试剂盒(Tiangen 公司)说明书提取 DNA。

### 1.4 PCR

25  $\mu$ l 反应体系中包含: 10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, 2.5 mmol/L dNTP 4.0  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l 正向检测引物 0.75  $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l 反向检测引物 0.75  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司) 0.25  $\mu$ l, 样品模板 0.5  $\mu$ l。针对每一对引物的反应体系按多个样品配置后分装, 每管分别加入模板后离心去气泡, 放入 PCR 仪进行 PCR 反应。PCR 扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。1.5%琼

表 1 OIE 推荐 IHNV 引物信息  
Tab.1 IHNV primers recommended by OIE

引物 Primers	产物 Product (bp)	序列 Sequence (5'-3')	G+C (%)	温度 Temperature( $^{\circ}$ C)	GenBank 或 参考文献 Reference
389F	389	CGGAACACAACCCGACTTTA	50	72	AF218266
389R		GGCCAAGACCAAATACGAA	45	71	Tang <i>et al</i> , 2000
77012F	356	ATCGGTGCACTACTCGGA	50	68	AF218266
77353R		TCGTACTGGCTGTTTCATC	55	63	Nunan <i>et al</i> , 2000
392F	392	GGGCGAACCAGAATCACTTA	50	68	AF218266
392R		ATCCGGAGGAATCTGATGTG	50	71	Tang <i>et al</i> , 2000、2007
309F	309	TCCAACACTTAGTCAAAACCAA	36	68	AF218266
309R		TGTCTGCTACGATGATTATCCA	40	69	Tang <i>et al</i> , 2007
MG831F	831	TTGGGGATGCAGCAATATCT	45	58	DQ228358
MG831R		GTCCATCCACTGATCGGACT	55	62	Tang <i>et al</i> , 2007

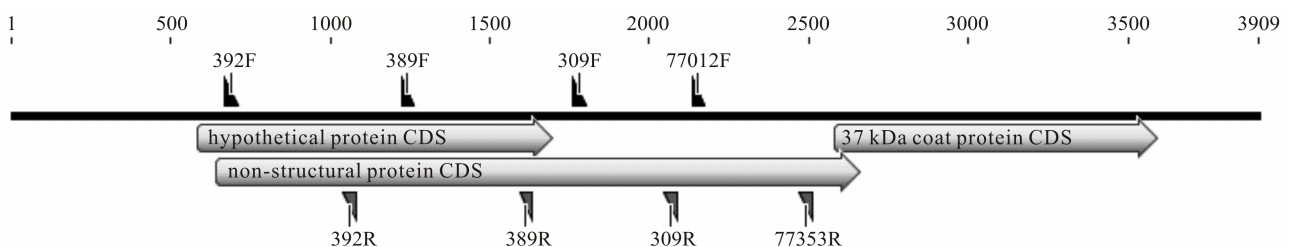


图 1 检测 IHNV 的 OIE 方法的引物在基因组上的分布示意  
Fig.1 Genome distribution diagram of OIE primers for IHNV detection

脂糖凝胶电泳观察检测结果。

### 1.5 测序反应

将各对 PCR 引物反应结果显示强阳性条带的样品扩增产物切胶回收(Zymo Research 公司), 由上海桑尼生物科技有限公司测序。

## 2 结果

### 2.1 检测 IHHNV 的各对引物的 PCR 产物特征

引物对 389F/389R 的扩增反应电泳见图 2-A, PCR 产物大小 389 bp; 引物对 77012F/77353R 的扩增反应电泳见图 2-B, PCR 产物大小 356 bp; 引物对 392F/392R 的扩增反应电泳见图 2-C, PCR 产物大小 392 bp; 引物对 309F/309R 的扩增反应电泳见图 2-D,

PCR 产物大小 309 bp。各引物对含有大量对虾基因组 DNA 的实际样品检测时, 均能产生 IHHNV 的特异产物条带, 没有非特异性杂带的出现, 表明各引物具有较好的特异性。检测引物 MG831F/MG831R 对部分样品进行检测结果显示出特异性较差、非特异性扩增的情况, 因此未将此对引物作为基因型筛查的推荐引物(图 3)。

### 2.2 IHHNV 各对引物的 PCR 产物测序及其与现有序列的比对

将 4 对引物 PCR 产物的测序结果进行 BLAST 比对, 其中 389F/389R 扩增片段序列与中国江苏地理株 JX258653 和 DQ228358 相应序列同源性达到 100%, 与夏威夷地理株同源性为 99%。309F/309R 扩增片段与越南地理株 JX840067、中国福建地理株 EF633688、中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、厄瓜多尔

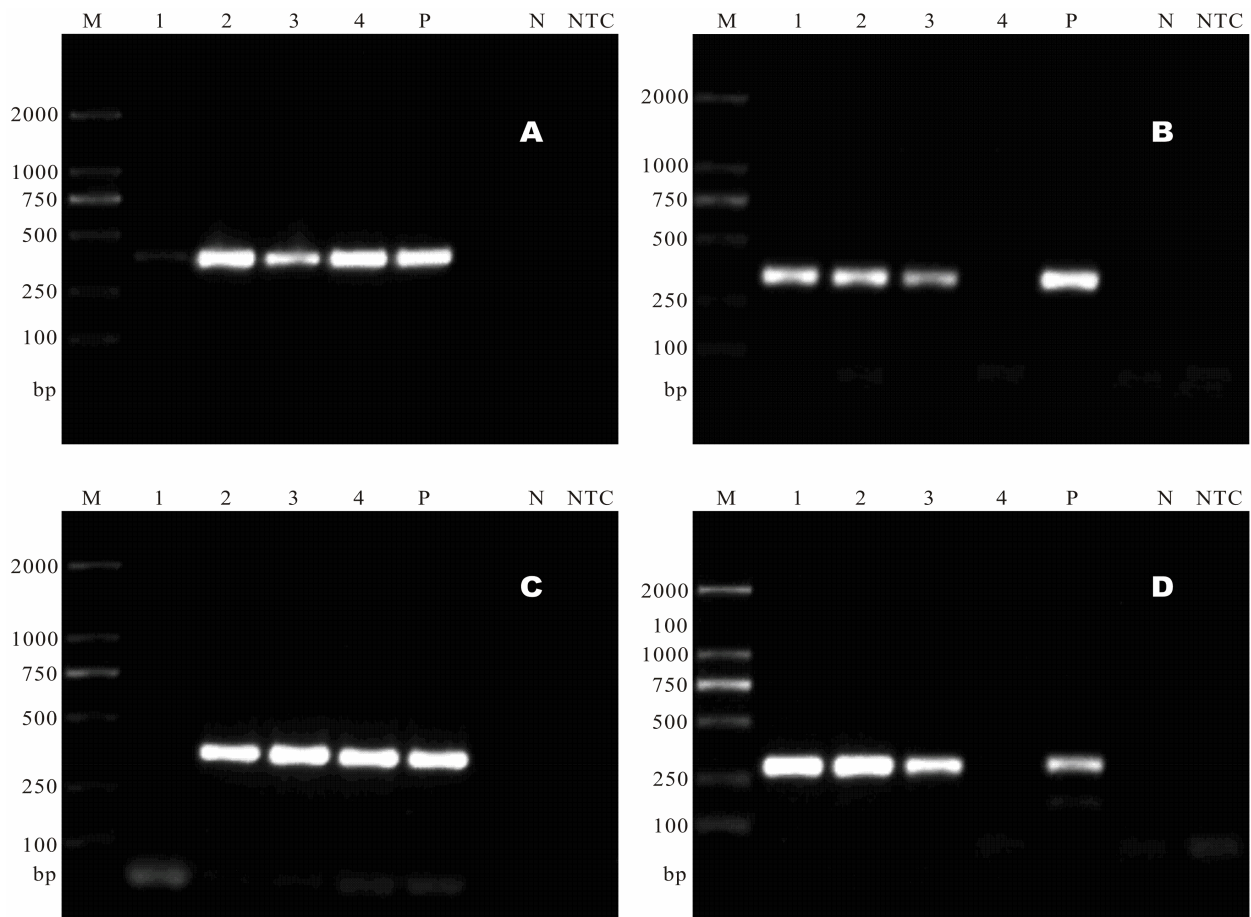


图 2 部分对虾样品的 PCR 检测结果

Fig.2 PCR detection results for partial shrimp samples

A: 引物 389F/389R 的 PCR; B: 引物 77012F/77353R 的 PCR; C: 引物 392F/392R 的 PCR; D: 引物 309F/309R 的 PCR;

M: DL2000 DNA 分子标准; 1-4: 4 份检测样品; P: 阳性对照; N: 阴性对照; NTC: 空白对照

A: PCR with primers 389F/389R; B: PCR with primers 77012F/77353R; C: PCR with primers 392F/392R; D: PCR with primers 309F/309R; M: DL2000DNA Ladder; 1-4: Four samples; P: Positive control; N: Negative control; NTC: No template control



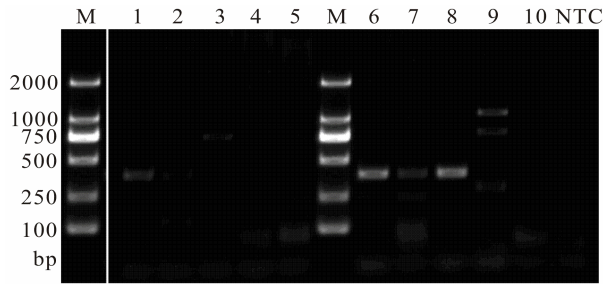


图3 对虾样品的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR detection results for partial shrimp samples

M: DL2000 DNA 分子标准; 1-10: 10 份检测样品;

NTC: 空白对照

M: DL2000DNA Ladder; 1-10: Ten samples; NTC: No template control

地理株 AY362548.1 相应序列同源率为 100%，与夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。77012F/77353R 扩增片段序列与韩国地理株 JN377975、厄瓜多尔地理株 AY362548、中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、加利福尼亚地理株 AF273215 同源率是 100%，与夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。392F/R 扩增片段序列与中国台湾地理株 AY355306 与 AY355308、福建地理株 EF633688、夏威夷地理株 AF218266 同源率为 99%。

### 2.3 IHNV 各对引物检测实际样品的阳性率

收集了 2011 和 2012 年来自全国的 143 份不同生长阶段的样品，其中 91 份凡纳滨对虾、36 份中国对虾、12 份斑节对虾、2 份宽沟对虾，2 份脊尾白虾。经 IHNV 各对 PCR 引物的检测显示，凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾均检测出 IHNV 阳性，脊尾对虾为阴性。2011-2012 年凡纳滨对虾 IHNV、不同虾种 IHNV 及不同区域 IHNV 不同检出类型情况分别见表 2、表 3、表 4。此外还对本实验室采集的少许蟹类(近方蟹、天津厚蟹和三疣梭子蟹)和浮游生物进行检测，但未检出阳性结果。

### 2.4 样品中 IHNV 的不同检测类型

4 对引物对 143 份对虾样品的 IHNV 检测，得到 49 份为阳性的结果，这些结果表现为 4 种检测结果(表 5)。其中类型 I，4 种引物 PCR 结果全为阳性的比例为 90%；类型 II，只有引物对 389F/390R 的 PCR 结果全为阳性的比例为 4%；类型 III，除 77012F/77353R 全为阳性的比例为 4%；类型 IV，389F/389R 和 309F/309R 为阳性的比例为 2%。389F/389R 在所有阳性样品中一直都能检出阳性结果，以此作为 100%的诊断灵敏度，309F/309R、392F/392R、77012F/77353R 的

表 2 2011-2012 年凡纳滨对虾 IHNV 不同检出类型情况  
Tab.2 Detected types of IHNV in *L. vannamei* during 2011-2012

年份 Year	样品品种 Sample species	样品总数 Sample number	389F/389R 阳性 Positive	392F/392R 阳性 Positive	77012F/77353R 阳性 Positive	309F/309R 阳性 Positive
2011	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	24	17(70.8%)	17(70.8%)	17(70.8%)	17(70.8%)
2012	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	67	23(34.3%)	21(31.3%)	19(28.4%)	24(35.8%)

表 3 不同虾种中 IHNV 的不同检出类型情况  
Tab.3 Detected types of IHNV in different shrimp species

样品品种 Sample species	样品总数 Sample number	389F/389R 阳性 Positive	392F/392R 阳性 Positive	77012F/77353R 阳性 Positive	309F/309R 阳性 Positive
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	91	40(44.0%)	40(44.0%)	40(44.0%)	40(44.0%)
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	12	5(41.7%)	5(41.7%)	5(41.7%)	5(41.7%)
中国对虾 <i>F. chinensis</i>	36	3(8.3%)	3(8.3%)	3(8.3%)	3(8.3%)
宽沟对虾 <i>M. latisulcatus</i>	2	1	1	1	1
脊尾白虾 <i>P. carincauda</i>	2	0	0	0	0

表 4 不同区域 IHNV 的不同检出类型情况  
Tab.4 Detected types of IHNV in different regions

采集区域 Collection region	样品总数 Sample number	389F/389R 阳性 Positive	392F/392R 阳性 Positive	77012F/77353R 阳性 Positive	309F/309R 阳性 Positive
华东 East China	88	32(36.4%)	30(34.1%)	28(31.8%)	30(34.1%)
华南 South China	34	13(38.2%)	12(35.3%)	12(35.3%)	13(38.2%)
华北 North China	21	3(14.3%)	4(19.0%)	4(19.0%)	4(19.0%)

表 5 不同引物对 IHHNV 的 PCR 检出类型  
Tab.5 PCR detected types of IHHNV using different primer pairs

检出类型 Detected type	392F/392R	389F/389R	309F/309R	77012F/77353R	阳性数 Positives	检测类型所占比例 Proportion of detection type(%)
I	+	+	+	+	44	90.0
II	-	+	-	-	2	4.1
III	+	+	+	-	2	4.1
IV	-	+	+	-	1	2.0
诊断灵敏度 Diagnostic sensitivity(%)	91.8	100	95.9	90.0	-	-

诊断灵敏度分别为 95.9%、91.8%和 90.0%。根据 4 对引物的检测类型的不同可知, 类型 I、III、IV 因引物 309F/309R 为阳性, 属于感染型, 而类型 II 只有 389F/389R 为阳性, 无法确定属于哪种类型。

### 3 讨论

OIE 所推荐的 4 对引物分别用于检测 IHHNV 两种基因型, 其中 389F/389R 和 392F/392R 设计于非结构蛋白编码区 NS-1, 可以检测感染型和非感染型 IHHNV(Tang *et al.*, 2002、2003; Krabsetsve *et al.*, 2004; Chayaburakul *et al.*, 2005); 309F/309R 设计于左侧 ORF 区域, 该对引物和 3A 和 3B 型有 8 个(36%)和 4 个(18%)错配, 只能检测感染型 IHHNV(Tang *et al.*, 2007); 引物 77012F/77353R 来自于 IHHNV 结构蛋白编码区和非结构蛋白编码区之间(OIE, 2012)。使用 4 对引物对 2011 年和 2012 年本实验室采集的对虾样品进行 IHHNV 检测, 初步获得了 4 种检测类型。推测可能与检测技术灵敏度、基因片段随机嵌入、引物自身特异性等有关。

根据 4 对引物 PCR 产物电泳和测序结果可知, 该 4 对引物的扩增产物特异性好, 没有非特异性杂带, 产物序列也很少有突变。表明 4 对检测引物的可靠性, 可排除因引物自身特异性导致的不同检测结果的产生。但在检测过程中, 4 对引物对同一样品进行不同次的检测时会出现不同结果的现象, 说明部分引物在检测弱阳性样品时的重复性较差。本研究在使用引物 MG831F/MG831R 检测 IHHNV 嵌入型的过程中发现该引物特异性较差, 非特异性扩增较普遍, 因此没有将该对引物作为基因型筛查的参考引物。

已报道的试验数据(Chayaburakul *et al.*, 2005)和用覆盖几乎所有 IHHNV 基因组的重叠引物对样品进行 PCR 检测的方法(Saksmerprome *et al.*, 2011)证实, 不同对虾对 IHHNV 具有不同的免疫能力, 且任意长度和数量的 IHHNV 基因片段普遍会镶嵌于斑节对虾基因组中, 凡纳滨对虾等种类感染的 IHHNV 则还没

有类似的片段插入的报道。本研究出现的不同检出类型的 II、III 和 IV 是否也有可能是这种插入的情况所致还需深入研究。

不同地区野生和养殖对虾的带毒率各不相同, 在 0-100%之间(Covarrubias *et al.*, 1999; Motte *et al.*, 2003; Nunan *et al.*, 2001; Pantoja *et al.*, 1999)。引物 389F/389R 也是 IHHNV 的 PCR 检测方法的国家标准中采用的引物(黄健等, 2010), 且本实验室已通过感染实验证实 309F/309R 引物阳性的样品可通过投喂方式感染健康凡纳滨对虾。杨冰等(2005)检测卤虫、轮虫、桡足类、沙蚕以及绒螯近方蟹等对虾养殖饵料和环境生物, 其中绒螯近方蟹检出了 IHHNV。本研究对采集的少量蟹类和浮游生物也进行了 IHHNV 的检测, 尚未得到阳性结果; 检测的养殖对虾中, 凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、宽沟对虾不同程度地检测出了 IHHNV 阳性, 而脊尾白虾未发现感染情况。本检测结果表明, IHHNV 在国内养殖对虾中已较普遍地感染, 且在华东和华南地区形成了一定的流行趋势。

### 参 考 文 献

- 杨冰, 宋晓玲, 黄健, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的流行病学与检测技术研究进展. 中国水产科学, 2005, 12(4): 519-524
- 黄健, 杨冰, 朱泽闻, 等. 中华人民共和国国家标准 GB/T 25878-2010-对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)检测 PCR 法
- Bell TA, Lightner DV. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1984, 38(3): 185-194
- Bonami JR, Trumper B, Mari J, *et al.* Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J Gen Virol*, 1990, 71(11): 2657-2664
- Chayaburakul K, Lightner DV, Sriurairattana S, *et al.* Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. *Dis Aquat Organ*, 2005, 67(3): 191-200

- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis Aquat Organ*, 2004, 60(2): 89–96
- Covarrubias MS, Nunan LM, Lightner DV, *et al.* Prevalence of IHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J Aquat Anim Health* 1999, 11(3): 296–301
- Kalagayan H, Godin D, Kanna R, *et al.* IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J World Aquacul Soc*, 1991, 22(4): 235–243
- Krabsetsve K, Cullen BR, Owens L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Dis Aquat Organ*, 2004, 61(1–2): 153–158
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J Invertebrate Pathol*, 1983a, 42(1): 62–70
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA, *et al.* Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Aquaculture Society*, 1983b, 14(1–4): 212–225
- Mari J, Bonami JR, Lightner D. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J General Virol*, 1993, 74(12): 2637–2643
- Motte E, Yugcha E, Luzardo J, *et al.* Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 57–70
- Nunan LM, Arce SM, Staha RJ, *et al.* Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J World Aquaculture Society*, 2001, 32(3): 330–334
- Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol*, 2000, 2(4): 319–328
- Pantoja CR, Lightner DV, Holtschmit KH. Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *J Aquatic Animal Health*, 1999, 11(1): 23–34
- Primavera H, Qunitio ET. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Crustacean Biol*, 2000, 20(4): 796–802
- Saksmerprome V, Puiprom O, Noonin C, *et al.* Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 2010, 298(3–4): 190–193
- Saksmerprome V, Jitrakorn S, Chayaburakul K, *et al.* Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res*, 2011, 160(1–2): 180–190
- Tang KF, Lightner DV. Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) originating from Hawaii and Americas. *Dis Aquat Organ*, 2002, 49(2): 93–97
- Tang KF, Lightner DV. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res*, 2006, 118(1–2): 185–191
- Tang KF, Navarro SA, Lightner DV. A PCR assay for discriminating between Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ*, 2007, 74(2): 165–170
- Tang KF, Poulos BT, Wang J, *et al.* Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(2): 91–99
- Tang KF, Durand SV, White BL, *et al.* Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 2000, 190(3–4): 203–210
- World Organization for Animal Health (OIE). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases Paris France: 2012, 119–137, <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.2.02\\_IHNV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.2.02_IHNV.pdf)>

(编辑 冯小花)

## PCR Detecting Types by the OIE Standards for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Farmed Shrimp

YUAN Yanyan<sup>1,2</sup>, YANG Bing<sup>1,2</sup>①, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, LIU Sun<sup>1</sup>, LIU Tianqi<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

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

**Abstract** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is a kind of common virus in shrimp culture industry in China, influencing prawn breeding all over the world. IHHNV is harmful to *Litopenaeus stylirostris* and the mortality can be as high as 90%. For *Litopenaeus vannamei*, the mortality is not high, but can suffer from runt deformity syndrome (RDS). IHHNV infection in *Penaeus monodon* is usually subclinical, but RDS, reduced growth rates and reduced culture performance have been reported in IHHNV-infected stocks. OIE recommended 5 sets of primer pairs to detect different genotypes of IHHNV. In order to know the detecting types in China, we used four sets of primer pairs in the PCR protocols recommended by the OIE standards to detect penaeid shrimp samples collected in 2011 and 2012 from different provinces. These four sets of primer pairs are 389F/389R, 392F/392R, 77012F/77353R, 309F/309R, respectively. The detection results showed that IHHNV positives were detected in the samples of *L. vannamei*, *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* and *Melicertus latisulcatus*, but not in the sample of *Palaemon carinicauda*. The positive percentage of *L. vannamei* was the highest, 70.8% (389F/R) in 2011 and 34.3% (389F/R) in 2012, and that of *F. chinensis* was the lowest, which is 8.3%. The more positive of penaeid shrimp samples in 2011 were detected than that in 2012. The positive percentage of IHHNV in penaeid shrimp samples from East China is higher than that from North China and South China. We got four detecting types from the PCR detection with 4 sets of primer pairs recommended by the OIE standards. For detected type I, the positive rate is 90% for all the four primer sets. For detected type II, the positive rate is 4% for primer set 389F/R. For detected type III, the positive rate is 4% for primer sets of 389F/389R, 392F/392R and 309F/309R. For detected type IV, the positive rate is 2% for primer sets of 389F/389R and 309F/309R. The survey provided valuable information for the future study and surveillance on epidemiology of IHHNV.

**Key words** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV); Polymerase chain reaction (PCR); OIE standards; Penaeid shrimp

① Corresponding author: YANG Bing, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

# 解放眉足蟹(*Blepharipoda liberate* Shen) 形态特征观察\*



王雪梅

(山东省日照市水产研究所 日照 276800)

**摘要** 为研究解放眉足蟹形态学特征(包括雌雄外部形态差异),补充国内解放眉足蟹相关资料的空缺,通过对采集到的野生活体进行解剖及显微观察,对成体口前板、组成口器的各个部分、第四步足、肛门及雌雄差异等进行了研究。口前板位于头胸部腹面第一、二触角的后方,口器的前方。口器由大、小颚及3对颚足共同组成,大颚单枝型,大颚须3节;第一小颚单枝型;第二小颚双枝型,内肢即小颚须棒状,外肢很发达,形成颚舟叶;第一颚足双枝型,内肢1节,外肢2节,具有上肢;第二颚足双枝型,内肢5节,外肢3节;第三颚足双枝型,内肢5节,外肢3节。胸足4对,均为单枝型,第1对为螯足,后3对为步足。腹部共7节(包括尾节),尾节无附肢,腹面有一肛门。腹部共6对腹肢,第6腹肢的1对附肢与尾节共同形成尾扇,司游泳功能,是解放眉足蟹唯一的游泳器官。雌雄差异明显,生殖孔1对,雌体位于第二步足基节腹面,雄体则位于第四步足基节上;第2-5对腹肢,雌性双枝型,雄性单枝型。与虾蟹比较,其没有腹甲,头胸部腹面更近似于虾类,但背部形态又更接近蟹类。其腹部没有蟹类的腹甲沟及用于锁住腹部的搭扣,故腹部常常处于半伸展状态。第四步足则位于腹部第一腹节上,与虾蟹类明显不同。另外,观察发现其腮部及身体外表各部位均附着有双壳类软体动物。

**关键词** 解放眉足蟹;异尾类;形态特征

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0074-05

解放眉足蟹(*Blepharipoda liberate* Shen)俗名海蝉蟹、海蝉虾、海知了、海节令,在分类学上属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳动物亚门(Crustacea)、软甲纲(Malacostraca)、真软甲亚纲(Eumalacostraca)、真虾总目(Eucarida)、十足目(Decapoda)、腹胚亚目(Pleocyemata)、异尾下目(Anomura)、蝉蟹总科(Hippoidea)、眉足蟹科(Blepharipodidae)、眉足蟹属(*Blepharipoda*) (杨思谅等,1979)。最早在山东烟台海岸带物种调查时被发现,1949年正式命名(Shen, 1949)。此后国内未见对解放眉足蟹的研究报道。

解放眉足蟹甲壳极薄、味道鲜美,深受人们喜爱。解放眉足蟹还具有重要的生态意义,其栖息于底质为细沙质的潮间带低潮区,摄食细小的肉屑及小型浮游动物,起到了清洁沙滩的作用。鉴于解放眉足蟹自然

资源量因人为大量采挖而急剧减少的现状,山东日照市水产研究所开展了人工苗种培育工作,3年人工培育出幼蟹167万只,并进行了增殖放流。目前解放眉足蟹已列为日照市财政资助的地方增殖放流品种。Shen(1949)给出了管须蟹科(Albuneidae)各属及眉足蟹属和冠鞭蟹属(*Lophomastix*)各物种检索表,对解放眉足蟹和日本冠鞭蟹成体在分类学上的形态差异进行了描述,并附有解放眉足蟹及日本冠鞭蟹背面观及部分附肢的手绘图,没有涉及解放眉足蟹雌雄在形态上的差异及生殖孔、肛门的位置;关于口器,只描述了第三颚足,没有提及与虾蟹差异较大的第四步足及共生的双壳贝类。本研究通过显微拍摄从形态学的角度将解放眉足蟹外部形态加以详细说明,附上所有附肢和共生蛤蜊及区分雌雄的腹部腹面观等图片,以补

\* 山东省农业良种工程(2013LZA11001)和日照市科技攻关项目(2012016)共同资助。王雪梅,研究员, E-mail: zgsdrzwxm@163.com

收稿日期: 2014-05-22, 收修改稿日期: 2014-08-22

充国内解放眉足蟹资料之不足。

## 1 材料与方法

2012年3月–2013年11月多次从山东日照潮间带采集野生个体共8720只,暂养于室内铺沙的水泥池或玻璃缸池中,采用海区自然海水饲养,水温0.5–30.0°C, pH 7.8–8.6, 盐度26.0–28.7, 投喂剁碎的细小鱼、虾、蟹、贝肉。选取身体完整且已达到性成熟的成体作为研究材料。显微照片采用的材料取自1雌1雄两只性成熟但体型较小的个体,目的是在解剖镜下能拍出完整的附肢,尤其是第一触角及各步足,其中雌体背甲长22.70 mm、背甲宽16.28 mm, 雄体背甲长18.84 mm、背甲宽13.13 mm (背甲长指从头胸甲前缘前齿前端到头胸甲后端的最大距离;背甲宽则指前侧缘第4侧齿之间头胸甲最宽处的距离)。用相机拍摄图片选取附肢完整、健康、中等体型的解放眉足蟹。

在OLYMPUS-SZ51解剖镜下进行成体各部分的解剖研究,对于一些细微部分,则在OLYMPUS-BX51显微镜40–100倍镜头下进行观察。在对不同季节多个成体解剖观察的基础上,选取雌雄个体进行解剖,分离出身体各部分进行显微拍照。对于头胸甲及整体的背面观和腹面观等则用LEICA D-LUX 5相机在像素10 M、微距模式下进行拍摄。

## 2 结果

解放眉足蟹成体体色多为淡青色、淡褐色、青白色(图1-1、图1-2), 2龄以下的幼蟹体色较淡,一般偏白色。整个身体分为头胸部和腹部。腮部及体表各部位常附着多个小型蛤蜊(图1-5a、图1-12d、图1-14a、图1-15a、图1-16a、图1-18a、图2-2a)。

### 2.1 头胸部

头胸部背面覆有一个很薄的头胸甲(图2-5), 两侧下折, 形成侧甲, 内边缘游离(图2-7), 侧甲的前半部分和背甲相似, 壳薄硬, 覆盖在第二小颚颚舟叶的外面; 后半部极薄、软, 包被鳃形成鳃盖。口前板位于头胸部腹面第一、二触角的后方, 口器的前方。

**2.1.1 头胸甲** 头胸甲近竖卵形, 长明显大于宽, 前侧缘左右末齿之间最宽, 背面隆起, 表面有一些细沟, 前半部分有一些突起的颗粒。前缘有3个三角形前齿(图2-5a), 中间1个为额齿, 整个前缘有许多小的齿状突起, 分布在3个前齿的边缘; 前侧缘每侧各有4个朝前的侧齿(图2-5b、7a), 侧齿的数目是属之间分类的重要依据; 后侧缘有许多很小的短齿(图2-5c),

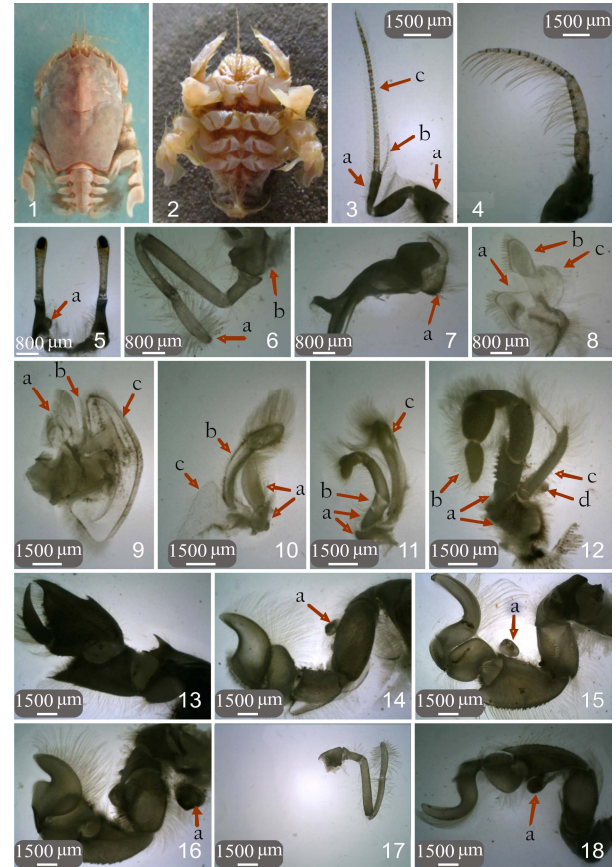


图 1 解放眉足蟹的形态特征

Fig.1 The morphological characteristics of the *B. liberate* Shen

1. 成体背面观; 2. 成体腹面观; 3. 第一触角(♂左, 解剖镜×0.8): a. 原肢, b. 内肢, c. 外肢; 4. 第二触角(♂左, 解剖镜×0.8); 5. 眼(背面观, ♂, 解剖镜×2.0): a. 蛤蜊; 6. ♂第四步足(左, 解剖镜×2.0): a. 指节(可动指), b. ♂生殖孔; 7. 大颚(♀右, 解剖镜×2.0): a. 大颚须; 8. 第一小颚(♀左, 解剖镜×2.0): a. 原肢底节(内片), b. 原肢基节(中片), c. 内肢(小颚须); 9. 第二小颚(♀左, 解剖镜×0.8): a. 原肢, b. 内肢, c. 外肢(颚舟叶); 10. 第一颚足(♀右, 解剖镜×0.8): a. 原肢, b. 外肢, c. 上肢; 11. 第二颚足(♀左, 解剖镜×0.8): a. 原肢, b. 内肢, c. 外肢; 12. 第三颚足(♀左, 解剖镜×0.8): a. 原肢, b. 内肢, c. 外肢, d. 蛤蜊; 13. 螯足(♀左, 解剖镜×0.8); 14. 第一步足(♀左, 解剖镜×0.8): a. 蛤蜊; 15. 第二步足(♀左, 解剖镜×0.8): a. 蛤蜊; 16. 第三步足(♀左, 解剖镜×0.8): a. 蛤蜊; 17. 第四步足(♀左, 解剖镜×0.8), 18. 第二步足(♂左, 解剖镜×0.8): a. 蛤蜊

1. Adult, dorsal view; 2. Adult, ventral view; 3. Antennule (♂left, dissecting microscope × 0.8): a. Protopodite, b. Endopodite, c. Exopodite; 4. Antenna(♂left, dissecting microscope × 0.8); 5. Oculi(Dorsal view, ♂, Dissecting microscope × 2.0): a. Clam; 6. ♂Pereopod IV(left, dissecting microscope × 2.0): a. Dactylus (movable finger), b. ♂ Genital pore; 7. Mandible(♀right, dissecting microscope × 2.0): a. Mandibular palpus; 8. Maxillula (♀left, Dissecting microscope × 2.0): a. Protopodite ischium (inner plate), b.

Protopodite basis (mid-plate), c. Endopodite (maxillary palpalus); 9. Maxilla (♀left, dissecting microscope × 0.8): a. Protopodite, b. Endopodite, c. Exopodite (scaphognathite); 10. First maxilliped (♀right, dissecting microscope × 0.8): a. Protopodite, b. Exopodite, c. Epipodite; 11. Second maxilliped (♀left, dissecting microscope×0.8): a. Protopodite, b. Endopodite, c. Exopodite; 12. Third maxilliped (♀left, Dissecting microscope×0.8): a. Protopodite, b. Endopodite, c. Exopodite, d. Clam; 13. Cheliped (♀left, dissecting microscope×0.8); 14. Pereopod I (♀left, dissecting microscope×0.8): a. Clam; 15. Pereopod II (♀left, dissecting microscope×0.8): a. Clam; 16. Pereopod III (♀left, dissecting microscope×0.8): a. Clam; 17. Pereopod IV (♀left, dissecting microscope×0.8); 18. Pereopod II (♂left, dissecting microscope×0.8): a. Clam

尤以幼年时更明显；后缘呈朝前的弧形(图 2-7b)。

### 2.1.2 附肢 头部共 6 对附肢。

眼(图 1-5): 复眼 1 对, 位于头胸甲前缘中间额齿的两侧下方, 眼柄细长, 柱状, 中间分节, 各节眼柄均能活动, 下面一节眼柄具刚毛。第一触角(图 1-3): 位于头部复眼的下方, 双枝型。原肢 3 节(图 1-3a), 包括亚底节、底节、基节, 底节基节能折叠到亚底节上, 各节均能活动; 外肢长(图 1-3c), 由 37-45 节组成, 形成节鞭; 内肢短小, 鞭状(图 1-3b), 由 9-14 节组成。原肢、内肢、外肢各节均具刚毛。

第二触角(图 1-4): 位于前齿外侧下方, 眼的两边, 比第一触角大、长, 单枝型, 外肢退化。底部 5 节较大, 能活动, 均具刚毛; 上部形成节鞭, 由 13-14 节组成, 每节短小, 着生两排硬的长刚毛。

大颚(图 1-7): 位于口的两侧, 与口前板相连, 为单枝型。外肢退化; 原肢由完全石灰质化的大颚体构成, 分为大颚突即底节及咀嚼板即基节两部分; 内肢为大颚须(图 1-7a), 有 3 节组成, 大颚须静止时折叠于切齿内侧。

第一小颚(图 1-8): 位于大颚的后方。单枝型, 外肢已退化。原肢包括底节和基节, 底节即内片(图 1-8a), 具柄, 末端近菱形, 密生羽状刚毛及少量粗刚毛; 基节即中片(图 1-8b), 具长柄, 末端似牙刷头, 内缘及前缘具粗刚毛。内肢即小颚须(图 1-8c), 1 节, 具刚毛, 上部有一突起具 4-6 根刺, 末端朝背部卷起。第二小颚(图 1-9): 位于第一小颚后方, 为双枝型。原肢在内侧(图 1-8a), 底节伸出两个突起形成内片, 其中下叶较大, 且除边缘刚毛外, 两面各有一排羽状刚毛, 下叶小, 也具有羽状刚毛; 基节伸出的突起从中部至末端裂为 2 枝, 上面一枝较下面的大, 底节、基节伸向口侧。内肢形成小颚须(图 1-8b), 棒状, 上具刚毛。外肢很发达(图 1-8c), 镰刀状, 周缘密生羽状刚毛, 形成颚舟叶。

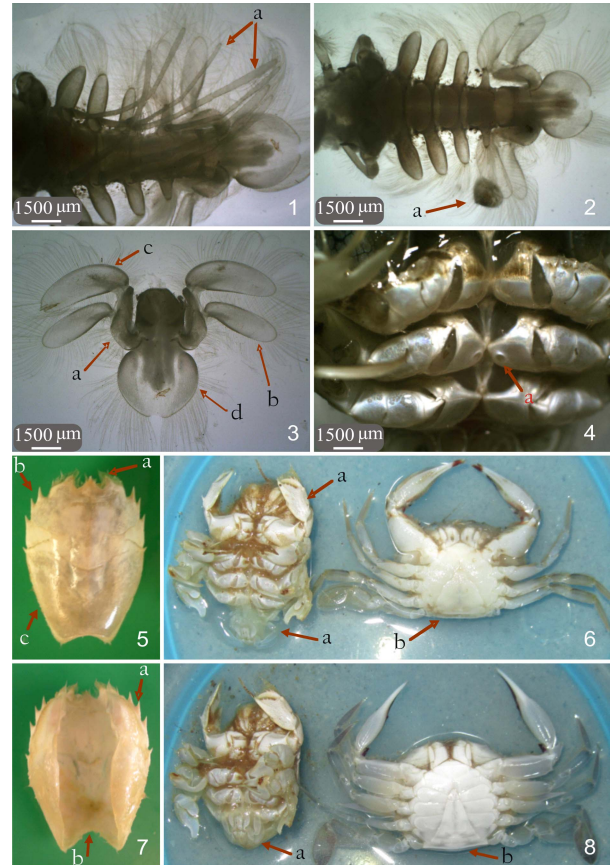


图 2 解放眉足蟹形态特征及与短尾类之比较

Fig.2 The morphological characteristics comparison of the *Blepharipoda liberate* and brachyura

1. ♀成体腹部腹面观(解剖镜×0.8): a. 内肢; 2. ♂成体腹部腹面观(解剖镜×0.8): a. 蛤蜊; 3. 成体腹部第 6、7 腹节(腹面观, ♀, 解剖镜×0.8): a. 第 6 腹节腹肢原肢, b. 内肢, c. 外肢, d. 尾节; 4. ♀成体第一、二、三步足基节(解剖镜×0.8): a. 生殖孔; 5. 头胸甲背面观: a. 前缘前齿, b. 前侧缘侧齿, c. 后侧缘; 6. 与蟹类比较(腹面观): a. 解放眉足蟹, b. 日本蟳; 7. 头胸甲腹面观: a. 前侧缘侧齿, b. 后缘; 8. 与蟹类腹面观比较: a. 解放眉足蟹, b. 三疣梭子蟹幼蟹

1. ♀ adult's abdomen, ventral view (dissecting microscope×0.8): a. Endopodite; 2. ♂adult's abdomen, ventral view (dissecting microscope×0.8): a. Clam; 3. Uromeres VI and VII (ventral view, ♀, dissecting microscope×0.8): a. Protopodite of pleopods on uromeres VI, b. Endopodite, c. Exopodite, d. tailfan; 4. ♀Basises of Pereopod I, II, and III (dissecting microscope×0.8): a. Genital pore; 5. Carapace, dorsal view: a. Anterior tooth on anterior border, b. Lateral tooth on anterolateral border, c. Posterolateral border; 6. Comparisons with decapod crustaceans, ventral view: a. *B. liberate* Shen, b. *Charybdis japonica*; 7. Carapace, ventral view: a. Lateral tooth on anterolateral border, b. Posterior border; 8. Comparisons with decapod crustaceans, ventral view: a. *B. liberate* Shen, b. *Portunus trituberculatus*

胸部共 7 对附肢, 前 3 对即第一、第二、第三颚足与大、小颚共同组成口器。后 4 对附肢为胸足。

第一颚足(图 1: 10): 位于第二小颚后方, 双枝型。原肢在内侧(图 1: 10a), 底节小; 基节相对较大, 叶片状。内肢 1 节, 长条状。外肢 2 节(图 1-10b), 下面 1 节三棱形, 末节近椭圆形, 密生羽状刚毛。基部具上肢(图 1-10c), 近三角形。原肢、内肢、外肢及上肢均具刚毛。

第二颚足(图 1-11): 位于第一颚足外侧, 双枝型。原肢 2 节, 底节、基节不具内叶(图 1-11a); 内肢 5 节(图 1-11b), 即座节、长节、腕节、前节及指节, 长节长, 末 3 节短。外肢 3 节(图 1-11c), 下面 1 节短小, 中间 1 节三棱形, 较长, 末节细长朝内弯曲。原肢及内外肢各节均具刚毛。

第三颚足(图 1-12): 位于第二颚足后方, 口器的最外层, 双枝型。原肢 2 节(图 1-12a), 底节粗大, 基节短小, 近三角形。内肢 5 节(图 1-12b), 依次为座节、长节、腕节、前节和指节, 座节内侧具锯齿, 长节较长, 各节均具刚毛。外肢 3 节(图 1-12c), 下面 1 节短小, 末 2 节长。

胸足 4 对, 均为单枝型。外肢已完全退化; 原肢 2 节, 即底节、基节; 内肢 5 节, 依次为座节、长节、腕节、前节或掌节、指节。

螯足(图 1-13): 第一对胸足为螯足, 两侧等大, 形态与后 4 对步足显著不同。前节基半部膨大为掌部, 故前节又称掌节, 其腹缘具一尖齿, 外侧面具 1-2 个尖齿, 掌节叶片状, 侧扁, 末部近三角形, 形成不动指与指节即可动指相对, 呈钳状, 用于捕捉食物和御敌, 不动指内缘具 3-6 个齿及刚毛; 可动指内缘无齿, 外上缘具 1-3 个大小不等的尖齿和较长的刚毛; 腕节短, 前缘三角形, 末端尖锐; 长节较长, 近三棱形, 其前部外下侧具 1 尖齿; 座节下缘具 1 尖齿。螯足的底节、基节、座节十分短小。

第一至三步足(图 1-14-图 1-18): 这 3 对步足形态相近, 底节、基节、座节均短小; 腕节外侧缘有一排锯齿; 指节多呈片状弯钩, 比螯足指节大。雌性第二步足基节腹面有 1 对生殖孔(图 2-4a), 雄性则无。除底节外各节均具刚毛。

## 2.2 腹部

**2.2.1 腹节** 腹部共 7 节(包括尾节)(图 2-1、图 2-2), 背腹扁平, 左右对称, 常折于胸部下方。第一节具 1 对步足, 即第四步足, 尾节无附肢, 其他 5 节各具 1 对附肢。第一腹节近三角形, 大部分位于背甲的下方; 尾节团扇形, 后缘中央有一浅内凹, 无刚毛, 除此外, 尾节外缘密生羽状刚毛, 尾节腹面有一肛门;

尾节与第六腹节的 1 对附肢共同形成尾扇, 司游泳功能, 是解放眉足蟹唯一的游泳器官。

**2.2.2 腹肢** 腹部共 6 对腹肢, 第四步足不在胸部而位于腹部。

第四步足: 位于腹部第一腹节腹面(图 1-6、图 1-17), 共 7 节, 比前 4 对胸足小很多, 细长, 亚螯状, 折于头胸甲后侧缘。雌雄有差异, 雄性基节上具有生殖孔(图 1-6b), 为性腺开口; 雌性则无。指节为可动指(图 1-6a), 与掌节的不动指相对, 形成钳状; 长节较长; 底节、基节、座节短小。除底节外, 其余 6 节均具刚毛, 尤其掌节刚毛密集。

第 2-5 对腹肢(图 2-1、图 2-2): 腹部第 2-5 节上各有 1 对腹肢, 雌雄有差异。

雄性(图 2-2): 单枝型, 位于腹节两侧, 无内肢, 外肢 1 节, 叶片状, 具较长的刚毛。

雌性(图 2-1a): 双枝型, 内肢细长棒状, 共 4 节, 最下面 1 节短小, 其他 3 节长且上有长短不一的刚毛; 外肢 1 节, 叶片状, 密生刚毛, 位于腹节两侧。

第 6 腹肢(图 2-3): 位于第 6 腹节末端两侧, 双枝型。原肢 2 节(图 2-3a), 底节小, 基节较大。内肢、外肢各 1 节(图 2-3b、图 2-3c), 均具刚毛。游泳时与尾节一起拨动水流。

## 3 讨论

从分类学角度看, 真正的虾类属于十足目下的枝鳃亚目, 蟹类和解放眉足蟹则属于腹胚亚目(薛俊增等, 2009), 真正的蟹类归属于短尾下目, 而解放眉足蟹则属于异尾下目, 是介于虾、蟹之间的一种甲壳动物, 但解放眉足蟹和虾类、蟹类同属于真软甲亚纲下的十足目动物(堵南山, 1993), 所以它们又有许多共同点, 由于解放眉足蟹和蟹类都在短尾下目, 从亲缘关系上更接近蟹类。

从外部形态上也充分说明, 解放眉足蟹是介于真正的虾类和蟹类之间的一种节肢动物(图 2: 6, 8), 从头胸部背面观察, 其头胸甲与蟹类十分相似, 但从腹面看, 则与蟹类大不相同, 蟹类除了头胸甲外还具有腹甲(堵南山, 1987; 陈惠莲等, 2002; 杨思谅等, 2012), 而解放眉足蟹没有腹甲, 它的头胸部腹面更近似于虾类(王克行, 2008)。但从整个外部形态看, 解放眉足蟹又更接近蟹类, 这与分类学上它们在同一亚目而与虾类分属不同的亚目相一致, 解放眉足蟹在繁殖季节, 其抱卵的形态与蟹类相似, 在这里不作详细论述。

解放眉足蟹的腹部时常会卷曲在头胸部腹面, 这



时看起来很像蟹类,但它没有蟹类的腹甲沟及像梭子蟹科雄性腹部腹面的锁窝和胸部腹甲的锁突形成的用于锁住腹部的搭扣(陈惠莲等,2002;杨思谅等,2012),所以腹部不能像蟹类贴附在头胸部腹面,而常常处于半伸展状态。腹部第6对腹肢较发达,与尾节形成尾扇,司游泳功能,这一点与虾类相似,但其他腹肢不像虾类是专门的游泳器官(刘瑞玉,1955),所以解放眉足蟹游泳能力很差。

真正的虾类和蟹类头胸部都具有5对胸足(沈嘉瑞等,1976;宋鹏东,1982),但解放眉足蟹除螯足和后三对步足在胸部,与虾蟹相似,其第四步足则位于腹部第一腹节,与虾蟹类明显不同。

解放眉足蟹属于多年生异尾类海洋生物,在不同的年龄段,其腮部及身体外表各部位均附着有大大小小的双壳类软体动物,这些小型蛤蜊通过足丝固着在解放眉足蟹的身体上。Boyko等(2002)就同为眉足蟹属的西方眉足蟹(*Blepharipoda occidentalis*)与双壳贝类(*Mysella pedroana*)的共生进行了研究。

到目前为止,解放眉足蟹在我国的分布范围还不十分清楚,仅Shen(1949)、王晓安等(2011)在烟台海滨及我们在日照潮间带采得样本,其他海区未见报道。另外解放眉足蟹的生活习性等还有待进一步的研究。

**感谢:**中国科学院海洋研究所王永良老师在解放眉足蟹研究工作中给予的指导,并对刘瑞玉院士生前给予的帮助深表敬意。

## 参 考 文 献

- 王克行. 虾类健康养殖原理与技术. 北京: 科学出版社, 2008, 3-9
- 王晓安, 孙虎山, 王宜艳. 烟台海滨习见无脊椎动物原色图谱. 北京: 科学出版社, 2011, 134-152
- 刘瑞玉. 对虾. 生物学通报, 1955, 4(5): 17-20
- 杨思谅, 陈惠莲, 戴爱云. 中国动物志 无脊椎动物 第四十九卷: 甲壳动物亚门 十足目 梭子蟹科. 北京: 科学出版社, 2012, 1-13
- 杨思谅, 孙秀敏. 中国管须蟹科新纪录. 动物分类学报, 1979, 4(3): 203
- 沈嘉瑞, 刘瑞玉. 我国的虾蟹. 北京: 科学出版社, 1976, 14-129
- 宋鹏东. 三疣梭子蟹的形态与习性. 生物学通报, 1982, 17(5): 18-21
- 陈惠莲, 孙海宝. 中国动物志 无脊椎动物 甲壳动物亚门 十足目 海洋低等蟹类. 北京: 科学出版社, 2002, 3-17
- 堵南山. 甲壳动物学(上). 北京: 科学出版社, 1987, 22-51
- 堵南山. 甲壳动物学(下). 北京: 科学出版社, 1993, 675-718
- 薛俊增, 堵南山. 甲壳动物学. 上海: 上海教育出版社, 2009, 175-195
- Boyko CB, Mikkelsen PM. Anatomy and biology of *Mysella pedroana* (Mollusca: Bivalvia: Galeommatoidea), and its commensal relationship with *Blepharipoda occidentalis* (Crustacea: Anomura: Albuneidae). Zool Anz, 2002, 241(2): 149-160
- Shen CJ. Notes on the genera *Blepharipoda* and *Lophomastix* of the family Albuneidae (Crustacea anomura) with description of a new species, *B. liberata*, from china. Contr Inst Zool, Natl Acad, 1949, 5(4): 153-170

(编辑 冯小花)

## The Morphological Characteristics of the *Blepharipoda liberate* Shen

WANG Xuemei

(Rizhao Ocean & Fisheries Research Institute, Rizhao 276800)

**Abstract** *Blepharipoda liberate* Shen can clean intertidal sand, which has important ecological significances. In order to study the external characteristics and provide more information for the research and utilization of Anomura, *B. liberate* Shen were utilized for the dissection and observation under microscope. *B. liberate* Shen is unisexual; the pleopods and the location of genital pore are different between females and males. Female *B. liberate* Shen has four pairs of endopodites that are located in the abdomen; however, male *B. liberate* Shen has no endopodites. The location of genital pores of female *B. liberate* Shen are on the venter of the basis pereopod II, while the genital pores of male *B. liberate* Shen are located on the venter of the basis pereopod IV. The commensal bivalves are attached to body surface and gills. Similar to brachyura, *B. liberate* Shen have carapaces, but they have no sternum. The abdomen can not attach to the cephalothorax venter because of the lack of the sternal groove. Pleopod VI is much developed to form tail fan with telson that functions swimming like shrimps. A pair of the pereopod IV of *B. liberate* is located in the abdomen that is different from shrimps or crabs.

**Key words** *Blepharipoda liberate* Shen; Anomura; Morphological characteristics

① Corresponding author: WANG Xuemei, E-mail: zgsdrzwxm@163.com

# 海湾扇贝晚苗池塘底播及在褐潮暴发海区 筏式养殖效果\*



王东哲<sup>1,2</sup> 毛玉泽<sup>1①</sup> 方笑<sup>3</sup> 杜美荣<sup>1</sup> 张福崇<sup>3</sup> 方建光<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 碳汇渔业实验室 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 国家贝类产业技术体系秦皇岛综合实验站 秦皇岛 066200)

**摘要** 为有效避开河北地区褐潮暴发与海湾扇贝养殖时间的重叠,为海湾扇贝产业健康持续发展提供技术支持,对海湾扇贝进行晚苗培育(4月初种贝入室,以下称晚苗)及池塘底播和筏式养殖实验。结果显示,池塘底播海湾扇贝晚苗培育的稚贝(壳长5.0–6.1 mm),经过139 d的养殖,收获时平均壳长达59.7 mm,扇贝柱5.2 g。2012年筏式养殖海湾扇贝晚苗,收获时平均湿质量、鲜贝柱重和出贝柱率分别为28.7 g、3.8 g和13.8%。2013年,晚苗收获时平均壳高、湿质量、鲜贝柱重和出贝柱率分别为50.3 mm、24.4 g、3.1 g和12.7%。按1000 m<sup>3</sup>育苗水体计算,海湾扇贝晚苗培育可以节省燃煤45.5 t,节约成本6.75万元,养殖晚苗可以降低养殖成本11.6%。研究表明,海湾扇贝晚苗养殖技术可以有效规避褐潮暴发的不利影响,而且还可以节约养殖成本和节省能源。

**关键词** 海湾扇贝;晚苗培育;池塘底播;筏式养殖

**中图分类号** S967 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0079-06

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)自1982年引种成功后(张福绥等,1986),产业发展迅速,成为河北、山东、辽宁和福建等地的重要养殖贝类,目前养殖产量为50万t左右(张福崇等,2011)。

2009年河北秦皇岛地区暴发大面积褐潮(26000 hm<sup>2</sup>),2010年褐潮暴发区域(超过3350 km<sup>2</sup>)直接经济损失高达2.05亿元(国家海洋局,2010),近年褐潮的面积和范围都有扩大的趋势。褐潮暴发主要发生在6月中下旬,持续30–40 d,对海湾扇贝产业产生重要影响(Zhang *et al.*, 2012; 张雅琪等,2013)。目前海湾扇贝多为早春育苗(2月初种贝入室),河北地区多在5月中上旬购买海湾扇贝稚贝苗种,褐潮发生时海湾扇贝壳长多在5.0–7.0 mm,褐潮期间养殖海湾扇贝滞长,甚至死亡,褐潮结束后海湾扇贝开始正常生长。褐潮暴发引起很多学者的关注(Bricelj *et al.*, 1997;

Probyn *et al.*, 2001; Gobler *et al.*, 2011; Talmage *et al.*, 2012),但目前尚缺少有效的防治手段。本研究针对河北地区褐潮的暴发与海湾扇贝养殖时间重叠较小的特点,开展了海湾扇贝晚苗培育及池塘、筏式养殖实验,探索了海湾扇贝池塘底播养殖的可行性;通过推迟海湾扇贝育苗和养殖时间,可以有效避开河北地区大规模褐潮暴发期,为海湾扇贝产业的健康可持续发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 海湾扇贝晚苗培育实验

于2012年4月在山东乳山瑞洋海珍品育苗场进行海湾扇贝晚苗培育试验。海湾扇贝种贝于4月5日入池(苗种培育过程除育苗时间延迟外,其他培养方

\* 国家海洋局海洋公益性行业科研专项经费项目(201205031)、国家贝类产业技术体系(cars-48)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022011003)和国家科技支撑计划(2011BAD45B01)共同资助。王东哲, E-mail: dongzhehaha89@126.com

① 通讯作者: 毛玉泽, 研究员, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-12, 收修改稿日期: 2014-04-16

法与升温早苗相同)。外界水温达到 17℃时,采用提高水温(2~3℃)刺激产卵,卵产出后,经过 10 d 左右的培养,发育至壳顶后期幼虫,规格为(182.6±13.5) μm,投放附着基。5月12日出池,在池塘暂养 40 d 左右。晚苗培育期间,每天测量壳长(Shell length, SL)、壳高(Shell height, SH)。

### 1.2 海湾扇贝池塘底播养殖实验

2012年6月22日,海湾扇贝稚贝壳长达到 5.0~6.1 mm,运输到山东潍坊龙威集团所属虾池开展底播养殖试验,用两个条件相似的面积分别为 2 hm<sup>2</sup>的池塘进行实验,放养密度为 4.5 粒/m<sup>2</sup>。每天测定水温、盐度,每 7 d 换水两次,每 30 d 测定海湾扇贝生长情况,2012年11月7日收获。

### 1.3 晚苗筏式养殖实验

筏式养殖试验在河北省昌黎秀亭养殖场进行,除养殖时间延迟外,其他养殖方式与早苗相同。早苗养殖每年 5月10~15日购买苗种,7月20日左右分苗养成,养殖笼 10~11层,养殖密度为 40~45 粒/层。2012年7月16日,放养海湾扇贝晚苗培育的稚贝 10万粒(壳长 6.0~8.0 mm),7月30日左右壳长达到 10.0 mm 左右时分苗养成,共养殖 120 笼,稚贝成活率约为 52.8%。2013年6月29日,放养海湾扇贝晚苗培育的稚贝 35万粒(壳长 3.0~5.0 mm),7月28日分苗养成,共养殖 300 笼,稚贝成活率约为 37.7%。

### 1.4 数据分析

$$\text{壳高增长率 } G(\text{mm/d}) = (SH_t - SH_0) / t$$

式中,  $SH_t$  和  $SH_0$  分别表示实验结束和实验开始时海湾扇贝的壳高(mm),  $t$  表示生长时间(d)。

采用 SPSS 19.0 对海湾扇贝各项生长数据进行统计分析( $T$  检验),  $P < 0.05$  为差异显著水平,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 海湾扇贝晚苗培育生长情况

2012年4月5日~5月12日期间,幼体培育阶段幼虫生长情况见图 1。海湾扇贝晚苗幼虫在 10 d 内,壳长可达(185.6±14.6) μm,壳高(167.9±16.0) μm。5月12日稚贝出池到室外池塘培养,稚贝成活率 90%以上。2013年采取和 2012年相同的方法培育稚贝,5月22日出池,在池塘暂养 36 d,成活率 90%以上,于 6月27日运输 35 万粒到昌黎海区开展养殖试验。

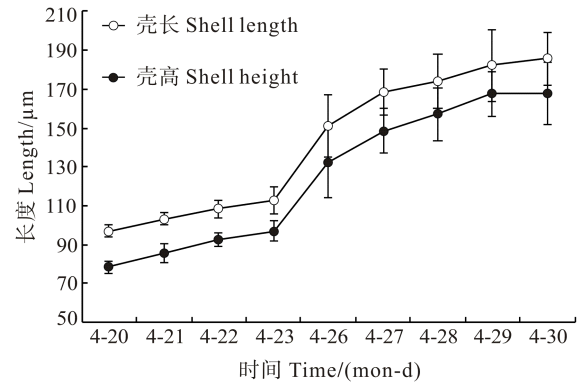


图 1 海湾扇贝晚苗培育幼虫生长情况

Fig.1 The larva growth curve of late bay scallop seedling

### 2.2 海湾扇贝晚苗池塘底播生长情况

2012年6月22日,运输晚苗培育的稚贝 15万粒进行池塘底播养殖实验。扇贝的生长情况见图 2。收获时,海湾扇贝平均壳长达 59.7 mm,壳高 55.0 mm,湿质量 35.3 g,扇贝柱 5.2 g,较筏式养殖海湾扇贝柱(4.0 g)提高 30.5%。

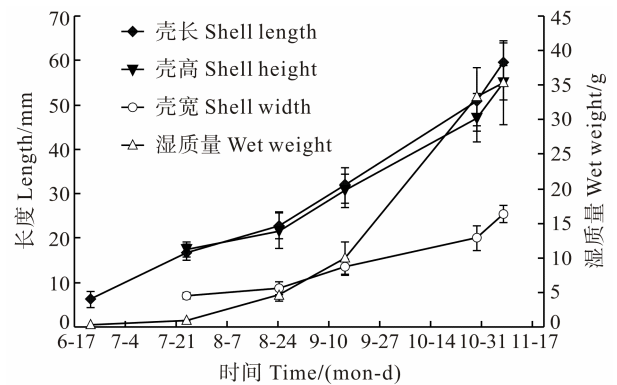


图 2 池塘底播海湾扇贝生长情况

Fig.2 The growth characteristics of bay scallop in bottom sowing culture

### 2.3 海湾扇贝早苗、晚苗养殖过程比较

海湾扇贝早苗、晚苗养殖过程和生长参数见表 1。晚苗与早苗相比,育苗时间推迟 40 d 左右,海区放苗时间延后了 60 d 左右。采取与升温早苗相同的养殖方式,2012年和 2013年收获时,晚苗平均壳高分别为 50.1 mm 和 50.3 mm,平均湿质量分别为 28.7 g 和 24.4 g,同期早苗平均壳高分别为 50.8 mm 和 51.9 mm,平均湿质量分别为 27.9 g 和 25.8 g。

### 2.4 海湾扇贝早苗、晚苗生长速度比较

表 2 表明晚苗与早苗相比生长速度更快。2012年晚苗的壳高增长率为 0.36 mm/d,明显高于早苗

(0.26 mm/d,  $P<0.05$ ), 在 9-10 月、10-11 月尤其明显。2013 年, 晚苗的壳高增长率为 0.31 mm/d, 显著高于早苗的 0.26( $P<0.05$ ); 两年的试验结果比较, 2013 年早苗壳高的生长速度与 2012 年相比变化不大, 但晚苗的生长速度明显低于 2012 年。

2.5 海湾扇贝早苗、晚苗出成率及养殖成本比较

早苗、晚苗筏式养殖(晚苗除放养时间比早苗晚, 养殖方式相同)收获时出成率见表 3。2012 年收获时(11 月 14 日), 早苗和晚苗的平均湿质量、鲜贝柱重、出贝柱率分别为 27.9 g、28.7 g、3.3 g 和 3.8 g、11.8%

表 1 海湾扇贝早苗与晚苗养殖过程  
Tab.1 The process of longline aquaculture of bay scallop from the early and late seedlings

年份 Year	苗种类型 Seedling type	褐潮发生时间 Brown tide duration (M-D)	苗种数量 Seedling number (10 <sup>4</sup> ind)	产量 Production (cage)	养殖密度 Stocking density (Ind./layer)	稚贝出池 Seeds outdoor			
						日期 Date (M-D)	壳高 SH (mm)	湿质量 WW (g)	
2012	早苗 Early seedling	05-07-07-13	10	120	40-45	04-10	0.7		
	晚苗 Late seedling					05-12	0.6		
2013	早苗 Early seedling	05-28-07-15	35	300	40-45	04-15	0.7		
	晚苗 Late seedling					05-22	0.6		
池塘暂养 Rearing in pond		放苗 Seedling cultivation		分苗 Separating seedling		收获 Harvest			
暂养海区 Rearing area	日期 Date (M-D)	壳高 SH (mm)	日期 Date (M-D)	壳高 SH (mm)	日期 Date (M-D)	壳高 SH (mm)	日期 Date (M-D)	壳高 SH (mm)	湿质量 WW (g)
莱州 Laizhou	5.5	3.0	5.10	3-5	7.20	10	11.14	50.8	27.9
乳山 Rushan	7.15	3.0	7.16	6-8	7.30	8	11.14	50.1	28.7
莱州 Laizhou	5.10	3.0	5.15	3-5	7.18	10	11.20	51.9	25.8
乳山 Rushan	6.27	3.0	6.29	3-5	7.28	9	11.20	50.3	24.4

表 2 海湾扇贝早苗、晚苗壳高日生长率的比较  
Tab.2 The daily growth rate of shell height of bay scallop of the early and late seedlings

年份 Year	苗种类型 Seedling type	养殖天数 Cultivation days (d)	壳高 SH (mm)				壳高日增长率 Daily growth rate of SH (mm/d)		
			苗种 Seedling	09-18/ 09-21	10-16/ 10-24	成贝 Adult	9-10 月	10-11 月	养殖期间 During cultivation
2012	早苗 Early seedling	184	3	42.0 <sup>a</sup>	44.2 <sup>a</sup>	50.8 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
	晚苗 Late seedling	122	6	36.5 <sup>b</sup>	40.6 <sup>b</sup>	50.1 <sup>a</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>
2013	早苗 Early seedling	190	3	44.0 <sup>a</sup>	48.3 <sup>a</sup>	51.9 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
	晚苗 Late seedling	145	5	38.5 <sup>b</sup>	47.7 <sup>a</sup>	50.3 <sup>a</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>

注: 同一列中参数上方不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different superscripts in the same row mean significant differences( $P<0.05$ )

表 3 不同苗种养殖的海湾扇贝成贝生物学参数  
Tab.3 The biological parameters of adult bay scallop of the early and late seedlings

苗种类型 Seedling type	收获日期 Harvest date (Y-M-D)	壳高 SH (mm)	壳长 SL (mm)	壳宽 SW (mm)	湿质量 WW (g)	鲜贝柱重 Adductor muscle (g)	出贝肉率 Scallop muscle rate (%)	成活率 Survival rate (%)
早苗 Early seedling	2012-11-14	50.8±4.0 <sup>a</sup>	53.2±3.0 <sup>a</sup>	24.9±5.8 <sup>a</sup>	27.9±4.1 <sup>a</sup>	3.3±0.8 <sup>a</sup>	11.8±0.02 <sup>a</sup>	48.6 <sup>a</sup>
晚苗 Late seedling		50.1±4.3 <sup>a</sup>	54.1±3.6 <sup>b</sup>	24.8±2.2 <sup>a</sup>	28.7±5.3 <sup>b</sup>	3.8±1.1 <sup>b</sup>	13.2±0.02 <sup>b</sup>	52.8 <sup>a</sup>
早苗 Early seedling	2013-11-20	51.9±3.9 <sup>a</sup>	54.6±3.7 <sup>a</sup>	23.2±2.3 <sup>a</sup>	25.8±4.6 <sup>a</sup>	3.2±0.6 <sup>a</sup>	12.4±0.02 <sup>a</sup>	51.4 <sup>a</sup>
晚苗 Late seedling		50.3±3.7 <sup>b</sup>	53.9±3.2 <sup>b</sup>	23.5±1.4 <sup>a</sup>	24.4±3.6 <sup>b</sup>	3.1±0.6 <sup>a</sup>	12.7±0.02 <sup>a</sup>	37.7 <sup>b</sup>

注: 同一列中参数上方不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different superscripts in the same row mean significant differences( $P<0.05$ )

和 13.8%，3 项指标均存在显著差异( $P<0.05$ )，早苗和晚苗的成活率分别为 48.6%和 52.8%，无显著差异( $P>0.05$ )。2013 年收获时(11 月 20 日)，早苗和晚苗的平均湿质量、鲜贝柱重、出贝柱率和成活率分别为 25.8 g、24.4 g、3.1 g 和 3.2 g、12.7%和 12.4%、51.4%和 37.7%，平均湿质量和成活率差异显著( $P<0.05$ )，平均鲜贝柱重和出贝柱率无显著差异( $P>0.05$ )。

## 2.6 海湾扇贝早苗、晚苗培育及养殖成本比较

晚苗育苗期间，海湾扇贝幼虫培育期间自然海水平均温度为 17℃，幼虫培育平均水温为 24℃，幼虫培养时间为 22 d。按照 1000 m<sup>3</sup> 育苗水体每天全量换水估算，幼虫培育期间，半常温育苗比升温育苗节省燃煤 53.1 t (折合标准煤 45.5 t，表 4)，减排二氧化碳 119.2 t、二氧化硫 386.8 kg、氮氧化物 333.7 kg。标准煤的价值约为 1500 元/t，节省燃煤可以降低成本 6.75 万元。

秦皇岛地区以家庭为单位的养殖户平均每年养殖海湾扇贝约 2 万笼，每年 5 月初购买升温苗，养殖周期一般为 9 个月，以此估算，2010 每户海湾扇贝的养殖成本约为 56.8 万元(张福崇等, 2011)，如果进行海湾扇贝晚苗筏式养殖(放苗时间推迟 60 d 左右，养殖周期为 7 个月)，养殖成本约为 50.2 万元(表 5)，降低 6.6 万元，降幅达 11.6%。尽管晚苗的放苗时间延后，但到收获时鲜贝柱差别不大，效益没有明显降低。

## 3 讨论

### 3.1 海湾扇贝池塘底播养殖潜力

海湾扇贝与对虾、美国红鱼、刺参的综合养殖已经取得了成功，综合养殖不仅可以减轻养殖过程中病

害的发生、净化池塘水质，而且增加了养殖产量，取得了显著的社会与经济效益(王吉桥等, 1999; 林建民等, 2000; 徐永东等, 2012)。本研究中两个池塘底播海湾扇贝的平均贝柱重量达 5.2 g，较同期筏式养殖海湾扇贝柱(4.0 g)提高 30.5%，产生更大的经济效益。海水池塘养殖作为我国海水养殖业三大主要养殖方式之一(王岩, 2004)，适合开展海湾扇贝池塘底播养殖的空间较大，作为筏式养殖的一个很好的补充，具有非常大的发展潜力。

### 3.2 海湾扇贝晚苗筏式养殖效果

两年的实验结果均表明，尽管晚苗放养时间晚，养殖时间短，但壳高增长率明显高于早苗，表现出了更大的生长优势。Gallager 等(1989)发现，在投喂褐潮藻的过程中，由于缺乏适口饵料满足自身生长需要，海湾扇贝幼虫的生长率降低，死亡率升高。Bricelj 等(1987)的研究也表明，褐潮暴发时，当褐潮藻的密度达到  $1 \times 10^6$  cells/ml 时，海湾扇贝的滤水率停滞，出现滞长、死亡现象；当海区环境趋于稳定，可供扇贝摄食生长的饵料逐渐丰富，海湾扇贝又恢复快速的生长过程(Bricelj *et al*, 1989)。2013 年海湾扇贝晚苗的成活率仅为 37.7%，可能与放苗时仍处于褐潮暴发期有关，这与 Bricelj 等(1989)的研究结果相似，而 2012 年褐潮于 7 月 13 日基本结束，晚苗放苗时间为 7 月 16 日，稚贝成活率达 52.8%。2013 年收获时海湾扇贝的平均湿质量、鲜贝柱重、出贝肉率都低于 2012 年，原因之一可能是苗种投放时间没有避开褐潮暴发造成的；另外，2013 年河北地区海湾扇贝总体较 2012 年偏瘦，这可以从受褐潮影响较小的抚宁地区得到验证(表 6,  $P<0.05$ )，其原因还需要进一步研究，不过缺少适合的饵料生物可能是重要因素。

表 4 海湾扇贝早苗和晚苗培育时间与燃煤消耗

Tab.4 The coal consumption and breeding time of the early and late bay scallop seedlings

模式 Seedling type	种贝入库日期 Date of rearing parent scallop (M-D)	产卵日期 Date of spawn (M-D)	自然水温 Seawater temperature (°C)	升温水温 Temperature rise (°C)	培育时间 Days of breeding (d)	耗煤 Coal consumption (t/1000m <sup>3</sup> )
早苗 Early seedling	02-10	03-10	8	24	25	86.4
晚苗 Late seedling	04-05	04-20	17	24	22	33.3

表 5 海湾扇贝早苗、晚苗养殖成本(2 万笼计算，单位：万元)

Tab.5 The aquaculture cost estimation of early and late bay scallop seedlings

苗种来源 Seedling type	养殖周期 Aquaculture time (month)	人工费 Labor cost	折旧费 Depreciation cost	苗种费 Seedling cost	燃油费 Fuel cost	其他支出 Others	合计 Total cost
早苗 Early seedling	9	29.8	9	9.8	6	2.2	56.8
晚苗 Late seedling	7	26.5	8	8.4	5.3	2.0	50.2

表 6 2012 和 2013 年抚宁地区海湾扇贝收获时生长比较

Tab.6 The biological parameters of bay scallop harvested in Funing area in 2012 and 2013

日期 Date(Y-M-D)	壳高 Shell height (mm)	壳长 Shell length (mm)	壳宽 Shell width (mm)	湿质量 Wet weight (g)	鲜贝柱重 Adductor muscle (g)
2012-11-14	53.0±4.1	55.4±4.2	25.2±1.6	29.6±5.4	3.8±1.0
2013-11-12	49.6±0.7	53.1±1.1	22.7±0.3	24.0±1.0	2.9±0.6

## 参 考 文 献

- 王岩. 海水池塘养殖模式优化: 概念、原理与方法. 水产学报, 2004, 28(5): 568-572
- 王吉桥, 李德尚, 董双林, 等. 中国对虾与海湾扇贝投饵混养的实验研究. 中国水产科学, 1999, 6(1): 97-102
- 林建民, 刘勇, 陈全国. 虾池混养美国红鱼与海湾扇贝试验. 齐鲁渔业, 2000, 17(1): 19
- 国家海洋局. 海洋灾害通报. 2010
- 张雅琪, 俞志明, 宋秀贤, 等. 改性黏土对褐潮生物种 *Aureococcus anophagefferens* 的去除研究. 海洋学报, 2013, 35(3): 197-203
- 张福绥, 何义朝, 刘祥生, 等. 海湾扇贝引种、育苗及试养. 海洋与湖沼, 1986, 17(5): 367-374
- 张福崇, 王六顺, 肖秋立, 等. 2010 年河北省海湾扇贝养殖业调查报告. 河北渔业, 2011(5): 30-32, 37
- 徐永东, 王芳, 王顺全, 等. 混养海湾扇贝对刺参池塘养殖环境的影响. 河北渔业, 2012(11): 11-14
- Bricelj VM, Epp J, Malouf RE. Intraspecific variation in reproductive and somatic growth cycles of bay scallops *Argopecten irradians*. Mar Ecol Prog Ser, 1987, 36(2): 123-137
- Bricelj VM, Kuenster SH. Effects of the "brown tide" on the feeding physiology and growth of bay scallops and mussels. Coastal and Estuarine Studies, 1989, 35: 491-509
- Bricelj VM, Lonsdale DJ. *Aureococcus anophagefferens*: causes and ecological consequences of brown tides in US mid-Atlantic coastal waters. Limnol Oceanogr, 1997, 42(5): 1023-1038
- Gallager SM, Stoecker DK, Bricelj VM. Effects of the brown tide algae on growth, feeding physiology and locomotory behavior of scallop larvae (*Argopecten irradians*). Novel Phytoplankton Blooms, 1989, 511-541
- Gobler C, Berry D, Dyhrman S, et al. Niche of harmful algae *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108(11): 4352-4357
- Probyn T, Pitcher G, Pienaar R, et al. Brown tides and mariculture in Saldanha Bay, South Africa. Mar Pollut Bull, 2001, 42(5): 405-408
- Talmage SC, Gobler CJ. Effects of CO<sub>2</sub> and the harmful algae *Aureococcus anophagefferens* on growth and survival of oyster and scallop larvae. Mar Ecol Prog Ser, 2012, 464: 121-134
- Zhang QC, Qiu LM, Yu RC, et al. Emergence of brown tides caused by *Aureococcus anophagefferens* Hargraves et Sieburth in China. Harmful Algae, 2012(19): 117-124

(编辑 冯小花)

## Studies on Bottom Sowing Culture in Pond and Longline Aquaculture of Late Seedling in Bay Scallop *Argopecten irradians*

WANG Dongzhe<sup>1,2</sup>, MAO Yuze<sup>1①</sup>, FANG Xiao<sup>3</sup>, DU Meirong<sup>1</sup>, ZHANG Fuchong<sup>3</sup>, FANG Jianguang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Carbon-Sink Fisheries Laboratory, Qingdao 266071;

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

3. Hebei Ocean and Fisheries Science Research Institute, Qinhuangdao 066200)

**Abstract** The work of breeding bay scallop seedling has been studied in the past. The breakout of the brown tide in Hebei Area has brought significantly negative effects on the industry of bay scallop. To avoid the outbreak, the breeding of late seedling (parents bay scallop were put into seedling rearing room for breeding at the beginning of April) and a chain of experiments concerning to bottom sowing culture in pond and longline aquaculture were carried out during 2012–2013. The results showed that the average shell length was 59.7 mm for the late seedling (with shell length 5.0–6.1 mm) after bottom sew into pond in June 2012 for 139 days cultivation. In 2012, after a longline aquaculture, the average wet weight, scallop adductor weight and adductor output rate of the late seedling were 28.7 g, 3.8 g and 13.8%, respectively. In 2013, after a longline aquaculture, the average shell height, wet weight and scallop adductor weight were 50.3 mm, 24.4 g and 3.1 g, respectively. The data suggest that the aquaculture of late seedling may reduce the expenditure of 45.5 t coal and 67.5 thousand Yuan per 1000 m<sup>3</sup>. These results also suggest that the planned delay may help to efficiently avoid the adverse effects of brown tide and may serve as a reference to the development of the whole bay scallop cultivation industry.

**Key words** *Argopecten irradians*; Late bay scallop seedling; Bottom sowing culture in pond; Longline aquaculture

① Corresponding author: MAO Yuze, E-mail: maoyz@ysfri.ac.cn

# 急性病毒性坏死病毒魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 克隆和生物信息学分析\*



张 帅<sup>1</sup> 王崇明<sup>1①</sup> 岳志芹<sup>2</sup> 宋晓玲<sup>1</sup> 白昌明<sup>1</sup>  
尹伟力<sup>2</sup> 黄 捷<sup>1</sup>

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

2. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 青岛 266002)

**摘要** 为深入探讨急性病毒性坏死病毒(Acute Viral Necrosis Virus, AVNV)魁蚶株的致病机理以及 IAP-86 蛋白的功能,从感染 AVNV 的濒死魁蚶外套膜中提取总 RNA,反转录获得 cDNA。根据 NCBI 公布的 AVNV 全基因组序列中 ORF86 序列设计两对反向套式引物,通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得 ORF86 5'端和 3'端的非编码区,拼接获得全长 cDNA 序列。Blast 序列比对显示,该基因与牡蛎疱疹病毒的同源性为 100%,与栉孔扇贝 AVNV 的同源性为 99%,并存在重叠基因。生物信息学分析预测,该蛋白不含信号肽,不存在跨膜区,最大疏水指数为 1.800,最小疏水指数为-3.456。该蛋白存在 8 个潜在的磷酸化位点(包括 5 个丝氨酸、1 个苏氨酸和 2 个酪氨酸),存在 1 个潜在的 O-糖基化位点,不存在潜在的 N-糖基化位点;其抗原表位主要集中在 8-11、14-16、28-39、75-76、88-95、97-100 和 147-158 位氨基酸。推测该株病毒可能为牡蛎疱疹病毒的变异株,并且基因重叠在该类病毒进化过程中可能扮演重要角色。

**关键词** 急性病毒性坏死病毒; 魁蚶; 细胞凋亡抑制蛋白; cDNA 末端快速扩增技术; 生物信息学  
**中图分类号** S944 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0085-06

急性病毒性坏死病毒(Acute Viral Necrosis Virus, AVNV)是 20 世纪 90 年代中、末期导致我国北方沿海栉孔扇贝大规模死亡的主要病原(王秀华等, 2002; 艾海新等, 2003; 王崇明等, 2004; 宋微波等, 2001)。任伟成(2009)<sup>1)</sup>完成了 AVNV 全基因组序列的测定,并预测 AVNV 全基因组中含有 123 个潜在的开放阅读框(Open Reading Frames, ORF),其中 44 个 ORF 具有一定的结构和功能,推测可能与病毒 DNA 复制、核酸代谢修饰以及病毒与宿主的相互作用等有关。

魁蚶(*Anadara uropygimelana*)是一种大型的经济价值较高的贝类,为冷水性贝类,主要分布于我国山

东及辽宁沿海、日本、朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海(王如才等, 2008; 吴彪等, 2013; 田吉腾等, 2013)。近几年来随着魁蚶自然资源破坏严重,人工增殖发展迅猛,魁蚶苗种的需求量不断增大,推动了魁蚶育苗产业的发展,但随之而来的病害问题时有发生。2012 年 5 月本课题组在山东省长岛县进行 AVNV 流行病学调查时,发现某育苗场魁蚶亲贝出现大量死亡,采集魁蚶样品,PCR 检测其 AVNV 呈阳性。2013 年 4 月山东省即墨市某育苗场魁蚶亲贝也出现了大规模的死亡现象,样品 AVNV 检测呈阳性,且阳性率达到 100%。由于该病毒的全基因组序列还未测序完成,

\* 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)和国家质检总局科研项目(2013IK040)共同资助。张 帅, E-mail: wosdzhangshuai@163.com

① 通讯作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-28, 收修改稿日期: 2014-04-13

1) 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术的研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27-68



暂且将该株病毒定义为急性病毒性坏死病毒魁蚶株。

杆状病毒凋亡抑制蛋白(Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP)是一类含有 BIR 结构域的家庭蛋白, 该家族蛋白因最先在昆虫杆状病毒中发现而得名。BIR 结构域包含一个保守的组氨酸残基以及 3 个保守的半胱氨酸残基, 某些杆状病毒凋亡抑制蛋白含有保守的指环蛋白结构(Ring), 这个结构可以和 Zn 结合(Deveraux *et al.*, 1999)。IAP 重复序列结构蛋白(BIRP)调节的酶促反应是无脊椎动物防御病毒感染的重要介质, 研究发现 BIR 基因也存在于其他感染无脊椎动物的大型 DNA 病毒中, 如 *Baculoviridae* (Crook *et al.*, 1993)、*Poxviridae* (Afonso *et al.*, 1999)、*Ascoviridae* (Stasiak *et al.*, 2000)和 *Iridoviridae* (Jakob *et al.*, 2001)。Leu 等(2013)在研究 WSSV 感染对虾时发现, WSSV 表达的抑制凋亡蛋白可以有效地抑制病毒感染后诱导的宿主细胞自身凋亡, 便于病毒在宿主体内大量繁殖, 最终导致宿主死亡。

IAP-86 是 AVNV ORF86 编码的含有一个 BIR 结构域的杆状病毒凋亡抑制蛋白, 该蛋白已经成功地在大肠杆菌中进行了原核表达, 细胞凋亡检测试验证明该蛋白能在一定程度上抑制栉孔扇贝细胞凋亡。本研究对 AVNV 魁蚶株进行 IAP-86 基因的全长 cDNA 克隆与分析, 并与已经公布的栉孔扇贝中 AVNV 全基因组序列和牡蛎疱疹病毒全基因组序列进行比对, 不仅有助于通过基因全序列对 IAP-86 基因的功能做进一步研究, 也将为探讨 AVNV 魁蚶株的致病机理提供一定的实验基础和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用魁蚶于 2013 年 4 月取自山东省即墨市某育苗场, AVNV 检测呈阳性。

### 1.2 环化 RACE 克隆 IAP-86 基因全长 cDNA

根据 AVNV 全基因组序列设计的 IAP-86 套式反向引物及特异性引物序列见表 1。

#### 1.2.1 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因 ORF 区的扩增

取 50 mg 魁蚶的外套膜组织, 参照天根公司生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书的方法进行病毒总 DNA 提取。

以提取的病毒总 DNA 为模板, 使用 Primer 5.0 引物设计软件设计特异性引物: 上游引物 IAP-86-F, 下游引物 IAP-86-R。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 进行 35 个循环;

表 1 实验所用引物及序列

Tab.1 Primers used for the PCR analysis

引物序列 Primer	Nucleotide sequence(5'-3')
IAP-86-F	CGGGATCCATGGATATAGTACC
IAP-86-R	CCCAAGCTTGATAACTGCTAAGT
SMARTerAoligo Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACG (G/C)GGG
IAP86-Fo	CGAGCTTTATGAATGGGAGGCTGGTG
IAP86-Ro	TGGGGAAATGTCGTCTGTGTTTCGTATG
IAP86-Fi	CTATTTCTGATTGTAACTTAGCAG
IAP86-Ri	CTCTTTATTCTGAGTTCCTTGGATTCT
GSPRo	TGGGGAAATGTCGTCTGTGTTTCGTATG
GSPRi	CACGCATAGAATTCATACGAACAC
Long primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC

最后 72℃ 延伸 10 min; 产物 4℃ 保存。1%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。将扩增出的约 500 bp 的目的片段进行胶回收, 然后将该目的基因连接至 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)中, 做 TA 克隆并测序。

#### 1.2.2 病毒总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

取检测为阳性的魁蚶外套膜组织约 50 mg 置于 1.5 ml 灭菌的离心管中, 加入 1 ml 的 TRIzol (Invitrogen), 用研磨棒研磨匀浆, 先氯仿抽提, 然后异丙醇沉淀, 加适量无 RNase 水溶解总 RNA。10 μl 反应体系中含有 2.75 μl RNA 模板(浓度为 340 ng/μl)、2 μl 5×First-Stand Buffer、1 μl SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (10 U/μl)、1 μl DTT (20 mmol/L)、1 μl dNTPs (10 mmol/L)、1 μl SMARTerAoligo Primer (10 μmol/L)、0.25 μl RNase Inhibitor (40 U/μl), 1 μl Random Primer (10 μmol/L)。反转录条件为 25℃ 10 min、42℃ 90 min、72℃ 10 min, 反转录合成 cDNA 的第一条链。

#### 1.2.3 环化 RACE 克隆 IAP-86 的 5'和 3'端

对合成的 cDNA 第一条链进行环化, 根据栉孔扇贝 AVNV 全基因组序列(GenBank 检索号: GQ153938)设计套式反向引物(Inverse primer)进行反向 PCR, 获得 IAP-86 cDNA 的 5'端和 3'端连接片段。25 μl 反应体系中含有 2.5 μl 10×ExTaq Buffer、2 μl dNTP (2.5 mmol/L)、1 μl IAP 86-Fo (10 μmol/L)、1 μl IAP86-Ro (10 μmol/L)、0.2 μl ExTaq 酶(40 U/μl) (TaKaRa)、2 μl cDNA 模板, 通过降落 PCR 进行第一重 PCR 扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 30 s, 68-48℃ 按照 2℃ 的梯度差 30 s, 72℃ 1 min, 各个温度梯度都进行 3 个循环; 之后 94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 1 min 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

将扩增产物稀释 10 倍作为模板进行第二重 PCR。25  $\mu$ l 反应体系中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l IAP86-Fi (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l IAP86-Ri (10  $\mu$ mol/L)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l) (TaKaRa)、1  $\mu$ l 上述稀释模板, 进行第二重 PCR。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物经胶回收后进行 TA 克隆, 连接转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 取 100  $\mu$ l 转化细胞涂到含有氨苄青霉素的 LB 平板(50  $\mu$ g/ml) 上, 37 $^{\circ}$ C 过夜倒置培养, 第 2 天挑取单菌落。pMD18-T 通用引物 M13 进行菌落 PCR 验证, 将阳性菌株送上海生工生物工程有限公司进行菌落测序, 获得 IAP-86 基因的 5'端和 3'端的连接序列。

**1.2.4 RACE 克隆 IAP-86 基因的 5'端** 以提取的总 RNA(浓度为 340 ng/ml)为模板, 10  $\mu$ l 反应体系中含有模板 2.75  $\mu$ l, 加入 2  $\mu$ l 5 $\times$ First-Strand Buffer、1  $\mu$ l SMART Scribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase、1  $\mu$ l DTT (20 mmol/L)、1  $\mu$ l dNTPs (10 mmol/L)、1  $\mu$ l SMARTer Aoligo Primer (10  $\mu$ mol/L)、0.25  $\mu$ l RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 基因特异性引物 GSP-Ro (10  $\mu$ mol/L)。反转录条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min、42 $^{\circ}$ C 90 min、72 $^{\circ}$ C 10 min, 反转录合成 cDNA 的第一条链。

第一重 PCR 的反应体系 25  $\mu$ l 中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP(2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l GSP-Ro (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l UPM (0.4  $\mu$ mol/L long primer+2  $\mu$ mol/L short primer)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l、TaKaRa)、2  $\mu$ l cDNA 模板, 通过降落 PCR 进行第一重 PCR 扩增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68–48 $^{\circ}$ C 按照 2 $^{\circ}$ C 的梯度差 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 各个温度梯度都进行 3 个循环; 之后 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将扩增产物稀释 10 倍作为模板进行第二重 PCR, 25  $\mu$ l 反应体系中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l GSP-Ri (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l short primer (10  $\mu$ mol/L)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l、TaKaRa)、1  $\mu$ l 上述稀释模板, 进行第二重 PCR。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、48 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物经胶回收后进行 TA 克隆, 连接转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 取 100  $\mu$ l 转化细胞涂到含有氨苄青霉素的 LB 平板(50  $\mu$ g/ml)上, 37 $^{\circ}$ C 过夜倒置培养, 第 2 天挑取单菌落, 用 pMD18-T 的通用引物 M13 进行菌落 PCR 验证, 将阳性菌株送上海生工生物工程有限公司进行菌落测序, 获取 IAP-86 基因的 5'末端。

**1.2.5 IAP-86 基因 3'端序列的获取和全长 IAP-86**

**cDNA 的序列拼接** 将获得的 5'端和 3'端连接序列与获得的 5'端序列以及获得的开放性阅读框序列使用 Accelrys Gene 软件找出使用的引物序列, 去除载体序列, 去掉重叠片段, 拼接获得 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 序列。

### 1.3 IAP-86 基因的生物信息学分析

运用生物信息学在线软件 TMpred 进行跨膜区预测, SingalP4.1 Server 信号肽切割位点预测, ProtScale 进行疏水性分析, <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>在线软件进行抗原表位分析, Net-O-Glyc 1.0 进行 O-糖基化位点预测, Net-N-Glyc 1.0 进行 N-糖基化预测, Net Phos 2.0 进行磷酸化位点预测, 同时使用 DNASTar 7.1 (Protean)软件对 IAP-86 蛋白进行疏水指数和抗原表位分析。将得到的 IAP-86 基因序列和氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 寻找与其同源性较高的基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 IAP-86 基因全长 cDNA 的克隆

通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了 IAP-86 基因的 5'端和 3'端, 将所得到的片段和获得的 IAP-86 的开放性阅读框 ORF86 进行拼接, 获得了 IAP-86 基因的 cDNA 全长序列, 其中 5'端非编码区为 196 bp, 3'端非编码区为 37 bp, 全长为 746 bp, 编码 170 个氨基酸(图 1)。通过与 NCBI 上的牡蛎疱疹病毒和栉孔扇贝 AVNV 序列比对, 结果显示该基因的 cDNA 全长序列与牡蛎疱疹病毒有 100%的相似度, 与栉孔扇贝 AVNV 有 99%的相似度, 其差别在于 3'的非编码区的两个碱基不同, 分别为栉孔扇贝 AVNV 的第 92 个碱基 T 突变为 G, 第 173 个碱基 T 突变为 C。三者的开放阅读框序列完全相同, 并且 5'端的非编码区与 AVNV 的 ORF85 有 181 个碱基发生重叠。

### 2.2 IAP-86 基因的生物信息学分析

通过生物信息学分析软件对 IAP-86 蛋白的二级结构进行分析, 结果显示, IAP-86 蛋白的二级结构中不含有信号肽; 不存在跨膜区; 最大疏水指数为 1.800, 最小疏水指数为-3.456; 其抗原表位主要集中在 8–11、14–16、28–39、75–76、88–95、97–100、147–158 位氨基酸; 存在 1 个潜在的 O-糖基化位点(与第一个丝氨酸位点位置一致), 不存在潜在的 N-糖基化位点; 在进行磷酸化位点预测时, 结果显示, 当阈值取 0.5 时, 其氨基酸存在 8 个潜在的磷酸化位点(包

ctgtcatatatacatagatacatcaatgaattactcacaagacatgaaaaggataggctgtttttgattgctataactcggggtgtgtgg  
tgatcaataataatggctgaaatttcaaaaggatattttatcctataaaaagcataactcgtgtataaccattcagtcataataaaacacaaac  
ATGGATATAGTACCAATATCACCATATGAGAGAATGAGACCTTTGAGAGAATCCAAGG  
 M D I V P I S P Y E R M R P L R E S K  
 AACTCAGAATAAAGAGCTTCGATGACCATCGGTGGCCACACAAGAACAATCCAGTTAT  
 E L R I K S F D D H R W P H K N N P V M  
 GACGAAGAACATGATAGAAAACACTTTTACTACATTGGTATAAATGATAAGATACAAT  
 T K N M I E N Y F Y Y I G I N D K I Q  
 GTGTACACTGTGGAGGTGTAATTTCCGGGATTTTAGAAGAAGACACGCATAGAATTTCA  
 C V H C G G V I S G F L E E D T H R I S  
 TACGAACACAGACGACATTTCCCAAATGTCCTGTTGAAAATATCGGCATCCAGGATA  
 Y E H R R H F P K C P V G K Y R H P G Y  
 TCACCTCGATGCCGAGAGATTGAAAAGTTTCAAAAATTGGCGCTATGAGAACATAGTG  
 H L D A E R L K S F K N W R Y E N I V  
 AGAAAGATGGACTTGGTTGCAGCGGGATTGTTCTATACCGGCATTGAAGATAGATGTGC  
 R K M D L V A A G L F Y T G I E D R C A  
 CTGCCACCAATGTGGGAACGAGCTTTATGAATGGGAGGCTGGTGATAACCCCAAAGAG  
 C H Q C G N E L Y E W E A G D N P K E  
 GAACATAAAAGACTATTTCCTGATTGTAACTTAGCAGTTATTAAttttacattacaataaaagatatg  
 E H K R L F P D C K L S S Y \*  
 taaagttaact

图 1 AVNV IAP-86 基因的核苷酸序列及推导出的氨基酸序列  
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of AVNV IAP-86

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用方框标明; 5' UTR 和 3' UTR 用小写字母表示;  
与 ORF85 的重叠序列用下划线标明; 突变碱基上标有箭头; 磷酸化位点用灰色阴影标明

The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) were noted in box; 5' UTR and 3' UTR were shown by lower-case letters; The overlapping sequences with ORF85 were marked by underline; The mutational bases were marked with arrows; The phosphorylation sites were shaded in gray

括 5 个丝氨酸、1 个苏氨酸和 2 个酪氨酸位点)。

通过 Blast 比对基因序列, 结果显示, 没有发现同源基因序列, 将氨基酸序列进行 Blast 比对后显示 IAP-86 的氨基酸序列与牡蛎杆状病毒抑制蛋白的氨基酸序列在某些氨基酸区域有一定的同源性, 但同源性不高。

### 3 讨论

Le Deuff 等(1996)研究发现, 牡蛎疱疹病毒在低于 23℃ 的环境下无法组装成完整的病毒粒子。由 AVNV 引起的栉孔扇贝大规模死亡主要集中在水温高于 23℃ 的夏季高温季节, 流行病学调查数据显示魁蚶亲贝发生死亡时的水温较低, 只有 15℃ 左右。鉴于两者的发病环境有较大区别, 因此推测该病毒可能是栉孔扇贝 AVNV 或者牡蛎疱疹病毒的变异株。

IAP 家族蛋白最先在杆状病毒中被发现, 目前已经在病毒、酵母以及人类等多种生物类群中发现其同源蛋白, 虽然 IAP 在脊椎动物的大型 DNA 病毒中还没有发现, 但在无脊椎动物大型 DNA 病毒中广泛存在, 栉孔扇贝 AVNV 属于其中的一种。IAP 对病毒能够在宿主体内大量繁殖起到重要作用, 如果没有 IAP 起抑制细胞凋亡的功能, 那么被感染细胞在病毒感染宿主的早期就可能会发生凋亡, 失去宿主的病毒还没

有获得大量繁殖就被释放, 也就不能在宿主体内持续进行增殖。

根据已经公布的栉孔扇贝 AVNV 全基因组序列, 本研究通过环化 RACE 技术克隆得到 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因的全长 cDNA 序列, 在 NCBI 上进行 blast 序列比对, 显示该基因与牡蛎疱疹病毒有 100% 的相似度, 与栉孔扇贝 AVNV 有 99% 的相似度, 其差别在于 3' 的非编码区的两个碱基不同, 但由于碱基变异位置位于非编码区内, 所以并不影响两者编码的氨基酸的不同。目前有关基因突变的研究主要集中在编码区中, 有关非编码区基因突变的研究较少, 但非编码区的基因突变在控制基因表达以及表达强弱方面发挥着重要作用。在 RNA 病毒中, 5' 和 3' 的 UTR 末端核苷酸可形成保守的二级结构, 并参与病毒的复制和翻译, 某些区域的变化影响着病毒毒力的强弱 (Cahour *et al*, 1995; Men *et al*, 1996)。5' UTR 中的启动子是基因的一个重要组成部分, 控制基因的转录和表达的程度。启动子的重要组成部分包括许多短的核苷酸序列即转录因子结合位点, 这些结合位点对转录既有促进作用又有抑制作用(唐潇等, 2013; Simon-Lorieri *et al*, 2013)。启动子上有一个核心区域对于转录的起始非常重要, 在起始转录时要与 RNA 聚合酶进行特异性结合(Smale *et al*, 2003)。序列比对结果在

一定程度上表明, AVNV 魁蚶株极有可能是从牡蛎疱疹病毒变异而来。序列比对还显示, 在扩增序列的 5'端非编码区与 AVNV 的 ORF85 有 181 个碱基重叠, 表明在该类病毒中存在基因重叠。重叠基因指两个或两个以上的结构基因有一段相同 DNA 顺序的现象。重叠基因不仅可经济利用基因组, 而且可能起表达调控的作用。重叠基因主要存在于噬菌体和病毒中, 而在真核生物中却很少发现重叠基因, 这可能因为前者基因组比较小, 但又必须要编码一些维持其生命和繁殖的基因, 在选择压力下而保留了这种重叠基因的形式。研究表明, 基因重叠在减少病毒同义基因突变、维持病毒稳定性、减缓病毒进化速率方面发挥重要作用(Torres *et al.*, 2013; Zhang, 1998)。Behura 等(2013)发现, 基因重叠现象也同样存在于昆虫中, 并对其进化过程起到一定作用。

通过生物信息学分析显示, IAP-86 蛋白既不含信号肽也不存在跨膜区, 表明 IAP-86 蛋白合成后不能被分泌到细胞外, 而是在细胞内部发挥作用, 而凋亡抑制蛋白 IAP 主要通过参与在细胞内参与有丝分裂原激活蛋白-Jun 激酶 1 (MAP-JUNK1)介导的信号通路中抑制 Caspase 的活性来发挥抵抗细胞凋亡的作用。分析显示, 该蛋白二级结构以  $\alpha$  折叠和  $\beta$  转角为主, IAP-86 的最大疏水指数为 1.800, 最小疏水指数为 -3.456, 其抗原表位主要集中在亲水区。分析还发现 IAP-86 蛋白存在一个 O-糖基化位点和 8 个磷酸化位点, 推测其翻译后修饰主要为磷酸化修饰。将基因序列和氨基酸序列通过 Blast 序列比对, 显示 IAP-86 的氨基酸序列与牡蛎杆状病毒凋亡抑制蛋白的氨基酸序列有一定的同源性, 推测该病毒的部分基因序列可能是从宿主基因组序列中获得的, 而证实这一猜想还需要更进一步的研究工作。

本研究克隆得到了 AVNV 魁蚶株的 IAP-86 基因的全长 cDNA 序列, 通过序列比对证实了 AVNV 魁蚶株的 IAP-86 基因与栉孔扇贝 AVNV 和牡蛎疱疹病毒的同源性分别达到 99%和 100%, 其编码的蛋白质完全相同, 并且证实在该类病毒中存在病毒界普遍存在的基因重叠现象。通过生物信息学分析了该蛋白的二级结构、抗原性、亲水性和疏水性以及糖基化和磷酸化位点, 为进一步从蛋白结构上了解 IAP-86 蛋白的相关功能提供了理论基础。

## 参 考 文 献

王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008

- 王秀华, 王崇明, 李筠, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查. 水产学报, 2002, 26(2): 149-155
- 田吉腾, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传多样性微卫星分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 59-67
- 艾海新, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究. 中国水产科学, 2003, 10(5): 386-391
- 王崇明, 王秀华, 艾海新, 等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究. 水产学报, 2004, 28(5): 547-553
- 宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. 海洋科学, 2001, 25(12): 23-26
- 吴彪, 于涛, 杨爱国, 等. 不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 64-68
- 唐潇, 李辉亮, 郭冬, 等. 巴西橡胶树 HbWRKY1 基因 5'调控序列的克隆及功能初步鉴定. 热带作物学报, 2013, 34(4): 630-635
- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, *et al.* The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. *J Virol*, 1999, 73(1): 533-552
- Behura SK, Severson DW. Overlapping genes of *Aedes aegypti*: evolutionary implications from comparison with orthologs of *Anopheles gambiae* and other insects. *BMC Evol Biol*, 2013, 13(1): 124-135
- Cahour A, Pletnev A, Vazeille-Falcoz M, *et al.* Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology*, 1995, 207(1): 68-76
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 1993, 67(4): 2168-2174
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO*, 1999, 18(19): 5242-5251
- Jakob NJ, Müller K, Bahr U, *et al.* Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate Iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo iridescent virus*. *Virology*, 2001, 286(1): 182-196
- Le Deuff RM, Renault T, Gerard A. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org*, 1996, 24(2): 149-157
- Leu JH, Lin SJ, Huang JY, *et al.* A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(4): 1011-1017
- Men R, Bray M, Clark D, *et al.* Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol*, 1996, 70(6): 3930-3937
- Simon-Loriere E, Holmes EC, Pagán I. The effect of gene overlapping on the rate of RNA virus evolution. *Mol Biol*

- Evol, 2013, 30(8): 1916–1928
- Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Ann Rev Biochem*, 2003, 72(1): 449–479
- Stasiak K, Demattei MV, Federici BA, *et al.* Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double-stranded DNA genomes. *J Gen Virol*, 2000, 81(12): 3059–3072
- Torres C, Fernández MDB, Flichman DM, *et al.* Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. *Virol*, 2013, 441(1): 40–48
- Zhang MQ. Identification of human gene core promoters in silico. *Genome Res*, 1998, 8(3): 319–326

(编辑 冯小花)

## Full Length cDNA Cloning and Bioinformatics Analysis of Acute Viral Necrosis Virus IAP-86 Gene From *Anadara uropygimelana*

ZHANG Shuai<sup>1</sup>, WANG Chongming<sup>1</sup>①, YUE Zhiqin<sup>2</sup>, SONG Xiaoling<sup>1</sup>,  
BAI Changming<sup>1</sup>, YIN Weili<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002)

**Abstract** Acute viral necrosis virus (AVNV) was reported as the causative agent for summer mass mortality of adult Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) that has been widely cultured along northern China coast. To understand the pathogenesis and the function of IAP-86, a strain of acute viral necrosis virus (AVNV) was isolated from *Anadara uropygimelana*. RNA was extracted from the mantle of moribund *A. uropygimelana* that was infected with AVNV, and cDNA was obtained by reverse transcription. Two pairs of nested reverse primer were designed according to the ORF86 sequence of AVNV complete genome sequence that registered in NCBI. The non-coding region of 5' and 3' end of the ORF86 were amplified using the designed primers by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique, and the full-length cDNA sequences were spliced. Blast sequence alignment illustrated that this gene has 100% homology with oyster herpesvirus and 99% with the AVNV. Moreover, overlapping genes were found in the cDNA sequence. Bioinformatics analysis indicated that the protein contains neither a signal peptide nor a transmembrane region. The maximum hydrophobic index was 1.800 and the minimum hydrophobic index was -3.456. There are eight potential phosphorylation sites (including five serine sites, two tyrosine sites and one threonine site), a potential O-glycosylation site, but no potential N-glycosylation site. The epitope were mainly located on the amino acids of 8–11, 14–16, 28–39, 75–76, 88–95, 97–100 and 147–158. Results suggest that the virus may be a strain of oyster herpesvirus, and gene overlapping may play an important role in the virus evolution.

**Key words** Acute viral necrosis virus; *Anadara uropygimelana*; Inhibitor of apoptosis protein; RACE; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

# 低盐环境对3种规格刺参(*Apostichopus japonicus*) 幼参生长与消化酶活力的影响\*



赵斌<sup>1,2</sup> 胡炜<sup>1,2</sup> 李成林<sup>1,2①</sup> 韩莎<sup>1,2</sup> 董晓亮<sup>3</sup>  
王波<sup>4</sup> 姜涛<sup>4</sup>

(1. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104; 2. 山东省海水健康养殖工程技术研究中心 青岛 266104;  
3. 东营海跃水产科技有限公司 东营 257500; 4. 日照海山水产有限公司 日照 276800)

**摘要** 为探明低盐环境中刺参幼参各生长阶段的消化酶活力变化,采用实验生态学方法,测定了低盐(16、18、20、22、24)环境中3种规格,体质量分别为(28.37±3.21)g、(7.52±1.25)g、(2.03±0.68)g的刺参幼参生长和肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活力。结果显示,3种规格刺参特定生长率变化趋势一致,随盐度升高而升高。盐度16时,特定生长率最低,与对照组差异显著( $P<0.05$ ),刺参身体不能正常自然伸展,多数个体匍匐在水槽底部,几乎不摄食;盐度31时,特定生长率最高。在盐度16–24范围内,刺参消化道内蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶活性变化趋势一致,随盐度的升高而升高;盐度24时,蛋白酶活性均达到最高水平,与对照组差异不显著( $P>0.05$ ),小规格刺参肠道蛋白酶活性在盐度20、22时无显著差异( $P>0.05$ );盐度20、22、24实验组淀粉酶活性无显著差异( $P>0.05$ ),中规格刺参淀粉酶活性在盐度22升至24时出现显著增高( $P<0.05$ );大规格刺参肠道脂肪酶活性在盐度20升至22时出现显著增高( $P<0.05$ ),小规格刺参在盐度升至24时脂肪酶活性出现显著增高( $P<0.05$ );当盐度高于24时3种消化酶活性随盐度升高而降低。

**关键词** 刺参;低盐;生长;消化酶

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0091-06

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinopermata)、海参纲(Holothurodidea)、楯手目(Aspidochirotida)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*),是我国常见海参种类中营养价值最高,深受消费者喜爱的品种(李成林等,2010)。近年来随着人民生活水平提高和保健意识的增强,刺参市场需求剧增,刺激了养殖业的蓬勃发展(唐黎等,2007)。目前刺参产业带由传统的自然分布区域拓展到其他沿海地区,其中包括山东省黄河三角洲与丁字湾等盐度偏低且不稳定海区(胡炜等,2012),开展低盐环境对刺参生长影响的研究不仅可为刺参健康养

殖提供基础数据,还可以为刺参适养区域的拓展提供参考。

盐度是海水养殖环境中的重要生态因子,其变化对水产动物的生长和消化生理活动有显著影响(李刚等,2011),而消化酶则是决定机体营养吸收与生长性能的重要因素。近年来有关盐度对消化酶影响方面的相关研究对象主要为鱼类(陈品健等,1998;庄平等,2008;Chen *et al*,2006)和虾类(孙建明等,1995;潘鲁青等,1997;黄凯等,2007),而研究盐度对刺参影响的相关报道多集中于生存和生长方面(陈勇等,2007;王国利等,2007;唐黎等,2007;孙双双等,2009),涉及较低

\*国家“863”计划(2012AA10A412)、国家海洋局海洋公益性行业科研专项经费项目(201305001-4)、山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设(SDAIT-08-011-01)、山东省农业良种工程项目(2014-2016)、山东省科技发展计划项目(2014GNC111022)和山东省农业重大应用技术创新课题(2011-2014)共同资助。赵斌, E-mail: jmbzster@gmail.com

① 通讯作者:李成林,研究员, E-mail: lcl\_xh@hotmail.com

收稿日期:2014-05-01,收修改稿日期:2014-07-09

盐度特别是长期低盐环境对刺参消化酶活力影响的研究报道尚不多见。本研究重点探讨了低盐环境条件对不同规格刺参幼参生长及消化酶活力的影响,旨在探明低盐环境下刺参幼参各生长阶段的消化生理状态,为刺参耐低盐品系的选育研究提供技术支撑,并为养殖生产中水体盐度环境调控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用刺参于2013年4月采集于山东省莱阳市水产养殖总公司刺参生态养殖池塘,运输至山东省海洋生物研究院种质资源研究中心鳌山卫实验室进行实验。设置3种不同规格的刺参为研究对象,大规格(L)平均体质量(28.37±3.21)g,中规格(M)平均体质量(7.52±1.25)g,小规格(S)平均体质量(2.03±0.68)g。刺参运到实验室后,按不同规格分别暂养在多个水族箱中,连续充气,使其适应实验室环境(盐度31, pH 8.1±0.2, 水温16–18℃)。暂养期间,日投喂刺参专用配合饲料1次,投饵量为刺参总重的3%–5%,同时按配合饲料与海泥重量比为1:5的比例搭配投喂海泥。选取表现正常、肉刺完整挺直、健康无病的刺参作为实验对象。

### 1.2 实验设计

设置不同盐度16、18、20、22、24五个处理组,以盐度31的自然海水为对照组。用经自然曝晒的自来水与自然海水混合的方式降低盐度,每天降低两个盐度单位,直至达到实验盐度,并在实验盐度条件下对刺参进行驯化养殖5d。驯化结束后,禁食48h,分别将刺参放置于水族箱(45 cm×35 cm×30 cm)中,按刺参规格不同,每个水族箱内放入大规格刺参10头、中规格刺参20头、小规格刺参30头,每个处理设置3个平行组。实验进行30d。

### 1.3 日常管理

实验期间连续充气,每天全量换水1次,用虹吸法清除残饵与粪便,换水前后水温差<1℃,盐度差<1。每天17:00投喂饲料1次。

### 1.4 测定方法与数据计算

**1.4.1 特定生长率(SGR)的测定** 实验开始前,停止投喂48h,刺参肠道内食饵及粪便排空后,将每个水族箱内刺参取出称质量,初始体质量为 $W_0$ (g);实验结束后,同样停止投喂48h,刺参排空肠道内食饵及粪便后,将每个水族箱内的刺参取出称重,结果体

质量为 $W_t$ (g)。称重时,首先将刺参取出阴干10min,然后用吸水纸将刺参体表水分吸干,尽量避免体表水分所引起的称量误差。 $t$ 为实验持续的时间(d)。刺参特定生长率 $SGR$ (%/d)采用以下公式计算:

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

**1.4.2 消化酶活力的测定** 取实验刺参,沿腹部剪开,取出消化道,剔除呼吸树,用超纯水冲洗干净,在-80℃超低温冰箱中保存。实验时取肠组织置于玻璃匀浆器中,加入10倍体积预冷的超纯水,在冰浴条件下匀浆20min,在高速冷冻离心机中(0–4℃, 1000 r/min)离心30min,所得上清液置于冰箱保存待测(姜令绪等,2007)。

刺参肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活力测定所需试剂均购买于南京建成生物技术公司,使用其生产的相对应试剂盒(蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶试剂盒编号分别为A080-1、C016、A054)进行测定。3种消化酶测定原理、酶单位定义及测定操作方法均参照试剂盒说明书。

酶液中蛋白质含量的测定:以标准牛血清蛋白作标准,采用考马斯亮蓝G-250法测定。各种酶活力均以比活力表示,即每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数。

**1.4.3 数据统计** 实验数据利用SPSS 17.0软件进行单因子方差分析和多重比较,以 $P<0.05$ 作为不同处理之间显著差异的标志。

## 2 结果

### 2.1 低盐环境对刺参特定生长率的影响

低盐环境中3种不同规格刺参特定生长率的变化如表1所示。在盐度16–24范围内,3种规格刺参特定生长率随盐度的升高而升高。盐度低于20时,3种规格刺参特定生长率均为负值,刺参体质量表现为负增长。盐度16时,刺参特定生长率最小,与其他各盐度实验组及对照组差异显著( $P<0.05$ );盐度31时,刺参特定生长率最大,L、M、S三种规格分别为0.83、0.81、0.98%/d。在盐度18–24范围内,大、小规格刺参各实验组特定生长率与对照组差异显著( $P<0.05$ );盐度高于20时,中规格刺参实验组特定生长率与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。

经实验前渐变式降盐驯化,在低盐环境中的3种规格实验刺参全程无死亡。当盐度16、18时,刺参身体不能正常自然伸展,体表疣突逐渐趋向钝圆平滑,多数个体匍匐在水槽底部,吸附能力差,几乎不摄食、残饵多,粪便极少。盐度20时,刺参个体活动能力较强,摄食量增大,粪便增多。当盐度高于

表 1 不同盐度下 3 种规格刺参特定生长率 SGR (%/d)  
Tab.1 The SGR of three-sized sea cucumber at different salinities

规格 Size	盐度 Salinity					
	16	18	20	22	24	31
L	-0.77±0.19 <sup>a</sup>	-0.57±0.21 <sup>b</sup>	-0.08±0.14 <sup>b</sup>	0.10±0.17 <sup>c</sup>	0.12±0.24 <sup>c</sup>	0.83±0.24 <sup>d</sup>
M	-0.52±0.25 <sup>a</sup>	-0.32±0.12 <sup>a</sup>	0.34±0.21 <sup>b</sup>	0.64±0.30 <sup>bc</sup>	0.73±0.26 <sup>c</sup>	0.81±0.27 <sup>c</sup>
S	-0.74±0.12 <sup>a</sup>	-0.58±0.34 <sup>a</sup>	-0.45±0.10 <sup>b</sup>	0.14±0.25 <sup>b</sup>	0.55±0.14 <sup>c</sup>	0.98±0.21 <sup>d</sup>

注: 同行中标有不同字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )

Note: The means with different letters within the same line are significantly different at the 0.05 probability level ( $P<0.05$ )

20 时, 刺参身体能够自然伸展, 疣突尖长, 活动能力强, 能够自由爬行, 附着在槽壁上, 摄食量大, 粪便明显增多, 与自然海水盐度条件下的状态相比未见明显异常, 实验结束时刺参体质量明显增加。

## 2.2 低盐环境对刺参消化酶活力的影响

**2.2.1 低盐环境对刺参蛋白酶活力的影响** 不同盐度对 3 种不同规格刺参消化道蛋白酶活力的影响如图 1 所示。在盐度 16–24 范围内, 刺参消化道蛋白酶活性随盐度的提高而升高。在盐度 16 时, 3 种规格刺参肠道蛋白酶活性均达到最低水平, 与对照组差异显著( $P<0.05$ ); 盐度 24 时, 蛋白酶活性均达到最高水平, 与对照组差异不明显( $P>0.05$ )。

在盐度从 20 升至 22 时, 大、中两种规格刺参肠道蛋白酶活性均呈现显著升高( $P<0.05$ ); 小规格刺参肠道蛋白酶活性在盐度 20、22 时无显著差异( $P>0.05$ )。此外, 在同一盐度水平下, 不同规格的刺参蛋白酶活性有差异。在盐度 16 时, 中、小规格刺参蛋白酶活性高于大规格刺参。但随盐度升高, 大规格刺参蛋白酶活性急剧升高, 当盐度高于 20 时, 不同规格刺参

蛋白酶活性均可以维持在较高水平。

**2.2.2 低盐环境对刺参淀粉酶活性的影响** 不同盐度对 3 种不同规格刺参消化道淀粉酶活性的影响如图 2 所示。在盐度 16–24 范围内, 刺参肠道淀粉酶活性呈现随盐度提高而升高的趋势。盐度 16 时, 3 种规格刺参肠道淀粉酶活性均处于最低水平。盐度 16、18 实验组中, 大规格刺参淀粉酶活性与对照组差异不显著( $P>0.05$ ); 当盐度从 18 升高至 20 时, 淀粉酶活性升高; 盐度 20、22、24 实验组淀粉酶活性无显著差异( $P>0.05$ ), 与其他实验组及对照组差异显著( $P<0.05$ )。中规格刺参淀粉酶活性在盐度 22 升至 24 时出现显著增高( $P<0.05$ ), 小规格刺参淀粉酶活性在盐度 20 升至 22 时出现类似的变化规律。

**2.2.3 低盐环境对刺参脂肪酶活性的影响** 不同盐度对 3 种不同规格刺参消化道脂肪酶活性的影响如图 3 所示。在盐度 16–24 范围内, 刺参肠道脂肪酶活性呈现随盐度的提高而升高的变化趋势, 同蛋白酶及淀粉酶活性变化趋势基本一致。当盐度降至 16 时, 3 种规格刺参肠道脂肪酶活性均处于最低水平, 与对照组有明显差异( $P<0.05$ ); 在盐度 24 时脂肪酶活性

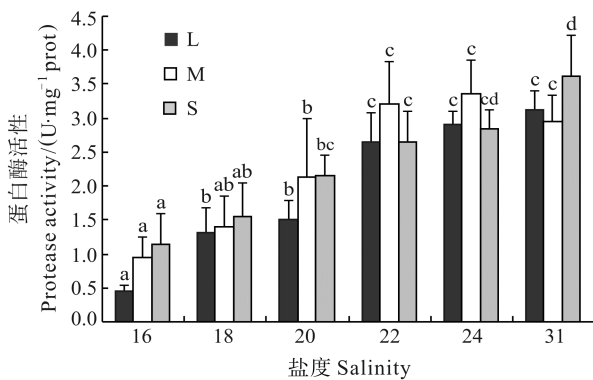


图 1 不同盐度对刺参蛋白酶活力的影响  
Fig.1 The effects of different salinity on the protease activity of sea cucumber

不同的字母表示显著性差异( $P<0.05$ )  
Different letters on the graph mean significant difference ( $P<0.05$ )

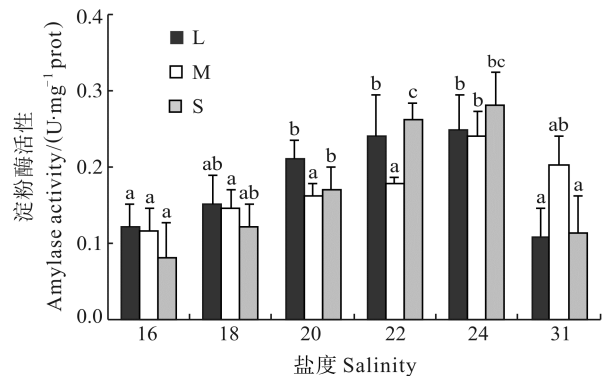


图 2 不同盐度对刺参淀粉酶活性的影响  
Fig.2 The effects of different salinity on the amylase activity of sea cucumber

不同的字母表示显著性差异( $P<0.05$ )  
Different letters on the graph mean significant difference ( $P<0.05$ )



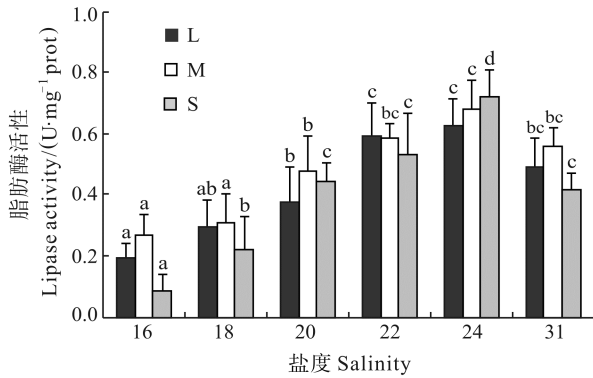


图3 不同盐度对刺参脂肪酶活性的影响

Fig.3 The effects of different salinity on the lipase activity of sea cucumber

不同的字母表示显著性差异( $P<0.05$ )

Different letters on the graph mean significant difference ( $P<0.05$ )

达到最大,与低于盐度 22 的各实验组有明显差异( $P<0.05$ )。大规格刺参肠道脂肪酶活性在盐度 20 升至 22 时出现显著增高( $P<0.05$ ),小规格刺参是在 22 升至 24 时脂肪酶活性出现显著增高( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 低盐环境与消化酶对刺参生长的影响

自然界中水生动物通过消耗自身能量来调节渗透压,当体液与外界水体的渗透压相等时,机体消耗能量最少(Dalla, 1986; 王国利等, 2007)。在本研究中,当盐度高于 22 时,刺参活力强,活动频繁,摄食旺盛,生长速度快;盐度低于 22 高于 20 时,刺参生长较为缓慢;当盐度低于 20 时,刺参用于调节渗透压的耗能增大,出现负生长,3 种不同规格的刺参均呈现这一生长规律。

消化酶活性与水产动物的营养吸收和生长密切相关。刺参肠道内含有的消化酶种类繁多,蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶就是其中主要 3 种消化酶。蛋白酶是一种内源性消化酶,分布在刺参消化道内各个部位(付雪艳, 2004)<sup>1)</sup>,活性最高;淀粉酶也是刺参主要的消化酶,活性仅次于蛋白酶(姜令绪等, 2007; 唐黎等, 2007);脂肪酶同蛋白酶一样同属内源性消化酶(Shimizu *et al*, 1994),在刺参消化酶(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)中活力最低(姜令绪等, 2007)。本研究结果表

明,消化酶活性水平的高低直接决定了刺参的生长性能,当消化酶活性维持在较高水平时,促进了刺参对营养物质的消化吸收,从而使刺参保持了较快的生长速度。

#### 3.2 盐度变化对刺参消化酶活性的影响

许多研究表明,盐度会对水生动物的消化酶活性产生影响。陈品健等(1998)研究认为,盐度能够反映水体环境中无机离子的含量,对刺参消化酶活性的影响就是通过无机离子对酶的直接作用来实现的。许多无机离子是消化酶的激活剂或抑制剂(Squires *et al*, 1986),离子浓度不同,其影响程度也不相同(李刚等, 2011)。田相利等(2008)研究也发现,水中的无机离子作用于酶可能是盐度影响消化酶活性的主要原因。庄平等(2008)研究发现,无机离子可直接对酶产生作用。这些研究结果均表明,盐度能够影响水生动物的消化酶活性,就是通过调节渗透压的方式来产生影响。在本研究中,盐度不同程度地大幅降低使刺参体内环境渗透压梯度差增大,为维持渗透压平衡刺参需要大量摄入海水,从而导致消化道内无机离子的增加,进而影响了刺参消化酶活力的活性。

在低盐环境条件下 3 种消化酶变化的研究结果表明,当盐度在 20-24 范围时,刺参肠道消化酶活性均高于正常盐度 31 时的水平或与之相当,这说明在一定范围内低盐度对刺参消化酶活性有一定的激活作用;随着盐度从 24 下降至 16,蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性均逐渐降低,直至正常水平以下,其原因为渗透胁迫渐强,超出其耐受范围,刺参生理代谢功能下降所致。本研究结果与孙双双等(2009)提出的在一定盐度范围内,盐度变化可对刺参消化酶活性产生激活、无影响、抑制等 3 种作用情况的结论基本一致。实验中大、中、小 3 种规格刺参消化酶活性发生显著变化时的盐度并不一致,可能是由于刺参在生长过程中对其消化酶活性产生激活与抑制作用的盐度范围发生了改变。

此外, Babkin(1950)研究发现,动物体内不同消化酶活性之间存在关联。当一种酶活性发生变化时,其他消化酶的活性也会同时产生相应的变化。例如,当其中一种酶活性升高或降低的同时,其他消化酶的活性也随之升高或降低。在本研究中,刺参 3 种消化酶活力随着盐度变化趋势基本一致,也证明了这一结论。

1) 付雪艳. 海参消化蛋白酶的初步研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2004, 52-54

## 参 考 文 献

- 王国利, 祝文兴, 李兆智, 等. 温度与盐度对刺参生长的影响. 山东科学, 2007, 20(3): 6-9
- 田相利, 任晓伟, 董双林, 等. 温度和盐度对半滑舌鳎幼鱼消化酶活性的影响. 中国海洋大学学报, 2008, 38(6): 895-901
- 庄平, 章龙珍, 田宏杰. 盐度对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 198-203
- 孙建明, 刘亚杰, 周遵春. 不同生长时期中国对虾蛋白酶、脂肪酶活性变化的研究. 水产科学, 1995, 14(2): 11-13
- 孙双双, 张云. 盐度对刺参消化酶活力的影响. 中国饲料, 2009, 20(24): 28-31
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 126-132
- 李刚, 唐学玺, 窦勇, 等. 盐度对刺参消化酶活力的影响. 海洋环境科学, 2011, 30(1): 61-63
- 陈品健, 王重刚, 郑森林. 盐度影响真鲷幼鱼消化酶活力的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 754-755
- 陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响. 水产学报, 2007, 31(5): 687-691
- 胡炜, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 92-96
- 姜令绪, 杨宁, 李建, 等. 温度和pH对刺参消化酶活力的影响. 海洋与湖沼, 2007, 38(5): 476-480
- 唐黎, 王吉桥, 许重, 等. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性. 水产科学, 2007, 26(5): 275-277
- 黄凯, 杨鸿昆, 战歌, 等. 盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活力的影响. 海洋科学, 2007, 31(3): 37-40
- 潘鲁青, 王克行. 中国对虾幼体消化酶活力的实验研究. 水产学报, 1997, 21(1): 26-31
- Babkin BP. Secretory mechanism of the digestive glands, Second edition. New York: Paul B Hoeber Inc, 1950
- Chen MY, Zhang XM, Gao TX, et al. Effects of temperature, pH and NaCl on protease activity in digestive tract of young turbot, *Scophthalmus maximus*. Chin J Oceanol Limnol, 2006, 24(3): 300-306
- Dalla VGJ. Salinity response of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus* I. Oxygen consumption and estimation of productivity. Aquaculture, 1986, 55(4): 297-306
- Shimizu M, Mikami I, Takahashi K. On accelerating maturity of sea cucumber with controlled temperature and its artificial seed-rearing, histochemical detection on the ontogenic development of digestive enzymes in the intestine of a juvenile sea cucumber *Stichopus japonicus*. Bull Fac Fish Hokkaido Univ, 1994, 45(1): 1-8
- Squires EJ, Haard NF, Feltham LAW. Gastric proteases of Greenland cod *Gadus ogac*. Biochem Cell Biol, 1986, 64(3): 215-221

(编辑 刘丛力)

## The Effects of Low Salinity on the Growth and Activities of Digestive Enzymes in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

ZHAO Bin<sup>1,2</sup>, HU Wei<sup>1,2</sup>, LI Chenglin<sup>1,2</sup>①, HAN Sha<sup>1,2</sup>, DONG Xiaoliang<sup>3</sup>, WANG Bo<sup>4</sup>, JIANG Tao<sup>4</sup>

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104; 2. Healthy Mariculture Engineering Research Center of Shandong Province, Qingdao 266104; 3. Dongying Haiyue Aquatic Science and Technology Co., Ltd., Dongying 257500; 4. Rizhao Seamount Fisheries Ltd., Rizhao 276800)

**Abstract** Salinity is an important environmental factor in aquaculture that has significant effects on the growth and digestive physiology of aquatic animals. In the system of an aquatic animal digestive enzymes play a crucial role in the nutrient absorption and growth performance. In this study we investigated the effects of low salinity (16, 18, 20, 22 and 24) on the growth and activities of digestive enzymes in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) of three different sizes (28.37±3.21 g, 7.52±1.25 g, and 2.03±0.68 g). The results showed that low salinity had remarkable impacts on the growth and digestive enzyme activities in sea cucumbers. The *SGR* of all three types of sea cucumber increased along with the increase in salinity, and it reached the lowest value at salinity 16 when the animals failed to stretch normally, crept at the bottom of the tank, and almost stopped the food intake. The lowest *SGR* was significantly different from the control ( $P<0.05$ ). We also observed that the *SGR* reached the highest value at salinity 31. In the salinity range of 16–24, the activities of digestive protease, amylase and lipase all increased as the salinity rose. The protease activity of sea cucumbers reached the highest value at salinity 24, which was not significantly different from the control ( $P>0.05$ ). Small sea cucumbers (2.03±0.68 g) showed no difference in the protease activity between salinity 20 and 22. Activities of amylase were not different between salinity 20, 22 and 24. For the medium-sized sea cucumbers (7.52±1.25 g), the amylase activity increased when the salinity rose from 22 to 24 ( $P<0.05$ ). The lipase activity of large sea cucumbers (28.37±3.21 g) significantly increased when the salinity rose from 20 to 22, while it was elevated when the salinity rose from 22 to 24 ( $P<0.05$ ) in small sea cucumbers (2.03±0.68 g). However, when the salinity was higher than 24, the activities of digestive enzymes increased as the salinity reduced. At the same salinity sea cucumbers of different sizes showed no variation in the activities of digestive enzymes. Our studies on the activities of the three enzymes at low salinity will provide reference for the salinity control in the aquaculture of sea cucumbers.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Low salinity; Growth; Digestive enzymes

① Corresponding author: LI Chenglin, E-mail: lcl\_xh@hotmail.com

# 多棘海盘车(*Asterias amurensis*)对 5 种双壳贝类的摄食选择性及摄食节律\*



代克涛<sup>1,2</sup> 李 娇<sup>2</sup> 关长涛<sup>2①</sup> 张 媛<sup>3</sup> 赵学伟<sup>3</sup>

(1. 大连海洋大学机械与动力工程学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 碳汇渔业实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 獐子岛集团股份有限公司 大连 116001)

**摘要** 研究了多棘海盘车(*Asterias amurensis*)对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)、贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 5 种双壳贝类的摄食选择性和对栉孔扇贝的摄食节律。结果显示,在有或无日本蝠、刺参等干扰饵料的条件下,多棘海盘车对于 5 种双壳贝类均可摄食,且表现出明显的摄食选择性。其中,多棘海盘车对菲律宾蛤仔的摄食选择性均显著高于其他 4 种贝类( $P < 0.05$ ),分别为 5.7、5.0、5.7、5.3、6.0 只/d,干扰饵料的加入并没有对多棘海盘车的摄食选择性造成显著影响。同时,采用定时投喂饵料的方式,每隔 4 h 投喂一次栉孔扇贝,多棘海盘车表现出显著地昼夜摄食节律。其 18:00–翌日 06:00 的摄食量显著高于 06:00–18:00 的摄食量( $P < 0.05$ ),分别为 60%和 40%,多棘海盘车的摄食高峰出现在 18:00–22:00,摄食频率达到 58%,显著高于其他时段( $P < 0.05$ )。

**关键词** 多棘海盘车; 摄食选择性; 摄食节律

**中图分类号** S968 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0097-06

海星(*Asteroidea*)以广温、广盐的超强适应性广泛分布于世界各海域(杨德渐等, 1999)。海星对贝类的喜食习性使其成为海水经济贝类养殖主要的敌害生物种类之一,短时间内呈现了一个从萌芽至猖獗的迅猛发展过程(李成林等, 2008)。近年来,人工鱼礁增殖模式发展迅速,海星在贝类底播增殖礁区也呈现大量聚集的现象,海星生物量的暴发及其对贝类的侵食不仅打破了海洋生态平衡,也给养殖业者带来较大的经济损失(周书珩等, 2008; William *et al.*, 1982; Hatanaka *et al.*, 1958)。2007 年 3 月底至 4 月初,在菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的主产区胶州湾红岛海域海星大肆泛滥,造成菲律宾蛤仔产量锐减,导致当地水产养殖产业损失惨重。

我国的海星主要有海燕和海盘车两个科,其中,以多棘海盘车(*Asterias amurensis*)危害最为严重。据

獐子岛集团股份有限公司估算,其海洋牧场贝类底播区海星的年捕获量可达 500 t,作为敌害生物,对獐子岛海域贝类养殖业影响严重。因此,研究多棘海盘车的摄食选择性及摄食节律揭示了其对海洋生态环境影响、作用机制的前提(Gaymer *et al.*, 2002; McClintock *et al.*, 1981),也为其防治方法提供了参考依据(Barbeau *et al.*, 1998)。目前,国内对于海星的研究多停留于海星的分类以及药用价值之上,而对于海星的摄食选择性以及摄食节律研究较少(杜美荣等, 2012)。本研究选取虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)、贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、菲律宾蛤仔 5 种贝类为饵料,以日本蝠(*Charybdis japonica*)、刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)为干扰饵

\* 公益性行业(农业)科研专项(201003068)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022011006)共同资助。代克涛, E-mail: daiketao@126.com

① 通讯作者: 关长涛, 研究员, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-01-14, 收修改稿日期: 2014-04-21

料, 研究多棘海盘车对其摄食行为。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用多棘海盘车采获于辽宁省长海县獐子岛海域, 辐径为 110–135 mm, 体重为 205–210 g。虾夷扇贝、栉孔扇贝、褶牡蛎、贻贝、菲律宾蛤仔、日本蛸、刺参、中国对虾、大泷六线鱼均采购于獐子岛镇沙包子区水产市场。针对獐子岛海域的生物种类分布, 确定饵料生物种类。以日本蛸、刺参、中国对虾、大泷六线鱼为干扰饵料(干扰饵料均为生物死体), 考察其对多棘海盘车摄食贝类的影响程度。实验用贝类生物学指标见表 1。

实验于 2013 年 10 月 22 日–11 月 12 日在獐子岛集团大连海珍品原良种厂育苗车间进行。育苗车间养殖池为 5.5 m×2.5 m×1.5 m, 充氧及换水设备齐全, 实验海水取自厂区附近海域, 海水经沉淀、砂滤、充分曝气后, 经管道输入实验水槽。实验海水经 YSI Proplus 水质分析仪测定, 水温为 13–15℃, 盐度为 30–31, 溶氧量为 7.8–9.7 mg/L。

多棘海盘车低温运回后, 暂养于育苗车间水泥池中(水体 7000 L), 暂养期间混合投喂杂鱼、多种贝类, 暂养期为 10 d, 采用自然光照, 每天 06:00 换水, 并

保持 24 h 充氧。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 多棘海盘车对 5 种贝类的摄食选择性** 多棘海盘车暂养期结束后, 对其进行长达 24 h 的饥饿处理。实验分为 5 组: I、II、III、IV 组分别加入干扰饵料日本蛸、刺参、中国对虾和大泷六线鱼, V 组为对照组, 每组设 3 个平行实验。

为了不改变多棘海盘车的暂养环境, 每组采用边长 1 m、高 0.5 m 的方形隔离网隔离, 各饲养 4 只活动良好, 个体大小相近的多棘海盘车, 将 4 只多棘海盘车分别放置于隔离网 4 个角落, 隔离网中间混合放置 4 只虾夷扇贝、4 只栉孔扇贝、4 只褶牡蛎、4 只贻贝、4 只菲律宾蛤仔, 使其随机分布, 然后在多棘海盘车与贝类之间加入干扰饵料。多棘海盘车对 5 种贝类的摄食选择性实验设计见表 2。

实验于 06:00 开始, 之后每隔 2 h 观察 1 次, 并及时补充饵料, 每次投饵前记录每种饵料的重量及数量, 至翌日 06:00 取出残饵, 记录每种残饵的重量及空壳数量。实验重复 3 次。实验结果分别从摄食率和摄食百分比两方面分析, 摄食率以每组多棘海盘车在单位时间内摄食某种贝类数量为分析对象, 摄食百分比以每组某种饵料被摄食干物质的重量与所有饵料被摄食干物质总重量的比值为分析对象。

表 1 实验用贝类生物学指标

Tab.1 The biological index of the experimental bivalves (Mean±S.D.)

生物学指标 Biological index	虾夷扇贝 <i>P.yessoensis</i>	栉孔扇贝 <i>C.farreri</i>	褶牡蛎 <i>O.plicatula</i>	贻贝 <i>M.galloprovincialis</i>	菲律宾蛤仔 <i>R.philippinarum</i>
壳长 Shell length(mm)	60.42±2.03	59.14±2.81		60.69±3.21	38.22±1.54
壳高 Shell height(mm)	60.46±3.20	63.37±1.35	96.20±4.82	32.80±2.20	22.13±2.29
壳宽 Shell width(mm)	15.12±1.19	20.16±2.01		24.89±2.05	16.29±1.25
总湿重 Wet weight(g)	34.78±3.63	33.80±2.59	94.36±5.28	28.24±1.36	10.20±2.62
软体部湿重 Soft tissue wet weight(g)	17.11±2.06	20.84±2.79	17.56±2.13	9.58±1.75	5.06±0.98
软体部干重 Soft tissue dry weight(g)	1.80±0.21	2.53±0.34	2.09±0.25	1.22±0.22	0.68±0.13

表 2 多棘海盘车对 5 种贝类的摄食选择性实验设计

Tab.2 The experimental design for *A. amurensis* feeding selectivity on five species of bivalves

组别 Treatment	实验贝类 Experimental bivalves(ind)					干扰饵料 Interference baits(ind)			
	虾夷扇贝 <i>P.yessoensis</i>	栉孔扇贝 <i>C.farreri</i>	褶牡蛎 <i>O.plicatula</i>	贻贝 <i>M.galloprovincialis</i>	菲律宾蛤仔 <i>R.philippinarum</i>	日本蛸 <i>C.japonica</i>	刺参 <i>A.japonicus</i>	中国对虾 <i>F.chinensis</i>	大泷六线鱼 <i>H.mosotakii</i>
I	4	4	4	4	4	4	0	0	0
II	4	4	4	4	4	0	4	0	0
III	4	4	4	4	4	0	0	4	0
IV	4	4	4	4	4	0	0	0	4
V	4	4	4	4	4	0	0	0	0

**1.2.2 多棘海盘车的摄食节律** 基于多棘海盘车对 5 种贝类的摄食选择性实验, 筛选出摄食量最大的贝类, 然后以该贝类为饵料, 进行多棘海盘车的摄食节律实验。实验分为 1 组, 设置 3 个平行, 每组用边长 1 m, 高 0.5 m 的方形隔离网隔开, 各饲养 4 只多棘海盘车, 将 4 只多棘海盘车分别放置于隔离网 4 个角落, 隔离网中间放置 12 只饵料贝类。

将 06:00–18:00 定为白天, 18:00–翌日 06:00 定为黑夜。记录投喂饵料贝类的初始重量, 每隔 2 h 观察一次多棘海盘车的摄食状况, 并记录相应时段摄食多棘海盘车的数量。实验于 06:00 开始, 18:00 收集残饵并记录重量, 补充饵料并记录重量, 至翌日 06:00 收集残饵并记录重量, 实验重复 3 次。

### 1.3 数据处理

**1.3.1 计算公式** 多棘海盘车对 5 种贝类摄食率的计算公式为:

$$F=D/T$$

式中,  $F$  为每组多棘海盘车对某种贝类的摄食率(只/d);  $D$  为每组多棘海盘车对某种贝类的摄食总数量(只);  $T$  为时间(d)。

多棘海盘车对不同饵料摄食百分比的计算公式为:

$$f=(m/M)\times 100\%$$

式中,  $f$  为多棘海盘车对不同饵料干物质的摄食百分比(贝类均指软体部干重);  $m$  为某种饵料被摄食的干物质重量(g);  $M$  为多棘海盘车对不同饵料干物质的摄食总重量(g)。

多棘海盘车的摄食频率公式为:

$$P=(n/N)\times 100\%$$

式中,  $P$  为多棘海盘车摄食频率;  $n$  为某段时间内摄食的多棘海盘车数量(只);  $N$  为实验多棘海盘车总数(只)。

多棘海盘车白天、黑夜的摄食百分比计算公式分别为:

$$f_D=M_D/(M_D+M_L)\times 100\%; f_L=M_L/(M_D+M_L)\times 100\%$$

式中,  $f_D$  为多棘海盘车白天干物质摄食百分比;  $f_L$  为多棘海盘车黑夜干物质摄食百分比;  $M_D$  为多棘海盘车白天干物质摄食重量(g);  $M_L$  为多棘海盘车黑夜干物质摄食重量(g)。

**1.3.2 数据统计与分析** 采用 DPS 统计分析软件对实验数据进行统计和分析, 小写字母表示在 Duncan(新复极差)法的比较中各因素的差异性, 不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平差异显著。

## 2 实验结果

### 2.1 多棘海盘车对 5 种贝类的摄食选择性

**2.1.1 摄食率** 由图 1 可知, 在未加入干扰饵料的 V 组, 多棘海盘车对于 5 种贝类的摄食选择性顺序为菲律宾蛤仔、贻贝、栉孔扇贝、褶牡蛎、虾夷扇贝, 摄食率分别为 6.0、2.3、2.0、0.7、0.7 只/d, 其中, 对于菲律宾蛤仔的摄食率显著高于其他 4 种贝类, 对于虾夷扇贝、褶牡蛎的摄食率较小, 且与其他 3 种贝类存在显著差异( $P<0.05$ )。在加入干扰饵料的前 4 组实验中, 除少数摄食率偏低的贝类摄食选择顺序发生变化外, 多棘海盘车对于菲律宾蛤仔的摄食选择性均显著高于其他 4 种贝类( $P<0.05$ )。

结果表明, 在未加入干扰饵料的条件下, 多棘海盘车对于 5 种贝类的摄食选择性顺序为菲律宾蛤仔、贻贝、栉孔扇贝、褶牡蛎、虾夷扇贝, 干扰饵料的加入并未对多棘海盘车的摄食选择性造成显著地影响。

**2.1.2 摄食百分比** 研究多棘海盘车对不同饵料的摄食百分比, 并判定干扰饵料对多棘海盘车摄食 5 种贝类的影响程度, 同时为多棘海盘车摄食节律的研究提供依据。结果如图 2 所示, 在加入干扰饵料日本蟳的 I 组, 多棘海盘车对于栉孔扇贝的摄食百分比最高为 37%, 显著高于除菲律宾蛤仔外的其他饵料( $P<0.05$ ), 对于日本蟳的摄食百分比比较低为 6%; 在加入干扰饵料刺参的 II 组, 多棘海盘车对于栉孔扇贝的摄食百分比最高为 35%, 但较菲律宾蛤仔、贻贝差异不显著, 对于刺参的摄食百分比比较低为 5%; 在加入干扰饵料中国对虾的 III 组, 多棘海盘车对于栉孔扇贝的摄食百分比最高为 35%, 但与菲律宾蛤仔差异不显著, 对于中国对虾的摄食百分比比较低为 9%; 在加入干扰饵料大泷六线鱼的 IV 组, 多棘海盘车对于栉孔扇贝的摄食百分比最高为 38%, 且显著高于其他饵料( $P<0.05$ ), 对于大泷六线鱼的摄食百分比比较低为 12%; 在未加入干扰饵料的 V 组, 多棘海盘车对于栉孔扇贝的摄食百分比最高为 33%, 但与菲律宾蛤仔、贻贝差异不显著。

结果表明, 在有或无干扰饵料的情况下, 多棘海盘车对栉孔扇贝的摄食量均最高, 干扰饵料的加入影响了多棘海盘车对 5 种贝类的摄食量, 但影响并不显著。

### 2.2 多棘海盘车的摄食节律

**2.2.1 昼夜摄食百分比** 由图 3 可知, 多棘海盘车对栉孔扇贝的夜晚摄食百分比为 60%, 白天的摄食百分比为 40%。这一结果说明, 多棘海盘车摄食量存在昼夜摄食节律, 夜晚摄食量显著高于白天摄食量, 即

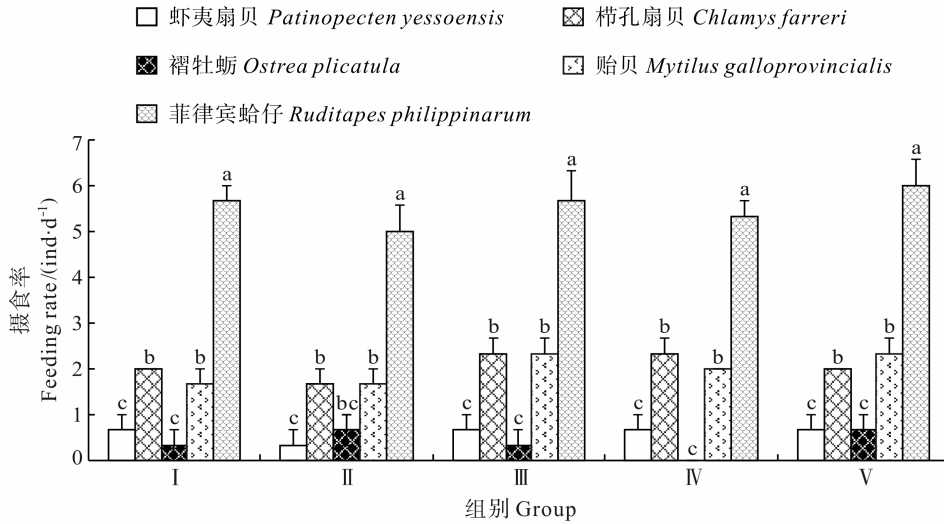


图1 多棘海盘车对5种贝类的摄食率

Fig.1 The feeding rate of *A. amurensis* on five species of bivalves

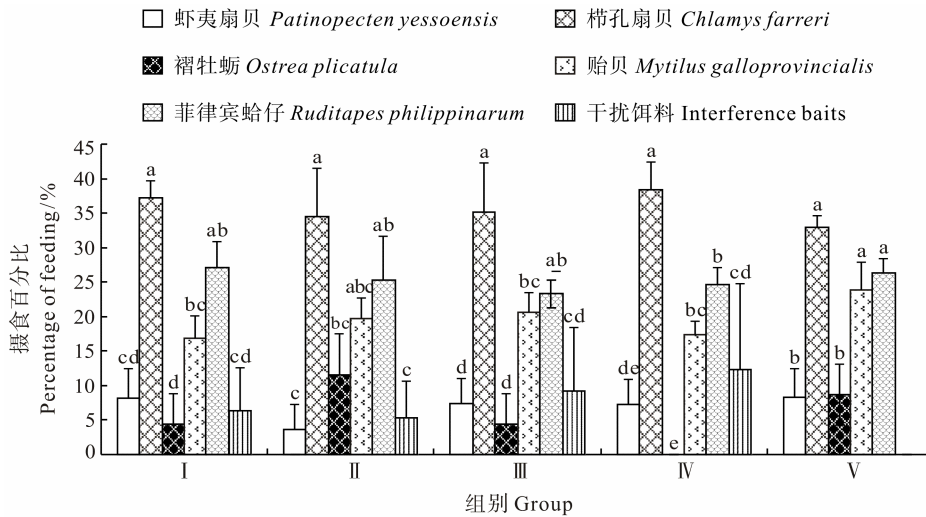


图2 多棘海盘车对不同饵料的摄食百分比

Fig.2 The percentage of different prey types fed by *A. amurensis*

I组、II组、III组、IV组的干扰饵料分别为日本鲷、刺参、中国对虾、大泷六线鱼  
Interference baits of treatment I, II, III and IV are *C. japonica*, *A. japonicus*,  
*F. chinensis* and *H. otakii*, respectively

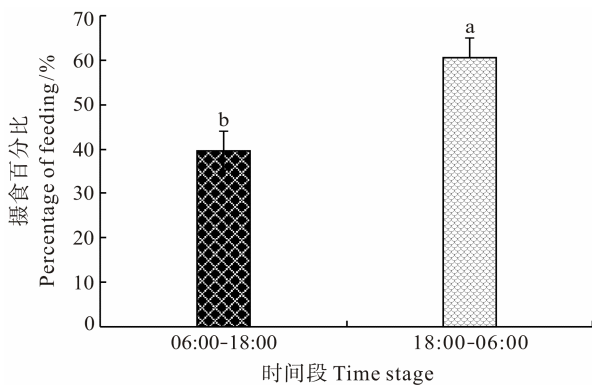


图3 多棘海盘车昼夜摄食百分比

Fig.3 The feeding percentage of *A. amurensis* in diurnal cycle

多棘海盘车夜晚摄食活动较白天更为活跃( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 摄食频率** 由图4可知,多棘海盘车具有明显的昼夜摄食频率,06:00-10:00、10:00-14:00、14:00-18:00、18:00-22:00、22:00-翌日02:00、02:00-06:00的摄食频率分别为25%、17%、8%、58%、8%和8%。

结果表明,多棘海盘车在14:00-18:00的摄食频率最低,在18:00-22:00的摄食频率显著高于其他时段的摄食频率( $P < 0.05$ ),即多棘海盘车在1d中的摄食频率存在显著差异,摄食高峰出现18:00-22:00时段,摄食低谷出现在14:00-18:00。

### 3 讨论

#### 3.1 多棘海盘车对5种贝类的摄食选择性

多棘海盘车的摄食选择性受到多重因素的影响,多棘海盘车个体大小以及饵料生物种类、个体大小、种群密度都成为影响其摄食选择性的因素(Sih *et al.*, 1990; Kim, 1969)。本研究条件下,无论是贝类饵料还是干扰饵料,大小规格相近,并且每组实验中放置的饵料生物均为4

只,因此饵料生物个体大小、密度对于多棘海盘车的摄食选择性影响可忽略。另外,本实验选取多棘海盘车个体较大,对于实验贝类均可摄食。

Tamura(1929)研究发现,生活在浅水区的贝类的闭壳肌较深水区的发达,生活在潮间带的褶牡蛎闭壳肌力量比其他贝类大许多。Wong等(2005)研究发现,相较于扇贝,海星对于贻贝的摄食选择性更高,因为贻贝运动性较弱易于捕获。从捕食能量效率的角度来讲,多棘海盘车更倾向于捕食那些运动性差、能量含量高而又易于捕获的饵料,甚至死鱼(Beddingfield *et al.*, 1993)。相较于其他4种贝类,菲律宾蛤仔个体偏小、

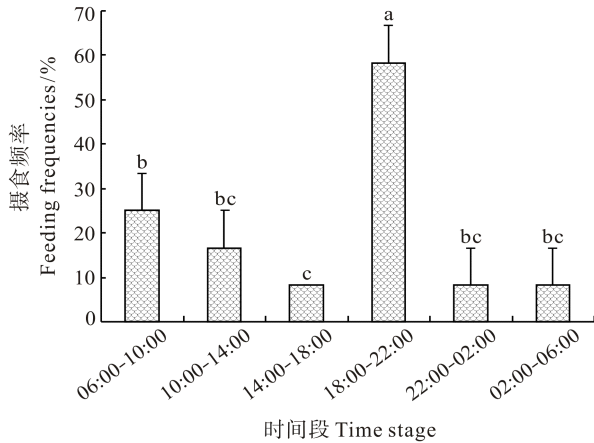


图 4 多棘海盘车不同时间段的摄食频率

Fig.4 The feeding frequencies of *A. amurensis* during different periods

活动力偏差、闭壳肌欠发达,故菲律宾蛤仔具备更高的捕食能量效率。褶牡蛎外形不规则且拥有发达的闭壳肌,虾夷扇贝闭壳肌较发达且运动性最强,对于多棘海盘车而言,捕食活动会消耗更高的能量,故多棘海盘车对于褶牡蛎、虾夷扇贝的摄食选择性最低。栉孔扇贝拥有较发达的闭壳肌,且栉孔扇贝壳表面拥有尖锐的棘刺,增大了多棘海盘车的捕食难度,故多棘海盘车对于贻贝、栉孔扇贝的摄食选择性较低。

杜美荣等(2012)研究发现,多棘海盘车对于贻贝的摄食选择性显著高于菲律宾蛤仔,该结果与本研究存在一定差异。这可能与杜美荣等(2012)所采用的贻贝密度大于菲律宾蛤仔密度有关,而本研究采用的贻贝和菲律宾蛤仔密度相同(表 2),这也证明了饵料密度是影响多棘海盘车摄食选择性的重要因素之一(刘佳等, 2012)。

### 3.2 多棘海盘车的摄食节律

齐占会等(2013)研究了 2 种海星对 3 种双壳贝类的捕食选择性和摄食率,发现 2 种海星在白天和黑夜均存在捕食活动,且夜间捕食强度明显高于白天,这可能与海星对光线较暗的海底环境产生的适应性有关。与之相一致,本研究也发现,多棘海盘车表现出白天、黑夜间的摄食节律,且黑夜的摄食量显著高于白天的摄食量,其中,摄食高峰出现在 18:00-22:00 时段。

许多研究表明,水生动物的摄食节律受到光照、溶解氧、水温、饵料等诸多外界因素的影响,但普遍认为,光照对鱼类的摄食节律影响较大(谢从新等, 1997)。多棘海盘车作为一种负趋光水生动物,对于光照较为敏感,白天光照较强时,就会选择转移到光线阴暗的地方,而这种活动范围的限制,对于多棘海盘车的摄食活动也产生了影响,夜晚时,光线变暗,这种影响

就会解除,在没有光线影响的条件下,多棘海盘车的摄食量就会相应的增加。

### 3.3 多棘海盘车的防治方法探讨

控制多棘海盘车的泛滥,已经引起了相关部门的高度重视,减少其对经济贝类的危害已迫在眉睫(李成林等, 2008)。

化学方法作用较为迅速,但是对于海洋生态环境副作用较强,目前并没有环保高效的杀灭多棘海盘车的化学药剂。生物方法就是引入多棘海盘车的天敌,对多棘海盘车的数量进行控制,但是该方法作用较为缓慢,天敌的引入对于当地海洋生态环境的影响有待进一步研究。

在不破坏海洋生态环境稳定的前提下,目前防治多棘海盘车最行之有效的方法就是采用物理方法。物理方法包括组织拖网采捕、采用诱捕笼诱捕、潜水员下水采捕等方法,其中采用诱捕笼诱捕不仅费用较少,且针对性和可操作性均较强。

本研究对于多棘海盘车的摄食选择性及摄食节律进行了初步研究,发现多棘海盘车具有偏好菲律宾蛤仔、嗅觉敏锐等特点。因此,可以将菲律宾蛤仔软体部分取下,放置于诱捕笼网兜中,投放于多棘海盘车暴发水域,对其进行诱捕清除。另外,针对多棘海盘车的昼夜摄食节律特点,可以选择投放诱捕笼时间段,以增加诱捕效果。

## 参 考 文 献

- 齐占会, 王珺, 毛玉泽, 等. 两种海星对三种双壳贝类的捕食选择性和摄食率. 生态学报, 2013, 33(16): 4878-4884
- 刘佳, 张秀梅. 多棘海盘车对太平洋牡蛎、紫贻贝、菲律宾蛤仔摄食选择性的研究. 中国海洋大学学报, 2012, 42(7/8): 98-105
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 海星侵食贝类的防治对策. 科学养鱼, 2008(8): 48-49
- 杜美荣, 方建光, 张继红, 等. 多棘海盘车对四种贝类摄食率和选择性的初步研究. 渔业现代化, 2012, 39(2): 25-47
- 杨德渐, 孙世春. 海洋无脊椎动物学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999, 486
- 周书珩, 王印庚. 近海水域海星泛滥引起的反思. 水产科学, 2008, 27(10): 555-556
- 谢从新, 熊传喜, 周洁, 等. 不同光照下乌鳢幼鱼的摄食强度及动力学. 水生生物学报, 1997, 21(3): 213-217
- Barbeau MA, Scheibling RE, Hatcher BG. Behavioral responses of predatory crabs and sea stars to varying density of juvenile sea scallops. Aquaculture, 1998, 169(1-2): 87-98
- Beddingfield SD, McClintock JB. Feeding behavior of the sea star *Astropecten articulatus* (Echinodermata: Asteroidea): an



- evaluation of energy-efficient foraging in a soft-bottom predator. *Mar Biol*, 1993, 115(4): 669–676
- Gaymer CF, Himmelman JH. Mussel beds in deeper water provide an unusual situation for competitive interactions between the sea star *Leptasterias Polaris* and *Asterias vulgaris*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 277: 13–24
- Hatanaka M, Kosaka M. Biological studies on the population of the starfish, *Asterias amurensis*, in Sendai bay. *Tohoku J Agric Res*, 1958, 9(3): 159–178
- Kim YS. Selective feeding on the several bivalve molluscs by Starfish, *Asterias amurensis* Loken. *Bull Faculty Fish, Hokkaido University*, 1969, 19(4): 244–249
- McClintock JB, Lawrence JM. An optimization study on the feeding behavior of *Luidia clathrata* Say (Echinodermata: Asteroidea). *Mar Behavior & Physiol*, 1981, 7: 263–275
- Sih A, Moore RD. Interacting effects of predator and prey behavior in determining diets. //Hughes RN, Behavioral Mechanisms of Food Selection. New York, USA: Springer-Verlag, 1990, 771–796
- Tamura T. The power of the adductor muscle of the oyster, *Ostrea circumpicta* Pils. *Sci Rep Tohoku Imp Univ*, 1929, 4(4): 259–279
- William J, Resetarits Jr. Ecological interactions among predators in experimental stream communities. *Ecol*, 1982, 72(5): 1782–1793
- Wong MC, Barbeau MA. Prey selection and the functional response of sea stars *Asterias vulgaris* Verrill and rock crabs *Cancer irroratus* Say preying on juvenile sea scallop *Placopecten magellanicus* Gmelin and blue mussels *Mytilus edulis* Linnaeus. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2005, 327(1): 1–21

(编辑 陈严)

## Selective Feeding on Five Species of Bivalves and Feeding Rhythm of *Asterias amurensis*

DAI Ketao<sup>1,2</sup>, LI Jiao<sup>2</sup>, GUAN Changtao<sup>2①</sup>, ZHANG Yuan<sup>3</sup>, ZHAO Xuewei<sup>3</sup>

(1. School of Mechanical and Power Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Carbon-Sink Fisheries Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Zhangzidao Group Co., Ltd, Dalian 116001)

**Abstract** *Asterias amurensis* is one of the primary predators of bivalves that often cause massive death of cultured bivalves. Better understanding of the feeding ecophysiology of *A. amurensis* is the key for developing effective control strategies. In this study, we recorded the selective feeding and feeding rhythm of *A. amurensis* on five species of bivalves including *Patinopecten yessoensis*, *Chlamys farreri*, *Ostrea plicatula*, *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes philippinarum*, and thus identified the characteristics of feeding of *A. amurensis*. The experimental animals were collected from the sea area of Zhangzi Island and then transported to our seaside laboratory at low temperature. The *A. amurensis* was acclimated to laboratory conditions for 10 d before the experiment. The experiment was conducted between October 22 and November 12, 2013, at the water temperature of 13–15°C, and at the salinity of 30–31, and at the dissolved oxygen level of 7.8–9.7 mg/L in a concrete tank ( $L \times W \times H = 5.5 \text{ m} \times 2.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$ ). The results showed that *A. amurensis* had the highest feeding rate ( $P < 0.05$ ) on *R. philippinarum*, no matter whether interfering baits, such as *Charybdis japonica* and *Apostichopus japonicus* Selenka, were present. The values were 5.7 ind/d, 5.0 ind/d, 5.7 ind/d, 5.3 ind/d and 6.0 ind/d respectively. There was no significant difference in the feeding rate when *A. amurensis* was fed with different interfering baits. We also observed an active feeding rhythm of *A. amurensis* in a diurnal cycle by feeding them with *C. farreri* every four hours. The percentage of food intake between 18:00 and 06:00 was apparently higher than that between 06:00 and 18:00 (60% vs 40%,  $P < 0.05$ ). Furthermore, we found that the feeding frequency of *A. amurensis* peaked between 18:00 and 22:00 (58%,  $P < 0.05$ ).

**Key words** *Asterias amurensis*; Selective feeding; Feeding rhythm

① Corresponding author: GUAN Changtao, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

# 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)生物扰动对混养系统沉积物及间隙水中营养物质的影响\*



李俊伟<sup>1</sup> 朱长波<sup>1</sup> 郭永坚<sup>1</sup> 颀晓勇<sup>1</sup> 黄国强<sup>2</sup> 陈素文<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;  
2. 广西海洋研究所 海洋生物技术重点实验室 北海 536000)

**摘要** 采用养殖水化学测定方法分析沉积物中有机质和营养盐含量变化,研究方格星虫生物扰动对混养系统中沉积物的生态效应。混养试验在20个养殖桶内(水体积550 L)进行,方格星虫(1.2±0.1 g)养殖在桶底沙层中,其放养密度为0、50、100和150条/桶;鳎(24.5±0.5 g)的放养密度为3尾/桶,养殖在水体中的网箱中(直径0.8 m、高度0.6 m)。试验共分4个处理组(T0、T50、T100和T150),每个处理组各设5个重复。结果显示,与对照组(T0)相比,方格星虫组底层(6–8 cm)沙中有机质含量有所增加,但未达到统计学显著差异( $P>0.05$ )。随着试验的进行,4个试验组的间隙水中硝态氮( $\text{NO}_3\text{-N}$ )、氨氮( $\text{NH}_4\text{-N}$ )以及活性磷(SRP)浓度均呈现出升高的趋势。试验结束时,T100和T150组各层间隙水的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度均低于T0组( $P<0.05$ ),且底层间隙水的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度随方格星虫密度的增加而降低;T0组表层 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度高于方格星虫组,而底层氨氮却显著低于高密度方格星虫组(T100和T150) ( $P<0.05$ )。结果表明,方格星虫的生物扰动在一定程度上可以促进沉积物表层的有机质向底层转移,从而影响间隙水中氮、磷营养盐的转化和释放。方格星虫的生物扰动在精养池塘中的底质修复作用仍需进一步研究。

**关键词** 方格星虫; 生物扰动; 沉积物; 间隙水; 营养物质

**中图分类号** Q958 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0103-08

沉积物是水生生态系统中重要的组成部分,其理化特征和沉积物-水界面的营养盐动力学特征直接影响着水生生态系统中的水质和底质环境(Boyd, 1995; Sajana *et al*, 2013; 张小勇等, 2013; 孙超等, 2014)。投饵类养殖系统产生的大量有机物在系统底部的过度积累会导致水质恶化以及沉积物理化特征的变化(Karakassis *et al*, 2000; Diaz, 2001; Sanz-Lázaro *et al*, 2008),而大型底栖动物则可以通过对沉积物的摄食、排泄以及掘穴活动等途径,改善沉积环境(孙刚等, 2013)。大型底栖动物的表面摄食和深层排泄行为加速了表层沉积物的封埋过程,从而降低和减缓沉积物中的营养物质向水体中的转移(Hulth *et al*, 2005);底栖动物的掘穴等生物扰动可以改变有机质或污染物在沉积物中的垂直分布(Benninger *et al*, 1979);底栖

动物对沉积物的垂直搬运和混合作用也会加速间隙水与上覆水之间的营养盐通量,从而影响沉积物-水界面的营养盐通量(Widdows *et al*, 1998)。

方格星虫(*Sipunculus nudus*)隶属于星虫动物门,是一种营穴居生活的大型底栖动物,广泛分布于中国近海沿岸,多栖息于沙质为主的滩涂区域(李凤鲁等, 1992; 张琴等, 2011、2013、2014; 李俊伟等, 2014)。方格星虫具有重要的食用和药用价值(蒋定文等, 2004; 沈先荣等, 2004),在国内具有较大的消费市场。由于方格星虫摄食和利用表层沉积物中的营养物质,并将粪便排泄在洞穴深处,实现了将表层沉积物质向底层的搬运和封埋,属于下行搬运者(孙刚等, 2013)。一般认为星虫类对表面沉积物及重金属具有明显的封埋和迁移效果,在生态系统的地球化学过程中发挥

\* 国家科技支撑计划(2011BAD13B03)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)(2014TS03; 2014ZD01)和国家自然科学基金项目(31160532)共同资助。李俊伟, E-mail: lijunwei303@163.com  
收稿日期: 2014-07-25, 收修改稿日期: 2014-09-22

着重要作用(Shields *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012)。目前关于方格星虫与其他生物混养的研究主要侧重经济效益的分析(陈福, 2009; 蔡德建等, 2011), 而对于方格星虫在混养系统中发挥的生态效益研究较少。方格星虫对沉积物中有机质的摄食利用可以减少或减缓有机质在沉积物表层的积累, 可改善沉积物的理化特征, 因此研究方格星虫在投饵类混养系统沉积物中的生态效益具有重要意义。

该研究通过在室内进行方格星虫与鲮的混养试验, 研究方格星虫的生物扰动对沉积物及间隙水中氮、磷营养盐浓度变化的影响, 确定方格星虫的生物扰动在投饵类养殖系统沉积物中发挥的生态效益, 可为投饵类养殖系统的高效清洁养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

方格星虫与鲮(*Mugil cephalus*)的混养试验共4个处理组, 每个处理组分别设5个重复, 共20个养殖桶。在养殖桶(高0.8 m、直径1 m; 水体积为550 L)底部铺设沙层, 下层厚度为6 cm的粗沙(粒径0.8–1.5 mm), 表层为2 cm厚的细沙(0.1–0.2 mm)。在铺沙前, 每个养殖桶内铺设9个塑料板(7 cm×7 cm)埋于沙层底部, 以方便采集沉积物样品。方格星虫养殖于底部沙层中, 鲮置于养殖桶内的网箱中(高60 cm、直径80 cm)内。网箱用于分隔鲮与方格星虫, 其底部距离沙层10 cm, 可保证方格星虫不受到鲮干扰和伤害。

试验用方格星虫(1.2±0.1) g, 由广西海洋研究所海水增殖基地提供。养殖桶内方格星虫的放养条数分别为0、50、100、150条/桶(密度依次为0、65、127、191条/m<sup>2</sup>); 鲮[(24.5±0.5) g]的放养密度均为3尾/桶。

### 1.2 日常管理

试验期间按照鲮体重的3%进行投喂, 日投喂量为2–3 g。随着鲮体重的增加, 相应地增加饵料投喂量。采用充气石进行连续充氧, 溶氧浓度高于6 mg/L。养殖期间不换水。

### 1.3 样品的收集及测定

试验期为60 d, 每20 d采样1次, 共采样4次。每次采样时分别采集水样和沉积物。水体的温度、盐度、pH以及溶解氧(DO)采用YSI(556, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA)进行现场测定。在试验初期和末期取水样测定水体中的总氮(TN)和总磷(TP)浓度, 采用过硫酸钾氧化法测定(雷衍之, 2006)。

采集沉积物时, 在每个养殖桶内采取3个样品混合为1个沉积物样品。将取样管(直径5 cm、高10 cm)插到沙底的塑料板上, 拎取塑料板上的绳子使取样管与塑料板紧密结合, 将沉积物样品取出。将沉积物分为表层(1–2 cm)、中层(3–5 cm)和底层(6–8 cm), 各层沉积物间隙水的氧化还原电位采用氧化还原电位仪测定(SX-630, 上海三信仪表公司)。通过真空抽滤方法获取间隙水并加入氯仿, 置于–20℃保存, 用于间隙水中硝态氮(NO<sub>3</sub>-N)、氨氮(NH<sub>4</sub>-N)及活性磷(SRP)浓度的测定(TitrIC全自动水质分析仪, 瑞士万通)。

将各层沉积物置于60℃烘干后保存, 采用马弗炉灼烧法(550℃)测定沉积物中的有机质含量。

### 1.4 数据分析

采用SPSS 17.0进行数据统计和分析。不同处理组之间的数据比较采用One-Way ANOVA进行分析, 显著度为 $P<0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 方格星虫生物扰动对沉积物中有机质垂直分布的影响

试验初期, 沙底中的表层、中层和底层有机质含量分别为2.0、2.0和2.2 mg/g。经过60 d的养殖试验, 4个处理组沉积物中有机质含量均具有一定程度的积累。在第20天采样时, 4个处理组的有机质浓度达到最高值, 随后有机质含量表现出缓慢降低的趋势(图1)。

试验结束时, 方格星虫组(T50、T100和T150)底层有机质含量均高于对照组(T0), 并且中层有机质含量也高于对照组。试验过程中, 底层有机质含量增幅最大, T0、T50、T100和T150组分别增加了5.16%、19.69%、14.52%和13.50%, 而方格星虫组的增幅高于对照组, 但4个试验组间的有机质含量未达到统计学上的差异水平( $P>0.05$ )。结果表明, 方格星虫的生物扰动在一定程度上促进了表层有机质向底部的转移。

### 2.2 方格星虫生物扰动对间隙水中氮、磷浓度的影响

**2.2.1 硝态氮浓度的变化** 试验初期, 4个试验组的间隙水中硝态氮浓度为0.07–0.11 mg/L, 组间无显著差异( $P>0.05$ )。随着养殖试验的进行, 各试验组的间隙水中硝态氮浓度均表现出升高的趋势。在第40天和第60天采样时, 随着沉积物深度的增加, 硝态氮浓度表现出降低的趋势, 尤其是底层间隙水的硝态氮浓度明显低于表层( $P<0.05$ ) (图2)。在第20天时, 高密度星虫组(T100和T150)的表层和中层间隙水中

硝态氮浓度高于对照组和 T50 组( $P<0.05$ ); 随着试验的进行, 在第 40 天和第 60 天时, 高密度星虫组(T100 和 T150)各层间隙水的硝态氮浓度均低于对照组(T0), 并且大多数层次的间隙水也低于 T50 组。试验后期(40 d 和 60 d), 底层间隙水中的硝态氮浓度表现出随方格星虫密度增加而降低的趋势。

**2.2.2 氨氮浓度的变化** 各试验组的间隙水中氨氮起始浓度范围为 0.06–0.08 mg/L, 组间无显著差异( $P>0.05$ ), 随着试验过程的推进呈缓慢增加趋势。在

第 20、40 和 60 天采样时, 高密度方格星虫组(T100 和 T150)表层、中层和底层间隙水均表现出较高的氨氮浓度, 尤其是 T100 组显著高于 T0 和 T50 组( $P<0.05$ )。在试验后期(40 d 和 60 d), 方格星虫组底层间隙水均表现出较高的氨氮浓度(图 3)。在整个采样过程中, T50 组表层、中层和底层均表现出较低的氨氮浓度。试验结束时对照组 T0 表层氨氮浓度最高, 底层氨氮浓度最低; 而 T50 组表层、中层氨氮浓度最

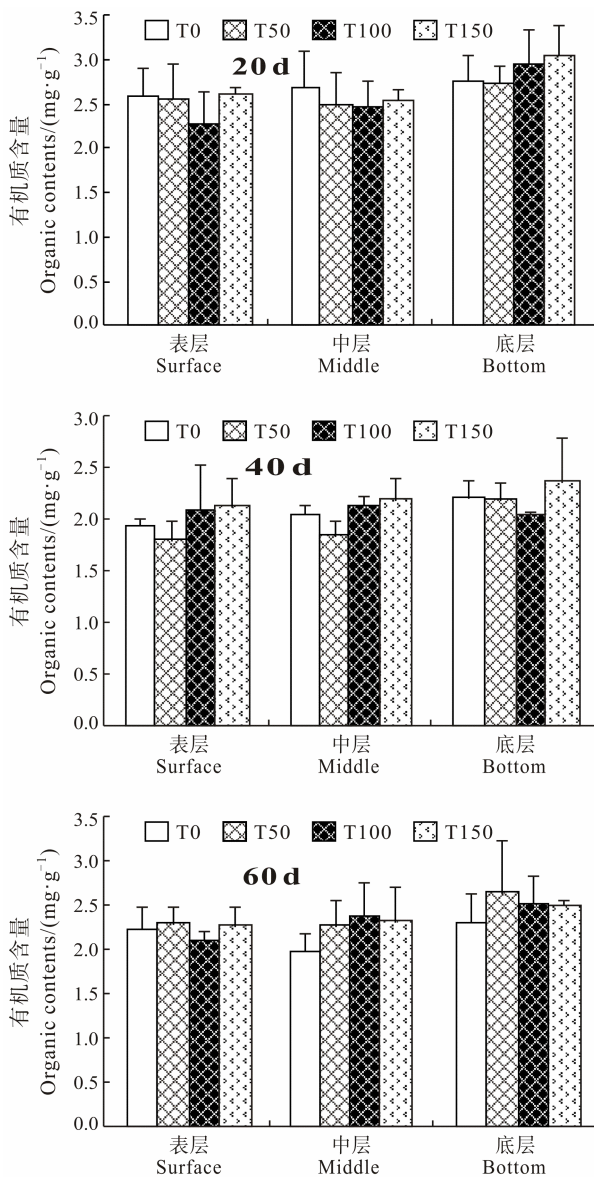


图 1 不同采样阶段沉积物不同层次中有机质含量的垂直分布

Fig.1 The contents of organic material in the three layers of the sediment during the experiment  
数据为平均值±标准误差  
Values were given as Mean ± SD (n=5)

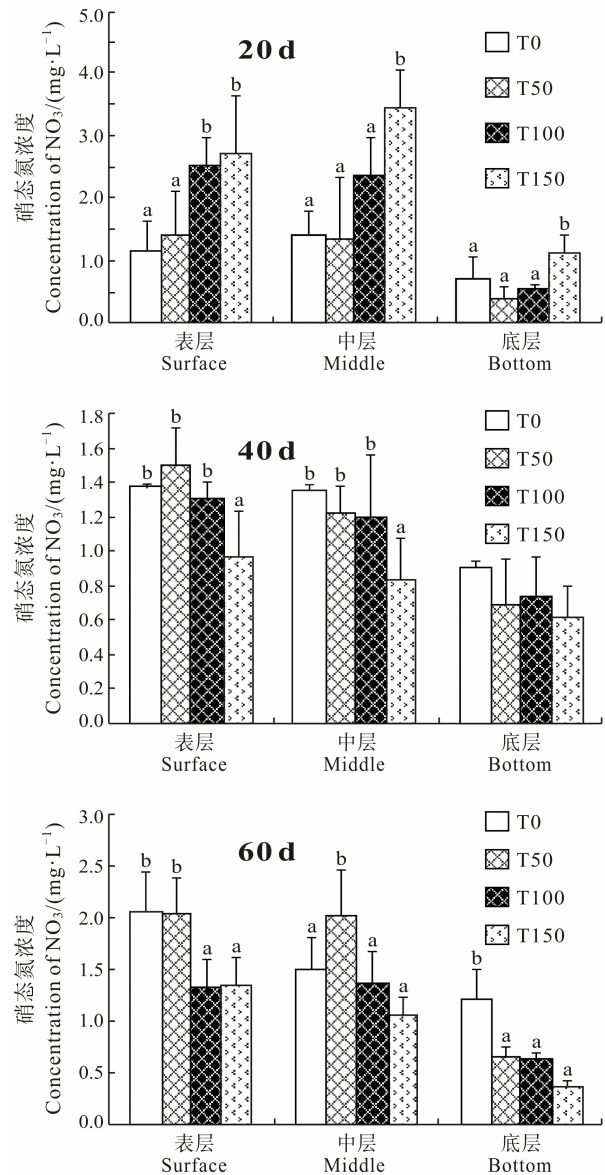


图 2 不同采样阶段沉积物的表层、中层和底层间隙水中硝态氮浓度的变化

Fig.2 The variation of nitrate nitrogen content in the three layers of the sediment during the experiment

字母 a 和 b 表示处理组之间的数据差异显著( $P<0.05$ )  
Different letters indicate significant difference among treatments ( $P<0.05$ )

低, 底层较高。随着密度增加, 方格星虫对于沉积物间隙水的影响也有所增强。

**2.2.3 活性磷浓度变化** 试验初期, 方格星虫组和对照组间隙水中的活性磷浓度相近, 变化范围为 0.004–0.008 mg/L, 且无显著差异 ( $P>0.05$ )。随着试验的进行, 所有处理组的间隙水中活性磷浓度均表现出增加的趋势(图 4)。在第 20 天采样时, 方格星虫组(T50、T100 和 T150)的表层和中层的间隙水活性磷浓度低于对照组, 底层间隙水则高于 T0 组。在第 40 天采样时, T100 和 T150 组的底层间隙水活性磷浓度仍高于对照组和低密度组 T50。试验结束时, 处理组

之间的底层间隙水活性磷浓度差异明显, T150 组底层间隙水活性磷浓度显著高于 T0 组 ( $P<0.05$ )。3 个采样阶段中对照组和低密度组(T50)的间隙水活性磷表现出随着深度增加而降低的趋势; 而在整个试验期间, 高密度组(T100 和 T150)间隙水活性磷浓度均表现为由底层向表层增加的趋势。

**2.3 方格星虫的生物扰动对水层的影响**

养殖期间, 水体中总氮和总磷浓度均呈显著升高的趋势(图 5)。试验初期 4 个处理组养殖水体中的总氮(TN)、总磷(TP)浓度相近 ( $P>0.05$ )。试验结束时, 所有处理组中的水体总氮浓度均显著高于初始浓度

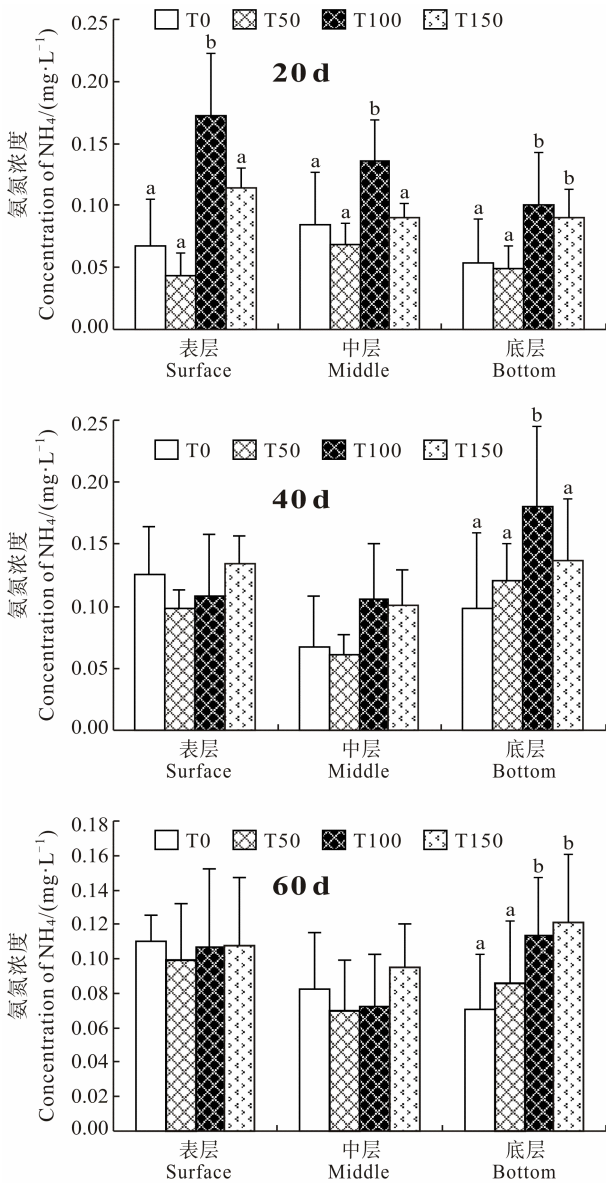


图 3 不同采样阶段沉积物的不同层次间隙水中氨氮浓度的变化

Fig.3 The variation of ammonia nitrogen content in the three layers of the sediment during the experiment

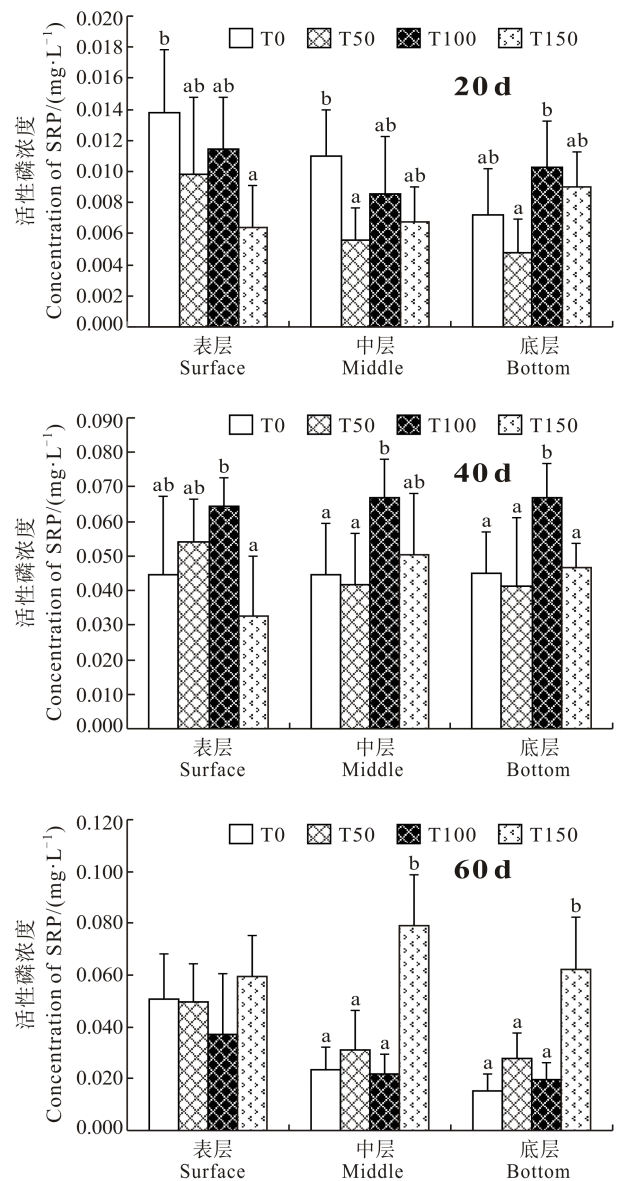


图 4 不同采样阶段沉积物的不同层次间隙水中活性磷浓度的变化

Fig.4 The variation of SRP in the three layers of the sediment during the experiment

( $P < 0.05$ ), 表明输入的氮源在水体中有显著积累, 尤以对照组 TN 浓度的增加趋势最为明显。方格星虫的密度越大, 养殖水体中 TN 的积累越少; 与对照组相比, 高密度组水体中的 TN 浓度降低了近 2 mg/L。

试验结束时水体中 TP 浓度也显著高于初始浓度。对照组(T0)水体中 TP 浓度增加量高于其他方格星虫处理组, 差异不显著( $P > 0.05$ )。T50 组水体中的 TP 浓度最低, 所有处理组间的 TP 浓度变化无明显变化趋势。

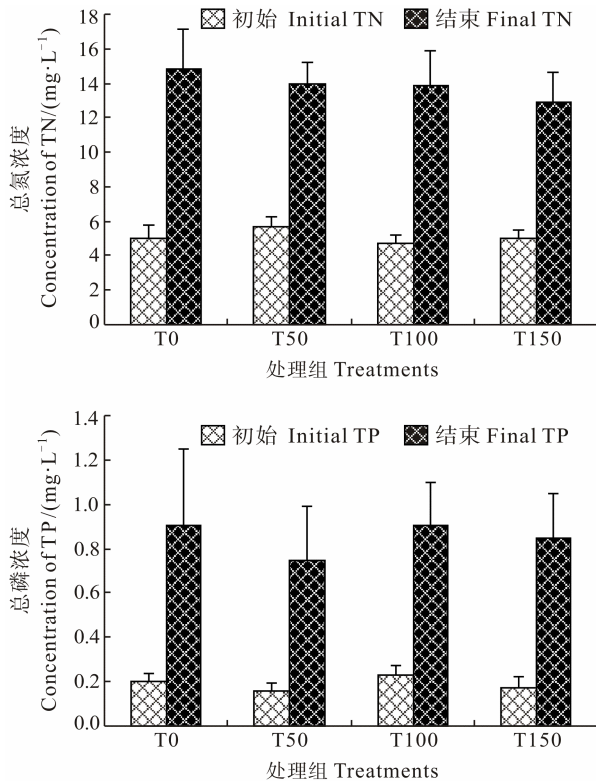


图 5 试验结束时 4 个处理组水层中总氮和总磷浓度  
Fig.5 The contents of TN and TP in the water column during the end of the experiment

#### 2.4 方格星虫和鲢的生长情况

试验结束时不同处理组的方格星虫表现出不同的生长性能(表 1)。低密度组(T50)的存活率为 92%, 大于高密度组 T100(91%)和 T150(85%)。整个养殖期间 T50 组方格星虫具有一定程度的增重, 由初始重量 1.24 g 增加到 1.34 g; 而 T100 和 T150 组的方格星虫却损失了一定重量, 分别由初始重量 1.15 g 和 1.22 g 降低到 0.97 g 和 0.99 g。

试验期间, 各处理组中的鲢均未出现死亡, 其存活率达到 100%。T0、T50、T100 和 T150 组鲢的终

末体重分别为 42.54 g、45.66 g、42.86 g 和 44.13 g。

表 1 方格星虫的存活和生长性能  
Tab.1 The survival rate and growth of *S. nudus* (Mean±SD)

组别 Group	成活率 Survival rate(%)	初始重量 Initial weight(g)	终末重量 Final weight(g)
T0	—	—	—
T50	92	1.24±0.03	1.34±0.14
T100	91	1.15±0.06	0.97±0.11
T150	85	1.22±0.02	0.99±0.07

### 3 讨论

以往研究表明, 大型底栖动物的摄食或钻沙活动可以影响沉积物的化学特征, 如疣拟海参(*Parastichopus parvimensis*) (Yingst, 1982)、加州拟海参(*Parastichopus californicus*) (Ahlgren, 1998)、招潮蟹(*Uca tangeri*) (Wolfrath *et al*, 1992)、多毛类动物如多齿围沙蚕(*Perinereis nuntia*)等(Honda *et al*, 2002; Palmer, 2010; Musale *et al*, 2011)对沉积物中有机质含量及其垂直分布、间隙水溶氧以及营养盐浓度变化具有显著影响。星虫类动物对沉积物的影响不同于刺参的表面摄食习性, 也异于蟹对底层沉积物的上移, 与活动频繁的多毛类也有区别, 其在生态系统中的重要作用主要体现在其可以将表面沉积物快速地消解和封埋(Shields *et al*, 2009; Li *et al*, 2015)。Graf (1992)研究发现星虫(*Nephasoma lilljeborgi*)可以将表面沉积物转运到 9 cm 的深处。该研究中高密度方格星虫组底层沉积物的有机质含量高于对照组, 且随着深度增加, 有机质含量增加幅度较大。试验结束时, 对照组的底层有机质含量比表层高 3.17%, 而星虫组 T50、T100 和 T150 底层沉积物比表层分别高出 15%、19% 和 11%, 表明方格星虫对表层沉积物具有一定的向下迁移和封埋作用。沉积物中层的有机质含量与表层相近, 均低于底层有机质含量, 表明有机质积累主要在底层, 原因可能是方格星虫的底部栖息特性以及其排泄物在底部的积累造成了底层具有较高的有机质含量。郑忠明 (2010)<sup>1</sup>研究发现, 可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)的生物扰动可以显著降低底层沉积物中的有机质稳定性; 方格星虫所栖息的管道中物质变为黑色, 表明底层有机质稳定性较差。

底栖动物的生物扰动会对沉积物中氮、磷的释放具有促进作用(余婕等, 2004; 吴淑娟, 2010)<sup>2</sup>。星虫

1) 郑忠明. 刺参养殖池塘沉积物-水界面营养盐通量的研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2010, 105-111

2) 吴淑娟. 颤蚓扰动作用对东洞庭湖沉积污染物释放的影响研究. 长沙理工大学硕士学位论文, 2010, 22-51

类动物通过其管道网络及其生物扰动将上覆水引入到管道中(Romero-Wetzel, 1987),从而增强沉积物间隙水与上覆水的水体交换。高密度的管道网络提高了水体的交换面积(Aller, 1988),提高了与管道相联的沉积物中细菌数量以及生物活力(Aller, 2001)。间隙水中溶解氧浓度以及微生物数量和活力的变化等影响到间隙水中氮、磷营养盐浓度的变化。该试验中,方格星虫的生物扰动对间隙水中的硝氮、氨氮以及活性磷浓度产生影响。试验前期(20 d),高密度星虫组(T100 和 T150)表层和中层间隙水高于对照组,而到试验后期,高密度方格星虫组(T100 和 T150)各层间隙水硝态氮浓度低于对照组(T0)和低密度方格星虫组(T50)。同时,高密度方格星虫组(T100 和 T150)中层、底层间隙水氨氮浓度高于对照组(T0)。试验前期,由于较少的沉积物积累造成厌氧程度较低,氮元素的形态转换以硝化反应为主导。高密度组在初期表现出较高的硝态氮浓度,可能是由于其释放的氨氮能够快速释放和转化成硝氮;高密度星虫组(T100 和 T150)在试验后期表现出较低的硝态氮浓度和较高的氨氮浓度,可能是因为星虫的呼吸代谢、异养微生物的生长和繁殖导致氨氮浓度增加,其生物扰动所带入的氧气不足以完成硝化反应,导致反硝化反应占主导。由结果可知,星虫类和沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)均可以通过摄食表面沉积物延缓表面有机质的积累,其生物扰动也会促进溶氧水平的提高和矿化过程的进行(张付国等, 1996; 邓锦松等, 2006)。不同的是,沙蚕活动频繁且剧烈,会导致氮营养盐的快速释放,而方格星虫活动缓慢,更有利于底层氨氮的缓慢释放,可以缓解表层沉积物的氧化层状况。由于方格星虫活动缓慢, T50 组在大部分时间内具有最低的氨氮浓度,原因可能是适宜密度的方格星虫对表面沉积物的利用以及生物扰动的增氧效果有利于沉积物中氨氮的转化,促进方格星虫的生长,并且 T50 组表现出较优的生长性能。各处理组间沉积物有机质含量未达到显著差异(图 1),并且 T150 组间隙水中的硝氮反而比其他组更低(图 2),原因可能是:一方面,方格星虫可以将表面有机质转运到沉积物深处,导致沉积物有机质及间隙水中硝氮、氨氮等增加;另一方面,方格星虫的生物扰动会对有机物的矿化及沉积物中氮、磷的释放具有促进作用,导致有机质和间隙水中硝氮、氨氮等减少。

水体底部经常存在活性有机碎屑层,其中有机磷的溶解和转化维持着较高浓度的活性磷,容易在间隙

水中形成高于上覆水的活性磷浓度(孙刚等, 2013)。底栖动物的生物扰动和生态习性对沉积物中磷的释放具有明显影响。以往研究发现,底栖动物颤蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)的生物扰动会加快底层的磷扩散到亚表层和表层,最后释放到上覆水中(吴淑娟, 2010)<sup>1)</sup>。颤蚓和铜锈环棱螺(*Bellamyia aeruginosa*)的生物扰动均会增加沉积物中活性磷的释放(Mermillod *et al*, 2008; 吕敬等, 2010)。该研究中,试验前期(第 20 天)方格星虫组(T50、T100 和 T150)的表层和中层间隙水活性磷低于 T0 组,而底层间隙水却高于 T0 组,主要原因是高密度方格星虫组通过摄食和生物扰动将较多的有机质迁移到底部。同时,由于方格星虫栖息于底层、活动缓慢,对于底层活性磷起到缓慢释放的作用。然而,随着试验的进行,间隙水中的活性磷浓度均表现出增加的趋势。高密度方格星虫组仍然表现出对磷的底部封埋、缓慢释放的效果,而不同于颤蚓的快速运动加速磷的释放(吴淑娟, 2010)<sup>1)</sup>。

研究表明,方格星虫的养殖可以将表面有机质转移到底部,对于间隙水中氮、磷营养盐的释放具有重要影响。T50 组表现出较优的存活率和生长性能,同时该组水体中总氮和总磷的积累处于较低水平,表明适宜密度的方格星虫可以延缓沉积物中氨氮的积累,有利于保持沉积物的良好状态。同时,有机质在底部的积累有助于氮、磷营养盐向水体中缓慢释放。

#### 4 结论

试验结果表明,方格星虫可以通过转移表层有机物质,缓解表层沉积物的有机质积累,有利于沉积物-水界面的营养盐通量。方格星虫甚至可以钻到 30–40 cm 深的沙质底部,通过将有机质封埋于底部,对于缓解沉积物表面的有机质积累具有重要作用。因此,在精养池塘中进行方格星虫的养殖对于养殖水体、沉积物-水界面氧化层的保持具有一定的生态效益。鉴于生物扰动对于间隙水溶氧、异养细菌的生物量和活力具有一定影响,深入研究方格星虫对上述因素的影响具有重要意义。

#### 参 考 文 献

- 邓锦松, 马牲, 牛化欣, 等. 投喂双齿围沙蚕对虾池底质的修复作用. 中国海洋大学学报, 2006, 36(2): 99–104
- 孙超, 朱玲, 毛玉泽, 等. 象山港南沙岛不同养殖模式沉积物微生物群落结构分析. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 13–21

1) 吴淑娟. 颤蚓扰动作用对东洞庭湖沉积污染物释放的影响研究. 长沙理工大学硕士学位论文, 2010, 22–51

- 孙刚, 房岩. 底栖动物的生物扰动效应. 北京: 科学出版社, 2013, 30–40
- 吕敬, 郑忠明, 陆开宏, 等. 铜锈环棱螺生物扰动对“蓝藻水华”水体底泥及其间隙水中碳、氮、磷含量的影响. 生态科学, 2010, 29(6): 538–542
- 陈福. 南美白对虾与沙虫生态混养技术. 中国水产, 2009(12): 39–40
- 李凤鲁, 周红, 王玮. 中国沿海星虫动物门名录. 中国海洋大学学报, 1992, 22(2): 72–88
- 李俊伟, 朱长波, 颀晓勇, 等. 方格星虫的繁育、养殖及研究开发进展. 南方水产科学, 2014, 10(5): 94–98
- 沈先荣, 蒋定义, 贾福星, 等. 方格星虫延缓衰老作用研究. 中国海洋药物, 2004, 25(1): 30–32
- 余婕, 刘敏, 侯立君, 等. 底栖穴居动物对潮滩 N 迁移转化的影响. 海洋环境科学, 2004, 23(2): 1–4
- 张付国, 侯明泉, 郭建军. 利用生物改善虾池底质试验. 齐鲁渔业, 1996, 13(2): 5–7
- 张琴, 童万平, 董兰芳, 等. 饲料中脂肪水平对方格星虫稚虫生长性能、体组成及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 99–106
- 张琴, 许明珠, 程光平, 等. 不同糖对方格星虫稚虫生长、成活率及体组成的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 82–88
- 张琴, 许明珠, 童潼, 等. 饲料中不同糖对方格星虫稚虫日增重和消化酶的影响. 南方水产科学, 2014, 10(1): 21–26
- 张小勇, 杨茜, 孙耀, 等. 桑沟湾养殖海域柱状沉积物中磷的赋存形态和生物有效性. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 36–44
- 蒋定义, 沈先荣, 贾福星, 等. 海洋星虫提取物的营养分析及免疫调节作用的初步观察. 中国生化药物杂志, 2004, 25(2): 96–97
- 雷衍之. 养殖水环境化学实验. 北京: 中国农业出版社, 2006, 80–85
- 蔡德建, 蒋艳. 沙虫与文蛤滩涂生态混养初试. 科学养鱼, 2011(11): 37–38
- Ahlgren MO. Consumption and assimilation of salmon net pen fouling debris by the red sea cucumber *Parastichopus californicus*: implications for polyculture. J World Aquacult Soc, 1998, 29(2): 133–139
- Aller RC. Benthic fauna and biogeochemical processes in marine sediments: the role of burrow structures//Blackburn TH, Sørensen J (Eds.), Nitrogen cycling in coastal marine environments. Wiley, New York, 1988, 301–338
- Aller RC. Transport and reactions in the bioirrigated zone//Boudreau BP, Jørgensen BB (Eds.), The Benthic Boundary Layer. Oxford University Press, Oxford, 2001, 269–301
- Benninger LK, Aller RC, Cochran JK, et al. Effects of biological sediment mixing on the  $^{210}\text{Pb}$  chronology and trace metal distribution in a Long Island Sound sediment core. Earth Planet Science Lett, 1979, 43(2): 241–259
- Boyd CE. Bottom Soils, sediment and pond aquaculture. Chapman & Hall, New York, USA, 1995, 1–348
- Diaz RJ. Overview of hypoxia around the world. J Environ Qual, 2001, 30(2): 275–281
- Graf G. Benthic pelagic coupling: a benthic view. Oceanogr Mar Biol: An Annual Review, 1992, 30: 149–190
- Honda H, Kikuchi K. Nitrogen budget of polychaete *Perinereis nuntia vallata* fed on the feces of Japanese flounder. Fisheries Sci, 2002, 68(6): 1304–1308
- Hulth S, Aller RC, Canfield DE, et al. Nitrogen removal in marine environments: Recent findings and future research challenges. Mar Chem, 2005, 94(3): 125–145
- Karakassis I, Tsapakis M, Hatziyanni E, et al. Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. ICES J Mar Sci, 2000, 57(5): 1462–1471
- Li JW, Zhu CB, Guo YJ, et al. Experimental study of bioturbation by *Sipunculus nudus* in a polyculture system. Aquaculture, 2015, 437: 175–181
- Mermillod BF, Nogaro G, Vallier F. Laboratory study highlights the key influence of stormwater sediment thickness and bioturbation by tubificid worms on dynamics of nutrients and pollutants in stormwater retention system. Chemosphere, 2008, 72(2): 213–223
- Musale AS, Desai DV. Distribution and abundance of macrobenthic polychaetes along the South Indian coast. Environ Monit Assess, 2011, 178(4): 423–436
- Palmer PJ. Polychaete-assisted sand filters. Aquaculture, 2010, 306(1): 369–377
- Romero-Wetzel MB. Sipunculans as inhabitants of very deep, narrow burrows in deep-sea sediments. Mar Biol, 1987, 96(1): 87–91
- Sajana TK, Ghangrekar M, Mitra MA. Application of sediment microbial fuel cell for in situ reclamation of aquaculture pond water quality. Aquacult Eng, 2013, 57(1): 101–107
- Sanz-Lázaro C, Marín A. Assessment of finfish aquaculture impact on the benthic communities in the Mediterranean Sea. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 2. Ed Global Science Books (Special Issue I), 2008, 21–32
- Shields MA, Kedra M. A deep burrowing sipunculan of ecological and geochemical importance. Deep Sea Research, 2009, 56(1): 2057–2064
- Wang F, Wang WX, Huang XP. Spatial distribution of gut juice extractable Cu, Pb and Zn in sediments from the Pearl River Estuary, Southern China. Mar Environ Res, 2012, 77(6): 112–119
- Wolfrath B. Burrowing of the fiddler crab *Uca tangeri* in the Ria Formosa in Portugal and its influence on sediment structure. Mar Ecol Prog Ser, 1992, 85(3): 237–243
- Widdows J, Brinsley MD, Bowley N, et al. A benthic annular flume for in situ measurement of suspension feeding/bio-deposition rates and erosion potential of intertidal cohesive sediments. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1998, 46(1): 27–28
- Yingst JY. Factors influencing rates of sediment ingestion by *Parastichopus parvimensis* (Clark), an epibenthic deposit-feeding holothurian. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1982, 14(2): 119–134



## Influence of Bioturbation of *Sipunculus nudus* on the Nutrients of Sediment and Pore Water in the Polyculture System of *S. nudus* and *Mugil cephalus*

LI Junwei<sup>1</sup>, ZHU Changbo<sup>1</sup>, GUO Yongjian<sup>1</sup>, XIE Xiaoyong<sup>1</sup>, HUANG Guoqiang<sup>2</sup>, CHEN Suwen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture of China, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;

2. Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000)

**Abstract** To study the effects of bioturbation of *Sipunculus nudus* on the sediment and the pore water, we established a polyculture ecosystem consisting of *S. nudus* and *Mugil cephalus* in the laboratory conditions. The experiment was conducted in 20 breeding tanks (diameter 1 m, height 0.8 m, water volume 550 L). *S. nudus* [mean weight (1.2±0.1) g] was stocked at four different densities in the sandy sediment at the bottom of the tank: 0 (control), 50, 100 and 150 individuals per tank. In each tank 3 juvenile *M. cephalus* [mean weight (24.5±0.5) g] were cultured with normal ration supply in a net cage (diameter of 0.8 m, height of 0.6 m). The sediment was prepared in layers: the bottom layer was 6 cm thick medium sand (grain size 0.40–1.10 mm), and the top layer was 1 cm thick fine sand (grain size 0.10–0.28 mm). The results showed that the organic content in the bottom sediment (6–8 cm) in the experimental groups was slightly but insignificantly higher than that in the control group ( $P>0.05$ ). The contents of nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), ammonia nitrogen ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) and soluble reactive phosphorus (SRP) in the pore water increased gradually as the experiment lasted. At the end of the experiment, it was found that the  $\text{NO}_3\text{-N}$  content in the bottom pore water was negatively correlated with the density of *S. nudus*, and it was lower in pore water of the T100 and T150 groups than in the T0 group ( $P<0.05$ ). The  $\text{NH}_4\text{-N}$  content of the pore water in the surface layer was the highest in the T0 group. The TN content in the water column rose along with the increase in the density of *S. nudus*. During the experiment, the  $\text{NH}_4\text{-N}$  content of the bottom pore water in the T100 and T150 groups was significantly higher than that in the T0 group ( $P<0.05$ ). The lowest  $\text{NH}_4\text{-N}$  content was observed in all layers of the pore water in the T50 group. These results suggested that the bioturbation of *S. nudus* could partly boost the downward transportation of organic content across the sediment, and consequently affect the nutrients content in the pore water.

**Key words** *Sipunculus nudus*; Bioturbation; Sediment; Pore water; Nutrients

① Corresponding author: LI Junwei, E-mail: lijunwei303@163.com

# 刺参养殖池环境细菌群落对底质改良剂的响应\*



李晓龙<sup>1,2</sup> 李秋芬<sup>2①</sup> 姜妮妮<sup>2</sup> 刘淮德<sup>2</sup> 王晓红<sup>3</sup> 宋娴丽<sup>3</sup> 安鑫龙<sup>1①</sup>

(1. 河北农业大学海洋学院 秦皇岛 066003; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104)

**摘要** 运用平板培养计数法、最大或然数法和 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 指纹图谱技术, 分析发病刺参池塘环境中不同生理类群细菌数量及群落结构对底质改良剂的响应。结果显示, 加入底质改良剂后, 发病刺参池塘沉积环境中的总异养菌、硝化细菌、硫酸盐还原细菌等的数量在最初的 2-4 d 有所上升, 但升高幅度小于对照组, 且在之后的 2-4 d 内下降至加改良剂之前菌量; 在加入底质改良剂后第 2 天, 弧菌和硫化细菌数量便迅速下降, 明显低于对照组。PCR-DGGE 图谱及测序结果显示, 刺参养殖环境细菌优势菌分别属于绿弯菌门、变形菌门的莫拉菌科、柄杆菌科和气单胞菌科以及厚壁菌门的芽孢杆菌科和乳杆菌科的某种细菌, 多样性指数在 2.5-3.5 之间。实验组加入底质改良剂后, 气单胞菌属两种细菌数量逐渐下降。研究结果表明, 底质改良剂可改变沉积环境中不同细菌类群的数量, 降低致病菌的数量, 从而改善底质环境并对“刺参腐皮综合征”起到防治作用。

**关键词** 刺参; 养殖环境; 细菌群落; PCR-DGGE; 底质改良剂

**中图分类号** S949 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0111-08

随着我国刺参(*Apostichopus japonicus*)人工养殖业的迅速发展, 养殖环境逐年恶化(关晓燕等, 2010; 张莹等, 2009; 邢红艳等, 2014)。2003 年开始, 刺参病害大规模暴发, 死亡率高达 80% 以上, 且传播速度快、波及范围广, 造成的经济损失巨大, 并呈逐年加重的趋势(孟庆国等, 2006)。为了防治刺参病害, 养殖池塘常用水体消毒剂, 单纯使用消毒剂效果不明显(邱兆星等, 2008), 且消毒类药物或固态沉淀型底质改良剂接触刺参体表对刺参造成进一步的损害。近年来, 出现了以微生物制剂(朱学芝等, 2008; Vanbelle *et al*, 1990)和活性中草药成分(王印庚等, 2009)为主的底质改良剂, 在改善水质底质的同时, 通过分解有机物获得生长繁殖的能源, 具有不污染环境、成本低、无毒副作用的特点, 是目前养殖业首选的底质改良剂。但由于基础研究不够充分, 缺乏理论指导, 调控具有一定的盲目性。

只有在良好的环境条件下, 刺参才能健康生长, 刺参养殖环境的微生物群落作为养殖环境的重要组

成生物类群, 可以作为衡量养殖环境优劣的指标之一(王轶南等, 2010; Paerl *et al*, 2003), 因此, 有必要通过研究环境微生物对底质改良剂的响应, 来推断底质改良剂对养殖环境的调控效果。但据报道, 自然环境中能够获得纯培养的微生物仅有不到 1% (Amann *et al*, 1995), 因此仅仅依靠诸如显微镜、分离纯化培养等传统的微生物学方法并不能全面系统地分析某一环境微生物的多样性以及了解其在自然生态系统中发挥的作用, 而以 PCR 为基础的各种分子生物学方法得到越来越广泛的应用(Muyzer *et al*, 1993; 关晓燕等, 2010; 姜妮妮等, 2014)。本研究利用本课题组研制的含中草药成分底质改良剂对刺参发病的池塘养殖环境进行调控的同时, 利用平板培养计数法与 PCR、DGGE 等分子生物学方法相结合的技术, 对环境细菌群落结构变化进行分析, 以期掌握刺参养殖环境中细菌群落对底质改良剂的响应情况, 从而为通过人为调控养殖环境来防治刺参病害发生提供理论基础和技术依据。

\* 国家自然科学基金(31170113)资助。李晓龙, E-mail: yesterday1987@126.com

① 通讯作者: 李秋芬, 研究员, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn; 安鑫龙, 副教授, E-mail: axlqhd@126.com

收稿日期: 2014-01-18, 收修稿日期: 2014-04-28

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用底泥于2013年7月采集于山东省青岛市红岛区发生“腐皮综合征”的刺参养殖池塘。采样方法参照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法,使用德国Hydro-Bios公司Van Veen采泥器在池塘4个角和中间共5个点分别取泥,混合均匀后,低温条件下立即带回实验室进行室内试验,并从采样池内取得海水和患有“腐皮综合征”的病参,一同带回实验室。实验过程中使用的底质改良剂为本课题组自行研制的含中草药成分的底质改良剂(配方不宜在此公开)。

### 1.2 试验方法

实验在30 cm×60 cm的塑料箱中进行,每个箱底部平铺从发病的刺参池塘采集的底泥(厚10 cm)。实验分为两组,每组设3个平行。A组为对照组,不加底质改良剂;B组为实验组,加入正常剂量(0.66 g/箱)的底质改良剂,分别编号为A1、A2、A3、B1、B2、B3。最后在箱内加入10 L取自刺参养殖池的海水,并在每个箱中放入4头病参。之后分别在第1、2、3、4、5、6、10、15天的相同时间段采集箱内的底泥,采样方法同上,实验在室温25℃、正常光照条件下进行。

### 1.3 培养计数

对沉积物中的总异养菌、弧菌、硝化细菌、硫化细菌,分别利用2216E、TCBS、硝化细菌、硫化细菌固体培养基直接培养计数(李秋芬等,2002;李彬等,2012),对样品进行稀释后取0.1 ml直接涂布于相应培养基上;而硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌采用最大或然数法计数(朱永艳等,2006),对样品进行稀释后取1 ml样品接种至相应的液体培养基,于28℃恒温培养箱中培养。异养菌和弧菌在接种2 d后计数菌落(30–300 CFU/板为有效范围),硫化菌和硝化菌在接种7 d后计数,硝酸盐还原菌在接种后7 d进行计数,硫酸盐还原菌在接种14 d后进行计数。最后查MPN表,并根据稀释倍数和接种量计算单位体积或单位质量的细菌数量。

### 1.4 DNA的提取

将A1、A2、A3和B1、B2、B3分别混合,作为对照组和实验组相应采样时间的样品,参照傅莲英等(2006)报道的方法提取DNA,并根据沉积物样品特性加以改进,将异丙醇室温沉淀DNA 1 h改为异丙醇4℃过

夜沉淀DNA,并使用DNA Clean&Concentrator TM-25试剂盒(Zymoclean公司)对DNA提取产物进行纯化。

### 1.5 16S rDNA V3区扩增

以上述提取的DNA为模板,采用细菌16S rDNA V3区通用引物341F(5'-GCC TAC GGG AGG CAG CAG)和758R(5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC C)进行扩增,并在341F 5'端加入长为40 bp的富含GC的片段(Holben *et al.*, 2004),以使DNA片段DGGE的检出率从50%左右提高到几乎100% (Muyzer *et al.*, 1998)。反应条件:95℃预变性5 min,然后94℃变性30 s,52℃退火45 s,72℃延伸2 min,进行30个循环,最后72℃延伸10 min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。使用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)对PCR产物进行纯化。

### 1.6 DGGE、克隆、测序、序列分析

纯化的PCR产物采用Bio-Rad DCode™突变检测系统(Hercules, CA)进行分离。所用聚丙烯酰胺浓度为8%,变性剂线性梯度范围为45%–65%,60℃、60 V下电泳18 h。电泳结束后取下凝胶,在含有300 ml 1×TAE和30 μl Gel Green核酸染料的塑料盘中染色,室温下染色30 min左右,之后用凝胶成像分析系统(DNR,以色列)观察照相。然后对代表性优势条带进行切胶、PCR、克隆,将克隆产物送往上海生工进行测序,测序结果在NCBI中进行同源性比较,从中选取与其相似性最高的细菌16S rDNA序列,使用软件Quantity One对序列进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 底泥中不同生理类群细菌的数量变化

将异养菌的3组平行数据取平均值后作图(图1)。加底质改良剂的实验组中,异养菌数量呈先上升后下降的趋势,在第4天开始缓慢下降,15 d后恢复至加改良剂前的水平,波动范围为 $(1.27 \pm 0.66) \times 10^4$ – $(2.71 \pm 0.81) \times 10^5$  CFU/g;而不加改良剂的对照组,与实验组变化趋势相同,但变化幅度较大,且最高值出现在第5天,而后一直高于实验组,数量波动范围为 $(1.27 \pm 0.19) \times 10^4$ – $(8.07 \pm 0.40) \times 10^5$  CFU/g。

将弧菌的3组平行数据取平均值后作图(图2),实验组在加入底质改良剂后,两天内弧菌数量急剧下降,之后维持在较低水平,且一直比对照组低,波动范围为 $(1.00 \pm 0) \times 10^2$ – $(5.80 \pm 1.20) \times 10^3$  CFU/g;对照组

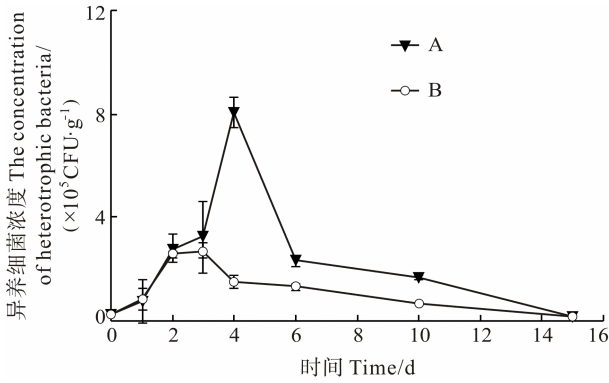


图 1 沉积物中异养细菌数量随时间的变化

Fig.1 Time-course of heterotrophic bacteria in sediment

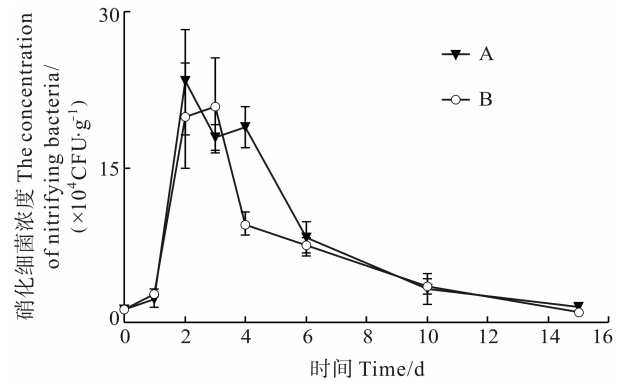


图 3 沉积物中硝化细菌数量随时间的变化

Fig.3 Time-course of nitrifying bacteria in sediment

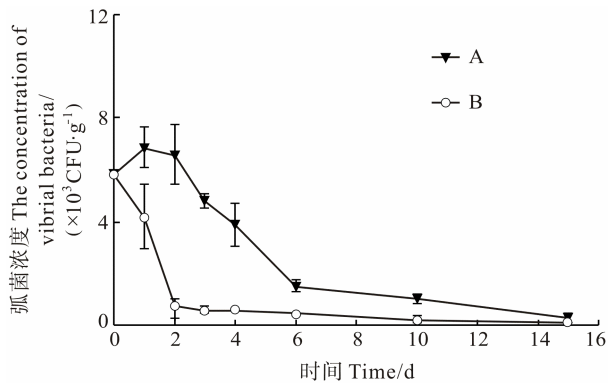


图 2 沉积物中弧菌数量随时间的变化

Fig.2 Time-course of *Vibrio* in sediment

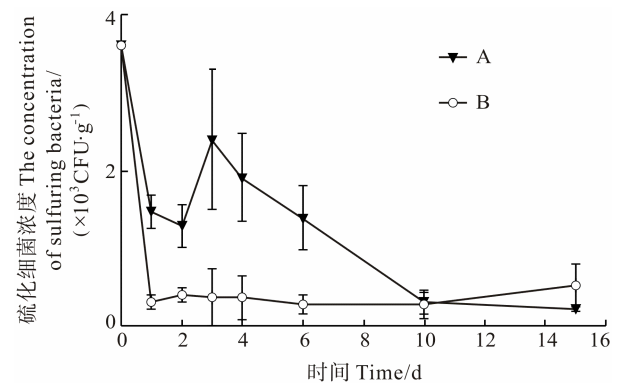


图 4 沉积物中硫化细菌数量随时间的变化规律

Fig.4 Time-course of sulfuring bacteria in sediment

弧菌数量则有一个缓慢升高过程, 第 3 天才开始下降, 下降趋势较实验组缓慢, 波动范围为 $(2.50 \pm 0.18) \times 10^2 - (6.87 \pm 0.83) \times 10^3$  CFU/g。

将硝化细菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 3), 实验组在加入底质改良剂后所呈现出的硝化菌量变化大体趋势为先升后降, 除第 3 天外, 数量均低于对照组, 波动范围为 $(9.14 \pm 2.35) \times 10^3 - (2.09 \pm 0.50) \times 10^5$  CFU/g; 对照组的菌量变化大体呈先升后降趋势, 中间稍有波动, 波动范围为 $(1.17 \pm 0.39) \times 10^4 - (2.32 \pm 0.51) \times 10^5$  CFU/g。

将硫化细菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 4), 实验组加入底质改良剂之后 1 d, 硫化细菌数量即出现明显下降, 之后一直较低, 波动范围为 $(2.83 \pm 0.76) \times 10^2 - (3.60 \pm 0.32) \times 10^3$  CFU/g; 对照组中硫化细菌数量下降趋势则较为缓慢, 甚至在第 3 天又有上升, 之后又缓慢下降, 波动范围为 $(2.10 \pm 0.36) \times 10^2 - (3.60 \pm 0.9) \times 10^3$  CFU/g。

将硝酸盐还原菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 5), 实验组和对照组硝酸盐还原菌菌量变化无明显差异, 均为先上升, 在第 4 天达到最大值, 之后数量下降, 10 d 后趋于平稳达到稳定值。实验组数量波动范

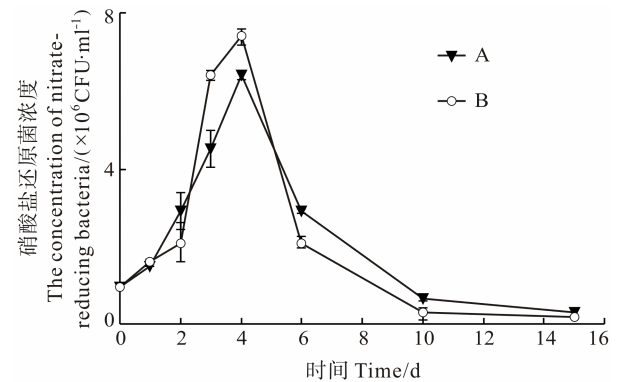


图 5 沉积物中硝酸盐还原菌数量随时间的变化

Fig.5 Time-course of nitrate-reducing bacteria in sediment

围为 $(1.50 \pm 0.24) \times 10^5 - (7.40 \pm 0.11) \times 10^6$  cells/ml, 对照组波动范围为 $(2.70 \pm 0.39) \times 10^5 - (6.40 \pm 0.59) \times 10^6$  cells/ml。

将硫酸盐还原菌的 3 组平行数据取平均值后作图(图 6), 两组数量变化趋势完全相同, 但实验组低于对照组, 且变化幅度较小, 实验组波动范围为 $(2.40 \pm 0) \times 10^0 - (2.70 \pm 0.97) \times 10^1$  cells/ml, 对照组波动范围为 $(3.60 \pm 0) \times 10^0 - (4.13 \pm 1.70) \times 10^1$  cells/ml。

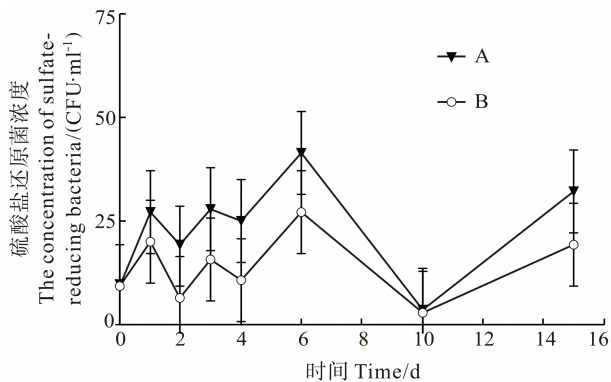


图6 沉积物中硫酸盐还原菌数量随时间的变化  
Fig.6 Time-course of sulfate-reducing bacteria in sediment

### 2.2 DNA 的提取扩增与纯化

提取的 DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现条带较亮(图 7), 表明提取效果较好, DNA 数量较多, 大小在 20 kb 左右。扩增纯化后的 DNA 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 条带明亮, 且无非特异性带(图 8), 说明引物 341FGC 和 758R 对细菌的 16S rDNA 基因的扩增效果较好。

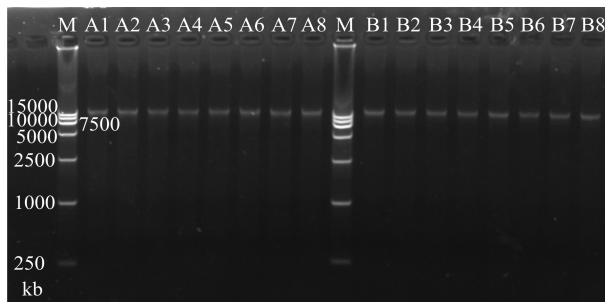


图7 沉积物中 DNA 的提取  
Fig.7 Agarose gel electrophoresis of the extracted DNA from sediment

M: DNA marker; A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时  
M: DNA marker; A1-A8 和 B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

### 2.3 底泥 DGGE 图谱结果

引物 341FGC 和 758R 对细菌的 16S rRNA 基因的扩增产物在 DGGE 图谱上得到较好的分离。由图 9 可以看出, 16 个不同样品中分别形成了 7-22 条亮带。随时间推移, 带谱特征有所变化; 相同时间段, 实验组和对照组有一定差异。其中条带 5、6、7、8、14、22、26 在所有样品中均有出现, 且较亮, 可能为共有优势菌。

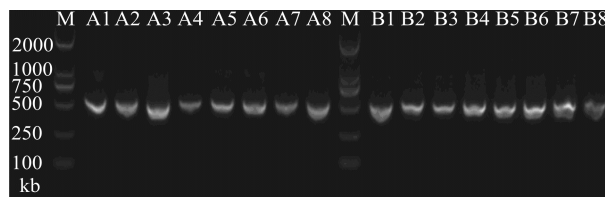


图8 16S rDNA-V3 区扩增  
Fig.8 Agarose gel electrophoresis of PCR for the V3 region of 16S rDNA of the sediment bacteria

M: DNAmarker; A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时  
M: DNA marker; A1-A8 and B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

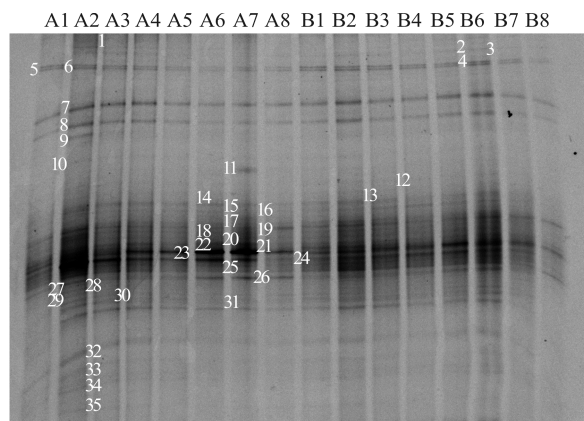


图9 沉积物中菌群 16S rDNA 的 DGGE 指纹图谱  
Fig.9 DGGE fingerprint of the 16S rDNA of the bacteria from the different sediment samples

A1-A8 和 B1-B8: A、B 组样品分别在第 1、2、3、4、5、6、10、15 天时  
A1-A8 和 B1-B8: Mixed sediment of Group A and B at the day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, and 15

样品的多样性指数如图 10 所示, 实验组呈升高下降、再升高下降的趋势; 对照组则呈升高、下降趋势, 但两组波动都不大, 多样性指数均集中在 2.5-3.5 之间。

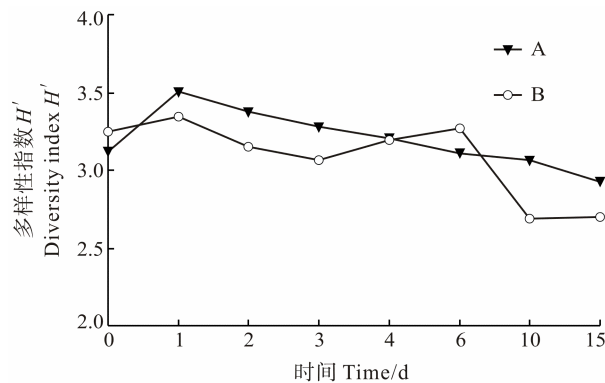


图10 沉积物中细菌的多样性指数  
Fig.10 Diversity index of the bacteria from different sediment samples



表1 优势菌序列对比结果  
Tab.1 Alignment results with the sequences of the closest relative of the dominant species

条带 No. of the band	GenBank 登录号 GenBank accession number	物种名 Species name	所属细菌门类 Bacterial categories	相似度 Similarity (%)
5	JN676117.1	<i>Acinetobacter</i> sp. PAO16	变形菌门莫拉菌科 <i>Acinetobacter</i> in proteobacteria	95
6	JX473725.1	<i>Staphylococcus</i> sp. W-2	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	100
7	AB682432.1	<i>Phenylobacterium composti</i> gene	变形菌门柄杆菌科 Caulobacteraceae in proteobacteria	99
8	KC107218.1	<i>Staphylococcus</i> sp. B(2012)	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	100
14	KC202268.1	<i>Aeromonas</i> sp. S5-13	变形菌门气单胞科 <i>Aeromonas</i> in proteobacteria	95
22	DQ463738.2	Uncultured Chloroflexi bacterium clone TK-SH18	Chloroflexi	99
23	JF987238.1	Uncultured bacterium clone Paddy_75_6536	Uncultured bacterium	99
26	JX899588.1	<i>Aeromonas</i> sp. REM-amp_229	变形菌门气单胞科 <i>Aeromonas</i> in proteobacteria	99
31	NR_036982.1	<i>Lactobacillus iners</i> strain DSM 13335	厚壁菌门芽孢杆菌科 <i>Staphylococcus</i> in Firmicutes	99
32	GQ412932.1	Uncultured bacterium clone 2FSeds_D04	Uncultured bacterium	99

2013)表明,气单胞菌、灿烂弧菌和副溶血弧菌是导致刺参“腐皮综合征”的主要致病菌,为此可以将养殖环境沉积物中的某些已知病原菌含量的变化作为指示刺参养殖环境优劣的标尺之一(陈文博等,2012;牛宇峰,2009<sup>1)</sup>)。抗生素及其他违禁药物被用于疾病防治,虽然起到一定的效果,但必将引起细菌抗药性及药物残留,严重阻碍刺参养殖业的健康良性发展,因此寻找健康环保的治病方法是目前的研究热点。近年来关于使用底质改良剂调节刺参养殖池塘的报道尚不多见,其中陈文博等(2012)研究了微生态制剂对养参池弧菌数量变化的影响;伏传永等(2008)<sup>2)</sup>报道,作为益生菌的枯草芽孢杆菌对条件性致病菌——弧菌有明显的抑制、拮抗作用,但益生菌在经历指数增长后会进入繁殖停滞的稳定期,对弧菌的抑制作用也会迅速减弱。微生态制剂还可作为水质调节剂,净化养殖环境,降低刺参养殖水体的COD、亚硝酸盐和氨氮等,并且可以直接利用沉积物中的不溶性有机物,从而加速对这些污染物的降解(Rengpipat *et al.*, 2000);另外,王东梅等(2012)报道,复方中草药能够在某种程度上增强刺参体腔液中的免疫因子 AKP、

ACP、SOD及NOS的活性;陈效儒等(2010)的研究表明,在饲料中甘草酸的添加量为200 mg/kg时,刺参的免疫力、抗病力和生长速度均得到显著提高。

本课题组经长期研究,研制出含中草药成分的底质改良剂,本次试验验证了其治疗刺参“腐皮综合征”的效果,也从环境微生物学角度揭示了其防治刺参疾病的机理。从细菌培养计数结果来看,加入底质改良剂的实验组多数可培养细菌的数量出现迅速下降,并维持在较低的水平,大多低于对照组,作为致病菌的弧菌变化尤为显著,同时可观察到该组发病刺参化皮面积逐渐减少,化皮症状逐渐消失,表明“腐皮综合征”基本痊愈。相比而言,未加入底质改良剂的对照组则在大部分时间细菌数量高于实验组,发病刺参化皮面积未见明显缩小,最后均死亡。由此可以看出本课题组的底质改良剂可降低“腐皮综合征”致病菌数量,对刺参“腐皮综合征”有一定的防治效果。而且,细菌16S rRNA基因的PCR-DGGE指纹图谱和切胶测序结果显示,莫拉菌科反硝化菌(*Acinetobacter* sp.)一直作为优势菌群存在,也可印证硝酸盐还原菌在培养过程中细菌数量持续较高。作为致病菌的气单胞菌

1) 牛宇峰. 刺参养殖池塘异养菌数量变动及区系组成的初步研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 32-61

2) 伏传永. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对刺参腐皮综合征致病菌的拮抗作用以及对水质的影响. 中国海洋大学硕士学位论文, 2008, 28-36

(*Aeromonas* sp.)(王高等, 2007)在实验组加入底质改良剂后条带明显变暗, 反映出细菌数量逐渐下降, 优势度降低, 也解释和印证了本课题组底质改良剂对刺参“腐皮综合征”有明显的治疗效果, 这为刺参腐皮综合征的防治提供了一个有效的方法和思路。同时, 在本次模拟试验中, 也发现实验组和对照组有时细菌数量没有表现出明显的差异, 可能与试验持续时间短、添加底质改良剂剂量偏小有关, 也可能是由于刺参发病与今年夏天我国北方持续高温且雨水偏多等物理因素有关, 需要进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 王轶南, 朱世伟, 常亚青. 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
- 王东梅, 王维新. 复方中草药对刺参免疫的影响. 饲料研究, 2012(11): 63-65
- 王高等, 原居林, 赵云奎, 等. 刺参表皮溃烂病原菌的分离鉴定与药敏试验. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(8): 87-90, 96
- 王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 1-7
- 王印庚, 荣小军, 张凤萍, 等. 养殖刺参“腐皮综合征”致病菌——灿烂弧菌的原位杂交检测方法的建立与应用. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 114-118
- 关晓燕, 周遵春, 陈仲, 等. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. 海洋湖沼通报, 2010, 11(1): 82-88
- 朱学芝, 郑石轩, 潘庆军, 等. 微生态制剂对凡纳滨对虾生长及水质的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(Z1): 58-62
- 朱永艳, 郑传波, 李言涛, 等. 海泥中硫酸盐还原菌数量变化对主要腐蚀环境因子的影响. 海洋科学, 2006, 30(11): 37-40
- 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. 海洋科学, 2012, 36(4): 63-67
- 李秋芬, 曲克明, 陈碧鹃, 等. 老化虾池生态系中几类主要细菌的季节变化特征. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 12-19
- 邢红艳, 马元庆, 李斌, 等.  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  对刺参幼参的急性毒性及其富集. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 91-96
- 邱兆星, 王晓红, 王宝庭, 等. 海参养殖发病的原因及对策. 齐鲁渔业, 2008, 25(3): 52-53
- 张莹, 姜国良, 刘云, 等. 仿刺参“腐皮综合征”病灶处优势菌的分离鉴定及 AHLs 信号分子的检测. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1664-1669
- 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123
- 陈文博, 王洪军, 李勃, 等. 养参池底泥弧菌数量变动及微生态制剂对其影响. 水产养殖, 2012, 33(10): 40-43
- 陈效儒, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中添加甘草酸对刺参生长、免疫及抗病力的影响. 水生生物学报, 2010, 34(4): 731-738
- 孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃瘍病原学研究. 水产科学, 2006, 25(12): 635-639
- 姜妮妮, 李秋芬, 刘淮德, 等. 养殖沉积环境中气单胞菌属细菌的实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 126-133
- 傅莲英, 席峰, 袁建军, 等. 海水养殖沉积环境微生物总 DNA 的提取方法研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(6): 841-846
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169
- Holben WE, Feris KP, Kettunen A, et al. GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(4): 2263-2270
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700
- Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141
- Paerl HW, Dyble J, Moisaner PH, et al. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 46(3): 233-246
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288
- Vanbelle M, Teller E, Focant M. Probiotics in animal nutrition: a review. Archives of Animal Nutrition, 1990, 40(7): 543-567
- Wang YG, Zhang CY, Rong XJ, et al. Diseases of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in China. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Report, 2004, 463: 297-310

(编辑 冯小花)



## Responses of Bacterial Community to the Sediment Improver in the Environment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds

LI Xiaolong<sup>1,2</sup>, LI Qiufen<sup>2①</sup>, JIANG Weiwei<sup>2</sup>, LIU Huaide<sup>2</sup>, WANG Xiaohong<sup>3</sup>,  
SONG Xianli<sup>3</sup>, AN Xinlong<sup>1①</sup>

(1. Ocean College of Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104)

**Abstract** Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming industry has been developing rapidly in North China, but at the meanwhile sea cucumber diseases has become a growing problem. The environmental deterioration was considered one of the main causes. A type of sediment improver studied by our research group has been proved to be effective in adjusting the sediment environment of the sea cucumber culture ponds. In order to detect the responses of the bacterial community to the sediment improver, we conducted experiments using the sediment from the disease-occurring sea cucumber culture ponds. The sample treated with the sediment improver was the trial group and that without the improver was the control group, and we set 3 parallels for each group. The plant counting method and the most probable number method were used to determine the change in the numbers of several bacterial groups in the sediment after the addition of the sediment improver. The bacterial diversity was analyzed using the 16S rRNA gene PCR-DGGE and the sequencing techniques. The results showed that in the trial group the numbers of the heterotrophic bacteria, the nitrifying bacteria and the sulfate-reducing bacteria in sea cucumber pond sediments increased in the first 2 to 4 days, followed by a decrease and then maintained at a low level, and the increase was significantly smaller than that in the control group. The numbers of Vibrionaceae and sulfurizing bacteria sharply declined 1 day after the addition of the sediment improver, which were significantly lower than those in the control group. The sequencing result of DGGE bands showed that the dominant bacteria in the sea cucumber culture environment belonged to chloroflexi, moraxellaceae, Caulobacteraceae, Aeromonadaceae in proteobacteria, bacillaceae, and lactobacillaceae in firmicutes. The bacterial diversity indexes varied between 2.5 and 3.5. The numbers of 2 species of *Aeromonus* were observed to decline after the addition of the sediment improver in the trial group. Therefore, we concluded that the sediment improver could adjust the numbers of different bacterial groups in the sediment environment and reduce the quantity of some pathogenic bacteria. The sediment improver may thus improve the quality of the pond sediment environment and protect *A. japonicus* from diseases.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Aquaculture environment; Bacterial community; PCR-DGGE; Sediment improver

① Corresponding author: LI Qiufen, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn; AN Xinlong, E-mail: axlqhd@126.com

# 多巴胺复合超滤膜的制备及其在海水养殖 废水处理中的应用\*



王 栋 徐 佳 单宝田<sup>①</sup> 宋 迪 刘瑞聪

(中国海洋大学化学化工学院 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室 青岛 266100)

**摘要** 将聚砜基膜浸泡在 2 g/L 的多巴胺溶液中,在震荡培养箱中涂覆 12 h,之后用去离子水震荡清洗 24 h 得到多巴胺复合超滤聚砜膜。红外光谱分析结果显示,复合膜为多巴胺聚合在聚砜膜表面形成的复合膜,接触角为 63°,较基膜减小 21°,亲水性显著加强;在 0.10 MPa 压力下,对海水养殖废水进行分离实验,对海水养殖废水总悬浮物(TSS)、化学需氧量(COD)的去除率分别达到 100%、83.3%,具有良好的去除效果。

**关键词** 多巴胺复合膜;超滤;海水养殖;废水处理

**中图分类号** S967 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0119-05

近年来,随着养殖业的迅猛发展,海水工厂化养殖在规模和数量上急剧增加。海水工厂化养殖废水若得不到有效处理后排放,必然会对邻近海域水体产生污染。目前,处理海水养殖废水的方法主要有物理法、化学法和生物法等,主要去除废水中的悬浮物(SS)、氨氮、化学需氧量(COD)、生物需氧量(BOD)等(单宝田等, 2002; 周华等, 2000),以达到循环利用或排放的要求。针对海水养殖废水的特点,这些方法均存在一些不足:物理法可以去除悬浮物,但对一些溶解性的污染物无法很好的去除;化学法对溶解性污染物的去除效果要比物理法好,但其处理成本相对较高;生物法因海水盐度过高而效率降低明显。与传统的海水养殖废水处理方法相比,膜技术具有操作管理方便,效率高等优点,可弥补传统工艺处理海水养殖废水的不足(朱建新, 2014),但膜技术应用中的膜污染问题影响了其推广应用。为减缓膜的污染, Mohammad 等(2012)从膜材料改性、流体力学优化、膜清洗 3 个方面总结了超滤膜处理水产养殖废水膜污染的措施。Chen 等

(2011)利用相转化法制得聚丙烯腈(PAN)-B-聚乙二醇(PEG)共聚物超滤膜,比 PAN 超滤膜有更好的抗污染能力。

研究发现,海洋动物贻贝分泌物中粘着蛋白的功能元左旋-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA, 多巴)及其儿茶酚衍生物 3,4-二羟基苯丙氨(Dopamine, 多巴胺),可在特定条件下自发聚合,强力附着于材料表面(陈丽娟等, 2012; 徐又一等, 2011)。这种海洋动物提取物不仅具有大量亲水性基团,还具有在海水中抗生物附着的特性(车芳琳等, 2011; 李小林等, 2010<sup>1)</sup>)。目前,国内外对此领域的研究非常重视,多巴(胺)自聚-复合技术成为了固体材料表面改性的研究热点,主要应用于多功能仿生药物、生物分子表面涂覆和表面抗生物处理等领域。此外,聚多巴(多巴胺)层还能够赋予超滤基膜以疏松纳滤膜孔结构特点,从而改善对水体中 COD 等指标的去除效率。

本研究以聚砜超滤膜为基膜,涂覆多巴胺制得了多巴胺复合聚砜膜,对其进行了表征和性能评价。并

\* 山东省科技发展计划项目(2012GHY11529、2014GHY115033)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2012HZ016)共同资助。王 栋, E-mail: wd\_charrel@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者:单宝田,教授, E-mail: btshan@ouc.edu.cn

收稿日期:2014-04-16, 收修修改稿日期:2014-05-26

1) 李小林,朱利平,易砖,等.以聚多巴胺为分离层的复合纳滤膜制备与表征.第七届中国功能材料及其应用学术会议论文集(第6分册),2010,45-47

利用制得的复合膜,对海水养殖废水进行了分离实验,取得了较好的处理效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

盐酸多巴胺(DA),分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司。聚砜超滤膜,上海蓝景科技有限公司提供。HZQ-X100 振荡培养箱,哈尔滨市东明医疗仪器厂。实验室自制超滤膜评价仪。DSA100 接触角测量仪,德国克吕士公司。UV-2540 紫外可见分光光度计,岛津(苏州)仪器有限公司。SENSOR27 红外光谱仪,德国布鲁克光谱仪器公司。S4800 扫描电子显微镜,日本日立公司。

### 1.2 多巴胺复合膜的制备

多巴胺复合膜制备过程分为:浸泡、清洗、涂覆、再清洗。将聚砜基膜用去离子水充分冲洗,放入洁净的去离子水中浸泡 24 h。将浸泡后的聚砜基膜用去离子水冲洗,洗去膜上残留的浸泡液。放入异丙醇中浸泡 2 h,之后在异丙醇中振荡清洗 1 h,异丙醇处理可以去除膜上滋生的细菌和残留在膜表面或膜孔隙中的制膜原料。再用去离子水将异丙醇完全洗去,放入去离子水中浸泡待用。

将去离子水浸泡后的聚砜基膜裁剪成反应池大小,放入膜反应池中,加入 2 g/L 多巴胺溶液 50 ml,迅速封闭反应池放入振荡培养箱中,37℃下振荡浸泡 12 h(高从塔等,2004)。将涂覆好的复合膜从反应池中取出,用去离子水洗去膜表面残留的涂覆液,用脱脂棉轻拭复合层,将没有聚合在膜表面的多巴胺分子洗掉。充分清洗后将膜放入去离子水中,振荡清洗 24 h,振荡清洗期间每 6 h 换水。振荡清洗完毕后,将膜超声清洗 4 s 后再使用。

### 1.3 多巴胺复合超滤膜表征

采用傅立叶表面衰减全反射变换红外分析(ATR-FTIR)对膜涂覆前后表面化学物质的结构进行测定。用 DSA100 型视频光学接触角测量仪测定超滤膜表面的纯水静态表观接触角,分析涂覆前后膜亲水性的变化。用扫描电子显微镜(SEM)对膜表面结构形貌进行分析。

### 1.4 多巴胺复合超滤膜超滤性能实验

实验用超滤评价仪由实验室自制。以蠕动泵供给 0.1 MPa 稳定的压力,来测试膜的分离及透过性能。

将膜按照超滤仪要求裁剪,用去离子水冲洗,脱脂棉擦净,放入评价仪内。以去离子水为进料液,预压半小时后,通过超滤测试可得到膜的透水速率和截留率(时均等,2001;郑京平,2011)。

**1.4.1 纯水通量** 指在一定的压力和温度下,单位面积膜在单位时间内纯水的初始透过量,可由下式表示:

$$J = Q / At$$

式中, $Q$  为在  $t$  时间内的纯水通过量(ml), $A$  为有效膜面积( $\text{cm}^2$ ), $t$  为时间(h)。

**1.4.2 截留率** 指膜对溶液中某种溶质的截留程度。溶液中某种溶质的浓度为  $C_f$ ,透过液中该溶质的浓度  $C_p$ ,则截留率  $R$  由下式定义:

$$R = (1 - C_p / C_f) \times 100\%$$

### 1.5 多巴胺复合聚砜超滤膜处理海水养殖废水

水样预处理:将养殖废水静置放置 24 h,使泥沙和鱼的粪便等较大的颗粒充分沉淀。取出上层清液装入贮藏瓶中,封口后放入冰箱中 4℃ 下保存。

取保存的水样,用滤纸过滤。烘干后,根据前后质量差计算出水中悬浮物(SS)的含量。之后取过滤液,用碱性高锰酸钾法测化学需氧量(COD),用纳氏试剂比色法测海水中氨氮的含量(胡海燕,2007)<sup>1)</sup>。用制得的多巴胺聚砜复合膜进行膜分离处理,分离液测定 COD 和氨氮。

## 2 结果与分析

### 2.1 傅立叶表面衰减全反射变换红外分析(ATR-FTIR)

分别对 PS 基膜和多巴胺复合聚砜膜进行了红外光谱分析,其红外光谱图如图 1 所示。

由图 1 中基膜的红外光谱可见,在  $1250 \text{ cm}^{-1}$  出现 S=O 伸缩震动峰,在  $1600 \text{ cm}^{-1}$  和  $1510 \text{ cm}^{-1}$  出现了芳环的 C=C 共振峰和弯曲振动的重叠峰,这些都是聚砜膜的特征峰。

由图 1 中多巴胺复合聚砜膜的红外光谱可见,在  $3500\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$  出现了 N-H/O-H 的伸缩震动峰, $1519 \text{ cm}^{-1}$  处出现了氨基的 N-H 剪力震动峰, $1394 \text{ cm}^{-1}$  处出现了 C-O-H 的震动峰,都是多巴胺的特征峰,出现这些峰值说明多巴胺已经聚合在聚砜膜的表面。

### 2.2 扫描电子显微镜(SEM)形貌图

聚砜基膜表面形貌与多巴胺复合聚砜膜表面形貌见图 2。

1) 胡海燕. 水产养殖废水氨氮处理研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2007, 100-101

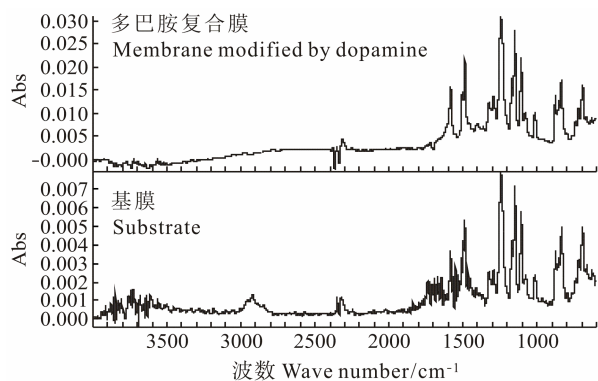


图 1 基膜与多巴胺复合膜的红外光谱

Fig.1 Infrared spectrum of the substrate and the membrane modified by dopamine

在扫描电子显微镜下可以清晰观察到膜的表面形貌, 由图 2-a 可以清晰看到聚砜基膜表面的空隙。图 2-b 是多巴胺复合聚砜膜表面的扫描电镜图, 膜表面出现一些粒子, 是因为多巴胺分子自聚成为粒子然后再聚合在聚砜膜的表面。由于多巴胺分子聚合在膜表面导致了聚砜膜表面微孔被覆盖, 孔隙的数量和孔隙的大小都有所减小。这样经过涂覆后膜的厚度明显增加, PS 基膜厚度为 213  $\mu\text{m}$ , 涂覆后得到的复合膜的厚度增加到 239  $\mu\text{m}$ 。而且会改善膜的分离性能, 增加自身的截留率。

### 2.3 接触角的测量

接触角大小是表征膜表面亲/疏水性的重要指标。在进行多巴胺涂覆后, 膜表面会增加大量亲水性基团, 这会使复合膜的接触角减小, 亲水性增强。

用 DSA100 型视频光学接触角测量仪测定超滤膜表面的纯水静态表观接触角, 测得的 PS 基膜的接触角是  $84^\circ$ , 多巴胺涂覆后的复合膜接触角为  $63^\circ$ 。经过多巴胺涂覆的复合膜接触角较比基膜明显减小, 亲水性得到了显著改善。这是由于多巴胺分子

聚合在膜表面, 越多分子聚合, 膜表面就会有越多的亲水基团, 膜的亲水性就越好。

### 2.4 多巴胺复合聚砜超滤膜分离性能实验

将不同条件下制得的分离膜放入超滤评价仪中, 以去离子水为料液, 在操作压力 0.15 MPa 下预压运行 0.5 h, 然后在 0.05–0.15 MPa 范围内取 5 个压力段, 分别测定纯水通量, 并计算出各压力对应的纯水透过系数( $L_p$ )。

以 5 mg/L 的腐殖酸(HA)溶液为进料液, 在 0.10 MPa 下进行膜过滤 2 h, 其中每 15 min 接水样进行测量。考察分离膜的分离性能, 包括膜通量和截留率, 每个条件下做平行试验。利用紫外分光光度计在 254 nm 波长下分别测定进料液和透过液的吸光度, 以  $U_{254}$  表征溶液中 HA 浓度。

基膜与复合膜截留率、基膜与复合膜水通量见图 3 和图 4。聚砜膜基膜的纯水通量在 0.10 MPa 下是 276.16  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 在 90 min 内对 HA 的截留率平均为 60%。当涂覆多巴胺后, 制得的多巴胺聚砜复合膜的纯水通量变为 147.62  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 在 90 min 内对 HA 的平均截留率变为 78%。经过多巴胺复合后, 膜的分离性能得到提高, 原因是多巴胺分子在聚砜膜表面复合后, 使膜的空隙变得更加致密, 从而提高了膜的截留率, 水桶量相应有所下降。从图 3–图 4 可看出, 当进料液为 HA 时, 在 90 min 的接样时间内, 水通量随时间而降低, 原因是在过滤过程中膜遭到一定程度的污染, 空隙被腐植酸的分子堵塞, 致使通量减少。多巴胺复合膜的水通量从 110  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  下降到 80  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 而 PS 基膜的水通量从 190  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  下降到 100  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 多巴胺复合膜的水通量下降的比例较小。图中显示出的曲线斜率也较小, 说明涂覆之后膜抗污染的性能有所增加。

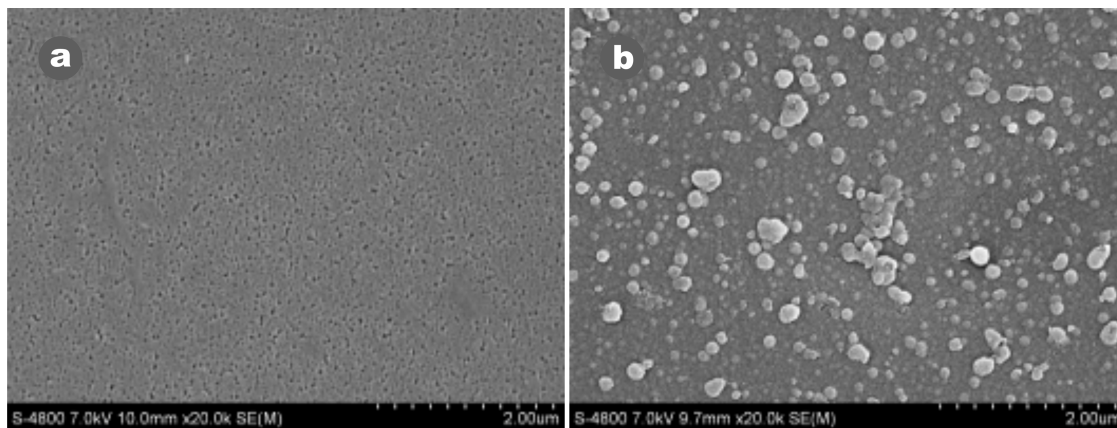


图 2 基膜与多巴胺复合聚砜膜表面形貌

Fig.2 SEM of the substrate and the membrane modified by dopamine

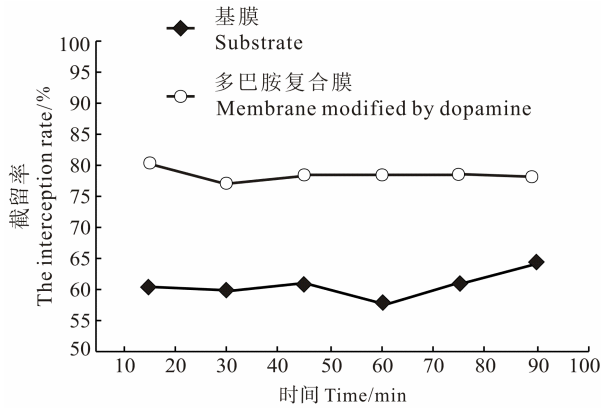


图3 基膜与复合膜截留率

Fig.3 HA rejection of the substrate and the membrane modified by dopamine

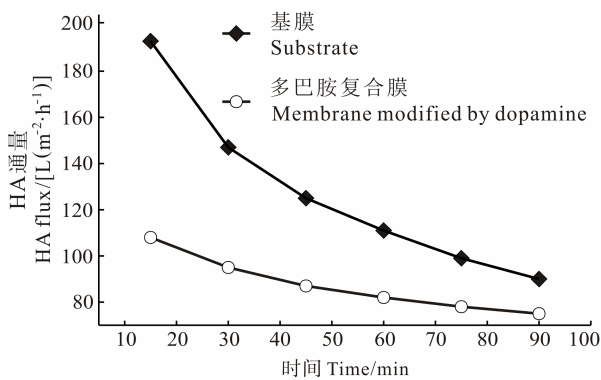


图4 基膜与复合膜 HA 通量

Fig.4 Flux of the substrate and the membrane modified by dopamine

## 2.5 多巴胺复合膜处理海水养殖废水

实验水样来自于中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心的对虾养殖水。水样取回后在4℃下冷藏。实验主要测定了水样中TSS、COD、氨氮3个指标。分别用PS基膜、多巴胺复合聚砜膜对水样进行处理,比较两种膜处理养殖废水的处理效果。

**2.5.1 对TSS的去除效果** PS基膜和多巴胺复合聚砜膜对养殖废水TSS的处理结果见表1。经PS基膜后和多巴胺复合聚砜膜处理后,废水中悬浮物得到完全去除。

**2.5.2 对COD的去除效果** PS基膜和多巴胺复合聚砜膜对养殖废水COD的处理结果见表2。

由表2可见,PS基膜对COD的去除率为72.22%,水通量为107.22 L/(m²·h);多巴胺复合聚砜膜对COD的去除率为83.26%,水通量为96.08 L/(m²·h)。随着膜空隙变得致密,对COD的处理效果越来越好。处理后的海水养殖废水COD达到了第二类海水水质标准。

表1 基膜与复合膜对SS的去除率

Tab.1 SS removal of the substrate and the membrane modified by dopamine

膜名称 Membrane type	过滤前水中悬浮物含量 SS in feed (mg/L)	过滤后水中悬浮物含量 SS in permeate (mg/L)
基膜 Substrate	35	0
多巴胺复合膜 Membrane modified by dopamine	35	0

表2 基膜与复合膜对COD的去除率

Tab.2 COD rejection of the substrate and the membrane modified by dopamine

膜名称 Membrane type	水样中COD含量 COD in feed (mg/L)	过滤后水中COD含量, COD in permeate (mg/L)	去除率 Removal (%)
基膜 Substrate	13.50	3.75	72.22
多巴胺复合膜 Membrane modified by dopamine	13.50	2.26	83.26

**2.5.3 对氨氮去除效果** PS基膜和多巴胺复合聚砜膜对养殖废水氨氮的处理结果显示,PS基膜处理后的水样氨氮浓度为4.12 mg/L,去除率为12.15%;经过多巴胺复合聚砜膜处理的水样氨氮浓度为3.95 mg/L,去除率为15.78%。尽管经过多巴胺复合聚砜膜对氨氮的去除率较基膜有所提高,但去除效果依然较差,达不到第二类海水水质标准。因此,对于海水养殖废水中氨氮的去除还需要进一步采取臭氧等氧化处理。

## 3 结论

用2 g/L多巴胺溶液涂覆制成的多巴胺复合膜由基膜支撑层和多巴胺功能层构成,其接触角为63°,较基膜减小21°,亲水性显著增强,对海水养殖废水的处理效果良好,SS去除率达100%,COD去除率达83.26%。对海水养殖废水中的氨氮也有一定去除效果,去除率15.78%。经该膜分离后的养殖废水进一步进行臭氧氧化等处理去除氨氮后,其主要水质指标可以达到第二类海水水质标准,处理后的海水养殖水可达到工厂化养殖循环利用的要求。

## 参考文献

朱建新,刘慧,徐勇,等.循环水养殖系统生物滤器负荷挂膜

- 技术. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 118-124
- 车芳琳, 代岩, 张玲玲, 等. 多巴胺复合膜研究进展. 化工进展, 2011, 30(增刊): 212-215
- 朱利平, 徐又一, 奚振宇, 等. DOPA 在聚乙烯微孔膜上的自聚合及肝素固定化. 高分子学报, 2009(4): 394-397
- 时均, 袁权, 高从塔. 膜技术手册. 北京: 化学工业出版社, 2001, 1
- 吴俊杰, 龙宇华, 徐坚, 等. 仿贻贝黏附高分子的研究进展. 高分子通报, 2011(10): 86-87
- 陈丽娟, 曾容菊, 王延梅. 多巴胺及其衍生物粘附性的研究与应用进展. 高分子通报, 2012(1): 15-17
- 单宝田, 王修林, 赵中华, 等. 海水工厂化养殖废水处理技术进展. 海洋科学, 2002, 26(10): 36-38
- 周华, 孙建岐. 水产养殖业的水处理技术综述. 渔业现代化, 2000(4): 27-29
- 郑京平. 纳氏试剂比色法快速测定海水养殖废水中的氨氮. 福建分析测试, 2011, 20(2): 10-14
- 徐又一, 蒋金泓, 朱利平, 等. 多巴胺的自聚-附着行为与膜的表面功能化. 膜科学与技术, 2011, 31(3): 32-37
- 高从塔, 陈国华. 海水淡化技术与工程手册. 北京: 化学工业出版社, 2004, 131-135
- Chen XR, Su Y, Shen F, *et al.* Antifouling ultrafiltration membranes made from PAN-b-PEG copolymers: Effect of copolymer composition and PEG chain length. *J Membr Sci*, 2011, 384: 44-51
- Lee BP, Dalsin J, Messersmith PB. Synthesis and gelation of dopa-modified poly (ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 1038-1047
- Mohammad AW, Ng CY, Lim YP, *et al.* Ultrafiltration in food processing industry: review on application, membrane fouling, and fouling control. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5(4): 1143-1156

(编辑 刘丛力)

## Preparation of Composite Ultrafiltration Membrane With Dopamine and Its Application in the Wastewater Treatment in Aquaculture

WANG Dong, XU Jia, SHAN Baotian<sup>①</sup>, SONG Di, LIU Ruicong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Ministry of Education Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Engineering and Technology, Qingdao, 266100)

**Abstract** In recent years, the marine aquaculture has been undergoing a rapid development in the quantity and the scale of this industry. The wastewater from marine aquaculture inevitably causes pollution to the adjacent sea water if discharged without proper treatment. In order to meet the criteria of recycling or discharge, currently people have mainly used physical, chemical, and biological methods to remove the suspended solids (SS) and ammonia nitrogen in the wastewater, and to reduce chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD). However these traditional methods have certain shortcomings in processing wastewater generated in marine aquaculture. Compared to the traditional treatment, membrane technology has the advantages such as the convenient operation and management and high efficiency, although it brings in membrane pollution during the application. In this study, we coated polysulfone ultrafiltration membrane with dopamine, and examined the properties and the functional performance of the dopamine composite ultrafiltration polysulfone membrane. The preparation of the composite membrane included coating and cleaning. The polysulfone membrane was first immersed in dopamine solution at the concentration of 2 g/L for 12 hours in a concussion incubator. The coated membrane then underwent vibration cleaning with deionized water for 24 hours. Infrared spectroscopy analysis showed that dopamine polymerization formed on the surface of the polysulfone membrane. The contact angle was 63° which was 21° smaller than the basal membrane. The hydrophilism of the composite membrane was significantly increased compared to the basal membrane. The results of separation experiments with aquaculture wastewater showed that under the pressure of 0.10 MPa the removal rates of TSS and COD were 100% and 83.3% respectively, indicating high-quality wastewater treatment.

**Key words** Dopamine composite membrane; Ultra filtration; Marine culture; Wastewater treatment

① Corresponding author: SHAN Baotian, E-mail: btshan@ouc.edu.cn

# 我国近海渔业资源可持续产出基础 研究的热点问题\*



金显仕<sup>1①</sup> 窦硕增<sup>2</sup> 单秀娟<sup>1</sup> 王震宇<sup>3</sup> 万瑞景<sup>1</sup> 卞晓东<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 海洋生态与环境科学重点实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071;

3. 教育部海洋环境与生态重点实验室 中国海洋大学 青岛 266100)

**摘要** 近海具有极其重要的生态服务功能,是众多渔业生物的关键栖息地和优良渔场,支撑着近海渔业资源的补充和可持续生产。在我国,近海渔业提供 90% 以上的海洋捕捞产量,是我国优质蛋白的重要来源。目前,因过度捕捞直接造成的资源量骤减、及大规模围填海工程、陆源污染和海水养殖等高强度人类活动的加剧,近海资源和环境问题日益凸显,如:富营养化导致的赤潮、水母暴发等生态灾害,湿地减少引起产卵场、育幼场碎片化或功能消失等,使得近海渔业资源的补充和可持续性严重受损。渔业资源的补充过程是海洋生物、物理作用耦合的过程,依赖复杂多样的环境驱动因子来调节和维系可持续渔业生产。而渔业种群早期生活史阶段是其生命中最脆弱、对栖息环境变化的敏感性最强的阶段,小规模环境变化也可能对其资源补充过程产生剧烈影响。因此,渔业种群早期生活史的关键生境(产卵场、育幼场等)和过程(繁殖发育、存活生长等)对环境变化的响应机制及其资源效应的研究成为海洋生态系统演变和生物资源可持续产出前沿领域的重点和热点。作者在综合国内外相关研究动态和我国近海渔业生态系统存在的突出问题的基础上,展望并分析了关键栖息地的形成和变迁过程与机理、关键资源补充过程与机制、渔业种群对生境变化的适应性响应以及资源效应的综合评估与模型分析等研究热点,期待为我国该研究领域的发展起抛砖引玉之用。

**关键词** 渔业种群; 补充过程; 资源效应; 环境变化

**中图分类号** S937 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0124-08

海洋作为人类社会可持续发展的宝贵财富,是解决当今人类所面临的人口增长、环境恶化和资源短缺三大问题的关键基础保障。特别是 1994 年《联合国海洋法公约》生效后,各沿海国家均把可持续开发海洋、发展海洋经济定为基本国策。其中,近海及其邻近地区具有非常重要的供给、支持、调节与文化等生态系统服务功能,成为各国实施海洋战略的主要区域。近海渔业更是对于保障各国食物安全和促进海洋经济发展发挥了极其重要的作用,成为各国缓解粮食危机的战略措施之一(Jacquet *et al.*, 2010)。从全球来看,近海及其周边地区用 18% 的地球表面,提供了

25% 的初级生产力和 90% 的渔获量(Field *et al.*, 2002)。目前,约 30 亿人口的动物蛋白摄入量中有近 20% 来自水产品。其中,近海捕捞产量占 60% 以上(FAO, 2012)。就我国而言,自 20 世纪 80 年代改革开放以来,渔业生产力得到了显著提高,近海渔业得以快速发展。2012 年,近海捕捞产量达 1267 万 t,产值逾 1700 亿元(包含远洋产量 122 万 t; 中国渔业统计年鉴, 2013),在保障我国水产品供给、增加渔民收入、促进沿海地区海洋经济发展等方面做出了巨大贡献。

然而,随着科学技术的进步和生产力的不断提高,以及迅速增长的世界人口对食物资源需求的急剧

\* 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB453300)和山东省泰山学者专项基金共同资助

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

收稿日期: 2014-09-13, 收修改稿日期: 2014-10-16

增加,人类对近海渔业资源的开发利用规模也越来越大,加之由于工业化、城市化、大型水利工程建设、农业活动等人类活动及全球气候变化的影响,近海生态系统健康和渔业资源的可持续产发生了显著变化。通过对世界 12 个近海和河口生态系统研究发现,90%以上的重要海洋生物资源被过度开发甚至消耗殆尽,超过 65%的海草和湿地栖息地遭受不同程度的破坏,并且造成严重的水环境污染(Lotze *et al.*, 2006; Stramma *et al.*, 2008; Courrat *et al.*, 2009)。渔业资源作为海洋生物资源的主体,因过度捕捞直接造成的资源量骤减和生态环境恶化造成的关键栖息地如产卵场退化,已经呈现全球性衰退趋势,日益危及生态系统的健康和渔业资源的可持续性。而且,这种趋势已从沿岸水域蔓延到近海水域(Myers *et al.*, 2003; Lotze *et al.*, 2006; Worm *et al.*, 2005、2006、2007、2009; Zeller *et al.*, 2011; Jacquet *et al.*, 2010; Anticamara *et al.*, 2011),引起了各国科学家的广泛关注。认识生物种群资源变动对环境变化响应的能力,探究生物资源的生产过程与机制也已成为 GLOBEC、IMBER 等国际科学组织的前沿研究方向(唐启升等, 2002)。渔业资源因其对世界优质蛋白供应的特殊贡献,其资源变动和可持续利用问题更是备受关注,尤其是环境变化下渔业资源的补充过程及资源效应已成为当前国际渔业资源领域基础研究的重点和热点。

## 1 研究意义和国家需求

近年来,我国水产品动物蛋白消费量约占人均动物蛋白消费量的三分之一,且呈上升趋势。根据国民经济与人口的发展趋势分析,预计 2020 年我国对海洋水产品的需求将有大幅度的增加,达到 4000 万 t/年,其中海洋年捕捞产量需要维持在 1500 万 t 左右。目前,海洋捕捞产量中 90%以上来自近海。然而,在人类活动和环境变化压力下,我国近海生态系统的结构与功能正发生着显著的变化,并影响到其生态服务功能(关道明, 2012; 中国海洋可持续发展的生态环境问题与政策研究课题组, 2013)。例如,围填海直接导致滩涂、湿地和海湾空间减少、水动力条件改变及其自净能力的下降,污染和富营养化加剧水质/底质恶化和生态服务功能下降,过度捕捞和关键栖息地的数量减少和质量退化导致渔业资源衰退。诸如此类栖息地的生境变化已导致渔业种群资源补充过程受损、渔场渔汛消失、渔获质量降低和资源衰退或枯竭等问题,严重制约近海生态系统的健康和食物产出能力,日益危及渔业资源的可持续发展(金显仕等, 2005; 唐启升, 2006)。而我国远洋渔业虽然在过去 30 多年中已

取得了较大发展,但年产量仅维持在 100 万 t 左右,远远不能支撑我国对海洋水产品的基本需求。由此,2013 年,国务院在《关于促进海洋渔业持续健康发展的若干意见》中明确指出,“加强海洋渔业资源和生态环境保护,不断提升海洋渔业可持续发展能力”是我国今后渔业发展的主要任务。在人类活动和气候变化影响日益加剧的情况下,科学认识环境变化对海洋渔业资源变动的的影响及渔业种群对环境变化的响应机理是保护海洋渔业资源和生态环境、提升渔业资源的可持续发展能力的必要前提,也是促进我国海洋渔业持续健康发展的需求。因此,亟需研究近海渔业种群资源补充过程的变化机理,认识渔业种群数量变动规律,为寻求渔业资源可持续开发利用与环境相协调发展的科学途径、保障近海生态系统的食物可持续产出功能和优质水产品供给的管理与政策的实施提供理论依据和技术支撑。

另一方面,近海渔业问题还涉及到我国在今后海洋资源安全和战略发展的走向。随着与一些周边国家的双边渔业协定的实施,我国一些传统作业渔场范围正在变小,捕捞配额和产量受到严重影响。而在处理国际渔业纠纷问题时,科学认识渔业种群生物学、资源属地和属性的确权及其数量变动规律等问题至关重要。许多在我国近海产卵繁育的重要洄游性渔业种类(如小黄鱼 *Larimichthys polyactis*、鲆鲽类和中国对虾 *Penaeus chinensis*)的越冬群体会洄游到一些国际水域而被“共享”。因此,开展环境变化下渔业资源变动的基础研究,特别是解决近海环境变化对渔业种群早期生活史、补充过程、资源效应及其迁移分布的影响等问题,将有利于我国争取国际共享资源的高配额和提升资源分配与管理的话语权,以及应对未来可能产生的国际海洋资源与环境问题争端。

## 2 国际研究热点和发展趋势

鱼类早期生活史的研究兴起于 20 世纪 60、70 年代 FAO 设立鱼类浮游生物(鱼卵、仔稚鱼)调查工作组(Working Party on Fish Egg and Larval Surveys)并颁布了调查技术规范和研究方法(Standard Techniques for Pelagic Fish Egg and Larva Surveys)之后(Smith *et al.*, 1977)。在 70、80 年代国际海洋考察理事会(ICES)举办的 3 次鱼类早期生活史国际学术研讨会大大革新了渔业种群补充机制及数量变动研究的理念(Blaxter, 1974; Lasker *et al.*, 1981; Blaxter *et al.*, 1989)。从 1977 年起美国渔业学会(American Fisheries Society, AFS)举办的仔鱼学术年会(Annual Larval Fish Conference)



则是展示和交流国际上相关研究成果和动态的重要学术平台。年会的研究主题一般聚焦于环境变化和人类活动影响下海洋渔业种群的繁殖生态、仔鱼的分散运输过程、摄食和生长存活策略、饥饿和被捕食死亡过程,以及种群的适应性响应和资源数量变动等科学问题(Browman *et al.*, 2014)。

### 2.1 全球变化背景下, 渔业种群的补充机制及其对环境变化的响应机制已成为一些国际组织和大科学计划的研究主题之一

在 GLOBEC 的相关研究计划中, 北大西洋的“鲑鱼与气候变化”(ICES-CCC)、全球性的“小型中上层鱼类与气候变化”(SPFCC)和北太平洋的“气候变化与容纳量”(PICES-CCCC)等科学计划注重作用过程和反馈机制研究, 研究气候变化下鲑鱼等渔业种群的早期补充过程与关键海洋生物、物理过程的耦合作用, 认识这些国际共享性渔业种群数量变动对气候变化的响应及其对海洋生态系统演化的反馈作用等问题。科学问题包括从小规模海洋动力过程对仔鱼的摄食生长策略和生存死亡过程的影响、饵料生物种群变动与渔业补充群体的相互作用, 到全球变化背景下大尺度风速场、流场和温度场等物理过程变化对仔鱼分散运输和生长过程的调控机制等。这些研究计划大大促进了研究环境变化下渔业种群补充机制和资源变动规律的基本科学理论框架和技术方法体系的构建。

### 2.2 区域性渔业种群资源变动研究聚焦过度开发或衰退性渔业种群的资源补充过程、驱动机理及其对环境变化的响应机制等问题

渔业资源补充过程中的幼体分散运输过程及其动力学基础、饵料生物种群变动与资源补充过程耦合关系等研究一直备受关注。例如, AFS 第 37 届(2013)仔鱼学术年会将“仔鱼分散运输与种群连通性”列为主要的议题之一。近年来的相关研究尤其活跃, 并取得了一系列重要进展(Leggett *et al.*, 1994; Helbig *et al.*, 1998a、b; Baumann *et al.*, 2006; Pepin, 2009)。例如, 欧洲科学家研究发现, 在全球变化影响下, 北海鲑鱼(*Gadus morhua*)产卵场水温的长期变化引起了仔鱼的浮游动物饵料——桡足类的种类、种群结构的改变和数量变动, 导致仔鱼经常由于无法得到充足的饵料保障而大量死亡, 造成过去几十年间北海鲑鱼种群补充失败和资源数量急剧波动和衰退(Beaugrand *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2004)。而日本科学家通过半个多世纪的不懈研究, 终于搞清楚日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)仔鱼从产卵场(马里亚纳海山附近水域)到育

幼场(东亚沿岸水域)的长达数月、超过 2000 km 的远洋运输过程与机制。即仔鱼在北赤道海流和黑潮中发育生长, 并借助黑潮动力驱动完成从产卵场到育幼场的远洋运输过程。全球变化下厄尔尼诺等海洋事件会通过影响黑潮水系的水动力条件(如温盐场、流场)和营养基础等而造成鳗鲡补充量和资源量的剧烈变动或衰退(Tsakamoto, 1992、2006)。这些开创性研究成果大大促进了该研究领域的发展。

### 2.3 渔业种群早期生长存活和死亡过程研究是资源补充机制及其数量变动规律研究的重点、难点和热点

AFS 第 36 届(2012)和 38 届(2014)仔鱼学术年会分别将“鱼类早期生活史阶段不同死亡过程对资源补充的影响评估分析”、“鱼类早期生活史阶段死亡过程对资源补充变动的驱动作用”和“仔鱼食物网与捕食者-被捕食者相互作用”列为主要的议题之一, 包括在近海生态机制转变下海洋生物、物理过程的变化对渔业补充群体的饥饿死亡过程的作用(Leggett *et al.*, 1994; Pepin, 2009)、敌害生物如水母暴发日趋严重的情况下补充群体被捕食死亡过程与机制(Bailey *et al.*, 1989; Purcell *et al.*, 2001; Pepin *et al.*, 2003; Pepin, 2004; Hallfredsson *et al.*, 2009)以及基于亲体——补充群体关系的死亡模型分析等。这些研究注重近海生态系统演变下水动力基础和饵料生物种群的长期变化对鱼类浮游性动物种群死亡的过程研究(Head *et al.*, 2010), 创新了许多观测和取样方法, 如连续水下鱼卵取样系统等(Pepin *et al.*, 2005), 同时形成和发展了一系列理论假说和死亡分析模型, 如关键生活史阶段的匹配-非匹配饥饿死亡理论(Cushing, 1990)、物理过程作用分割式死亡模型、选择性和制约性死亡模型分析等(Helbig *et al.*, 1998a、b)。相关的理论和研究方法的创新将会在未来长时期内引领该领域的研究方向和发展。

### 2.4 在全球变化背景下, 渔业种群对环境变化的响应机制和基于生态系统的适应性管理研究越来越受关注

近年来, Science 和 Nature 发表的一系列相关论文提出并探讨了环境变化对渔业生态系统服务功能的作用机理(Myers *et al.*, 2003; Lotze *et al.*, 2006; Sibert *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2013a、b)、渔业种群对环境变化的响应机制(Olsen *et al.*, 2004; Worm *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011)以及基于生态系统的渔业资源的重建与适应性管理等科学理

论框架(Botsford *et al*, 1997; Pikitch *et al*, 2004; Beddington *et al*, 2007), 形成了国际渔业科学领域研究的一个新趋势。而环境变化下渔业资源补充过程的变动及其资源效应等研究, 特别是资源补充过程对环境变化的反馈机制, 是完善和实践这些理论框架的核心基础研究内容。其中, 在生境选择、摄食和生殖策略转变、食物网变动以及种群和群落演替等研究方面取得了重要研究进展(Saucier *et al*, 1993; Dahlgren *et al*, 2000; Laurel *et al*, 2007; Cheung *et al*, 2013a, b)。环境变化下亲体-补充量关系研究也日趋活跃(Fox, 2001), 产生了基于日产卵量的生殖群体评估模型(Kraus *et al*, 2004; Stratoudakis *et al*, 2006; Haslob *et al*, 2012)和基于个体生理因子分析模型解决环境驱动下鱼类早期补充动态变化(Hufnagl *et al*, 2011; Gröger *et al*, 2014)等一系列亲体-补充量关系分析模型。尽管如此, 目前多数相关研究大都处于资料积累归纳分析、科学假设、方法论构建和案例分析等阶段, 其理论验证和应用尚需深入研究。

综上所述, 国际上近海环境变化与渔业资源变动关系研究的一个重要发展趋势是: 在科学认识近海渔业生态系统演变的基础上, 围绕环境变化资源补充机制反馈——种群适应性响应及其资源效应这一渔业科学基础问题, 研究渔业-资源的补充过程及其驱动机理, 探究生境变化对渔业资源补充过程和亲体——补充量关系的影响, 阐释渔业种群的适应性响应及其资源效应, 为渔业种群的重建和构建基于生态系统的种群适应性管理理论提供科学依据。

### 3 国内研究现状和水平

在 20 世纪 80 年代之前, 我国渔业资源学和渔业海洋学研究主要聚焦于鲈(*Pneumatophorus japonicus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、小黄鱼、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、鲷类等重要渔业种群的渔场海洋学及渔业生物学等研究, 如“全国海洋普查”、“烟威鲈鱼渔场环境及资源调查”等。“七五”期间开始开展渔业生物学、渔业资源数量变动与生态环境关系的研究, 如实施了“胶州湾生态学和生物资源”、“渤海水域渔业资源、生态环境及其增殖潜力的调查研究”、“三峡工程对长江口生态系的影响”、“闽南-台湾浅滩渔场上升流区生态系研究”等研究计划。这些研究在近海渔业种群生物学(如种群结构、摄食、年龄生长、繁殖、洄游分布等)、资源数量分布与变动规律、渔业生态环境等方面积累了重要的调查数据, 产生了一批开创性研究成果, 为我国海洋渔业科学的发展奠定了研究

基础(邓景耀等, 1991; 陈大刚, 1991)。

“八五”以来, “渤海增养殖生态基础调查研究”、“典型海湾生态系统动态过程与持续发展研究”、“渤海生态系统动力学与生物资源持续利用”、“东、黄海生态系统动力学与生物资源可持续利用”等国家重大项目注重生态环境变化对生物资源生产的影响研究。这些工作引领并推动了我国海洋生态环境与生物资源相关领域的基础研究(金显仕等, 2005; 唐启升, 2006)。之后, 科技部相继支持和实施了一批与海洋相关的“973”项目。这些研究大大提高了我国近海生态系统与生物资源的综合观测、建模和预测技术的研究水平, 对推动我国海洋生态系统动力学研究的发展发挥了重要的作用(唐启升等, 2000、2002)。

渔业种群作为海洋生态系统的生物主体之一, 其资源量的变动是反映生态系统结构与功能变化的重要指标, 因此, 环境变化与渔业资源补充机制和种群数量变动关系一直是国际上渔业科学研究的主题, 也是我国上述相关研究计划的重要研究内容之一。我国在该领域中也取得了一些重要研究成果, 如阐释了鳀鱼补充机制和资源变动规律、渤海渔业生态系统结构长期演变机制以及中国对虾的生活史及其亲体——补充量关系等问题(邓景耀等, 1991; 金显仕等, 2005; Tang *et al*, 2003; Jin *et al*, 2013)。其他相关研究主要集中在近海渔业种群的繁殖群体结构及繁殖力、鱼卵仔鱼的数量分布以及鱼类个体水平上的生殖、早期发育、存活及其与环境因子的关系等方面(姜言伟等, 1988; 万瑞景等, 2008、2009; 王爱勇等, 2010; Bian *et al*, 2014)。另外还有一些关于仔鱼关键阶段的摄食、饥饿死亡及鱼卵仔鱼被水母捕食死亡方面的研究(曹亮等, 2012; Dou *et al*, 2003; Shan *et al*, 2009)。在渔业种群对捕捞和环境变化压力的适应性响应的认识和研究方面, 也取得了一些进展, 如发现小黄鱼、带鱼等种群的性成熟个体年龄提前和小型化等现象(金显仕等, 2005)。但在总体上, 在关键资源补充过程中幼体分散输运过程、生长和死亡过程、亲体-补充量关系与海洋生物-物理过程的耦合关系以及渔业种群对环境变化的适应性响应机制等重要科学问题的研究尚不系统、深入, 研究水平有待于提高, 急需开展深入研究。

### 4 我国近海渔业生态系统的突出问题 and 研究关注点

近海拥有丰富的陆源营养物质补充, 基础生产力和生物多样性高, 具备适宜生物繁育生长的水动力基

基础和底质条件。渔业种群数量的变动主要由补充量的变化驱动,而种群的补充机制直接决定了渔业资源的世代发生量和生物资源的可持续产出。因此,近海是众多渔业生物的优良产卵场、索饵场和渔场,支撑着渔业种群的持续补充和繁衍。但近海同时又是人类活动密集、开发强度高的区域,其生境和生物资源受人类活动和环境压力的影响也是显而易见的(Worm *et al.*, 2006; Lotze *et al.*, 2006)。伴随着大规模围填海工程、污染物入海、海水养殖等高强度人类活动的加剧,我国近海富营养化,赤潮和水母爆发等生态灾害日趋严重,已经导致产生了许多渔业环境和资源问题。如栖息地减少、碎片化或消失,湿地功能退化,仔鱼分散输运动力学基础剧烈变动,饵料基础失衡,产卵场和育幼场环境污染严重与质量退化,生物多样性降低,食物网结构简单化、敌害生物种群暴发等(崔毅等, 2003; 金显仕等, 2005; Song, 2009; 关道明, 2012; 孙松, 2012; Jin *et al.*, 2013)。毋庸置疑,这些生境数量的减少和质量功能退化将对渔业种群的繁殖发育、幼体分散运输、生长存活、性成熟等关键补充过程产生深刻影响,并产生了一系列种群对环境变化的适应性响应问题如繁殖和生长生存策略转变、种群结构更替、生活史型演变、分布迁移路线变更和资源数量剧烈变动等(邓景耀等, 2000; Tang *et al.*, 2003; 张波等, 2004; 郭旭鹏等, 2006; 单秀娟等, 2011、2012; Jin *et al.*, 2013)。但是,对这些环境变化过程与生物生产过程的关联机制等诸多科学问题的认识尚不甚清楚,亟待深入研究。

环境变化导致近海生态系统服务功能的衰退已成为制约我国海洋渔业可持续发展的主要瓶颈,为实现基于生态系统的渔业管理造成了巨大障碍。为突破这种困境,围绕国家对近海渔业可持续发展的重大需求以及所面临的渔业生境退化和渔业资源衰退等问题,应重点关注以下4个方面的研究。

(1)关键栖息地的形成和变迁过程与机理。研究渔业种群繁育对产卵场、育幼场等栖息地的理化、生物环境条件的基础需求;探究生境变化对栖息地质量和种群繁育的影响途径;解析环境变化如围填海、污染等导致产卵场和育幼场的生境碎片化、数量减少以及质量功能退化等生境问题的过程和原因,阐释种群早期生活史生境的变迁特征及其驱动基础。

(2)关键资源补充过程与机制。研究渔业种群的卵和幼体的数量分布与环境因子变化的关系,揭示关键资源补充过程与重要海洋生物-物理过程的耦合机制;解析补充群体的分散运输过程和动力学基础、摄食策略和饵料生物种群变动与饥饿死亡过程、早期发

育生长和存活过程、逃避敌害策略和被捕食死亡过程的环境驱动基础。

(3)渔业种群对环境变化的适应性响应。研究渔业种群资源补充过程对产卵场、育幼场生境变迁响应的途径与机理;研究饵料基础、污染物及其他主控环境因子变迁对种群繁殖、生长存活等资源补充过程的作用,阐释种群生活史对生境变化的适应性响应机制。

(4)资源动态模型分析与资源效应综合评估。在上述研究的基础上,查明不同环境变化情景下种群亲体-补充量关系,分析生境变化对补充量的影响,建立资源效应综合预测评估模型,探究近海渔业种群早期生活史生境修复和资源养护的理论基础和科学途径。

## 参 考 文 献

- 万瑞景, 赵宪勇, 魏皓. 山东半岛南部产卵场鳀鱼的产卵生态 II. 鳀鱼的产卵习性和胚胎发育特性. 动物学报, 2008, 54(6): 988-997
- 万瑞景, 赵宪勇, 魏皓. 山东半岛南部产卵场温跃层对鳀鱼鱼卵垂直分布的作用. 生态学报, 2009, 29(12): 6818-6826
- 邓景耀, 赵传纲. 海洋生物学. 1991. 北京: 中国农业出版社, 1-452
- 邓景耀, 金显仕. 莱州湾及黄河口水域渔业生物多样性及保护研究. 动物学研究, 2000, 21(1): 76-82
- 王爱勇, 万瑞景, 金显仕. 渤海莱州湾春季鱼卵、仔稚鱼生物多样性的年代际变化. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 19-24
- 中国海洋可持续发展的生态环境问题与政策研究课题组. 中国海洋可持续发展的生态环境问题与政策研究. 2013. 北京: 中国环境科学出版社, 1-493
- 中国渔业统计年鉴. 2013. 北京: 中国农业出版社, I-II
- 孙松. 水母暴发研究所面临的挑战. 地球科学进展, 2012, 27(3): 257-261
- 关道明. 中国滨海湿地. 2012. 北京: 海洋出版社, 1-233
- 陈大刚. 黄渤海渔业生态学. 1991. 北京: 海洋出版社, 1-505
- 张波, 唐启升. 渤、黄、东海高营养层次重要生物资源种类的营养级研究. 海洋科学进展, 2004, 22(4): 393-404
- 金显仕, 赵宪勇, 孟田湘, 等. 黄、渤海生物资源与栖息环境. 2005. 北京: 科学出版社, 1-405
- 单秀娟, 金显仕, 李忠义, 等. 渤海鱼类群落结构及其主要增殖放流鱼类的资源量变化. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 1-9
- 单秀娟, 金显仕. 长江口近海春季鱼类群落结构的多样性研究. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 32-40
- 郭旭鹏, 金显仕, 戴芳群. 渤海小黄鱼生长特征的变化. 中国水产科学, 2006, 13(2): 243-249
- 姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛. 渤海硬骨鱼类鱼卵、仔稚鱼调查. 海洋水产研究, 1988, 9: 185-192
- 唐启升. 中国专属经济区海洋生物资源与栖息环境. 2006. 北京: 科学出版社, 1-1158

- 唐启升, 苏纪兰. 中国海洋生态系统动力学研究(I): 关键科学问题与研究发展战略. 2000. 北京: 科学出版社, 1–252
- 唐启升, 苏纪兰. 中国海洋生态系统动力学研究(II): 渤海生态系统动力学过程. 2002. 北京: 科学出版社, 1–445
- 崔毅, 马绍赛, 李云平, 等. 莱州湾污染及其对渔业资源的影响. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 35–41
- 曹亮, 刘金虎, 于鑫, 等. 实验条件下幼海蜇对褐牙鲆卵和初孵仔鱼捕食的比较研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(3) : 513–519
- Anticamara JA, Watson R, Gelchu A, *et al.* Global fishing effort (1950–2010): Trends, gaps, and implications. *Fish Res*, 2011, 107: 131–136
- Bailey KM, Houde ED. Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Adv Mar Biol*, 1989, 25:1–83
- Baumann H, Hinrichsen HH, Möllmann C, *et al.* Recruitment variability in Baltic Sea sprat (*Sprattus sprattus*) is tightly coupled to temperature and transport patterns affecting the larval and early juvenile stages. *Can J Fish Aquat Sci*, 2006, 63: 2191–2201
- Beaugrand G, Brander KM, Lindley JA, *et al.* Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature*, 2003, 426: 661–664
- Beddington JR, Agnew DJ, Clark CW. Current problems in the management of marine fisheries. *Science*, 2007, 316: 1713–1716
- Bian X, Zhang X, Sakrai Y, *et al.* Temperature-mediated survival, development and hatching variation of Pacific cod *Gadus macrocephalus* eggs. *J Fish Biol*, 2014, 84: 85–105
- Blaxter JHS. The early life history of fish. 1974. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1–200
- Blaxter JHS, Gamble JC, Westernhagen HV. The early life history of fish. The third ICES symposium, Bergen, 3-5 October 1988. Rapp P-V Réunion, ConsInt Explor Mer, 1989, 191: 1–497
- Botsford LW, Castilla JC, Peterson CH. The management of fisheries and marine ecosystems. *Science*, 1997, 277: 509–515
- Browman HI, Skiftesvik AB. The early life history of fish——there is still a lot of work to do! *ICES J Mar Sci*, 2014, doi:10.1093/icesjms/fst219
- Cheung WLW, Lam VWY, Sarmiento JL, *et al.* Projecting global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. *Fish Fish*, 2009, 10: 235–251
- Cheung WLW, Watson R, Pauly D. Signature of ocean warming in global fisheries catch. *Nature*, 2013a, 497: 365–368
- Cheung WLW, Sarmiento J L, Dunne J, *et al.* Shrinking of fishes exacerbates impacts of global ocean changes on marine ecosystems. *Nature Climate Change*, 2013b, 3:254–258
- Courrat A, Lobry J, Nicolas D, *et al.* Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estu Coast Shelf Sci*, 2009, 81(2): 179–190
- Cushing DH. Plankton production and year class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Adv Mar Biol*, 1990, 26: 249–293
- Dahlgren CP, Eggleston DB. Ecological processes underlying ontogenetic habitat shifts in a coral reef fish. *Ecology*, 2000, 81: 2227–2240
- Dou SZ, Masuda R, Tanaka M, *et al.* Identification of factors affecting the growth and survival of the settling Japanese flounder larvae. *Aquaculture*, 2003, 218(1–4): 309–327
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2012. Rome, 1–209
- Field JG, Hempel G, Summerhayes CP. *Ocean 2020: Science, Trends and the Challenge of Sustainability*. 2002. Island Press, 1–296
- Fox C. Recent trends in stock-recruitment of blackwater herring (*Clupea harengus* L.) in relation to larval production. *ICES J Mar Sci*, 2001, 58: 750–762
- Gröger JP, Hinrichsen HH, Polte P. Broad-scale climate influences on spring-spawning herring (*Clupea harengus*, L.) recruitment in the Western Baltic Sea. *PLoS one*, 2014, 9(2): 1–14.
- Hallfredsson EH, Pedersen T. Effects of predation from juvenile herring (*Clupea harengus*) on mortality rates of capelin (*Mallotus villosus*) larvae. *Can J Fish Aquat Sci*, 2009, 66: 1693–1706
- Haslob H, Hauss H, Hinrichsen HH, *et al.* Application of the daily egg production method to Baltic sprat. *Fish Res*, 2012, 127: 73–82
- Head EJJ, Pepin P. Spatial and inter-decadal variability in plankton abundance and composition in the Northwest Atlantic (1958–2006). *J Plankton Res*, 2010, 32: 1633–1648
- Helbig JA, Pepin P. Partitioning the influence of physical processes on the estimation of ichthyoplankton mortality rates. 1. Theory. *Can J Fish Aquat Sci*, 1998a, 55: 2189–2205
- Helbig JA, Pepin P. Partitioning the influence of physical processes on the estimation of ichthyoplankton mortality rates. II Application to simulated and field data. *Can J Fish Aquat Sci*, 1998b, 55: 2206–2220
- Hufnagl M, Peck MA. Physiological individual-based modelling of larval Atlantic herring (*Clupea harengus*) foraging and growth: insights on climate-driven life-history scheduling. *ICES J Mar Sci*, 2011, 68: 1170–1188
- Jacquet J, Pauly D, Ainley D, *et al.* Seafood stewardship in crisis. *Nature*, 2010, 467: 28–29
- Jin X, Shan X, Li X, *et al.* Long-term changes in the fishery ecosystem structure of Laizhou Bay, China. *Sci China (Earth Sci)*, 2013, 56: 366–374
- Kraus G, Köster FW. Estimating Baltic sprat (*Sprattus sprattus balticus* S.) population sizes from egg production. *Fish Res*, 2004, 69: 313–329
- Lasker R, Sherman K. The early life history: Recent studies.

- Rapp P-V Réun, Cons Int Explor Mer, 1981, 178: 1–607
- Laurel BJ, Stoner AW, Ryer CH, *et al.* Comparative habitat associations in juvenile Pacific cod and other gadids using seines, baited cameras and laboratory techniques. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2007, 351: 42–55
- Leggett WC, Deblois E. Recruitment mechanism in marine fishes: is it regulated by starvation and predation at egg and larvae stages? *Nether J Sea Res*, 1994, 32: 119–134
- Lotze HK, Lenihan HS, Bourque BJ, *et al.* Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, 2006, 312: 1806–1809
- Myers RA, Worm B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature*, 2003, 423: 280–283
- Olsen EM, Heino M, Lilly GR, *et al.* Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature*, 2004, 428: 932–935
- Pepin P. Early life history studies of prey-predator interactions: quantifying the stochastic individual responses to environmental variability. *Can J Fish Aquat Sci*, 2004, 61: 659–671
- Pepin P, Dower JF, Davidson FJM. A spatially explicit study of prey-predator interactions in larval fish: assessing the influence of food and predator abundance on larval growth and survival. *Fish Oceanogr*, 2003, 12: 19–33
- Pepin P, Snelgrove PVR, Carter KP. Accuracy and precision of the continuous underway fish egg sampler (CUFES) and bongo nets: a comparison of three species of temperate fish. *Fish Oceanogr*, 2005, 14: 432–447
- Pikitch EK, Santora C, Babcock EA, *et al.* Ecosystem-based fishery management. *Science*, 2004, 305: 346–347
- Purcell JE, Arai MN. Interactions of pelagic cnidarians and ctenophores with fish: a review. *Hydrobiologia*, 2001, 451:27–44
- Richardson AJ, Schoeman DS. Climate impact on plankton ecosystems in the Northeast Atlantic. *Science*, 2004, 305: 1609–1612
- Saucier MH, Baltz DM. Spawning site selection by spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, and black drum, *Pogonias cromis*, in Louisiana. *Environ Biol Fish*, 1993, 36: 257–272
- Shan XJ, Huang W, Cao L, *et al.* Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. *Fish Physiol Biochem*, 2009, 35: 385–398
- Sibert J, Hampton J, Kleiber P. *et al.* Biomass, size, and trophic status of top predators in the Pacific Ocean. *Science*, 2006, 314: 1773–1776
- Smith ADM, Brown CJ, Bulman CM, *et al.* Impacts of fishing low-trophic level species on marine ecosystems. *Science*, 2011, 333: 1147–1150
- Smith PE, Richardson SL. Standard techniques for pelagic fish egg and larva surveys. *FAO Fish Tech Paper*, 1977, 175: 1–100
- Song JM. Biogeochemical Processes of Biogenic Elements in China Marginal Seas. 2009. Springer-Verlag GmbH&Zhejiang University Press, 1–662
- Stramma L, Johnson GC, Sprintall J, *et al.* Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science*, 2008, 320: 655–658
- Stratoudakis Y, Bernal M, Ganias K, *et al.* The daily egg production method: recent advances, current applications and future challenges. *Fish Fish*, 2006, 7: 35–57
- Tang QS, Jin XS, Wang J, *et al.* Decadal-scale variations of ecosystem productivity and control mechanisms in the Bohai Sea. *Fish Oceanogr*, 2003, 12: 223–233
- Tsukamoto K. Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature*, 1992, 356: 789–791
- Tsukamoto K. Spawning of eels near a seamount. *Nature*, 2006, 439: 929
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, *et al.* Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 2006, 314: 787–790
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, *et al.* Response to Comments on “Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services”. *Science*, 2007, 316: 1285
- Worm B, Hilborn R, Baum JK, *et al.* Rebuilding global fisheries. *Science*, 2009, 325: 578–585
- Worm B, Sandow M, Oschlies A. Global patterns of predator diversity in the open oceans. *Science*, 2005, 309: 1365–1369
- Zeller D, Rossing P, Harper S, *et al.* The Baltic Sea: estimates of total fisheries removals 1950–2007. *Fish Res*, 2011, 108: 356–363

## Hot Spots of Frontiers in the Research of sustainable Yield of Chinese Inshore Fishery

JIN Xianshi<sup>1</sup>Ⓐ, DOU Shuozeng<sup>2</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1</sup>, WANG Zhenyu<sup>3</sup>, WAN Ruijing<sup>1</sup>, BIAN Xiaodong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; 2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, 266100)

**Abstract** The inshore water areas are the major habitats and fishing grounds of many commercial species. Chinese inshore fisheries accounts for more than 90% of the total marine catches, and is an important resource of high-quality proteins for Chinese people. Currently the inshore fishery resources have been markedly declining due to the combination of overfishing and other excessive human activities (e.g. large-scale reclamation, pollution and mariculture). The sustainable production of many inshore fishery species has been impaired by adverse ecological change, such as the eutrophication-induced red tide and jellyfish bloom, and the fragmentation and defunctionalization of spawning and nursery grounds caused by the loss of wetlands. The recruitment of fishery populations is generally regulated by the interaction between the biological and physical processes in marine ecosystems which can be largely affected by the changes in environmental factors. To better understand the succession of marine ecosystem and sustainable yield of marine fishery populations, it is crucial to investigate how environmental changes affect the habitats and recruitment of fishery populations, especially at their early life stages. In this paper we reviewed literatures regarding these topics and analyzed the current situation of Chinese inshore fishery and the relevant problems of inshore ecosystems. We proposed and discussed four promising topics in future study: 1) fundamental and long-term changes in spawning and nursery grounds of fishery populations; 2) recruitment of fishery populations and the environmental driving forces; 3) adaptive strategies of fishery populations to environmental changes; and 4) evaluation of the effects of environmental changes on fishery population dynamics. These prospective studies are expected to provide essential knowledge that helps with the conservation of fishery habitats and resources as well as the improvement of sustainable development of inshore fisheries in China.

**Key words** Fishery populations; Recruitment; Impacts on fishery resources; Environmental changes

---

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

# 海胆早期多巴胺能神经系统的发育 及功能研究进展\*



汝少国<sup>①</sup> 王翠翠

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**摘要** 早期发育阶段的海胆是海洋生态毒理学研究的重要模式生物。海胆多巴胺(DA)能神经系统发育较胆碱能系统早,也比5-羟色胺能系统更早地调控海胆早期形态发生和游泳行为,因此,以早期发育阶段海胆为模式生物,对DA能神经系统发育及功能进行综述。DA递质及其受体是DA能系统发育的重要基础,DA及其受体合成后,DA能神经元发育进入DA能神经元前体细胞期,该时期DA及1型DA受体(DRD<sub>1</sub>)均以直径1-2 μm大小颗粒形式(DA/DRD<sub>1</sub>-Gs)存在,且从旋转囊胚期至变态阶段在胚胎和幼虫表面均有表达;DA/DRD<sub>1</sub>-Gs聚集后,四腕幼虫早期,DA能细胞开始在下唇神经节和后口腕基部形成且具有轴突联系,八腕幼虫期其数量增至最大;此后,DA能系统逐步发育直至成熟。海胆早期发育阶段形态发生受多种递质系统共同调控,而游泳行为则在不同时期由DA能神经系统单独或联合其他系统共同调控。最后,展望海胆DA能系统发育影响因子、DA受体发育调控功能及其功能通路、海胆早期三大递质系统在形态发生和游泳行为调控过程中的主次关系及其上/下调机制、神经毒物对DA能系统发育影响等领域的研究前景。

**关键词** 海胆;早期发育阶段;多巴胺能神经系统

**中图分类号** Q426 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0132-07

1995年,美国环境保护局(EPA)将海胆胚胎毒性试验方法列为标准的生态毒理学试验方法(US EPA 600R95136)。海胆与脊索动物亲缘关系较近(Burke *et al*, 2006; Sodergren *et al*, 2006),其神经递质系统和信号传导途径与脊椎动物类似(Morale *et al*, 1998; Angelini *et al*, 2005; Buznikov *et al*, 2007);海胆对污染物敏感,尤其早期发育阶段对有机污染物更敏感(Graillet *et al*, 1993);而且海胆具有生命力强、适应性广、易饲养、繁殖周期短、产卵量大、胚胎或幼虫通体透明、研究较透彻等优势,近年来海胆已日益成为海洋生态毒理学研究的重要模式生物(Berdyshev *et al*, 1995; Semenova *et al*, 2006; Falugi *et al*, 2008)。

其中,较多研究通过观察毒物对海胆胚胎和幼虫发育的影响,来探讨毒物作用机制及靶标(Pagano *et al*, 2002; Pesando *et al*, 2003; Aluigi *et al*, 2008)。作为海胆胚胎发育调控信号(Buznikov *et al*, 2007),神经递质及相应系统的发育研究(Katow *et al*, 2010、2013),特别是神经毒物对递质系统发育影响相关研究逐渐增多(Buznikov *et al*, 2001a、b; Yao *et al*, 2010; 许磊, 2012<sup>1)</sup>)。此外,受递质系统调控的海胆早期发育阶段游泳行为相关研究也不断受到关注(Yaguchi *et al*, 2003),调控游泳行为的纤毛结构及其作用机理等基础研究也逐步展开(Wada *et al*, 1997; Doran *et al*, 2004)。

\* 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20120132110011)资助

① 通讯作者:汝少国,教授, E-mail: rusg@ouc.edu.cn

收稿日期:2014-03-21, 收修改稿日期:2014-05-13

1) 许磊. 久效磷农药扰乱马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*) 5-羟色胺能神经系统发育的机制研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2012, 1-67

海胆早期发育阶段形态发生受多种递质系统共同调控,而游泳行为则在不同时期由 DA 能神经系统单独或联合其他系统共同调控。海胆递质系统中研究较多且重要的主要有胆碱能系统(Cholinergic System)、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)能系统和多巴胺(Dopamine, DA)能神经系统三大关键递质系统,其中,DA 能系统发育较胆碱能系统早(Falugi *et al.*, 2002; Katow *et al.*, 2010),而且,在最早发育成熟的递质系统——5-HT 能系统发育前,DA 递质及其受体就已开始表达,并对海胆早期形态发生和游泳行为具有重要调控作用(Buznikov *et al.*, 2001b、2007; Katow *et al.*, 2010)。因此,本文以早期发育阶段海胆为模式生物,对 DA 能神经系统的发育及其功能进行综述。

## 1 海胆早期多巴胺能神经系统的发育

Bisgrove 等(1987)研究发现,海胆 DA 能神经系统包括口部下唇神经节和一对后口腕基底神经节。通常,DA 能神经元发育大致经历 4 个阶段,即前体细胞期—DA 能神经元前体细胞期—DA 能神经元早期—DA 能神经元成熟期。前体细胞是一类只能向特定终末分化细胞分化、比祖细胞的增殖能力更有限的成体细胞。前体细胞期,DA 递质及其受体等 DA 能神经系统中发挥作用的主成分均尚未合成。DA 递质和多巴胺受体(Dopamine receptor, DR)是 DA 能系统发育的基础。

### 1.1 多巴胺递质代谢过程及多巴胺受体

DA 递质代谢主要包括 DA 的合成、转运和降解 3 个重要过程(图 1),代谢所需合成酶、转运体及降解酶对 DA 代谢过程至关重要。

**1.1.1 合成、储存与释放** DA 属于非肽类小分子神经递质,在轴突末梢合成并贮存于突触囊泡中,当神经冲动到来时,突触囊泡即与突触前膜融合释放 DA 递质至突触间隙。

DA 合成原料为来自于血液中的酪氨酸(Tyrosine, Tyr),Tyr 首先在酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)作用下合成左旋多巴(L-DOPA),再经多巴脱羧酶(Dopa Decarboxylase, DDC)催化合成 DA(Rang *et al.*, 2010),这两步反应均在胞浆中进行,TH 含量少、活性低,为 DA 合成限速酶。DA 合成后即被囊泡单胺转运体(Vesicular Monoamine Transporter, VMAT)快速摄入囊泡中储存。当囊泡中含有多巴胺 β 羟化酶(Dopamine β-Hydroxylase, DBH)时,DA 则会被进一步催化合成去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)储存于囊泡中,NE 还可

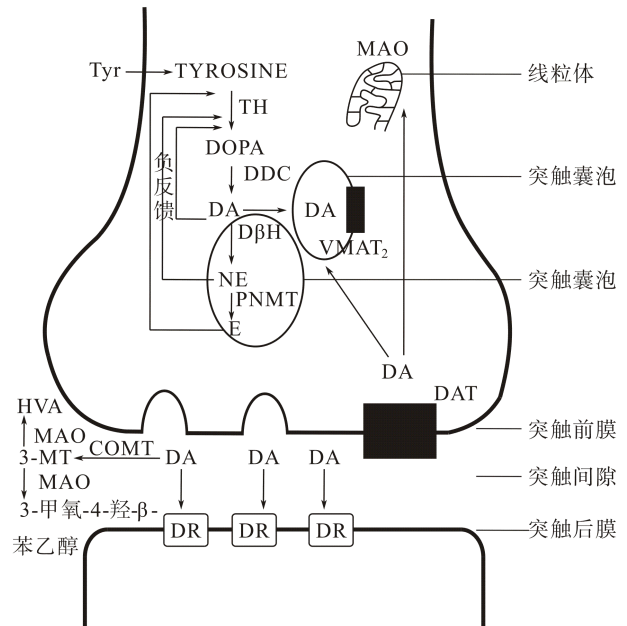


图 1 突触部位 DA 递质代谢

Fig.1 DA neurotransmitter metabolism in synapsis

线粒体: Mitochondria; 突触囊泡: Synaptic Vesicles; 突触前膜: Presynaptic membrane; 突触间隙: Synaptic cleft; 突触后膜: Postsynaptic membrane; DA: Dopamine

以在苯乙醇胺-N-甲基转移酶(Phenylethanolamin N-Methyl Transferase, PNMT)作用下生成肾上腺素(Epinephrine, E),所以 DA 为 NE 和 E 合成的前体物质,三者均属于儿茶酚胺(Catecholamine, CA)类。由于 CA 合成速率调控机制为负反馈抑制作用,即通过终产物来抑制合成途径中的限速步骤,因而,当神经末梢胞浆中游离 DA、NE 或 E 浓度过高时,限速酶 TH 则会受到负反馈抑制,从而减少 CA 合成。

此外,囊泡除了具有储存作用外,还可参与递质释放。当神经冲动到达突触前膜时, $Ca^{2+}$ 通道开放, $Ca^{2+}$ 内流,细胞内  $Ca^{2+}$ 浓度增加,促使囊泡与前膜融合,DA 从而以胞吐形式释放至突触间隙。由于 DA 释放是  $Ca^{2+}$ 依赖性的,因此,由膜外进入膜内的  $Ca^{2+}$ 数量可以直接影响 DA 释放量。递质释放后,囊泡膜会在突触前膜经内吞作用形成新囊泡,从而实现囊泡再循环。

**1.1.2 转运** 释放到突触间隙的 DA 与突触后膜上的 DR 结合产生生理效应后,大部分被转运回突触前膜以备再次利用。

与受体结合后,DA 即被突触前膜的多巴胺转运体(Dopamine transporter, DAT)重摄取至突触前膜胞浆中,然后在 VMAT 作用下被快速转入囊泡中贮存,当神经冲动到达前膜时,DA 被再次释放至突触间隙。



因此, DAT 和 VMAT 相互配合, 可以一定程度调控 DA 递质的空间分布。海胆中 DA 摄取量取决于胚胎发育时间和 DA 浓度, 海胆未受精卵中 DA 摄取量较高, 但受精后 20–30 min 开始下降, 卵裂期又有所增加(Carginale *et al.*, 1995)。目前, 尚未有海胆 DAT 和 VMAT 相关研究。

**1.1.3 降解** 与受体结合后, 突触间隙的 DA 除被重摄取回前膜再次利用外, 剩余大部分都被酶促降解而最终失活。

广泛分布的单胺氧化酶(Monoamine oxidase, MAO)和儿茶酚氧位甲基转移酶(Catechol-O-Methyl Transferase, COMT, EC.2.1.1.6)是催化 DA 分解的两种重要酶类(Charles, 2006), COMT 主要存在于突触间隙, 而 MAO 则在突触前膜和间隙中均有分布。

神经元内的 DA 首先经 MAO 氧化脱氨生成醛再转化为 3,4-二羟- $\beta$ -苯乙酸或 3,4-二羟苯乙酸(3,4-hydroxyphenylacetic acid, DOPAC), 然后, 在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下, 由 S-腺苷蛋氨酸提供甲基, 经神经元外的 COMT 进一步甲基化生成醇或酸, DA 的主要终产物在中枢神经元中为 3-甲氧-4-羟- $\beta$ -苯乙醇, 而在外周神经元中则为高香草酸(Homovanillic Acid, HVA); 突触间隙的 DA 首先由 COMT 转化为 3-甲氧基酪氨(3-MT), 再由 MAO 最终转化为 3-甲氧-4-羟- $\beta$ -苯乙醇和 HVA。作为 DA 的重要终代谢物, HVA 可被用作间接判断 DA 含量。

总之, DA 递质代谢各个过程协同作用才能确保 DA 代谢保持动态平衡。

**1.1.4 多巴胺受体** 突触间隙中含有粘多糖、糖蛋白和唾液酸等化学成分, DA 与其结合后才能由前膜移至后膜进而与受体结合发挥生理作用。海胆共有  $\text{D}_1$ - $\text{D}_5$  五种 DR, 它们均属于 7 个跨膜区域(7-GM)组成的 G 蛋白偶联受体(G Protein Coupled Receptor, GPCR)(Gingrich *et al.*, 1993), 根据生物化学和药理学性质, 可分为促进型  $\text{D}_1$  类( $\text{D}_1$ 、 $\text{D}_5$ )和抑制型  $\text{D}_2$  类( $\text{D}_2$ 、 $\text{D}_3$ 、 $\text{D}_4$ )两大受体家族(Missale *et al.*, 1998)。海胆  $\text{D}_1$  和  $\text{D}_2$  受体家族对腺苷酸环化酶(AC)的调控作用与哺乳动物脑类似(Kebabian *et al.*, 1979; Stoof *et al.*, 1981)。 $\text{D}_1$  受体家族与刺激型 G 蛋白( $\text{G}_{\text{os}}$ )偶联, 激活 AC 第二信使系统, 调控细胞代谢包括离子通道功能。相反,  $\text{D}_2$  受体家族与抑制型 G 蛋白( $\text{G}_{\text{oi}}$ )偶联, 直接调控偶联  $\text{G}_{\text{oi}}$  亚单元的效应因子, 抑制 AC 活性(Enjalbert *et al.*, 1983)。

贮存于海胆未受精卵表面的 DR, 在受精后仅可发挥作用数分钟或数秒钟, 但在整个胚胎发育阶段 DR 均可再生(Carginale *et al.*, 1995)。DR 不可逆失活

时, 早期胚胎发育受损。马粪海胆(*H. pulcherrimus*)的 DR 中 1 型多巴胺受体(Dopamine receptor 1,  $\text{DRD}_1$ )分布较广、表达水平最高, 而且在 9.5-hpf 旋转囊胚期即开始表达, 它可以结合 DA 递质来共同调控海胆胚胎和幼虫的形态发生和游泳行为(Katow *et al.*, 2010)。至于海胆其他各型 DR 的作用及信号转导途径相关研究则尚未有报道。

## 1.2 前多巴胺能神经系统中 DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 的形成

DA 递质及 DR 合成后, DA 能神经元发育即进入 DA 能神经元前体细胞期, 该时期递质具有一定的功能活性(Buznikov, 1990)。

Katow 等(2010)发现, 在 DA 能系统发育成熟之前(即前多巴胺能神经系统), 马粪海胆(*H. pulcherrimus*) DA 递质及  $\text{DRD}_1$  受体蛋白在即将孵化前的 9.5 hpf 旋转囊胚期开始表达。DA 形成直径 1–2  $\mu\text{m}$  大小 DA 颗粒(Dopaminergic granules, DAGs), 从旋转囊胚期至变态阶段在胚胎和幼虫表面均有表达, 且最先出现于外胚层顶端表面。在 48 hpf 二腕幼虫期, DAGs 数目显著上升并开始发生聚集, 从最初胚胎期的均匀分布模式发展为有序的纤毛环模式, 而在 34 dpf 八腕幼虫期, DAGs 则在各腕及前、后毛肩片上聚集并形成一条较窄的条带。多巴胺受体  $\text{D}_1$  颗粒(Dopaminergic receptor  $\text{D}_1$  granules,  $\text{DRD}_1$ -Gs)的形成时间、分布模式及位置均与 DAGs 非常相似, 并可在跨膜区域与 DAGs 紧密结合(DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs), 每个 DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 还包含多种 DA/ $\text{DRD}_1$  信号通路的异质共聚物。DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 与纤毛基体相连, 且密集填充于纤毛环中。二腕幼虫至八腕幼虫阶段(48–34 dpf), 幼虫腕纤毛环中 DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 均为典型的 5 列条带类型, 但 34 dpf 顶簇区 DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 的列数大约增至 7。

## 1.3 DA 能神经细胞形成

DA/ $\text{DRD}_1$ -Gs 聚集后, 四腕幼虫早期, DA 能神经细胞开始在下唇神经节和后口腕基部形成且具有轴突联系, 八腕幼虫期其数量增至最大(Bisgrove *et al.*, 1987)。原肠胚期及其之前阶段, DA 仅在未分化细胞中合成; 而长腕幼虫期, DA 还可在分化神经元中合成。虽然分化和未分化细胞均可合成 DA, 但相比之下, DA 能神经元的递质储存系统更有效, 因此, DA 能细胞形成对 DA 含量增加非常重要(Toneby, 1980)。

DA 能细胞形成后, 在长腕幼虫发育过程中, 神经元逐步生长、迁移, 轴突不断延伸、联系, DA 阳性纤维也不断生长、延伸, DA 能神经元逐渐成熟,

DA 能神经系统最终发育成熟。目前关于海胆 DA 能神经系统具体发育过程及时期相关研究很少, 亟待补充。

## 2 海胆早期多巴胺能神经系统的功能

### 2.1 形态发生调控

以马粪海胆(*H. pulcherrimus*)为例, 通常海胆早期发育过程大致可分为以下阶段: 5–6 hpf 桑椹胚期, 8 hpf 未孵化非旋转囊胚期, 9.5 hpf 未孵化旋转囊胚期, 14–15 hpf 浮游囊胚期, 16 hpf 间质囊胚期, 20 hpf 原肠胚早期, 24–29 hpf 棱柱幼虫期, 48 hpf 二腕幼虫期, 67–72 hpf 二腕幼虫晚期以及 34 dpf 八腕幼虫期(Katow *et al.*, 2010)。

研究表明, 海胆早期发育过程中的一系列形态特征变化, 受到包括胆碱能系统、5-HT 能系统和 DA 能系统在内的多种递质系统共同调控(Buznikov *et al.*, 2001a; Pesando *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2003; Aluigi *et al.*, 2005)。5-HT 受体和 DR 拮抗剂可以阻断海胆胚胎卵裂(Buznikov *et al.*, 2001b)。DA 递质及其受体在 5-HT 能系统发育成熟之前就开始表达, 对海胆早期胚胎和幼虫形态发生具有重要调控作用。有研究表明, DA 能信号通路能够通过其 D<sub>2</sub> 受体调节腕长, 进而控制幼虫发育可塑性(Adams *et al.*, 2011)。单胺转运体阻断剂利血平能够引起海胆早期发育畸形, 而 5-HT 和 DA 的类似物则能够缓解或消除利血平的影响(Buznikov *et al.*, 2007)。

通常同一轴突含有多种递质, 如下唇神经节最初只包含 DA 能细胞, 但 7 d 后, 5-HT 能细胞也出现(Bisgrove *et al.*, 1987)。Buznikov 等(2007)认为, 在海胆早期发育过程中, 所有递质都作用于一个相同的下游信号通路, 共同调控胚胎发育, 当某递质系统受影响导致发育畸形时, 任一递质的外源类似物均可以缓解这种畸形效应, 这进一步说明, 海胆早期发育阶段形态发生受多种神经递质系统共同调控。

### 2.2 游泳行为调控

海胆幼虫生长发育伴随着其游泳行为复杂性的增加, 游泳行为对摄食、逃逸反应以及光敏垂直迁移等活动都相当重要, 海洋幼虫的游泳行为依靠纤毛推动作用。纤毛是海胆等海洋无脊椎动物幼虫的主要运动器官(Kinukawa *et al.*, 2007), Nakajima(1986a、b)首先观察到了位于海胆幼虫前口区的纤毛结构, 并且证明了纤毛由具有轴突结构的细胞长出。幼虫游泳的首要效应器为纤毛环(Strathmann, 1971、1975), 纤毛着生其上, 纤毛摆动频率、周期乃至方向等均受多种递

质系统调控(Wikramanayake *et al.*, 1997)。除了前、后泳动之外, 随着海胆幼虫发育, 幼虫在以动、植物极为轴线进行逆时针方向自转的同时, 其动物极在驱动力牵引下可以向前运动, 从而使每个幼虫在保持自转的同时还能上、下游动。

CA 能神经元和肽能神经元可能参与调控纤毛摆动(Nakajima, 1987; Beer *et al.*, 2001)。DA 和 5-HT 均可调控幼虫游泳的速度和方向, 二者首要调控纤毛摆动方向, 其次调控摆动频率。Mogami 等(1992)发现, 5-HT 增加了马粪海胆(*H. pulcherrimus*)和红海胆(*Pseudocentrotus depressus*)长腕幼虫游泳速率; DA 降低了红海胆(*P. depressus*)长腕幼虫的向前泳动速率, 却增加了其向后泳动速率。

研究认为, 5-HT 能系统、多巴胺能系统和  $\gamma$ -氨基丁酸(Gamma Amino Acid Butyric Acid, GABA)能神经系统均可参与调控海胆幼虫期游泳行为(Bisgrove *et al.*, 1987; Yaguchi *et al.*, 2003; Katow *et al.*, 2007、2013), 但囊胚期游泳行为很可能受前多巴胺能神经系统调控(Katow *et al.*, 2010)。Katow 等(2010)发现, DAGs 和 DRD<sub>1</sub>-Gs 从 9.5 hpf 未孵化旋转囊胚期一直到变态阶段, 在胚胎和幼虫表面均有表达。DA/DRD<sub>1</sub>-Gs 最先出现在外胚层顶端表面, 与纤毛基体相连, 直至八腕幼虫阶段均密集填充于纤毛环中。研究发现, DA 合成抑制剂以及 DR 拮抗剂均能够抑制马粪海胆(*H. pulcherrimus*)囊胚期游泳行为。认为 DA/DRD<sub>1</sub>-Gs 是 DA 能神经系统调控胚胎和幼虫游泳行为的形态学基础, 囊胚期游泳行为受前多巴胺能神经系统调节。因此, 在 DA 能细胞出现之前, 甚至 5-HT 能细胞出现之前, 前 DA 能系统中就存在可以调控海胆形态发生和游泳行为的重要因子, 即 DA 递质及其受体 DRD<sub>1</sub>。

总之, DA 能神经系统可以单独或与其他系统共同调控海胆早期发育阶段游泳行为。在 5-HT 能神经系统开始发育之前即胚胎期的游泳行为主要由前多巴胺能神经系统调控; 而 5-HT 能神经系统开始发育之后即幼虫期的游泳行为, 则可能主要由包括 5-HT 能系统、前多巴胺能神经系统和 GABA 能神经系统等在内的多种递质系统协同调控。

## 3 展望

### 3.1 进一步探究海胆多巴胺能系统发育影响因子、多巴胺受体作用及机制

目前, DA 能系统相关研究多以大鼠、小鼠为对象, 而且远较海胆透彻。首先, 对海胆 DA 能系统发

育的关键成分 DR 了解较少,但在大鼠中,各受体的信号转导途径及作用已较明确。介导大鼠 DR 功能的通路以 AC/cAMP/PKA 为主, MAPK、Akt/NF- $\kappa$ B 及 PLC $\beta$ /IP $_3$  等为辅(Neve *et al*, 2004)。大鼠 DR 活化可以调控轴突导向活动,改变神经元迁移、细胞周期活动和细胞形态,也可能会影响其发育过程。因此,可以运用生化方法和分子生物学方法,对几种海胆 DR 的功能、相互关系及其信号转导途径进一步研究,以深入了解 DR 并为其对海胆形态发生和游泳行为的调控机制研究奠定基础。其次,对海胆 DA 能神经系统发育影响因子了解较少,但已明确的是小鼠 DA 能神经元发育受包括 Pitx3、Nurr1、Lmx 1b、神经营养因子、醛脱氢酶(Aldehyde Dehydrogenase, AHD $_2$ )及维 A 酸(RA)等多种转录和生长因子调控,而且各因子间具有相互作用,因此,今后可以着重探究海胆中以上基因对 DA 能系统发育的影响。

### 3.2 以早期海胆为模式生物,探究三大神经系统在调控过程中的相互关系

由于海胆早期发育阶段形态发生和游泳行为受多种递质系统共同调控,而且主要是胆碱能系统、5-HT 能系统和 DA 能系统三大神经系统共同作用的结果,但具体调控机理并无定论。为了进一步明确海胆早期发育阶段各时期三大递质系统是怎样协同调控形态发生和游泳行为的,主要作用系统和次要作用系统是如何发挥上调或下调作用的,可以借助各系统的特异性拮抗剂进行干扰处理,首先排除其他系统的影响,然后再在分子水平进行研究并结合形态学观察,来逐步探究各个系统的作用机制。

### 3.3 以早期海胆为模式生物,进一步探究神经毒物对 DA 能系统发育的影响

研究发现,神经毒物可以通过影响 DA 能系统各因子(DAT、VMAT $_2$ 、MAO 或 DRD $_1$  等),进而造成动物形态发生和运动行为异常而表现神经毒性作用(Cadet *et al*, 1998; Gluck *et al*, 2001; Bradner *et al*, 2013; 姚丹, 2010<sup>1)</sup>)。因此,可以运用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)和酶联免疫吸附法(ELISA)等方法,分析神经毒物对海胆 DA 递质、DR 和 DA 递质代谢过程关键因子(如 TH、DAT、MAO 等)的影响,为进一步探讨海胆 DA 能系统发育影响因子及神经毒物的作用机制提供理论依据。

## 参 考 文 献

- Adams DK, Sewell MA, Angerer RC, *et al*. Rapid adaptation to food availability by a dopamine-mediated morphogenetic response. *Nat Commun*, 2011, 2: 592
- Aluigi MG, Angelini C, Corte G, *et al*. The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, embryo as a "bioethical" model for neurodevelopmental toxicity testing: Effects of diazinon on the intracellular distribution of OTX2-like proteins. *Cell Biol Toxicol*, 2008, 24(6): 587-601
- Aluigi MG, Angelini C, Falugi C, *et al*. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem-Biol Interact*, 2005, 157-158: 305-316
- Angelini C, Aluigi MG, Sgro M, *et al*. Cell signaling during sea urchin development: a model for assessing toxicity of environmental contaminants. *Prog Mol Subcell Biol*, 2005, 39: 45-70
- Beer AJ, Moss C, Thorndyke M. Development of serotonin-like and SALMF amide-like immunoreactivity in the nervous system of the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Biol Bull*, 2001, 200(3): 268-280
- Berdyshev EV, Vaskovsky VE, Vaschenko MA. Sea urchins-a new model for PAF research in embryology. *Comp Biochem Phys B*, 1995, 110(3): 629-632
- Bisgrove BW, Burke RD. Development of the nervous system of the pluteus larva of *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Cell Tissue Res*, 1987, 248(2): 335-343
- Bradner JM, Suragh TA, Wilson WW, *et al*. Exposure to the polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 damages the nigrostriatal dopamine system: Role of dopamine handling in neurotoxicity. *Exp Neurol*, 2013, 241: 138-147
- Burke RD, Angerer LM, Elphick MR, *et al*. A genomic view of the sea urchin nervous system. *Dev Biol*, 2006, 300(1): 434-460
- Buznikov GA, Nikitina LA, Bezuglov VV, *et al*. An invertebrate model of the developmental neurotoxicity of insecticides: effects of chlorpyrifos and dieldrin in sea urchin embryos and larvae. *Environ Health Perspect*, 2001a, 109(7): 651-661
- Buznikov GA. Neurotransmitters in Embryogenesis. Chur, Switzerland Harwood Academic Publishers, 1990:1-526
- Buznikov GA, Nikitina LA, Rakić LM, *et al*. The sea urchin embryo, an invertebrate model for mammalian developmental neurotoxicity, reveals multiple neurotransmitter mechanisms for effects of chlorpyrifos: therapeutic interventions and a comparison with the monoamine deplete, reserpine. *Brain Res Bull*, 2007, 74 (4): 221-231
- Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res*, 2001b, 305(2): 177-186

1) 姚丹. 久效磷对马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)胚胎发育神经毒性效应研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2010, 1-94

- Cadet JL, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int*, 1998, 32(2): 117–131
- Carginale V, Borrelli L, Capasso A, *et al.* Changes in Dopamine Uptake and Developmental Effects of Dopamine Receptor Inactivation in the Sea Urchin. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40(3): 379–385
- Charles AM. Dopamine: the rewarding years. *Brit J Pharmacol*, 2006, 147(Suppl 1): 136–144
- Doran SA, Koss R, Tran CH, *et al.* Effect of serotonin on ciliary beating and intracellular calcium concentration in identified populations of embryonic ciliary cells. *J Exp Biol*, 2004, 207(8): 1415–1429
- Enjalbert A, Bockaert J. Pharmacological characterization of the D<sub>2</sub> dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol*, 1983, 23 (3): 576–660
- Falugi C, Diaspro A, Angelini C, *et al.* Three-dimensional mapping of cholinergic molecules by confocal laser scanning microscopy in sea urchin larvae. *Micron*, 2002, 33(3): 233–239
- Falugi C, Lammerding-Koppel M, Aluigi MG. Sea Urchin Development: An Alternative Model for Mechanistic Understanding of Neurodevelopment and Neurotoxicity. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2008, 84(3): 188–203
- Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptor. *Annu Rev Neurosci*, 1993, 16: 299–321
- Gluck MR, Moy LY, Jayatilleke E, *et al.* Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. *J Neurochem*, 2001, 79(1): 152–160
- Graillet C, Pagano G, Girard JP. Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis. *Teratogen Carcinogen Mutagen*, 1993, 13(1): 1–14
- Katow H, Abe K, Katow T, *et al.* Development of the GABA-ergic signaling system and its role in larval swimming in sea urchin. *J Exp Biol*, 2013, 216 (Part 9): 1704–1716
- Katow H, Suyemitsu T, Ooka S, *et al.* Development of a dopaminergic system in sea urchin embryos and larvae. *J Exp Biol*, 2010, 213(16): 2808–2819
- Katow H, Yaguchi S, Kyojuka K. Serotonin stimulates [Ca<sup>2+</sup>] elevation in ciliary ectodermal cells of echinoplutei through a serotonin receptor cell network in the blastocoels. *J Exp Biol*, 2007, 210(Pt 3): 403–412
- Kebabian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 1979, 277: 93–96
- Kinukawa M, Vacquier VD. Adenylate kinase in sea urchin embryonic cilia. *Cell Motil Cytoskel*, 2007, 64(4): 310–319
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, *et al.* Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*, 1998, 78(1): 189–225
- Mogami Y, Watanabe K, Ooshima C, *et al.* Regulation of ciliary movement in sea urchin embryos: dopamine and 5-HT change the swimming behavior. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 101(2): 251–254
- Morale A, Conigiio L, Angelini C, *et al.* Biological effects of a neurotoxic pesticide at low concentrations on sea urchin early development. *Chemosphere*, 1998, 37(14): 3001–3010
- Nakajima Y. Presence of ciliary patch in preoral epithelium of sea urchin plutei. *Dev Growth Differ*, 1986a, 28(3): 243–249
- Nakajima Y. Development of the nervous system of sea urchin embryos: Formation of the ciliary bands and the appearance of two types of ectoneural cells in the pluteus. *Dev Growth Differ*, 1986b, 28(6): 531–542
- Nakajima Y. Localization of catecholaminergic nerves in larval echinoderms. *Zool Sci*, 1987, 4(2): 293–299
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, 2004, 24(3): 165–205
- Pagano G, Biase A, Iaccarino M, *et al.* Bauxite manufacturing residues from Gardanne (France) and Portovesme (Italy) exert different patterns of pollution and toxicity to sea urchin embryos. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21: 1272–1278
- Pesando D, Huitorel P, Dolcini V, *et al.* Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Mar Environ Res*, 2003, 55(1): 39–57
- Qiao D, Nikitina LA, Buznikov GA, *et al.* The sea urchin embryo as a model for mammalian developmental neurotoxicity: ontogenesis of the high-affinity choline transporter and its role in cholinergic trophic activity. *Environ Health Persp*, 2003, 111(14): 1730–1735
- Rang HP, Dale MM, Pitter JM, *et al.* Rang and Dale's Pharmacology. Sixth Edition. Beijing: Peking University Medical Press, 2010, 526
- Semenova MN, Kiselyov A, Semenov VV. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. *BioTechniques*, 2006, 40(6): 765–774
- Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, *et al.* The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 2006, 314: 941–952
- Stoof JC, Kebabian JW. Opposing roles for the D-1 and the D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*, 1981, 294: 366–368
- Strathmann RR. Larval feeding in echinoderms. *Amer Zool*, 1975, 15: 717–730
- Strathmann RR. The feeding behavior of planktotrophic echinoderm larvae: mechanisms, regulation and rates of suspension-feeding. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1971, 6(2): 109–160
- Toneby M. Dopamine in developing larvae of the sea urchin *Psammechinus Miliaris* Gmelin. *Comp Biochem Phys*, 1980,

- 65(2), 139–142
- US EPA 600R95136. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to West Coast marine and estuarine organisms
- Wada Y, Mogami Y, Baba SA. Modification of ciliary beating in sea urchin larvae induced by neurotransmitters: Beat-plane rotation and control of frequency fluctuation. *J Exp Biol*, 1997, 200(1): 9–18
- Wikramanayake AH, Klein WH. Multiple signaling events specify ectoderm and pattern the oral-aboral axis in the sea urchin embryo. *Development*, 1997, 124(1): 13–20
- Yaguchi S, Katow H. Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior. *J Comp Neurol*, 2003, 466(2): 219–229
- Yao D, Ru SG, Katow H. The neurotoxic effects of monocrotophos on the formation of the serotonergic nervous system and swimming activity in the larvae of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Environ Toxicol Pharm*, 2010, 30(2): 181–187

(编辑 冯小花)

## Progress on the Research of the Development and Function of the Dopaminergic Nervous System of Sea Urchin in the Early Developmental Stage

RU Shaoguo<sup>①</sup>, WANG Cuicui

(Marine Life Science College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Sea urchin embryo and larvae in the early developmental stages is an important model for research on marine ecological toxicology. Sea urchin dopaminergic (DA) nervous system develops earlier than the cholinergic system, and it starts to regulate the morphogenesis and swimming behaviors much earlier than the serotonergic system. Here we used sea urchin in the early developmental stages as a model and reviewed the development and the functions of the dopaminergic nervous system. The synthesis of dopamine and the receptors precedes the development of the dopaminergic nervous system. The dopaminergic neuron precursor cell period starts after the synthesis of DA and the receptors. In this period DA and DA receptor 1 (DRD<sub>1</sub>) appears in the form of granules of which the diameter is 1-2 μm (DA/DRD<sub>1</sub>-Gs), and they are also expressed on the surface of the embryo and larvae from the rotational blastula stage to the metamorphosis stage. After the aggregation of DA/DRD<sub>1</sub>-Gs, dopaminergic cells with the axon contacts begin to develop in the labial ganglion and the base of the back oral arms in the early four-wrist larval stage. The number of dopaminergic cells reached the maximum in the eight-wrist larval stage. Then the dopaminergic nervous system continues to develop until the maturity. The morphogenesis in the early developmental stage is regulated by several neurotransmitter systems together, and the swimming behaviors in different early periods can be regulated by either the dopaminergic nervous system alone or together with other systems. In the end, we assessed the prospective studies on issues, such as the factors affecting the development of the dopaminergic nervous system in the early developmental stages of sea urchin, the functions and the signaling pathway of DA receptors, the primary-secondary relationship and the mechanisms of the up-/down-regulation of the three important neurotransmitter systems in early morphogenesis and swimming behaviors, and the influences of neurotoxic substances on the development of the dopaminergic nervous system.

**Key words** Sea urchin; Early developmental stages; Dopaminergic nervous system

① Corresponding author: RU Shaoguo, E-mail: rusg@ouc.edu.cn

# 《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Members (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang	戈贤平 GE Xianping	方建光 FANG Jianguang	王清印 WANG Qingyin
王新鸣 WANG Xinming	包振民 BAO Zhenmin	司徒建通 SITU Jiantong	关瑞章 GUAN Ruizhang
刘占江 LIU Zhanjiang	刘海金 LIU Haijin	孙效文 SUN Xiaowen	孙 溢 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士璀 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立侨 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 捷 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 沙珍霞 (编辑部主任) SHA Zhenxia (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua

刘丛力 LIU Congli

刘 慧 LIU Hui

陈 严 CHEN Yan

## 渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

## PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

第36卷 第1期 2015年2月

Vol.36 No.1 Feb. 2015

主管单位 中华人民共和国农业部

主办单位 中国水产学会

中国水产科学研究院黄海水产研究所

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛星球印刷有限公司

国内发行 青岛市邮政局

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Supervised

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed by

Subscription

Overseas Distributed by

by Ministry of Agriculture, P.R. China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580  
http://www.yyqxjz.cn; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Tang Qisheng

by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.

Post Office of Qingdao

Post Offices All Over China

China International Book Trading Corporation

P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 1000-7075

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 1000-7075



9 771000 707152