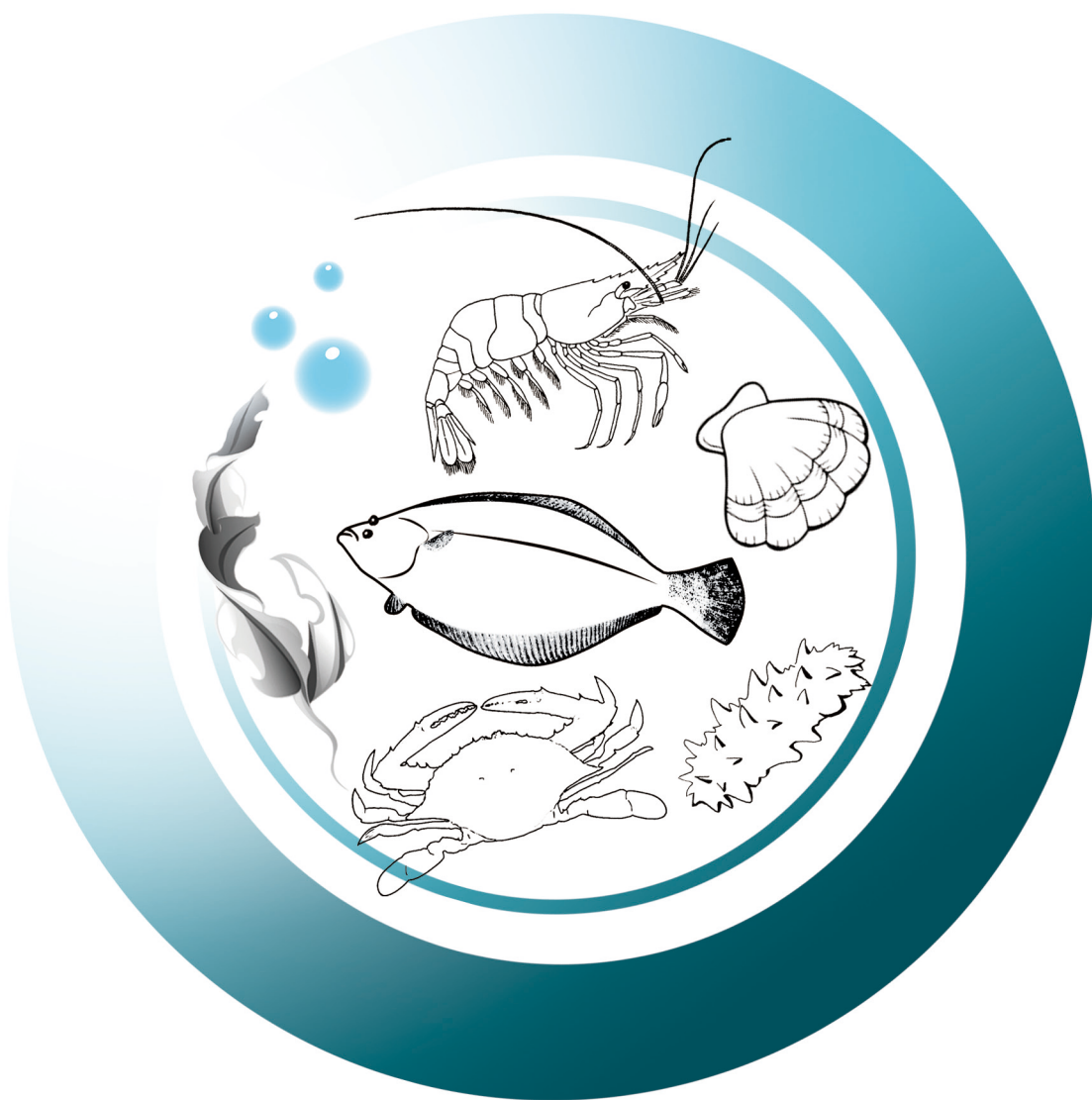


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第38卷 VOL.38 第2期 NO.2



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 38 卷 第 2 期

2017 年 4 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源核心期刊

RCCSE 中国权威学术期刊

中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、

中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊

《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊

《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊

《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

研究论文

- 气候变化对长江口和黄河口渔业生态系统健康的潜在影响.....单秀娟 陈云龙 金显仕 (1)
- 渤海中部海区水域夏季环境质量综合评价.....徐 勇 曲克明 赵 俊 崔正国 夏 斌 (8)
- 黄河口附近海域表层沉积物重金属污染状况及年际变化分析.....胡 琴 李 强 黄必桂 曲 亮 曹 静 (16)
- 辽东湾不同型刺网捕捞性能的比较.....邢彬彬 郭 瑞 李显森 赵宪勇 张国胜 许传才 孙 珊 尤宗博 (24)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *c-Jun* 基因的克隆及免疫应答分析.....于孟君 孙璐明 陈亚东 陈学杰 杨 光 刘 洋 仇雪梅 沙珍霞 (31)
- 星斑川鲈、石鲈及其杂交一代(星斑川鲈♀×石鲈♂)的线粒体 DNA 序列比较分析.....李 青 郑风荣 关洪斌 倪世俊 王 波 (40)
- 四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)消化系统胚后发育组织学观察.....谢木娇 区又君 李加儿 温久福 周 慧 王鹏飞 刘奇奇 (50)
- 急性氨氮胁迫对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响.....王贞杰 陈四清 曹栋正 卢 斌 常 青 刘长琳 燕敬平 (59)
- 低温胁迫对云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代血清生化指标的影响.....邵彦翔 陈 超 李炎璐 张梦淇 陈建国 庞尊方 (70)
- 盐度对条纹锯鲷(*Centropristis striata*)仔鱼的活力、开口、摄食的影响.....张春禄 陈 超 李炎璐 张廷廷 刘 莉 曲江波 孙 涛 (77)
- 饲料中添加两种蛋白水解物对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长性能及肠道组织学结构的影响.....牟玉超 柳 茜 卫育良 梁萌青 郑珂珂 徐后国 (83)
- 饲料中添加甘氨酸可提高大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的抗氧化和抗应激能力.....潘孝毅 张 琴 李 俊 刘 东 张含乐 张文兵 麦康森 (91)
- 胆汁酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响.....曾本和 廖增艳 向 泉 何文萧 岑 敏 何善成 (99)
- 油酸诱导建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)肝细胞脂肪变性模型的建立.....杜金梁 曹丽萍 贾 睿 王 涛 顾郑琰 张春云 骆仁军 徐 跑 殷国俊 (107)
- 投喂水平对黄鳝(*Monopterus albus*)生长、肠道消化酶活性及部分血清生理生化指标的影响.....陈云飞 彭慧珍 刘庄鹏 胡 毅 吕怡航 李昭林 张德洪 (114)
- 两种养殖模式下泥鳅养成品体色、质构及其脏器消化酶、抗氧化酶和 ATP 酶活力的差异.....袁向阳 王志铮 杨 程 富 裕 李鸿鹏 白晓倩 朱卫东 (121)
- 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应.....曹家旺 孔 杰 罗 坤 栾 生 曹宝祥 史晓丽 卢 霞 冯亚萍 王 军 王明珠 孟宪红 (128)
- 栉江珧(*Atrina pectinata*) EST-SSR 标记的开发与应用.....李东明 杨爱国 吴 彪 孙秀俊 周丽青 刘寒苗 张广明 (137)
- 高盐胁迫对黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*)呼吸排泄和免疫酶活性的影响.....唐保军 邹 雄 尹 飞 (143)
- 条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)源美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)的分离鉴定.....王庚申 许文军 谢建军 汪 玮 施 慧 (151)
- 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧光定量 PCR 检测.....刘宝彬 杨 冰 吕秀旺 万晓媛 刘 珍 黄 捷 (158)
- 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCh3* 基因克隆鉴定及表达分析.....张 凤 吕建建 刘 萍 高保全 李 健 (167)
- 研究简报
- 中国养殖斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)上皮囊肿病的发现及显微观察.....范 超 史成银 刘江春 (177)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.38 No.2 April 2017

Projecting Fishery Ecosystem Health Under Climate Change Scenarios: Yangtze River Estuary and Yellow River Estuary.....	SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, JIN Xianshi	(1)
Assessment of Environmental Water Quality in the Central Region of the Bohai Sea in Summer.....	XU Yong, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo, XIA Bin	(8)
Pollution Status and the Annual Variations of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of the Yellow River Estuary.....	HU Qin, LI Qiang, HUANG Bigui, QU Liang, CAO Jing	(16)
Fishing Capacity Comparison of Different Types of Gillnet in the Liaodong Bay.....	XING Binbin, GUO Rui, LI Xiansen, ZHAO Xianyong, ZHANG Guosheng, XU Chuancai, SUN Shan, YOU Zongbo	(24)
Cloning and Expression of the <i>c-Jun</i> Gene in Immune Response to Pathogen Challenge in Half-Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>).....	YU Mengjun, SUN Luming, CHEN Yadong, CHEN Xuejie, YANG Guang, LIU Yang, QIU Xuemei, SHA Zhenxia	(31)
Comparative Analysis of Genetic Variability of mtDNA Sequences in <i>Platichthys stellatus</i> , <i>Kareius bicoloratus</i> and Their Hybrid (<i>P. stellatus</i> ♀ × <i>K. bicoloratus</i> ♂).....	LI Qing, ZHENG Fengrong, GUAN Hongbin, NI Shijun, WANG Bo	(40)
Histological Observation of the Post-Embryonic Development of Digestive Tract of <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	XIE Mujiao, OU Youjun, LI Jiaer, WEN Jiufu, ZHOU Hui, WANG Pengfei, LIU Qiqi	(50)
Effects of Acute Ammonia Nitrogen Stress on Histopathology of Gill and Liver and Enzyme Activities of Juvenile <i>Verasper variegatus</i>	WANG Zhenjie, CHEN Siqing, CAO Dongzheng, LU Bin, CHANG Qing, LIU Changlin, YAN Jingping	(59)
Effects of Low Temperature Stress on Serum Biochemical Indices of the Juvenile Hybrid of <i>Epinephelus moara</i> ♀ × <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂.....	SHAO Yanxiang, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Mengqi, CHEN Jianguo, PANG Zunfang	(70)
Effects of Salinity on the Survival and Feeding of <i>Centropristis striata</i> Larvae.....	ZHANG Chunlu, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Tingting, LIU Li, QU Jiangbo, SUN Tao	(77)
Effects of Dietary Inclusion of Two Protein Hydrolysates on Growth Performance and Intestinal Histological Structure of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.).....	MU Yuchao, LIU Xi, WEI Yuliang, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XU Houguo	(83)
Dietary Glycine Improved the Capacity of Anti-Oxidation and Anti-Stress of Large Yellow Croaker (<i>Larimichthys crocea</i>).....	PAN Xiaoyi, ZHANG Qin, LI Jun, LIU Dong, ZHANG Hanle, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen	(91)
Effects of Bile Acids on Growth Performance, Muscle Composition and Digestive Enzyme Activities of <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	ZENG Benhe, LIAO Zengyan, XIANG Xiao, HE Wenxiao, CEN Min, HE Shancheng	(99)
Oleic Acid Induced Hepatocyte Steatosis Model in Jian Carp (<i>Cyprinus carpio</i> var. Jian).....	DU Jinliang, CAO Liping, JIA Rui, WANG Tao, GU Zhengyan, ZHANG Chunyun, LUO Renjun, XU Pao, YIN Guojun	(107)
Effects of Feeding Level on Growth, Intestinal Digestive Enzymes Activity and Physiological and Biochemical Characteristics of Serum in the Asian Swamp Eel (<i>Monopterus albus</i>).....	CHEN Yunfei, PENG Huizhen, LIU Zhuangpeng, HU Yi, LÜ Yihang, LI Zhaolin, ZHANG Dehong	(114)
Comparison of the Body Color, Texture, Activities of Viscera Digestive Enzymes, Antioxidant Enzymes and ATP Enzymes of Two Cultured Population of <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	YUAN Xiangyang, WANG Zhizheng, YANG Cheng, FU Yu, LI Hongpeng, BAI Xiaoqian, ZHU Weidong	(121)
Immune Priming Response Induced by Heat-Inactivated WSSV on <i>Fenneropenaeus chinensis</i> at Different Temperature.....	CAO Jiawang, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, SHI Xiaoli, LU Xia, FENG Yaping, WANG Jun, WANG Mingzhu, MENG Xianhong	(128)
Development and Application of the EST-SSR Markers in <i>Atrina pectinata</i>	LI Dongming, YANG Aiguo, WU Biao, SUN Xiujun, ZHOU Liqin, LIU Hanmiao, ZHANG Guangming	(137)
Effects of Acute Hyperosmotic Stress on Metabolic Rates and Immune-Related Enzymatic Activities in Clam (<i>Trachycardium flavum</i>).....	TANG Baojun, ZOU Xiong, YIN Fei	(143)
Isolation and Identification of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> from Diseased Rock Bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>).....	WANG Gengshen, XU Wenjun, XIE Jianjun, WANG Wei, SHI Hui	(151)
Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP) of <i>Litopenaeus vannamei</i> by Real-Time PCR.....	LIU Baobin, YANG Bing, LÜ Xiuwang, WAN Xiaoyuan, LIU Zhen, HUANG Jie	(158)
Cloning and Expression Analysis of the cDNA of <i>PtCh3</i> in <i>Portunus trituberculatus</i>	ZHANG Feng, LÜ Jianjian, LIU Ping, GAO Baoquan, LI Jian	(167)
First Report and Microscopic Examination of Epitheliocystis in Cultured Spotted Knifejaw (<i>Oplegnathus punctatus</i>) in China.....	FAN Chao, SHI Chengyin, LIU Jiangchun	(177)

气候变化对长江口和黄河口 渔业生态系统健康的潜在影响*



单秀娟^{1,2} 陈云龙^{1,3} 金显仕^{1,2①}

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

摘要 本研究采用层次灰色综合评价模型,结合动态生物气候分室模型预估的长江口和黄河口鱼类资源密度增量分布结果,对不同气候变化情景(RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5)对长江口和黄河口渔业生态系统健康的潜在影响进行了分析。从生态环境、生物群落结构和生态系统功能三个层面构建了长江口和黄河口渔业生态系统健康评价体系。2015–2050 年,长江口和黄河口渔业生态系统健康水平随着温室气体排放程度的增加而降低,即 RCP2.6 情景下健康水平最高,RCP6.0 情景次之,RCP8.5 情景最低。两个河口的健康水平随时间推移在 RCP2.6 情景下呈现出“高–低–高”的变化趋势;在 RCP6.0 情景下呈现出“低–高–低”的变化趋势;在 RCP8.5 情景下两个河口略有差异,黄河口呈“高–低–高”的变化趋势,长江口呈“低–高–低”的变化趋势。若以 2050 年渔业生态系统健康水平作为“最终状态”,两个河口 RCP2.6 情景下的健康水平高于 RCP6.0 和 RCP8.5 情景:长江口 RCP2.6 情景下的健康评价值为 0.61,是 RCP6.0 和 RCP8.5 情景下健康评价值的 1.9 倍和 1.8 倍;黄河口 RCP2.6 情景下的健康评价值分别是 RCP6.0 和 RCP8.5 情景的 2.8 倍和 2.2 倍。

关键词 长江口; 黄河口; 生态系统健康; 气候变化情景

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0001-07

河口作为独特的生态系统,环境复杂多变,基础饵料丰富,是众多渔业生物的产卵场、索饵场和育幼场,对渔业生产发挥了重要作用(陈渊泉, 1995; 李建生等, 2005; 蒋玫等, 2006)。同时,河口作为海陆交汇的关键区域,也是国内外渔业生态学研究的热区(李建生等, 2004; 钟俊生等, 2005; 单秀娟等, 2011; Jin *et al.*, 2013; Lercari *et al.*, 2015; Selleslagh *et al.*, 2015; Pasquaud *et al.*, 2015; Feyrer *et al.*, 2016),涉及了渔业资源数量变动(刘勇等, 2004; 林龙山, 2009; Arévalo-Frías *et al.*, 2015; Strydom, 2015)、群落结构(金显仕等, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2015)、优势种及多样性(李建生等,

2007; 李显森等, 2013; Shan *et al.*, 2013; Samedy *et al.*, 2015; 孙鹏飞等, 2015)及其影响因素等(董方勇, 1997; Obaza *et al.*, 2015)。关于河口生态系统的健康评价也引起了广泛关注(叶属峰等, 2007; 周晓蔚等, 2011; Sheaves *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2012、2015; Whitfield *et al.*, 2015)。这些研究主要基于已有的观测资料,运用相关的统计分析和模型对生态系统健康现状进行分析,但关于不同气候变化情景对河口渔业生态系统健康潜在影响的研究尚未见报道。鱼类群落结构及生物量分布变化被证明是表征河口生态系统健康的重要因子(Sheaves *et al.*, 2012),因此,本研究

* 鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-05)、国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)和山东省泰山学者专项基金共同资助 [This work was supported by the Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02-05), the National Basic Research Program of China (2015CB453303), and the Special Funds for Taishan Scholars Project of Shandong Province]. 单秀娟, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2016-04-27, 收修改稿日期: 2016-04-29

运用层次灰色综合评价模型(Grey Comprehensive Evaluation Model), 结合动态生物气候分室模型(Dynamic Bioclimate Envelope Model)预估的不同气候变化情景下长江口和黄河口鱼类资源密度增量的分布结果, 预估了不同气候变化情景对长江口和黄河口渔业生态系统健康的潜在影响, 以期为气候变化背景下近海渔业资源的适应性管理提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

渔业生态系统健康评价中, 鱼类资源密度来源于长江口(单秀娟等, 2016)和黄河口(未发表数据)水域鱼类资源密度增量的预估值, 其余变量来源于美国国家海洋大气管理局(NOAA)地球物理流体动力学实验室(Geophysical Fluid Dynamics Laboratory, GFDL)提供的不同气候变化情景下的预测值(<http://data1.gfdl.noaa.gov/>), 该预测值是耦合模式比较计划第五阶段(CMIP5)的新一代全球气候模式的模拟结果, 主要包括 pH、溶解氧、无机氮、活性磷酸盐、浮游植物、浮游动物、叶绿素浓度。以 2015–2050 年 36 年的数据构建灰色综合评价模型进行分析。

1.2 渔业生态系统健康评价指标体系

1.2.1 评价指标的选择 根据层次分析法原理, 将渔业生态系统健康作为目标层, 将区域的评价因子和评价指标分别作为准则层和指标层, 构建了包括渔业生态环境、渔业生物群落结构和渔业生态系统功能在内的 3 个子系统的递阶层次结构体系来反映渔业生态系统健康。综合考虑资料的科学性和可得性等, 并参考相关文献(杨建强等, 2003; 叶属峰等, 2007; 孙敏, 2012¹⁾), 共选择 8 个评价指标(表 1)。

1.2.2 权重的确定 选用层次分析法作为确定指标权重的主要方法, 层次分析法能够对定性结果进行量化分析, 也是应用最广泛的方法之一(李寇军等, 2007)。层次分析法需要首先建立递阶层级结构, 自上而下依次为目标层 A、准则层 B 和指标层 C。各层次具体判断矩阵构造方法如下: 在渔业生态系统健康的目标层 A 下, 以 C 为指标层, 构造 B 的判断矩阵; 以 B 为指标层, 构造 A 的判断矩阵。本研究中各矩阵的一致性指标(CI)均小于 0.1, 认为判断矩阵的一致性可以接受。最终, 利用层次分析法得到长江口和黄河口渔业生态系统健康评价的准则层和指标层权重值(表 1)。

表 1 长江口和黄河口渔业生态系统健康评价各指标权重
Tab.1 The weight of each index for fishery ecosystem health assessment in the Yangtze River estuary and Yellow River estuary

目标层 Target layer A	准则层 Criterion layer B	指标层 Index layer C	权重 Weight
长江口渔业 生态系统健康	生态环境 0.4905	pH	0.0918
		溶解氧	0.0918
		无机氮	0.1508
		活性磷酸盐	0.1538
	生物群落结构 0.3119	浮游植物丰度	0.1268
		浮游动物丰度	0.1268
		鱼类丰度	0.1205
		初级生产力	0.1376
黄河口渔业 生态系统健康	生态环境 0.2972	pH	0.0684
		溶解氧	0.0684
		无机氮	0.1095
		活性磷酸盐	0.1153
	生物群落结构 0.5390	浮游植物丰度	0.1415
		浮游动物丰度	0.1558
		鱼类丰度	0.1982
		初级生产力	0.1429
生态系统功能 0.1638			

1.2.3 综合评价模型 采用层次灰色综合评价模型, 首先将长江口和黄河口渔业生态系统的 n 个年份的 m 个评价指标按照不同指标属性的隶属函数进行数据的初值化处理, 建立属性指标值矩阵 x 。在最优向量 G 和最劣向量 B 的基础上计算灰色关联度, 然后假设第 j 个对象向量 X_j 以 u_j 从属于最优向量 G , 那么 X_j 即以 $(1-u_j)$ 从属于最劣向量 B 。为了建立系统的综合评判模型, 将经典最小二乘准则进行合理拓展, 提出目标函数:

$$\min \left\{ F(u) = \sum_{j=1}^n \left[(1-u_j) \gamma(X_j, G) \right]^2 + \left[u_j \gamma(X_j, B) \right]^2 \right\}$$

式中, u 为系统的最优解向量: $u=(u_1, u_2, u_3, \dots, u_n)$

由 $\frac{\partial F(u)}{\partial u_j} = 0$ 得

$$u_j = \frac{1}{1 + \left[\frac{\gamma(X_j, B)}{\gamma(X_j, G)} \right]^2} \quad j=1, 2, \dots, n$$

1) Sun M. Ecosystem health assessment and stress factor analysis on Zhuhai coastal marine areas. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [孙敏. 珠海近岸海域生态系统健康评价及胁迫因子分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]

利用层次灰色综合评价模型得到了第 j 个评价对象向量 X_j 从属于最优向量的程度, 即反映该评价对象的优劣程度, 从而根据 u_j 的大小对各个评价对象进行优次排序, 达到评判目的。

在渔业生态系统, 各指标具有不同的属性类型, 为了消除不同量纲的影响, 需要对灰关联属性指标值矩阵进行规格化处理, 即指标初值化。指标初始规格化处理之前, 需要对评价指标类型进行区分, 指标类型不同, 初值化处理方法也不同, 具体参考罗小明等 (1994)。根据模式评价指标对渔业生态系统健康评价的影响, 本研究选取的指标可分为三类:

第一类为“效益型指标”, 该指标取值越大, 对渔业生态系统健康越好, 如浮游植物丰度、浮游动物丰度、鱼类资源丰度、叶绿素浓度。

效益型指标权重的确定:

$$x_{ij} = \frac{x'_{ij} - \min x'_{ij}}{\max x'_{ij} - \min x'_{ij}}$$

式中, x'_{ij} 代表第 j 个年份在第 i 个指标下的属性值。

第二类为“成本型指标”, 该指标的取值越小, 对渔业生态系统健康越有利, 如无机氮和活性磷酸盐。

成本型指标权重的确定:

$$x_{ij} = \frac{\max x'_{ij} - x'_{ij}}{\max x'_{ij} - \min x'_{ij}}$$

第三类为“适当型指标”, 该类型指标有一定的最适范围, 其取值过低或过高, 均会对渔业生态系统产生不利影响, 如溶解氧和 pH。

适当型指标权重的确定:

$$x_{ij} = 1 - \frac{|x'_{ij} - y_i|}{\max |x'_{ij} - y_i|}$$

式中, x'_{ij} 代表第 j 个年份下第 i 个指标的属性值, y_i 为第 i 个指标的最适值。

pH 最适值采用《近岸海洋生态健康评价指南》(国家海洋局, 2005)河口及海湾生态系统水环境评价指标中的 I 类标准。

溶解氧计算公式参考杨建强等(2003)。

2 结果

2.1 长江口渔业生态系统

2015–2050 年, 长江口渔业生态系统健康水平均值以 RCP2.6 情景最高, 为 0.54, RCP6.0 和 RCP8.5 情景较为接近, 分别为 0.45 和 0.44(表 2), 这与 3 种情景的温室气体排放程度刚好相反(RCP2.6、RCP6.0

和 RCP8.5, 分别代表低、中和最高程度的温室气体排放情景)。在生态系统健康水平的离散程度方面, RCP2.6 和 RCP6.0 情景较高, 分别为 0.30 和 0.29, RCP8.5 情景最低, 为 0.24。

单因素方差分析(One-way ANOVA)发现, RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5 情景下长江口渔业生态系统健康水平存在显著差异($F=6.449, P=0.002$)。每 5 年作为 1 个时间单位, RCP2.6 情景下, 渔业生态系统健康水平呈现“高–低–高”的变化趋势, 评价值在 2020 年为 0.66, 之后呈下降趋势, 2035 年达到最低值, 仅为 2020 年的 42.4%, 之后有所回升, 2050 年基本恢复到 2020 年时的健康水平; RCP6.0 情景下, 呈现出“低–高–低”的变化趋势, 以 2040 年健康水平最高, 为 0.77, 其余年份多在 0.3–0.5 之间波动; RCP8.5 情景下, 健康水平波动性较 RCP2.6 和 RCP6.0 情景低, 2035 年取得最大值, 为 0.63, 其余年份的健康水平低于其他 2 个情景或者持平(图 1)。

若以 2050 年长江口渔业生态系统健康水平作为“最终状态”, RCP2.6 情景下的健康水平明显高于其他 2 个情景, 2050 年 RCP2.6 情景下渔业生态系统的健康评价值为 0.61, 分别是 RCP6.0 和 RCP8.5 情景下健康评价值的 1.9 倍和 1.8 倍。

2.2 黄河口渔业生态系统

黄河口渔业生态系统健康水平在 2015–2050 年的均值以 RCP2.6 情景最高, 为 0.49, RCP6.0 情景次之, 健康评价值为 0.48, RCP8.5 情景最低, 为 0.41, 这与长江口的变化趋势一致。在健康水平的离散程度方面, RCP8.5 情景最高, 波动性最大, 为 0.40, RCP2.6 情景次之, 为 0.38, RCP6.0 情景最低。

单因素方差分析显示, RCP2.6、RCP6.0 和 RCP8.5 情景下黄河口渔业生态系统健康水平不存在显著性差异($F=2.638, P>0.05$)。每 5 年作为 1 个时间单位, 黄河口渔业生态系统健康水平在 RCP2.6 情景下呈现出“高–低–高”的变化趋势, 评价值在 2020 年为 0.50, 随后下降, 2035 年达到最低值, 仅为 2020 年的 1/4 左右, 之后有所回升, 2050 年达到最大值; RCP6.0 情景下呈现“低–高–低”的变化趋势, 2030–2040 年健康水平较高, 其余年份评价值多在 0.4 以下; RCP8.5 情景下呈先升高后降低而后略有回升的趋势, 2020–2030 年其健康评价值逐渐升高, 2030 年达到 0.55, 2035 年和 2040 年迅速降低, 渔业生态系统健康评价值只有 2030 年的 1/3 左右, 2040–2050 年健康水平出现小幅升高(图 2)。

表 2 长江口和黄河口渔业生态系统健康评价

Tab.2 The statistic description of fishery ecosystem health assessment in Yangtze River estuary and Yellow River estuary

项目 Items		平均值 Mean value	中值 Mid-value	变异系数 Coefficient of variation	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value
长江口 Yangtze River estuary	RCP2.6	0.54	0.57	0.30	0.81	0.25
	RCP6.0	0.45	0.45	0.29	0.77	0.17
	RCP8.5	0.44	0.45	0.24	0.68	0.20
黄河口 Yellow River estuary	RCP2.6	0.49	0.51	0.38	0.85	0.12
	RCP6.0	0.48	0.45	0.34	0.83	0.24
	RCP8.5	0.41	0.40	0.40	0.81	0.16

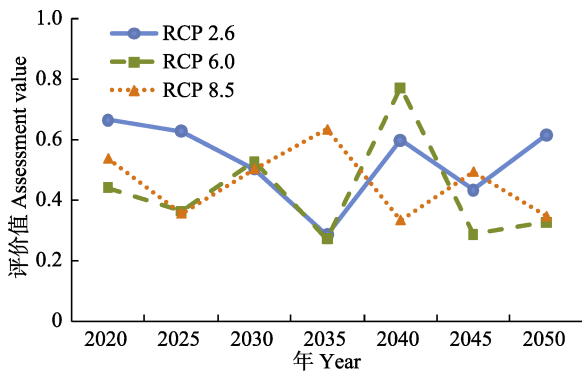


图 1 不同气候变化情景下长江口渔业生态系统健康水平
Fig.1 Projections of fishery ecosystem health assessment in Yangtze River estuary under climate change scenarios

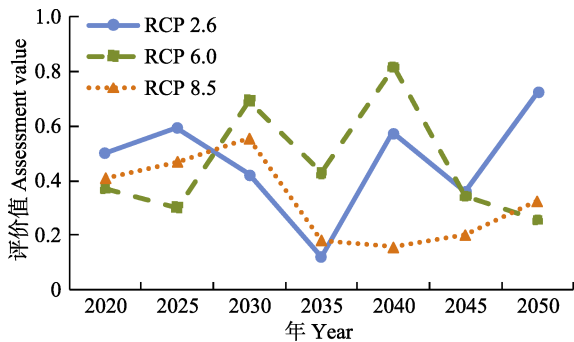


图 2 不同气候变化情景下黄河口渔业生态系统健康水平
Fig.2 Projections of fishery ecosystem health assessment in Yellow River estuary under climate change scenarios

黄河口水域若以 2050 年渔业生态系统健康水平作为“最终状态”，RCP2.6 情景下的健康水平明显高于其他 2 个情景，RCP2.6 情景下的健康评价价值分别是 RCP6.0 和 RCP8.5 情景的 2.8 倍和 2.2 倍。

3 讨论

渔业生态系统健康是维持渔业生物多样性，保证渔业生物生产的关键过程稳定持续的基础。气候变化通过对渔业生物多样性和分布产生影响，进而影响渔业生态系统的健康水平。不同气候变化情景对渔业

生态系统健康的潜在影响有所不同，在不考虑捕捞和污染等外界因素影响情况下，长江口和黄河口渔业生态系统健康水平随着温室气体排放程度的增加而降低，即 RCP2.6 情景下渔业生态系统的健康水平最高，其次是 RCP6.0 情景，RCP8.5 情景最低。在 RCP2.6 和 RCP8.5 情景下，长江口渔业生态系统的健康水平高于黄河口渔业生态系统的健康水平；黄河口渔业生态系统健康评价价值的离散程度高于长江口，但黄河口生态系统健康评价价值最大值要高于长江口渔业生态系统，并且 RCP2.6 和 RCP8.5 的健康评价最小值要低于长江口渔业生态系统。以上变化可能与两个河口的生态环境不同有关。长江口属于开放型河口，生态环境对气候变化的影响缓冲能力相对较高，进而基础生产力和渔业生物的变化较小，生态环境、群落结构及生态系统功能相对稳定，渔业生态系统健康水平较高，长江口渔业生态系统健康水平评价中，渔业生态环境子系统所占比重最高，生态环境权重为 0.4905，渔业生物群落结构子系统所占比例次之，这在其他海域的研究中也有类似发现(杨建强等, 2003; 叶属峰等, 2007); 而黄河口处于渤海内部，浮游生物、渔业生物种类和群落可迁移的范围较小，种类组成和群落结构演替迅速，导致生态系统的结构和功能发生变化，黄河口渔业生态系统健康评价指标体系中，渔业生物群落结构子系统占比重最高，渔业生态环境子系统占比重次之，渔业生态系统功能子系统最小。气候变化在河口渔业生态系统健康和功能中发挥了重要作用，近海渔业资源的适应性管理中，气候变化应作为一个重要因子考虑在内。

目前，国内外对于渔业生态系统健康评价多局限于评价指标的定性描述，尚未形成统一的理论体系和评价方法(杨建强等, 2003; Wazniak *et al*, 2003; Hershner *et al*, 2007; Platt *et al*, 2008; 李纯厚等, 2013)。本研究从环境表征因子、生物群落结构和生物群落功能三个方面出发，选择了 8 个指标，包含了效益型、成本型和适当型三种指标，从目标层、准则

层和指标层基本保证了指标覆盖的全面性,模型的评价结果需要长时间序列实测数据验证。但使用层次分析法进行指标权重确定时,指标个数较少容易导致权重系数偏大,使得权重更加明显地分布在个别指标上。因此,在进行渔业生态系统健康评价时,需要综合考虑评价指标的敏感性和可靠性(Hilty *et al*, 2000; Vassallo *et al*, 2006; Muniz *et al*, 2011),在指标选择、生态系统功能的完整性和可持续性等方面都需要进一步探讨和完善。

参 考 文 献

- Arévalo-Frías W, Mendoza-Carranza M. Influence of temporal and spatial factors on abundance and richness of fish early stages in shallow tropical estuaries. *Environmental Biology of Fishes*, 2015, 98(3): 891–904
- Chen YQ. Fisheries status in estuarine front zone of Changjiang river and adjacent waters. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1995, 2(1): 91–103 [陈渊泉. 长江口河口锋区及邻近水域渔业. *中国水产科学*, 1995, 2(1): 91–103]
- Dai X, Ma J, Zhang H, *et al*. Evaluation of ecosystem health for the coastal wetlands at the Yangtze Estuary, Shanghai. *Wetlands Ecology and Management*, 2013, 21(6): 433–445
- Dong FY. A preliminary prediction on the effects of the eastern route of water transferring project from Yangtze River on fisheries resources in Yangtze River estuary. *Resources and Environment in the Yangtze Valley*, 1997, 6(2): 168–172 [董方勇. 南水北调东线工程对长江口渔业资源的影响. *长江流域资源与环境*, 1997, 6(2): 168–172]
- Feyrer F, Newman K, Nobriga M, *et al*. Delta smelt habitat in the San Francisco Estuary: A reply to Manly, Fullerton, Hendrix, and Burnham's "comments on Feyrer *et al*. modeling the effects of future outflow on the abiotic habitat of an imperiled estuarine fish". *Estuaries and Coasts*, 2016, 39(1): 287–289
- Hershner C, Havens K, Bilkovic DM, *et al*. Assessment of Chesapeake Bay program selection and use of indicators. *Ecohealth*, 2007, 4(2): 187–193
- Hilty J, Merenlender A. Faunal indicator taxa selection for monitoring ecosystem health. *Biological Conservation*, 2000, 92(2): 185–197
- Jiang M, Shen XQ, Wang YL, *et al*. Species of fish eggs and larvae and distribution in Changjiang estuary and vicinity waters. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28(2): 171–174 [蒋玫, 沈新强, 王云龙, 等. 长江口及其邻近水域鱼卵、仔鱼的种类组成与分布特征. *海洋学报*, 2006, 28(2): 171–174]
- Jin X, Shan X, Li X, *et al*. Long-term changes in the fishery ecosystem structure of Laizhou Bay, China. *Science China Earth Sciences*, 2013, 56 (3): 366–374
- Jin XS, Shan XJ, Guo XW, *et al*. Community structure of fishery biology in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(9): 4761–4772 [金显仕, 单秀娟, 郭学武, 等. 长江口及其邻近海域渔业生物的群落结构特征. *生态学报*, 2009, 29(9): 4761–4772]
- Lercari D, Horta S, Martínez G, *et al*. A food web analysis of the Río de la Plata estuary and adjacent shelf ecosystem: Trophic structure, biomass flows, and the role of fisheries. *Hydrobiologia*, 2015, 742(1): 39–58
- Li CH, Lin L, Xu SN, *et al*. Establishment of integrated methodology for bay ecosystem health assessment and its application in Daya Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(6): 1798–1810 [李纯厚, 林琳, 徐姗楠, 等. 海湾生态系统健康评价方法构建及在大亚湾的应用. *生态学报*, 2013, 33(6): 1798–1810]
- Li JS, Cheng JH. Analysis on the dynamic of fishery biological resources on the fishing grounds of the Changjiang estuary. *Marine Fisheries*, 2005, 27(1): 33–37 [李建生, 程家骅. 长江口渔场渔业生物资源动态分析. *海洋渔业*, 2005, 27(1): 33–37]
- Li JS, Li SF, Ding FY, *et al*. Analysis on annual change of fish diversity in Yangtze estuary offshore water area. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(4): 637–643 [李建生, 李圣法, 丁峰元, 等. 长江口近海鱼类多样性的年际变化. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 637–643]
- Li JS, Li SF, Ren YP, *et al*. Seasonal variety of fishery biology community structure in fishing ground of the Yangtze estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(5): 432–439 [李建生, 李圣法, 任一平, 等. 长江口渔场渔业生物群落结构的季节变化. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 432–439]
- Li KJ, Qiu YS, Wang YZ. Influence of natural environment variation on fishery resources in Beibu Gulf. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(1): 7–13 [李冠军, 邱永松, 王跃中. 自然环境变动对北部湾渔业资源的影响. *南方水产科学*, 2007, 3(1): 7–13]
- Li XS, Yu ZH, Sun S, *et al*. Ecological niche breadth and niche overlap of dominant species of fish assemblage in Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8): 2353–2359 [李显森, 于振海, 孙珊, 等. 长江口及其毗邻海域鱼类群落优势种的生态位宽度与重叠. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2353–2359]
- Lin LS. Spatial distribution and environmental characteristics of *Harpodon nehereus* in the East China Sea region. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(1): 66–71 [林龙山. 东海区龙头鱼数量分布及其环境特征. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(1): 66–71]
- Liu Y, Cheng JH, Li SF. A study on the distribution of *Setipinna taty* in the East China Sea. *Marine Fisheries*, 2004, 26(4): 255–260 [刘勇, 程家骅, 李圣法. 东海区黄鲫数量分布特征的分析研究. *海洋渔业*, 2004, 26(4): 255–260]
- Luo XM, Yang HG. A model for grey comprehensive evaluation. *Journal of System Engineering and Electronics*, 1994, 16(9):

- 18–25 [罗小明, 杨惠鹤. 灰色综合评判模型. 系统工程与电子技术, 1994, 16(9): 18–25]
- Muniz P, Venturini N, Hutton M, *et al.* Ecosystem health of Montevideo coastal zone: A multi approach using some different benthic indicators to improve a ten-year-ago assessment. *Journal of Sea Research*, 2011, 65(1): 38–50
- Obaza A, Hoffman R, Clausing R. Long-term stability of eelgrass fish assemblages in two highly developed coastal estuaries. *Fisheries Management and Ecology*, 2015, 22(3): 224–238
- Pasquaud S, Vasconcelos RP, França S, *et al.* Worldwide patterns of fish biodiversity in estuaries: Effect of global vs. local factors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2015, 154: 122–128
- Platt T, Sathyendranath S. Ecological indicators for the pelagic zone of the ocean from remote sensing. *Remote Sensing of Environment*, 2008, 112(8): 3426–3436
- Ramos S, Amorim E, Elliott M. *et al.* Early life stages of fishes as indicators of estuarine ecosystem health. *Ecological Indicators*, 2012, 19(8): 172–183
- Ramos S, Cabral H, Elliott M. Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality? *Ecological Indicators*, 2015, 55: 74–85
- Samedy V, Wach M, Lobry J, *et al.* Hydroacoustics as a relevant tool to monitor fish dynamics in large estuaries. *Fisheries Research*, 2015, 172: 225–233
- Selleslagh J, Amara R. Are estuarine fish opportunistic feeders? The case of a low anthropized nursery ground (the Canche Estuary, France). *Estuaries and Coasts*, 2015, 38(1): 252–267
- Shan XJ, Chen YL, Jin XS, *et al.* Reshaping the distribution of fish abundance by climate change: A case study in the Yangtze River estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 1–15 [单秀娟, 陈云龙, 金显仕, 等. 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 1–15]
- Shan XJ, Jin XS. Diversity of fish community structure in the spring-time offshore waters at the Yangtze River estuary. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 32–40 [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]
- Shan XJ, Sun PF, Jin XS, *et al.* Long-term changes of fish assemblage structure in the Yellow River estuary ecosystem, China. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 2013, 5(1): 65–78
- Sheaves M, Johnston R, Connolly RM. Fish assemblages as indicators of estuary ecosystem health. *Wetlands Ecol Manage*, 2012, 20(6): 477–490
- State Oceanic Administration. HY/T 087-2005. Guidelines for coastal marine ecological health assessment. Beijing: China Standards Press, 2005 [国家海洋局. HY/T 087-2005. 近岸海洋生态健康评价指南. 北京: 中国标准出版社, 2005]
- Strydom NA. Patterns in larval fish diversity, abundance, and distribution in temperate South African estuaries. *Estuaries and Coasts*, 2015, 38(1): 268–284
- Sun PF, Dai FQ, Chen YL, *et al.* Seasonal variations in structure of fishery resource in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 8–16 [孙鹏飞, 戴芳群, 陈云龙, 等. 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 8–16]
- Vasconcelos RP, Henriques S, Franc S, *et al.* Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *Journal of Animal Ecology*, 2015, doi:10.1111/1365-2656.12372
- Vassallo P, Fabiano M, Vezzulli L, *et al.* Assessing the health of coastal marine ecosystems: A holistic approach based on sediment micro and meio-benthic measures. *Ecological Indicators*, 2006, 6(3): 525–542
- Wazniak C, Goshorn D, Hall M, *et al.* Maryland's coastal bays ecosystem health assessment. Annapolis, MD, USA: Maryland Department of Natural Resources, 2004: 1–7
- Whitfield AK. Why are there so few freshwater fish species in most estuaries? *Journal of Fish Biology*, 2015, doi:10.1111/jfb.12641
- Yang JQ, Cui WL, Zhang HL, *et al.* Marine ecosystem health structure and function index assessment in the west of Laizhou Bay. *Marine Science Bulletin*, 2003, 22(5): 58–63 [杨建强, 崔文林, 张洪亮, 等. 莱州湾西部海域海洋生态系统健康评价的结构功能指标法. 海洋通报, 2003, 22(5): 58–63]
- Ye SF, Liu X, Ding DW, *et al.* Ecosystem health assessment of the Changjiang River estuary: Indicator system and its primarily assessment. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4): 128–136 [叶属峰, 刘星, 丁德文, 等. 长江河口海域生态系统健康评价指标体系及其初步评价. 海洋学报, 2007, 29(4): 128–136]
- Zhong JS, Yu WW, Liu BL, *et al.* Seasonal occurrences of fish larvae and juveniles in the surf zone of the Yangtze River estuary. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, 14(4): 375–382 [钟俊生, 郁蔚文, 刘必林, 等. 长江口沿岸碎波带仔稚鱼种类组成和季节性变化. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 375–382]
- Zhou XW, Wang LP, Zheng BH. Studies on ecosystem health evaluation in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2011, 42(10): 1201–1208 [周晓蔚, 王丽萍, 郑丙辉. 长江口及毗邻海域生态系统健康评价研究. 水利学报, 2011, 42(10): 1201–1208]

Projecting Fishery Ecosystem Health Under Climate Change Scenarios: Yangtze River Estuary and Yellow River Estuary

SHAN Xiujuan^{1,2}, CHEN Yunlong^{1,3}, JIN Xianshi^{1,2}①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Estuaries are the unique ecosystem with variable environment and higher diet foundation, are the spawning grounds, feeding grounds and nursery grounds of many fishery species, which greatly contribute to the fisheries yields. So, estuary ecosystem health is critical to the sustainable recruitment of fishery species. In the present study, based on the projections of fish abundance increment distribution under three climate change scenarios (RCP2.6, RCP6.0 and RCP8.5) in the Yangtze River estuary and Yellow River estuary by the dynamic bioclimate envelope mode, the fishery ecosystem health in Yangtze River estuary and Yellow River estuary was evaluated by hierarchical grey comprehensive evaluation model. The health evaluation system in Yangtze River estuary and Yellow River estuary included environment, fishery community structure and ecosystem function and service. During 2015–2050, the highest health index was found in RCP2.6 scenario both in Yangtze River estuary and Yellow River estuary, and then was RCP6.0 scenario, the lowest health index was found in RCP8.5 scenario. The health level gradually decreased with the increase of greenhouse gas emission levels. The health index showed the “high-low-high” trend with time under RCP2.6 scenario both in Yangtze River estuary and Yellow River estuary; however, it was “low-high-low” trend under RCP6.0 scenario. Under RCP8.5 scenario, the amplitude of health index fluctuation was lower than those under the other scenarios, and there were some differences between two estuaries, the health indices showed a “low-high-low” changing trend in Yangtze River estuary, meanwhile, the health indices firstly increased, then decreased, finally showed a slight increase in Yellow River estuary. If the health index in 2050 was regarded as the final results, the health levels under RCP2.6 scenario were higher than those under the other scenarios in two estuaries. The health index under RCP2.6 scenario was 0.61 in Yangtze River estuary, and it was 1.9 times and 1.8 times for RCP6.0 and RCP8.5 scenarios, respectively. The health index under RCP2.6 scenario was 2.8 times and 2.2 times for RCP6.0 and RCP8.5 scenarios in Yellow River estuary, respectively.

Key words Yangtze River estuary; Yellow River estuary; Ecosystem health; Climate change scenarios

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

渤海中部海区水域夏季环境质量综合评价

徐勇^{1,2} 曲克明^{1①} 赵俊¹ 崔正国¹ 夏斌¹

(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. 中国海洋大学化学化工学院 青岛 266100)

摘要 基于 2012 年夏季渤海中部海域 21 个站点的调查数据,采用内梅罗(Nemerow)指数、富营养指数(ED)和潜在富营养化法对渤海中部海域水体环境质量现状进行了评价。内梅罗指数评价结果显示,对参与评价的酸碱度、溶解氧、无机氮、活性磷酸盐、化学耗氧量、石油类、重金属(Cu、Zn、Pb、Cd、Hg 和 As)等 12 项指标而言,表层、10 m 层、底层受污染站位比例分别为 57.1%、33.3%、23.8%。表层海水石油类浓度超标率为 57.1%,10 m 层水体超标率为 42.9%,底层水体超标率为 14.3%,石油类是主要污染因素。从分布位置看,受污染站位主要集中在调查区域的西南部,中部海域水质等级较高。海水环境质量呈现出由沿岸水域向中央海盆逐渐升高的趋势。渤海中部海域无明显富营养化状态,除表层 13 号站位外,表层、10 m 层、底层海水富营养状态指数法 EI 均小于 1,表现为贫营养级水平。绝大部分海域氮磷比值高于 Redfield 比值,但未呈现富营养化水平,无机氮浓度升高,活性磷酸盐浓度降低,渤海中部水域营养盐结构由氮限制向磷限制转变,已经开始转变成磷限制中度营养状态。

关键词 渤海中部;水质;环境质量评价;富营养化

中图分类号 S938 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0008-08

渤海为半封闭的陆架边缘海,面积为 $7.7 \times 10^4 \text{ km}^2$,平均水深为 18 m,包括辽东湾、渤海湾、莱州湾及中央海区(李淑媛等,1995)。沿岸黄河、海河、辽河、滦河等 40 余条河流携带大量淡水与营养盐汇入渤海。与此同时,也将沿河两岸大量的工农业废水、生活污水和有害物质带到了渤海,超过 36% 的中国大陆陆地污水排入渤海(Wang *et al.*, 2009),被认为是中国污染最严重的海洋区域之一(吴光红等,2007)。近年来,渤海的生态环境日趋恶化,渔业资源衰退,赤潮暴发次数增多,以致出现“荒漠化”警告。众多研究通过水体(于春艳等,2013;聂洪涛等,2008;秦昌波等,2006)、沉积物(林秀梅等,2005)、生物生态(许思思等,2011;杨小玲等,2006;Liu *et al.*, 2014)等不同途径来探讨渤海环境问题,但关于渤海中部区域水质环境质量综合评价的相关研究尚不多见(王伟伟等,2013)。

渤海中部为西向东倾斜的盆地,此海区既是渤海重要水产生物的洄游地,又是其越冬场,同时拥有丰富的油气、海砂等资源,在整个渤海生态环境中占有重要的地位。2011 年渤海蓬莱“19-3”油田发生溢油事故,导致油田周边及其西北部海域受到严重污染,其中劣四类严重污染海水面积达到 840 km^2 ,三、四类污染海域面积约 3400 km^2 。因此,开展这一区域水质状况的综合研究,不仅对于了解该受损海域的生态环境的变化状况有重要意义,并且可以为渤海生态环境的保护与修复提供依据。

1 调查区域与评价方法

1.1 调查区域

调查区域为渤海中部海域,具体位置为

* 农业部专项“渤海生态环境监测评估”(13-Q52201302)资助 [This work was supported by Special Project of Ministry of Agriculture (Monitoring and Evaluation on Bohai Sea Ecological Environment) (13-Q52201302)] 徐勇, E-mail: xuyong@ysfri.ac.cn

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

收稿日期:2015-10-21,收修改稿日期:2016-01-29

119.25°–120.50°E、38.0°–39.5°N 之间, 共设置监测点位 21 个, 监测点位置如图 1 所示。

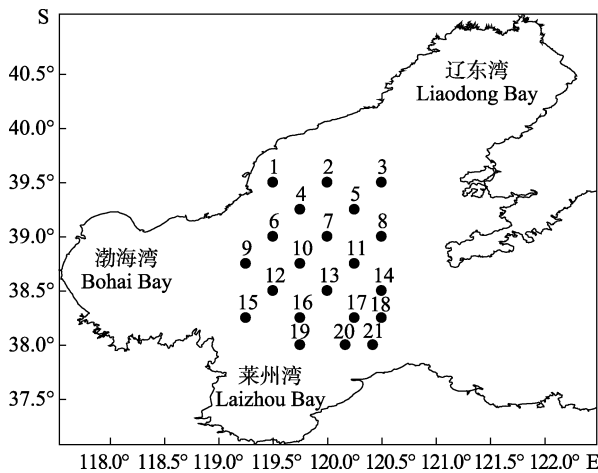


图 1 渤海中部海域调查站位

Fig.1 Surveyed sites in the central region of the Bohai Sea

1.2 样品采集与分析

2012 年 6 月对渤海中部 21 个站位进行取样, 每个站位分别取表层(0.5–1 m)、10 m 层、底层(离海底 2 m 处) 3 个层次的水样。样品采集与分析均严格按照《海洋监测规范》(GB17378-2007)相关方法进行。测定水体水温、盐度、溶解氧、pH、无机氮、活性磷酸盐、化学需氧量、重金属(Cu、Zn、Pb、Cd、Hg 和 As)、石油类含量。

1.3 评价方法

1.3.1 海水环境质量评价 利用内梅罗指数(Nemerow, 1974)评价方法对调查海域水体 12 个指标进行综合评价。此次调查主要研究蓬莱“19-3”油田溢油对渤海中部海域渔业生态环境的影响, 因而采用《海水水质标准》(GB3097-1997)中的二类标准作为水质评价标准, 其公式如下:

$$P = \sqrt{\frac{P_{max}^2 + P_{avg}^2}{2}}$$

式中, P 为内梅罗综合指数, P_{max} 、 P_{avg} 分别为单因子污染指数 P_i 的最大值与平均值。具体等级划分标准见表 1。

单因子污染指数(P_i)计算公式:

$$P_i = \frac{C_i}{S_i}$$

式中, C_i 为第 i 类污染物的实测质量浓度, S_i 为第 i 类污染物的评价标准, 均采用《海水水质标准》(GB3097-1997)中二类评价标准对水质状况进行评价。

其中, pH、溶解氧的单因子污染指数按下列公式进行计算:

$$pH: P_i = \frac{|pH_i - pH_{sm}|}{DS}$$

$$pH_{sm} = \frac{pH_{su} + pH_{sd}}{2}$$

$$DS = \frac{pH_{su} - pH_{sd}}{2}$$

式中, pH_i 、 pH_{su} 、 pH_{sd} 分别为海水 pH 的实测值、标准上限、标准下限。

溶解氧:

$$P_i = 0 \quad (\text{溶解氧} \geq 8 \text{ mg/L})$$

$$P_i = 1 - \frac{C_i - C_{oi}}{C_{oi}} \quad (\text{溶解氧 } 4\text{--}8 \text{ mg/L})$$

$$P_i = 1 + \frac{C_{oi} - C_i}{C_{oi}} \quad (\text{溶解氧} \leq 4 \text{ mg/L})$$

式中, C_i 为溶解氧含量实测值, $C_{oi}=5 \text{ mg/L}$ 。

1.3.2 海水富营养化评价 根据邹景忠等(1983)的营养状态指数法对海水富营养化程度进行评价, 公式如下:

$$EI = \frac{\text{COD}(\text{mg/L}) \times \text{DIN}(\text{mg/L}) \times \text{DIP}(\text{mg/L})}{4500} \times 10^6$$

EI、COD、DIN、DIP 分别代表营养指数、化学需氧量(mg/L)、无机氮含量(mg/L)、活性磷酸盐含量(mg/L)。当 $EI < 1$ 时, 水体低于富营养化水平; 当 $EI \geq 1$ 时, 表现为富营养化状态, 营养指数越大, 富营养化程度越高。同时, 利用郭卫东等(1998)的潜在性富营养化评价模式, 对富营养化情况进行分级。营养级划分原则见表 2。

2 结果与讨论

2.1 渤海中部海域海水质量评价

根据渤海中部水域溶解氧、营养盐、化学需氧量、重金属等 12 项指标测定结果, 并利用内梅罗指数法综合评价该水域环境质量状况。结果显示(表 3), 渤海中部海域表层水体中 5、15、21 号站位水质等级为 IV 级, 处于中度污染水平; 4、11—14、16、18、19、20 号站位水质等级均为 III 级, 处于轻度污染水平, 其他站位为较清洁及以上水平。10 m 层水体中 15 号站位水质等级为 IV 级, 即中度污染水平; 4、13、14、18、19、20 号 6 个站位水质等级为 III 级, 处于轻度污染水平, 其他站位均为 II 级或 I 级污染水平。对底层水体而言, 17 号站位水质等级为 V 级, 重度

表1 内梅罗污染指数划分水体污染等级

Tab.1 Water pollution degrees based on the Nemerow pollution index

污染水平 Pollution degree	清洁 I Clean	较清洁 II Relatively clean	轻度污染 III Mild pollution	中度污染 IV Moderate pollution	重度污染 V Severe pollution
<i>P</i>	$P \leq 0.6$	$0.6 < P \leq 1.0$	$1 < P \leq 2.6$	$2.6 < P \leq 5$	$P > 5$

表2 潜在性富营养化评价模式对营养级的划分

Tab.2 The classification of the nutrient level by using the potential eutrophication assessment model

等级 Level	营养级 Nutrient salt level	无机氮 IN ($\mu\text{g/L}$)	无机磷 IP ($\mu\text{g/L}$)	氮磷比 N/P
I	贫营养 Poor nutrient	<200	<30	8-30
II	中度营养 Medium nutrient	200-300	30-45	8-30
III	富营养 Rich nutrient	>300	>45	8-30
IV _P	磷限制中度营养 Medium nutrient with phosphorous limiting	200-300	/	>30
V _P	磷中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium phosphorous limiting	>300	/	30-60
VI _P	磷限制潜在性富营养 Potential eutrophication with phosphorous limiting	>300	/	>60
IV _N	氮限制中度营养 Medium nutrient with nitrogen limiting	/	30-45	<8
V _N	氮中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium nitrogen limiting	/	>45	4-8
VI _N	氮限制潜在性富营养 Potential eutrophication with nitrogen limiting	/	>45	<4

表3 内梅罗指数评价法水质评价结果

Tab.3 Evaluation results of the water quality by using the Nemerow pollution index

站位 Stations	表层水体 Surface water		10 m 层水体 10 m water		底层水体 Bottom water	
	<i>P</i>	等级 Pollution degree	<i>P</i>	等级 Pollution degree	<i>P</i>	等级 Pollution degree
1	0.38	I	0.31	I	0.31	I
2	0.36	I	0.52	I	0.38	I
3	0.32	I	0.33	I	0.62	II
4	1.83	III	1.15	III	0.49	I
5	2.99	IV	0.42	I	0.63	II
6	0.56	I	0.89	II	0.60	I
7	0.73	II	0.45	I	0.41	I
8	0.57	I	0.59	I	0.58	I
9	0.27	I	0.50	I	1.32	III
10	0.74	II	0.39	I	0.40	I
11	1.52	III	0.37	I	0.45	I
12	1.52	III	0.48	I	2.67	IV
13	2.43	III	2.08	III	0.51	I
14	1.84	III	2.39	III	1.67	III
15	2.82	IV	3.82	IV	0.54	I
16	1.30	III	0.27	I	0.30	I
17	0.87	II	1.97	II	5.48	V
18	1.17	III	2.39	III	0.41	I
19	1.17	III	2.03	III	0.85	II
20	2.04	III	2.42	III	2.66	IV
21	2.69	IV	0.57	I	0.56	I

污染水平, 12、20号站位水体为中度污染水平, 9、14号2个站位为轻度污染水平。由此可见, 渤海中部海域表层水体被污染站位数量占总调查站位的57.1%, 受污染的10 m层水体站位比例达到33.3%, 底层水体受污染比例为23.8%, 其中, 表层、10 m层、底层水体中重度污染站位比例分别为14.3%、4.8%、14.3%。

从污染站位分布来看, 渤海中部受污染区域主要位于渤海湾、莱州湾、辽东湾湾口位置, 越靠近中间海域, 污染越低。黄河、滦河、海河、辽河等40余条河流汇入渤海, 这些径流也将沿河的工农业废水、生活污水及其他有毒有害物质注入渤海, 因而导致海湾较近的站位污染程度较重。刘学海(2010)发现, 辽东湾北部10 m等深线内80%以上水域受重金属、无机氮污染, 河口附近水域无机氮和石油类严重超标。陆源输入、养殖业、船舶运输以及石油开发是渤海海域污染物的主要来源, 其中, 陆源污染物占渤海污染物来源的首位(王修林等, 2006)。

在所有污染物中, 污染贡献程度最高的是石油类(表4), 表层海水石油类浓度超标率(单因子污染指数

大于1)为57.1%, 10 m层、底层海水石油类超标率分别为42.9%、14.3%, 部分站位石油类含量甚至接近《海水水质标准》(GB3097-1997)三类标准。石油类高污染区域主要集中在调查区域的西南部, 这里不仅是黄河入海口, 而且紧邻莱州湾与渤海湾, 同时蓬莱“19-3”油田、渤中“34-2/4”油田也在该区域, 也是19-3油田溢油污染最为严重的区域, 因而在该调查区域石油类污染较为严重。王修林等(2006)研究发现, 渤海水体石油类含量超过二类海水水质标准的站位比例达34.2%, 其平均浓度居中国沿海海域之首。陆源输入是渤海石油类污染的主要来源, 所占比例为84%, 相对于陆源排放而言, 河流携带污染物所占比例达到67%, 高于渤海沿岸排污口输入量。

渤海为半封闭的浅海, 水体交换能力较弱, 且不同海域交换能力相差较大。莱州湾、渤海湾、辽东湾、中央海域的海水半交换期分别为0.5 a、300 d、3 a、1.5 a(魏皓等, 2002), 这也是蓬莱19-3油田附近海域海水污染较重的一个原因。因而, 在无外界环境因素改变的情况下, 蓬莱19-3油田溢油对其附近海域的影响还将持续较长时间。

表4 单因子污染指数计算结果

Tab.4 Evaluation results of the water quality by using single-factor contaminant index

站位 Station	表层水体 Surface water			10 m层水体 10 m water			底层水体 Bottom water		
	石油类 TPHs	范围 Range	平均值 Average	石油类 TPHs	范围 Range	平均值 Average	石油类 TPHs	范围 Range	平均值 Average
1	0.33	0-0.52	0.15	0.41	0-0.41	0.16	0.41	0-0.41	0.17
2	0.46	0-0.48	0.18	0.71	0-0.71	0.20	0.38	0.01-0.49	0.21
3	0.42	0-0.43	0.14	0.30	0-0.43	0.17	0.38	0.02-0.83	0.27
4	2.57	0-2.57	0.37	1.59	0.02-1.59	0.30	0.23	0-0.65	0.23
5	4.20	0-4.20	0.52	0.48	0-0.52	0.28	0.35	0-0.83	0.34
6	0.28	0-0.74	0.30	1.21	0.01-1.21	0.34	0.23	0-0.80	0.28
7	1.00	0-1.00	0.25	0.50	0-0.58	0.25	0.33	0-0.54	0.22
8	0.78	0-0.78	0.20	0.77	0.01-0.77	0.30	0.74	0-0.78	0.26
9	0.28	0-0.34	0.18	0.19	0-0.69	0.17	1.82	0-1.82	0.37
10	1.01	0-1.01	0.27	0.21	0-0.50	0.22	0.38	0-0.51	0.25
11	2.11	0-2.11	0.41	0.34	0-0.49	0.17	0.61	0-0.61	0.17
12	2.11	0-2.11	0.38	0.33	0-0.64	0.22	0.23	0-3.74	0.48
13	2.19	0-3.38	0.62	2.89	0-2.89	0.50	0.67	0-0.67	0.26
14	2.54	0-2.54	0.58	3.35	0-3.35	0.45	2.32	0-2.32	0.47
15	0.46	0-3.94	0.56	5.36	0.02-5.36	0.67	0.71	0-0.71	0.27
16	1.80	0-1.80	0.34	0.26	0-0.36	0.12	0.20	0-0.39	0.15
17	0.29	0-1.16	0.41	2.74	0-2.74	0.51	0.44	0-7.69	0.99
18	1.61	0-1.61	0.38	3.35	0-3.35	0.47	0.29	0-0.55	0.17
19	0.42	0-1.62	0.32	2.82	0.05-2.82	0.55	0.83	0-1.10	0.47
20	2.86	0-2.86	0.44	3.35	0.01-3.35	0.68	3.71	0-3.71	0.67
21	3.75	0-3.75	0.58	0.70	0-0.74	0.31	0.39	0-0.71	0.36

2.2 渤海中部水体富营养化程度评价

渤海中部海域表层 13 号站位水体 $EI > 1$, 呈现富营养化状态; 10 m 层、底层水体中所有站位 $EI < 1$, 即未表现出富营养化水平。从各层平均富营养化指数来看, 表层 > 10 m 层 > 底层, 表层水体比 10 m 层、底层更容易出现富营养化。从整个调查区域来看, 氮、磷营养盐含量较低, 未表现出明显富营养化。渤海自身的水动力输运特征形成的湍流扩散及对流迁移(王修林等, 2006), 会将径流输入占主导地位的化学需氧量、营养盐等陆源性富营养化物质固定在近岸海域, 难以到达渤海中央海盆地区, 从而导致渤海水体的富营养化指数自沿岸、河口区域向中部水域递减的分布特征。魏皓等(2003)通过对渤海浮游植物生物量变化的分析发现, 陆源输入只会影响局部水域营养盐含量, 沿岸水域的富营养化将消耗大量的营养盐, 从而使中部海域水质保持良好。

表 5 渤海中部水体潜在性富营养化评价结果

Tab.5 Assessment results of the potential eutrophication of waters in the central region of the Bohai Sea

站 Stations	富营养化指数 Eutrophication index		
	表层水体 Surface water	10 m 层水体 10 m water	底层水体 Bottom water
1	0.03	0.12	0.22
2	0.10	0.16	0.16
3	0.01	0.05	0.08
4	0.16	0.08	0.16
5	0.27	0.24	0.14
6	0.46	0.23	0.06
7	0.08	0.07	0.12
8	0.02	0.18	0.08
9	0.17	0.37	0.20
10	0.38	0.14	0.18
11	0.22	0.14	0.02
12	0.15	0.25	0.35
13	2.78	0.27	0.20
14	0.27	0.07	0.04
15	0.19	0.34	0.12
16	0.22	0.03	0.11
17	0.40	0.09	0.09
18	0.24	0.17	0.06
19	0.21	0.38	0.40
20	0.14	0.24	0.25
21	0.29	0.61	0.85
平均值 Average	0.32	0.20	0.19

2.3 渤海中部海域潜在性富营养化评价

因水体中营养盐的限制, 必然有一部分氮或磷相对过剩。理论上, 过剩的氮或磷会促使水域营养化程度上升, 从而表现为富营养化水平。然而, 研究发现, 浮游植物并不能完全吸收这些过剩的氮、磷元素。因此, 营养盐的过剩可以认为是形成水体富营养化的必要而不充分条件, 郭卫东等(1998)将这种现象称为潜在性富营养化。当水体中氮磷比值接近 Redfield 值 ($N/P=16$) (Redfield, 1958) 时, 其才成为富营养化形成的必要条件。评价结果(表 6)表明, 渤海中部海域 13 号站位为氮限制潜在性富营养, 4、13-15、19-21 号 7 个站位处于磷限制中度营养状态, 其余表层海水大多都处于贫营养状态。10 m 层水域 4、5、7、17-19、21 号 7 个站位为磷限制中度营养状态, 底层水域中 4-6、15、18、20 号 6 个站位为磷限制中度营养状态, 其他站位均为贫营养状态。渤海中部海域只有 1 个站位表层水体呈氮限制潜在性富营养, 与 20 世纪 90 年代相比(于志刚等, 2000), 氮限制的状况正在逐步改变。

N/P 值作为海水营养盐结构的重要指标, 通常以 Redfield 值为开阔海区的适宜值。20 世纪 60-80 年代中期, 渤海水体 N/P 值维持在 3 左右; 20 世纪 90 年代中期, N/P 值虽然逐渐增加但仍低于 Redfield 比值(王修林等, 2006)。随着渤海中无机氮含量的增加, N/P 值开始快速升高并超过 Redfield 值, 呈现出磷限制。本研究发现, 渤海中部海域表层 N/P 平均值为 24, 10 m 层与底层 N/P 平均值分别为 24 和 21, 这也印证了渤海中部海域的 N/P 值近 20 年来呈不断上升的趋势(于志刚等, 2000), 其主要由无机氮的升高所致。近 20 年(1982-1999 年)来, 渤海中部水域氮、磷、硅酸盐浓度均发生了显著变化, 无机氮浓度升高, 硅酸盐、活性磷酸盐浓度降低, 从而导致氮磷比值升高, 硅氮比值下降(于志刚等, 2000)。渤海中部海域营养盐结构, 正从氮限制改变为硅酸盐、磷限制。虽然调查区域表现为磷限制中度营养状态的站位比例较低, 但也证明了这一趋势。

3 结论

通过内梅罗指数法对渤海中部海域水环境质量进行综合评价发现, 表层、10 m 层、底层受污染站位比例分别为 57.1%、33.3%、23.8%, 石油类污染是主要因素。从分布位置看, 受污染站位主要集中在调查区域的西南部, 中部海域水质等级较高。蓬莱“19-3”油田附近海域水体污染等级较高, 石油类污染为其主要污染因素。整体上, 海水环境质量呈现由沿岸水域

表 6 渤海中部水体氮磷比评价结果

Tab.6 Assessment results of the N/P ratio of waters in the central region of the Bohai Sea

站位 Stations	表层水体 Surface water			10 m 层水体 10 m water			底层水体 Bottom water		
	氮磷比 N/P	等级	Pollution degree	氮磷比 N/P	等级	Pollution degree	氮磷比 N/P	等级	Pollution degree
1	13		I	24		I	22		I
2	16		I	19		I	12		I
3	5		I	15		I	25		I
4	31		IV _P	41		IV _P	31		IV _P
5	21		I	47		IV _P	42		VI _N
6	9		I	16		I	3		VI _N
7	28		I	40		IV _P	16		I
8	7		I	8		I	9		I
9	18		I	9		I	26		I
10	14		I	9		I	19		I
11	9		I	14		I	1		I
12	30		I	11		I	18		I
13	3		VI _N	12		I	13		I
14	46		IV _P	39		IV	15		I
15	40		IV _P	21		I	32		IV _P
16	10		I	6		I	13		I
17	18		I	32		IV _P	22		I
18	28		I	35		IV _P	32		IV _P
19	49		IV _P	35		IV _P	26		I
20	46		IV _P	29		I	34		IV _P
21	58		IV _P	37		IV _P	25		I
平均值 Average	24		I	24		I	21		I

向中央海盆逐渐降低的趋势。

渤海中部海域无明显富营养化, 除表层 13 号站位外, 表层、10 m 层、底层海水富营养状态指数 EI 均小于 1。各层平均营养状态指数来看, 表层>10 m 层>底层, 表层水体更容易出现富营养化。

绝大部分海域氮磷比值高于 Redfield 比值, 处于贫营养级。渤海中部海域氮限制的状况正在逐步改变, 活性磷由供给充分演变为磷限制的临界, 其营养盐结构已经开始转变成磷限制中度营养状态。

参 考 文 献

- Guo WD, Zhang XM, Yang YP, *et al.* Potential eutrophication assessment for Chinese coastal waters. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(1): 64-70 [郭卫东, 章小明, 杨逸萍, 等. 中国近岸海域潜在性富营养化程度的评价. 台湾海峡, 1998, 17(1): 64-70]
- Li SY, Miao FM, Liu GX, *et al.* A preliminary study on the environmental background values of heavy metals in the sediments of Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 1995, 17(2): 78-85 [李淑媛, 苗丰民, 刘国贤, 等. 渤海底质重金属环境背景值初步研究. 海洋学报, 1995, 17(2): 78-85]
- Lin XM, Liu WX, Chen JL, *et al.* Distribution and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from Bohai Sea, China. *Acta Science Circumstantiae*, 2005, 25(1): 70-75 [林秀梅, 刘文新, 陈江麟, 等. 渤海表层沉积物中多环芳烃的分布与生态风险评估. 环境科学学报, 2005, 25(1): 70-75]
- Liu JH, Cao L, Huang W, *et al.* Zinc and copper bioaccumulation in fish from Laizhou Bay, the Bohai Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(3): 491-502
- Liu XH. Analysis on environment situation of coastal areas of Bohai Sea. *Environmental Protection Science*, 2010, 36(1): 14-18 [渤海近岸水域环境污染状况分析. 环境保护科学, 2010, 36(1): 14-18]
- Nemerow NL. *Scientific stream pollution analysis*. Mc Graw Hill, 1974
- Nie HT, Tao JH. Impact of coastal exploitation on the eco-environment of Bohai Bay. *Ocean Engineering*, 2008, 26(3): 44-50 [聂红涛, 陶建华. 渤海湾海岸带开发对近海水环境影响分析. 海洋工程, 2008, 26(3): 44-50]
- Qin CB, Zheng BH, Qin YW, *et al.* Gray correlation assessment

- of water environment quality for Tianjin coastal zone in Bohai Bay. *Research of Environment Science*, 2006, 19(6): 94–99 [秦昌波, 郑丙辉, 秦延文, 等. 渤海湾天津段海岸带水环境质量灰色关联度评价. *环境科学研究*, 2006, 19(6): 94–99]
- Redfield AC. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 1958, 46: 561–600
- Sea water quality standard(GB3097-1997). Beijing: China Environmental Science Press, 1997 [海水水质标准(GB3097-1997). 北京: 环境科学出版社, 1997]
- Specification for Marine Monitoring(GB17378.4-2007). Beijing: China Standards Press, 2000 [海洋监测规范(GB17378.4-2007). 北京: 中国标准出版社, 2000]
- Wang WW, Fu YB, Li ST, *et al.* Distribution on surface sediment and sedimentary divisions in the middle part of Bohai Sea. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2013, 31(3): 478–490 [王伟伟, 付元宾, 李树同, 等. 渤海中部表层沉积物分布特征与粒度分区. *沉积学报*, 2013, 31(3): 478–490]
- Wang XL, Cui ZG, Guo Q, *et al.* Distribution of nutrients and eutrophication assessment in the Bohai Sea of China. *Chinese Journal of Oceanography and Limnology*, 2009, 27(1): 177–183
- Wang XL, Li KQ. Marine environmental capacity of pollutants in Bohai Sea. Beijing: Science Press, 2006 [王修林, 李克强. 渤海主要化学污染物海洋环境容量. 北京: 科学出版社, 2006]
- Wei H, Tian T, Zhou F, *et al.* Numerical study on the water exchange of the Bohai Sea: Simulation of the half-life time by dispersion model. *Journal of Ocean University of Qingdao (Natural Science Edition)*, 2002, 32(4): 519–525 [魏皓, 田恬, 周锋, 等. 渤海水交换周期的数值研究——水质模型对半交换时间的模拟. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2002, 32(4): 519–525]
- Wei H, Zhao L, Yu ZG, *et al.* Variation of the phytoplankton biomass in the Bohai Sea. *Journal of Ocean University of Qingdao (Natural Science Edition)*, 2003, 33(2): 173–179 [魏皓, 赵亮, 于志刚, 等. 渤海浮游植物生物量时空变化初析. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2003, 33(2): 173–179]
- Wu GH, Li WQ, Zheng HQ. Water pollution characteristics in Tianjin sea area of the Chinese Bohai Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(2): 143–149 [吴光红, 李万庆, 郑洪起. 渤海天津近岸海域水污染特征分析. *海洋学报*, 2007, 29(2): 143–149]
- Xu SS, Song JM, LI XG, *et al.* Modeling of fishing effects on fishery resources and ecosystems of the Bohai Sea. *Resources Science*, 2011, 33(6): 1153–1162 [许思思, 宋金明, 李学刚, 等. 渔业捕捞对渤海渔业资源及生态系统影响的模型研究. *资源科学*, 2011, 33(6): 1153–1162]
- Yang XL, Yang RQ, Jiang GB, *et al.* Using *Mytilus edulis* and *Perna viridis* as bioindicators to monitor butyltins pollution along the Bohai coastal sites. *Environmental Chemistry*, 2006, 25(1): 88–91 [杨小玲, 杨瑞强, 江桂斌, 等. 牡蛎作为生物指示物监测渤海近岸水体中的丁基锡污染物. *环境化学*, 2006, 25(1): 88–91]
- Yu CY, Liang B, Bao CG, *et al.* Study on eutrophication status and trend in Bohai Sea. *Marine Environment Science*, 2013, 32(2): 175–177 [于春艳, 梁斌, 鲍晨光, 等. 渤海富营养化现状及趋势研究. *海洋环境科学*, 2013, 32(2): 175–177]
- Yu ZG, Mi TZ, Xie DB, *et al.* Changes of the environmental parameters and their relationship in recent twenty years in the Bohai Sea. *Marine Environment Science*, 2000, 19(1): 15–19 [于志刚, 米铁柱, 谢宝东, 等. 二十年来渤海生态环境参数的演化和相互关系. *海洋环境科学*, 2000, 19(1): 15–19]
- Zou JZ, Dong LP, Qin BP. Preliminary discussion on eutrophication and red tide problem in Bohai Bay. *Marine Environmental Science*, 1983(2): 41–55 [邹景忠, 董丽萍, 秦保平. 渤海湾富营养化和赤潮问题的初步探讨. *海洋环境科学*, 1983(2): 41–55]

(编辑 冯小花)

Assessment of Environmental Water Quality in the Central Region of the Bohai Sea in Summer

XU Yong^{1,2}, QU Keming^{1①}, ZHAO Jun¹, CUI Zhengguo¹, XIA Bin¹

(1. *Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Province Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;*

2. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100)*

Abstract Based on the investigation data from 21 sampling stations in the central region of the Bohai Sea in 2012, and by using Nemerow index, eutrophication index (EI), and potential eutrophication assessment model, an assessment was conducted on the environmental quality of water body in the Bohai Sea area. According to the Nemerow index assessment on the 12 indicators including pH, dissolved oxygen (DO), dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved inorganic phosphorous (DIP), chemical oxygen demand (COD), total petroleum hydrocarbons (TPHs), Cu, Zn, Pb, Cd, Hg, and As, 57.1% of the surface water quality was at slight pollution level or more serious pollution level, 33.3% of the ten meter water quality was at slight and moderate pollution level, 23.8% of the bottom water quality was at slight or more serious pollution level. TPHs was the most important factor in all the contamination factors. Among the 21 surface sea water samples, 12 (corresponding to 57.1%) were above the second marine water quality standards when evaluated with single factor index method. The standard-exceeding rates of ten-meter water and bottom water were 42.9% and 14.3% respectively. The polluted area was located in the southeast of survey area, next to the Bohai Bay and the Laizhou Bay. The horizontal distribution of sea water quality showed an increasing trend from the coastal area to the middle area. The sea water EI value of the central region of the Bohai Sea except 13 stations in the surface water was less than 1, the results showed that most of the seawater quality in the investigated area was at the poorly eutrophication level. The ratios of N/P in most of the sea water were much higher than Redfield ratios, and the situation of nitrogen limiting in the central Bohai Sea was gradually changing to that of relative lack of phosphate. The nutrients structure has changed into potential eutrophication of phosphorus limiting.

Key words Central region of Bohai Sea; Water quality; Environmental quality assessment; Eutrophication

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

黄河口附近海域表层沉积物重金属污染 状况及年际变化分析*



胡琴¹ 李强¹ 黄必桂¹ 曲亮² 曹静¹

(1. 中海油研究总院 北京 100028; 2. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033)

摘要 根据 2006–2014 年共 5 个航次在黄河口附近海域采集的 150 个调查站位的表层沉积物样品的监测结果,对沉积物中 Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 共 7 种重金属元素的含量及年际变化趋势进行了分析,采用单因子标准指数法和潜在生态风险指数法对重金属污染状况和潜在生态风险程度进行了评价。结果显示,7 种重金属的含量除 2011 年少数调查站位的 Cu 和 Pb 超过第一类标准外,其他调查站位的重金属含量均符合海洋沉积物质量第一类标准。重金属 Hg 和 Cd 的含量相当,其含量明显低于其他 5 种重金属元素。7 种重金属含量的年际变化有所不同,年平均单因子标准指数均小于 1,表明调查海域表层沉积物质量状况良好。7 种重金属元素的年平均单因子标准指数排序为 Cu>Cr>As>Pb>Cd>Hg>Zn; 其中, Cu 的标准指数值较高,近 10 年来其标准指数均值达 0.61,应引起重视并加强例行监测;其他 6 种重金属元素的单因子标准指数均值均小于 0.4。潜在生态风险评价结果显示,各航次 7 种重金属的平均潜在生态风险系数 E_r^i 均小于 40,属于低生态风险水平;7 种重金属近 10 年平均 E_r^i 排序为 Hg>Cd>As>Pb>Cu>Cr>Zn; 其中, Hg 是该调查海域的主要潜在生态风险因子。综合潜在生态风险指数 RI 的年际变化范围为 32.18–53.12,属于低生态风险水平;RI 的年际变化趋势基本表现为先升高后降低、然后略微上升的趋势。

关键词 黄河口; 表层沉积物; 重金属; 污染; 年际变化

中图分类号 X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0016-08

重金属是近海环境中最主要的污染物之一,已成为国内外海洋环境科学研究的主要热点之一(周笑白等, 2015; 刘宏伟等, 2015; 密蓓蓓等, 2013; 张勇等, 2012; Nobi *et al*, 2010)。重金属污染物具有来源广、残毒时间长、易二次污染、可沿食物链转移等特性,对水生生物和人体健康产生很大的危害。进入海洋的重金属绝大部分富集在海底沉积物中,因此,沉积物被认为是海洋环境中重金属最终的蓄积地,而河口和近海为重金属污染物的主要宿地(郑懿珉等, 2015)。

黄河口位于渤海湾与莱州湾交汇处,其附近海域是黄、渤海多种经济鱼虾类的主要产卵场、孵幼场和

索饵场(夏斌等, 2009)。黄河每年携带大量的颗粒物、重金属、营养盐和有机物质等入海,一方面为黄河口附近海域创造了适宜于海洋生物生长的良好生态环境,但另一方面,重金属和其他污染物也极大威胁着黄河口附近海域渔业资源发展和生态环境安全。根据国家海洋局公布的 2014 年中国海洋环境状况公报,2014 年黄河携带入海的重金属就多达 386 t。因此,开展本海域沉积物中重金属的污染状况等研究已成为目前海洋环境科学领域的重要任务之一。

近年来,对黄河口重金属研究大都局限在黄河口滨海湿地、潮间带、河口段以及莱州湾等海域(刘志杰

* 中海石油(中国)有限公司科技项目(YXKY-2016-ZY-07)资助 [This work was supported by Science and Technology Project of China National Offshore Oil Corporation (YXKY-2016-ZY-07)].

① 通讯作者: 胡琴, 工程师, E-mail: huqin7321@163.com

收稿日期: 2016-02-22, 收修改稿日期: 2016-04-01

等, 2012; 刘淑民等, 2012; 吴斌等, 2013; 罗先香等, 2010、2011), 对黄河口附近海域重金属的研究较少, 且对其年际变化等的研究鲜有报道。为此, 本研究根据 2006–2014 年 5 个航次共计 150 个调查站位的重金属监测数据, 对黄河口附近海域近 10 年来表层沉积物重金属的污染状况及年际变化趋势进行分析评价, 为及时掌握黄河口附近海域的生态环境质量, 更好地保护黄河口附近海域生态环境提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 调查站位与时间

本研究在黄河口附近海域分别于 2006 年 10 月、2009 年 12 月、2011 年 9 月、2013 年 9 月和 2014 年 10 月共计 5 个航次采集了 150 个调查站位的表层沉积物样品, 其中, 5 个航次沉积物调查站位数分别为 12、36、33、35 和 34 个。5 个航次调查站位覆盖范围在 $37^{\circ}27'–38^{\circ}28'N$ 、 $119^{\circ}0'–120^{\circ}7'E$ 之间; 调查海域水深在 1–26 m 之间。调查站位布设见图 1。

1.2 调查项目与分析方法

调查项目包括总汞(Hg)、铜(Cu)、铅(Pb)、镉(Cd)、铬(Cr)、锌(Zn)和砷(As)等。

本研究各航次均采用曙光型采泥器采集沉积物

表层样, 样品的采集、贮存、预处理和分析方法等均按照《海洋监测规范》(GB17378-2007)中所规定的要求执行; 5 个航次所有样品的调查采样和监测分析均出自同一实验室。供测定重金属 Cu、Pb、Cr、Zn、Cr 和 As 的沉积物湿样转到洗净并编号的瓷蒸发皿中, 置于 $80–100^{\circ}C$ 烘箱内烘干, 研磨、过筛后待分析; 供测定重金属 Hg 的沉积物取湿样待分析。其中, Pb、Cu、Cd 和 Cr 用无火焰原子吸收分光光度法测定, 其检出限分别为 1×10^{-6} 、 0.5×10^{-6} 、 0.04×10^{-6} 和 2×10^{-6} ; Zn 用火焰原子吸收分光光度法测定, 其检出限为 6×10^{-6} ; As 和 Hg 用原子荧光法测定, 其检出限分别为 0.06×10^{-6} 和 0.002×10^{-6} 。

1.3 评价方法与评价等级

目前, 国内外关于沉积物重金属评价方法主要有单因子标准指数法、综合指数法、修正综合指数法、地累积指数法、污染负荷指数法、回归过量分析法、潜在生态风险指数法和底栖生物评价方法等(胡益峰等, 2012)。本研究首先采用单因子标准指数评价法对调查海域重金属的含量状况进行分析评价, 然后采用国内外沉积物质量评价中应用最为广泛的潜在生态风险指数法对调查海域重金属的潜在污染状况进行分析评价。

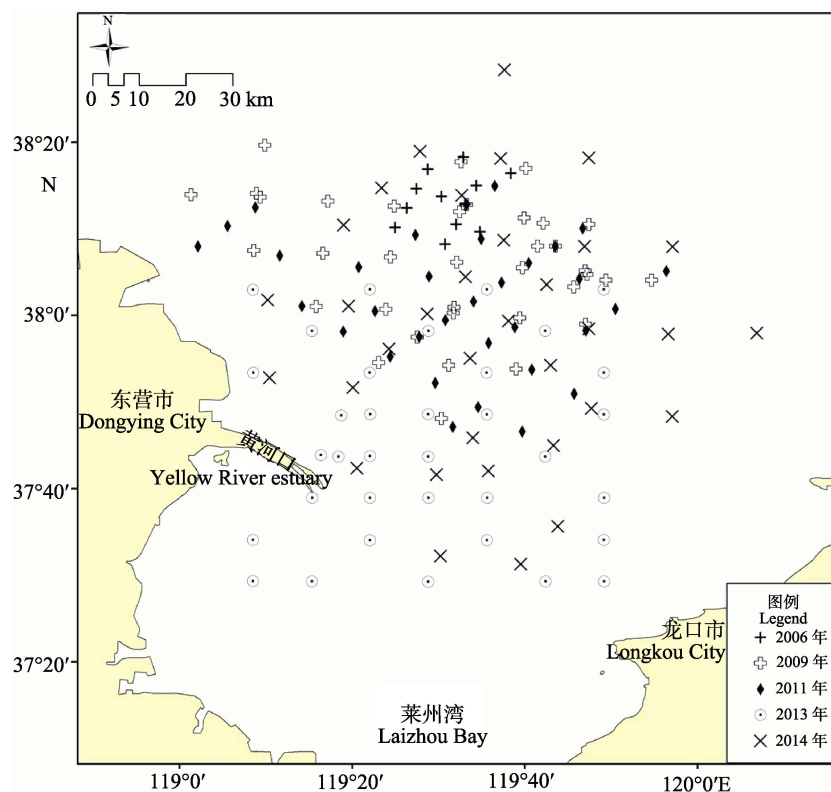


图 1 5 个航次调查站位分布

Fig.1 Distribution of survey stations in five cruises

1.3.1 重金属含量单因子标准指数评价 根据《海洋沉积物质量》(GB18668-2002)中第一类标准值,调查海域表层沉积物重金属的质量状况采用单因子标准指数法进行评价,其计算公式为:

$$I_i = C_i / S_i$$

式中, I_i 为第 i 种重金属的标准指数, C_i 为第 i 种重金属的实测值, S_i 为第 i 种重金属的第一类标准值。当 $I_i \leq 1$ 时,符合标准;当 $I_i > 1$ 时,含量超标。其中,海洋沉积物质量第一类标准值: $Hg \leq 0.20 \times 10^{-6}$, $Cu \leq 35.0 \times 10^{-6}$, $Pb \leq 60.0 \times 10^{-6}$, $Cd \leq 0.50 \times 10^{-6}$, $Zn \leq 150.0 \times 10^{-6}$, $Cr \leq 80.0 \times 10^{-6}$, $As \leq 20.0 \times 10^{-6}$ 。

1.3.2 重金属的潜在生态风险指数评价 Hakanson (1980)提出的重金属潜在生态风险指数评价法是一套应用沉积学原理评价重金属污染及生态危害的方法,是国内外沉积物质量评价中应用最为广泛的方法之一(柴小平等, 2015; 陈燕等, 2014; 刘明等, 2012; 刘宏伟等, 2015)。该方法通过分析沉积物中不同重金属污染物的释放能力和生物毒性强度,将沉积物中污染物的含量折算为生物毒性风险。当多种重金属共存时,采取加和的方式来衡量重金属的生物毒性。

定义单个重金属潜在生态风险系数为:

$$E_r^i = T_r^i \times C_f^i = T_r^i \times C^i / C_n^i$$

式中, E_r^i 为重金属 i 潜在生态风险系数; T_r^i 为重金属 i 的毒性响应系数,用于反映重金属 i 的毒性水平和生物对污染物的敏感程度; C_f^i 为重金属 i 的污染系数; C^i 为重金属 i 的实测浓度; C_n^i 为重金属 i 的背景参考值。在计算 Hakanson 潜在生态风险指数时,一般以全球工业化以前沉积物中重金属含量为背景值,但受地质条件、水文状况、生物活动等多种因素的影响,重金属背景值往往具有很强的区域性,如在评价时仍以前者作为参照,往往会使判断结果出现较大的偏差(乔永民等, 2010)。因此,本研究采用中国海岸带和海涂资源综合调查专业报告集(全国海岸带办公室环境质量调查报告编写组, 1989)和山东省海岸带和海涂资源综合调查报告黄河口区(山东省科学技术委员会, 1990)的背景值为参考值(表 1); E_r^i 的等级划分见表 2。

表 1 沉积物中重金属的毒性系数和背景参考值

Tab.1 Toxicity coefficients and background values of heavy metals in the sediments

项目 Items	Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As
T_r^i	40	5	5	30	2	1	10
$C_n^i (\times 10^{-6})$	0.125	30	21.5	0.5	54.7	80	15

定义多种重金属总的潜在生态风险指数为:

$$RI = \sum_{i=1}^7 E_r^i$$

式中, RI 为重金属污染物的综合潜在风险指数。

由于 Hakanson(1980)提出的生态风险指数法所包括的监测项目包括 PCB(多氯联苯)、Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 共 8 种。而本研究未考虑 PCB,主要针对 7 种重金属进行分析评价,因此,需要对 Hakanson 提出的综合潜在风险指数值 RI 范围进行调整(马德毅等, 2003; 刘成等, 2002)。单个重金属潜在生态风险系数 E_r^i 和调整后的综合潜在风险指数 RI 值所对应的污染评价等级划分见表 2。

2 结果与讨论

2.1 重金属含量分析

本研究对 5 个调查航次的表层沉积物重金属的监测结果见表 3。由表 3 可知, 2006–2014 年黄河口附近海域表层沉积物重金属 Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 的含量变化范围分别为 $(0.019-0.188) \times 10^{-6}$ 、 $(5.7-43.7) \times 10^{-6}$ 、 $(7.9-86.1) \times 10^{-6}$ 、 $(0.010-0.444) \times 10^{-6}$ 、 $(13.8-70.9) \times 10^{-6}$ 、 $(11.3-88.6) \times 10^{-6}$ 和 $(2.2-18.4) \times 10^{-6}$ 。与《海洋沉积物质量》(GB18668-2002)中第一类标准值相比,除 2011 年调查少数站位的 Cu 和 Pb 超过第一类标准外,其他 5 种重金属和其他航次调查的重金属含量均符合第一类标准;超标站位的 Cu 和 Pb 含量均符合第二类标准。

天然海域中表层沉积物各种重金属本底含量相差较大,由表 3 可知, Hg 和 Cd 的含量相差不大,且含量明显低于其他 5 种重金属元素; Cu、Pb、Cr、Zn 和 As 等的含量基本在一个数量级。2006–2014 年调查海域表层沉积物各重金属的年均含量大小与郑懿珉等(2015)对莱州湾附近海域表层沉积物重金属统计结果基本一致,但 Cr 和 Zn 的年均含量与郑懿珉等(2015)、林曼曼等(2013)的调查结果相比要小。

从水平分布角度分析,同种重金属不同年份的平面分布略有不同。本研究以重金属 Hg 为例,2014 年,调查海域重金属 Hg 的平面分布特征表现为从四周向中间海域降低的趋势,黄河口以南海域的含量偏低;2013 年,调查海域 Hg 的平面分布特征表现为北部海域较高,黄河口以南海域含量较低,其他海域分布较均匀;2011 年,调查海域 Hg 的平面分布特征表现为中北部海域高,南部海域略低;而 2009 年,调查海域 Hg 的平面分布趋势为东部海域高,其他海域略低;2006 年,由于调查范围相对较小,平面分布趋势不明显。

表 2 潜在生态风险指数法的污染评价等级划分

Tab.2 The classification and evaluation of pollution degree by using the potential ecological risk index

E_r^i 范围 Ranges of E_r^i	单个重金属污染物生态风险程度分级 Degree classification of ecological risk for single heavy metal	RI 范围 Ranges of RI	综合潜在生态风险程度分级 Degree classification of the comprehensive potential ecological risk
$E_r^i < 40$	低 Low	$RI < 130$	低 Low
$40 \leq E_r^i < 80$	中 Moderate	$130 \leq RI < 260$	中 Moderate
$80 \leq E_r^i < 160$	较高 Considerable	$260 \leq RI < 520$	较高 Considerable
$160 \leq E_r^i < 320$	高 High	$RI \geq 520$	高 High
$E_r^i \geq 320$	很高 Very high		

表 3 2006–2014 年调查海域表层沉积物重金属的含量($\times 10^{-6}$)Tab.3 The contents of heavy metals in the surface sediments of the survey area from 2006 to 2014 ($\times 10^{-6}$)

元素 Element	2006		2009		2011		2013		2014		年均值 Annual average
	范围 Range	均值 Average	范围 Range	均值 Average	范围 Range	均值 Average	范围 Range	均值 Average	范围 Range	均值 Average	
Hg	0.035–0.049	0.043	0.037–0.050	0.044	0.019–0.188	0.099	0.032–0.048	0.040	0.027–0.068	0.044	0.055
Cu	22.6–31.9	26.7	16.5–31.9	22.9	5.7–43.7	19.0	11.7–25.2	18.7	18.1–26.9	22.7	21.3
Pb	34.2–41.2	38.3	13.0–27.6	18.8	7.9–86.1	20.3	8.9–18.0	12.9	9.6–30.9	20.5	19.7
Cd	0.092–0.128	0.104	0.128–0.264	0.182	0.066–0.444	0.145	0.066–0.250	0.150	0.010–0.194	0.105	0.143
Cr	38.8–57.1	45.7	18.6–33.5	24.8	19.6–70.9	43.1	13.8–28.3	20.4	15.0–26.3	21.1	28.6
Zn	56.4–78.0	65.2	19.0–39.0	28.8	11.3–68.6	25.6	16.3–88.6	23.7	17.3–30.8	23.9	28.7
As	8.6–10.1	9.6	5.0–8.7	6.53	2.2–7.5	4.39	3.8–6.1	4.83	6.4–18.4	11.6	7.1

2.2 重金属年际变化分析

本研究调查海域表层沉积物重金属含量年际变化情况见图 2。从图 2 可以看出, 7 种重金属含量的年际变化有所不同。其中, Hg 含量在 2011 年监测值最大, 在其他年份基本持平; Cd 含量呈先升高后下降趋势; Cu 和 As 含量相对比较稳定, 呈略微下降后上升的趋势; Pb 和 Zn 含量变化较大, 在 2006 年监测值最大, 然后呈下降趋势; Cr 含量在 2006 和 2011 年较大, 其他 3 个年份含量持平。

相对其他调查航次, 2011 年调查海域重金属 Hg 的含量明显高于其他 4 个航次; 胡宁静等(2011)的研究结果表明, 黄河口及邻近海域沉积物中 Hg 主要受人为活动影响, 这可能与莱州湾海水 Hg 污染严重和大气颗粒物沉降有关。2011 年调查海域海水中重金属 Hg 的同步监测结果显示, 表层、中层和底层分别有 50.0%、58.3%和 58.5%的调查站位的 Hg 超过《海水水质标准》(GB3097-1007)中的第一类标准, 而 2006、2013 和 2014 年 3 个航次调查海域海水中重金属 Hg 含量均未超标, 2009 年调查海域表层和底层分别为 10.2%和 3.4%的调查站位的 Hg 超过《海水水质标准》(GB3097-1007)中的第一类标准, 超标程度较轻。由此可知, 2011 年调查海域表层沉积物中 Hg 含

量偏高原因主要与其海水中 Hg 含量较高有关。

2.3 重金属单因子标准指数评价

根据单因子标准指数评价法, 2006–2014 年调查海域表层沉积物重金属年平均单因子标准指数统计结果见表 4。从表 4 可以看出, 所有重金属元素年平均单因子标准指数均小于 1, 表明调查海域表层沉积物质量状况良好, 符合国家海洋沉积物质量第一类标准。

各重金属元素的年平均单因子标准指数排序为 $Cu > Cr > As > Pb > Cd > Hg > Zn$ 。相对于其他 6 种重金属元素, Cu 的标准指数值较高, 近 10 年来标准指数均值达 0.61; 其他 6 种重金属元素单因子标准指数均值均小于 0.4。鉴于重金属 Cu 的标准指数值远高于其他重金属元素, 应引起重视并加强例行监测。

2.4 重金属潜在生态风险评价

通过对调查海域 2006–2014 年表层沉积物重金属潜在生态风险进行评价, 得到重金属潜在生态风险系数 E_r^i 和综合潜在生态风险指数 RI 两项指标(表 5)。从表 5 可以看出, 2006–2014 年调查海域各航次 7 种重金属的平均潜在生态风险系数 E_r^i 均小于 40, 根据污染评价等级划分(表 2), 属于低生态风险水平; 仅 2011 年个别调查站位的重金属 Hg 的潜在生态风险系

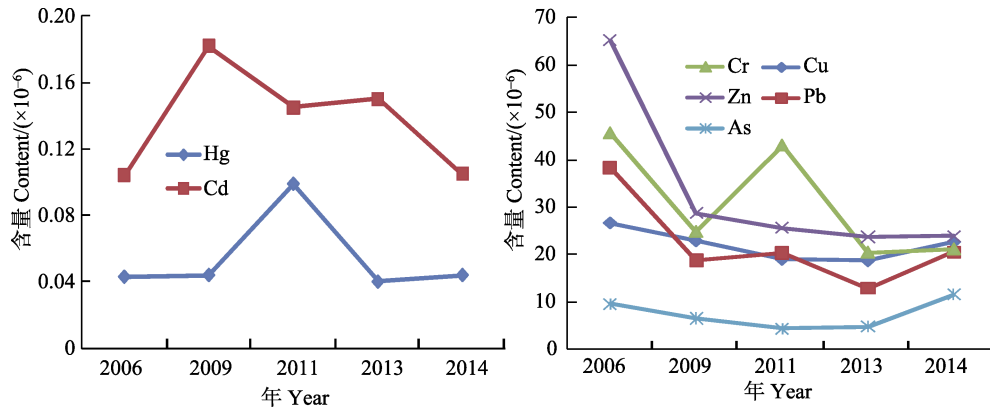


图 2 调查海域表层沉积物中重金属平均含量的年际变化

Fig.2 The annual variations of the average contents of heavy metals in the surface sediments of the survey area

数 E_r^i 达到最大值 60.16, 属于中等生态风险水平。2006–2014 年调查海域综合潜在风险指数 RI 年际变化范围为 32.18–53.12, 平均为 40.44, RI 均远小于 130, 表明该调查海域表层沉积物的综合潜在生态风险为低生态风险水平。从年际变化趋势看, 2011 年 RI 最高, 为 53.12; 2013 年 RI 最低, 为 32.18; RI 年际变化基本表现为先升高后降低、然后略微上升的趋势。

7 种重金属近 10 年平均潜在生态风险系数 E_r^i 由大到小依次为 $Hg > Cd > As > Pb > Cu > Cr > Zn$; 其中, Hg 的 E_r^i 年均值最高, 为 17.63, 是该调查海域的主要潜在生态风险因子; 其次是 Cd, 均值为 8.56。与 7 种重金属年均含量大小排序相比, 潜在生态风险系数 E_r^i 的排序基本呈逆序排列; 分析原因之一可能由于 Hg 和 Cd 等元素的毒性响应系数 T_r^i 比较大, 其毒性水平以及生物对其敏感程度较高; 原因之二可能是有

些重金属元素如 Zn、Cr 等具有亲颗粒性: 虽然其在沉积物中含量比较高, 但其具有亲颗粒性, 容易被细颗粒悬浮物迁移, 进入沉积物中矿化埋藏使它们毒性降低, 从而其潜在生态风险程度也降低(刘志杰等, 2012)。

表 4 2006–2014 年调查海域表层沉积物重金属年平均单因子标准指数

Tab.4 Annual average of single-factor standard index for heavy metals in the surface sediments from 2006 to 2014

元素 Element	2006	2009	2011	2013	2014	年均值 Annual average
Hg	0.22	0.22	0.50	0.20	0.22	0.28
Cu	0.76	0.65	0.54	0.53	0.65	0.61
Pb	0.64	0.31	0.34	0.22	0.34	0.33
Cd	0.21	0.36	0.29	0.30	0.21	0.29
Cr	0.57	0.31	0.54	0.26	0.26	0.36
Zn	0.43	0.19	0.17	0.16	0.16	0.19
As	0.48	0.33	0.22	0.24	0.58	0.35

表 5 调查海域表层沉积物重金属的潜在生态风险系数和潜在生态风险指数

Tab.5 The potential ecological risk factors (E_r^i) and risk indices (RI) of heavy metals in the surface sediments of the survey area from 2006 to 2014

年份 Year	项目 Items	E_r^i							RI
		Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As	
2006	范围 Range	11.20–15.68	3.77–5.32	7.95–9.58	5.52–7.68	1.42–2.09	0.71–0.98	5.74–6.73	42.24
	均值 Average	13.76	4.45	8.91	6.24	1.67	0.82	6.40	
2009	范围 Range	11.84–16.00	2.75–5.32	3.02–6.42	7.68–15.84	0.68–1.22	0.24–0.49	3.33–5.81	38.81
	均值 Average	14.08	3.82	4.37	10.92	0.91	0.36	4.35	
2011	范围 Range	6.18–60.16	0.96–7.28	1.83–20.02	3.98–26.64	0.72–2.59	0.14–0.86	1.48–4.99	53.12
	均值 Average	31.71	3.17	4.72	8.70	1.58	0.32	2.93	
2013	范围 Range	10.24–15.36	1.95–4.20	2.07–4.19	3.97–15.00	0.50–1.03	0.20–1.11	2.51–4.08	32.18
	均值 Average	12.80	3.12	3.00	9.00	0.75	0.30	3.22	
2014	范围 Range	8.64–21.66	3.02–4.48	2.23–7.19	0.60–11.64	0.55–0.96	0.22–0.39	4.27–12.27	37.77
	均值 Average	14.08	3.79	4.78	6.28	0.77	0.30	7.77	
年均值 Annual average		17.63	3.56	4.58	8.56	1.04	0.36	4.70	40.44

研究海域不同, 重金属的潜在风险不同; 同一海域研究的时间不同, 重金属的潜在风险也可能不同。张雷等(2011)的研究结果表明, 重金属对渤海典型海域生态风险构成的危害程度排序为 $Cd > Pb > As > Cu > Zn > Cr$, 其中, Cd 以中等生态风险等级为主, 局部海域出现强、很强、极强生态风险等级; 而刘志杰等(2012)对 2008 年黄河三角洲表层沉积物研究结果显示, 6 种重金属污染物潜在生态风险系数由大到小顺序为 $Cd > Hg > Cu > Cr > Pb > Zn$, 而 Cd 是黄河三角洲的主要潜在生态风险因子。上述研究结果均与本研究结果不同, 表明海洋沉积物环境中重金属对海洋环境的潜在生态风险程度在不同海域和不同研究年份都可能不同, 需要结合沉积物中有机质含量、物理化学性质、粒度分析以及重金属来源等进行分析, 才能全面反映调查海域沉积物环境的质量状况。

3 结论

(1) 2006–2014 年, 黄河口附近海域表层沉积物 7 种重金属 Hg 、 Cu 、 Pb 、 Cd 、 Cr 、 Zn 和 As 的含量除 2011 年调查少数站位的 Cu 和 Pb 超过第一类标准外, 其他调查站点的重金属含量均符合海洋沉积物质量第一类标准; 超标站点的 Cu 和 Pb 含量均符合第二类标准值。7 种重金属本底含量相差较大, 其中, Hg 和 Cd 的含量相当, 其含量明显低于其他 5 种重金属元素; 7 种重金属含量的年际变化有所不同。

(2) 单因子标准指数评价结果显示, 7 种重金属元素年平均单因子标准指数均小于 1, 表明调查海域表层沉积物质量状况良好。7 种重金属元素的年平均单因子标准指数排序为 $Cu > Cr > As > Pb > Cd > Hg > Zn$ 。 Cu 的标准指数值较高, 近 10 年来标准指数均值达 0.61, 应引起重视并加强例行监测; 其他 6 种重金属元素单因子标准指数均值均小于 0.4。

(3) 潜在生态风险评价结果显示, 2006–2014 年调查海域各航次 7 种重金属的平均 E_i^i 均小于 40, 属于低生态风险水平; RI 年际变化范围为 32.18–53.12, 平均为 40.44, 属于低生态风险水平; RI 的年际变化趋势基本表现为先升高后降低、然后略微上升的趋势。7 种重金属近 10 年平均 E_i^i 排序为 $Hg > Cd > As > Pb > Cu > Cr > Zn$, 其中, Hg 是该调查海域的主要潜在生态风险因子。

参 考 文 献

Chai XP, Hu BL, Wei N, *et al.* Distribution, sources and assessment of heavy metals in surface sediments of the Hangzhou Bay and its adjacent areas. *Acta Scientiae*

- Circumstantiae*, 2015, 35(12): 3906–3916 [柴小平, 胡宝兰, 魏娜, 等. 杭州湾及邻近海域表层沉积物重金属的分布、来源及评价. *环境科学学报*, 2015, 35(12): 3906–3916]
- Chen Y, Xu ZZ, Hu YY, *et al.* Distribution and ecological risk assessment of heavy metals in the surface sediments along coast of Qinhuangdao. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(1): 66–70 [陈燕, 许自舟, 胡莹莹, 等. 秦皇岛海域表层沉积物重金属含量分布特征及生态风险评价. *海洋环境科学*, 2014, 33(1): 66–70]
- Committee of Science and Technology of Shandong Province. The comprehensive survey reports of coastal zone and tidal flat resources in Shandong Province. Beijing: China Science and Technology Press, 1990: 526 [山东省科学技术委员会. 山东省海岸带和海涂资源综合调查报告. 北京: 中国科学技术出版社, 1990: 526]
- Compiling group in environmental quality survey report of the national coast belt office. Chinese coastal zone and coastal resources comprehensive survey professional report. Beijing: China Ocean Press, 1989: 180 [全国海岸带办公室环境质量调查报告编写组. 中国海岸带和海涂资源综合调查专业报告集. 北京: 海洋出版社, 1989: 180]
- Hakanson L. An ecological risk index for aquatic pollution control: A sedimentological approach. *Water Research*, 1980, 14: 975–1001
- Hu NJ, Shi XF, Liu JH, *et al.* Distribution and impacts of heavy metals in the surface sediments of the Laizhou Bay. *Advance in Marine Science*, 2011, 29(1): 63–72 [胡宁静, 石学法, 刘季花, 等. 莱州湾表层沉积物中重金属分布特征和环境影响. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 63–72]
- Hu YF, Jiang H. Status and trend analysis of heavy metal pollution in surface sediments of Zhongjieshan Islands national marine special protection area. *Ocean Development and Management*, 2012, 11: 67–70 [胡益峰, 蒋红. 中街山列岛国家级海洋特别保护区海域表层沉积物重金属污染状况及变化趋势分析. *海洋开发与管理*, 2012, 11: 67–70]
- Lin MM, Zhang Y, Xue CT, *et al.* Distribution pattern of heavy metals in the surface sediments of the area of circum-Bohai Bay and ecological environment assessment. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2013, 33(6): 41–46 [林曼曼, 张勇, 薛春汀, 等. 环渤海海域沉积物重金属分布特征及生态环境评价. *海洋地质与第四纪地质*, 2013, 33(6): 41–46]
- Liu C, Wang ZY, He Y, *et al.* Evaluation on the potential ecological risk for the river mouths around Bohai Bay. *Research of Environmental Sciences*, 2002, 15(5): 33–37 [刘成, 王兆印, 何耘, 等. 环渤海湾诸河口潜在生态风险评价. *环境科学研究*, 2002, 15(5): 33–37]
- Liu HW, Du D, Ma Z, *et al.* Distribution pattern and contamination assessment of heavy metals in surface sediments of Beidaihe near-shore area. *Marine Geology Frontiers*, 2015, 31(7): 47–51 [刘宏伟, 杜东, 马震, 等. 北戴河近岸海域表层沉积物重金属分布特征及污染评价.

- 海洋地质前沿, 2015, 31(7): 47–51]
- Liu M, Zhang AB, Fan DJ, *et al.* Environmental quality of heavy metals in surface sediments in the central region of the Bohai Sea. *China Environmental Science*, 2012, 32(2): 279–290 [刘明, 张爱滨, 范德江, 等. 渤海中部底质沉积物重金属环境质量. *中国环境科学*, 2012, 32(2): 279–290]
- Liu SM, Yao QZ, Liu YL, *et al.* Distribution and influence factors of heavy metals in surface sediments of the Yellow River Estuary wetland. *China Environmental Science*, 2012, 32(9): 1625–1631 [刘淑民, 姚庆祯, 刘月良, 等. 黄河口湿地表层沉积物中重金属的分布特征及其影响因素. *中国环境科学*, 2012, 32(9): 1625–1631]
- Liu ZJ, Li PY, Zhang XL, *et al.* Regional distribution and ecological risk evaluation of heavy metals in surface sediments from coastal wetlands of the Yellow River Delta. *Environmental Sciences*, 2012, 33(4): 1182–1188 [刘志杰, 李培英, 张晓龙, 等. 黄河三角洲滨海湿地表层沉积物重金属区域分布及生态风险评价. *环境科学*, 2012, 33(4): 1182–1188]
- Luo XX, Tian J, Yang JQ, *et al.* Distribution characteristics of heavy metals and nutrient elements in inter-tidal surface sediments of Yellow River estuary. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(5): 892–897 [罗先香, 田静, 杨建强, 等. 黄河口潮间带表层沉积物重金属和营养元素的分布特征. *生态环境学报*, 2011, 20(5): 892–897]
- Luo XX, Zhang R, Yang JQ, *et al.* Distribution and pollution assessment of heavy metals in surface sediment in Laizhou Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2): 262–269 [罗先香, 张蕊, 杨建强, 等. 莱州湾表层沉积物重金属分布特征及污染评价. *生态环境学报*, 2010, 19(2): 262–269]
- Ma DY, Wang JY. Evaluation on potential ecological risk of sediment pollution in main estuaries of China. *China Environmental Science*, 2003, 23(5): 521–525 [马德毅, 王菊英. 中国主要河口沉积物污染及潜在生态风险评价. *中国环境科学*, 2003, 23(5): 521–525]
- Mi BB, Lan XH, Zhang ZX, *et al.* Distribution of heavy metals in surface sediments off Yangtze River estuary and environmental quality assessment. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2013, 33(6): 47–53 [密蓓蓓, 蓝先洪, 张志珣, 等. 长江口外海域沉积物重金属分布特征及其环境质量评价. *海洋地质与第四纪地质*, 2013, 33(6): 47–53]
- Nobi EP, Dilipan E, Thangaradjou T, *et al.* Geochemical and geo-statistical assessment of heavy metal concentration in the sediments of different coastal ecosystems of Andaman Islands, India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2010, 87(2): 253–264
- Qiao YM, Huang CJ, Zhao JG. Heavy metal accumulation and environmental quality assessment for surface sediment in Zhelin Bay. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(3): 324–327 [乔永民, 黄长江, 赵建刚. 粤东柘林湾沉积物重金属富集特征与环境质量评价. *海洋环境科学*, 2010, 29(3): 324–327]
- Wu B, Song JM, Li XG. Environmental Characteristics of Heavy Metals in Surface Sediments from the Huanghe Estuary. *Environmental Science*, 2013, 34(4): 1324–1332 [吴斌, 宋金明, 李学刚. 黄河口表层沉积物中重金属的环境地球化学特征. *环境科学*, 2013, 34(4): 1324–1332]
- Xia B, Zhang XL, Cui Y, *et al.* Evaluation of the physicochemical environment and nutrition status in Laizhou Bay and adjacent waters in summer. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 103–111 [夏斌, 张晓理, 崔毅, 等. 夏季莱州湾及附近水域理化环境及营养现状评价. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 103–111]
- Zhang L, Qin YW, Zheng BH, *et al.* Distribution and pollution assessment of heavy metals in sediments from typical areas in the Bohai Sea. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(8): 1676–1684 [张雷, 秦延文, 郑丙辉, 等. 环渤海典型海域潮间带沉积物中重金属分布特征及污染评价. *环境科学学报*, 2011, 31(8): 1676–1684]
- Zhang Y, Zhang XR, Bi SP, *et al.* Heavy metal distribution patterns in Chinese coastal sediments and environment quality assessment. *Marine Geology Frontiers*, 2012, 28(11): 38–42 [张勇, 张现荣, 毕世普, 等. 我国近海海域沉积物重金属分布特征与环境质量评价. *海洋地质前沿*, 2012, 28(11): 38–42]
- Zheng YM, Gao MS, Liu S, *et al.* Distribution patterns and ecological assessment on heavy metals in the surface sediments of Laizhou Bay. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(3): 354–360 [郑懿珉, 高茂生, 刘森, 等. 莱州湾表层沉积物重金属分布特征及生态环境评价. *海洋环境科学*, 2015, 34(3): 354–360]
- Zhou XB, Mei PW, Peng LL, *et al.* Contents and potential ecological risk assessment of selected heavy metals in the surface sediments of Bohai Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, 24(3): 452–456 [周笑白, 梅鹏蔚, 彭露露, 等. 渤海湾表层沉积物重金属含量及潜在生态风险评价. *生态环境学报*, 2015, 24(3): 452–456]

Pollution Status and the Annual Variations of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of the Yellow River Estuary

HU Qin¹①, LI Qiang¹, HUANG Bigui¹, QU Liang², CAO Jing¹

(1. China National Offshore Oil Corporation Research Institute, Beijing 100028;

2. North China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Qingdao 266033)

Abstract According to the monitoring results of the surface sediment samples from five cruises of 150 survey stations from 2006 to 2014 collected in the adjacent sea water of the Yellow River estuary, the pollution status and the annual variations of the seven kinds of heavy metals Hg, Cu, Pb, Cd, Cr, Zn and As in the sediments were analyzed. The methods of single factor standard index and potential ecological risk index were used to evaluate the status of heavy metal pollution and potential ecological risk degree. The results showed that the contents of heavy metals met the first class standard requirement of the Marine Sediment Quality except a few stations investigated in 2011 exceeded the first class standard. The contents of Hg and Cd were equal, which were obviously lower than that of the other five heavy metal elements. And the annual variations of the seven heavy metals were different from each other. The average single factor standard indices of the seven heavy metals were all less than 1, which indicated that the quality status of the surface sediment in the survey area was good. The order of the annual average single factor standard indices of the seven heavy metals was Cu>Cr>As>Pb> Cd>Hg>Zn. And the standard index value of Cu was higher than the others, even the average standard index of Cu reached 0.61 in recent ten years, which should be paid attention to and strengthened routine monitoring. And the single factor standard indices for the other six heavy metal elements were all less than 0.4. Further potential ecological risk assessment results showed that the average potential ecological risk factors E_r^i of seven heavy metals of all cruises were less than 40, which presented a low level ecological risk. And the order of E_r^i for seven heavy metals in recent ten years was Hg>Cd>As>Pb>Cu>Cr>Zn, where Hg was the main potential ecological risk factor in the survey area. The annual variations of the comprehensive potential ecological risk index RI ranged from 32.18 to 53.12, which indicated a low level of ecological risk. Basically, the trend of the annual variations of RI was increasing first, then decreasing, and then a slight increasing.

Key words Yellow River estuary; Surface sediments; Heavy metals; Pollution; Annual variations

① Corresponding author: HU Qin, E-mail: huqin7321@163.com

辽东湾不同型刺网捕捞性能的比较*

邢彬彬² 郭 瑞^{1,2} 李显森^{1①} 赵宪勇¹ 张国胜²
许传才² 孙 珊¹ 尤宗博¹



(1. 农业部海洋渔业资源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
中国水产科学院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 大连海洋大学海洋与环境学院 大连 116021)

摘要 为了提高近海渔业资源养护型捕捞与管理技术,促进《全国海洋捕捞渔具目录》的实施,2014年10–11月在辽东湾进行了网目尺寸为40 mm、50 mm、60 mm的单片刺网、双重刺网和三重刺网以及生产对照网的选择性对比实验。结果显示,各种实验网的渔获种类数均在6–9种之间,优势种口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)的优势度随网目尺寸的增大而减小,但花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的优势度随网目尺寸的增大而增大。同型试验网在不同网目尺寸条件下的渔获量有显著性差异,其中,60 mm试验网与40 mm同型试验网的单位捕捞努力量渔获量(CPUE)比较,单片刺网为800%,双重刺网为650%,三重刺网为500%;而异型试验网在网目尺寸相同条件下对渔获量的影响相对较小。试验网的组内渔获组成平均相似度分别为单片刺网59.24%,双重刺网62.63%,三重刺网66.51%;组间分别为71.44%、67.50%和70.58%;对组内和组间平均相似度贡献最高的种类均为口虾蛄和花鲈。随着网目尺寸的增大,各型试验网的渔获物幼鱼比例呈下降趋势。

关键词 辽东湾;刺网;网目尺寸;选择性;渔获组成;捕捞性能

中图分类号 S971 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0024-07

刺网是黄渤海沿海地区重要的传统作业方式之一,在北方沿海三省一市的海洋捕捞业中占有极其重要的地位(孙中之等,2012)。近10年,我国刺网渔业年产量占海洋捕捞总产量的16%–22%,其中,黄渤海区的刺网渔业产量占捕捞产量的20%–30%(中国渔业统计年鉴2005–2014)。自渤海海域禁止底拖网作业后(农业部渤海生物资源养护规定,2004),刺网渔业在渤海的地位越来越重要。

刺网类渔具按网具结构特征可分为单片刺网、双重刺网、三重刺网、无下纲刺网和框格刺网5型(黄锡昌,2001)。其中,单片刺网选择性强,是一种有利于渔业资源繁殖保护和合理应用的优良渔具(潘国良等,2007),双重刺网、无下纲刺网、框格刺网在黄渤海渔业中应用较少,选择性相对较低的三重刺网则随着渔业资源的衰退和渔业种群的低龄化及小型化被广

泛应用(孙中之等,2011)。基于对其破坏渔业资源的关切,2013年农业部颁布的《关于实施海洋捕捞准用和过渡渔具最小网目尺寸制定的通告》(农业部通告[2013]1号)将三重刺网定为海洋捕捞过渡渔具,亟需开展相关研究,以确定其过渡期后的归属。

目前,国外关于刺网选择性的研究较多,主要集中在网线材料、直径和网目尺寸对刺网选择性的影响(Psuty-Lipska *et al*, 2006; Fonseca *et al*, 2005; Yokota *et al*, 2001; 张健等,2006)。我国的捕捞学研究基础相对薄弱,虽然开展过刺网类渔具渔法调查和渔业现状调查与分析(张澄茂等,2002、2005;孙中之等,2011;潘国良等,2007;方水美等,2005),但相关的渔具选择性研究则主要集中于单片刺网(张鹏等,2005;李灵智等,2010;尤宗博等,2014),关于不同型、不同式的刺网渔具的选择性对比研究尚未见报道。因此,有必要

* 公益性行业(农业)科研专项(201203018)资助 [This work was supported by the Special Scientific Research Fund of Agricultural Public Welfare Profession of China (Grant No.201203018)]. 邢彬彬, E-mail: xingbinbin@dlou.edu.cn

① 通讯作者:李显森,研究员, E-mail: lixs@ysfri.ac.cn

收稿日期:2016-01-04, 收修改稿日期:2016-03-07

开展不同型、不同式刺网类渔具的选择性实验,从渔获量、渔获组成、渔获优势种、幼鱼比例等方面比较单片刺网、双重刺网和三重刺网的作业性能,为渤海三重刺网过渡期后的归属划分与管理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验船和网具

试验船为“辽盘渔 2009”,主机功率 44.1 kW(60 HP),全长 14.8 m,型宽 3.6 m。试验渔具为单片刺网、双重刺网和三重刺网(分别表示为 S、D 和 T),渔具主尺度均为 50 m×5 m,网目尺寸分别有 40 mm、50 mm、60 mm 三种规格,共装配成 9 种(40S、50S、60S、40D、50D、60D、40T、50T 和 60T)。双重刺网的大网目网衣和三重刺网的外网衣网目尺寸为 300 mm,外网衣和内网衣网线均为 PA 单丝,直径分别为 0.45 mm 和 0.25 mm,内网衣的水平缩结系数为 0.583,外网衣的水平缩结系数为 0.707。生产对照网为口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)三重流刺网(以字母 C 表示),渔具主尺度为 50 m×1.5 m,内网衣网目尺寸为 50 mm,网线为直径 0.1 mm 的 PA 单丝,水平缩结系数为 0.366,外网衣网目尺寸为 170 mm,网线为 1×3 PE 捻线,水平缩结系数为 0.502。

1.2 实验海域和时间

本实验时间为 2014 年 10 月 7 日-11 月 25 日,作业海域为渤海 40°30'N 以北、121°30'E 以东的辽东湾营口、盘锦近海水域(图 1 中的阴影区域),水深为 6-15 m。

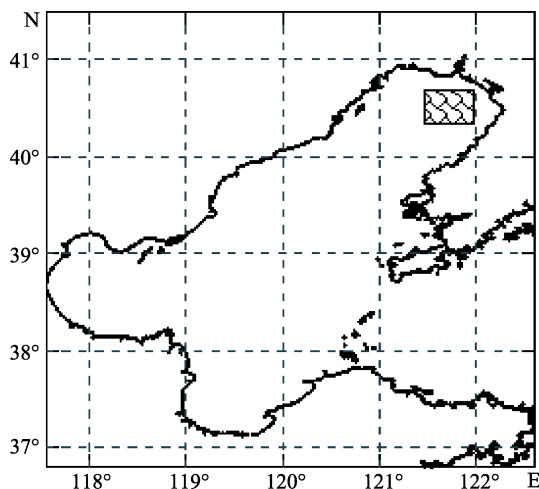


图 1 实验海域

Fig.1 Experimental fishing area

1.3 实验方法

将生产对照网和 9 种试验网各 5 片依次相连,共

50 片网为 1 个网列,每航次放 1 个网列,作为 1 网次,本实验共进行 12 个有效网次的捕捞采样。作业方式为底层漂流,傍晚下网,网具海中漂流 13-16 h,次日上午起网。起网后回到渔港对各种试验网网片的渔获物分别摘取,估算缠绕和刺挂比例[鱼体刺入网目或鱼体某一部分(如鳃盖)挂于网片作为刺挂,鱼体缠绕于网衣上作为缠绕]。分析实验对所有渔获物全部取样,进行渔获物分类、统计和生物学测定。

1.4 数据处理

1.4.1 渔获优势种 运用 Pinkas 等(1971)提出的相对重要性指数(IRI)来计算各种试验网渔获种类的优势度,以 IRI 值大于 1000 定为优势种。表达式为:

$$IRI=(N+W) \times F \quad (1)$$

式(1)中, N 为某一物种的个体数占总个体数的百分率(%); W 为某一物种的生物量占总生物量的百分率(%); F 为出现频率,即某一物种在该种试验网中出现的频率(%)。

1.4.2 单位捕捞努力量渔获量(CPUE) 试验网的单位捕捞努力量渔获量(CPUE)为单位面积(网衣展开面积)(100 m²)网衣每小时的平均渔获重量[g/(100 m²×h)],其表达式为:

$$CPUE = \frac{\sum_{i=1}^n \left(100 * \frac{C_i}{ST_i} \right)}{n} \quad (2)$$

式(2)中, C_i 为某试验网第 i 次试捕(5 片网)的渔获重量(g/net), S 为该试验网(5 片网衣)的面积(m²), T_i 为该试验网第 i 次试捕在海水中的敷设时间(h), n 为该试验网的试捕次数。

1.4.3 渔获组成分析 利用 PRIMER 软件对各种试验网的渔获组成进行相似性百分比分析,研究各试验网的种间选择性差异(Macbeth *et al*, 2005)。相似性百分比分析方法是研究群落结构的常规方法,可以用于分析群落结构之间相似性的典型种和造成群落之间差异性的分歧种(梅春等, 2010)。Macbeth 等(2005)运用此方法研究了安装套网对试验网囊中渔获组成的影响, Guijarro 等(2006)运用此方法研究了 40 mm 菱形网目和 40 mm 方形网目网囊拖网渔获组成的差异性,李超等(2015)运用此方法研究了菱形网目和不同网目尺寸的方形网目网囊张网渔获组成的差异性。

本研究将每种试验网的渔获视为一个类似生物群落,那么可以利用相似性百分比分析方法定量分析不同试验网渔获组成的差异及其渔获组成之间相似性的典型种和差异性的分歧种。

1.4.4 差异性显著检验 利用单因子方差分析方法(One-way ANOVA)对相同网目尺寸的单片刺网、双重刺网和三重刺网渔获量进行方差分析。利用卡方检验(χ^2 检验)分析各型试验网的渔获量之间所存在的差异是否显著, 选择显著水平 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 渔获种类分析

2.1.1 渔获种类组成 本实验 12 网次采样的渔获物共 2881 尾, 总重 242.05 kg, 隶属 6 目 12 科 12 属 12 种, 其中, 鲈形目种类最多(6 种), 鲷形目 2 种, 鲱形目、鲽形目、鲛鳎目、口足目各 1 种; 渔获物的种间体型差异较大, 有纺锤形、侧扁形、棍棒形等, 各种试验网的渔获种类数均为 6–9 种, 其中, 相同的渔获种类为口虾蛄、花鲈(*Lateolabrax japonicas*)、矛尾鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)和红狼牙鰕虎鱼(*Odontamblyopus rubicundus*)。网目尺寸为 40–60 mm 的双重刺网和三重刺网与网目尺寸为 40–50 mm 的单片刺网对辽东湾渔业种类的选择性基本相同, 对物种的选择性较差。相比而言, 单片刺网随着网目尺寸的增大, 渔获种类减少, 60 mm 单片刺网的渔获种类为 6 种, 少于其他试验网和生产对照网, 对物种的选择性略有优势(表 1)。

2.1.2 渔获优势种 不同试验网和生产对照网的渔获优势种略有不同, 各试验网渔获种类的相对重要性指数(IRI 值)列于表 1。由表 1 可知, 口虾蛄为各试验网的渔获优势种, 优势度随各型试验网网目尺寸的增大而减小; 花鲈为除 40 mm 三重刺网外其他各试

验网的渔获优势种, 优势度随各型试验网的网目尺寸增大而增加。生产对照网渔获优势种为口虾蛄、花鲈、梭鱼(*Liza haematocheila*)。在相同网目尺寸条件下, 口虾蛄的 IRI 值按单片刺网、双重刺网、三重刺网顺序呈递增趋势, 表明口虾蛄的优势度递增。

2.1.3 渔获量 对相同网目尺寸的单片刺网、双重刺网和三重刺网渔获量进行方差分析, 结果显示(表 2), 网目尺寸同为 40 mm 或 60 mm 时, 各型试验网的渔获量之间差异性不显著($P=0.313$ 、 $P=0.604$); 但网目尺寸同为 50 mm 时, 各型试验网的渔获量之间差异性显著($P=0.007$), 以三重刺网的渔获量最高, 单片刺网的渔获量最低。不同网目尺寸的同型试验网渔获量之间均存在显著性差异($P=0.0003$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.002$)。各型试验网的 CPUE 均随网目尺寸的增大递增(表 2), 其中, 60 mm 与 40 mm 的试验网 CPUE 比较, 单片刺网为 800%, 双重刺网为 650%, 三重刺网为 500%, 表明网目尺寸为 40–60 mm 范围时, 渔获性能与网目尺寸呈显著正相关。刺挂与缠绕比例显示(表 2), 不同型刺网的渔获方式存在明显差异, 单片刺网以刺挂为主(占 85%–89%), 三重刺网以缠绕为主(占 79%–81%), 双重刺网刺挂与缠绕的比例相对较均衡(刺挂比例为 39%–55%); 且同型刺网随网目尺寸的增大缠绕比例均减小, 而刺挂比例增大。

2.2 渔获组成

2.2.1 网目尺寸对渔获组成的影响 各类型试验网的口虾蛄渔获选择性随网目尺寸的变化呈现不同的变化趋势: 单片刺网的口虾蛄渔获尾数比例随网目尺寸的增大呈明显减少的趋势; 双重刺网的口虾

表 1 不同型刺网的渔获种类 IRI 值
Tab.1 Catches IRI of different kinds of gillnets

种类 Species	试验网 Nets									
	40S	50S	60S	40D	50D	60D	40T	50T	60T	C
口虾蛄 <i>Oratosquilla oratoria</i>	8491	6914	2547	9015	7838	6099	12229	11413	7259	12201
花鲈 <i>Lateolabrax japonicas</i>	1017	4478	11856	4229	8223	8713	438	5417	5026	2702
梭鱼 <i>Liza haematocheila</i>	–	484	7	–	–	73	31	133	916	1928
蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	–	–	–	–	–	9	–	–	–	–
小黄鱼 <i>Pseudosciaena polyactis</i>	19	–	–	66	146	65	17	3	4	–
许氏平鲷 <i>Sebastes schlegeli</i>	–	125	–	–	–	–	–	–	–	16
斑鲷 <i>Konosirus punctatus</i>	76	–	–	–	34	–	–	–	–	–
黄鲛鳎 <i>Lophius litulon</i>	38	36	–	–	197	236	117	30	774	127
短吻红舌鲷 <i>Cynoglossus joyneri</i>	37	–	3	453	4	–	796	16	3	–
红娘鱼 <i>Lepidotrigla microptera</i> Günther	–	209	–	76	–	–	–	–	6	–
红狼牙鰕虎鱼 <i>Odontamblyopus rubicundus</i>	850	721	388	312	9	63	235	35	250	60
矛尾鰕虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>	329	68	120	724	236	336	130	192	51	32

“–”表示种类在该类型试验网具中未出现

–: Species did not appear in this type of experiment gillnets

鲎渔获尾数比例在网目尺寸为 40 mm 和 50 mm 时基本相同, 但当网目尺寸增大到 60 mm 时则明显减少; 三重刺网的口虾鲎渔获尾数比例随网目尺寸的变化与双重刺网趋于一致, 但其所占比例总体上大于双重刺网(图 2)。各类型试验网的花鲈渔获尾数比例均随网目尺寸的增大而增加, 短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)的渔获尾数比例则随网目尺寸的增大而减少。

利用 PRIMER 进行的渔获组成相似性百分比分析结果显示, 不同网目尺寸的单片刺网渔获组成之间平均相似度为 59.24%, 对组内平均相似度贡献最高

的种类为花鲈; 不同网目尺寸的双重刺网的平均相似度为 62.63%, 对组内平均相似度贡献最高的种类为口虾鲎; 不同网目尺寸的三重刺网的平均相似度为 66.51%, 对组内平均相似度贡献最高的种类为口虾鲎(表 3)。

2.2.2 刺网的型对渔获组成的影响 三型刺网网目尺寸相同时, 口虾鲎渔获尾数的比例在 3 种网目尺寸下均呈现出按单片刺网、双重刺网、三重刺网顺序的增长趋势, 表明三重刺网对口虾鲎具有最佳的选择性; 网目尺寸为 40 mm 和 50 mm 时, 各型刺网的花鲈渔获尾数比例是双重刺网高于单片刺网和三重刺

表 2 渔获性能
Tab.2 Catch performance

试验渔具 Nets	种类数 Species number	尾数 Catch in number (ind)	重量 Weight (g)	平均网次重量 Mean of haul (g)	渔获方式 Catching method		CPUE [g/(100 m ² ×h)]
					缠绕率 Entangled rate (%)	刺挂率 Gilled rate (%)	
40S	8	108	5138.5	428.2	15.0	85.0	4.0
50S	8	116	8334.3	694.5	14.0	86.0	6.5
60S	6	280	45124.9	3760.4	11.0	89.0	35.4
40D	7	122	7008.8	584.1	55.0	45.0	5.5
50D	8	231	20423.1	1701.9	41.0	59.0	16.0
60D	8	380	45884.9	3823.7	39.0	61.0	36.0
40T	8	184	6010.4	500.9	81.0	19.0	4.7
50T	8	431	27118.6	2259.9	81.0	19.0	21.3
60T	9	336	31909.5	2659.1	79.0	21.0	25.0
50C	7	670	40957.5	3413.1	78.0	22.0	32.1

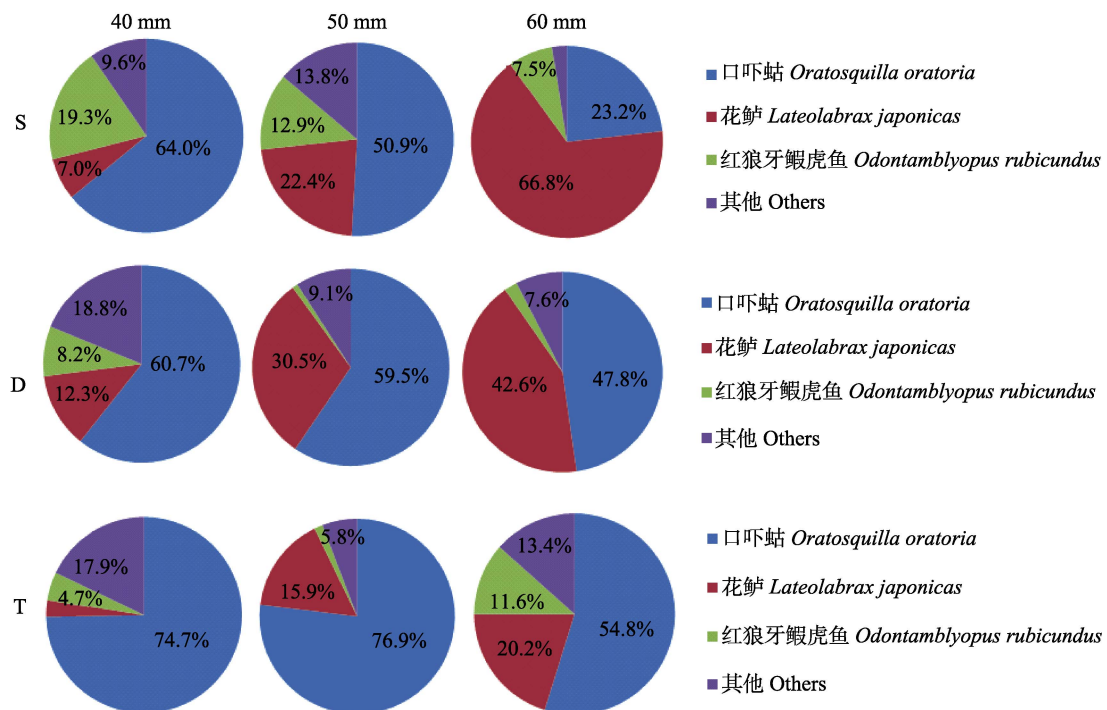


图 2 不同试验网的渔获尾数结构

Fig.2 The composition of catch species with different experiment gillnets

表 3 渔获种类对试验网组内和组间的平均相似性贡献

Tab.3 Contribution of catch species to average similarity between intra-group and inter-group of the experimental gillnets

相似度贡献 Similarity contributions(%) 种类 Species	组别 Factor group			组间 Inter-group		
	组内 Intra-group			40 mm	50 mm	60 mm
	S	D	T			
花鲈 <i>L. japonicas</i>	35.73	41.13	25.60	26.89	43.01	51.44
口虾蛄 <i>O.oratoria</i>	29.78	27.17	30.94	34.88	24.03	19.50
红狼牙鰕虎鱼 <i>O. rubicundus</i>	15.20	13.26	9.46	15.08	8.40	6.83
矛尾鰕鲐鱼 <i>S. hasta</i>	9.15	—	7.19	4.75	8.47	9.28
梭鱼 <i>L. haematocheila</i>	—	—	10.08	—	6.72	7.07
黄鲛鲷 <i>L.litulon</i>	4.01	5.17	10.53	6.62	—	—
小黄鱼 <i>P. polyactis</i>	—	8.14	—	5.50	—	—

注：组内指不同网目尺寸的同型试验网；组间指相同网目尺寸的各型试验网

Note: Intra-group was the same type of gillnets which had different mesh sizes; Inter-group was different type of gillnets which had same mesh sizes

网，而当网目尺寸为 60 mm 时，则呈现出按单片刺网、双重刺网、三重刺网顺序减小的趋势，以 60 mm 的单片刺网对花鲈的选择性最高。综合 3 种不同网目尺寸在 3 型试验网的渔获尾数，表明三重刺网对口虾蛄的选择性优于双重刺网和单片刺网，而随网目尺寸的增大，单片刺网对花鲈具有较好的选择性。

除渔获优势种口虾蛄和花鲈外，其他渔获种类渔获尾数比例：网目尺寸为 40 mm 时，各型刺网的比例均较高 (> 20%)，渔获选择性相对较差；网目尺寸为 50 mm 时，单片刺网比例最高(26.7%，其中，红狼牙鰕虎鱼为 12.9%，梭鱼 5.2%)，双重刺网和三重刺网比例均小于 10%，渔获选择性优于单片刺网；网目尺寸为 60 mm 时，单片刺网和双重刺网的比例均小于 10%，而三重刺网比例最高(25%，其中，红狼牙鰕虎鱼 11.7%，梭鱼 7.9%)。

利用 PRIMER 进行的渔获组成相似性百分比分析结果显示，当网目尺寸为 40 mm、50 mm 和 60 mm 时，单片刺网、双重刺网和三重的渔获组成平均相似度分别为 71.44%、67.50%和 70.58%；对组间平均相似度贡献最高的种类分别为花鲈、花鲈和口虾蛄(表 3)。

2.3 未达到可捕标准的渔获比例

根据 2004 年农业部颁布的《渤海生物资源养护规定》(2004 年 2 月 12 日农业部令第 34 号)，口虾蛄最小可捕体长为 11 cm，花鲈最小可捕体长为 40 cm。本次 9 种试验网的口虾蛄渔获未达最小可捕标准的比例均高于 40%。在相同网目尺寸条件下，各型试验网口虾蛄未达到可捕标准的渔获尾数呈现出按单片刺网、双重刺网、三重刺网顺序递增的趋势，但其所

占渔获的比例差异不明显。同型试验网，当网目尺寸为 50 mm 时，未达到可捕标准的口虾蛄渔获尾数均最多。未达到可捕标准的口虾蛄渔获比例在各型试验网中均随网目尺寸的增大而递减(图 3)。

花鲈是渔获优势种之一，所有试验网和生产对照网的花鲈渔获体长多在 17–28 cm 之间，未达到可捕标准比例均为 100%(图 4)。

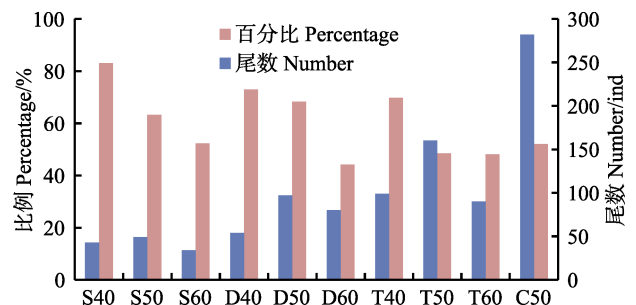


图 3 未达到可捕标准的口虾蛄渔获尾数与比例
Fig.3 The number and proportion of *O. oratoria* less than the minimum fishable standard

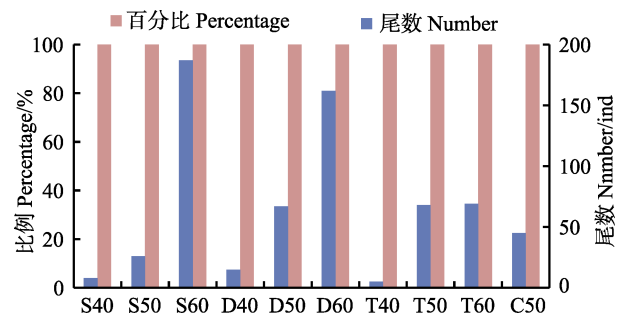


图 4 未达到可捕标准的花鲈渔获尾数与比例
Fig.4 The number and proportion of *L. japonicas* less than the minimum fishable standard

3 讨论

3.1 各型试验网捕捞性能评价

从本次实验的各型刺网渔获组成比较发现,三重刺网渔获优势种的优势度大于双重刺网和单片刺网,其他渔获种类比例较小;就 40 mm 和 50 mm 网目尺寸而言,三重刺网的 CPUE 大于单片刺网,主捕对象口虾蛄的渔获比例也高于单片刺网;在相同网目尺寸下,各型试验网幼体比例无明显差异。因此,在 40–60 mm 网目尺寸条件下,渤海三重刺网作业性能从渔获组成、CPUE 和幼体比例比较优于单片刺网。

三重刺网渔具构造较为简单,捕捞技术不太复杂,对渔船动力要求不高,捕捞作业能耗低(孙珊等, 2014),且对甲壳类渔获产量较单片刺网高,渔获品质高,经济性能优于单片刺网;目前,黄渤海区三重刺网作业方式主要为定置和漂流两种,其缠绕功能对兼捕鱼类和幼鱼具有一定的损害,对渔场环境具有一定的破坏,所以三重刺网的生态性能较差。但是,可以通过控制减少刺网渔具数量,减小其对渔业资源的破坏。

3.2 各型试验网的渔获选择性比较

渔获组成相似性分析结果显示,对各网目尺寸的单片刺网、双重刺网、三重刺网平均相似度贡献最高的种类分别为花鲈、花鲈、口虾蛄,即花鲈对单片刺网和双重刺网的渔获选择性影响较大,口虾蛄对三重刺网的渔获选择性影响较大;同时,相对重要性指数和渔获尾数结构也表明,在相同网目尺寸条件下,单片刺网的花鲈相对重要性指数和渔获尾数比例大于三重刺网,而口虾蛄相对重要性指数和渔获尾数比例则小于三重刺网;表明单片刺网对花鲈的选择性具有一定的优势,而三重刺网对口虾蛄的选择性具有一定的优势。

通过比较各型刺网的渔获原理并结合生产经验推测,这种差异可能是由各型刺网的渔获方式造成的,以刺挂为主的单片刺网对纺锤形和棍棒形鱼类选择性较好,随网目尺寸的变化渔获体长变化明显。孙中之等(2011)黄渤海刺网调查结果表明,不同目标鱼种的单片刺网网目尺寸不同;而三重刺网除刺挂外,还有较强的缠绕功能,使其对口虾蛄、梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、中国对虾(*Panulirus stimpsoni*)等甲壳类的选择具有一定的优势。

参 考 文 献

Fang SM, Zhang ZL, Zheng Y. The comparison and analysis of fishing capacity of fishery in Fujian. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(3): 27–34 [方水美, 张壮丽, 郑奕. 福

- 建省刺网作业捕捞能力的比较分析. *海洋水产研究*, 2005, 26(3): 27–34]
- Fonseca P, Martins R, Campos A, *et al.* Gill-net selectivity off the Portuguese western coast. *Fisheries Research*, 2005, 73(3): 323–339
- Guijarro B, Massuti E. Selectivity of diamond-and square-mesh codends in the deepwater crustacean trawl fishery off the Balearic Islands (western Mediterranean). *ICES Journal of Marine Science*, 2006, 63(1): 52–67
- Huang XC. *Fishing technology*. Chongqing: Chongqing Press, 2001, 125–130 [黄锡昌. 捕捞学. 重庆: 重庆出版社, 2001, 125–130]
- Li C, Zhang XM, Chen P, *et al.* Selectivity of codend mesh sizes in stow nets during spring on the coast of Zhaitang Island, Qingdao. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 799–811 [李超, 张秀梅, 陈平, 等. 青岛斋堂岛海域春季双桩竖杆张网网囊网目的选择性. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 799–811]
- Li LZ, Huang HL, Wang L, *et al.* The mesh size selectivity research of silvery pomfret gillnet in Yellow and East China Sea. *Marine Fisheries*, 2010, 32(1): 89–94 [李灵智, 黄洪亮, 王磊, 等. 东黄海区银鲳流刺网网目尺寸选择性研究. *海洋渔业*, 2010, 32(1): 89–94]
- Macbeth WG, Broadhurst MK, Millar RB. Improving selectivity in an Australian penaeid stow-net fishery. *Bulletin of Marine Science*, 2005, 76(3): 647–660
- Mei C, Xu BD, Xue Y, *et al.* Fish community structure and species diversity during autumn and winter in the central waters of Jiaozhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 110–118 [梅春, 徐宾铎, 薛莹, 等. 胶州湾中部海域秋、冬季鱼类群落结构及其多样性研究. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 110–118]
- Minimum mesh size of gillnet for *Ilisha elongata* [SC4009-1983, 鳓鱼流网最小网目尺寸]
- Minimum mesh size of gillnet for *Stromateoides argenteus* [SC4008-1983, 银鲳流网最小网目尺寸]
- Pan GL, Zhang HL, He ZT. Current analysis on fisheries of gill nets in the coastal zone of Zhejiang Province. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 2007, 26(3): 324–328 [潘国良, 张洪亮, 贺舟挺. 浙江近海流刺网渔业的分析. *浙江海洋学院学报*, 2007, 26(3): 324–328]
- Pinkas L, Oliphant MS. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California waters. *Water Research*, 1971, 18(6): 653–594
- Psuty-Lipska I, Madsen N, Draganik B, *et al.* Gill net selectivity for perch (*Perca fluviatilis*) in the Szczecin Lagoon, Poland. *Fisheries Research*, 2006, 80(2): 339–344
- Sun S, Zhu JC, Yang YY, *et al.* The fishery resources utilization of the main fishing gear in Yellow Sea and Bohai area. *Shandong Fisheries*, 2014, 31(1): 8–18 [孙珊, 朱建成, 杨艳艳, 等. 黄渤海主要作业类型渔具的渔业资源利用. *齐鲁渔业*, 2014, 31(1): 8–18]
- Sun ZZ, Zhou J, Zhao ZL, *et al.* The fishing structure of Yellow Sea and Bohai Sea. *Marine Sciences*, 2012, 36(6): 44–52 [孙中之, 周军, 赵振良, 等. 黄渤海区捕捞结构的研究. *海洋科学*, 2012, 36(6): 44–52]

- Sun ZZ, Zhou J, Zhao ZL. Sample investigation and quantitative analysis on fishing gear and method of gillnet in the Yellow Sea and Bohai area. *Fishey Modernization*, 2011, 38(4): 53–58 [孙中之, 周军, 赵振良. 黄渤海区刺网渔具的抽样调查和定性定量分析. *渔业现代化*, 2011, 38(4): 53–58]
- Yokota K, Fujimori Y, Shiode D, *et al.* Effect of thin twine on gill net size-selectivity analyzed with the direct estimation method. *Fisheries Science*, 2001, 67(5): 851–856
- You ZB, LI XS, Zhao XY, *et al.* The selectivity research of big mesh gillnet for *Scomberomorus niphonius*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 289–296 [尤宗博, 李显森, 赵宪勇, 等. 蓝点马鲛大网目流刺网的选择性研究. *水产学报*, 2014, 38(2): 289–296]
- Zhang CM, Ye SZ, Wang DM, *et al.* The present condition of drift fishery in the Mindong waters. *Journal of Fujian Fisheries*, 2002, 3(1): 52–56 [张澄茂, 叶孙忠, 王冬梦, 等. 闽东海区流刺网渔业的现状分析. *福建水产*, 2002, 3(1): 52–56]
- Zhang CM, Zhang ZL, Ye SZ, *et al.* The investigation and management study on drift fishery in Fujian waters. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(3): 41–47 [张澄茂, 张壮丽, 叶孙忠, 等. 福建海区流刺网渔业的调查和管理研究. *海洋水产研究*, 2005, 26(3): 41–47]
- Zhang J, Sun MC. Research progress on size selectivity of gillnet. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 1040–1048 [张健, 孙满昌. 刺网渔具选择性研究进展. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 1040–1048]
- Zhang P, Yang L, Zhang XF, *et al.* Study on selectivity of different mesh size gillnet for *Nemipterus virgatus* in South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(2): 61–66 [张鹏, 杨吝, 张旭丰, 等. 刺网网目尺寸对南海区金线鱼选择性研究. *南方水产*, 2005, 1(2): 61–66]

(编辑 冯小花)

Fishing Capacity Comparison of Different Types of Gillnet in the Liaodong Bay

XING Binbin², GUO Rui^{1,2}, LI Xiansen¹①, ZHAO Xianyong¹, ZHANG Guosheng²,
XU Chuancai², SUN Shan¹, YOU Zongbo¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, 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. College of Marine Science and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116021)

Abstract In order to improve the fishing techniques and management level of offshore fishery resources, promote the implementation of National Marine Fishing Gear Catalog, selectivity among single gillnet (with the mesh sizes 40 mm, 50 mm, 60 mm), double gillnet, trammel gillnet and productive fishing gear (control group) was compared in the Liaodong Bay during October to November 2014. The results showed that the catch species of all experimental and productive fishing gear was between 6 and 9; the dominant species of experimental and productive fishing gear were *Oratosquilla oratoria* (dominance decreased with the increased mesh size) and *Lateolabrax japonicas* (dominance increased with the increased mesh size). There were significant differences on yields of the same type nets with different mesh size ($P=0.0003$, $P=0.001$, $P=0.002$), compared the CPUE of 60 mm with 40 mm, the single gillnet is 800%, the double gillnet is 650% and the trammel gillnet is 500%; but the influence on catch yields of the different type nets with same mesh size was relatively small. The average similarity of intra-group catch composition of the network was: single gillnet 59.24%, double gillnet 62.63%, and trammel gillnet 66.51%; Meanwhile, the average similarity of the inter-group was 71.44%, 67.50% and 70.58% respectively; The species which had the highest contribution to intra-group and inter-group average similarity were *O. oratoria* and *L. japonicas*. With the increasing of mesh size, the proportion of the catch the proportion of juvenile in the catch of all types of gillnets showed a decreasing trend.

Key words Liaodong Bay; Gillnets; Mesh size; Selectivity; Catch composition; Catch performance

① Corresponding author: LI Xiansen, E-mail: lixs@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *c-Jun* 基因的克隆及免疫应答分析*



于孟君^{1,2} 孙璐明^{1,2} 陈亚东^{2,3} 陈学杰² 杨光²
刘洋¹ 仇雪梅¹ 沙珍霞^{2,3}①

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 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. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071)

摘要 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)AP-1 家族转录因子 *c-Jun* 基因(Jun proto-oncogene)及其在免疫应答中的作用尚无报道。本研究根据半滑舌鳎转录组数据库中预测的 *c-Jun* 序列, 通过 RACE 技术和 PCR 扩增方法获得了半滑舌鳎 *c-Jun* 基因 cDNA 全长 2093 bp, CDS 区域共 981 bp, 编码 326 个氨基酸, 5' UTR 区域 377 bp, 3' UTR 区域 735 bp。SMART 分析显示, C-JUN 蛋白具有 2 个结构域: AP-1 家族典型结构域 Jun, 以及高度保守的亮氨酸拉链结构域(BRLZ)。经蛋白多序列同源比对、系统进化树分析, 发现半滑舌鳎 *c-Jun* 与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *c-Jun* 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析显示, *c-Jun* 基因在半滑舌鳎不同组织中普遍表达, 在卵巢中表达量最高。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)人工感染半滑舌鳎后, *c-Jun* 基因在肝脏、脾脏、头肾、小肠、鳃、血液中表达量都出现不同程度上调, 其中, 鳃中变化最明显: 感染 12 h 后表达量达到 0 h 时的 13.20 倍。使用 LPS、PGN、PolyI:C 和 WGP 病原模拟物刺激半滑舌鳎外周血淋巴细胞, 结果显示, WGP 诱导 *c-Jun* 基因上调表达, 而 LPS 与 PolyI:C 均下调基因表达。以上实验结果表明, *c-Jun* 基因在半滑舌鳎的免疫防御中发挥重要作用。

关键词 半滑舌鳎; 转录因子 *c-Jun* 基因克隆; 表达分析; 病原感染; 免疫应答

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0031-09

原癌基因 *c-Jun* 是促分裂原活化蛋白激酶 AP-1 (Activator protein 1)复合物家族的一个重要转录因子。AP-1 复合物包括 *Jun*(Jun proto-oncogene)(*c-jun*、*jun-B* 和 *jun-D*)、*Fos*(*c-Fos*、*Fos-B*、*Fra-1* 和 *Fra-2*) 及 *Atf* (Activating transcription factor)因子(Eferl *et al.*, 2003)。在细胞的催化区域, *c-Jun* 和 *c-Fos* 通过亮氨酸拉链结构(BRLZ, Leucine zipper structure domain)相互结合, 再通过 *Atf* 蛋白嵌合, 形成异质二聚体, 并绑定 AP-1 启动子结合位点, 调节神经元中下游基

因的转录(Angel *et al.*, 1988; Bohmann *et al.*, 1987)。JUN 蛋白以及 FOS 蛋白组成 DNA 结合蛋白, 根据不同的生物体信号指挥转录调节基因的表达, 它主要参与体内免疫应答, 调节细胞增殖分化、肿瘤生长、细胞死亡(Blau *et al.*, 2012; Karin *et al.*, 2001; Shaulian, 2010; Vesely *et al.*, 2009)。*c-Jun* 基因以及其家族转录因子广泛参与到 B 细胞受体信号通路、T 细胞受体信号通路、MASP 信号通路以及 JNK 信号通路等诸多的信号通路中, 并在各个通路中发挥着重要的信号传

* 国家自然科学基金(31172439)和国家 863 高技术计划(2012AA10A401-4)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31172439), and the National High Technology Development Program of China (863) (2012AA10A401-4)]. 于孟君, E-mail: ymj31362009@163.com

① 通讯作者: 沙珍霞, 研究员, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-01-25, 收修改稿日期: 2016-02-29

导作用,因此,对 *c-Jun* 以及相关转录因子的研究必将对信号通路的探索提供重要线索(Novoszel, 2013)。

c-Jun 的研究始于 20 世纪 80 年代中后期,研究表明其在哺乳动物、鸟类的生长发育、免疫应答中起着重要作用(Alladi *et al*, 2005; Santos *et al*, 2012)。目前, *c-Jun* 家族基因的克隆以及功能已在一些鱼类中进行了研究,包括鲫鱼(*Carassius auratus*) (Fujikawa *et al*, 2006)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*) (李园园等, 2013)、点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Wei *et al*, 2015)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Matsuoka *et al*, 1998)等,但在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中却未有相关报道。半滑舌鳎是我国重要的海水养殖鱼类,养殖规模日益扩大,而养殖病害问题一直是影响产业可持续发展的瓶颈。因此,探讨半滑舌鳎抗病分子机制将会对半滑舌鳎的病害防治提供重要理论基础,本研究将重点解析 *c-Jun* 基因鉴定、表达模式及免疫应答表达分析,以期阐明半滑舌鳎免疫机制的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼以及病原

实验用半滑舌鳎购于日照东鑫现代渔业技术研究所,为 1.5 龄鱼,平均体长为 30 cm。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)由本实验室自行保存。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国);总 RNA 提取试剂盒(天根);Trans-T1(全式金);PrimeScript™ RT reagent 试剂盒(Perfect Real-time) (TaKaRa);5'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa);3'-Full RACE 试剂盒(TaKaRa, 大连)等。

1.3 实验方法

1.3.1 鳃弧菌感染实验 实验鱼暂养于 60 cm×30 cm×40 cm 塑料箱中,20–22℃水温条件下暂养 7 d 以消除环境胁迫。鳃弧菌感染实验参照 Sha 等(2012)略作修改,实验组按照 3.18×10^5 CFU/g (半数致死量, LD₅₀)的剂量进行腹腔注射,对照组注射等体积 1×PBS 溶液。分别在注射后 0、6、12、24、48、72 h 共 6 个时间点取样,每个时间点 3 个样本,分别取肝、小肠、脾、头肾、鳃、血液 6 种组织;另外,随机选 3 条健康鱼,分别收集肝、脾、头肾、后肾、小肠、胃、血液、鳃、皮肤、肌肉、心脏、脑、卵巢 13 个组

织,所有组织迅速投入液氮中,随后将其转移至–80℃冰箱中保存,用于总 RNA 提取。

1.3.2 细胞感染实验 脂多糖 Lipopolysaccharide (LPS, 革兰氏阴性菌模拟物)、肽聚糖 Peptidoglycan (PGN, 革兰氏阳性菌模拟物)、聚肌胞 Poly muscle cell (PolyI:C, 病毒模拟物)和葡聚糖 Dextran(WGP, 真菌模拟物)分别稀释到 50 ng/ml、100 μg/ml、50 μg/ml、50 μg/ml,感染 6 孔板中接种的半滑舌鳎外周血淋巴细胞, PBS 组为对照组,每组 3 个平行。感染后 0.5 h 收集细胞悬液,1000 r/min、5 min 离心去培养基,使用 PBS 洗涤半滑舌鳎外周血淋巴细胞数次,加入新培养基进行培养。分别在 0、2、6、12、24 h 共 5 个时间点取样。低温离心去上清,各加 1 ml TRIzol 试剂收集细胞,–80℃冰箱超低温保存,待提取 RNA。

1.3.3 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 液氮条件下研磨收集的组织,先加入 500 μl 的裂解液 RZ 裂解并研磨充分,最后再加入 500 μl 裂解液充分裂解,具体步骤参照总 RNA 提取试剂盒(天根)提取操作说明,得到的 RNA 在 1%琼脂糖上进行电泳检测,并用紫外分光光度计检测所提取的 RNA 浓度及质量。取 1 μl 的 RNA,按照 TaKaRa 反转录试剂盒(TaKaRa)说明书,首先去除基因组 DNA,再进行反转,反转产物稀释到相应倍数作为 qRT-PCR 模板。

1.3.4 *c-Jun* 基因的克隆 根据本实验室转录组测序获得的 *c-Jun* 基因 cDNA 序列(Zhang *et al*, 2015),运用 Primer 5.0 软件设计 CDS 扩增引物 *c-Jun*-F、*c-Jun*-R(表 1),以半滑舌鳎混合组织 cDNA 为模板,扩增目的基因;设计 5'-RACE 扩增引物 RACE-F1、RACE-R1 和 3'-RACE 扩增引物 RACE-F2、RACE-R2 (表 1),按照 TaKaRa RACE 扩增试剂盒说明书对 5'-UTR 和 3'-UTR 进行扩增。PCR 产物用 1%琼脂糖检测,进行切胶回收,连接 T 载体,转化到感受态细胞中,并孵育、涂板,培养过夜后挑取单克隆,菌液 PCR 检测选取阳性单克隆后送苏州金唯智生物有限公司测序。

1.3.5 C-JUN 蛋白的生物信息学分析 运用 NCBI 的 Protein Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析半滑舌鳎 C-JUN 和其他同源蛋白的相似性,SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质结构域 ClustalW(<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)以及 MEGA 5.0 (<http://megasoftware.net/>)进行序列比对,采用 Neighbour-Joining 方法构建系统进化树。

1.3.6 *c-Jun* 基因组织表达分析 运用实时荧光定量 PCR 技术检测 *c-Jun* 基因在各个组织中的表达情

况。以半滑舌鳎 18S rRNA 作为内参, 采取三步法进行 PCR 扩增: 95℃ 预变性 15 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 20 s, 最后 72℃ 延伸 30 s, 同时采集荧光信号, 共 40 个循环, 程序自动加入熔解曲线分析, 分析结束后采用 ABI-7500Fast 自有软件 SDS v2.0.6 对扩增曲线、熔解曲线分析, 相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 7500 software v2.0.6 处理结果后导出相对定量数据, 用 SPSS 19.0 对数据进行单因素分析, 利用 Origin 9.0 制作相对定量表达柱状图。18S rRNA 扩增引物和组织特异性检测引物序列见表 1。

2 结果

2.1 *c-Jun* 基因 cDNA 序列扩增

以半滑舌鳎混合组织为模板, 扩增得到 *c-Jun* 基因 cDNA 全长为 2093 bp, CDS 区域共含有 981 个碱基, 编码 326 个氨基酸, 其 5' UTR 为 377 bp, 3' UTR 为 735 bp。预测编码蛋白质的分子量约为 35.9 kDa, 等电点为 8.24。通过在线蛋白质结构与预测软件 Smart 分析得 *c-Jun* 编码的蛋白质含有 JUN 结构域和 1 个高度保守的亮氨酸拉链(BRLZ)结构域(图 1)。

表 1 实验所用引物

Tab.1 Primers and their sequences used in this study

引物 Primers	碱基序列 Base sequence(5'-3')	用途 Application
C-JUN-F	CAGCGGCAGCAGATAAGG	扩增 C-JUN ORF 上游引物
C-JUN-R	CACAGAACTTTAGCGGGTC	扩增 C-JUN ORF 下游引物
CS-18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	内参上游引物
CS-18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGGTTAC	内参上游引物
C-JUN-RT-F	TACGGATACAGCGACGCCA	<i>c-Jun</i> 定量上游引物
C-JUN-RT-R	CCGTTGCTGGACTGGATG	<i>c-Jun</i> 定量下游引物
Race-F1	TGCGTTGCCGCCTATCTCTCT	扩增序列 5'UTR 区域
Race-R1	CTAATACGACTCACTATAGGGC	扩增序列 5'UTR 区域
Race-F2	GAGGCTGGAGGATAAAGTGAAGAACCTC	扩增序列 3'UTR 区域
Race-R2	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	扩增序列 3'UTR 区域

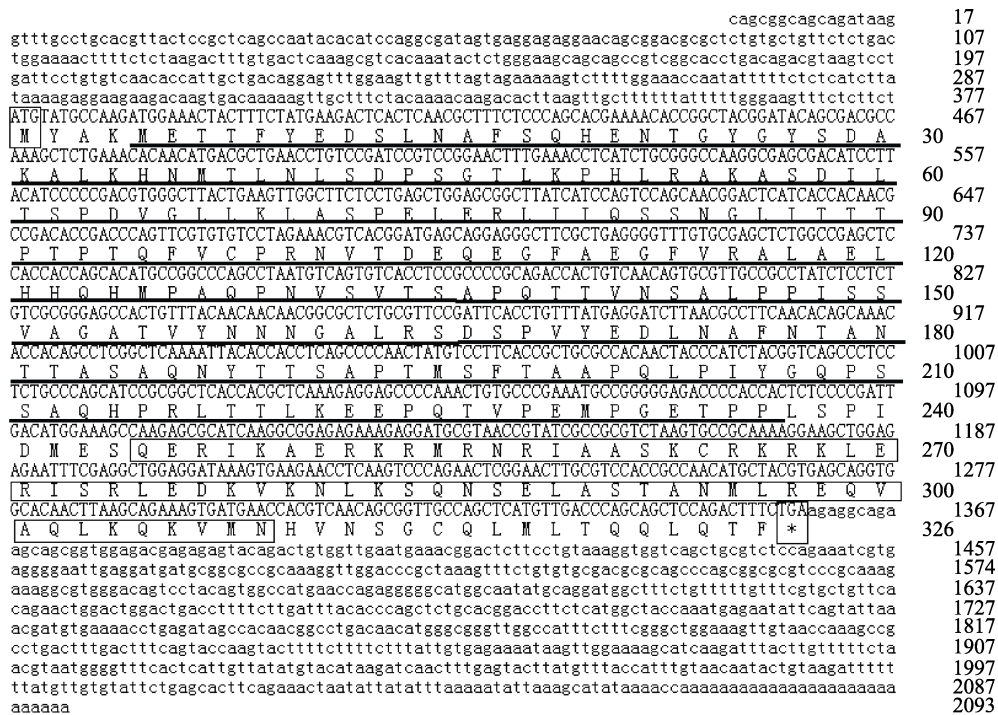


图 1 半滑舌鳎 *c-Jun* 基因 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *C. semilaevis c-Jun*

图中下划线所标出的 5-236 号氨基酸为 JUN 结构域, 用方框圈出的 245-309 号氨基酸为亮氨酸拉链结构域(BRLZ) The JUN domain from No.5 to No.236 amino acid residues is marked by an underline, the leucine zipper structure domain (BRLZ) from No.245 to No.309 amino acid residues is marked by a box

2.2 氨基酸多序列比对及系统进化树分析

利用 Protein blast 对在 NCBI 数据库中下载的其他物种: 斑马鱼(Danio rerio, NP_956281.1)、大黄鱼(Larimichthys crocea, XP_010738075.1)、非洲爪蟾(Xenopus laevis, NP_001084266.1)、红鳍东方鲀(Takifugu rubripes, XP_003974079.1)、虹鳟(Oncorhynchus mykiss, NP_001117883.1)、孔雀鱼(Poecilia reticulata, XP_008405560.1)、罗非鱼(Oreochromis niloticus, XP_005478994.1)、青鳉(Oryzias latipes, XP_004068223.1)、原鸡(Gallus gallus, NP_001026460.1)、人(Homo sapiens, NP_002219.1)、小鼠(Mus

musculus, NP_034721.1)的 C-JUN 蛋白同源序列进行氨基酸序列比对(图 2)。结果显示, 半滑舌鲷 C-JUN 蛋白序列与其他物种相似度很高, 与大黄鱼 C-JUN 序列相似高达 94%, 与其他几种常见硬骨鱼类相似度在 90%左右, 亮氨酸拉链结构域氨基酸序列在不同的物种之间均呈现出高度的相似性。系统进化树分析显示(图 3), 鱼类的 c-Jun 聚为一支, 其中, 半滑舌鲷首先与虹鳟聚为一支; 红鳍东方鲀首先与青鳉聚为一支, 然后又与大黄鱼、罗非鱼聚为一支。鱼类与两栖类、鸟类和哺乳类的 c-Jun 分别聚类在两大不同的分支上, 显示鱼类的亲缘关系更为接近。

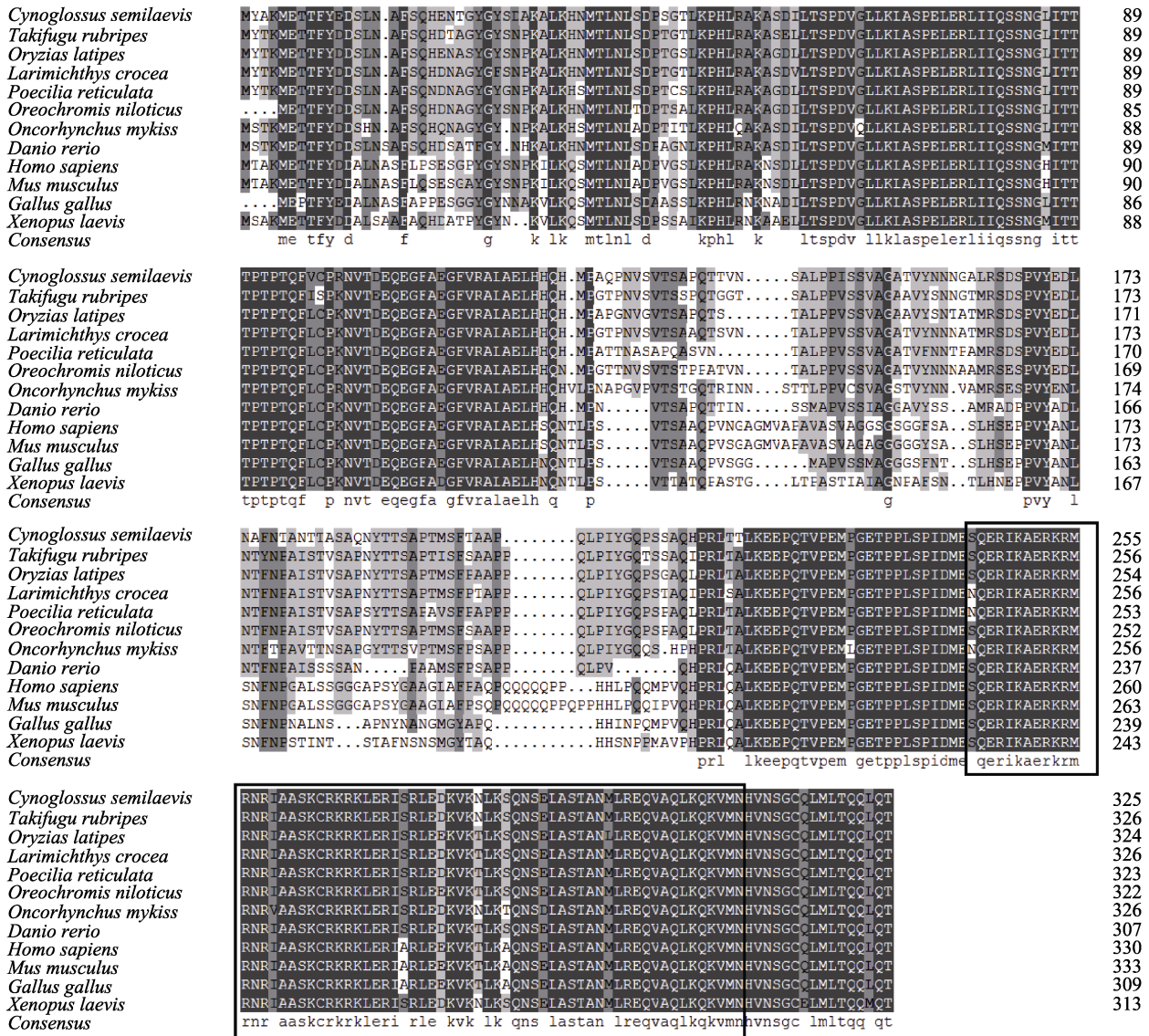
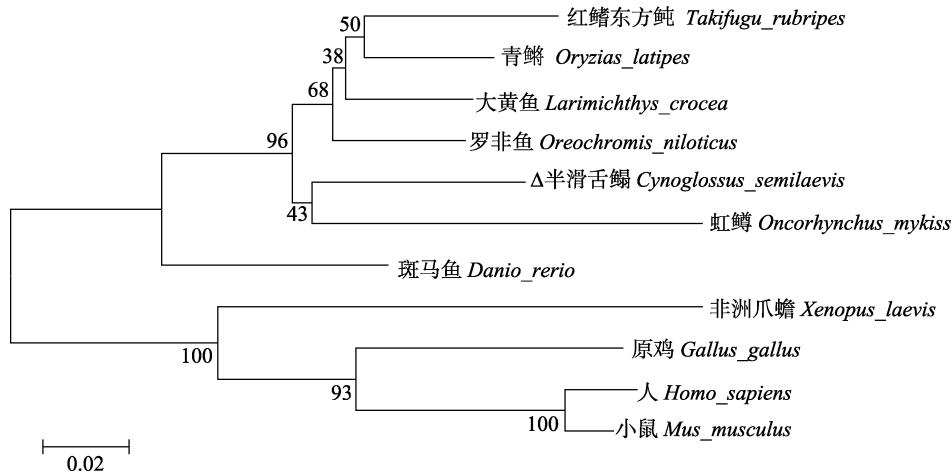


图 2 半滑舌鲷 C-JUN 蛋白质多重序列比对结果

Fig.2 The multiple sequence alignment of the C-JUN protein

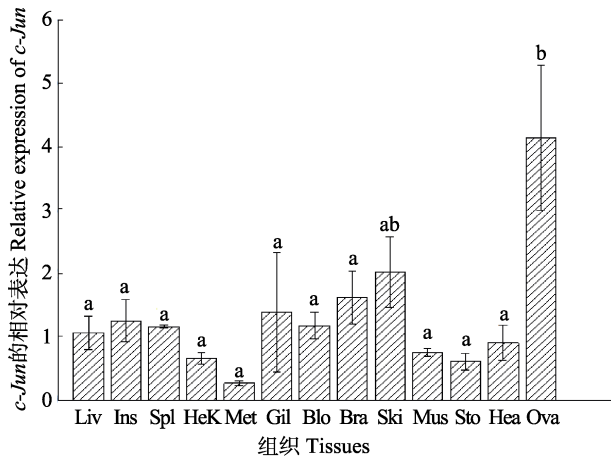
用黑色线框标注的是亮氨酸拉链结构域(BRLZ)

Leucine zipper structure domain (BRLZ) is marked by a black box

图 3 半滑舌鲷 *c-Jun* 与其他物种 *c-Jun* 系统进化分析Fig.3 Phylogenetic analysis of *C. semilaevis c-Jun* sequence with other *c-Jun* sequences in fish, amphibians, birds and mammals

2.3 *c-Jun* 基因在健康鱼中的实时荧光定量分析

c-Jun 基因在健康半滑舌鲷 13 种组织: 肝脏、小肠、脾脏、头肾、后肾、鳃、血液、脑、皮肤、肌肉、胃、心脏、卵巢中均有不同程度的表达(图 4)。其中, 卵巢中的表达量最高, 后肾中的表达最低, 卵巢中的

图 4 半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在不同组织中的表达分布Fig.4 *c-Jun* gene of *C. semilaevis* expression profile in different tissues

Liv: 肝脏; Ins: 小肠; Spl: 脾脏; HeK: 头肾; Met: 后肾; Gil: 鳃; Blo: 血液; Bra: 脑; Ski: 皮肤; Mus: 肌肉; Sto: 胃; Hea: 心脏; Ova: 卵巢。图中“a, b”为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组, 有相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 无相同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Liv: Liver; Ins: Intestine; Spl: Spleen; HeK: Head-kidney; Met: Metanephros; Gil: Gill; Blo: Blood; Bra: Brain; Ski: Skin; Mus: Muscle; Sto: Stomach; Hea: Heart; Ova: Ovary. The letters “a, b” were subsets by Duncan algorithm. The same letters indicated no significant difference ($P>0.05$), the different letters indicated significant difference ($P<0.05$)

表达量是后肾中的 14.43 倍; 其次在皮肤中的表达较高, 另外在脑、鳃、肝、脾、小肠组织中也都有较高的表达。

2.4 鳗弧菌感染半滑舌鲷后 *c-Jun* 基因在不同组织、不同时间点的表达分析

鳗弧菌感染半滑舌鲷后, *c-Jun* 基因在主要免疫组织的表达如图 5 所示。*c-Jun* 的表达量在 6 种组织(肝脏、脾脏、鳃、血液、头肾、小肠)均呈现上升趋势, 达到峰值后开始降低到正常量。鳃和血液中变化趋势最为明显, 设定 0 h 表达量为标准, 表达量为 1, 在鳃中 12 h 的表达量达到 0 h 的 13.20 倍($P<0.01$), 之后在 24 h 迅速下降到 0 h 的 2.10 倍($P<0.05$), 开始回归正常水平; 血液中的表达变化趋势与鳃中相似, 也在 12 h 达到最高峰, 是 0 h 表达水平的 5.79 倍($P<0.01$), 之后也开始下降; 其他免疫相关的组织中也呈现不同程度的上升趋势, 其中, 肝脏中表达峰值为 0 h 的 4.32 倍($P<0.01$), 小肠组织中的变化是在 6 h 时上升到最高, 为 0 h 的 4.75 倍($P<0.01$); *c-Jun* 基因在脾和头肾表达峰值均出现在 24 h, 头肾中 24 h 表达量是 0 h 的 4.62 倍($P<0.01$); 脾脏中 24 h 时的表达量为 0 h 的 3.41 倍($P<0.01$)。

2.5 *c-Jun* 在外周血淋巴细胞中的表达分析

c-Jun 基因在不同病原模拟物处理后的外周血淋巴细胞中表现出不同的表达趋势(图 6)。其中, LPS 处理后的细胞中 *c-Jun* 表达量呈现下降趋势, 2 h 后表达量即下降到了 0 h 时的 33.26%, 并一直保持在低的表达状态; PGN 处理组没有明显的变化; PolyI:C 处理后表达量也下降; WGP 组处理之后, *c-Jun* 基因

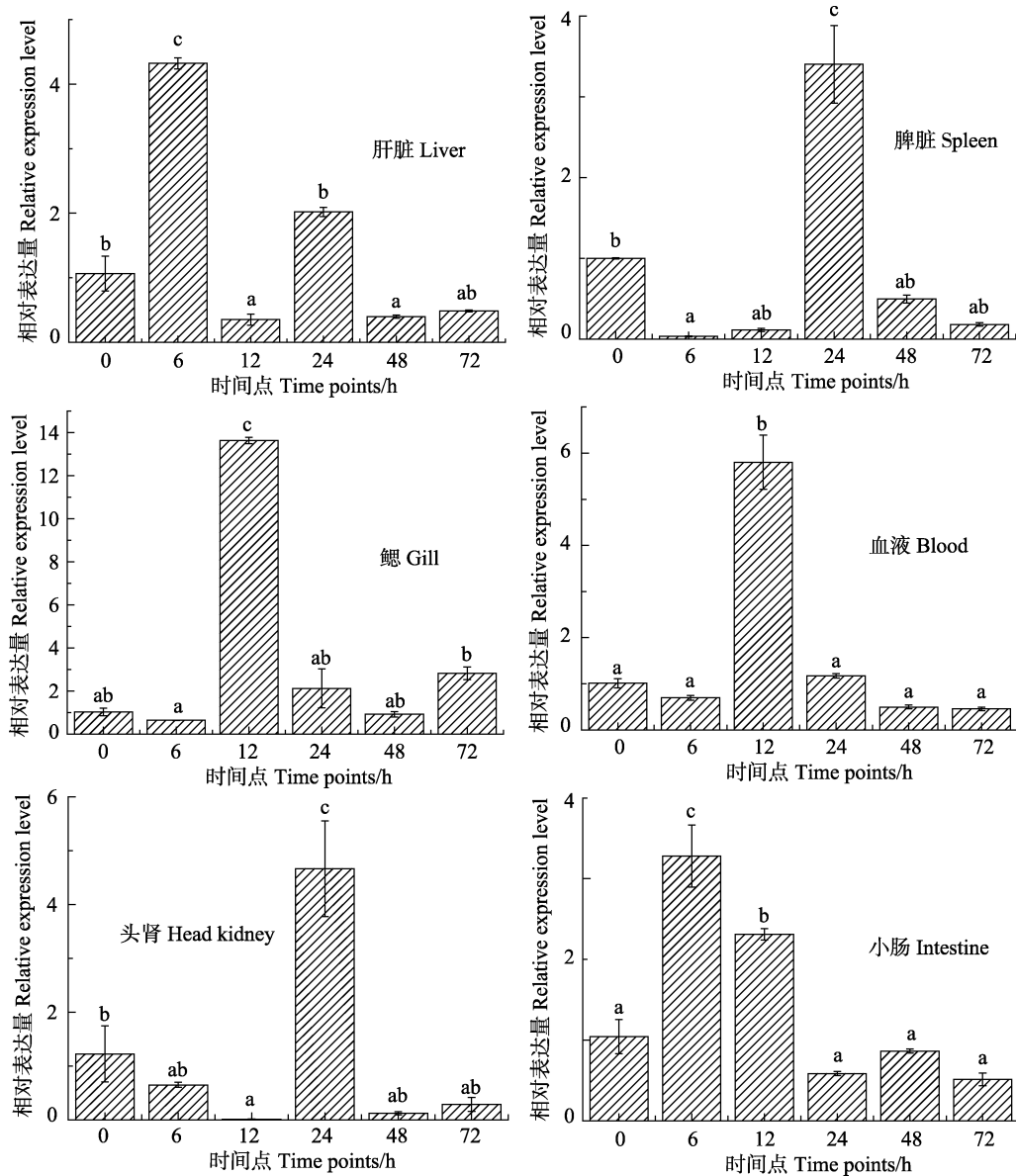


图 5 鳃弧菌感染后半滑舌鲷 *c-Jun* 在免疫组织中表达变化

Fig.5 The expression of *C. semilaevis c-Jun* gene in immunologic tissues after *V. anguillarum* infection

图中“a, b, c”为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组，下同
The letters “a, b, c” were subsets by Duncan algorithm, the same as below

表达量有所升高，在 6 h 相对表达量达到峰值，为 0 h 时的 2.49 倍，之后在 12 h、24 h 时呈现下降趋势。

3 讨论

本研究结果显示，半滑舌鲷 C-JUN 蛋白中具有典型的亮氨酸拉链结构域，而且通过蛋白质多重序列比对得知，不同物种之间 C-JUN 的亮氨酸拉链结构域具有高度的保守性，由此可以推测，半滑舌鲷的 C-JUN 可能通过亮氨酸拉链结构域结合特异目标蛋白，从而在不同的信号通路中发挥信号传递、调控的

功能(Angel *et al.*, 1988)。

c-Jun 基因在健康半滑舌鲷不同的组织中呈现组成型表达，谭俊等(2012)¹⁾在文昌鱼(*Branchiostoma japonicum*)的研究已经证明了 *AP-1* 家族基因与卵巢发育、机体免疫密切相关；本研究中，半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在卵巢中表达量最高，由此可以推测，半滑舌鲷 *c-Jun* 基因在卵巢发育或母源免疫中或许发挥重要的作用。

经鳃弧菌感染后 *c-Jun* 基因在半滑舌鲷各免疫组织都呈现出不同程度的上调趋势，推测 *c-Jun* 转录因子参与了革兰氏阴性菌引起的机体免疫信号传导。结

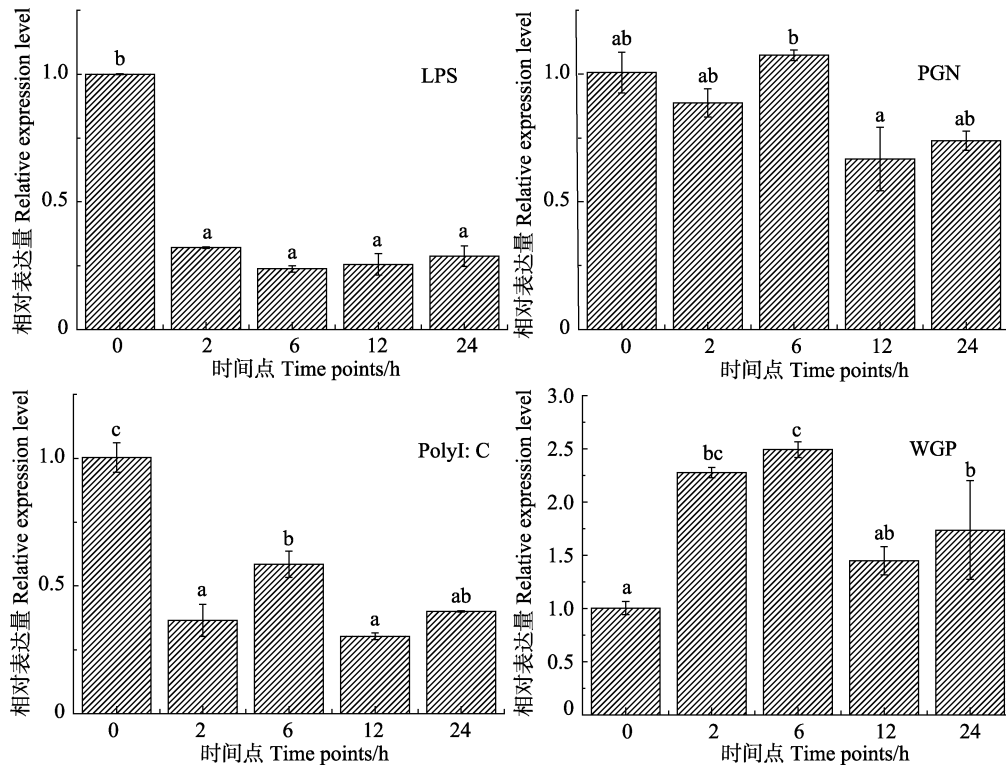


图 6 病原模拟物处理后半滑舌鳎 *c-Jun* 基因在外周血淋巴细胞中的表达分布
Fig.6 The expression of *C. semilaevis c-Jun* gene in lymphocyte after stimulation with LPS, PGN, Poly I: C and WGP respectively

合之前学者对 *AP-1* 家族基因参与免疫反应机制的研究(Ameyar *et al*, 2003; 吴冰等, 2014), 推测在半滑舌鳎 B 细胞受体激活的通路中, 机体经过外源细菌刺激后, 会迅速发生信号传递作用于通路下游因子, 而受通路信号刺激之后, *c-Jun* 基因与 *c-Fos* 基因会迅速而短暂地被诱导表达(Tischmeyer *et al*, 1999), 由于二者都具有亮氨酸拉链结构, 因此可以在 *Atf* 基因的嵌合作用下形成二聚体, 然后再与 DNA 序列特异性的结合(Uimari *et al*, 1997)作用在 B 细胞膜受体上激活 B 细胞通路, 从而使 B 细胞尽快参与到体液免疫, 发挥免疫应答作用。

LPS、PolyI:C、WGP 分别是革兰氏阴性菌、病毒、真菌真菌模拟物, 经不同病原模拟物处理后, 在淋巴细胞的表达只有 WGP 组出现明显上调趋势, LPS、PolyI:C 组经处理后呈现不同程度的下调趋势, 而 PGN 组没有明显的变化。由此可以推测, *c-Jun* 在介导信号通路的过程中, 对病原的识别具有广谱性, 但由于体外单独的培养环境很难达到体内的状态, 使其缺乏了一些激活该通路的介导因子, 因此, 不会产

生像体内一样在短的时间内出现显著变化, 但该实验同时也可以从细胞层面上确定 *c-Jun* 基因在免疫过程中发挥着积极作用。

综上, 本研究报告了半滑舌鳎 *c-Jun* 基因的克隆和鉴定, 分别从个体及细胞两个水平对半滑舌鳎的 *c-Jun* 基因的表达分析进行了研究, 研究结果显示, 该基因参加了半滑舌鳎的免疫应答, 为今后更深入研究半滑舌鳎的免疫应答机理提供了详实的数据, 奠定了理论基础。

参 考 文 献

- Alladi PA, Roy T, Singh N, *et al*. Developmentally regulated expression of c-Fos and c-Jun in the brainstem auditory nuclei of *Gallus domesticus* is modified by prenatal auditory enrichment. *Journal of Neurobiology*, 2005, 62(1): 92–105
- Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman J. A role for AP-1 in apoptosis: The case for and against. *Biochimie*, 2003, 85(8): 747–752
- Angel P, Allegretto EA, Okino ST, *et al*. Oncogene *jun* encodes a sequence-specific *trans*-activator similar to AP-1. *Nature*, 1988, 332(6160): 166–171

1) Tan J. Molecular cloning and expression of transcription factor *AP-1* in amphioxus *Branchiostoma japonicum*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [谭俊. 日本文昌鱼转录因子 *AP-1* 基因的克隆和表达. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

- Blau L, Knirsh R, Bendror I, *et al.* Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(42): 2875–2884
- Bohmann D, Bos TJ, Admon A, *et al.* Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 1987, 238(4832): 1386–1392
- Eferl R, Wagner EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(11): 859–868
- Fujikawa Y, Kozono K, Esaka M, *et al.* Molecular cloning and effect of *c-fos* mRNA on pharmacological stimuli in the goldfish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(2): 253–259
- Karin M, Shaulian E. AP-1: Linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life*, 2001, 52(1–2): 17–24
- Li YY, Ma JG, Li XY. Cloning and sequence analysis of immediately early genes (*c-fos* & *c-jun*) in *Hypophthal-michthys molitrix*. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34(6): 63–69 [李园园, 马军国, 李效宇. 鲢即刻早期基因 *c-fos* 和 *c-jun* 的克隆及其序列分析. *水生态学杂志*, 2013, 34(6): 63–69]
- Matsuoka I, Fuyuki K, Shoji T, *et al.* Identification of *c-fos* related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1998, 1395(2): 220–227
- Novoszel P. The role of the AP-1 proteins c-Jun and JunB in the development and function of plasmacytoid dendritic cells. *Uniwienn*, 2013
- Santos FR, Diamond-Stanic MK, Prasannarong M, *et al.* Contribution of the serine kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) to oxidant-induced insulin resistance in isolated rat skeletal muscle. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2012, 118(5): 231–236
- Sha ZX, Wang QL, Liu Y, *et al.* Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 914–921
- Shaulian E. AP-1—the Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise. *Cellular Signalling*, 2010, 22(6): 894–899
- Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1999, 55(4): 564–574
- Uimari A, Strommer J. Myb26: A MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant Journal*, 1997, 12(6): 1273–1284
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, *et al.* Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2009, 682(1): 7–12
- Wei S, Huang Y, Huang X, *et al.* Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 230–240
- Wu B, Liu YC, Zhang YC, *et al.* Cloning and expression profile analysis of *AP-1* gene from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 9–14 [吴冰, 刘逸尘, 张亦陈, 等. 凡纳滨对虾 *AP-1* 基因的克隆和表达特征分析. *水产学报*, 2014, 38(9): 9–14]
- Zhang X, Wang S, Chen S, *et al.* Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in immunity in *Cynoglossus semilaevis* during *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 209–218

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression of the *c-Jun* Gene in Immune Response to Pathogen Challenge in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

YU Mengjun^{1,2}, SUN Luming^{1,2}, CHEN Yadong^{2,3}, CHEN Xuejie², YANG Guang²,
LIU Yang¹, QIU Xuemei¹, SHA Zhenxia^{2,3}①

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023;

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. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071)

Abstract The transcription factor *c-Jun* (jun proto-oncogene) of AP-1 family and its role in immune response is unknown in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) so far. Based on *c-Jun* genetic partial cDNA sequence of half-smooth tongue sole, the complete cDNA sequence is obtained by RACE and PCR application. The cDNA of *c-Jun* is 2093 bp in length, including a 377 bp 5'-terminal untranslated region (UTR), a 735 bp 3'-terminal UTR and a 981 bp open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 326 amino acids. The deduced amino acid sequence of *c-Jun* possesses a Jun domain which is a typical structure domain in AP-1 family and a high conservative leucine zipper structure domain (BRLZ). The protein sequence alignment and phylogenetic tree analysis suggested that the half-smooth tongue sole *c-Jun* gene is closely related to that of the rainbow trout's (*Oncorhynchus mykiss*). Tissue expression analysis by quantitative real-time reverse transcription PCR showed that the *c-Jun* mRNA was constitutively expressed in all examined tissues with the predominant expression in the ovary. After infection with *Vibrio anguillarum*, the half-smooth tongue sole *c-Jun* transcript levels exhibited distinct time-dependent response patterns in the liver, spleen, head kidney, intestine, gill and blood. Among the tested tissues, changes in gill is the most obvious, and it reached the peak level 13.20-fold at 12 h post-infection. After challenge with different pathogenic (LPS, PGN, PolyI:C, WGP) in lymphocyte, the *c-Jun* gene in the WGP group showed up-regulation, while in the LPS group and PolyI:C group it showed down-regulation, while, there was no significant change in the PGN group. The results suggested that the *c-Jun* gene plays a vital role in the immune response in half-smooth tongue sole and might play an important role in half-smooth tongue sole host defense against the bacteria infection.

Key words Half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*; Transcription factor *c-Jun* gene cloning; Expression analysis; Pathogen challenge; Immune response

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20151203002

http://www.yykxjz.cn/

星斑川鲈、石鲈及其杂交一代(星斑川鲈♀×石鲈♂) 的线粒体 DNA 序列比较分析*

李 青^{1,2} 郑风荣¹ 关洪斌² 倪世俊³ 王 波^{1①}

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061;

2. 山东大学海洋学院 威海 264209; 3. 乳山渔政监督管理站 乳山 264500)

摘要 本研究以线粒体基因细胞色素 b (Cytochrome b, *Cytb*)和细胞色素 C 氧化酶 I (Cytochrome oxidase subunit I, *COI*)为研究对象,探究比较了星斑川鲈(*Platichthys stellatus*)、石鲈(*Kareius bicoloratus*)以及杂交 F₁代(星斑川鲈♀×石鲈♂)的种质遗传特性。结果显示,杂交子代与亲本的碱基(A+T)含量均高于(C+G)含量,且杂交 F₁代与母本星斑川鲈的(C+G)相同。基于 mtDNA *Cytb* 和 *COI* 序列结果显示,石鲈与星斑川鲈遗传距离分别为 0.085 和 0.045;杂交 F₁代与石鲈遗传距离分别为 0.076 和 0.045。基于 mtDNA *Cytb* 序列显示,杂交 F₁代与星斑川鲈遗传距离很小,仅 0.009,而两者在 *COI* 基因序列上完全一致。基于 Kimura 2-parameter 模型的 NJ 分子系统树均显示,星斑川鲈和杂交 F₁代聚为一支,石鲈单独聚为一支。以上结果均可得出,杂交后代在线粒体 DNA 上呈现明显的母系遗传。杂交后代中出现左右眼的分化,且在 *COI* 的 NJ 系统树中,杂交 F₁代与母本星斑川鲈形成的一大支又分为两支:母本星斑川鲈与杂交 F₁代中外观显示左眼的聚为一支,杂交 F₁代中外观显示右眼的单独聚为一小支。表明线粒体基因 *COI* 与杂交 F₁代左右眼的分化有一定关系,为进一步研究星斑川鲈♀×石鲈♂提供了参考数据。

关键词 星斑川鲈; 石鲈; 杂交; 线粒体 DNA

中图分类号 Q321 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0040-10

星斑川鲈(*Platichthys stellatus*)隶属鲈形目、鲈科、川鲈属(王波等,2010),主要分布在 33°-73°N 和 105°W-127°E 的太平洋和北冰洋海域以及附近的河流(Miao *et al*, 2009)。星斑川鲈鱼体扁平形,体较高,两眼突出,养殖群体中大约有 95%-97%的个体两眼位于体左侧,右侧仅占 3%-5%(王波,2010)¹⁾。石鲈(*Kareius bicoloratus*)隶属鲈形目、鲈科、石鲈属,主要

分布于我国东海、黄海、渤海以及日本和朝鲜近海(张少华等,2004)。石鲈体呈椭圆形,侧扁,两眼位于头的右侧(刘曼红等,2009)。星斑川鲈和石鲈营养成分高、肉质鲜美,是我国重要的渔业资源和养殖对象。杂交育种是一种常用的育种方式(Hashimoto *et al*, 2012),杂交后代具有亲鱼双方的遗传物质(Purdom *et al*, 1974; Šimková *et al*, 2015),甚至可以表现出比亲鱼还

* 国家高技术发展计划(863 项目) (2012AA10413-4)和国家海洋公益性行业科研专项 (201305005; 201405010)共同资助 [This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10413-4), and National Marine Public Welfare Industry Research Special (201305005, 201405010)]. 李 青, E-mail: liqingshdwh@163.com

① 通讯作者: 王 波, 研究员, E-mail: ousun@fio.org.cn

收稿日期: 2015-12-03, 收修改稿日期: 2016-01-10

1) Wang B. Study on the biological characteristics and healthy breeding technology of *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 [王波. 星斑川鲈的生物学及健康养殖技术研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2010]

优良的性状(Garrett, 2005), 比如生活能力强、适应范围广、抗逆性强和竞争能力强等。在海洋鱼类杂交实验中, 经常研究的是鲆鲽鱼类(Garrett *et al*, 2009)。

细胞色素 b 基因(*Cytb*)和细胞色素 C 氧化酶 I (*COI*)具有比线粒体 rDNA 和非编码区更容易排序、进化速率适中、易扩增和测序及富含系统发育信息等优点(俞建中, 2004¹⁾; 张迪等, 2012)。基于这些特点, 线粒体基因 *Cytb* 和 *COI* 常常被作为分子标记应用于种群遗传结构和遗传多样性的研究(Harrison, 1989; Kartavtsev *et al*, 2008; 彭博等, 2010)。而且同一线粒体引物在邻近种间也可以很好地扩增, 因此, 在杂交实验中也常常被用来评估杂交子代间的遗传分化程度, 以验证杂交子代偏母遗传特性(肖永双等, 2014b)。鲆鲽鱼类由于形态相似, 很难根据一般的形态分类法对其分类, 这就给渔业资源保护和管理带来一定困难。由于线粒体基因自然状态下单倍体和母系遗传的特性, 相比核基因标记, 线粒体基因是一种更好的分子标记。国外学者早已将线粒体基因 *Cytb* 用于鲆鲽类的鉴定(Céspedes *et al*, 1999; Sanjuan *et al*, 2002), *Cytb* 基因片段和 *D-loop* 区基因片段也曾用于鉴别鲆鲽的杂交亲子代[欧洲川鲷(*Platichthys flesus*)×欧鲽(*Pleuronectes platessa*)], *Cytb* 鉴定结果与形态鉴定结果一致, *D-loop* 区显示出不同长度的多态性(Kijewska *et al*, 2009)。本研究针对星斑川鲷、石鲷以及杂交一代(星斑川鲷♀×石鲷♂)线粒体 DNA 的 *Cytb* 和 *COI* 基因片段的遗传特性展开研究, 可为星斑川鲷和石鲷的线粒体遗传效应的研究提供理论依据, 同时为星斑川鲷和石鲷运用杂交育苗手段选育优良品种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将取自山东日照海洋水产资源增殖站的星斑川鲷雌性亲鱼和取自日照近海的野生石鲷雄性亲鱼于 2015 年 4 月在烟台蓬莱宗哲养殖公司进行同步促熟培养, 人工授精杂交, 获得受精卵并进行孵化培养。2015 年 8 月于日照海洋水产资源增殖站采集星斑川鲷 24 尾(包含亲本)、石鲷 24 尾(包含亲本); 于烟台蓬莱宗哲养殖有限公司取 30 尾平均体长为 24 mm 的

杂交幼苗, 包括左眼杂交幼苗 15 尾和右眼杂交幼苗 15 尾。所有成鱼于活体状态下取小部分尾鳍后放养。杂交幼苗取其肌肉, 在 95% 的酒精中 4℃ 保存, 回实验室后, 无菌条件下洗去酒精, 并存放于 -80℃ 以备基因组提取。

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

取每个样本的尾鳍约 30 mg, 采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)提取, 并溶于 130 μl TE 中, 于 -20℃ 保存。水浴时不断摇晃, 使样品细胞充分裂解以释放出 DNA; 加 TE 溶解前, 充分晾干使酒精挥发完全, 以免影响后续实验。星斑川鲷中用于扩增线粒体 *Cytb* 基因的引物(张岩等, 2009): 上游引物 *Cytb* F(5'-AACCACCGTTGTTATTCAACT-3'); 下游引物 *Cytb* R(5'-CTCAGAATGACATTTGTCCTCA-3')。用于扩增线粒体 *COI* 基因的引物(肖永双等, 2014a): 上游引物 *COI* F(5'-CACAAAGACATTGGCACCCT-3'); 下游引物 *COI* R(5'-CCTCCTGCAGGGTCAAAGAA-3')。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72℃ 总延伸 10 min。扩增 *Cytb* 基因的引物退火温度为 53℃, *COI* 的退火温度为 55℃。所有的 PCR 反应体系均为 50 μl: DNA 模板 1.5 μl (15 ng/μl), 上下游引物各 2 μl (10 μmol/L), 2×Reaction Mix 25 μl, ddH₂O 18.9 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.6 μl (2.5 U/μl)(东盛生物)。PCR 反应在 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 上进行。取 5 μl PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(U=5 V/cm)。将含有目的条带的 PCR 产物送北京美吉桑格生物医药科技有限公司用 ABI3730XL 自动测序仪进行单向测序, 测序反应采用与之相对应的正向引物。

1.3 序列分析

测序结果经 Dnastar 软件包(DNASTAR, Inc., 美国)校对后人工截取有效片段, GenBank 登录号: 日照星斑川鲷 KT920092-KT920114, KT920069-KT920091; 日照石鲷 KT920136-KT920157, KT920115-KT920135; 子一代 KU097360-KU097415。软件 DNA Sequence Polymorphism 5.0(DnaSP 5)(Librado *et al*, 2005)计算各个群体单倍型数(*h*)、单倍型多样性(*Hd*)(Nei, 1987)、核苷酸多样性(λ)以及平均核苷酸差异

1) Yu JZ. Pilot study of phylogeny and molecular evolution, in Pleuronectiformes of Yellow Sea. Master's Thesis of the Ocean University of China, 2004 [俞建中. 黄海鲆形目鱼类系统发生与分子进化的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]

数(k)(Tajima, 1983);软件 MEGA 6.0(Tamura *et al*, 2013) 计算碱基组成、碱基替换, 基于 Kimura 2-parameter 公式计算种间种内遗传距离, 采用(Neighbor-joining, NJ)法(设 Interior-branch test 次数是 1000)构建系统发育树, 进行系统分化分析。

2 实验结果

2.1 mtDNA *Cytb* 序列分析结果

2.1.1 *Cytb* 部分基因序列碱基组成分析 将测序结果与 GenBank 中注册的星斑川鲈和石鲈的 mtDNA *Cytb* 基因序列进行比对, 确定所得片段序列为目的片段。经 Dnastar 比对后, 截取得到有效片段为 356 bp, 应用 MEGA 6.0 中 Sequence Date Explore 分别计算星斑川鲈、石鲈以及 F_1 代群体的碱基组成频率, 结果见表 1。由表 1 可见, 3 种鲈类中(A+T)含量均高于(C+G)含量, 表现出与其他鱼类相似的碱基组成偏向性(唐文乔等, 2010)。总体来说, 3 种鲈类的碱基组成差异不大, 星斑川鲈、石鲈、杂交 F_1 代的(A+T)分别为 53.4%、53.5%、53.4%, (C+G)含量分别为 46.6%、46.5%、46.6%, F_1 代(C+G)含量与母本(C+G)含量相同。从 3 个位点分别比较发现, 星斑川鲈和杂交 F_1 代没有差异, 但二者与石鲈在第 2 位点和第 3 位点有轻微差异, 从总体分析 3 个位点, 发现第 1 位点富含 T, 第 2 位点富含 C, 且严重缺少 G, 第 3 位点较均一, 这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏性, 张艳云等(2011)在乌龟的研究中也发现了类似情况。

表 2 显示, 3 个鲈类群体共检测到 30 个变异位点(8.42%), 其中含有 29 个简约信息位点; 星斑川鲈(♀)与杂交 F_1 代之间仅有 2 个变异位点, 全部为简约信息位点; 石鲈(♂)与杂交 F_1 代之间共 30 个变异位点, 其中 29 个为简约信息位点。可见杂交 F_1 代与母

本之间差异性远远小于杂交 F_1 代与父本之间的差异性, 这也印证了线粒体母系遗传这一事实。用软件 DnaSP 检测到 3 个群体间含有 8 个单倍型, 单倍型多样性为 0.792, 平均核苷酸差异数为 12.679。如表 3 所示, 3 个群体的 356 个碱基中共有不变位点 341 个, 转换位点 13 个, 颠换位点 2 个, 转换与颠换位点的比值为 6.5, 转换明显大于颠换, 这与 Green 等(2012)得出的脊椎动物的数值是一致的。

2.1.2 3 种鲈科鱼类群体内和群体间的多样性

从表 4 可以看出, 星斑川鲈、石鲈和杂交 F_1 代各个群体个体间的序列差异均很小。父本与母本及父本与子代之间序列差异均较大, 远远大于母本与子代之间的差异, 遗传距离所反映的遗传变异关系与序列差异所反映的一致, 即线粒体基因 *Cytb* 严格遵守母系遗传。

2.1.3 分子系统树 将星斑川鲈(PSTR1-PSTR3)、石鲈(KBTS1-KBTS3)、其杂交 F_1 代(左眼 PKZY1-PKZY3, 右眼 PKZY24-PKZY26)的 *Cytb* 基因核苷酸序列随机各取 3 条, 用 MEGA 6.0 采用 NJ 法构建分子系统进化树(图 1)。星斑川鲈 KF445179.1 和石鲈 AB987795.1 分别为在 GenBank 中与星斑川鲈和石鲈 *Cytb* 序列(登录号分别为 PSTR4 和 KBTS4)相似度最高的序列。由图 1 可看出, NJ 树形成明显的两大支, 石鲈单独聚为一大支, 星斑川鲈和杂交 F_1 代聚为一支, 而且杂交 F_1 代左右眼并没有分支, 而是聚为一小支后与母本星斑川鲈聚为一大支。

2.2 mtDNA *COI* 序列分析结果

2.2.1 *COI* 部分基因序列碱基组成分析 对亲代个体 *COI* 基因片段扩增后所获得序列人工拼接后得到 557 bp, 用软件 MEGA 6.0 中 Sequence Date Explore 分别计算星斑川鲈、石鲈以及 F_1 代群体的碱基组成频率, 结果见表 5。结果显示, 亲代碱基使用情况差

表 1 *Cytb* 基因片段序列的碱基组成

Tab.1 Base composition of *Cytb* partial sequence

实验样品 Experimental samples	总碱基频率				第 1 位点				第 2 位点				第 3 位点			
	Total base frequency (%)				First site(%)				Second site(%)				Third site(%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
星斑川鲈 <i>P.stellatus</i>	31.7	28.1	21.7	18.5	39.0	22.7	19.3	19.3	28.0	41.2	22.7	8.4	29.0	20.3	22.9	28.0
石鲈 <i>K.bicoloratus</i>	32.0	28.1	21.5	18.4	39.0	22.7	19.3	19.3	29.0	41.2	22.2	8.1	29.0	20.3	22.9	28.0
杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂	31.7	28.1	21.7	18.5	39.0	22.7	19.3	19.3	28.0	41.2	22.7	8.4	29.0	20.3	22.9	28.0

表 2 *Cytb* 基因片段平均位点分析

Tab.2 The analysis of average sites of *Cytb* gene sequence

实验样品 Experimental samples	保守位点(C) Conserved sites	变异位点(V) Variable sites	简约信息位点(Pi) Parsim-info sites	自裔位点(Si) Singleton sites	0 倍简并位点 0-fold Degenerate sites	2 倍简并位点 2-fold Degenerate sites	4 倍简并位点 4-fold Degenerate sites	单倍型 Haplotypes (h)	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	平均核苷酸差异数 Mean number of nucleotide differences (k)
星斑川鲷和 F ₁ 代 <i>P.stellatus</i> and hybrids	354	2	2	0	227	60	65	2	0.509	1.017
石鲷和 F ₁ 代 <i>K.bicoloratus</i> , and hybrids	326	30	29	1	222	46	57	6	0.659	14.113
星斑川鲷和石鲷 <i>P.stellatus</i> , and <i>K.bicoloratus</i>	328	28	27	1	222	47	58	6	0.684	13.248
星斑川鲷、石鲷、杂交一代 <i>P.stellatus</i> , <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	326	30	29	1	222	46	57	8	0.792	12.679

表 3 *Cytb* 基因序列碱基替换统计

Tab.3 The base substitution of *Cytb* gene sequence

统计内容 Statistical content	不变位点 Identical Pairs (ii)	转换位点 Transitional Pairs (si)	颠换位点 Transversional Pairs (sv)	转换与颠换位点的比值(si/sv)	统计所包括的位点 All sites
星斑川鲷和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	355	1	0	—	356
石鲷和 F ₁ 代 <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	341	13	2	6.5	356
星斑川鲷和石鲷 <i>P. stellatus</i> and <i>K.bicoloratus</i>	342	12	2	6.0	356
星斑川鲷、石鲷、杂交一代 <i>P. stellatus</i> , <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	341	13	2	6.5	356

表 4 基于 Kimura 2-parameter 模型 3 个群体的 *Cytb* 序列的遗传距离

Tab.4 Genetic distances of *Cytb* sequences based on the Kimura 2-parameter model of three groups

	星斑川鲷 <i>P.stellatus</i>	石鲷 <i>K.bicoloratus</i>	杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂
星斑川鲷 <i>P.stellatus</i>	0.001		
石鲷 <i>K.bicoloratus</i>	0.085	0.005	
杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂	0.009	0.076	0

注: Kimura 2-parameter distance 双参数模型对角线以下是种群间遗传距离, 对角线以上是种群内遗传距离。表 8 同

Note: Using Kimura 2-parameter distance model. Data below the diagonal were pairwise distances, and data above the diagonal were genetic distances within one population. The same in Table 8

别不大, 其中, 星斑川鲷和杂交 F₁ 代完全一致, 每个位点间也一致, 再次证明线粒体基因 *COI* 具有明显的母系遗传特性。在总碱基频率使用方面, 星斑川鲷和杂交 F₁ 代(A+T)含量为 52.4%, (C+G)含量为 47.6%; 石鲷(A+T)含量为 52.1%, (C+G)含量为 48.0%。

在 557 bp 的 *COI* 基因片段中, 3 个鲷科种群共

检测到 26 个变异位点(4.8%)(表 6), 其中, 25 个为简约信息位点。母本星斑川鲷和杂交 F₁ 代间全部为保守位点, 未检测到变异位点, 再次有力地说明了线粒体基因母系遗传这一特性; 石鲷与杂交 F₁ 代间的变异位点和星斑川鲷与石鲷间的变异位点完全一致。如表 7 所示, 用 MEGA 6.0 检测, 发现亲子代 3 种鲷科

群体间共有 12 个转换位点, 1 个颠换位点, 转换远大于颠换; 星斑川鲮和杂交 F₁ 代间全部为保守位点。

2.2.2 3 种鲮科鱼类群体内和群体间的多样性

基于 Kimura 2-parameter 模型对 3 个群体的 COI

基因序列计算遗传距离, 结果如表 8 所示。星斑川鲮、石鲮、杂交 F₁ 代群体内部的遗传距离, 杂交 F₁ 代间与母本星斑川鲮的遗传距离, 几乎没有差别, 杂交 F₁ 代与父本石鲮间的遗传距离远远大于子代与母本间的遗传距离。

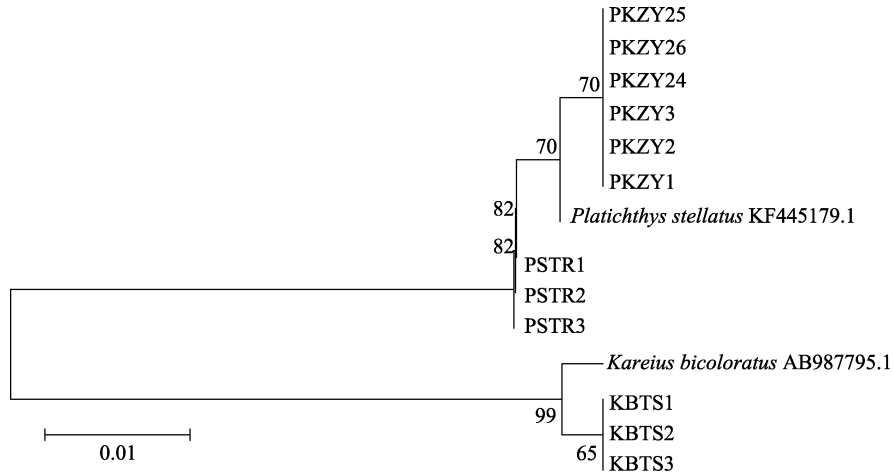


图 1 基于 Kimura 2-parameter 模型建立的邻近关系系统发育树
Fig.1 Neighbor-joining(NJ) phylogeny based on the Kimura 2-parameter model

表 5 COI 基因片段序列的碱基组成频率
Tab.5 Base composition of partial sequence of COI

实验样品 Experimental samples	总碱基频率 Total base frequency (%)				第 1 位点 First site(%)				第 2 位点 Second site(%)				第 3 位点 Third site(%)			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
星斑川鲮 <i>P. stellatus</i>	27.6	29.3	24.8	18.3	44	28.5	14.5	12.9	23	33.9	30.6	12.4	16	25.4	29.2	29.7
石鲮 <i>K. bicoloratus</i>	27.7	29.1	24.4	18.9	44	28.5	14.5	12.9	23	33.3	29.5	14.0	16	25.4	29.2	29.7
杂交一代 <i>P. stellatus</i> ♀× <i>K. bicoloratus</i> ♂	27.6	29.3	24.8	18.3	44	28.5	14.5	12.9	23	33.9	30.6	12.4	16	25.4	29.2	29.7

表 6 COI 基因片段平均位点分析
Tab.6 The analysis of average sites of COI gene sequence

实验样品 Experimental samples	保守位点(C) Conserved sites	变异位点(V) Variable sites	简约信息位点(Pi) Parsim-info sites	自裔位点(Si) Singleton sites	0 倍简并位点 Degenerate sites	2 倍简并位点 Degenerate sites	4 倍简并位点 Degenerate sites	单倍型 Haplotypes (h)	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	平均核苷酸差异数 Mean number of nucleotide differences (k)
星斑川鲮和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	557	0	0	0	365	108	82	1	0.000	0.000
石鲮和 F ₁ 代 <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	531	26	25	1	362	93	77	6	0.564	11.959
星斑川鲮和石鲮 <i>P. stellatus</i> and <i>K. bicoloratus</i>	531	26	25	1	362	93	77	6	0.605	12.382
星斑川鲮、石鲮、杂交一代 <i>P. stellatus</i> , <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	531	26	25	1	362	93	77	6	0.445	9.946

2.2.3 分子系统树 将星斑川鲮(PSTRI1-PSTRI3)、石鲮(KBTSI1-KBTSI3)、杂交 F₁ 代(左眼 PKZ1-PKZ3, 右眼 PKZ24-PKZ26)的 COI 基因核苷酸序列随机各取 3 条,MEGA6.0 采用 NJ 法构建分子系统进化树(图 2)。

星斑川鲮 EU266365.1 和石鲮 JQ738484.1 分别为在 GenBank 中与星斑川鲮和石鲮 COI 基因序列(GenBank 登录号分别为 PSTRI4、KBTSI4)相似度最高的序列。NJ 树显示, 3 种鲮科鱼分为明显的两支, 星斑川鲮和杂交 F₁ 代聚为一支, 石鲮独自聚为一支, 即父本石鲮单独聚成一支, 母本与杂交子代聚成一

支。杂交 F₁ 代与母本星斑川鲮形成的那一支中, 又分为两支: 母本星斑川鲮与杂交 F₁ 代中外观显示左眼的聚为一支, 杂交 F₁ 代中外观显示右眼的单独聚为一小支。

3 讨论

杂交育苗是鱼类品种改良的重要手段, 为了获得具有优良品质的品种, 在许多鲮科鱼类中进行了杂交实验(You *et al.*, 2009; 王新成等, 2003; 刘振华等, 2009; 肖永双等, 2014b)。虽然日本学者早已开始研究

表 7 COI 基因序列碱基替换统计
Tab.7 The base substitution of COI gene sequence

统计内容 Statistical content	不变位点 Identical Pairs(ii)	转换位点 Transitional Pairs(si)	颠换位点 Transversional Pairs(sv)	转换与颠换位点的比值(si/sv)	统计所包括的位点 All sites
星斑川鲮和 F ₁ 代 <i>P. stellatus</i> and hybrids	557	0	0	/	557
石鲮和 F ₁ 代 <i>K. bicoloratus</i> and hybrids	544	11	1	12	556
星斑川鲮和石鲮 <i>P.stellatus</i> and <i>K.bicoloratus</i>	544	12	1	12	557
星斑川鲮、石鲮、杂交一代 <i>P.stellatus</i> , <i>K.bicoloratus</i> and hybrids	544	12	1	12	557

表 8 基于 Kimura 2-parameter 模型 3 个群体的 COI 序列的遗传距离
Tab.8 Genetic distances of COI sequences based on the Kimura 2-parameter model of three groups

实验样品 Experimental samples	星斑川鲮 <i>P.stellatus</i>	石鲮 <i>K.bicoloratus</i>	杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂
星斑川鲮 <i>P.stellatus</i>	0		
石鲮 <i>K.bicoloratus</i>	0.045	0.001	
杂交一代 <i>P.stellatus</i> ♀× <i>K.bicoloratus</i> ♂	0	0.045	0

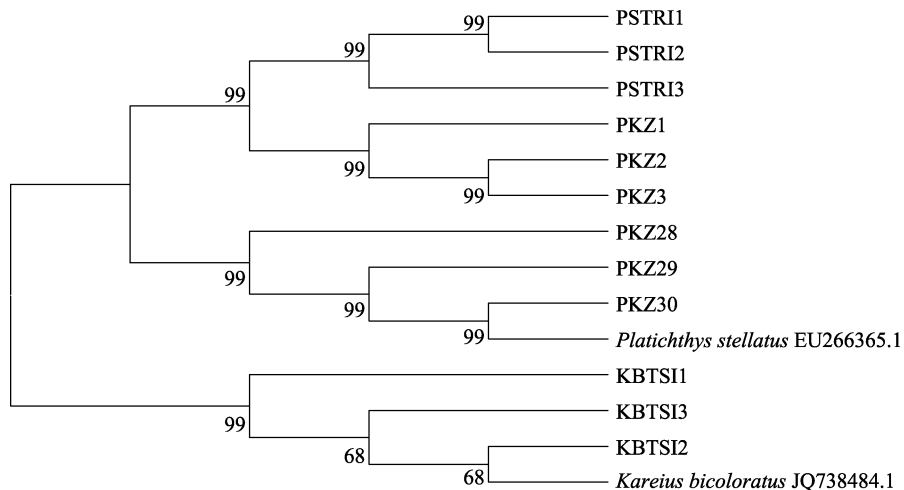


图 2 基于 Kimura 2-parameter 模型建立的邻近关系系统发育树
Fig.2 Neighbor-joining (NJ) phylogeny based on the Kimura 2-parameter model

星斑川鲷和石鲷的杂交育苗,但研究主要集中在星斑川鲷、石鲷和杂交子代的形态学(Kosaka, 1989)、淡水适应性(Takeda *et al.*, 2007);遗传方面的研究手段也仅为同工酶(Park *et al.*, 1991)。运用线粒体基因 *COI* 和 *Cytb* 探究星斑川鲷、石鲷和杂交子代之间遗传关系的中外报道至今还少有见到。通过线粒体 DNA 序列变异可以评估物种间的遗传分化程度、遗传距离以及分子系统发育情况(徐冬冬等, 2010),是一种常用于探究物种间亲缘关系的分子标记手段。本研究通过线粒体基因 *COI* 和 *Cytb* 在星斑川鲷、石鲷以及杂交 F_1 代间的序列差异、遗传距离、分子系统树等方面,得出杂交 F_1 代线粒体基因具有明显的母系遗传倾向,这也与其他物种的研究结果相一致。基于线粒体基因 *COI* 得出的杂交 F_1 代与母本星斑川鲷的遗传距离为 0 的发现与星斑川鲷和大菱鲆(星斑川鲷♀×大菱鲆♂)的杂交实验结果相一致(肖永双等, 2014b)。周翰林等(2012)比较了 2 种杂交石斑鱼子一代与亲本间 *COI* 基因序列的差异,表明 2 种杂交后代在线粒体基因 *COI* 序列上都严格遵循母系遗传规律。

NJ 树是根据遗传距离建立的分子发育树,其建树思想是先假定一棵无根星状树,再两两比较,将亲缘关系近的聚成聚合分类群,然后再将这聚合分类群看作一个整体与另外的再进行聚合分类,这样重复下去,直至构出完整的 NJ 树。在本研究中,根据 *Cytb* 基因和 *COI* 基因建立的 NJ 树都分为两大支,均为石鲷单独聚为一支。但在基因 *COI* 的 NJ 树中,母本星斑川鲷与杂交 F_1 代又分为明显的两支:其中,外形表现为左眼的子代与星斑川鲷聚为一小支,而后与右眼杂交 F_1 代聚为一支,而在基因 *Cytb* 基因的 NJ 树中没有这种分化。推测线粒体基因 *COI* 可能参与鲆鲷杂交 F_1 代的左右眼移位。

鲆鲷左右眼移位的现象早就引起人们的关注,曾有研究调查显示,养殖的星斑川鲷两眼位于体左侧占 95%–97%(王波, 2010)¹⁾,且有资料显示,在“日本海域 100%为左眼型,东北太平洋的北美洲沿岸左右眼型各占 50%”(肖志忠等, 2008)。关于左右眼移位发生的内在机制,也有不少研究者做了探究。研究发现,鲆鲷发育过程中有一段变态期,其体尺比例在这一期间发生巨大变化(Seikai *et al.*, 1986),包含大量的形态上和功能上的变化,也包含眼睛移位这一变化(Inui *et al.*, 1995)。不少学者认为,鲆鲷发育过程中眼睛移

位与一些基因相关,但一直没有得到证明(Bao *et al.*, 2005; Tagawa *et al.*, 2005; Hildahl *et al.*, 2007)。关于鲆鲷杂交子代中出现左右眼分化的现象,也曾经出现在牙鲆(♀)×石鲷(♂)的子代中,左右眼分别占 44%、56%(Wang *et al.*, 2003)。针对这一现象,Chen 等(2009)采用 DD-RT-PCR 和 cDNA-RDA 两种方法,针对两个重要的基因——肌酸激酶基因(*CK*)和胰蛋白酶原-2 前体基因(*TR2P*)进行了研究,发现右眼的杂交子代中 *TR2P* 与父本石鲷相似性高达 96%,而和母本牙鲆仅达 66%,但并没有证明这 2 个基因与鲆鲷类的左右眼移位有关。结合本研究和前人的研究来看,可以推测出鲆鲷及鲆鲷杂交子代出现的左右眼移位这一现象不是偶然的,而是在其变态期,通过一系列复杂的基因调控产生的,并初步得出线粒体基因 *COI* 也参与这一复杂过程。

4 展望

星斑川鲷和石鲷是我国重要的经济鱼类,虽然星斑川鲷的养殖已经规模化、产业化,但养殖的石鲷皆为捕捞的野生幼鱼,养殖成活率较低。为此,星斑川鲷和石鲷杂交为改变石鲷养殖成活率低这一难题起到了积极作用。本杂交实验证明,杂交后代成活率很高,而且在杂交后代中出现了左右眼各半的现象。利用线粒体基因 *COI* 建立的 NJ 树也表明,基因 *COI* 与左右眼移位发生有关,为进一步研究鲆鲷左右眼的分化提供了新线索。

参 考 文 献

- Bao B, Yang G, Liu Z, *et al.* Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2005, 1725(1): 64–70
- Céspedes A, García T, Carrera E, *et al.* Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. *Central European Journal of Medicine*, 1999, 82(4): 903–907
- Chen Y, Zhang Q, Qi J, *et al.* Screening of eye-position related genes with DD-RT-PCR and RDA in the hybrids between Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(1): 92–99

1) Wang B. Study on the biological characteristics and healthy breeding technology of *Platichthys stellatus*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 [王波. 星斑川鲷的生物学及健康养殖技术研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2010]

- Garrett DL. A new intergeneric hybrid flatfish (Pleuronectiformes: Pleuronectidae) from Puget Sound and adjacent waters. *Copeia*, 2005(3): 673–677
- Garrett DL, Pietsch TW, Utter FM, *et al.* The hybrid sole *Inopsetta ischyra* (Teleostei: Pleuronectiformes: Pleuronectidae): Hybrid or biological species? *Transactions of the American Fisheries Society*, 2009, 136(2): 460–468
- Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2010
- Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 1989, 4(1): 6–11
- Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, *et al.* Interspecific fish hybrids in Brazil: Management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 108–118
- Hildahl J, Galay-Burgos M, Sweeney G, *et al.* Identification of two isoforms of Atlantic halibut insulin-like growth factor-I receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 147(3): 395–401
- Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture*, 1995, 135(1): 87–98
- Kartavtsev YP, Park TJ, Lee JS, *et al.* Phylogenetic inferences introduced on cytochrome b gene sequences data for six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) and species synonymy between representatives of genera *Pseudopleuronectes* and *Hippoglossoides* from far eastern seas. *Russian Journal of Genetics*, 2008, 44(4): 524–531
- Kijewska A, Burzyński A, Wenne R. Molecular identification of European flounder (*Platichthys flesus*) and its hybrids with European plaice (*Pleuronectes platessa*). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil: fsp*, 2009, 110
- Kosaka M. Morphological study of hybrid flatfish: *Kareius bicoloratus*×*Platichthys stellatus* in Sendai Bay [Japan]. *Journal of the Faculty of Marine Science and Technology Tokai University*, 1989, 13: 161–166
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2005, 25(11): 1451–1452
- Liu MH, Yu HX, Ma YK, *et al.* Morphological observation of wildlife economical fishes *Verasper variegates* and *Kareius bicoloratus*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2009(9): 110–111 [刘曼红, 于洪贤, 马玉堃, 等. 两种野生经济鱼类圆斑星鲽和石鲽的最新形态观测. *东北林业大学学报*, 2009(9): 110–111]
- Liu ZH, Wang B, Xu ZP, *et al.* A brief report on cross-breeding of starry flounder and other flounder. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009(6): 267–270 [刘振华, 王波, 徐中平, 等. 星斑川鲽与其他鲆鲽类杂交研究简报. *水产科技情报*, 2009(6): 267–270]
- Miao GD, Shao CW, Liao XL, *et al.* Development of polymorphic microsatellite markers from barfin flounder (*Verasper moseri*) and their cross-species amplification. *Conservation Genetics*, 2009, 10(3): 701–703
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, 1987
- Park JY, Kijima A. Genetic variability and differentiation within and between the stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and the starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 1991, 41(3–4): 69–82
- Peng B, Zhang Q, Zhao S, *et al.* Genetic diversity analysis of *Larimichthys polyactis* in coastal waters of China based on cytochrome b gene. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010(2): 131–135 [彭博, 章群, 赵爽, 等. 中国近海小黄鱼遗传变异的细胞色素 b 序列分析. *广东农业科学*, 2010(2): 131–135]
- Purdom C, Lincoln R. *Gynogenesis in hybrids within the Pleuronectidae. The early life history of fish*, Springer: 1974, 537–544
- Sanjuan A, Comesaña AS. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b region. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(6): 1016–1023
- Seikai T, Tanangonan J, Tanaka M. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Palatichthys olivaceus* in the laboratory. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1986, 52(6): 977–982
- Šimková A, Vojtek L, Halačka K, *et al.* The effect of hybridization on fish physiology, immunity and blood biochemistry: A case study in hybridizing *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio* (Cyprinidae). *Aquaculture*, 435: 381–389
- Tagawa M, Aritaki M. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 141(2): 184–189
- Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 1983, 105(2): 437–460
- Takeda Y, Tanaka M. Freshwater adaptation during larval, juvenile and immature periods of starry flounder *Platichthys stellatus*, stone flounder *Kareius bicoloratus* and their reciprocal hybrids. *Journal of Fish Biology*, 2007, 70(5): 1470–1483
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729

- Tang WJ, Hu XL, Yang JQ. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control regio N. Biodiversity Science, 2010, 15(3): 224–231 [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. 生物多样性, 2010, 15(3): 224–231]
- Wang B, Sun P, Fang HH, et al. Morphological characteristics and parameters measurement of starry flounder (*platichthys stellatus* Pallas). Acta Oceanologica Sinica, 2010(2): 139–147 [王波, 孙萍, 方华华, 等. 星斑川鲈形态特征及相关参数的观测. 海洋学报, 2010(2): 139–147]
- Wang XC, You F, Ni GT, et al. Hybridization between Stone flounder *Kareius bicoloratus* and Olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Marine Sciences, 2003, 27(1): 1–4 [王新成, 尤锋, 倪高田, 等. 石鲈与牙鲈人工杂交的研究. 海洋科学, 2003, 27(1): 1–4]
- Wang Z, Wang X, Zhang Q. Interfamilial hybridization between *Paralichthys olivaceus* and *Kareius bicoloratus*-Early development and growth characters. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(7): 30–37
- Xiao YS, Xiao ZZ, Liu QH, et al. Comparative analysis of genetic variability of mtDNA sequence in *Platichthys stellatus*, *Scophthalmus maximus* and their hybrids. Marine Sciences, 2014a, 38(6): 5–9 [肖永双, 肖志忠, 刘清华, 等. 星斑川鲈、大菱鲆及其杂交后代的线粒体 DNA 序列比较分析. 海洋科学, 2014a, 38(6): 5–9]
- Xiao YS, Zhang Y, Gao TX. Study of the relationship between genera *Kareius bicoloratus* and *Platichthys stellatus* by mtDNA sequence. Periodical of Ocean University of China, 2014b, 40(6): 69–76 [肖永双, 张岩, 高天翔. 基于线粒体 DNA 部分片段探讨石鲈与星斑川鲈的亲缘关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014b, 40(6): 69–76]
- Xiao ZZ, Wang B, Liu ZH. Morphological and anatomical studies on *Platichthys stellatus*. New Advances in Mariculture Research. Beijing: China Ocean Press, 2008, 260–269 [肖志忠, 王波, 刘振华. 星斑川鲈形态与解剖学研究. 海水养殖研究新进展. 北京: 海洋出版社, 2008, 260–269]
- Xu DD, You F, Lou B, et al. Analysis of correlation between pairwise genetic distance of eight flatfishes and hybrid fitness. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(2): 178–184 [徐冬冬, 尤锋, 楼宝, 等. 8 种鲆鲽鱼种间遗传距离与杂交亲和性的相关性分析. 水产学报, 2010, 34(2): 178–184]
- You F, Wang W, Xu DD, et al. Hybrids between olive flounder *Paralichthys olivaceus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*: Karyotype, allozyme and RAPD analyses. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(2): 135–141
- Zhang D, Lei GC, Gong C, et al. Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial COI sequences. Journal of Lake Sciences, 2012, 24(2): 299–306 [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 COI 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性. 湖泊科学, 2012, 24(2): 299–306]
- Zhang SH, Zhang XL, Sun AF, et al. Pellet culture technology of stone flounder. Shandong Fisheries, 2004, 21(5): 6–7 [张少华, 张秀丽, 孙爱凤, 等. 石鲈池塘养殖技术. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 6–7]
- Zhang Y, Xiao YS, Gao TX, et al. Comparative analysis of mtDNA gene sequences between two species of *Pleuronectes*. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(2): 201–207 [张岩, 肖永双, 高天翔, 等. 两种黄盖鲽线粒体 DNA 部分片段比较分析. 水产学报, 2009, 33(2): 201–207]
- Zhang YY, Bi TT, Song JL, et al. Phylogenetic evolution of hinged turtles in China based on the complete mitochondrial cytochrome b gene sequences. Journal of Biology, 2011, 28(1): 22–26 [张艳云, 毕婷婷, 宋娇莲, 等. 基于线粒体 *Cytb* 基因的全长序列探讨闭壳龟类的系统进化. 生物学杂志, 2011, 28(1): 22–26]
- Zhou HL, Zhang Y, Qi X, et al. SSR analysis of the heterosis in the two grouper hybrids. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 161–168 [周翰林, 张勇, 齐鑫, 等. 两种杂交石斑鱼子一代杂种优势的微卫星标记分析. 水产学报, 2012, 36(2): 161–168]

(编辑 冯小花)

Comparative Analysis of Genetic Variability of mtDNA Sequences in *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and Their Hybrid (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂)

LI Qing^{1,2}, ZHENG Fengrong¹, GUAN Hongbin², NI Shijun³, WANG Bo^{1①}

(1. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061;

2. Marine College of Shandong University, Weihai 264209;

3. Fishery Supervision Station, Rushan 264500)

Abstract *Platichthys stellatus* and *Kareius bicoloratus* are two common Pleuronectidae species that are highly valuable in the aquaculture industry. *P. stellatus* is endowed with high meat content and delicious taste while *K. bicoloratus* is highly resistant to diseases. Characteristics of their hybrids, however, were rarely reported. In this study, we explored the genetic variability of mtDNA sequences of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their hybrid (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂), using 24 *P. stellatus*, 24 *K. bicoloratus* and 40 hybrids as samples. We found that the content of A+T base pairs was higher than that of the C+G base pairs in all 3 groups, and that the content of A+T base pairs in the hybrids was the same as in *P. stellatus*. The analysis of mtDNA *Cytb* gene and *COI* fragments suggested that the genetic distances between *K. bicoloratus* and *P. stellatus* were 0.085 and 0.045 respectively, and that the genetic distances between the hybrids and *K. bicoloratus* were 0.076 and 0.045 separately. Moreover, there was a very small differentiation (0.009) between the hybrids and *P. stellatus* based on the mtDNA *Cytb* sequence analysis, and there was no genetic differentiation between the 2 groups based on the mtDNA *COI* gene sequence analysis. The neighbor-joining (NJ) phylogeny trees constructed with the Kimura 2-parameter model showed that *P. stellatus* and the hybrid could be clustered into one branch, while *K. bicoloratus* belonged to another branch. In the NJ phylogenetic tree based on gene *COI*, the big branch including F₁ hybrid and *P. stellatus* could be further divided into two small branches. One was *P. stellatus* and F₁ hybrid with the left eyes, and the other was the F₁ hybrid with the right eyes. These data strongly suggested that characteristics of the hybrid of *P. stellatus* and *K. bicoloratus* (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂) were maternally inherited. This study provided helpful information for the future research on the hybridization of the two species.

Key words *Platichthys stellatus*; *Kareius bicoloratus*; Hybridization; Mitochondrial DNA

① Corresponding author: WANG Bo, E-mail: ousun@fio.org.cn

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*) 消化系统胚后发育组织学观察



谢木娇^{1,2} 区又君^{1①} 李加儿¹ 温久福¹
周 慧^{1,2} 王鹏飞¹ 刘奇奇^{1,2}

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 运用组织学切片技术研究四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)出膜后 1–30 d (Day after hatching, DAH)仔鱼的消化系统形态和结构的变化。结果显示,在温度 29–32℃、盐度 25–28、溶氧 4.80–5.5 mg/L、pH 8.0–8.3 条件下,1 DAH 仔鱼消化管尚未分化,由紧贴腹壁和卵黄囊的肠管组成。卵黄囊在 3 DAH 时完全吸收完毕,仔鱼开口摄食,消化管也与外界相通,此后逐渐分化出食道、胃部和肠道,一定程度上能自主消化吸收食物维持自身生长,逐渐从内源性营养期过渡为外源性营养期。15 DAH 时出现幽门盲囊和胃腺,消化道结构和功能成分进一步发育完善,消化能力显著提高,30 DAH 仔鱼消化道具备与成体相似的结构和功能。肝脏和胰腺分别在 2 DAH 和 5 DAH 时分化,随着仔鱼的生长而快速发育,至 30 DAH 时具备与成体相似的结构和功能。四指马鲛消化系统的发育表现为结构与功能密切联系且逐渐发育成熟的特点。本研究根据四指马鲛消化系统的发育特点讨论了育苗过程中的三大危险期并提出应对措施。

关键词 四指马鲛; 消化系统; 胚后发育

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0050-09

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)隶属鲭形目(Mugiliformes)、马鲛亚目(Polynemoidei)、马鲛科(Polynemidae)、四指马鲛属(孙典荣等, 2013), 主要分布于澳大利亚西海岸(Horne *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2011; Newman *et al.*, 2011)、太平洋–印度洋海域(Motomura *et al.*, 2002), 我国东海、南海沿海地区(Wang *et al.*, 2014)也有分布, 是一种生长迅速、营养价值较好的食用鱼类。目前, 该鱼在我国大陆东南沿海地区已有人工养殖。在人工育苗过程中, 掌握幼体

不同时期的适口饵料以及制定合适的投饲策略是提高鱼苗成活率的关键, 而鱼类消化系统在控制食物的消化吸收、能量收支起着关键作用(dos Santos *et al.*, 2014)。研究消化系统结构和功能发育常作为监测仔鱼生长过程中营养需求和消化能力的变化规律的一种手段, 进而优化仔鱼的培育条件(Micale *et al.*, 2010)。关于不同种属鱼类消化系统胚后发育有不少报道(区又君等, 2011、2015; Yang *et al.*, 2010; 关海红等, 2007; 苏友禄等, 2008), 而有关四指马鲛消化道的

* 广东省省级科技计划项目(2014A020217010)、广东省海洋渔业科技推广专项科技攻关与研发项目(A201401A05; B201601-12)和中国水产科学研究院南海水产研究所基本科研业务费专项资金项目(2014YD04)共同资助 [This work was supported by the Provincial Scientific and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A020217010), Special Item about Science and Technology Research and Development in the Scientific and Technical Extension Project in Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201401A05, B201601-12), and Basic Expenses on Scientific Researching of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou (2014YD04)]. 谢木娇, E-mail: zuolan521314@126.com

① 通讯作者: 区又君, 研究员, E-mail: ouyoujun@126.com

收稿日期: 2015-11-25, 收修改稿日期: 2016-02-01

胚后发育观察在国内外尚未见有报道。本研究通过观察出膜后 1–30 d (Day after hatching, DAH)四指马鲛消化道的结构变化,旨在探讨该鱼消化机能发育规律,同时掌握其消化生理和饵料系列更换的特点,从而提高育苗的成活率。

1 材料与方法

1.1 样本来源

四指马鲛受精卵和初孵仔鱼由本课题组在中国水产科学研究院南海水产研究所珠海试验基地于 2015 年 6–12 月培育所得,仔鱼在室外土池培育,温度为 29–32℃,盐度为 25–28,溶氧为 4.80–5.50 mg/L, pH 为 8.00–8.30,氨氮含量为 0.20–0.40 mg/L,亚硝酸盐含量为 0.05–0.015 mg/L。饵料系列为轮虫、小球藻、枝角类(3–15 DAH)→卤虫无节幼体和部分红虫(16–30 DAH)→粉状配合饲料和鱼肉糜或贝肉糜(31–50 DAH)。期间通过对仔鱼 1–30 DAH 阶段进行连续采样,每次采样 30 尾,用 10%甲醛固定。

1.2 切片制备

所取样本经过充分的流水冲洗后进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(5 μm)、HE 染色、中性树脂封片。用 ZEISS 型光学显微镜对已染色的切片进行观察并拍照。

2 结果

2.1 消化道发育

2.1.1 1–3 DAH 前期仔鱼 1 DAH 仔鱼全长为(1.84±0.22) mm,卵黄囊被吸收 1/2,油球渐变为卵圆形,靠近卵黄囊最底部。光镜观察显示,其消化管尚未分化,由紧贴腹壁和卵黄囊的肠管组成,内含细胞比较模糊。此时,口咽腔、肛门尚未形成,卵黄囊体积较大,HE 染色呈深红色(图 1-A)。2 DAH 仔鱼肠管增长,口腔张开形成口裂,卵黄囊体积减少至约为原来的 1/2,肠管向中间扩展,末端与外界形成通路,肠腔内开始形成黏膜上皮层,未见纹缘状结构。靠近卵黄囊前端可见食道原基,其内细胞较密集,外层形成纤维膜,尚未与口咽腔、胃肠道相通。随着卵黄囊的吸收,腹腔体积增大,靠近中部出现胃原基并出现空腔,其内可见黏膜层及单层柱状上皮细胞(图 1-B)。大部分仔鱼在 3 DAH 开口摄食,此时卵黄囊完全消失,消化管道进一步发育,食道连接口咽腔和胃部已相通,但仍处于细胞混集阶段,未形成明显的黏膜层。胃肠相连并未完全分化为单独的胃部和肠道,而内部已形成较为丰富的黏膜层并出

现皱褶结构,黏膜上单层柱状上皮细胞清晰可见。

2.1.2 4–14 DAH 后期仔鱼 4 DAH 仔鱼消化道与外界相通,口咽腔、食道、胃部、肠道、肛门分化比较明显。食道黏膜分化出复层上皮,末端与胃部形成一个不明显的缢痕。胃腔扩展,肠道增长、增粗,但未形成曲折(图 1-C)。5 DAH 仔鱼食道复层黏膜上皮尤为清晰,未见杯状细胞的分化,与黏膜相连处可见一层较薄的肌肉层(图 1-D);胃部仍无区域的分化,黏膜皱褶变得扁平整齐;肠管黏膜上皮未见杯状细胞,含多量的嗜酸性颗粒(图 1-E)。7 DAH 仔鱼食道变化尤为明显,形成纵行的黏膜皱褶,上皮间出现少量圆形空泡状的杯状细胞(图 1-F),黏膜层以外分化出黏膜下层、肌肉层、外膜,结构已清晰可辨,与胃部连接处黏膜复层上皮过渡为单层柱状上皮;胃部开始贲门、幽门、胃体和盲囊区域的分化,其中,胃体最为膨大,幽门与贲门区和胃体区分界较明显,内含 2–3 条纵行的黏膜皱褶。胃体和盲囊区域由于食物填充而使黏膜平整无皱褶。肠道黏膜皱褶增多。9 DAH 仔鱼食道杯状细胞数量增多,胃肠管壁分化出黏膜下层、肌肉层和外膜(图 1-G, H)。肠道含 12–15 个黏膜皱褶,皱褶明显增高变宽。10–14 DAH 仔鱼消化道变化不大,胃部尚未见胃腺分化(图 1-I, J)。

2.1.3 15–30 DAH 稚鱼期 15 DAH 仔鱼消化道出现胃腺和幽门盲囊的分化,消化管管壁包括黏膜层(上皮、固有层、黏膜肌)、黏膜下层、肌肉层(环肌和纵肌)、外膜分化完整。在幽门部与肠道交汇处出现 2 个幽门盲囊管腔,腔内结构与肠道相似,有 3–5 个黏膜皱褶,上皮间已有少量杯状细胞,未见纹缘状结构(图 1-K)。肠道有 2 处明显的曲折,使前、中、后肠分区明显。前肠绒毛最丰富,较为细长,其上分布很多杯状细胞(图 1-L)。中肠和后肠绒毛和杯状细胞数量相当。胃部黏膜皱褶结构极为宽大,除幽门部外均有胃腺的分布,以胃体部区域最为丰富,胃腺均为单管状,分布于黏膜固有层内,与上皮临近(图 2-A),胃腺开口于胃小凹。幽门部肌肉层尤为发达,不含胃腺伸往腔内的黏膜上皮细胞十分整齐密集。17 DAH 仔鱼肠道黏膜分化完整,杯状细胞数量显著增多,但仍含有部分嗜酸性颗粒。20 DAH 仔鱼食道杯状细胞数量极多(图 2-B),黏膜皱褶变得宽长,肌肉层环肌加厚。胃部更为膨大,大量的胃腺与黏膜交织成网状。幽门盲囊管腔增加至 6–8 个,单个管腔增大,内含的皱褶同样变得宽长,上皮杯状细胞增多,肠道绒毛上皮可见纹缘状结构(图 2-C)。23–30 DAH 仔鱼消化道结构成分与成体差异不大,消化管管壁增厚,黏膜皱褶增多,食道和肠道上皮杯状细胞数量继续增多,胃部胃腺、胃小凹增多是基本特点(图 2-D)。

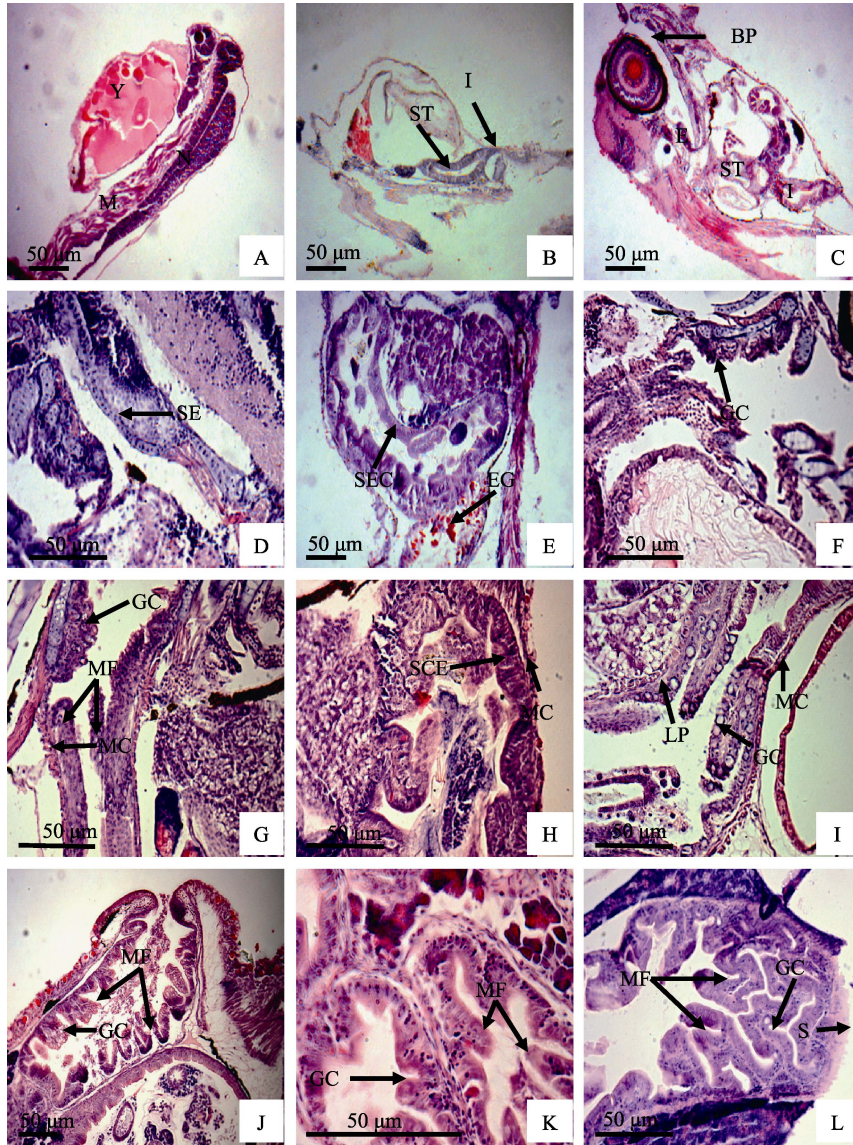


图1 四指马鲛仔稚鱼消化系统发育组织学结构(HE染色)

Fig.1 Histological observation of the development of the digestive system of *E. tetradactylum* (HE staining)

A: 1 DAH 仔鱼消化道整体结构, 纵切; B: 2 DAH 仔鱼消化管整体结构, 纵切; C: 4 DAH 仔鱼食道、胃、肠的分化, 纵切; D: 5 DAH 仔鱼食道复层黏膜上皮, 纵切; E: 5 DAH 仔鱼胃单层柱状黏膜上皮以及肠腔内嗜酸颗粒, 纵切; F: 7 DAH 仔鱼食道黏膜上皮杯状细胞的分化, 纵切; G: 9 DAH 仔鱼食道的黏液细胞和黏膜皱褶, 纵切; H: 9 DAH 仔鱼胃黏膜皱褶, 纵切; I: 12 DAH 仔鱼食道杯状细胞和肌肉层, 纵切; J: 12 DAH 仔鱼肠腔内绒毛结构和杯状细胞, 纵切; K: 15 DAH 仔鱼幽门盲囊黏膜皱褶和杯状细胞, 横切; L: 15 DAH 仔鱼肠道绒毛和杯状细胞, 横切

BP: 口咽腔; E: 食道; EG: 嗜伊红颗粒; GC: 杯状细胞; GG: 胃腺; I: 肠道; LP: 固有层; M: 肌肉组织; MC: 肌肉层; MF: 黏膜皱褶; N: 脊索; S: 外膜; SE: 复层上皮; SEC: 单层柱状上皮; SM: 黏膜下层; ST: 胃部; Y: 卵黄囊

A: Longitudinal section of digestive tract of 1 DAH larvae; B: Longitudinal section of digestive tract of 2 DAH larvae; C: Longitudinal section of esophagus, stomach and intestine of 4 DAH larvae; D: Longitudinal section of stratified epithelium in esophagus of 5 DAH larvae; E: Longitudinal section of simple columnar epithelium in stomach and the eosinophilic granular in intestine of 5 DAH larvae; F: Longitudinal section of goblet cells in esophagus of 7 DAH larvae; G: Longitudinal section of mucous cells and mucosal folds in esophagus of 9 DAH larvae; H: Longitudinal section of mucosal folds in stomach of 9 DAH larvae; I: Longitudinal section of goblet cells and muscle layer in esophagus of DAH 12 larvae; J: Longitudinal section of mucosal folds and goblet cells in intestine of 12 DAH larvae; K: Transverse section of mucosal folds and goblet cells in pyloric caeca of 15 DAH larvae; L: Transverse section of mucosal folds and goblet cells in intestine of 15 DAH larvae

BP: Buccopharynx; E: Esophagus; EG: Eosinophilic granular; GC: Goblet cell; GG: Gastric gland; I: Intestine; LP: Lamina propria; M: Musculature; MC: Muscle layer; MF: Mucosal fold; N: Notochord; S: Serosal; SE: Stratified epithelium; SEC: Simple columnar epithelium; SM: Submucosal; ST: Stomach; Y: Yolk sac

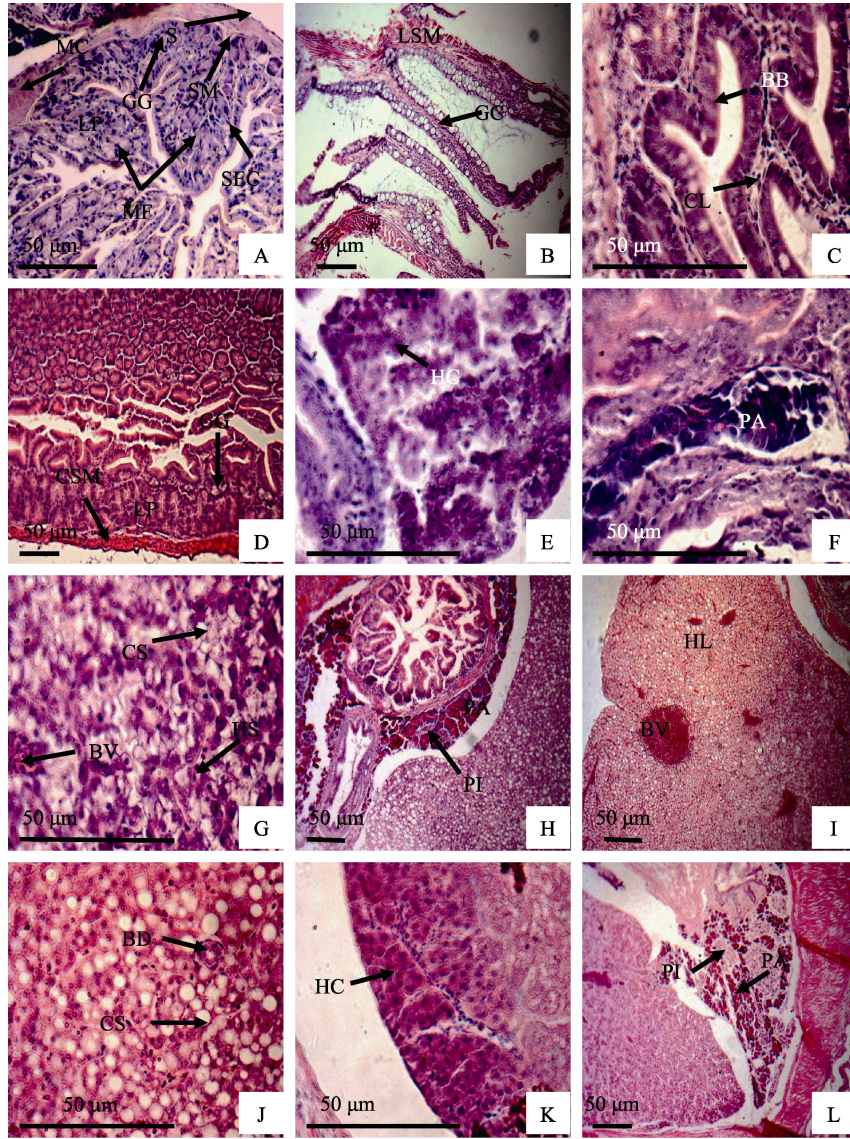


图 2 四指马鲛仔稚鱼消化系统发育组织学结构(HE 染色)

Fig.2 Histological observation of the development of the digestive system of *E. tetradactylum* (HE staining)

A: 15 DAH 仔鱼胃管壁整体结构, 横切; B: 20 DAH 仔鱼食道黏膜和肌肉层结构, 纵切; C: 20 DAH 仔鱼肠绒毛纹缘状结构, 横切; D: 30 DAH 仔鱼胃部胃腺结构, 纵切; E: 5 DAH 仔鱼分化的肝细胞, 纵切; F: 5 DAH 仔鱼胃肠交界处的胰腺组织, 纵切; G: 15 DAH 仔鱼肝脏肝血窦、空泡和血管结构, 横切; H: 15 DAH 仔鱼肝胰腺结构, 纵切; I: 23 DAH 仔鱼肝小叶, 横切; J: 23 DAH 仔鱼肝脏内胆管结构, 横切; K: 30 DAH 仔鱼致密的肝细胞结构, 横切; L: 30 DAH 仔鱼肝胰腺结构, 纵切
 BB: 纹缘状; BD: 胆管分支结构; BV: 血管; CL: 中央乳糜管; CSM: 环肌; CS: 空泡结构; GC: 杯状细胞; GG: 胃腺; HC: 肝细胞; HL: 肝小叶; HS: 肝血窦; LP: 固有层; LSM: 纵肌; MC: 肌肉层; MF: 黏膜皱褶; PA: 胰腺; PI: 胰岛; S: 外膜; SCE: 单层柱状上皮; SM: 黏膜下层

A: Transverse section of tube wall of stomach of 15 DAH larvae; B: Longitudinal section of mucosal folds and muscle layer in esophagus of 20 DAH larvae; C: Transverse section of brush border in intestine of 20 DAH larvae; D: Longitudinal section of gastric gland in stomach of 30 DAH larvae; E: Longitudinal section of hepatic cells in 5 DAH larvae; F: Longitudinal section of pancreas between stomach and intestine of 5 DAH larvae; G: Transverse section of liver of 15 DAH larvae, including hepatic sinusoid, cavity structure and blood vessels; H: Longitudinal section of hepatopancreas of 15 DAH larvae; I: transverse section of hepatic lobule in 23 DAH larvae; J: transverse section of bile duct in 23 DAH larvae; K: Transverse section of hepatic cells in liver of 30 DAH larvae; L: longitudinal section of hepatopancreas in 30 DAH larvae

BB: Brush border; BD: Branch of bile duct; BV: Blood vessel; CL: Central lacteals; CSM: Circular layers of striated muscle; CS: Cavity structure; GC: Goblet cell; GG: Gastric gland; HC: Hepatic cell; HL: Hepatic lobule; HS: Hepatic sinusoid; LP: Lamina propria; LSM: Longitudinal layers of striated muscle; MC: Muscle layer; MF: Mucosal fold; PA: Pancreas; PI: Pancreas islet; S: Serosa; SCE: Single columnar epithelium; SM: Submucosa

2.2 肝脏和胰腺的发育

四指马鲛消化道内无独立的胰脏器官,随着生长发育,在肝脏、胃、幽门盲囊、肠等的系膜交界处呈弥散性分布,其中,与肝脏连在一起的称为肝胰脏,在其余消化管壁系膜分布的为胰腺组织。在2 DAH时形成肝脏原基,原基在卵黄囊近脊椎处,数十个肝细胞排列在一起,呈“三角形”细胞团,细胞之间界限模糊。3 DAH时,肝细胞数量增多,细胞团体积增大。5 DAH仔鱼肝脏器官有了明显的生长,表现为肝细胞体积变大并依次排列形成肝细胞板结构,相邻肝板间有清晰可见的空隙结构,称为肝血窦(图2-E);此时,肝脏周围以及胃和肠系膜交界处出现胰腺细胞团,细胞被染成深紫色,界限比较清晰(图2-F)。9 DAH时,肝脏进一步发育,肝板内细胞增多,排列更为紧密,细胞呈圆形,细胞核很明显,位于中央。肝板周围出现许多空泡结构。肝脏周围的胰腺组织可明显分辨出浅紫色的胰岛区域,胰岛内胰岛细胞形状不规则,胞核不明显,为胰腺内分泌部。胰岛周围是深紫色的外分泌部腺泡,腺泡细胞体积增大,个别可见细胞核。15 DAH时,肝脏开始分出左右两叶,肝细胞数量明显增多、体积变小,呈圆形,肝板结构增多形成肝索结构,肝血窦和肝板之间空泡增多(图2-G),胰腺组织在肝脏周围、胃、肠系膜交界处均有分布,其基本结构变化不大(图2-H)。17 DAH时,肝脏可见中央静脉,局部可见毛细血管和静脉血管管腔,肝血窦内可见红细胞。23 DAH时,肝脏结构发育基本与成体相似,肝细胞紧密连接,血窦增多(图2-I, J),此时,幽门盲囊与肠道交界处以及幽门盲囊管腔之间的胰腺进一步发育,胰腺细胞更为密集。30 DAH时,仔鱼肝脏进一步发育成熟,肝体积增大,肝细胞数量极多,形成致密的肝板结构(图2-K)。胰腺组织结构也基本与成体相似,分布范围不变,但各区域的胰腺区域体积增大,胰腺组织内的外分泌部和内分泌部分化明显(图2-L)。

3 讨论

3.1 四指马鲛消化道早期发育阶段的划分

本研究发现,四指马鲛消化道的发育具有明显的阶段性特征。1-3 DAH,仔鱼消化道结构简单呈直线状,未与外界相通,表明仔鱼存活所需营养物质全部由卵黄囊提供,为内源性营养期,此阶段仔鱼生长情况是否良好与亲鱼质量和人工孵化技术密切相关。4-14 DAH,仔鱼开口摄食,消化管与外界相通,逐渐分化出口咽腔、食道、胃、肠,同时,肝脏、胰腺

也开始发育,一定程度上能自主消化吸收食物维持自身生长,从短暂的混合营养期(4-7 DAH)过渡为外源性营养期。15-30 DAH为稚鱼期,随着幽门盲囊和胃腺的出现,消化系统结构和功能逐渐发育为与成体相似,消化能力显著提高,进入快速生长阶段。与四指马鲛消化道发育特点类似的还有其他肉食性鱼类。条石鲷(*Oplegnathus fasciantus*)内源性营养期、外源性营养期和稚鱼期的划分分别是1-3 DAH、4-18 DAH和19-35 DAH(区又君等,2014);卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)分别是1-2 DAH、6-17 DAH(3-5 DAH为混合营养期)、18-22 DAH(区又君等,2011);鲇(*Silurus asotus*)1-3 DAH为内源性营养期,4-6 DAH为混合营养期,6-8 DAH进入外源性营养期并进入加速生长期,11 DAH出现胃腺,进入稚鱼期(蒲红宇等,2004)。而大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)1-5 DAH为内源性营养期,6-18 DAH为外源性营养期,19-31 DAH为稚鱼期,各阶段持续时间均比四指马鲛略长(徐晓津等,2010)。杂食性鱼类如普安银鲫(*Carassius auratus*)1-2 DAH为内源性营养期,3-4 DAH为混合营养期,5 DAH进入外源性营养期,15 DAH后进入快速生长期(姚俊杰等,2013),而草食性的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)1-4 DAH为内源性营养期,5 DAH过渡为外源性营养,9-17 DAH为稚鱼期(阮国良等,2012),均与四指马鲛有所不同。由此可发现,鱼类消化道早期发育阶段的划分与种属特性和食性密切相关,另外,普安银鲫和草鱼同为无胃鱼类,其仔稚鱼阶段消化道的形态学变化则主要表现为肠在形态、组织上的进一步分化,而肉食性有胃鱼类进入稚鱼期逐渐形成功能完善的胃,推测胃部和肠道发育的差异也是消化道发育阶段存在差异的原因之一。哲罗鱼(*Hucho taimen*)为凶猛的肉食性鱼类,受精30 d后破膜,要经历较长的内源性营养期(1-24 DAH),直至30 DAH才进入完全外源性营养期(关海红等,2007),可能是由于该鱼喜栖息于冷水环境(孵化温度为7-8℃,仔鱼培育温度为3-14℃),即使在胚胎期已形成原始消化管,但发育速度较慢,仍需借助相当体积的卵黄囊维持较长时间的营养供给以缓解消化道发育缓慢带来的代谢压力。

3.2 四指马鲛消化道早期发育的结构特征

鱼类消化道结构与其食性相关,鱼体处于不同发育阶段,其消化功能与其结构相适应。在1-3 DAH内,四指马鲛消化道结构极其简单,仅靠卵黄囊提供营养物质,这与大海马(*Hippocampus kuda*)仔鱼的消化道特点不同,大海马没有经历由卵黄囊提供营养的

内源性营养阶段而直接进入混合营养期,这与其为卵胎生及 1-2 DAH 仔鱼已具有较完善的摄食和消化器官、可独立摄食的特性有关(林强等, 2007)。4-14 DAH 后,四指马鲛开口摄食,消化道有明显变化,逐渐分化出口咽腔、食道、胃、肠、肛门,随着生长,摄食能力加强,消化管扩张,出现黏膜皱褶、杯状细胞等与消化吸收能力匹配的变化,与多种属鱼类仔鱼消化道发育特征相似,如黄尾鲷(*Seriola lalandi*) (Chen *et al.*, 2006)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (陈慕雁等, 2006)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (苏友禄等, 2008)等。食道、胃、肠内形成的黏膜皱褶对于增大食物容纳量及消化吸收面积有重要意义(勾效伟等, 2008),而四指马鲛 5 DAH 仔鱼肠道出现大量的嗜酸性颗粒,是细胞消化的一种方式(Jany, 1976),其食道和肠道分别在 5、9 DAH 时分化出杯状细胞,具有润滑、辅助食物消化的功能,表明在此阶段(4-14 DAH)的仔鱼经过摄食训练和细胞消化协调,机体过渡到完全外源营养模式,此后消化道开始扩张,摄食能力增强,同时分化出基本的功能组分以协助食物的消化。胃腺和幽门盲囊的出现,标志仔鱼进入稚鱼期。胃腺具有分泌黏液和胃蛋白酶原的功能,使消化食物蛋白成为可能,符合肉食性鱼类的消化特点。从四指马鲛仔鱼出现胃腺的时间(15 DAH)判断该鱼为发育迅速的鱼类,与条石鲷(区又君等, 2015) 12-15 DAH、卵形鲳鲹(区又君等, 2011) 17-18 DAH、有名锤形石首鱼(*Atractoscion nobilis*) (Galaviz *et al.*, 2011) 16 DAH 出现胃腺相似,而黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (Yang *et al.*, 2010) 3 DAH 即出现胃腺,绯小鲷(*Pagellus erythrinus*) (Micale *et al.*, 2006) 和 黄 鳍 鲷 (*Sparus latus*) (王永翠等, 2012) 胃腺出现则较迟,分别为 28 DAH 和 37 DAH,而黑点圆鲀(*Sphoeroides annulatus*) (García-Gasca *et al.*, 2006) 则 32 DAH 还未出现胃腺,这些差异与种属有关,还可能与培育条件、技术和环境等因素有关。此阶段的四指马鲛仔鱼(15-30 DAH),消化管进一步扩张,固有结构(黏膜层、黏膜下层、肌肉层、外膜)逐渐分化完善,似成体状:食道和肠道黏膜皱褶增加,杯状细胞数量显著增多,胃部膨大并形成完善的分化区域(贲门、幽门、胃体和盲囊胃、幽门盲囊),幽门盲囊的出现使机体摄食和消化能力极大提高,消化道结构功能与机体生长发育形成一个正

反馈效应,从而使机体快速生长成为可能。鱼类肝脏和胰腺发育时间存在种属间的差异,四指马鲛肝脏与胰腺发育不同步且胰腺发育比肝脏要迟,与条石鲷(区又君等, 2015)、卵形鲳鲹(区又君等, 2011)相似。有些鱼类如细鳞鲑(*Brachymystax lenok*) (徐革锋等, 2013)、青龙斑(*Epinephelus coioides*♀×*E. lanceolatus*♂) (吴水清, 2014)¹⁾的肝脏和胰脏独立存在,前者在胚胎期已出现肝脏原基并在 2 DAH 时肝细胞不断分化,胰脏原基则在初孵仔鱼肠道背侧出现;后者均在 3 DAH 时出现肝脏和胰脏原基。肝脏是机体内最大的消化腺,具有分泌、储存甚至排泄等功能(许晓娟等, 2009),胰脏中则合成和分泌大量的酶(淀粉酶、脂酶和胰蛋白酶等)(陈慕雁等, 2004),肝脏、胰脏的分化和发育在提高仔稚鱼消化能力方面有重要意义。本研究中,四指马鲛 2 DAH 时已分化出肝脏,在 9 DAH 时出现肝脏空泡结构,且随着仔鱼生长,肝脏内空泡结构增多,至 23 DAH 后,肝脏结构基本与成体相似。Boulhic 等(1992)研究指出,这种空泡结构具有储藏肝糖原的作用,表明进入外源性营养阶段的仔鱼消化道的发育速度开始加快,对摄入的食物进行有效的消化吸收并存储营养物质,以适应在同时加速的机体代谢需求。胰腺在 5 DAH 时发生,随着发育的进行,逐渐分化出外分泌部和内分泌部并扩大分布范围,至 30 DAH 时形成具有分泌能力的成熟组织,胰腺的逐渐发育进一步增强仔鱼的消化能力。

3.3 四指马鲛消化道发育规律对仔鱼培育的指导意义

根据四指马鲛消化道发育特点,总结出育苗过程的三个危险阶段。第一阶段为卵黄囊期的仔鱼,此阶段仔鱼的存活完全依靠卵黄物质的营养,受精卵质量和孵化技术的优劣决定了子代仔鱼质量的优劣,常因受精卵质量差以及孵化条件如盐度不适宜的原因造成初孵仔鱼及卵黄囊期间存活率降低(柴学军等, 2011)。有研究表明,采用适宜浓度的葡萄糖溶液和维生素对胚胎及卵黄囊仔鱼进行浸泡,可以提高胚胎孵化率和仔鱼存活率,同时,维生素 C 可降低卵黄囊仔鱼机体的损伤,提高免疫力,从而为整个发育过程中正常的代谢提供保障(熊铎龙等, 2014; 蒋左玉等, 2015)。因此,提高育苗成活率,培育优质的亲鱼和建立最适宜的育苗条件是应对措施之一。第二阶段为

1) Wu SQ. Studies on post-embryonic development of Qinglong grouper (*Epinephelus coioides*♀×*E. lanceolatus*♂) and histochemistry and immunohistochemistry of digestive tract in juveniles. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 26-34 [吴水清. 斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代早期发育及幼鱼消化道组织化学和免疫组织化学的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 26-34]

开口期仔鱼,从混合营养期过渡到完全外源性营养期,是否有充足的适口饵料以及预防因饵料混有病原微生物而使仔鱼感染,也是提高仔鱼存活率的关键。因为此阶段仔鱼的消化管管径很小以及管壁结构不完善,从而对饵料有较为严格的要求,淡水臂尾轮虫常作为多种鱼类仔鱼的开口饵料,轮虫经孵化后应用小球藻强化培育3d后再投喂,可降低仔鱼因一直摄食未强化培育的轮虫(缺乏高度不饱和脂肪酸)(梁友等,2011)而造成机体的营养不足甚至死亡的几率。第三阶段为稚鱼变态期,消化器官和功能组分发育基本完善,摄食和消化能力极大提高,同时残食现象以及仔鱼的自身变化与外界环境条件不相适应等也会造成鱼苗的大量死亡(区又君等,2014)。根据鱼苗摄食情况制定恰当的投饲策略以及适时的分苗培养是关键,可减少鱼苗的死亡。

综上所述,四指马鲛消化系统的发育速度较快并具有明显的阶段性特征,符合肉食性鱼类消化系统发育的规律,体现消化系统结构功能的发育与自身生长发育和外界环境相协调的特点。而在人工育苗过程中,除了重点掌握根据幼体消化能力的变化做好饲喂管理工作外,优化其他培育条件,如良好水质的维持、病虫害的防治等也是必要的。

参 考 文 献

- Boulhic M, Gabaudan J. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*. 1992, 102(4): 373–396
- Chai XJ, Sun M, Xu YJ. Effects of temperature and salinity on embryonic development of *Nibea japonica*. *South China Fisheries Science*, 2011, 7(5): 43–49 [柴学军, 孙敏, 许源剑. 温度和盐度对日本黄姑鱼胚胎发育的影响. *南方水产科学*, 2011, 7(5): 43–49]
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, *et al.* Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 489–501
- Chen MY, Zhang XM. Development of the digestive system in larval, juvenile and young turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 236–240 [陈慕雁, 张秀梅. 大菱鲆仔稚幼鱼消化系统发育的组织学研究. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 236–240]
- Chen MY, Zhang XM. Recent advances in digestive physiology of marine fish larvae-juvenile. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(3): 81–88 [陈慕雁, 张秀梅. 海水鱼类仔稚鱼消化生理学研究进展. *海洋水产研究*, 2004, 25(3): 81–88]
- dos Santos DCM, do Cupertino CM, Fialho MCQ, *et al.* Quantification of endocrine cells and ultrastructural study of insulin granules in the large intestine of opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). *Tissue and Cell*, 2014, 46(1): 70–77
- Galaviz MA, García-Gasca A, Drawbridge M, *et al.* Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 2011, 318(1): 162–168
- García-Gasca A, Galaviz MA, Gutiérrez JN, *et al.* Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*, 2006, 251(2–4): 366–376
- Gou XW, Ou YJ, Liao R. Histochemical study of digestive system of *Rhabdosargus sarba*. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(5): 28–36 [勾效伟, 区又君, 廖锐. 平鲷消化系统形态学、组织学及组织化学研究. *南方水产*, 2008, 4(5): 28–36]
- Guan HH, Kuang YY, Xu W, *et al.* Histological observation on the development of digestive system in *Hucho taimen*. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(2): 116–123 [关海红, 匡友谊, 徐伟, 等. 哲罗鱼消化系统器官发生发育的组织学观察. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 116–123]
- Horne JB, Momigliano P, van Herwerden L, *et al.* Murky waters: Searching for structure in genetically depauperate blue threadfin populations of Western Australia. *Fisheries Research*, 2013, 146(5): 1–6
- Jany KD. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* (Bloch): Endopeptidases. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1976, 53(1): 31–38
- Jiang ZY, Yao JJ, Xiong HL, *et al.* Effects of glucose and vitamin C on activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase during yolk-sac larva development of *Garassius auratus gibelio*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 73–79 [蒋左玉, 姚俊杰, 熊铨龙, 等. 葡萄糖、维生素C对普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中LPL和HL活性的影响. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 73–79]
- Lin Q, Lu JY, Zhang B, *et al.* Histological studies on post-embryonic development of digestive system of seahorse *Hippocampus kuda*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 26(6): 46–51 [林强, 吕军仪, 张彬, 等. 大海马消化系统胚后发育的形态学及组织学研究. *热带海洋学报*, 2007, 26(6): 46–51]
- Liang Y, Ni Q, Wang YG, *et al.* Research on scale manual reproduction techniques of *Epinephelus moara*. *Fishery Modernization*, 2011, 38(5): 31–34, 41 [梁友, 倪琦, 王印庚, 等. 云纹石斑鱼规模化人工繁育技术研究. *渔业现代化*, 2011, 38(5): 31–34, 41]
- Micale V, Garaffo M, Genovese L, *et al.* The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, 2006, 251(2–4): 354–365
- Micale V, Levanti MB, Germana A, *et al.* Ontogeny and

- distribution of cholecystokinin-immuno reactive cells in the digestive tract of sharpnose sea bream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777), during larval development. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169(1): 23–27
- Moore BR, Stapley J, Allsop Q, *et al.* Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia, as indicated by parasites. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(3): 923–936
- Motomura H, Iwatsuki Y, Kimura S, *et al.* Revision of the Indo-West Pacific polynemid fish genus *Eleutheronema* (Teleostei: Perciformes). *Ichthyological Research*, 2002, 49(1): 47–61
- Newman SJ, Pember MB, Rome BM, *et al.* Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia as inferred from stable isotopes in sagittal otolith carbonate. *Fisheries Management and Ecology*, 2011, 18(3): 246–257
- Ou YJ, Li JE, Ai L. A study on the histology of digestive system in early life stages of *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of South China Agricultural University*, 2015, 36(1): 23–27 [区又君, 李加儿, 艾丽. 条石鲷早期发育阶段消化系统组织学研究. 华南农业大学学报, 2015, 36(1): 23–27]
- Ou YJ, He YL, Li JE. Postembryonic development of digestive system of *Trachinotus ovatus*. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2011, 30(4): 533–539 [区又君, 何永亮, 李加儿. 卵形鲳鲹消化系统的胚后发育. 台湾海峡, 2011, 30(4): 533–539]
- Ou YJ, Li JE, Lin F. First maturation and spawning of cultured *Oplegnathus fasciatus* broodstock in the South China Sea. *South China fisheries Science*, 2014, 10(5): 82–86 [区又君, 李加儿, 林锋. 南海区驯养条石鲷亲鱼的初次性成熟和产卵. 南方水产科学, 2014, 10(5): 82–86]
- Pu HY, Zhai BX, Liu HL. Histological studies on post-embryonic development of digestive system in larval catfish *Silurus asotus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(1): 1–8 [蒲红宇, 翟宝香, 刘焕亮. 鲇仔、稚鱼消化系统胚后发育的组织学观察研究. 中国水产科学, 2004, 11(1): 1–8]
- Ruan GL, Yang DQ, Wang WW. Ontogeny of the digestive tracts in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), yellowcheck carp (*Elopichthys bambusa*) and topmouth culter (*Culter alburnus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(6): 1164–1170 [阮国良, 杨代勤, 王卫民. 草鱼、鳊和翘嘴鲃消化道组织的早期发育. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1164–1170]
- Sun DY, Chen Z. *The South China Sea fish to retrieve*. Beijing: Ocean Press, 2013: 380–382 [孙典荣, 陈铮. 南海鱼类检索(上册). 北京: 海洋出版社, 2013: 380–382]
- Su YL, Sun XX, Feng J, *et al.* Morphological and histological observations of digestive system of cobia *Rachycentron canadum*. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(6): 88–94 [苏友禄, 孙秀秀, 冯娟, 等. 军曹鱼消化系统的形态及组织学研究. 南方水产, 2008, 4(6): 88–94]
- Wang J, Sun P, Yin F. Low mtDNA Cytb diversity and shallow population structure of *Eleutheronema tetradactylum* in the East China Sea and the South China Sea. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 55(2): 268–274
- Wang YC, Li JE, Ou YJ, *et al.* Histomorphology observation on digestive tract of larva, juvenile and young yellowfin black porgy (*Sparus latus*). *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(8): 1212–1217 [王永翠, 李加儿, 区又君, 等. 黄鳍鲷仔、稚、幼鱼消化道形态组织学观察. 南方农业学报, 2012, 43(8): 1212–1217]
- Xiong HL, Yao JJ, An M, *et al.* Effects of glucose and vitamin C on early development of Puan silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 88–92 [熊铎龙, 姚俊杰, 安苗, 等. 葡萄糖、维生素 C 对普安银鲫早期发育的影响. 南方水产科学, 2014, 10(6): 88–92]
- Xu GF, Liu Y, Li YF, *et al.* Organogenesis of the digestive system in *Brachymystax lenok* during early development. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 733–742 [徐革锋, 刘洋, 李永发, 等. 细鳞鲑早期发育过程中的消化系统发生. 中国水产科学, 2013, 20(4): 733–742]
- Xu XJ, Li JE, Ou YJ. Advance in the research on digestive system in fishes. *Fisheries Science*, 2009, 28(6): 350–354 [许晓娟, 李加儿, 区又君. 鱼类消化系统研究进展. 水产科学, 2009, 28(6): 350–354]
- Xu XJ, Wang J, Xie YJ, *et al.* Post-embryonic histological development in digestive system of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2010, 25(2): 107–112 [徐晓津, 王军, 谢仰杰, 等. 大黄鱼消化系统胚后发育的组织学研究. 大连水产学院学报, 2010, 25(2): 107–112]
- Yang RB, Xie CX, Fan QX, *et al.* Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 2010, 302(1–2): 112–123
- Yao JJ, Liang ZQ, Feng YN, *et al.* Histological studies on post-embryonic development for digestive system of *Carassius auratus*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2013, 41(11): 152–155 [姚俊杰, 梁正其, 冯亚楠, 等. 普安银鲫消化系统胚后发育的组织学观察. 贵州农业科学, 2013, 41(11): 152–155]

Histological Observation of the Post-Embryonic Development of Digestive Tract of *Eleutheronema tetradactylum*

XIE Mujiao^{1,2}, OU Youjun¹①, LI Jiaer¹, WEN Jiufu¹, ZHOU Hui^{1,2}, WANG Pengfei¹, LIU Qiqi^{1,2}

(1. Key Laboratory for Exploitation & Utilization of Marine Fisheries Resource in South China Sea, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;

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

Abstract *Eleutheronema tetradactylum* is a tropical inshore marine fish species that belongs to the Polynemidae family. It has very high commercial values. Previous studies mainly focused on the stock structure and taxonomy of this species. However, the information about morphology and structural and functional biology has been limited, especially little is known about the development of the digestive system. In this study we applied the histological method to investigate this issue of *E. tetradactylum* aged Day 1 to Day 30 after hatching (DAH 1 to 30). Thus we may develop a better feeding strategy during artificial seedling rearing and improve the survival rate of the larvae. The experimental conditions were temperature 29–32°C, salinity 25–28, dissolved oxygen 4.80–5.5 mg/L, and pH 8.0–8.3. We found that on DAH 1, the digestive tube was not differentiated, and was composed of intestinal tubes that were attached to the abdominal wall and the yolk sac. On DAH 3, the yolk sac was fully absorbed, the larvae began feeding, and the digestive tube started to communicate with the outside. This indicated a switch from the endogenous nutrition to the exogenous feeding, and from this point, the larvae could maintain the growth by relative independent digestion and absorption through the gradually differentiated esophagus, stomach and intestine. The gastric gland and pyloric caeca appeared on DAH 15, which greatly improved the digestion and were the signs of the juvenile stage. On DAH 30, the structure and function of the digestive tract were well developed, which resembled that of the adults. The liver and the pancreas started to differentiate on DAH 2 and DAH 5 respectively, and they developed fast as the larvae grew. These observations suggested that the development of the digestive system was highly associated with the functions. Based on the characteristics of the digestive system, we further discussed issues in three major critical stages in the process of seedling rearing and proposed solutions for each stage.

Key words *Eleutheronema tetradactylum*; Digestive system; Post-embryonic development

① Corresponding author: OU Youjun, E-mail: ouyoujun@126.com

急性氨氮胁迫对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*) 幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响*

王贞杰^{1,2} 陈四清^{2①} 曹栋正^{1,2} 卢斌^{1,2}
常青² 刘长琳² 燕敬平²



(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)

摘要 本实验以体重为(70.0±5.5) g 圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼为研究对象,研究了不同浓度氨氮胁迫对其鳃、肝组织及相关酶活性的影响。实验首先进行 96 h 急性氨氮胁迫,得出 96 h LC₅₀,在此基础上,设置对照和低(35 mg/L)、中(50 mg/L)、高(65 mg/L) 3 个氨氮浓度处理组,进行 6、12、24、48 和 96 h 的氨氮胁迫。结果显示,氨氮胁迫下,鳃小片基部泌氯细胞、呼吸上皮细胞水肿变性、坏死和脱落,鳃腔充血,柱状细胞排列不整齐;毛细血管破裂,红细胞溢出;鳃小片变粗、变短并卷曲。肝细胞核出现偏移、肿大和溶解现象,细胞轮廓模糊,血窦扩张、充血形成点状病灶,细胞水样变性、空泡化。 Na^+/K^+ -ATP 酶、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力均与对照组差异显著($P<0.05$);超氧化物歧化酶(SOD)活力显著高于对照组($P<0.05$);氨氮胁迫组 96 h 丙二醛(MDA)浓度均高于对照组,且与氨氮浓度呈显著正相关($P<0.05$);氨氮胁迫对血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、溶菌酶(LSZ)产生显著性影响($P<0.05$)。肝脏 ALT、AST、LSZ 活性 96 h 均显著低于对照组($P<0.05$)。研究表明,氨氮胁迫对圆斑星鲈产生损害,氨氮胁迫使鱼体抗氧化系统、非特异性免疫系统下降,正常生理代谢受到阻碍,鳃组织损伤,呼吸功能受损。肝组织充血形成点状病灶,机体新陈代谢和解毒功能下降。

关键词 圆斑星鲈;氨氮胁迫;组织结构;酶活性

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0059-11

氨氮是鱼类蛋白质代谢的最终产物,约占鱼类氮代谢的 60%–80%(Salin *et al*, 1991)。鱼类已形成高密度工厂化养殖,鱼类的残饵和排泄物经氨化作用产生大量氨态氮,以非离子氨为主要毒性形式。王琨(2007)¹研究证明,氨氮是诱发鱼病的主要环境因子。

当水生动物机体在受到氨氮连续刺激且超过机体调节阈值时,其抗氧化系统会遭到破坏,鳃、肾和肝组织结构发生病变(张武肖等, 2015),呼吸系统和排泄系统受到损害,进而影响机体的生长发育。目前,国内外已有较多关于氨氮胁迫对水生动物影响的报道,

* 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0803)资助 [This work was supported by Shandong Special Independent Innovation Achievements]. 王贞杰, E-mail: 1218370725@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-01, 收修改稿日期: 2016-01-10

1) Wang K. Effects of ammonia on some tissue and haematological parameters of juvenile carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus). Master's Thesis of the Northeast Agricultural University, 2007, 12–23 [王琨. 氨氮对鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)幼鱼部分组织及血液指标的影响. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2007, 12–23]

如黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*) (龙章强, 2008)¹⁾、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (叶继丹等, 2007)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) (黎庆等, 2015)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) (芦光宇等, 2014)、奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) (韩春艳等, 2014)等, 不同种鱼对氨氮耐受能力不同。同种鱼不同规格及不同地理群体对氨氮的耐受能力也不尽相同(周永欣, 1986)。本实验通过研究不同氨氮浓度、不同胁迫时间对圆斑星鲃(*Verasper variegatus*)鳃、肝组织结构及抗氧化、免疫指标的影响, 探讨 $\text{NH}_4\text{-N}$ 对圆斑星鲃产生毒害的机制, 进而实时监测养殖水体氨氮浓度的变化, 预防病害, 为圆斑星鲃的健康养殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

圆斑星鲃采自山东科合海洋高技术有限公司, 挑选同一批次体质健康、规格接近[体重为(70.0±5.5) g, 体长为(21.0±2.2) cm]的幼鱼。实验前驯养 7 d, 每天 08:00 和 17:00 定时换水 20%, 15:00 投喂 1 次商品饲料, 连续充气增氧。暂养水温为(21.0±0.5)°C、pH 为(7.8±0.2)、溶氧 > 6 mg/L、总氨氮浓度为 0.01 mg/L, 氨氮测定仪由北京连华永兴科技发展有限公司提供。

1.2 急性毒性实验

急性毒性实验在方形水泥池(210 cm× 130 cm× 44 cm)进行, 以 24 h 内未见死亡的最小浓度(75 mg/L)和全部死亡的最大浓度(150 mg/L)为区间, 作等对数划分。设置 75.00、89.18、106.05、126.11 和 149.97 mg/L 共 5 个浓度水平, 每组 2 个重复, 每个重复组 20 尾鱼, 每天用氨氮测定仪检测并用对应氨氮质量浓度的养殖用水调整水体氨氮浓度, 使其维持在初始浓度。分别记录 24、48、72 和 96 h 圆斑星鲃的死亡数量。每组浓度实测值分别为(75.00±0.35)、(89.18±0.28)、(106.05±0.44)、(126.11±0.40)和(149.97±0.56) mg/L, 水温为(21.2±0.4)°C, pH 为 7.7±0.4, 溶氧为(6.20±0.25) mg/L。

1.3 氨氮胁迫实验

1.3.1 实验组设置 通过预实验得出圆斑星鲃幼鱼 96 h 氨氮半致死浓度(LC₅₀), 据此设置对照、低

(35 mg/L)、中(50 mg/L)和高氨氮组(65 mg/L), 实测每组氨氮值分别为对照(0±0.01) mg/L、低(35.00±1.87) mg/L、中(50.00±1.22) mg/L、高氨氮组(65.00±2.35) mg/L。随机挑选体色正常、健康的圆斑星鲃幼鱼, 每组 3 个重复, 每个重复 20 尾鱼, 用对应氨氮质量浓度的养殖用水调整水体氨氮浓度, 使其维持在初始浓度。实验期间停止投饵, 每隔 8 h 测定氨氮浓度。水温为(21.0±0.5)°C, pH 为(7.8±0.5), 溶氧为(6.68±0.15) mg/L。

1.3.2 样品采集与分析 分别于氨氮胁迫后的 0、6、12、24、48、96 h, 每个池子随机挑选 3 尾实验鱼进行解剖取样。用 1 ml 无菌注射器尾静脉采血, 置于无菌离心管中, 4°C 下 3500 r/min 离心 15 min, 取上层血清, 置于-80°C 超低温冰箱保存备用。冰浴条件下, 在每条鱼的相同部位取出适量鳃丝、肝, 并准确称量鳃、肝组织质量, 按质量体积比制成 10% 的组织匀浆, 4°C 下 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于-80°C 超低温冰箱保存备用。

鳃及肝组织显微观察: 取鱼体右侧第二鳃弓及适量肝脏, 用 Bouin 氏液固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 显微观察并拍照(10×100)。

Na^+/K^+ -ATP 酶、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和溶菌酶均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.4 数据统计分析

急性毒性实验使用 SPSS 17.0 软件处理数据, 采用直线内插法(雷衍之, 2008)求出 LC₅₀, 安全浓度(SC)和非离子氨浓度(国家环境保护局科技司, 1995)的计算公式:

$$\text{SC}=0.1 \times 96 \text{ h LC}_{50}$$

非离子氨浓度计算公式:

$$C_1=1.216 \times f \times C_2 / 100$$

$$f=100 / (10^{\text{pK}_a-\text{pH}}+1)$$

$$\text{pK}_a=0.09018+2729.92/T$$

$$T=273.15+t$$

式中, C_1 为非离子氨浓度(mg/L), f 为氨的水溶液中非离子氨的摩尔百分比(%), C_2 为氨氮浓度(mg/L), T 为绝对温度(K), t 为摄氏温度(°C)。

酶活实验结果以 3 个平行组数据平均值±标准差(Mean±SD)表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 氏检验法统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

1) Long ZQ. The physiological responses to ammonia stress and vitamin C requirement of juvenile black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. Master's Thesis of East China Normal University, 2008, 23–30 [龙章强. 黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)幼鱼对氨氮胁迫的生理响应及其维生素 C 的营养需求研究. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2008, 23–30]

2 结果与分析

2.1 氨氮半致死浓度的测定

设置不同氨氮浓度梯度, 记录圆斑星鲃幼鱼的死亡率(表 1), 通过直线内插法求出氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼 24、48、72 和 96 h 的半致死浓度, 并转换成非离子氨浓度, 计算得出氨氮和非离子氨的安全浓度(表 2)。

表 1 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼死亡率的影响

Tab.1 Effects of ammonia-N stress on the mortality of *V. variegatus*

氨氮浓度 Ammonia nitrogen concentration (mg/L)	非离子氨浓度 Non-ionic ammonia concentration (mg/L)	死亡率 Mortality (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
74.99	3.36	0	10	20	40
89.18	4.00	0	40	40	70
106.05	4.75	40	80	100	100
126.11	5.65	80	100	100	100
149.97	6.72	90	100	100	100

表 2 氨氮对圆斑星鲃幼鱼的半致死浓度和安全浓度

Tab.2 The median lethal concentration and safe concentration of ammonia nitrogen for *V. variegatus*

项目 Items	半致死浓度 LC ₅₀ (mg/L)				安全浓度 Safe
	24 h	48 h	72 h	96 h	
氨氮浓度(mg/L)	115.36	96.56	72.25	67.07	6.71
非离子氨浓度	5.17	4.33	3.24	3.0	0.30

2.2 氨氮胁迫后圆斑星鲃幼鱼鳃、肝组织的显微观察

2.2.1 氨氮胁迫对鳃组织结构的影响

氨氮胁迫前, 圆斑星鲃幼鱼的鳃丝和鳃小片泌氯细胞较少, 柱状细胞和呼吸上皮细胞排列整齐规则(图 1-1)。低氨氮胁迫 6 h 和 12 h, 泌氯细胞无明显变化(图 1-2 和图 1-3); 24 h 泌氯细胞增加(图 1-4); 48 h 上皮组织增生(图 1-5); 96 h 呼吸上皮细胞部分脱落, 鳃腔有充血现象, 柱状细胞排列不整齐(图 1-6)。中氨氮

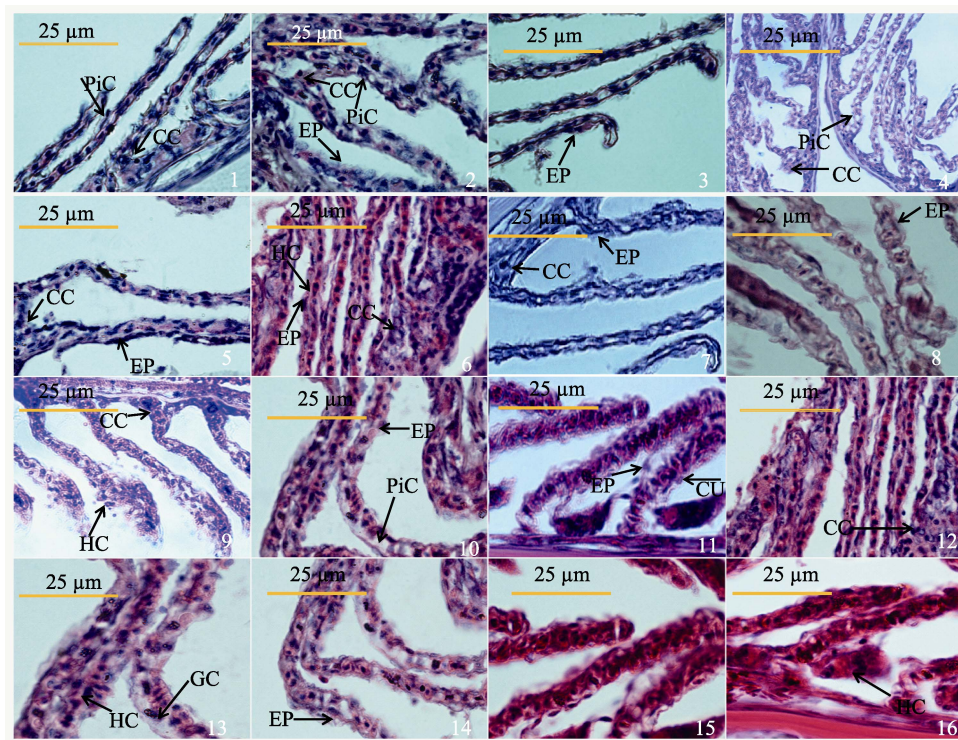


图 1 圆斑星鲃鳃组织切片

Fig.1 Microscopical observation of the gill structure of *V. variegatus* exposed to ammonia-N at different concentrations

1. 氨氮胁迫 0 h (对照组); 2-6: 低氨氮浓度(10 mg/L)胁迫 6、12、24、48 和 96 h; 7-11: 中氨氮浓度胁迫 6、12、24、48 和 96 h; 12-16: 高氨氮浓度胁迫 6、12、24、48 和 96 h

GC: 鳃腔; CU: 角质膜; EP: 上皮层细胞; HC: 血细胞; CC: 泌氯细胞; PiC: 柱状细胞

1. Microscopical gill exposed to ammonia for 0 h; 2-6: Low ammonia for 6, 12, 24, 48, and 96 h;

7-11: Medium ammonia for 6, 12, 24, 48, and 96 h

GC: Gill cavity; CU: Cuticle; EP: Epithelium; HC: Haemolymph cell; CC: Secretory chloride cell; PiC: Columnar cell

胁迫 12 h 出现呼吸上皮细胞部分脱落(图 1-8); 24 h 泌氯细胞增加, 柱状细胞排列不整齐, 部分毛细血管破裂, 红细胞溢出(图 1-9); 48 h 呼吸上皮细胞大面积脱落, 鳃小片变粗、变短并卷曲(图 1-10); 96 h 毛细血管破裂、鳃腔充血(图 1-11)。高氨氮浓度胁迫 6 h 泌氯细胞数量增加(图 1-12); 12 h 毛细血管扩张出现破裂, 鳃腔充血, 部分呼吸上皮细胞水肿变性、坏死和脱落, 鳃小片部分融合(图 1-13); 24 h 柱状细胞排列不规则, 出现充血, 鳃小片卷曲(图 1-14); 48 h 呼吸上皮细胞水肿变性、大面积坏死和脱落, 毛细血管破裂, 血细胞溢出, 鳃小片变粗变短(图 1-15); 96 h 鳃腔内充血严重, 上皮组织增生(图 1-16)。

2.2.2 氨氮胁迫对肝组织结构的影响 氨氮胁迫前, 肝细胞排列整齐, 细胞轮廓清晰(图 2-1)。低氨氮胁迫 6、12 和 24 h, 肝细胞无明显变化(图 2-2、3、4); 48 h 肝细胞核出现偏移、肿大现象(图 2-5); 96 h

细胞核出现溶解, 细胞轮廓模糊, 血窦充血(图 2-6)。中氨氮胁迫 6 h 部分细胞核肿大(图 2-7); 12 h 出现细胞核溶解(图 2-8); 24 h 细胞核溶解数量增多, 细胞出现空泡化, 细胞轮廓模糊(图 2-9); 48 h 局部肝细胞水样变性, 血窦扩张、充血(图 2-10); 96 h 充血严重, 细胞大量水样变性、空泡化(图 2-11)。高氨氮胁迫 6 h, 细胞核颜色加深, 细胞和细胞核均肿胀, 细胞核出现偏移(图 2-12); 12 h 细胞出现空泡化, 胞浆疏松透明, 水样变性(图 2-13); 24 h 细胞轮廓模糊, 个别细胞溶解(图 2-14); 48 h 肝血窦出现扩张、充血, 肝细胞溶解, 形成局部病灶(图 2-15); 96 h 大面积细胞核溶解, 细胞空泡化、溶解严重, 肝血窦严重扩张, 大面积充血, 形成点状病灶(图 2-16)。

2.3 氨氮胁迫对鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响

与对照组相比, 氨氮胁迫各组在 24 h 内, Na^+/K^+ -ATP

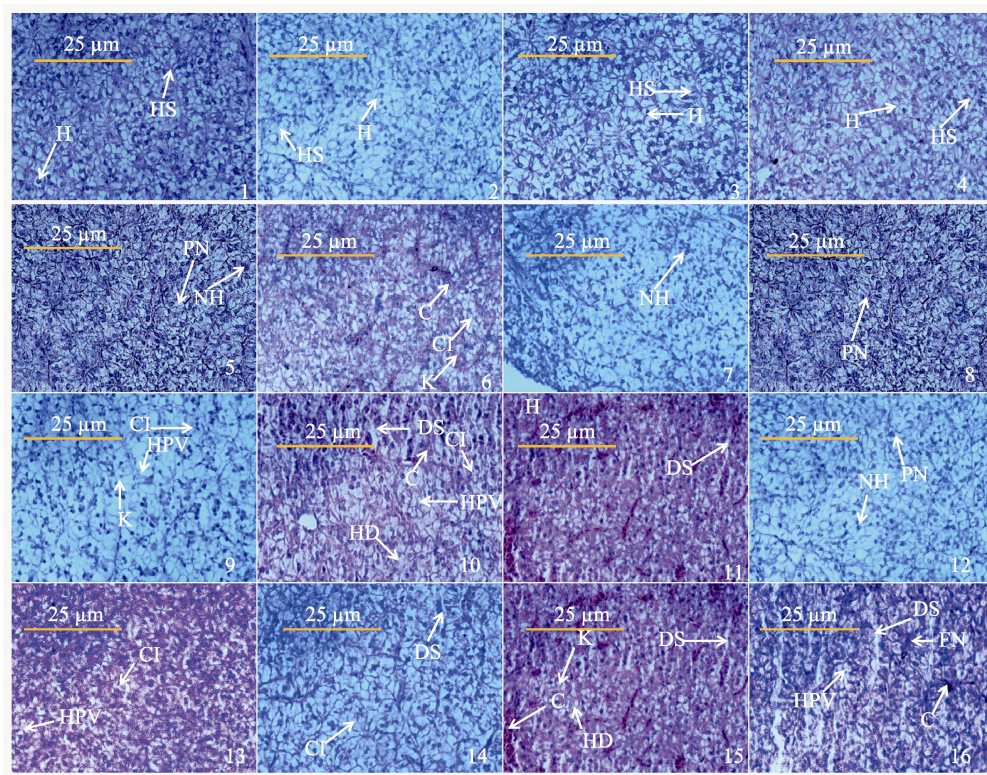


图2 圆斑星鲃肝组织切片

Fig.2 Microscopical observation of the liver structure of *V. variegatus* exposed to ammonia-N at different concentrations

1. 氨氮胁迫 0 h (对照组); 2-6: 低氨氮浓度胁迫 6、12、24、48 和 96 h; 7-11: 中氨氮浓度胁迫 6、12、24、48 和 96 h; 12-16: 高氨氮浓度胁迫 6、12、24、48 和 96 h

H: 肝细胞; HS: 肝血窦; PN: 细胞核偏移; NH: 细胞核肿大; K: 细胞核溶解; HPV: 肝细胞空泡化; HD: 肝细胞水样变性; C: 充血; CI: 细胞轮廓模糊; DS: 血窦扩张; FN: 点状病灶

1. Microscopical liver exposed to ammonia for 0 h; 2-6: Low ammonia for 6, 12, 24, 48, and 96 h; 7-11: Medium ammonia for 6, 12, 24, 48, and 96 h

H: Hepatocytes; HS: Sinusoids; PN: Cellular peripheral nucleus; NH: Nuclear hypertrophy; K: Karyolysis; HPV: Hepato cellular vacuolation; HD: Hydropic degeneration; C: Congestion; CI: Cellular outline indistinguishable; DS: Dilatation in sinusoids; FN: Focal necrosis

酶均呈负峰值变化, 且高浓度组和中浓度组在 6 h 达到最低值, 低浓度组在 12 h 达到最低值, 均与对照组差异显著($P<0.05$)。24 h 后高浓度组呈正峰值增长, 中浓度组到达对照组水平($P<0.05$); 低浓度组呈上升趋势但仍低于对照组($P<0.05$)。氨氮胁迫组在 24 h 后均上升且在 48 h 达到最大值, 均与对照组差异显著($P<0.05$)。96 h 各组降至对照组水平($P>0.05$) (图 3)。

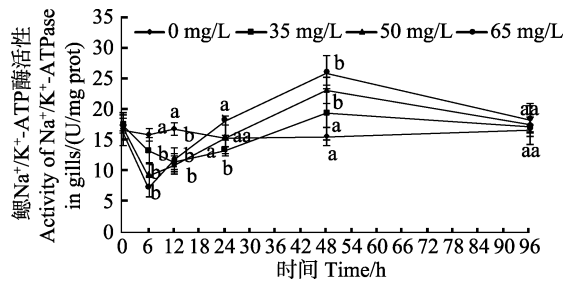


图 3 氨氮胁迫对圆斑星鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶的影响
Fig.3 Effects of ammonia-N stress on the Na^+/K^+ -ATPase in gills of *V. variegatus*

图中不同字母表示同一时间段不同处理组间差异显著 ($P<0.05$); 反之则差异不显著 ($P>0.05$); 下同
Different letters showed significant difference among treatments ($P<0.05$) at the same sampling time;
The same as below

2.4 氨氮胁迫对抗氧化系统的影响

2.4.1 氨氮胁迫对血清抗氧化系统的影响 氨氮胁迫 6 h, 血清 SOD 活性高于对照组, 且在 6 h 达到最大值, 与对照组差异显著($P<0.05$) (图 4)。6-96 h 氨氮胁迫组均低于对照组, 在 12 h 降到最低 ($P<0.05$)。高浓度组 48 h 后显著低于对照组 ($P<0.05$), 低浓度组和中浓度组 48 h 后到达同一水平 ($P<0.05$)。

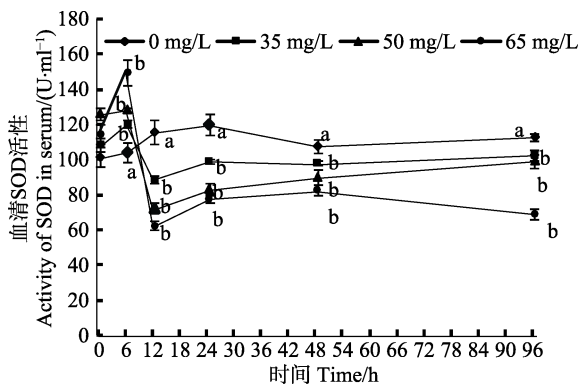


图 4 氨氮胁迫对圆斑星鲈幼鱼血清 SOD 的影响
Fig.4 Effects of ammonia-N stress on SOD in the serum of juvenile *V. variegatus*

与对照组相比, 氨氮胁迫下血清 GSH-PX 在 96 h 内先下降后上升, 均低于对照组 ($P<0.05$) (图 5)。低

浓度组在 24 h 达到最低值, 中浓度组在 6 h 达到最低值, 高浓度组在 12 h 达到最低值, 均与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

氨氮胁迫组在 96 h 内血清 MDA 均先升高后降低并显著高于对照组 ($P<0.05$), 且与氨氮浓度呈显著正相关 ($P<0.05$) (图 6)。处理组均在 24 h 升高至最高值, 高浓度组升至最高, 并与对照组差异显著 ($P<0.05$)。处理组 96 h 仍显著高于对照组 ($P<0.05$)。

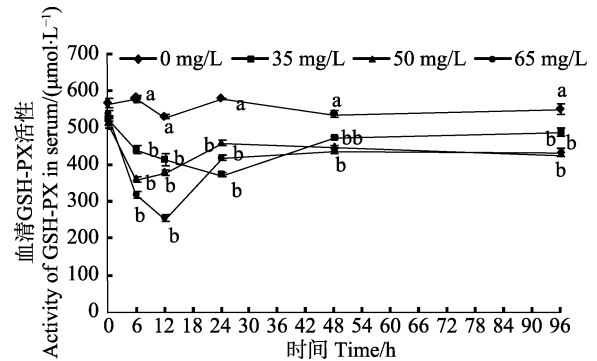


图 5 氨氮胁迫对圆斑星鲈幼鱼血清 GSH-PX 的影响
Fig.5 Effects of ammonia-N stress on GSH-PX in the serum of juvenile *V. variegatus*

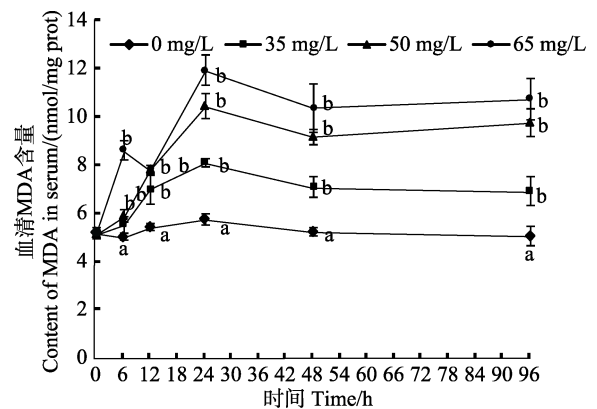


图 6 氨氮胁迫对圆斑星鲈幼鱼血清 MDA 的影响
Fig.6 Effects of ammonia-N stress on MDA in the serum of juvenile *V. variegatus*

2.4.2 氨氮胁迫对肝脏抗氧化系统的影响 氨氮胁迫 96 h, 肝脏 GSH-PX 活性先下降后上升, 均低于对照组 ($P<0.05$) (图 7)。12 h 时, 高氨氮组 GSH-PX 活性降至最小, 低、中氨氮组达到最小值, 且均与对照组差异显著 ($P<0.05$); 24 h 时, 氨氮胁迫组 GSH-PX 活性均上升, 高浓度组上升至最大, 低浓度组和中浓度组也达到最大值, 均与对照组有显著性差异 ($P<0.05$)。12 h 后高浓度组 GSH-PX 开始下降, 48 h 达到最低点, 低浓度组 12 h 后上升, 到 48 h 达到最高点。96 h 三个处理组仍显著低于对照组 ($P<0.05$)。

氨氮胁迫组肝脏 SOD 活性 6 h 升高至峰值, 均

高于对照组($P<0.05$) (图8)。6 h时,低浓度组呈下降趋势,在96 h仍显著高于对照组($P<0.05$);中浓度组6 h后SOD下降,96 h低于对照组($P>0.05$);高浓度组6 h后下降,96 h显著低于对照组($P<0.05$)。

与对照组相比,处理组MDA在胁迫6 h差异不显著($P>0.05$);6–24 h处理组均先上升后下降,且都高于对照组($P<0.05$);在24 h达到最大值,高浓度组显著高于中浓度组和低浓度组。高浓度组在24–96 h趋于平坦并显著高于对照组和其他2个处理组($P<0.05$);中浓度组在24–96 h先上升后下降,在48 h有最大值并高于对照组($P<0.05$);低浓度组96 h与对照组无显著性差异($P>0.05$) (图9)。

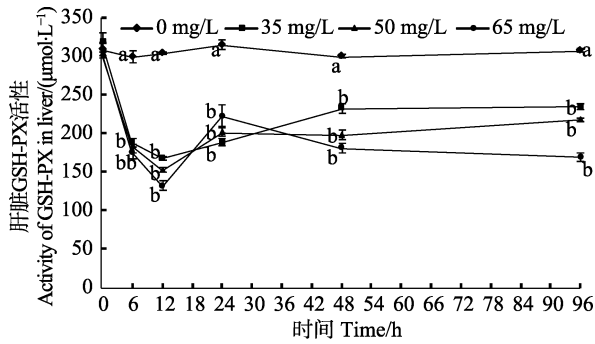


图7 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 GSH-PX 的影响
Fig.7 Effects of ammonia-N stress on GSH-PX in the liver of juvenile *V. variegatus*

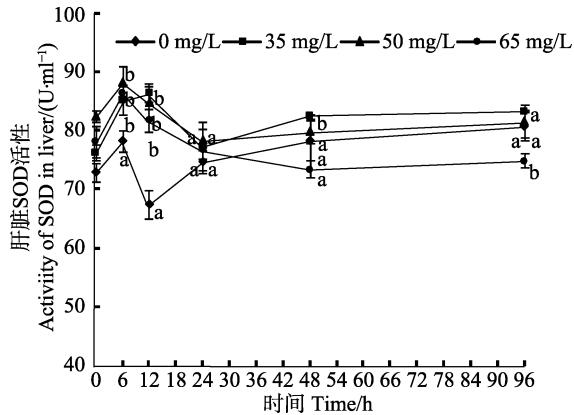


图8 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 SOD 的影响
Fig.8 Effects of ammonia-N stress on the SOD in the liver of *V. variegatus*

2.5 氨氮胁迫对免疫系统的影响

2.5.1 氨氮胁迫对血清非特异性免疫系统的影响

氨氮胁迫对血清 ALT、AST 产生显著性影响($P<0.05$),处理组均高于对照组($P<0.05$) (图10、图11)。0–12 h,处理组 ALT、AST 活性随氨氮浓度增加均显著升高并在12 h达到峰值,高浓度组到达最大值。

ALT 在12–48 h呈下降趋势,AST 在24–48 h呈下降趋势,2种酶48 h后均趋于平坦,96 h仍处于较高水平($P<0.05$)。氨氮胁迫对血清 LSZ 影响显著($P<0.05$) (图12)。0–24 h,LSZ 活性先升高后降低,在12 h达到峰值,表现为随氨氮浓度升高而升高,并高于对照组($P<0.05$)。36 h后降至对照组以下,48 h降至最低,高浓度组达到最低值,48–96 h处理组趋于平坦,但显著低于对照组($P<0.05$)。

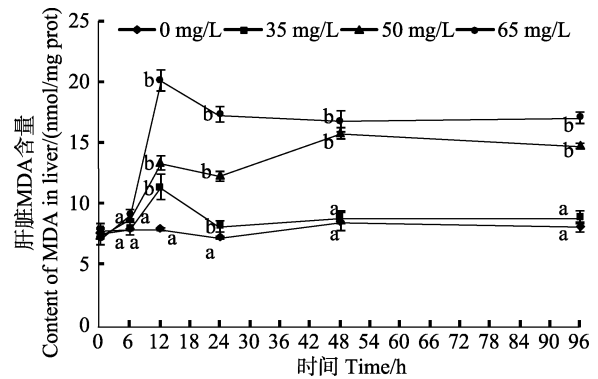


图9 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 MDA 的影响
Fig.9 Effects of ammonia-N stress on MDA in the liver of juvenile *V. variegatus*

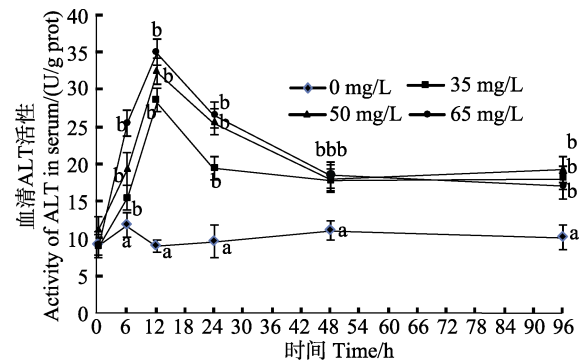


图10 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼血清 ALT 的影响
Fig.10 Effects of ammonia-N stress on ALT in the serum of juvenile *V. variegatus*

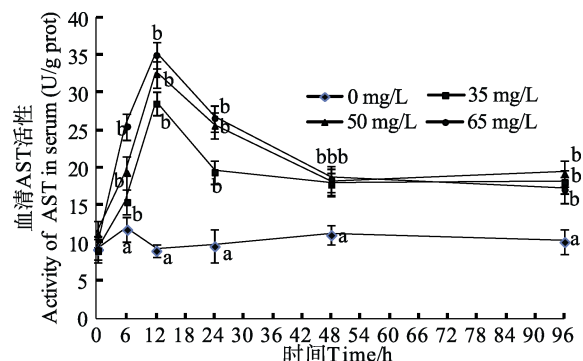


图11 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼血清 AST 的影响
Fig.11 Effects of ammonia-N stress on AST in the serum of juvenile *V. variegatus*

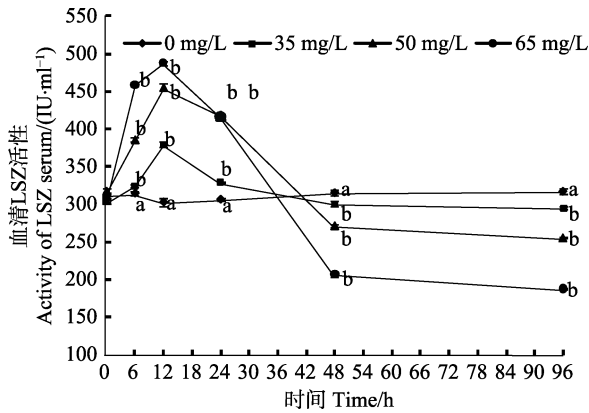


图 12 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼血清 LSZ 的影响
Fig.12 Effects of ammonia-N stress on LSZ in the serum of juvenile *V. variegatus*

2.5.2 氨氮胁迫对肝脏非特异性免疫系统的影响

与对照组相比, 氨氮胁迫 0-6 h, 肝脏 ALT、AST 活性显著升高($P<0.05$), 在 6 h 达到峰值, 氨氮浓度越高峰值越高(图 13、图 14)。ALT 在 6 h 后呈下降趋势, 24 h 时, 中浓度和高浓度组均低于对照组, 低浓

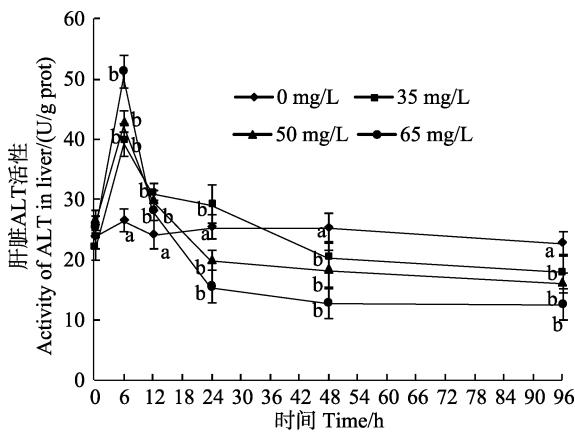


图 13 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 ALT 的影响
Fig.13 Effects of ammonia-N stress on ALT in the liver of juvenile *V. variegatus*

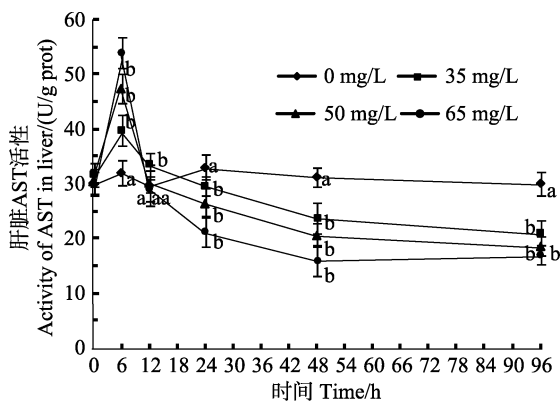


图 14 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 AST 的影响
Fig.14 Effects of ammonia-N stress on AST in the liver of juvenile *V. variegatus*

度组高于对照组, 均有显著性差异($P<0.05$)。48-96 h 时, 氨氮胁迫组均低于对照组($P<0.05$)。AST 在 6 h 后下降, 12 h 低浓度组仍显著高于对照组($P<0.05$)。中浓度组和高浓度组降至对照组水平且无显著性差异($P>0.05$)。24-96 h 时, 处理组均显著低于对照组($P<0.05$), 且氨氮浓度越高酶活性越低。

肝脏 LSZ 活性 96 h 均显著低于对照组水平($P<0.05$)。0-48 h 随氨氮浓度的增加, LSZ 活性降低, 48 h 高浓度组达到最小值($P<0.05$)。48-96 h 低浓度组升高, 高浓度组和中浓度组降低, 均显著低于对照组($P<0.05$)(图 15)。

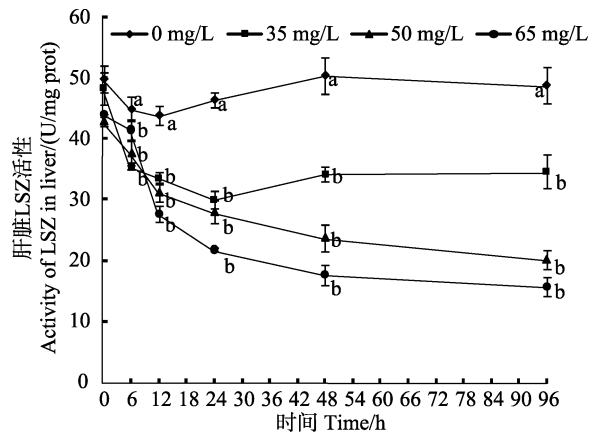


图 15 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼肝脏 LSZ 的影响
Fig.15 Effects of ammonia-N stress on LSZ in the liver of juvenile *V. variegatus*

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼鳃和肝组织结构的影响

鳃是鱼类的重要呼吸器官, 具有呼吸、排泄、调节渗透平衡的功能。鱼类的鳃与其生活的水环境直接接触, 易因水体污染受到损害, 致其正常生理功能受损, 危害鱼体健康(吴玲玲等, 2007)。当受到有毒物质侵害后, 鳃的组织细胞会出现损伤, 可以分为以下两类: 一是防御产生的损伤, 包括鳃丝上皮细胞增生和肿大、鳃小片的呼吸上皮水肿等; 二是直接造成损伤, 包括鳃上皮细胞坏死和脱落等(Sun *et al*, 2006; Fanta *et al*, 2003)。本研究结果显示, 低浓度长时间或高浓度氨氮胁迫对鳃组织结构影响显著, 泌氯细胞增加, 呼吸上皮细胞严重水肿变性, 上皮组织增生, 上皮细胞脱落和坏死严重, 毛细血管破裂, 血细胞溢出, 鳃腔内充血严重, 鳃小片变粗变短并卷曲。与张武肖等(2015)、Benli 等(2008)、周鑫(2013)等研究结果相近。鳃丝上泌氯细胞数量增多, 说明鳃的主动渗透调节机制被激活, 且胁迫浓度越高, 渗透调节机制启动

越快。鳃丝上有数千个鳃小片,形成巨大的表面积供气体交换,鳃小片是气体交换的主要场所(李加儿等,2009)。鳃丝中毛细血管破裂,鳃腔狭窄,呼吸上皮细胞脱落等都严重影响鳃的呼吸功能。

鱼类的肝脏是主要的解毒和代谢器官,是鱼体中各种污染与毒素聚集处。高浓度的氨氮污染水体,氨氮通过肝门静脉运输参与肝的代谢活动。因此,肝脏是在氨氮胁迫下受到严重损害的器官之一。本研究结果显示,高浓度氨氮胁迫使肝细胞肿大,细胞核溶解,肝细胞空泡化、溶解,细胞轮廓模糊甚至消失,肝血窦扩张、充血形成点状病灶。这与在其他胁迫研究下肝脏的损伤相似,如氯氰菊酯对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的胁迫(谢文平等,2009)、对鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼(Shiogiri *et al*, 2012)的氨氮胁迫、草甘膦对细鳞肥脂鲤(*Mylopharyngodon piceus*)毒性实验(Shiogiri *et al*, 2012)等。当肝细胞肿大时,细胞活性增加,但当细胞空泡化时,说明肝功能已受损(张武肖等,2015)。本研究中,高浓度氨氮胁迫 6 h,肝细胞及细胞核肿大,说明胁迫初期圆斑星鲃幼鱼的活性增加,可能是抗氧化酶的活性受到了影响(徐力文等,2007);胁迫 12 h 细胞出现空泡化,这时肝功能已受到了影响,细胞核空泡化表明细胞已开始坏死;48 h 后,圆斑星鲃幼鱼肝细胞已大量坏死。结果表明,高浓度或者长时间的氨氮胁迫下,肝细胞坏死使肝功能受损。组织切片证明,高浓度氨氮胁迫 12 h 后可使鳃小片呼吸上皮细胞脱落坏死甚至鳃部毛细血管破裂组织充血,长时间胁迫下严重影响圆斑星鲃的呼吸功能,进而造成鱼体死亡。高浓度氨氮胁迫下,肝组织切片显示肝血窦扩张,细胞变性坏死,因此,氨氮胁迫会造成圆斑星鲃幼鱼鳃、肝等组织损伤使鱼体发生病变。

3.2 氨氮胁迫对鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响

Na^+/K^+ -ATP 酶是在鳃组织上泌氯细胞和细胞器膜上的蛋白酶,在鱼体起渗透调节作用,其原理是主动运输排出 Na^+ 、吸收 K^+ ,细胞内外形成电位差,通过细胞膜上的载体蛋白和离子通道运输,使体内渗透压稳定(蒋玫等,2014)。鲮鱼(*Mugil cephalus*) (李波等,2007)、黄颡鱼(王雷等,1994)等在慢性氨氮胁迫下, Na^+/K^+ -ATP 酶都显著降低,但对急性氨氮胁迫的报道还较少。本研究结果显示,同一氨氮浓度下,鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活性随时间出现降低升高交替的现象。

胁迫 6 h 各处理组显著下降且低于对照组,浓度越高,下降越快,6 h 后上升,48 h 后下降。可能是胁迫初期水体中高浓度氨氮通过渗透作用进入机体,机体正常氨氮排泄受阻,高浓度的氨氮影响 Na^+/K^+ -ATP 酶蛋白结构,使酶活力降低,后来机体激活体内渗透机制,通过主动渗透调节使酶活上升。鳃组织显微观察显示,高浓度组和中浓度组分别在胁迫 6 h 和 12 h 泌氯细胞开始增多,主动渗透调节被激活,且渗透调节机制胁迫浓度越高,启动越快。48 h 后, Na^+/K^+ -ATP 酶下降,可能与鳃上皮细胞脱落、坏死,毛细血管破裂,鳃腔充血有关。

3.3 氨氮胁迫对抗氧化系统的影响

机体内抗氧化系统主要由应激诱导的抗氧化酶如 GSH-PX、SOD 等组成。氨氮在水中主要有非离子氨(NH_3)和离子氨(NH_4^+)两种形式,由于 NH_3 不带电荷又具有脂溶性,可透过细胞膜,使机体内产生大量活性氧自由基(O_2^- 和 HO_2^-),进而启动机体抗氧化系统(雷衍之,2008)。本研究中,血清和肝脏 GSH-PX 在胁迫下先下降后降低,96 h 仍显著低于对照组。GSH-PX 是普遍存在于机体中的具有催化 H_2O_2 分解的酶,且特异催化 GSH 与 H_2O_2 的还原反应,从而保护细胞膜的结构和功能完整(刘晓华等,2007)。因氨氮胁迫初期机体有短暂应激反应,GSH-PX 和 GSH 含量下降(邱德全等,2008)。血清和肝脏 SOD 先升高后降低,氨氮浓度越高,活性下降越快。肝脏 MDA 含量在抗氧化酶活性下降时明显升高。据洪美玲(2007)¹⁾报道,低氨氮浓度胁迫下,机体中抗氧化酶活性升高而抑制氧化自由基的产生,但机体抗氧化酶活力在高浓度氨氮胁迫下受到抑制,从而使机体抗氧化能力下降,机体不能及时有效的清除产生的氧自由基。氧自由基加快机体脂质过氧化,从而脂质化产物 MDA 增加(陈昌生等,2001)。这与叶继丹等(2007)、李永等(2012)、黎庆等(2015)的报道一致。氨氮胁迫对机体的抗氧化系统产生不良影响,影响动物机体正常的生理活动甚至产生病害。

3.4 氨氮胁迫对非特异性免疫系统的影响

ALT 和 AST 是动物体内广泛存在的重要的转氨酶,对机体氨基酸合成与分解代谢具有重要作用。通常用这 2 种酶活性检测动物体内氨基酸的代谢,同时

1) Hong ML. Toxicity of ambient nitrite and ammonia on *Eriocheir sinensis* juveniles and nutritional modulation of dietary V_E . Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2007, 82-89 [洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2007, 82-89]

反映肝脏功能。ALT 绝大部分存在于细胞浆, AST 位于线粒体, 少量在细胞浆中。肝脏是动物机体营养物质消化的主要腺体, 也是尿素合成的主要场所, 有解毒功能。正常情况下, 血清中只有微量 ALT 和 AST, 当肝细胞膜和线粒体膜受损时, 膜通透性增加, ALT 和 AST 被释放进入血液中(赵杰等, 2002)。氨氮胁迫 6 h, 血清和肝脏中 ALT 和 AST 活性均升高, 说明这 2 种酶受到胁迫诱导, 活性提高以加强氨氮毒性的排出。6–96 h 时, 血清中 ALT 和 AST 活性仍处于显著高水平, 但肝脏中这 2 种酶活性显著下降并低于对照组。其原因可能是随着氨氮胁迫时间的延长, 肝细胞受到损害出现细胞溶解、充血、细胞轮廓模糊等症状, 导致细胞膜和线粒体膜通透性增加, ALT 和 AST 被释放进入血液所致。这与氯氰菊酯对鲫鱼的毒性实验(王媛等, 2005), 乙草胺对泥鳅(张彬彬, 2005)胁迫实验结果一致。氨氮胁迫对圆斑星鲃幼鱼的非特异免疫系统产生毒害作用, 损害肝脏的正常功能, 对鱼体生理生长产生阻碍。

溶菌酶(LSZ)是一种碱性蛋白酶, 作为血淋巴免疫应答因子存在于动物体内, 可以裂解微生物细胞壁, 水解革兰氏阳性细菌, 清除侵入机体体内的异物, 起到免疫防御功能(Zhao *et al.*, 2003)。本研究中, 胁迫 0–12 h, 血清 LSZ 上升, 且氨氮浓度越高, 酶活性越高。可能是因为低浓度胁迫或短时间高浓度胁迫下, 圆斑星鲃机体出现强烈应激反应, 酶活性升高。12–96 h 酶活性下降, 48 h 低于对照组, 氨氮浓度越高酶活性下降越快, 说明圆斑星鲃对氨氮有一定的耐受性, 超过耐受浓度和时间后, LSZ 活性降低。高浓度或长时间的氨氮胁迫会使圆斑星鲃幼鱼 LSZ 活性降低, 进而使其非特异性免疫力下降。因此, LSZ 活性可作为圆斑星鲃应激与污染物耐受性的信号。这与氨氮胁迫对马氏珠母贝(*Pinctada martensii*) (栗志民, 2011)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) (王文琪等, 2007)、建鲤(陈家长等, 2000)的研究结果一致。肝脏 LSZ 活性 0–96 h 呈下降趋势并显著低于对照组, 本研究证明, 氨氮胁迫对肝脏 LSZ 活性有抑制作用, 表明肝脏作为鱼类的解毒器官对氨氮胁迫敏感。

本研究结果表明, 高浓度或低浓度长时间氨氮胁迫下, 圆斑星鲃幼鱼鳃、肝组织均出现充血现象, 鳃组织呼吸上皮细胞水肿变性甚至脱落坏死, 毛细血管破裂等, 严重影响鱼的呼吸功能; 肝细胞出现空泡化, 水样变性, 血窦扩张形成点状病灶, 损害圆斑星鲃的新陈代谢与解毒功能。鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性降低, 使鱼体内渗透调节紊乱, 机体受损。圆斑星鲃抗氧化能力下降, 使机体自由基增加, 脂质化严重, 非特异性免疫力下降, 鱼体容易出现各种疾病, 从而

对养殖效益产生不利影响。本研究确定了圆斑星鲃幼鱼的氨氮半致死浓度及不同氨氮浓度下鱼体鳃、肝组织中 Na^+/K^+ -ATP 酶、抗氧化指标、非特异性免疫指标的变化, 为今后养殖中对水体氨氮的监测提供参考, 以便及时对养殖水体氨氮进行调节, 及时换水去污。

参 考 文 献

- Benli AC, Köksal G, Ozkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 2008, 72(9): 1355–1358
- Chen CS, Wang SH, Ji DH, *et al.* Effects of ammonia-N on activities of CAT and SOD in *Halilobis diversicolor supertexta*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10(3): 218–222 [陈昌生, 王淑红, 纪德华, 等. 氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 218–222]
- Chen JZ, Jian JC, Hu GD, *et al.* Effects of $\text{NH}_3\text{-N}$ on non-specific immunity of Jian Carp. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2000, 20(3): 13–16 [陈家长, 简纪常, 胡庚东, 等. 水体中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 对建鲤非特异性免疫功能的影响. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(3): 13–16]
- Fanta E, Rios FS, Rom S, *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organ phosphorus in water and food. *Ecotoxicology Environment Safety*, 2003, 54(2): 119–130
- Han CY, Zheng QM, Chen GD, *et al.* Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(3): 49–52 [韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响. 南方水产科学, 2014, 10(3): 49–52]
- Jiang M, Li L, Shen XQ, *et al.* Effect of ammonia stress immunity indicators of juvenile *Mugil cephalus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 529–535 [蒋玫, 李磊, 沈新强, 等. 慢性氨氮胁迫对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼组织细胞免疫指标的影响研究. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 529–535]
- Lei YZ. *Chemical water environment for aquaculture*. Beijing: China Agriculture Press, 2008, 191–202 [雷衍之. 养殖水环境化学. 北京: 中国农业出版社, 2008, 191–202]
- Li B, Fan QX, Yang K, *et al.* Effects of chronic ammonia stress on foraging, growth, and haematological parameters of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) juveniles. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 17(6): 824–829 [李波, 樊启学, 杨凯, 等. 慢性氨氮胁迫对黄颡鱼摄食、生长及血液指标的影响. 应用与环境生物学报, 2007, 17(6): 824–829]
- Li JE, Ou YQ, Liu C, *et al.* A scanning electron microscopic observation of the gill of yellow finporgy *Sparus latus* and Niletilapia *Oreochrom isnilotica*. *South China Fisheries Science*, 2009, 4(5): 26–29 [李加儿, 区又君, 刘匆, 等. 黄鳍鲷和尼罗罗非鱼鳃丝表面结构扫描电镜观察. 南方水产, 2009, 4(5): 26–29]
- Li Q, Gong SY, Li M. Chronic ammonia toxicity induces

- glutamine accumulation, oxidative damage and immunosuppression of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 729–734 [黎庆, 龚诗雁, 黎明. 慢性氨氮暴露诱发黄颡鱼幼鱼谷氨酰胺积累、氧化损伤及免疫抑制的研究. *水产学报*, 2015, 39(5): 729–734]
- Li Y, Yang QB, Su TF, *et al.* The toxicity of ammonia-N on *Penaeus monodon* and immune parameters. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(3): 358–362 [李永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(3): 358–362]
- Li ZM, Shen YC, Wang SM, *et al.* Effects of ammonia-N stress on immune activity of *Pinctada martensii* (Dunker). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(4): 52–57 [栗志民, 申玉春, 王淑敏, 等. 氨氮胁迫对马氏珠母贝免疫活性的影响. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(4): 52–57]
- Liu XH, Cao JM, Yang DW, *et al.* Ammonia nitrogen stress before and after, marina prawns in the organization of antioxidant enzyme and lipid peroxidation products distribution. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6): 24–26 [刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. *水利渔业*, 2007, 27(6): 24–26]
- Lu GY, Liu GX. Effect of ammonia nitrogen on function of antioxidant system in *Procambarus clarkii*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2014, 26(2): 129–133 [芦光宇, 刘国兴. 氨氮对克氏原螯虾抗氧化功能的影响. *江西农业学报*, 2014, 26(2): 129–133]
- Qiu DQ, Zhou XJ, Qiu MS. Study on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of vibrio *parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(4): 455–461 [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]
- Salin D, Williot P. Acute toxicity of ammonia to Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Acipenser*, Cemagre of Publication, 1991, 153–167
- Shiogiri NS, Paulino MG, Carraschi SP, *et al.* Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neo tropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, 34(2): 388–396
- State environmental protection agency (EPA) slurry sampling. The standard of surface water environment non-ionic ammonia conversion method. *Environmental Monitoring In China*, 1995, 11(4): 9–21 [国家环境保护局科技司. 地面水环境标准非离子氨换算方法. *中国环境监测*, 1995, 11(4): 9–21]
- Sun YY, Yu HX, Zhang JF, *et al.* Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*, 2006, 63(8): 1319–1327
- Wang L, Li GY, Mao YX. Measuring methods and variations of some haemolymph factors in *Penaeus chinensis* after their oral ingestion of immune drugs. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1994, 26(5): 486–490 [王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. *海洋与湖沼*, 1994, 26(5): 486–490]
- Wang WQ, Jiang LX, Yang N. The effect of ammonia-N on immune activity of *Ruditapes philippinarum*. *Marine Sciences*, 2007, 31(1): 23–27 [王文琪, 姜令绪, 杨宁. 氨氮对菲律宾蛤仔免疫力的影响. *海洋科学*, 2007, 31(1): 23–27]
- Wang Y, Yang KJ, Wu Z, *et al.* Effect of beta-cypermethrin on glutamic-pyruvic transaminase and glutamic-oxaloacetic transaminase activities in crucian carp. *Fisheries Science*, 2005, 24(9): 8–10 [王媛, 杨康健, 吴中, 等. 氯氰菊酯对鲫鱼血清中谷丙转氨酶及谷草转氨酶活性的影响. *水产科学*, 2005, 24(9): 8–10]
- Wu LL, Chen L, Zhang YL. Effects of phenanthrene toxicity on histopathology of *Brachydanio rerio* gill and liver. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(5): 688–692 [吴玲玲, 陈玲, 张亚雷. 菲对斑马鱼鳃和肝组织结构的影响. *生态学报*, 2007, 26(5): 688–692]
- Xie WP, Zhu XP, Chen KC, *et al.* Toxic effects of cypermethrin on Na^+/K^+ -ATP activity and ultramicrostructure of gill and liver tissue in grass carp. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 120–125 [谢文平, 朱新平, 陈昆慈, 等. 氯氰菊酯对草鱼组织 Na^+/K^+ -ATP 酶活性及肝、鳃超显微结构的影响. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 120–125]
- Xu LW, Liu GF, Wang RX, *et al.* Effects of abrupt salinity stress on osmoregulation of juvenile *Rachycentron canadum*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(7): 1596–1600 [徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 等. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响. *应用生态学报*, 2007, 18(7): 1596–1600]
- Ye JD, Wang K, Chang JB. Effects of ammonia exposure on superoxide dismutase activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Paralichthys olivaceus*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2007, 20(1): 9–13 [叶继丹, 王琨, 常建波. 氨氮对牙鲆幼鱼肝中超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化物含量的影响. *水产学杂志*, 2007, 20(1): 9–13]
- Zhang BB. Effect of Acetochlor on loach liver cereal third transaminase and aspartate amino transferase. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2009(1): 289–290 [张彬彬. 乙草胺对泥鳅肝脏谷丙转氨酶和谷草转氨酶的影响. *江苏农业科学*, 2009(1): 289–290]
- Zhang WX, Sun SM, Ge XP, *et al.* Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 2(39): 233–240 [张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响. *水产学报*, 2015, 2(39): 233–240]
- Zhao HX, Zhang YQ, Huang L, *et al.* Immune system and immunological protection of shrimp. *Veterinary Medicine*, 2003, 39(1): 41–44
- Zhao J, Gu ZL, Cun QM, *et al.* Effect of “Kebaike” feed on the activities of succinate dehydrogenase, phosphoric acid triglycerides and aspartate aminotransferase of *Penaeus chinensis*. *China Feed*, 2002(3): 31–32 [赵杰, 谷子林, 崔青曼, 等. “克白克”对中国对虾体内琥珀酸脱氢酶、磷酸甘油三酯和谷草转氨酶活性的影响. *中国饲料*, 2002(3): 31–32]
- Zhou X, Dong X, Wang F, *et al.* The effect of high ammonia

concentration on gill structure alternation and expression of SOD and Hsp90 genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 321–328 [周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 急性氨氮胁迫对于草鱼 SOD 和 Hsp90 基因表达及鳃部结构的影响. *水生生物学报*,

2013, 37(2): 321–328]

Zhou YX. The acute and subacute toxicity of ammonia to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(1): 32–38 [周永欣. 氨对草鱼的急性和亚急性毒性. *水生生物学报*, 1986, 10(1): 32–38]

(编辑 冯小花)

Effects of Acute Ammonia Nitrogen Stress on Histopathology of Gill and Liver and Enzyme Activities of Juvenile *Verasper variegatus*

WANG Zhenjie^{1,2}, CHEN Siqing^{2①}, CAO Dongzheng^{1,2}, LU Bin^{1,2},
CHANG Qing², LIU Changlin², YAN Jingping²

(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)

Abstract Ammonia is a major source of water pollution and a cause of fish diseases. The object of this study was to evaluate the effects of ammonia-N stress on the gill Na^+/K^+ -ATPase, the liver microstructure, and serum physiological-biochemical indices of juvenile *Verasper variegatus*. Experimental fish had an initial average weight of (70.0±5.5) g. Subjects were first exposed to ammonia-N for 96 hours to obtain the median lethal concentration at 96 h. According to the data, we set up a control group and three ammonia-N treatments of which the concentrations were 35 mg/L (low group), 50 mg/L (middle group), and 65 mg/L (high group). In each group the subjects were treated for a series of periods (0, 6, 12, 24, 48 and 96 h). In the gill microstructure, the ammonia-N stress caused changes such as the increase in chloride cells, the shedding of pavement cells, epithelial tissue hyperplasia, the fracture in blood capillaries, the overflow of red blood cells, shortening and curling of thickened gill dice, and the breakage and congestion of the gill cavity. In liver tissue, we observed dissolution of liver nuclei, vacuoles in cells, liver cell degeneration, liquidized cells, blood sinus expansion, hyperemia, and severe congestion. Under the ammonia-N stress the activities of Na^+/K^+ -ATPase and glutathione peroxidase (GSH-PX) were first decreased and then increased, which was significantly different from the control group ($P<0.05$). The superoxide dismutase (SOD) activity was raised followed by a decrease, and was higher than the control group ($P<0.05$). After 96-hour treatment with ammonia nitrogen, the malondialdehyde (MDA) concentration became higher than the control group, and there was a positive correlation between the MDA concentration and ammonia nitrogen concentration ($P<0.05$). Ammonia nitrogen stress also resulted in an increase-decrease change in activities of serum alanine amino transferase (ALP), aspartate amino transferase (AST) and lysozyme (LSZ) ($P<0.05$). After 96-hour treatment, activities of liver ALT and AST first increased and then decreased, and was significantly lower than the control group ($P<0.05$). The liver LSZ activity was significantly lower than the control group after 96-hour treatment ($P<0.05$). These results suggested that ammonia nitrogen stress could cause a variety of impairments in the fish body, including deterioration of the antioxidant system, nonspecific immune system, physiological metabolism, the gill tissue, the respiratory function and the detoxification function. Also it led to the liver tissue hyperemia and the formation of dot lesions.

Key words *Verasper variegatus*; Ammonia nitrogen stress; Organizational structure; Enzyme activity

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

低温胁迫对云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂) 杂交后代血清生化指标的影响*



邵彦翔^{1,2} 陈超^{2①} 李炎璐² 张梦淇^{2,4} 陈建国^{2,4} 庞尊方³

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 264003;
4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 选取云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*♀)×鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*♂)的杂交种(俗称云龙石斑鱼)为研究对象, 设定 20℃、16℃、15℃、13℃和 10℃共 5 个温度梯度(20℃为对照组), 从 20℃开始, 采取 1℃/d 的降温速率, 对其进行低温胁迫实验, 并对云龙石斑鱼血清中生化指标和代谢酶活力进行检测。同时对棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*♀)和鞍带石斑鱼(♂)的杂交种(俗称珍珠龙胆石斑鱼)、斜带石斑鱼(*E. coioides*♀)×鞍带石斑鱼(♂)的杂交种(俗称青龙石斑鱼)进行低温胁迫, 每天记录 3 种杂交石斑鱼的存活率。当存活率低于 50%时, 记录半致死温度。结果显示, 云龙石斑鱼半致死温度为 8℃, 珍珠龙胆石斑鱼的半致死温度为 11℃, 青龙石斑鱼的半致死温度为 9.5℃。云龙石斑鱼血清中肌酐(CREA)含量和总胆固醇(T-CHO)含量随低温胁迫强度增加呈先降低后上升的趋势, 血清甘油三酯(TG)含量呈现波动, 在 15℃和 10℃时与对照组比较, 出现显著性差异($P<0.05$)。血清葡萄糖(GLU)含量随胁迫强度的增加呈现波动, 在 16℃和 13℃时与对照组之间有显著性差异($P<0.05$)。碱性磷酸酶(AKP)活性在 16℃时有所升高, 但整体上与对照组无显著性差异($P>0.05$)。过氧化氢酶(CAT)活性呈现波动, 除 13℃以外, 其余各组均与对照组有显著性差异($P<0.05$)。血清中谷草转氨酶(GOT)的活性在 13℃和 16℃时略高于对照组。谷丙转氨酶(GPT)活性呈现先升后降的趋势, 在 16℃和 15℃时, 与对照组差异显著($P<0.05$)。结果表明, 3 种杂交石斑鱼中, 云龙石斑鱼最耐受低温; 低温胁迫会导致幼鱼免疫力和抗氧化能力下降, 实际生产中仍应降低胁迫强度和缩短胁迫时间。

关键词 杂交石斑鱼; 低温胁迫; 生化指标; 低温耐受

中图分类号 S967 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0070-07

鱼类是在水中生活的变温动物, 体温伴随着外界生存水环境温度的变化而变化。当外界生存水环境的温度降低时, 鱼类自身会发生一系列生理、生化指标的变化。探究鱼类对低温的耐受能力, 有助于鱼类低温胁迫基础理论的研究及其培育和筛选抗寒品种, 为其幼鱼和亲本的越冬提供理论依据。

在我国, 石斑鱼的养殖品种多属于温水性或暖水性鱼类, 养殖区域主要集中在福建、广东、广西及至海南省等南方海域。当我国北方冬季遭遇寒冷空气袭扰时, 温度下降可达到 8℃以上(李凯, 2013)¹⁾。研究低温胁迫后石斑鱼血清生化指标的变化, 对于耐低温新品种的繁育十分关键。本研究以云龙石斑鱼幼鱼为

* 青岛市市南区科技项目(2014-14-011-SW)、农业部东海海水健康养殖重点实验室(T61201406)和山东省自然科学基金项目(ZR2015PC015)共同资助 [This work was supported by Qingdao City South District Science and Technology Project (2014-14-011-SW), Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture (T61201406), and Natural Science Funds of Shandong Province (ZR2015PC015)]. 邵彦翔, E-mail: shaoyanxiang123@163.com

① 通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfriuchenchao@126.com

收稿日期: 2016-01-03, 收修改稿日期: 2016-02-26

实验对象,探讨了鱼体在生活水温逐步降低的条件下,其体内生理生化指标的变化,并研究了3种杂交石斑鱼的半致死温度,为海水鱼类在北方海域的养殖和耐寒机理的研究提供了参考。

鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)又称龙趸或龙胆石斑鱼,为暖水性中下层珊瑚礁鱼类,是石斑鱼中体型最大的种类,有巨石斑之称。鞍带石斑鱼主要分布在东南亚、澳大利亚海域,在中国的南海诸岛和海南岛等海域也有分布(周玲等, 2010)。鞍带石斑鱼生长快,从6 cm左右的幼鱼至1 kg左右的商品鱼只需7-8个月,达到1 kg以后生长更快,只需1年体重就可以长到3-6 kg(黄建辉等, 2002)。鞍带石斑鱼肉味鲜美,肌肉中所含的氨基酸与组成人体的氨基酸较接近,食用营养价值极高。其幼鱼抗病能力强,具有很好的养殖前景。本研究中的3种杂交石斑鱼均以鞍带石斑鱼为父本,利用其生长快、抗病能力强的优点,分别与云纹石斑鱼(*E. moara*)(俗称真油斑)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)(俗称老虎斑)和斜带石斑鱼(*E. coioides*)(俗称青斑)的3种母本杂交,以寻找具有耐受低温能力强、生长快,具有抗病力优势、更适合我国海域和工厂化养殖的新型石斑鱼养殖品种。

1 材料与方法

1.1 材料

2014年1月从山东莱州明波水产有限公司选取规格均匀、体色正常、体表无伤的3种石斑鱼幼鱼各90尾,珍珠龙胆石斑鱼体长为(22.50±0.35) cm,体重为(198.60±0.68) g;云龙石斑鱼体长为(25.40±0.42) cm,体重为(226.70±0.75) g;青龙石斑鱼的体长为(5.40±0.32) cm,体重为(3.20±0.22) g。随机分组进行低温胁迫实验,选择9个500 L的玻璃钢水槽,在每个水槽中放入30尾幼鱼,并于20℃条件下在水槽中暂养5 d,暂养期间水温为20℃,投喂石斑鱼配合饲料,每天上下午各饱食投喂1次。实验用水符合国家渔业水质标准(GB 11607-89)。盐度为28.2±0.5, pH为7.4±0.5。每日早晚各换水50%,换水前后温差不大于0.5℃。

1.2 实验设计

以20℃为对照组,从取样开始为实验的第1天,以1℃/d的速度降温。通过加热棒控制水温,分别在16℃、15℃、13℃、10℃时对云龙石斑鱼幼鱼进行取样。取

样时将样品鱼用MS-222麻醉后吸干鱼体表面水分,用一次性无菌注射器将血液从鱼尾静脉取出并存放于1.5 ml离心管,待4℃静置5-6 h后离心,取上清液备用,将待测样品置于-80℃超低温冰箱备用。每天分别统计3种杂交鱼的成活率,在死亡率达到50%时,分别记录3种杂交石斑鱼的半致死温度。

1.3 指标检测

采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法检测血清中葡萄糖(GLU)的含量;采用甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法检测血清中甘油三酯(TG)的含量;采用肌氨酸氧化酶法检测血清中肌酐(CREA)的含量。血清中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、过氧化氢酶(CAT)和碱性磷酸酶(AKP),以上生化指标的测定的具体方法均参照南京建成试剂盒说明书。

1.4 数据统计与处理

采用Excel和SPSS 16.0对数据进行处理分析,显著性差异以($P < 0.05$)为标准,结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。对照组取5次取样的平均值,分别与实验组对比,进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 低温胁迫下云龙石斑鱼的血清生化指标

低温胁迫条件下(图1),云龙石斑鱼幼鱼血清中CREA的含量随低温胁迫强度的增强呈现先降后升的趋势,并且在16℃和13℃时与20℃对照组之间出现显著性差异($P < 0.05$),最终与胁迫前差异不显著。血清甘油三酯(TG)含量呈现波动式变化,分别在15℃和10℃时与对照组呈现显著性降低($P < 0.05$),但在其他取样温度间差异都不显著($P > 0.05$)。血清GLU含量随胁迫强度的增加整体呈现波动性变化,在16℃和13℃时与对照组之间出现显著性降低($P < 0.05$),最终含量与胁迫前差异不显著。血清中总胆固醇(T-CHO)含量随低温胁迫的强度的增强呈现先降后升的趋势,并且分别在15℃、13℃、10℃时与对照组之间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 低温胁迫下云龙石斑鱼血清酶活性

云龙石斑鱼幼鱼低温胁迫后(图2),血清中AKP活性在16℃时有所升高,但与对照组无显著性差异($P > 0.05$),实验结束时与胁迫初差异不显著。血清中CAT受到低温胁迫后活性呈现波动性,除13℃外,其

1) Li K. Taiwan Strait cold air formation and its effects on surface water temperature. Master's Thesis of the Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, 2013 [李凯. 台湾海峡冷空气过程及其对表层水温的影响研究. 国家海洋局第三海洋研究所硕士研究生学位论文, 2013]

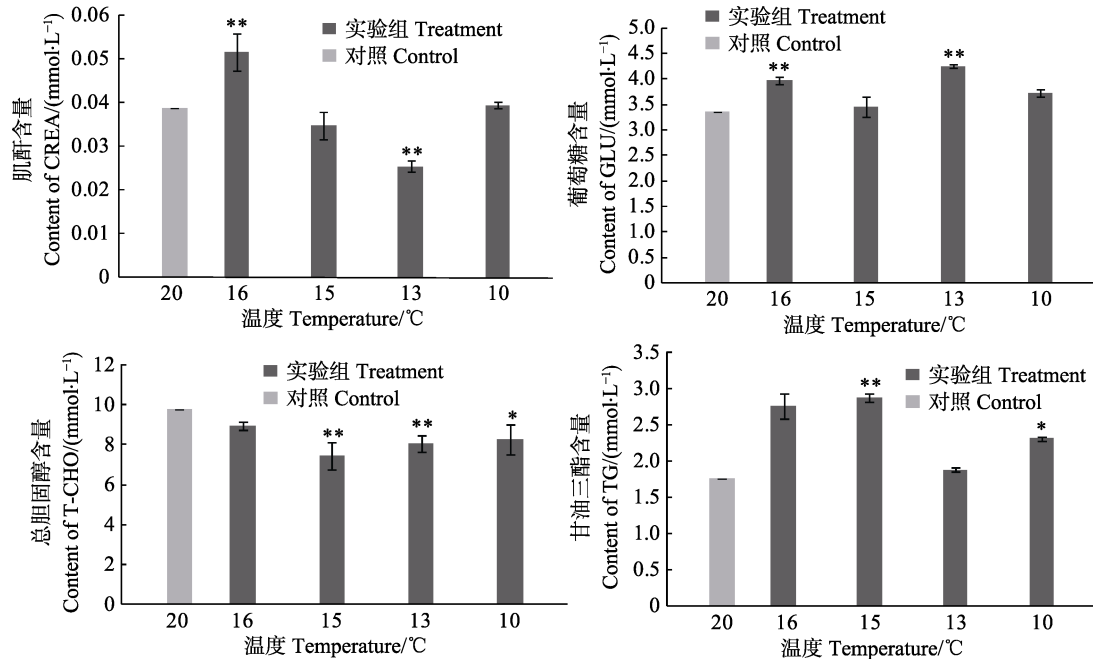


图 1 不同低温胁迫对云龙石斑鱼血清生化指标的影响

Fig.1 The effects of low temperature stress on the serum biochemical indices of *E. moara*♀ × *E. lanceolatus*♂

实验组与对照组之间的差异显著性, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 下同

Difference between the treatment and control group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, the same as below

余各组均与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。血清中 GOT 的含量在 13°C 和 16°C 时略高于对照组, 低温胁迫实验过程中整体与对照组差异不显著($P > 0.05$)。血清中 GPT 含量随低温胁迫强度的增加呈现先升后降的态势, 在 16°C 和 15°C 时与对照组相比显著降低($P < 0.05$), 实验结束时基本与对照组持平。

2.3 几种杂交石斑鱼半致死低温研究

云龙石斑鱼在 20°C 以上摄食正常, 低温至 14°C 时停止摄食, 在 8.5°C 出现死亡, 8°C 时死亡超过 50%, 达到半致死温度。珍珠龙胆石斑鱼低温胁迫时, 温度下降至 15°C 前, 摄食维持在正常摄食量的 70%–80%, 13°C 时开始死亡, 12°C 时大部分鱼体表发红, 游泳能力下降, 11°C 时死亡过半。青龙石斑鱼低温胁迫后, 13°C 鱼体出现不适, 游泳能力下降, 基本不摄食, 9.5°C 死亡超过 50%, 达到半致死温度。

3 讨论

3.1 低温胁迫对云龙石斑鱼血清生化指标的影响

血液具有运输物质、调节免疫、防御病害等重要

作用, 若血液生理成分和理化性质发生变化, 将会引起鱼体内机体代谢混乱、生理功能障碍等严重后果, 直接影响鱼类的生长发育。鱼类血液中的血清生化指标在鱼病诊断、营养状况的判断等方面具有广泛的应用。血清的生化成分也常用来反映鱼体生理状况、代谢水平和健康情况等指标。血清生化指标与生理指标对外界条件胁迫的敏感性较低, 更能体现胁迫条件下机体的生理变化(高明辉, 2008)¹⁾。鱼类是群体生活的生物, 个体之间差异较显著, 施兆鸿等(2016)在对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼肠道消化酶活性以及血清生化指标的研究中发现, 低温胁迫会对其消化系统及排泄系统造成一定的影响。可见, 研究温度胁迫对鱼类血清生化指标的影响对实际生产具有重要意义。

巫向前(2009)报道指出, 血清肌酐(CREA)来源于肌酸的代谢, 是反映肾功能健全与否的重要指标; Sano(1962)研究发现, 当外界环境温度降低时, 养殖鱼体的肾脏和鳃等器官会出现损伤, 对 CREA 的滤过或者渗出发生障碍, 进而造成血清中肌酐水平的升高。陈超等(2012)研究指出, 5 d 的低温胁迫未对七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)幼鱼肾组织造成损害, 幼鱼

1) Gao MH. The effects of V_C , V_E on carp blood indicators and antioxidant capacity under isobutyl nitrite stress. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2008, 56–62 [高明辉. V_C 、 V_E 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2008, 56–62]

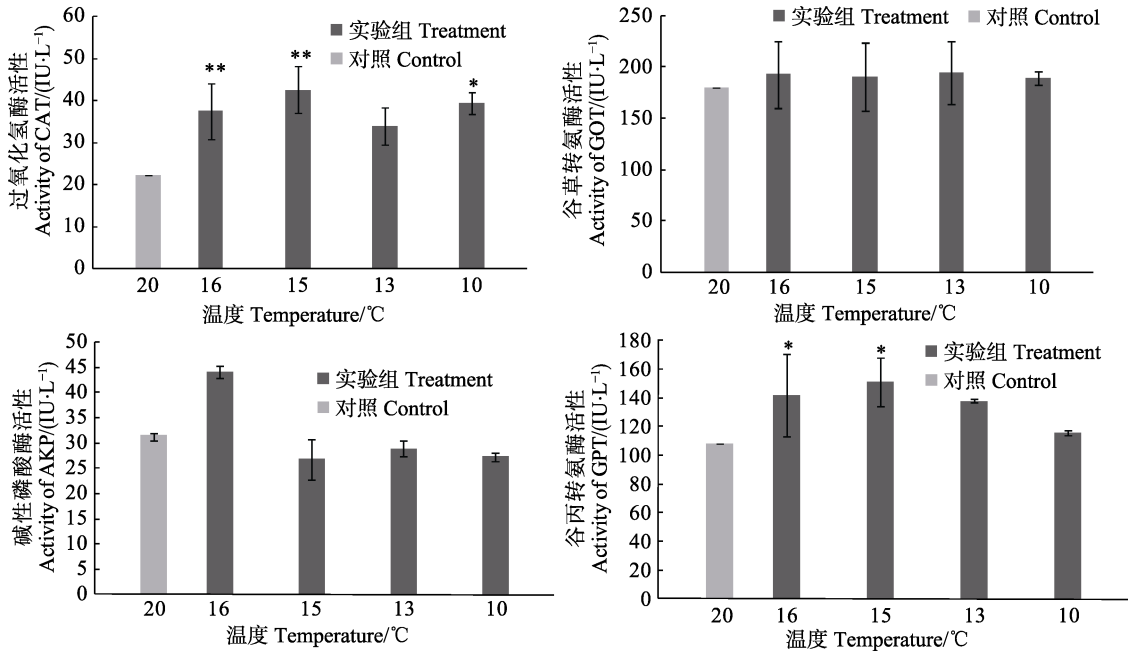


图 2 不同低温胁迫对云纹石斑鱼血清酶活性的影响

Fig.2 The effects of different low temperature stress on serum enzyme activities of *E. moara*♀×*E. lanceolatus*♂

表 1 不同温度下几种杂交石斑鱼的半致死温度

Tab.1 The semi-lethal temperatures for different hybrids at different temperatures

温度 Temperature (°C)	云纹石斑鱼(<i>E. moara</i> ♀)× (<i>E. lanceolatus</i> ♂)		珍珠龙胆石斑鱼(<i>E. fuscoguttatus</i> ♀) ×(<i>E. lanceolatus</i> ♂)		青龙石斑鱼(<i>E. coioides</i> ♀) ×(<i>E. lanceolatus</i> ♂)	
	持续时间 Time of duration (h)	成活率 Survival rate (%)	持续时间 Time of duration (h)	成活率 Survival rate (%)	持续时间 Time of duration (h)	成活率 Survival rate (%)
20	120	100	120	100	120	100
19	24	100	24	100	24	100
18	24	100	24	100	24	100
17	24	100	24	100	24	100
16	24	100	24	100	24	100
15	24	100	24	100	24	100
14	24	100	24	100	24	100
13	24	100	24	94	24	100
12	24	100	24	90	24	100
11	24	100	48	10	24	100
10	24	100			24	90
9	24	90			48	10
8	48	10				

血清 CREA 水平随着低温胁迫作用的增强而呈现下降趋势。施兆鸿等(2015)研究发现, 云纹石斑鱼幼鱼血清 CREA 含量随低温胁迫作用的增强而呈现下降的趋势, 且胁迫前后含量有显著性差异。本研究中, 血清 CREA 含量随低温胁迫强度的增加以及胁迫时间的延长, 先出现下降的趋势, 但在 10℃时又出现上升。水温为 10℃时, 接近云纹石斑鱼的半致死温度。作者认为, 温度过低引起云纹石斑鱼肾功能的损

害, 从而导致血清 CREA 的含量有所上升。

葡萄糖(GLU)是鱼体内重要的能源物质, 受肾上腺素、胰岛素等多种激素的调控, 还受到外界环境如温度、饵料等因素的影响。正常情况下, 血清中血糖含量维持在动态平衡状态。常玉梅等(2006)研究发现, 随着低温胁迫时间的延长, 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)血清中 GLU 水平先升高后降低, 认为降温初期鱼体内糖原会转化为 GLU, 进而使得血液中 GLU 水平升高,

但后期大量的 GLU 被分解为 ATP 以提供能量来应对低温环境,进而使得血清中 GLU 水平降低。邵同先等(2013)也发现,鱼体内血糖水平随着低温作用强度的增强呈现先升高后降低的趋势,可能低温胁迫前期鱼体通过血糖代谢来产生热量以提高抵御寒冷的能力,而后期身体机能明显下降。本研究中,云龙石斑鱼在低温胁迫的早期,血糖浓度升高,之后下降。但在 13℃ 时出现略微上升之后又下降,作者认为,因其在 14℃ 时停止摄食,机体内肌糖元转化成葡萄糖,导致血糖浓度出现短时间上升,具体原因有待进一步研究。

总胆固醇(T-CHO)和甘油三酯(TG)是血脂中的主要成分,它们是生命细胞代谢的必需物质,也是反应机体摄取和合成蛋白能力的重要指标。它们以不同的脂蛋白形式存在于肝脏和其他细胞中,通过肝肠循环的形式合成和分泌。TG 是一种高效的能量物质,通常以热量源的形式被存储起来。贾明亮(2010)¹⁾实验表明,低温胁迫条件下,奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aures*)血清中 TG 和 T-CHO 含量都显著降低。本研究中,血清 TG 的含量在实验初期出现上升,之后下降,最终高于对照组,且差异显著,与陈超等(2012)的研究结果相似。推测机体不饱和脂肪酸在低温条件下被诱导合成,能够帮助鱼体提高抵御寒冷的能力,是鱼类机体在低温作用下调整适应的结果。

胆固醇是细胞膜的主要组成成分,Dey 等(1993)研究表明,在温度较高时,胆固醇能组织细胞膜磷脂双层分子的无序化;当环境温度降低时,胆固醇又能够干扰膜磷脂双层分子的有序化,从而通过防止晶体形成的方式来保证细胞膜的完整性和流动性。本研究中,T-CHO 的含量随着低温胁迫时间的延长逐渐降低,与之前的研究结果相似。作者认为,T-CHO 含量的减少是由于肝细胞受到损伤致使与胆固醇合成相关的酶反应受到抑制而导致。

3.2 低温对云龙石斑鱼血清酶活性的影响

血清中的碱性磷酸酶(AKP)在生物体内分布广泛,是一种重要的水解酶,与机体内磷酸基团的转移密切相关,通常此酶活力高,表明机体代谢能力较强且生长速度较快。章龙珍等(2010)报道指出,外界环境、疾病和年龄等因素会对 AKP 的活力造成影响,并带来一系列的生理变化。本研究发现,随着外界环境温度的降低,AKP 活力呈短暂升高后又降回到与对照组接近的水平。当生物体代谢或胆道排泌异常时

可能会引起 AKP 活力的升高。曹莉萍等(2008)和韦仕高等(2010)研究发现,当肝脏受损或功能出现异常时,血清中 AKP 活性的升高是由于其通过淋巴道和肝窦进入血液。本研究中,AKP 活力与对照组接近,低温胁迫未对云龙石斑鱼幼鱼的免疫机制或代谢造成损害。

谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)是糖类、脂肪和蛋白质三大能源物质代谢的关键酶,是维持生物体正常生命活动必不可少的酶。Samsonova 等(2003)研究发现,GPT 和 GOT 的活性对于鱼体生存环境、摄食情况和生长发育具有一定的指示作用。当鱼体受到外界低温环境胁迫时,机体细胞膜通透性改变,GPT 和 GOT 大量释放到血清中,导致血清转氨酶活性迅速升高,进而影响鱼体正常的代谢功能。冀德伟等(2009)在对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)低温胁迫实验中发现,GPT 和 GOT 活性均随着胁迫时间的延长和强度的增加而不断升高。何福林等(2007)发现,随着外界水温的升高,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)血清中 GPT 和 GOT 活性有不断升高的趋势。通常情况下,GOT 在血清中的浓度较低,而在肝细胞中的含量较高。一旦肝细胞受损,GOT 将会被大量释放至血液中,进而血液中的酶浓度升高或酶活性增强。本研究中,云龙石斑鱼血清 GOT 与降温的关系:在低温胁迫的开始阶段,GOT 活性明显上升,但随着低温胁迫的持续,GOT 活性出现下降,略高于对照组。具体原因还需要进一步研究。

正常情况下,GOT 多存在于心脏中,只有少量存在于细胞中,其催化谷氨酸与草酰乙酸间的转氨反应。因此,GOT 活性高低常用来检测心脏功能是否健全。影响 GOT 活性的因素很多,如机体发育阶段、饵料质量、温度、化学污染等均会对其活性产生影响,其中,温度是影响 GOT 活性最大的环境因子。本研究中,随着低温的延续,GOT 的含量整体呈现上升趋势,与施兆鸿等(2015)对云纹石斑鱼的研究结果相似,表现出云纹石斑鱼耐受低温的特性。

过氧化氢酶(CAT)是细胞内参与自由基清除系统的重要抗氧化酶,它能够减轻活性氧簇(ROS)对机体的伤害。然而,鱼体内的抗氧化酶活力受到多种环境因子的影响,如温度、饥饿、盐度、溶氧等。Martinez-Alvarez 等(2005)报道指出,水温的变化能直接影响鱼体的抗氧化体系。王晓杰等(2006)研究发现,随着环境温度的降低,在实验初期许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)体内的 CAT 活性降低,后期 CAT 活性又随

1) Jia ML. The effects of low temperature stress on growth, muscle composition and hematological and biochemical indices of Tilapia(*Oreochromis niloticus*×*O. aures*). Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2010, 59–66 [贾明亮. 低温胁迫对奥尼罗非鱼的生长、肌肉组成和血液生理生化指标的影响. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 59–66]

着胁迫时间的延长呈上升趋势。本研究中, CAT 的含量在实验开始阶段出现上升, 中期出现略微下降, 之后又呈现上升趋势。本研究只选择了具有代表性的 CAT 作为鱼体抗氧化酶的研究对象, 观察了低温胁迫对云龙石斑鱼血清中抗氧化酶活性的影响, 而没有对鱼体内其他抗氧化酶的活性进行检测, 因此, 低温胁迫对云龙石斑鱼整体抗氧化酶的影响尚需进一步研究。

3.3 几种杂交石斑鱼低温半致死温度的研究

马旦梅等(2010)和徐镇等(2006)研究了不同品系的罗非鱼(*Tilapia*)和大黄鱼在低温胁迫下的致死温度。值得注意的是, 对于同样的鱼体采用不同的降温速率将会得到不同的起始致死低温点和不同的死亡温度范围。尽管目前测定鱼类起始致死低温的方法较多, 但学者多采用杨淞等(2006)报道的 1℃/24 h 的降温方法, 此低温条件下的降温速率对实验鱼体产生的冷冲击微乎其微, 能够客观真实地反应出鱼体对于低温胁迫的抵抗力。本研究以 1℃/24 h 的降温速率, 测定了 3 种杂交石斑鱼的致死低温, 较真实地反映出 3 种杂交石斑鱼对低温的最低耐受温度。研究表明, 珍珠龙胆石斑鱼作为大规模养殖的杂交石斑鱼品种, 耐受低温的能力明显比云龙石斑鱼弱, 适合在南方大规模养殖。青龙石斑鱼其生长特性、抗病抗寒能力均未出现相关报道, 还需要进一步研究。云龙石斑鱼比其他两种杂交石斑鱼能耐受更低温度的胁迫, 适合在我国北方和南方进行大规模工厂化养殖生产。

参 考 文 献

- Cao LP, Lv JF, Mou XP, *et al.* Serum GGT, ALP and LDH associated detection to cancer patients diagnosis and its meaning. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2008, 26(4): 437-438 [曹莉萍, 吕娇凤, 牟秀萍, 等. 血清 GGT、ALP 和 LDH 联检测定对癌症患者的诊断及意义. *实验与检验医学*, 2008; 26(4): 437-438]
- Chang YM, Cao DC, Sun XW, *et al.* Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. *Chinese Journal of Fisheries*, 2006, 19(2): 71-75 [常玉梅, 曹鼎臣, 孙效文, 等. 低温胁迫对鲤血清生化指标的影响. *水产学杂志*, 2006, 19(2): 71-75]
- Chen C, Shi ZH, Xue BG, *et al.* Influence of low-temperature stress on serum biochemical parameters in juvenile *Epinephelus septemfasciatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1249-1255 [陈超, 施兆鸿, 薛宝贵, 等. 低温胁迫对七带石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响. *水产学报*, 2012, 36(8): 1249-1255]
- Dey I, Buda C, Wiik T, *et al.* Molecular and structural composition of phospholipids membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(16): 7498-7502
- He FL, Xiang JG, Li CJ, *et al.* Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3): 363-369 [何福林, 向建国, 李常健, 等. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 363-369]
- Huang JH, Wu TM, Lin QS, *et al.* Biological characteristics and breeding technology of gentian grouper. *China Fisheries*, 2002, 24(6): 57-59 [黄建辉, 吴天明, 林秋生, 等. 龙胆石斑鱼的生物学特性及养殖技术. *中国水产*, 2002, 24(6): 57-59]
- Ji DW, Li MY, Wang TZ, *et al.* Effects of low temperature stress periods on serum biochemical indexes in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fisheries Sciences*, 2009, 28(1): 1-4 [冀德伟, 李祥云, 王天柱, 等. 不同低温胁迫时间对大黄鱼血清生化指标的影响. *水产科学*, 2009, 28(1): 1-4]
- Ma DM, Cheng GP, Yu HY, *et al.* The death reaction of Yoshitomi tilapia in different cooling rate stress. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 26(4): 200-202 [马旦梅, 程光平, 喻海燕, 等. 吉富罗非鱼对不同降温速率胁迫的死亡反应研究. *广西畜牧*, 2010, 26(4): 200-202]
- Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1): 75-88
- Sano T. Haematological studies of the culture fishes in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 1962(48): 105-109
- Samsonova MV, Minkova NO, Lapteva TI, *et al.* Aspartate and alanine amino transferase in early development of the keta. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2003, 34(1): 14-18
- Shao TX, Lei WJ, Zhao WZ. *Hypothermal medicine*. Beijing: People's Military Medical Press, 2013 [邵同先, 雷万军, 赵文增. *低温医学*. 北京: 人民军医出版社, 2013]
- Shi ZH, Xie MM, Peng SM, *et al.* Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30-36 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30-36]
- Shi ZH, Zhang YL, Gao QX, *et al.* Effects of low-temperature stress on serum biochemical parameters and metabolic enzyme activity in juvenile *Epinephelus moara*. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(8): 2222-2228 [施兆鸿, 张艳亮, 高权新, 等. 云纹石斑鱼幼鱼血清生化指标对低温胁迫的响应. *生态学杂志*, 2015, 34(8): 2222-2228]
- Wang XJ, Zhang XM, Huang GQ, *et al.* Compensatory growth of rockfish (*Sebastes schlegeli*) following low temperature stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 566-572 [王晓杰, 张秀梅, 黄国强, 等. 低温胁迫对许氏平鲈补偿生长的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 566-572]
- Wei SQ, Wei X, Wei ZL, *et al.* The clinical value of serum enzymes indicators changes effecting liver cancer diagnosis. *Chinese Journal of Misdiagnosis*, 2010, 10(9): 2095-2096 [韦仕高, 韦霞, 韦忠理, 等. 血清酶类指标变化对原发性肝癌诊断的临床价值. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(9): 2095-2096]

- Wu XQ. Evaluation of clinical test results (2nd Edition). Beijing: People's Health Press, 2009: 292–294 [巫向前. 临床检验结果评价(第2版). 北京: 人民卫生出版社, 2009, 292–294]
- Xu Z, Jiang JP, Chen YE, *et al.* Study on low lethal temperature of different strains of *Pseudosciaena crocea*. Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition), 2006, 19(4): 462–464 [徐镇, 江锦坡, 陈寅儿, 等. 不同品系大黄鱼致死低温的研究. 宁波大学学报, 2006, 19(4): 462–464]
- Yang S, Du C, Lu MX, *et al.* Study on lethal temperature of five *Tilapia* hybrids F₁. Journal of Aquaculture, 2006, 27(2): 11–14 [杨淞, 杜诚, 卢迈新, 等. 5种杂交F₁代罗非鱼致死低温的初步研究. 水产养殖, 2006, 27(2): 11–14]
- Zhang LZ, Feng L, Hou JL, *et al.* Effects of lead exposure on the activities of alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and creatine kinase in juvenile *Acipenser sinensis* blood. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(7): 1359–1364 [章龙珍, 冯琳, 侯俊利, 等. 铅暴露与排放对中华鲟幼鱼血液中碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶及肌酸激酶活力的影响. 生态学杂志, 2010, 29(7): 1359–1364]
- Zhou L, Weng WM, Li JL, *et al.* Studies on embryonic development, morphological development and feed change-over of *Epinephelus lanceolatus* larva. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(1): 293–302 [周玲, 翁文明, 李金亮, 等. 鞍带石斑鱼胚胎发育及仔鱼形态发育、饵料转变的观察研究. 中国农学通报, 2010, 26(1): 293–302]

(编辑 冯小花)

Effects of Low Temperature Stress on Serum Biochemical Indices of the Juvenile Hybrid of *Epinephelus moara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂

SHAO Yanxiang^{1,2}, CHEN Chao^{2①}, LI Yanlu², ZHANG Mengqi^{2,4}, CHEN Jianguo^{2,4}, PANG Zunfang³

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 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. Laizhou Mingbo Aquatic Limited Corporation, Yantai 264003; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Low temperature tolerance of *Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ (hereinafter *Yunlong*) was investigated in this study. The initial water temperature (20°C) was served as control, and then was dropped at a rate of 1°C/d, the changes in serum biochemical indices and metabolic enzyme activities of *Yunlong* were determined when the water temperatures reached 16°C, 15°C, 13°C and 10°C. During the cold stress period, survival rates and the semi-lethal temperatures of *Yunlong*, *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ (Pearl Gentian), and *E. coioides* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ (*Qinglong*) were observed and recorded. The semi-lethal temperature was recorded when the survival rate reached 50%. We found that the semi-lethal temperatures for *Pearl Gentian*, *Qinglong* and *Yunlong* were 11°C, 9.5°C, 9°C, and 8°C respectively. The levels of serum creatinine (CREA) and total cholesterol (T-CHO) were first increased and then decreased along with increase of the intensity and duration of the low temperature stress. The level of serum triglycerides (TG) fluctuated at different temperatures, and the values at 15°C and 10°C were significantly different from that of the control group ($P < 0.05$). The content of serum glucose (GLU) also varied with the temperatures, the levels at 16°C and 13°C were different from that of the control group ($P < 0.05$). The activity of serum alkaline phosphatase (AKP) at 16°C was slightly and insignificantly increased ($P > 0.05$). The activity of serum catalase (CAT) fluctuated and showed significant differences between the control group and low temperatures at 16°C, 15°C and 10°C ($P < 0.05$). The activity of serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) was slightly higher than that of the control group ($P > 0.05$). The activity of serum glutamate pyruvate transaminase (GPT) was elevated followed by a decline along with the increase in the intensity and duration of low temperature stress. At 16°C and 15°C, the activity of GPT was different from that of the control group ($P < 0.05$). In conclusion, *Yunlong* was the most tolerant to low temperature stress among the three hybrids. Our data also suggested that low temperature could impair the immunity and the antioxidant capacity of juvenile fish, therefore the intensity and duration of the low temperature condition should be limited during practice.

Key words Hybrid grouper; Low temperature stress; Biochemical indicators; Low temperature tolerance

① Corresponding author: CHEN Chao, E-mail: ysfrichenchao@126.com

盐度对条纹锯鲷(*Centropristis striata*)仔鱼的活力、开口、摄食的影响*



张春禄^{1,2} 陈超^{1①} 李炎璐¹ 张廷廷^{1,2}
刘莉^{1,2} 曲江波³ 孙涛³

(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. 烟台开发区天源水产有限公司 烟台 264000)

摘要 观察研究了 10 个盐度梯度(7、12、17、22、27、32、37、42、47 和 52)对条纹锯鲷(*Centropristis striata*)仔鱼的活力、开口和摄食情况的影响,记录分析其不同盐度条件下不投饵存活系数、开口率、摄食率及摄食强度等指标。结果显示,盐度对条纹锯鲷仔鱼的活力、摄食及存活有明显影响,其存活和摄食的适宜盐度范围为 12–37,最适盐度范围为 27–32。盐度低于 12 时,仔鱼存活率、开口率和摄食强度随盐度的降低而降低,盐度高于 37 时,仔鱼存活率、开口率及摄食强度则随盐度的升高而降低。不同盐度条件下,条纹锯鲷仔鱼 SAI 值的波动范围为 0.034–6.401,盐度为 12–37 的实验组与 7、42、47、52 实验组的 SAI 值存在显著性差异($P < 0.05$),盐度为 32 时,仔鱼的 SAI 值最大,为 6.041,SAI 值与盐度之间符合三次曲线函数关系,其表达式为 $y = -5.894 + 1.155x - 0.034x^2 + 0.000x^3$, $R^2 = 0.895$,其中, y 代表 SAI, x 代表盐度。盐度为 7、42、47 和 52 时,仔鱼的存活率均低于 50%,盐度为 52、47 时,仔鱼在第 3、4 天存活率分别降为 0。盐度为 22、27、32 时,培育至第 5 天,仔鱼的存活率均在 80% 以上。盐度在 17–37 范围内,仔鱼开口率为 60%–85%,且仔鱼均能较好摄食,盐度为 32 时,仔鱼开口率达到最大值,为 85%,仔鱼摄食亦达到最佳状态,摄食率为 85%,8 日龄仔鱼摄食强度为 5.45 个轮虫/尾。

关键词 盐度; 条纹锯鲷; 仔鱼; 生存活力指数; 存活率; 开口率

中图分类号 S962 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0077-06

条纹锯鲷(*Centropristis striata*)属于鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Serraninae)、锯鲷属(*Centropristis*),俗称美洲黑石斑鱼(雷霖霖等,2007)。条纹锯鲷是一种名贵的海水鱼类,其肉质鲜美,适应性强,经济价值高(林星,2009;刘瑞棠,2011)。2002 年从美国引进条纹锯鲷鱼苗和受精卵,其后在山东、浙江、福建、广东等地广泛开展养殖(王波等,2003)。国内外对条纹锯鲷的研究主要包括:条纹锯鲷胚胎发育及卵黄囊仔鱼形态变化(贾瑞锦等,2012)、幼鱼配合饲料(林星,2009)、

仔稚幼鱼形态发育的异速生长模式(贾瑞锦等,2014)、饥饿对仔鱼生长摄食的影响(贾瑞锦等,2014)等。盐度作为重要的环境因子,对多种海、淡水鱼类的生活、生长、发育、繁殖、孵化、仔鱼活力、开口、仔鱼摄食等有明显影响。阳刚等(2011)研究了条纹锯鲷对盐度胁迫的耐受能力及淡水胁迫的恢复,结果显示,(20.32±9.67) cm 和(10.20±0.63) cm 的鱼种在盐度为 0 的环境中的半致死时间分别为(1.63±0.23) h 和(0.77±0.23) h,且在盐度为 10 的低盐度环境中可以存

* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)资助 [This work was supported by Ministry of Science and Technology International Cooperation Project (2012DFA30360)]. 张春禄, E-mail: zcl643228594@sina.com

① 通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfriichencao@126.com

收稿日期: 2015-10-26, 收修改稿日期: 2016-01-12

活 96 h 以上。徐涛(2007)¹⁾认为, 盐度对条纹锯鲂的特定生长率、食物转化率、血浆渗透压和鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力有显著影响, 盐度变化的幅度越大, 血浆渗透压和鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力下降越明显。在条纹锯鲂幼鱼对极限盐度的耐受实验中发现, 在盐度为 6 时, 幼鱼出现死亡现象; 当盐度为 4 时, 24 h 内幼鱼全部死亡(Berlinsky *et al.*, 2000; Atwood *et al.*, 2001)。盐度高低对条纹锯鲂的影响的报道, 其研究对象主要为幼鱼, 盐度对条纹锯鲂仔鱼的活力、开口和摄食影响的研究尚未见报道, 本研究以多梯度盐度对比实验对条纹锯鲂早期仔鱼活力、开口、摄食进行研究观察, 为稳定开展其人工繁育奠定理论基础。

在生产中, 仔鱼活力、开口、饵料转换和摄食是提高养殖成活率 and 经济效益的关键(庄平等, 1999), 仔鱼早期发育阶段的高死亡率与开口率关系密切。许多鱼类仔鱼在内源营养向外源营养过渡的阶段, 会出现大量死亡, 这一过渡阶段被学者称为“危险期”(朱成德, 1986)。如果不清楚仔鱼开口、摄食和生长与环境因素的关系, 容易导致仔鱼大量死亡或者畸形, 而在众多环境因子中, 盐度是最重要的因素之一, 合理的盐度能够提高仔鱼的开口率和成活率(菅玉霞等, 2012)。本研究通过开展盐度对条纹锯鲂仔鱼的活力、开口和摄食的影响分析, 为其苗种生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验用亲鱼为中国水产科学研究院黄海水产研究所在烟台开发区天源水产有限公司培育的 3-4 龄种鱼, 在 7 m×3 m×1.2 m 的室内水泥池中培养。亲鱼自然产卵受精后, 收集受精卵放入孵化网中孵化, 获得初孵仔鱼, 全长为(2.696±0.087) mm。孵化和培育条件: 水温为 22.6-26.0℃, 盐度为 32, $\text{DO} \geq 5 \text{ mg/L}$, pH 为 7.4-8.1。

1.2 实验方法

1.2.1 实验盐度梯度的设置 根据条纹锯鲂适宜的生存盐度为 5-36, 最适盐度为 15-32 (雷霖霖等, 2007), 设置 10 个盐度梯度, 分别为 52、47、42、37、32、27、22、17、12 和 7。较高盐度的海水以自然海水加盐卤配制而成, 较低盐度组由海水添加一定比例

的、经充分暴晒曝气的自来水配制而成, 每个盐度梯度设置 2 个平行。

1.2.2 不同盐度下仔鱼生存活力指数测定 肉眼观察选取无畸形、活力好的初孵仔鱼作为实验材料, 每个盐度组(海水 1000 ml)烧杯中放置 100 尾, 实验水温为(25.0±0.5)℃, 无投饵, 无充气, 静水培育。每隔 24 h 用吸管吸出死亡仔鱼, 并记录死亡数量, 直至仔鱼全部死亡, 计算仔鱼生存活力指数:

$$\text{SAI} = \sum_{i=1}^k (N - hi) \times i / N$$

式中, SAI 为生存活力指数(Survival activity index); N 为实验起始的仔鱼数量; k 为仔鱼全部死亡所需的天数; hi 为第 i 天时仔鱼累计死亡数(王涵生等, 2002)。

1.2.3 不同盐度条件下仔鱼开口率和摄食率的测定

盐度梯度设置及海水配制和实验容器同 1.2.1。每实验组选取活力好的 2 d 仔鱼[全长为(2.914±0.243) mm], 每个烧杯各 100 尾, 不充气, 静水培育。仔鱼的开口饵料为褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*), 投饵密度为 10-15 个/ml。每日 15:00 统计每个烧杯中仔鱼死亡数量, 计算成活率, 从每个烧杯取 10 尾仔鱼镜检其摄食情况, 计算仔鱼的开口率、摄食率及摄食强度, 每日清污, 隔天少量换水。

开口率(%)=(3 d 开口的尾数/测定仔鱼总数)×100;

摄食率(%)=(摄食尾数/测定仔鱼总数)×100;

摄食强度=仔鱼摄食轮虫的总数/测定仔鱼的总数。

1.2.4 数据处理分析 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。SAI、开口率数据使用 SPSS 13.0 软件处理, 用单因素方差分析方法(One-way ANOVA)分析数据, 选择显著性水平 P 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异显著, 反之差异不显著。

2 结果

2.1 不同盐度下条纹锯鲂仔鱼的 SAI 值

2015 年 7 月 14 日-8 月 3 日, 先后测定 3 批仔鱼在不同盐度下的 SAI 值, 其结果见表 1。对 3 个批次的 SAI 平均值采用最小显著差法检验各盐度组 2 组的差异, 结果显示, 盐度为 12、17、22、27、32 和 37 的实验组, SAI 值无显著性差异, 与其他组差异显著。盐度为 47 与 52 的实验组之间的 SAI 值无显著性差异,

1) Xu T. The effect of environmental factors on energy budget, osmoregulation and the activities of antioxidant enzymes of *Centropristis striata*. Mater's Thesis of the Ocean University of China, 2007, 1-64 [徐涛. 环境因子对条纹锯鲂 *Centropristis striata* 能量代谢、渗透调节和抗氧化酶活力的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 1-64]

表 1 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的 SAI 值
Tab.1 Effect of salinity on the survival activity index of *C. striata* larvae

批次 Batch	不同盐度下的生存活力指数 SAI at different salinity									
	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52
1	1.465	7.250	7.365	7.640	7.840	8.205	3.745	1.750	0.340	0.020
2	0	5.465	6.155	6.165	6.275	6.810	4.580	0.690	0.150	0.090
3	0	0	0.294	1.413	2.065	4.188	3.800	1.444	0.040	0
平均值±标准差 Mean±SD	0.488± 0.846 ^c	4.238± 3.777 ^a	4.604± 3.782 ^a	5.073± 3.254 ^a	5.393± 2.987 ^a	6.401± 2.039 ^a	4.042± 0.467 ^a	1.295± 0.546 ^b	0.177± 0.152 ^d	0.037± 0.047 ^d

注: 不同上标字母表示显著差异($P < 0.05$)

Note: Different superscript letters showed significant difference ($P < 0.05$)

这 2 组与 7、12、17、22、27、32 和 37 盐度下的 SAI 值有显著性差异。盐度为 42 和 7 的实验组与其他组的 SAI 之间均有显著性差异。SAI 数值顺序为 32>27>22>17>12>37>42>7>47>52。对盐度和 SAI 值进行回归分析, 根据显著性(P 值)及相关指数(R^2)的大小表示回归可靠程度来选择最优方程。盐度与 SAI 所选的方程均达到显著水平(图 1)($P < 0.05$)。SAI 与盐度之间符合三次曲线函数关系, 其表达式为 $y = -5.894 + 1.155x - 0.034x^2 + 0.000x^3$, $R^2 = 0.985$, 其中, y 代表 SAI, x 代表盐度。

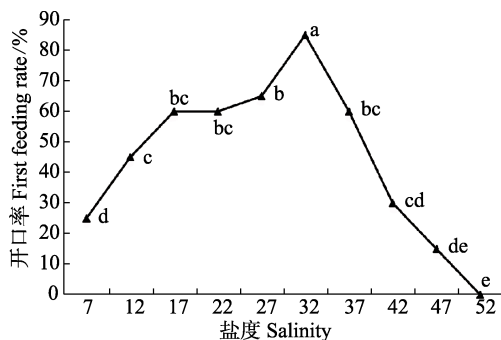


图 1 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的开口率

Fig.1 The first feeding rate of *C. striata* larvae at different salinities

不同字母者有显著差异($P < 0.05$)

Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$)

2.2 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的存活率

盐度对条纹锯鲷仔鱼的存活率同样具有显著影响(表 2)。在盐度 7–52 范围内, 随着盐度增加, 仔鱼存活率呈先升高后降低的趋势; 当盐度为 7、42、47 和 52 时, 仔鱼的存活率均低于 50%; 当盐度为 52 和 47 时, 仔鱼在第 3、4 天存活率均为 0; 当盐度为 22、27 和 32 时, 培育至第 5 天, 仔鱼的存活率均在 80% 以上。

2.3 盐度对条纹锯鲷仔鱼开口率的影响

条纹锯鲷仔鱼孵出 2 d 即可见口轻微上下开合,

显微镜下观察未见摄食, 仔鱼 2.5 d 时进入摄食期, 3 d 时取各盐度梯度中的仔鱼统计开口率(图 1)。结果显

表 2 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的存活率(%)

Tab.2 Effects of salinity on the survival rate of *C. striata* larvae (%)

仔鱼日 龄 Day age (d)	不同盐度下的存活率 Survival rate at different salinity									
	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52
2	22.5	94.0	94.5	96.5	97.5	97.5	78.0	50.0	44.4	11.5
3	22.0	78.0	87.0	88.6	89.0	90.5	65.5	48.0	42.5	0
4	22.0	64.5	82.0	85.5	86.0	90.5	63.5	48.0	0	0
5	13.5	61.0	79.0	83.5	84.0	89.0	58.0	34.0	0	0

示, 在盐度 7–52 范围内, 仔鱼开口率呈先升高后降低的变化趋势; 盐度 7、12、42、47 和 52 时, 仔鱼的开口率明显偏低; 在盐度为 17–37 的范围内, 仔鱼开口率为 60%–85%, 盐度为 32 时, 仔鱼的开口率达到最大值, 为 85%。

2.4 盐度对条纹锯鲷仔鱼摄食的影响

条纹锯鲷仔鱼开口摄食后, 不同盐度条件下, 仔鱼的摄食率和摄食强度呈现不同的变化趋势(表 3、图 2)。盐度为 7、12、42、47 和 52 时, 仔鱼的摄食率和摄食强度均较低, 且前期仔鱼(开口–5 d 仔鱼)的摄食量随着时间的推移有降低的趋势; 在盐度为 17–37 的范围内, 仔鱼均能较好摄食, 且随着时间的推移摄食活动基本不受影响, 盐度为 32 时, 仔鱼摄食达到最佳状态, 摄食率达 85%, 8 d 时仔鱼摄食强度为 5.45 个轮虫/尾。

3 讨论

3.1 盐度对条纹锯鲷仔鱼活力及存活的影响

盐度是影响鱼类胚胎及仔鱼发育的重要生态因子之一(Yasuhisa *et al*, 1993), 其对仔鱼的 SAI 值和存

表3 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的摄食率(%)
Tab.3 Effects of salinity on the feeding rate of
C. striata larvae (%)

仔鱼日龄 Day age (d)	不同盐度下的摄食率 Feeding rate at different salinity									
	7	12	17	22	27	32	37	42	47	52
2	25	45	60	60	65	85	60	30	15	0
3	30	30	75	75	90	90	35	15	0	0
7	40	80	80	85	85	85	65	45	35	0
8	45	60	75	75	85	85	80	55	0	0

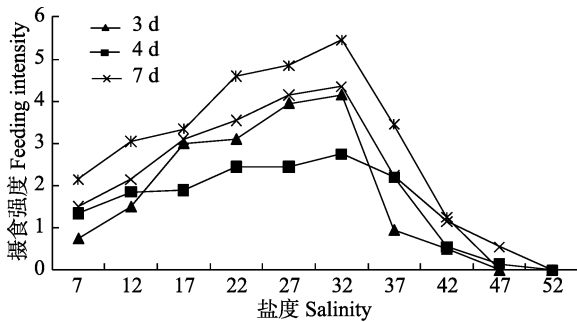


图2 不同盐度条件下条纹锯鲷仔鱼的摄食强度
Fig.2 The feeding intensity of *C. striata* larvae at different salinities

活率影响比较明显,在适宜的盐度范围内,仔鱼的SAI和存活率较高,盐度过低或过高都会使仔鱼的死亡率显著上升。Tytler等(1988)研究认为,初孵仔鱼在较低盐度环境时,仔鱼接近外界渗透压,消耗的能量少,有利于仔鱼存活。Faulk等(2006)通过研究军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼发现,幼鱼对盐度的耐受性与日龄有关,日龄越大耐受性越强。本研究表明,相同盐度条件下,不同批次仔鱼的SAI值有较大区别,这与受精卵的质量有关(王涵生等,2002)。适宜的盐度又对仔鱼的存活至关重要,本研究中,盐度在12-37的范围内,条纹锯鲷仔鱼的SAI值为4.238-6.401,存活率为58.0%-89.0%,盐度为27、32时,SAI值和存活均达到最大值,条纹锯鲷仔鱼的适宜盐度为12-37,最适盐度范围为27-32,这与雷霖霖等(2007)得出的条纹锯鲷适宜盐度范围基本一致。不同种海水鱼类早期发育的适宜盐度范围有一定差别;施兆鸿等(2008)认为,点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)仔鱼适宜盐度为25-40,最适盐度为25.6-31.7;宋振鑫等(2013)研究表明,云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)仔鱼适宜的盐度范围为20-35,最适范围为25-30;张海发等(2006)报道斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)仔鱼的适宜存活盐度为10-40,最适盐度为15-30。与同亚科的石斑鱼类相比,条纹

锯鲷仔鱼存活的适宜盐度范围较宽,对低盐度适宜能力较强。

3.2 盐度对条纹锯鲷仔鱼摄食活动的影响

Vernberg等(1981)研究表明,随着环境盐度升高,鱼鳃的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力就会增强,释放能量调节渗透平衡;当盐度降低时, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的活力降低,仔鱼消耗的能量减少。盐度的变化会迫使鱼类自身通过一系列的生理变化来维持内外渗透压的平衡,从而影响其生长存活、摄食、呼吸代谢和胚胎发育等生理指标产生相应的变化(Lein et al, 1997)。

目前,盐度对海水鱼类仔鱼摄食的影响已有报道。郑乐云等(2004)研究了斜带髯鲷仔鱼(*Haplogenyx nitens*)在不同盐度下的摄食情况,在盐度为14-44范围内,仔鱼的摄食量呈先升高后降低的趋势,在盐度29-34区间,开口率高达90%以上,24-34是仔鱼生理机能较为正常的盐度范围;梁国栋等(2009)认为,罗非鱼(*Tilapia*)仔鱼在2-10的盐度范围内,开口率随盐度的增加逐渐上升,仔鱼为了克服渗透压,鱼鳃的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力增强,增大了代谢速率,刺激摄食器官提前发育成型,使初次摄食率增加。另外,盐度过高时,鱼苗下沉困难,仔鱼基本上在上层水体中,会造成仔鱼局部密度过高,对仔鱼的摄食产生一定的负面影响。本研究结果显示,在17-37的盐度范围内,条纹锯鲷仔鱼有较高的开口率和摄食强度,且适宜盐度范围内仔鱼的摄食强度随着时间的延长而逐渐增强,盐度为32时,开口率和摄食强度达到最大值,3d仔鱼开口率为85%,8d仔鱼的摄食强度为5.45个轮虫/尾,而较高和较低盐度明显影响了仔鱼的摄食活动,仔鱼的摄食能力降低,这可能与盐度过高或过低破坏了仔鱼的渗透压平衡而影响仔鱼的摄食有关。

3.3 盐度与仔鱼活力、开口和摄食的关系及其生产意义

仔鱼孵出后,在不投饵的情况下,依靠卵黄作为营养物质可存活一段时间。存活时间的长短与其卵积累的营养物质的数量和质量有关(王涵生等,2002)。仔鱼存活的时间越长,其SAI值越高,通过测定仔鱼的SAI值可以判断仔鱼的活力,进而判断受精卵的卵质。此外,由于环境、营养等的变化,不同时间产生的卵,其卵质亦有一定差异。在育苗实践中,仅依靠SAI值来判断仔鱼活力是不充分的,还需加上仔鱼的存活率、开口率及摄食率等几项指标,从而更准确地判断仔鱼活力,并以此判断卵质和亲鱼状况。尤宏争等(2013)认为,通过实验找出有利于鱼类生活的最佳

盐度和耐受范围并应用于生产,可以有效节省饵料,提高生长速度和成活率。根据本研究结果,在盐度为27–32的范围内,条纹锯鲷仔鱼生存活力好,开口率和摄食率高。在条纹锯鲷的实际生产中,依据此盐度范围调节育苗水体的盐度,可有效提高仔鱼的开口率和摄食率,节省饵料,提高育苗成活率,促进条纹锯鲷的苗种繁育产业的发展。

参 考 文 献

- Atwood HL, Young SP, Tomasso JR, *et al.* Salinity and temperature tolerances of black seabass juveniles. *North American Journal of Aquaculture*, 2001, 63: 285–288
- Berlinshy DM, Watson GN, *et al.* Investigations of selected parameters for growth of larval and juvenile black seabass, *Centropristis striata* L. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2000, 31(3): 426–435
- Faulk CK, Holt GJ. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. *Aquaculture*, 2006, 254(1–4): 275–283
- Jia RJ, Chen C, Kong XD, *et al.* Effects of starvation on surviving, feeding and growth of the yolk-sac larval of *Centropristis striata*. *Marine Sciences*, 2014, 38(4): 44–49 [贾瑞锦, 陈超, 孔祥迪, 等. 饥饿对条纹锯鲷仔鱼的存活、摄食及生长的影响. *海洋科学*, 2014, 38(4): 44–49]
- Jia RJ, Chen C, Li YL, *et al.* Early development and allometric growth pattern of *Centropristis striata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 128–134 [贾瑞锦, 陈超, 李炎璐, 等. 条纹锯鲷(*Centropristis striata*)仔、稚、幼鱼形态发育的异速生长模式. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 128–134]
- Jia RJ, Wang L, Zhao CM, *et al.* Preliminary studies on embryonic development and morphology of the yolk-sac larvae of *Centropristis striata* Linnaeus. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 11–17 [贾瑞锦, 王鲁, 赵从明, 等. 条纹锯鲷胚胎发育及卵黄囊仔鱼形态变化的观察. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 11–17]
- Jian YX, Pan L, Hu FW, *et al.* The effects of temperature and salinity on survival and growth of larval *Hexagrammos otakii* Jordan et Starks. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 24–29 [菅玉霞, 潘雷, 胡发文, 等. 温度和盐度对大泷六线鱼仔鱼存活与生长的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 24–29]
- Lei JL, Lu JW. The breed predominance and culture prospects of *Centropristis striata* Linnaeus. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5): 110–115 [雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景. *海洋水产研究*, 2007, 28(5): 110–115]
- Lein I, Tveite S, Gjerde B, *et al.* Effects of salinity on yolk sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*). *Aquaculture*, 1997, 156(3): 291–303
- Liang GD, Wang H, Liu JH, *et al.* Constructing and optimizing model of relationship between first feeding rate of larval *Tilapia* and temperature and salinity. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2009, 34(4): 33–34 [梁国栋, 王辉, 刘加慧, 等. 罗非鱼仔鱼开口率与温度、盐度间模型的建立与优化. *广东海洋大学学报*, 2009, 34(4): 33–34]
- Lin X. Nutritional components analysis and nutritive value evaluation in *Centropristis striata* muscles. *Animals Breeding and Feed*, 2009, 40(9): 43–46 [林星. 条纹锯鲷肌肉营养成分分析与品质评价. *养殖与饲料*, 2009, 40(9): 43–46]
- Liu RT. The experiment of marine cage culture of the introduced Atlantic seabass. *Hebei Fisheries*, 2011(10): 28–29 [刘瑞棠. 引进美洲黑石斑鱼海水网箱养殖实验. *河北渔业*, 2011(10): 28–29]
- Shi ZH, Chen B, Peng SM, *et al.* The morphological change under salinity stress in development of yolk-sac larvae of *Epinephelus malabaricus*. *Oceanologia ET Limnologia Sinica*, 2008, 39(3): 222–227 [施兆鸿, 陈波, 彭士明, 等. 盐度胁迫下点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)胚胎及卵黄囊仔鱼形态变化. *海洋与湖沼*, 2008, 39(3): 222–227]
- Song ZX, Chen C, Wu LM, *et al.* Effects of salinity and pH on the embryonic development and larval activity of kelp bass *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(6): 52–58 [宋振鑫, 陈超, 吴雷明, 等. 盐度和pH对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 52–58]
- Tytle P, Blaxter JH. The effects of external salinity on the drinking rates of the larvae of herring, plaice and cod. *Journal of Experimental Biology*, 1988, 138(1): 1–15
- Vemberg FJ, Verberg WB. Functional adaptations of marine organisms. New York: Academic press, 1981, 237–336
- Wang B, Zhu MY, Mao XH. Breeding new variety——Atlantic seabass. *Hebei Fisheries*, 2003(5): 26–27 [王波, 朱明远, 毛兴华. 养殖新品种——美洲黑石斑鱼. *河北渔业*, 2003(5): 26–27]
- Wang HS, Fang QS, Zheng LY. Effects of salinity on hatching rates and survival activity index of the larvae of *Epinephelus akaara*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 36(4): 344–350 [王涵生, 方琼珊, 郑乐云. 盐度对赤点石斑鱼受精卵发育的影响及仔鱼活力的判断. *水产学报*, 2002, 36(4): 344–350]
- Yang G, Liu C, Ma S, *et al.* Preliminary study on the tolerance of the black sea bass under salinity stress and the recovery from freshwater stress. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2011(2): 73–78 [阳钢, 刘超, 马牲, 等. 条纹锯鲷对盐度胁迫的耐受力及淡水胁迫恢复的初步研究. *海洋湖沼通报*, 2011(2): 73–78]
- Yasuhisa M, Tsuzumi M. Effects of salinity on the embryonic development and larval survival activity of red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Saibai Giken*, 1993, 22(1): 35–38
- You HZ, Zheng YK, You GC. Research progress on effects of different salinity on culture biology of fish. *Hebei Fisheries*, 2013(3): 47–52 [尤宏争, 郑艳坤, 尤广超. 不同盐度对鱼类养殖生物学的影响研究进展. *河北渔业*, 2013(3): 47–52]
- Zhang HF, Liu XC, Wang YX, *et al.* Effects of temperature,

salinity and pH on hatch and larval activity of *Epinephelus coioides*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, 25(2): 31–36 [张海发, 刘晓春, 王云新, 等. 温度、盐度及 pH 对斜带石斑鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响. *热带海洋学报*, 2006, 25(2): 31–36]

Zheng LY, Fang QS, Wang HS, *et al.* Effects of salinity on activity and larval feeding rate of *Hapalogenys nitens* Richardson. *Marine Sciences*, 2004, 28(4): 5–7 [郑乐云, 方琼珊, 王涵生, 等. 盐度对斜带髯鲷仔鱼(*Hapalogenys nitens*)活力及摄食率的影响. *海洋科学*, 2004, 28(4): 5–7]

Zhu CD. Aspects on the first-feeding stage and food of fish larvae. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(1): 86–95 [朱成德. 仔鱼的开口摄食期及其饵料综述. *水生生物学报*, 1986, 10(1): 86–95]

Zhuang P, Zhang LZ, Zhang T, *et al.* Effects of delaying first feeding time on the survival and growth of larval Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 560–565 [庄平, 章龙珍, 张涛, 等. 中华鲟仔鱼初次摄食时间与存活及生长的关系. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 560–565]

(编辑 冯小花)

Effects of Salinity on the Survival and Feeding of *Centropristis striata* Larvae

ZHANG Chunlu^{1,2}, CHEN Chao^{1①}, LI Yanlu¹, ZHANG Tingting^{1,2},
LIU Li^{1,2}, QU Jiangbo³, SUN Tao³

(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. Yantai Tianyuan Aquaculture Co., Ltd, Yantai 264000)

Abstract Here we investigated the effects of salinity gradients (7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42, 47, and 53) on the survival, the first feeding and feeding of larval *Centropristis striata*. The first feeding rate (FFR%), the feeding rate and the feeding intensity of early larvae were also recorded and analyzed. Newly-hatched larvae were used in the starvation test to measure the survival activity indices (SAIs) at different salinities. The results suggested that salinity had strong effects on the survival and feeding of larvae. The suitable salinity for newly-hatched larvae was 12–37, and the optimum range was 27 to 32. The survival rate, the first feeding rate and the feeding intensity were reduced when salinity was below 12 or above 37. The SAI of newly-hatched larvae varied between 0.034 and 6.401 according to the salinity. When the salinity was between 12 and 37, the corresponding SAIs were significantly different from those at salinities 7, 42, 47 and 52 ($P < 0.05$). The SAI was the highest (6.041) at salinity 32. The relationship between SAI (y) and salinity (x) could be described as $y = -5.894 + 1.155x - 0.034x^2 + 0.000x^3$, $R^2 = 0.895$. When the salinities were 7, 42, 47 and 52, the survival rate of larvae was below 50%. There was no survival after a 3-day treatment at salinity 52, or after 4 days at salinity 47. After a 5-day treatment at salinities 22, 27 and 32, the survival rate was above 80%. At salinity 17 to 37, the first feeding rate varied between 60% and 85%, and the maximum (85%) appeared at salinity 32. The highest feeding rate (85%) was also observed at this salinity, and the feeding intensity was 5.45 rotifers per larvae on Day 8.

Key words Salinity; *Centropristis striata*; Larvae; SAI; Survival rate; First feeding rate

① Corresponding author: CHEN Chao, E-mail: ysfrichenchao@126.com

饲料中添加两种蛋白水解物对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长性能 及肠道组织学结构的影响*



牟玉超^{1,2} 柳 茜^{1,2} 卫育良¹ 梁萌青^{1,3①} 郑珂珂¹ 徐后国¹

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

摘要 本研究共配制了 3 种等氮等脂的实验饲料, 其中, 对照组饲料使用 15% 鱼粉提供部分饲料蛋白, 2 个实验组饲料分别用鱼水解蛋白和鸡水解蛋白替代了饲料中 10% 的鱼粉蛋白。对初始体重为 4.16 g 左右的大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼进行了为期 12 周的投喂, 研究了其对大菱鲆生长性能及肠道组织学结构的影响。结果显示, 鱼水解蛋白组(PHf)的特定生长率、饲料效率、蛋白效率比和蛋白质沉积率较对照组(FM)无显著差异($P>0.05$), 但显著高于鸡水解蛋白组(PHc) ($P<0.05$); 3 组实验鱼的摄食率无显著差异($P>0.05$); PHf 和 PHc 组的鱼体蛋白含量显著高于 FM 组 ($P<0.05$), 3 组实验鱼的脂肪含量无显著差异($P>0.05$)。PHf 和 PHc 组的鱼体肌肉必需氨基酸含量显著高于 FM 组($P<0.05$)。PHf 和 PHc 组的前肠和中肠黏膜皱襞高度大于 FM 组, 且 PHf 组较 FM 组差异显著($P<0.05$); 3 组实验鱼的前肠和中肠上皮细胞的高度无显著差异($P>0.05$); FM 组前肠和中肠的肠壁厚度大于其他 2 组, 且显著大于 PHf 组($P<0.05$)。大菱鲆饲料中使用鱼水解蛋白替代部分鱼粉蛋白在生长性能及肠道组织学结构方面要优于使用鸡水解蛋白。

关键词 鸡水解蛋白; 鱼水解蛋白; 生长性能; 肠道组织学结构; 大菱鲆
中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0083-08

随着水产养殖业的发展, 对鱼粉的需求不断增加, 导致鱼粉价格不断上涨, 供不应求。植物蛋白因其来源广泛、价格低廉等优点可作为鱼粉替代源, 但由于植物蛋白源含有抗营养因子、氨基酸不平衡等缺陷, 限制了其在水产饲料中的添加量(周岐存等, 2005; Bureau *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 1995; 陈伟, 2009¹); El-Saidy *et al.*, 2003; 庄平等, 2002)。

水解蛋白是富含低分子寡肽的一类蛋白产品, 通过鱼体内源蛋白酶、内切型或外切型商品蛋白酶限定性酶解获得, 富含必需氨基酸、牛磺酸、矿物质及微量元素等(熊光权等, 1992; Liaset *et al.*, 2008)。饲料中添加部分水解蛋白在对增强鱼类免疫力、提高鱼类成活率、增重率及提高饲料利用率方面有一定促进作用(李清等, 2005; Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999;

*公益性行业专项(NO.201303053)和国家自然科学基金项目(31172423)共同资助 [This work was supported by the Project of Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (NO.201303053), and National Natural Science Foundation of China (NO.31172423)]. 牟玉超, E-mail: muyuchao@163.com

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

收稿日期: 2015-12-02, 收修改稿日期: 2016-02-14

1) Chen W. Effects of antinutritional factors on the utilization of soybean proteins by Japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 [陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)利用大豆蛋白源的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009]

于辉等, 2003)。近年来, 各国学者就饲料中添加水解蛋白对大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)幼鱼的影响进行了研究, 发现适度使用鱼水解蛋白可显著促进生长、提高消化率以及非特异性免疫功能(Liaset *et al.*, 2003; 胡梦红等, 2007), 但鸡肉蛋白水解物对鱼类生长性能的影响鲜见报道。

本研究以大菱鲆幼鱼为对象, 研究了在高植物蛋白含量饲料中使用鸡水解蛋白和鱼水解蛋白分别替代部分鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、肌肉氨基酸组成及肠道组织学结构的影响, 为不同蛋白水解物在肉食性鱼类饲料中的合理利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 水解蛋白的制备

鱼水解蛋白采用太平洋狭鳕鱼(*Theragra chalcogramma*)鱼排。鱼水解蛋白的制备方法参照Zheng等(2012)的方法, 酶解液使用旋转蒸发器(BUCHI)浓缩得到浓缩液, 然后冷冻干燥保存备用。鸡水解蛋白选自商用。

1.2 鱼水解蛋白、鸡水解蛋白分子量分布及氨基酸组成测定

鱼水解蛋白(PHf)和鸡水解蛋白(PHc)分子量分布采用卫育良等(2014)的方法, 氨基酸组成的测定在6 mol/L HCl中110℃水解24 h, 采用日立L-8900全自动氨基酸测定仪测定。2种水解蛋白产品PHf、PHc的分子量组分及氨基酸组成分别见表1和表2。

表1 不同来源水解蛋白的分子量分布(%)

Tab.1 Molecular weight distribution of two protein hydrolysates (%)

分子量 Molecular weight (Da)	PHf ¹	PHc ²
10000–5000	0.10	0.19
5000–2000	1.33	3.22
2000–1000	6.65	12.62
1000–500	22.72	27.38
200–500	55.16	45.18
100–200	2.35	3.65
<100	11.69	7.76

1: 鱼水解蛋白; 2: 鸡水解蛋白, 下同

1: Fish protein hydrolysate; 2: Chicken protein hydrolysate; the same as below

表2 鱼水解蛋白和鸡水解蛋白的氨基酸组成(%干物质)

Tab.2 The amino acid composition of fish protein hydrolysate and chicken protein hydrolysate (% dry matter)

氨基酸 Amino acid(%)	PHf	PHc
天冬氨酸 Asp	6.78	7.01
苏氨酸 Thr	3.07	3.13
丝氨酸 Ser	3.35	3.01
谷氨酸 Glu	10.88	12.52
甘氨酸 Gly	5.12	13.49
丙氨酸 Ala	4.67	7.17
半胱氨酸 Cys	0.57	0.51
缬氨酸 Val	3.30	3.10
蛋氨酸 Met	1.92	1.10
异亮氨酸 Ile	2.88	2.32
亮氨酸 Leu	5.12	4.13
酪氨酸 Tyr	1.85	1.35
苯丙氨酸 Phe	2.86	2.47
赖氨酸 Lys	6.10	4.74
组氨酸 His	1.51	1.61
精氨酸 Arg	4.54	5.03
牛磺酸 Tau	0.77	0.12
总氨基酸 TAA	65.33	72.82
必需氨基酸 EAA	31.32	27.63
非必需氨基酸 NEAA	34.01	45.19
EAA/TAA	47.94	37.94
EAA/NEAA	92.08	61.14

1.3 实验饲料

本实验以红鱼粉、植物蛋白(豆粕、玉米蛋白粉、谷朊粉)及鱼水解蛋白(PHf)、鸡水解蛋白(PHc)为蛋白源, 以鱼油为脂肪源。不添加水解蛋白为对照组(FM), 2种水解蛋白分别替代10%的鱼粉蛋白, 制作成3种等氮、等脂的饲料, 饲料配方见表3。所有原料粉碎过80目筛, 将原料充分混匀, 制成粒径为3 mm的饲料, 在烘箱55℃下烘干, 然后-20℃保存备用。饲料氨基酸组成见表4。

1.4 实验鱼及养殖管理

养殖实验选用初始体重为(4.16±0.01) g的大菱鲆幼鱼, 养殖实验在烟台开发区天源水产有限公司开展。实验开始前, 将鱼苗暂养14 d, 使其适应养殖环境。实验采用自然光照, 养殖系统采用水体体积为120 L的玻璃钢桶, 养殖用水为深井海水, 流水养殖模式, 流速为5 L/min, 水温为(14.0±0.5)℃, 连续充气, 溶氧>7 mg/L, 盐度为30.0±0.5, pH为7.5–8.0。生长实验开始时, 停食24 h, 选择大小均匀、体格健壮且体表无病的大菱鲆幼鱼, 称重后随机分配在

12 个玻璃钢桶内(3 个处理组, 每组 4 个重复), 每桶 25 尾鱼, 每天用实验饲料饱食投喂 2 次(06:30 和 16:30), 投喂结束 30 min 后, 对残饵进行统计, 并换水 1/2。养殖周期为 12 周。

表 3 实验饲料配方和营养组成(%)
Tab.3 Formulation and proximate chemical composition of experimental diets (%)

原料 Ingredients (%)	FM	PHf	PHc
鱼粉 Fish meal	15.00	8.00	8.00
豆粕 Soybean meal	24.00	24.00	24.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	12.00	12.00	12.00
谷朊粉 Wheat gluten	18.00	18.00	18.00
鱼水解蛋白 PHf		6.20	
鸡水解蛋白 PHc			5.30
小麦粉 Wheat meal	12.30	12.60	13.50
鱼油 Fish oil	8.70	9.20	9.20
卵磷脂 Soy lecithin	1.00	1.00	1.00
维生素混合物 ¹ Vitamin premix	1.50	1.50	1.50
矿物质混合物 ² Mineral premix	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	2.00	2.00	2.00
维生素 C Vitamin C	0.50	0.50	0.50
L-赖氨酸 L-lysine	0.80	0.80	0.80
D/L-蛋氨酸 D/L-methionine	0.40	0.40	0.40
L-精氨酸 L-arginine	0.30	0.30	0.30
营养成分 Proximate composition			
粗蛋白 Crude protein	50.24	50.23	50.46
粗脂肪 Crude lipid	11.33	11.29	11.31
灰分 Ash	7.24	7.23	6.36

1: 维生素混合物(mg/kg or g/kg 饲料): 硫胺素, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 B12, 0.1 mg; 维生素 K3, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.20 mg; 维生素 A, 32 mg; 维生素 D, 5 mg; 维生素 E, 120 mg; 次粉 18.67 g

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

1: Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): thiamine 25 mg, riboflavin 45 mg, pyridoxine 20 mg, vitamin B12 0.1 mg, menadione 10 mg, inositol 800 mg, pantothenate 60 mg, tocopherol acetate 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 1.2 mg, vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 120 mg, wheat flour 18.67 g

2: Mineral premix (mg/kg or g/kg diet): NaF 2 mg; KI 0.8 mg; CoCl₂·6H₂O 50 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; FeSO₄·7H₂O 80 mg; ZnSO₄·7H₂O 50 mg; MnSO₄·4H₂O 1200 mg; Ca (H₂PO₄)₂·H₂O 3000 g; NaCl 100 g; Mordenzeo 15.51 g

1.5 样品采集及生化指标测定

实验开始时, 随机取 10 尾鱼保存于-20℃以供后

续的鱼体成分分析实验。实验结束时, 停食 24 h, 每桶鱼称总重, 然后随机取 5 尾鱼, 保存于-20℃用于鱼体成分分析。每桶取 3 尾鱼, 取其前肠及中肠保存于 Davidson's 固定液(95%乙醇 330 ml, 甲醛 220 ml, 冰醋酸 115 ml, 纯水 335 ml)中, Davidson's 固定液的固定 24 h, 此后转移至 70%乙醇中保存。

饲料和鱼体样品在 105℃烘干至恒重, 通过失重法测定干物质含量, 然后进行生化测定。粗蛋白采用凯氏定氮法; 粗脂肪采用索氏抽提法; 灰分的测定需先在电炉上炭化后再在马福炉中 550℃燃烧 3 h, 失重法测定。

肠道组织切片, 先用乙醇脱水, 石蜡包埋, LEICA RM2235 型切片连续切片, HE 染色, 中性树脂封片, Nikon E800 型显微镜下观察、拍照。

表 4 饲料氨基酸组成(%干物质)

Tab.4 The amino acid composition of experimental diets (% dry matter)

氨基酸 Amino acid(%)	FM	PHf	PHc
天冬氨酸 Asp	2.86	2.74	2.74
苏氨酸 Thr	1.43	1.37	1.40
丝氨酸 Ser	1.92	1.84	1.89
谷氨酸 Glu	10.54	10.05	10.55
甘氨酸 Gly	1.67	1.67	2.08
丙氨酸 Ala	2.07	2.01	2.17
半胱氨酸 Cys	0.53	0.73	0.75
缬氨酸 Val	1.81	1.75	1.86
蛋氨酸 Met	0.89	0.53	0.69
异亮氨酸 Ile	1.61	1.59	1.69
亮氨酸 Leu	3.56	3.45	3.66
酪氨酸 Tyr	1.58	1.45	1.60
苯丙氨酸 Phe	2.72	2.67	3.22
赖氨酸 Lys	2.31	2.36	2.47
组氨酸 His	1.02	0.93	1.13
精氨酸 Arg	1.93	2.25	2.52
牛磺酸 Tau	0.14	0.16	0.12
总氨基酸 TAA	38.59	37.55	40.51
必需氨基酸 EAA	17.28	16.90	18.64
非必需氨基酸 NEAA	21.31	20.64	21.88
EAA/TAA	44.80	45.02	46.04
EAA/NEAA	81.18	81.89	85.40

1.6 计算及统计分析方法

增重率(Weight gain rate, %)=100×(终末体重-初始体重)/初始体重

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

摄食率(Feeding rate, %/d)=100×总干物质摄食量/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2]

饲料效率(Feed efficiency)=鱼体增重(湿重)/总干物质摄食量

蛋白效率比(Protein efficiency ratio)=(终末体重-初始体重)/蛋白摄入量

蛋白质沉积率(Protein retention, %)=100×鱼体蛋白质贮存量/蛋白摄入量

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 当差异达到显著水平($P<0.05$), 进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests), 数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 不同水解蛋白对大菱鲆幼鱼生长性能及饲料利用的影响

水解蛋白对大菱鲆幼鱼生长性能的影响见表 5。3 组实验鱼的成活率在 98%以上, 且 3 组之间无显著差异($P>0.05$)。3 组实验鱼之间的摄食率无显著差异($P>0.05$); PHf 组的增重率、特定生长率与 FM 组之间无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 PHc 组($P<0.05$); FM 与 PHf 组的饲料效率、蛋白质效率、蛋白质沉积率无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 PHc 组($P<0.05$)。

表 5 不同水解蛋白对大菱鲆幼鱼生长性能的影响(平均值±标准差)

Tab.5 The effects of dietary inclusion of two different protein hydrolysates on growth performance of juvenile turbot(Mean±SD)

项目 Items	FM	PHf	PHc
成活率 Survival rate(%)	99.0±2.0	98.0±2.3	98.0±2.1
增重率 Weight gain rate(%)	592.69±7.60 ^a	579.46±6.54 ^{ab}	446.49±5.94 ^c
特定生长率 Specific growth rate(%/d)	2.30±0.01 ^a	2.28±0.01 ^{ab}	2.02±0.01 ^c
摄食率 Feeding rate(%/d)	1.34±0.02	1.33±0.02	1.35±0.04
饲料效率 Feed efficiency	1.33±0.01 ^a	1.33±0.02 ^a	1.22±0.0 ^b
蛋白效率比 Protein efficiency ratio	2.30±0.03 ^a	2.26±0.04 ^a	2.08±0.06 ^b
蛋白沉积率 Protein retention(%)	33.81±0.30 ^a	33.00±0.65 ^a	29.91±0.96 ^b

注: 同行数据上标不同字母表示存在显著差异($P<0.05$), 下同

Note: Values in the same row with different superscripts were significantly different ($P<0.05$). The same as below

2.2 不同水解蛋白对大菱鲆鱼体化学组成及肌肉氨基酸组成的影响

PHf 和 PHc 组的鱼体化学组成中(表 6), 粗蛋白含量无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 FM 组($P<0.05$); 粗脂肪含量 3 个实验组间无显著差异($P>0.05$); FM、PHc 组的灰分含量显著高于 PHf 组($P<0.05$), FM 和 PHc 组之间无显著差异($P>0.05$)。

在测得的肌肉的 16 种氨基酸中(表 7), PHf 组鱼体牛磺酸含量显著高于其他 2 组($P<0.05$), FM、PHf、PHc 组呈鲜味氨基酸天冬氨酸、呈甜味氨基酸甘氨酸含

表 6 不同水解蛋白对大菱鲆幼鱼体化学组成的影响(%干物质)(平均值±标准差)

Tab.6 The effects of dietary inclusion of two different protein hydrolysates on body chemical compositions of juvenile turbot (% dry matter) (Mean±SD)

项目 Items	FM	PHf	PHc
粗蛋白 Crude protein	63.24±0.49 ^b	65.45±0.65 ^a	65.57±0.93 ^a
粗脂肪 Crude lipid	17.05±0.49	17.88±0.79	18.23±1.48
灰分 Ash	14.74±0.30 ^a	13.65±0.14 ^b	14.59±0.51 ^a

表 7 不同水解蛋白对大菱鲆幼鱼肌肉氨基酸组成的影响(%干物质)(平均值±标准差)

Tab.7 The effects of dietary inclusion of two different protein hydrolysates on amino acid composition of muscle of juvenile turbot (% dry matter) (mean ± SD)

氨基酸 Amino acid(%)	FM	PHf	PHc
天冬氨酸 Asp	8.54±0.12	8.04±0.26	8.08±0.18
苏氨酸 Thr	3.78±0.09	3.65±0.13	3.72±0.13
丝氨酸 Ser	3.39±0.08	3.19±0.11	3.25±0.14
谷氨酸 Glu	13.78±0.20	13.56±0.45	13.77±0.20
甘氨酸 Gly	4.03±0.04	3.79±0.10	4.04±0.17
丙氨酸 Ala	5.20±0.13	5.08±0.15	5.23±0.14
半胱氨酸 Cys	0.79±0.04 ^b	0.80±0.07 ^b	1.76±0.14 ^a
缬氨酸 Val	3.91±0.05	4.16±0.17	4.21±0.04
蛋氨酸 Met	2.31±0.04	2.05±0.10	2.54±0.30
异亮氨酸 Ile	3.69±0.02	3.95±0.18	3.93±0.02
亮氨酸 Leu	6.45±0.09	6.78±0.28	6.87±0.16
酪氨酸 Tyr	2.82±0.03 ^b	3.28±0.22 ^a	3.01±0.04 ^b
苯丙氨酸 Phe	3.57±0.07 ^c	5.12±0.27 ^a	4.87±0.29 ^b
赖氨酸 Lys	7.68±0.10 ^b	8.37±0.32 ^a	8.34±0.20 ^a
组氨酸 His	1.70±0.02 ^c	2.08±0.20 ^a	1.91±0.03 ^b
精氨酸 Arg	5.00±0.07	6.16±0.93	5.24±0.12
牛磺酸 Tau	0.12±0.01 ^c	0.17±0.02 ^a	0.15±0.01 ^b
总氨基酸 TAA	76.75±0.97	80.13±1.03	80.93±0.52
必需氨基酸 EAA	38.09±0.39 ^b	42.22±1.01 ^a	41.65±0.25 ^a
非必需氨基酸 NEAA	38.66±0.57	37.91±0.07	39.28±0.29
EAA/TAA	49.63±0.11 ^c	52.68±0.59 ^a	51.46±0.10 ^b
EAA/NEAA	98.53±0.44 ^c	111.35±2.64 ^a	106.03±0.41 ^b

量无显著差异($P>0.05$); PHf 和 PHc 组必需氨基酸中的组氨酸及必需氨基酸含量显著高于 FM 组($P<0.05$), PHf 组的必需氨基酸与总氨基酸比值、必需氨基酸与非必需氨基酸比值高于 FM、PHc 组, 并且显著高于 FM 组($P<0.05$), FM、PHc 两者间无显著差异($P>0.05$)。

2.3 不同水解蛋白对大菱鲆肠道组织的影响

不同水解蛋白对大菱鲆肠道组织结构的影响见

表 8 不同水解蛋白对大菱鲆幼鱼肠道组织的影响(平均值±标准差)

Tab.8 The effects of dietary inclusion of two different protein hydrolysates on intestinal histological structure of juvenile turbot (Mean±SD)

项目 Items (μm)	FM	PHf	PHc
前肠 Foregut			
黏膜皱襞高度 Mucosal fold height	1040.99±28.52 ^b	1213.35±22.14 ^a	1121.88±70.35 ^{ab}
肠上皮细胞高度 Enterocyte height	52.09±1.72	51.79±1.27	54.71±1.98
肠壁厚度 Intestinal wall thickness	120.10±8.51 ^a	105.32±2.95 ^b	112.11±2.66 ^{ab}
中肠 Midgut			
黏膜皱襞高度 Mucosal fold height	710.57±13.81 ^b	786.32±20.82 ^a	744.92±7.81 ^b
肠上皮细胞高度 Enterocyte height	44.92±4.45	43.36±1.52	46.23±3.79
肠壁厚度 Intestinal wall thickness	104.04±2.70 ^a	96.12±3.08 ^b	101.76±3.36 ^{ab}

3 讨论

蛋白水解物是富含寡肽和游离氨基酸的蛋白制品, 在自制的鱼水解蛋白及购买的鸡水解蛋白中, 80%以上分子量小于 1000 Da (PHf, 91.92%; PHc, 83.97%) (表 1), 含有丰富的必需氨基酸和呈味氨基酸等(表 2), 具有良好的诱食性。本研究 3 组实验鱼的摄食率之间无显著差异($P>0.05$), 说明组间的生长差异不是由饲料的适口性造成。Silk 等(1985)研究表明, 小肽和游离氨基酸具有独立的吸收机制。小肽的吸收具有吸收速度快、耗能低、载体不易饱和等特点(何吉祥等, 2003)。Srichanun 等(2014)研究发现, 小肽和游离氨基酸含量高的蛋白水解物会降低尖吻鲈(*Lates calcarifer* Bloch)稚鱼的生长性能, 分析其原因可能是这些小分子肽及游离氨基酸使刷状缘膜酶产量减低, 游离氨基酸过早通过肠道导致必需氨基酸吸收不平衡或是游离氨基酸过多导致氨基酸分解代谢增强等, 从而引起生长性能降低。多项研究表明, 适当添加鱼水解蛋白可以促进鱼类的生长性能及提高饲料利用(Tang *et al*, 2008; Zheng *et al*, 2012; Kotzamanis *et al*, 2007)。

本研究中, PHf 组的增重率、特定生长率与 FM 组之间差异不显著($P>0.05$), 但显著高于 PHc 组($P<0.05$), 说明添加鱼水解蛋白的实验组优于鸡水解

表 8。肠道切片显示, PHf 组的前肠皱襞高度显著高于 FM 组($P<0.05$), PHc 组前肠皱襞高度较 FM 组和 PHf 组无显著差异($P>0.05$); PHf 组的中肠黏膜皱襞高度显著高于 FM 和 PHc 组($P<0.05$); 3 组实验鱼的前肠和中肠上皮细胞高度无显著差异($P>0.05$); FM 组前肠和中肠的肠壁厚度大于其他 2 组, 且显著大于 PHf 组($P<0.05$), PHc 组与 FM、PHf 组之间差异不显著($P>0.05$)。

蛋白组, PHc 组的饲料效率、蛋白质效率、蛋白质沉积率显著低于其他 2 组($P<0.05$), 说明水解鸡肉蛋白组的饲料利用较低。从鱼水解蛋白与鸡水解蛋白的分子量分布上看无明显差异, 必需氨基酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸及赖氨酸鸡水解蛋白低于鱼水解蛋白(表 1, 表 2), 但饲料氨基酸蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸及赖氨酸无显著差别(表 4)。造成生长和饲料利用差异的原因可能是鱼蛋白水解物中含有的牛磺酸是鸡水解蛋白的 6.25 倍, 牛磺酸是一种水溶性氨基酸衍生物, 是重要的条件必需氨基酸, 在高植物蛋白饲料中可显著促进肉食性鱼类的生长。本研究中, 鸡水解蛋白组的牛磺酸水平与鱼水解蛋白组及对照组相比较低, 因而可能影响了大菱鲆的生长性能及饲料利用。

Oliva-Teles 等(1999)研究发现, 鱼水解蛋白没有改善大菱鲆幼鱼的生长及饲料的利用情况, 而本研究是在鱼粉含量较低条件下添加蛋白水解物, 鱼水解蛋白组跟对照组在生长上无显著差异($P>0.05$), 可能的原因是 Oliva-Teles 等(1999)的对照组含有 68.6% 的鱼粉, 分别以 5%、10%和 15%鱼水解蛋白替代鱼粉, 实验饲料中鱼粉最低组为 46.3%, 鱼水解蛋白的作用被高鱼粉所掩盖, 而本研究对照组鱼粉含量为 15%, 而水解蛋白实验组鱼粉含量仅为 8%, 大大低于的 Oliva-Teles 等(1999)的鱼粉用量。

本研究通过观察实验鱼的肠道组织变化,从而评价水解蛋白对大菱鲂幼鱼肠道发育的影响作用。黏膜高度、肠上皮细胞高度、肠壁厚度是评价肠道组织结构变化的重要指标。黏膜高度、肠上皮细胞高度、肠壁厚度从前肠至中肠有逐渐减低的趋势,添加水解蛋白的 2 组实验鱼的前肠和中肠黏膜皱襞高度大于 FM 组,并且 PHf 与 FM 组差异显著($P < 0.05$)。黏膜皱襞数量和高度升高,肠道吸收面积增大,吸收营养物质的能力提高。Bonaldo 等(2006)和 Peng 等(2013)研究大豆蛋白分别对埃及鲷(*Solea aegyptiaca*)幼鱼、大菱鲂幼鱼肠道显微结构的影响,发现高水平添加大豆蛋白对其肠道有不利影响,说明蛋白质质量对幼鱼肠道的发育有影响。杨玉荣等(2006)研究发现,日粮中添加 80–120 g/kg 的大豆活性肽能够提高肉鸡生长初期肠道杯状细胞的数量,增加肠道绒毛长度与隐窝深度的比值,说明适量添加水解大豆蛋白对肉鸡肠道发育有促进作用。肠壁厚度、小肠的节律性伸缩及食糜的机械消化效率密切相关,因此,肠壁厚度会影响小肠的吸收功能。陈付菊等(2013)研究表明,随着年龄的增加,青海湖裸鲤(*Cymnocypris przewalskii*)肠壁厚度逐渐增加,证明青海湖裸鲤可能通过增加肠壁厚度提高肠道的消化吸收功能。Bonaldo 等(2011)研究混合植物蛋白对大菱鲂幼鱼生长、肠道组织变化时发现,肠道组织学变化跟生长没有相关关系。本研究与 Bonaldo 等(2011)实验结果相似,大菱鲂的生长跟肠道组织结构变化相关性不高。添加水解蛋白对大菱鲂幼鱼肠道黏膜皱襞数量及高度有促进作用,尤其是 PHf 组的促进作用更明显,但水解蛋白组的肠壁厚度小于对照组,与黏膜皱襞长度的结果相反,其原因有待于进一步研究。

4 小结

在高植物蛋白含量的大菱鲂饲料中,用鱼水解蛋白替代 10% 的鱼粉蛋白不影响大菱鲂的生长,鱼水解蛋白在生长性能上优于鸡水解蛋白,且更能改善大菱鲂肠道组织学结构。

参 考 文 献

- Bonaldo A, Parma L, Mandrioli L, *et al.* Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles. *Aquaculture*, 2011, 318(1): 101–108
- Bonaldo A, Roem AJ, Pecchini A, *et al.* Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 580–586
- Bureau DP, Harris AM, Cho CY. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1998, 161(1): 27–43
- Cahu CL, Infante JLZ, Quazuguel P, *et al.* Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 1999, 171(1–2): 109–119
- Chen FJ, Wang HC. Study on histological structure of intestine in *Gymnocypris przewalskii* with different age. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 34(1): 34–37 [陈付菊, 王洪超. 不同年龄青海湖裸鲤肠道组织结构的比较研究. *动物医学进展*, 2013, 34(1): 34–37]
- El-Saidy DMSD, Gaber MMA. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquaculture Research*, 2003, 34(13): 1119–1127
- Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 2001, 199(3–4): 197–227
- Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ. Replacement of fish meal by plant proteins in the diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 1995, 130(2–3): 177–186
- He JX, Ding FQ. Small peptides and their applications in fish nutrition. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(2): 95–97 [何吉祥, 丁凤琴. 小肽及其在鱼类营养中的应用. *水利渔业*, 2007, 27(2): 95–97]
- Hu MH, Wang YM, Xiong BX. The small peptide absorption mechanism and its effect in fish nutrition physiology. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition) Agricultural Science Version*, 2007, 4(1): 39–44 [胡梦红, 王有基, 熊邦喜. 小肽的吸收机制及其对鱼类的营养生理学效应. *长江大学学报(自然科学版: 农学卷)*, 2007, 4(1): 39–44]
- Infante JLZ, Cahu CL, Peres A. Partial substitution of di-and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition*, 1997, 127(4): 608–614
- Kotzamanis YP, Gisbert E, Gatesoupe FJ, *et al.* Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*,

- Part A, Molecular and Integrative Physiology, 2007, 147(1): 205–214
- Li Q, Mao HM, Xiao TY. The effect of small peptides on immune function of common carp. *Feed Research*, 2005(5): 1–3 [李清, 毛华明, 肖调义. 小肽对鲤鱼免疫力的影响. *饲料研究*, 2005(5): 1–3]
- Liaset B, Espe M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochemistry*, 2008, 43(1): 42–48
- Liaset B, Julshamn K, Espe M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry*, 2003, 38(12): 1747–1759
- Oliva-Teles A, Cerqueira AL, Gonçalves P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 1999, 179(1): 195–201
- Peng M, Xu W, Ai QH, *et al.* Effects of nucleotide supplementation on growth, immune responses and intestinal morphology in juvenile turbot fed diets with graded levels of soybean meal (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 2013, 392(10): 51–58
- Silk DBA, Grimble GK, Rees RG. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1985, 44(1): 63–72
- Srichanun M, Tantikitti C, Kortner TM, *et al.* Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. *Aquaculture*, 2014, 428: 195–202
- Tang H, Wu T, Zhao Z, *et al.* Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(9): 684–690
- Wei YL, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* The effects of fish protein hydrolysate on the digestibility of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(5): 910–920 [卫育良, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 水解鱼蛋白对大菱鲂幼鱼消化率的影响. *水生生物学报*, 2014, 38(5): 910–920]
- Xiong GQ, Zhang H. Study on enzyme hydrolysis in low value freshwater fish. *China Fisheries*, 1992(8): 37–38 [熊光权, 张弘. 低值淡水鱼的酶法水解. *中国水产*, 1992(8): 37–38]
- Yang YR, She RP, Zhang RJ, *et al.* Effect of soybean peptide on the structure of broiler intestine mucosa. *Chinese Journal of Animal Science*, 2006, 42(15): 13–15 [杨玉荣, 余锐萍, 张日俊, 等. 大豆活性肽对肉鸡肠道黏膜结构的影响. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(15): 13–15]
- Yu H, He JH. The effect of small peptides on growth performances in grass carps. *Journal of Foshan University (Natural Science Edition)*, 2003, 21(4): 56–58 [于辉, 贺建华. 小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. *佛山科学技术学院学报(自然科学版)*, 2003, 21(4): 56–58]
- Zheng K, Liang M, Yao H, *et al.* Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(3): 297–303
- Zhou QC, Mai KS, Liu YJ, *et al.* Advances in animal and plant protein sources in place of fish meal. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 404–410 [周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展. *水产学报*, 2005, 29(3): 404–410]
- Zhuang P, Chen XB, Zeng CP, *et al.* Study on optimum dietary animal-plant protein ratio for juvenile *Acipenser sinensis*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2002, 14(1): 61–64 [庄平, 陈喜斌, 曾翠平, 等. 中华鲟幼鲟饲料中适宜动植物蛋白比的研究. *动物营养学报*, 2002, 14(1): 61–64]

(编辑 冯小花)

Effects of Dietary Inclusion of Two Protein Hydrolysates on Growth Performance and Intestinal Histological Structure of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

MU Yuchao^{1,2}, LIU Xi^{1,2}, WEI Yuliang¹, LIANG Mengqing^{1,3}^①, ZHENG Keke¹, XU Houguo¹

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

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

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract This experiment used laboratory-made fish protein hydrolysates (PHf) and the commercial chicken protein hydrolysate (PHc) to replace 10% total fish meal protein and designed three isonitrogenous and isoenergetic diets: the control group (FM), PHf group (fish protein hydrolysate) and PHc group (chicken protein hydrolysate). Juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) (4.16±0.01 g) were fed with these three diets for 12 weeks to investigate the effects of different protein hydrolysates on the growth performance and intestinal structure of juvenile turbot. Results of this study showed that the specific growth rate, feed efficiency, protein efficiency ratio and protein retention in FM group and PHf group had no significant difference ($P>0.05$), but both the two groups were significantly higher than the PHc group ($P<0.05$); there was no significant difference in feeding rate in the three groups ($P>0.05$). PHf and PHc had higher crude protein than FM ($P<0.05$), while had no significant difference in crude lipid ($P>0.05$). PHf and PHc had higher essential amino acid content than FM ($P<0.05$). The plica height in foregut and midgut of PHf and PHc were higher than FM, and PHf had significant difference with FM ($P<0.05$), while the intestinal wall thickness of FM was higher than the other two groups, and significantly higher than PHf ($P<0.05$); there was no significant difference in foregut and midgut enterocytes height of the experimental groups ($P>0.05$). These results indicated that the growth response and feed utilization of PHf was superior to PHc, which suggesting that replaced fish meal by fish protein hydrolysates in high plant protein diets had some advantage over chicken protein hydrolysates.

Key words Chicken protein hydrolysates; Fish protein hydrolysates; Growth performance; Intestinal structure; *Scophthalmus maximus* L.

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

饲料中添加甘氨酸可提高大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)的抗氧化和抗应激能力*

潘孝毅¹ 张琴^{2①} 李俊¹ 刘东¹
张含乐¹ 张文兵^{1①} 麦康森¹



(1. 水产动物营养与饲料农业部重点实验室 海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003;
2. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000)

摘要 为研究饲料甘氨酸对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)抗氧化和抗应激反应的影响,将初始体重为(130.35±8.37)g的大黄鱼随机分成6组,每组3个重复,每个重复(网箱)50尾鱼。在基础饲料中分别添加不同梯度的甘氨酸(0、0.6%、1.2%、2.4%、4.8%和6.0%),配制出甘氨酸实测含量分别为(1.58%、2.15%、2.75%、3.96%、6.33%和7.51%)的6种实验饲料。经过30d养殖后,对大黄鱼进行拖网应激实验。结果表明,养殖实验结束后,饲料处理未对大黄鱼的存活和体成分产生显著影响。肝脏总抗氧化能力在饲料甘氨酸含量为2.75%时达到最大值,而丙二醛的含量在甘氨酸含量为3.96%时达到最小值,但与2.75%组无显著差异($P>0.05$)。以肝脏总抗氧化能力为评价指标,根据二次曲线回归模型得出大黄鱼饲料中甘氨酸的适宜含量为3.57%。血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性均在饲料甘氨酸含量为2.75%时呈现最小值($P<0.05$)。在拖网应激前,饲料甘氨酸含量为2.75%时,大黄鱼血清皮质醇的含量最高。在拖网应激后,该处理的大黄鱼血清皮质醇的变化幅度最小,而此时的血糖维持在较高水平。综合考虑大黄鱼的抗氧化和抗应激能力,本研究推荐大黄鱼饲料中甘氨酸的适宜含量为2.75%–3.57%。

关键词 大黄鱼; 甘氨酸; 抗氧化; 抗应激; 营养

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0091-08

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是目前我国产量第一的海水养殖鱼类,2014年的养殖产量为12.79万t(中国渔业统计年鉴,2015)。在其养殖生产过程中,常遇到分鱼、换网、台风和水温变化等应激条件,导致饲料利用率降低、疾病易发、死亡率增加和生长减缓等不利现象的发生,甚至会造成重大经济损失。提高大黄鱼的抗应激能力对于大黄鱼的养殖生产有着重要意义。

牛磺酸、脯氨酸、谷氨酰胺和甘氨酸等一些非必需氨基酸及其代谢物对体内一些关键代谢途径起到

重要的调控作用,这对于维持生命、生长、摄食、营养利用、免疫和繁殖都是必需的,并且对于机体抵御环境应激和各种病原生物也同样重要(Li *et al*, 2009; Wu *et al*, 2011、2013; Wang *et al*, 2013)。甘氨酸是中枢神经系统中的神经递质,调节动物行为、食物摄入量 and 全身的平衡(Rajendra *et al*, 1997)。同时,通过白细胞和巨噬细胞中的甘氨酸门控氯离子通道,甘氨酸能够调控细胞内 Ca^{2+} 水平,调节细胞因子和超氧化物的产生以及免疫功能(Zhong *et al*, 2003)。尽管甘氨酸的轻微不足不会危及生命,但长期缺乏会导致次优生长、降低

* 广西海洋生物技术重点实验室开放基金资助课题(GLMBT-201401)资助 [This work was supported by the Open Fund of the Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi (No: GLMBT-201401)]. 潘孝毅, E-mail: a827443720@126.com

① 通讯作者: 张文兵, 教授, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn; 张琴, 研究员, E-mail: zhangqin821220@163.com

收稿日期: 2016-01-20, 收修改稿日期: 2016-02-17

免疫力以及其他对营养代谢和健康不利的影响(Matilla *et al*, 2002; de Koning *et al*, 2003; Lewis *et al*, 2005)。

关于甘氨酸在水产动物饲料中应用的研究较少。Xie等(2014)确定以增重率为评价指标, 初始体重为0.61 g左右的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)饲料中甘氨酸的适宜含量为2.54%。本研究拟通过分析饲料中不同含量的甘氨酸对大黄鱼抗氧化和抗应激反应的影响, 为甘氨酸在大黄鱼配合饲料中的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

采用单因素实验设计, 以鱼粉和豆粕为主要蛋白源, 小麦粉为主要糖源, 鱼油和大豆卵磷脂为主要脂

肪源, 同时添加维生素混合物、矿物质混合物和诱食剂等, 配制成含粗蛋白约46%、粗脂肪约12%的基础饲料(表1)。以大黄鱼体氨基酸含量为参考, 添加晶体氨基酸, 使基础饲料中各必需氨基酸含量达到大黄鱼体中的含量(表2)。并在此基础上, 分别添加0、0.6%、1.2%、2.4%、4.8%和6.0%的甘氨酸(饲料甘氨酸实测含量为1.58%、2.15%、2.75%、3.96%、6.33%、7.51%), 配制成6组实验饲料。各组饲料中氨基酸组成分析结果见表2。

1.2 实验鱼及饲养管理

实验大黄鱼是购于福建省宁德市富发水产有限公司的同一批鱼苗, 用基础饲料投喂驯化14 d, 使之逐渐适应实验饲料和养殖环境。挑选体格健壮、规格一致, 初始体重为(130.35±8.37) g的大黄鱼麻醉后随机分

表1 饲料配方及其营养成分(%干重)

Tab.1 Ingredients and proximate composition of the experimental diets (% dry weight)

原料 Ingredients	Diet1(1.58%)	Diet2(2.15%)	Diet3(2.75%)	Diet4(3.96%)	Diet5(6.33%)	Diet6(7.51%)
鱼粉 Fish meal	23	23	23	23	23	23
豆粕粉 Soybean meal	24	24	24	24	24	24
小麦粉 Wheat meal	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	2	2	2	2	2	2
鱼油 Fish oil	7	7	7	7	7	7
矿物质混合物 ¹ Mineral mix	2	2	2	2	2	2
维生素混合物 ² Vitamin mix	2	2	2	2	2	2
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
丙氨酸 Alanine	6.0	5.4	4.8	3.6	1.2	0.0
甘氨酸 Glycine	0.0	0.6	1.2	2.4	4.8	6.0
复合诱食剂 Attractant	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
防霉剂 Mold inhibitor	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
抗氧化剂(乙氧基喹啉) Ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
氨基酸混合物 Amino acid mixture	6.45	6.45	6.45	6.45	6.45	6.45
成分分析 Proximate analysis						
粗蛋白 Crude protein(%DM)	45.43	45.26	45.78	45.37	45.73	45.22
粗脂肪 Crude lipid(%DM)	11.89	12.05	11.40	11.94	11.27	11.08

1. 矿物质混合物(g/kg 预混物) Mineral mix (g/kg premix): MgSO₄·7H₂O, 182.57; CuSO₄·5H₂O, 0.98; FeSO₄·7H₂O, 11.95; ZnSO₄·7H₂O, 7.59; MnSO₄·H₂O, 4.40; CoCl₂·6H₂O, 0.20; Na₂SeO₃, 0.05; Ca(IO₃)₂·6H₂O, 0.24; 微晶纤维素 Microcrystalline cellulose, 792.03

2. 维生素混合物(mg/kg 饲料): V_A 醋酸酯, 16000 IU; VD₃, 2500 IU; α-生育酚, 120; 亚硫酸氢钠甲萘醌(MSB), 5.1; 盐酸硫胺素, 24.5; 核黄素, 36; 吡哆醇, 19.8; 氰钴胺, 0.1; D-泛酸钙, 58.8; 烟酸, 198; 叶酸, 19.6; 生物素, 1.2; 肌醇, 784; V_C 磷酸酯, 700

2. Vitamin mix (mg/kg diet): Retinol acetate, 16000 IU; Cholecalciferol, 2500 IU; α-Tocopherol, 120; MSB, 5.1; Thiamin-HCl, 24.5; Riboflavin, 36; Pyridoxine, 19.8; Vitamin B₁₂, 0.1; D-pantothenic acid calcium, 58.8; Niacin acid, 198; Folic acid, 19.6; Biotin, 1.2; Inositol, 784; Ascorbyl polyphosphate, 700

3. 诱食剂: 甜菜碱, 40%; 二甲基-丙酸噻亭, 20%; 甘氨酸, 20%; 丙氨酸, 10%; 5-磷酸肌苷, 10%

3. Attractant: Lycine, 40%; Dimethyl-propionate thiamethoxam pavilion, 20%; Glycine, 20%; Alanine, 10%; Inosine 5-phosphoric acid, 10%

表 2 各组饲料的氨基酸组成分析(%干重)
Tab.2 Amino acid composition of the diets (% dry weight)

氨基酸 Amino Acid	43%鱼体蛋白 43% of whole-body protein	Diet1 (1.58%)	Diet2 (2.15%)	Diet3 (2.75%)	Diet4 (3.96%)	Diet5 (6.33%)	Diet6 (7.51%)
精氨酸 Arginine	3.54	3.40	3.53	3.70	3.41	3.58	3.46
组氨酸 Histidine	0.88	0.91	0.97	1.09	0.95	0.99	0.95
异亮氨酸 Isoleucine	1.76	1.74	1.76	1.93	1.77	1.76	1.72
亮氨酸 Leucine	3.54	3.43	3.54	3.67	3.50	3.55	3.53
赖氨酸 Lysine	3.48	3.26	3.36	3.51	3.32	3.49	3.38
蛋氨酸 Methionine	1.33	1.33	1.38	1.24	1.34	1.24	1.32
苯丙氨酸 Phenylalanine	1.76	1.64	1.77	1.81	1.71	1.75	1.71
苏氨酸 Threonine	1.90	1.85	2.02	1.85	1.85	1.87	1.90
缬氨酸 Valine	1.97	1.97	1.92	2.01	1.91	1.95	1.98
天冬氨酸 Aspartic acid	4.07	3.95	4.14	3.66	4.07	3.98	4.15
丝氨酸 Serine	1.83	1.81	1.83	1.91	1.78	1.86	1.83
甘氨酸 Glycine	2.46	1.58	2.15	2.75	3.96	6.33	7.51
丙氨酸 Alanine	2.94	7.54	6.43	3.98	2.88	2.25	1.66
半胱氨酸 Cystine	0.20	0.20	0.19	0.19	0.21	0.18	0.20
酪氨酸 Tyrosine	1.31	1.30	1.29	1.46	1.30	1.30	1.31
谷氨酸 Glumatic acid	6.17	6.17	5.97	6.61	6.21	6.14	5.92

配到 18 个网箱(2 m×2 m×2.5 m)中, 每个网箱 50 尾鱼。

养殖实验在海上浮式网箱中进行, 每种饲料按照随机分组投喂 3 个网箱(即 1 个处理组 3 个重复)。每天 05:00 和 17:00 饱食投喂 2 次, 并记录大黄鱼存活情况。养殖实验共进行 30 d。

1.3 样品采集

养殖实验结束时, 饥饿大黄鱼 24 h, 随后从每个网箱随机捞取 5 尾鱼, 麻醉后快速采集血液, 并在冰块上静置 12 h, 于 4℃以 3000 r/min 离心 10 min, 所得血清置于-80℃冻存备用。采血后的实验鱼解剖, 取肝脏、肠、肌肉, 液氮速冻, -80℃保存。

1.4 应激实验

养殖实验结束时, 先进行应激前样品采集, 然后进行拖网应激实验, 即拖网让养殖网箱中所有大黄鱼刚好离开水面, 空气暴露 10 s, 再把网放下让鱼在水中 10 s 后再提起, 重复操作 3 次, 30 min 后取血样 (Benfey *et al.*, 2000)。

1.5 样品分析

饲料原料及饲料中粗蛋白含量采用凯氏定氮法测定, 粗脂肪含量采用索氏抽提法测定, 肝脏组织蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定, 饲料甘氨酸含量选用酸水解法测定(日立 8900 全自动氨基酸测定仪)。

总抗氧化力(Total anti-oxidative capacity, T-AOC)、

丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathion peroxidase, GSH-PX)活性、谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase, GOT)活性和谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase, GPT)活性、血清中皮质醇(Cortisol)含量等采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。血清葡萄糖(Glucose)的测定选用己糖激酶法(费维伦等, 2012), 使用仪器为日立全自动生化分析仪(HITACHI7600)。

肝脏匀浆液中 CAT 酶活力的定义: 每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为 1 个活力单位(U/mg prot)。

肝脏匀浆液中 SOD 酶活力的定义: 每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U/mg prot)。

肝脏匀浆液中 T-AOC 的定义: 在 37℃时, 每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为 1 个总抗氧化能力单位(U/mg prot)。

肝脏匀浆液中 GSH-PX 酶活力的定义: 每毫克组织蛋白每分钟扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为 1 个酶活力单位(U/mg prot)。

肝脏匀浆液和血清中 GOT、GPT 酶活力定义: 在温度 25℃、pH 7.4、波长 340 nm、光径 1 cm 的条

件下,1 ml 血清使 NADH 的吸光度下降 0.001 的转氨酶活性为 1 个卡门氏单位,卡门氏单位用物质的吸光度表示酶的活力单位。

1.6 数据分析

数据采用平均值±标准误(Mean±SE)表示。用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA),差异显著后($P<0.05$),采用 Tukey 检验进行多重比较。用 t 检验检测应激前后的变化。根据 T-AOC 数据,利用二次曲线模型确定大黄鱼饲料中甘氨酸的适宜含量。

2 结果

2.1 存活

单因素方差分析显示,各处理组中大黄鱼存活率(%)依次为 88.85±5.60、82.22±1.66、88.24±1.77、92.85±4.23、90.67±3.84 和 84.04±3.86,差异不显著($P>0.05$)。

2.2 抗氧化反应

大黄鱼抗氧化反应的结果见表 3。饲料中甘氨酸含量分别为 2.15%和 2.75%时,显著提高了肝脏 SOD 活性,且与饲料甘氨酸含量 3.96%组差异不显著($P>0.05$),并在饲料甘氨酸含量为 2.75%时取得最大值 291.12 U/mg prot ($P<0.05$)。饲料中甘氨酸含量为 2.75%和 3.96%时,显著提高了肝脏 CAT 活性($P<0.05$),并在 2.75%甘氨酸组取得最大值。饲料中甘氨酸含量为 3.96%时,肝脏中 MDA 水平显著降低($P<0.05$),且与饲料甘氨酸含量为 2.75%组差异不显著($P>0.05$)。肝脏 T-AOC 水平在饲料甘氨酸含量为 2.75%时取得最大值($P<0.05$)。各处理组中肝脏 GSH-PX 活性差异不显著($P>0.05$)。

以饲料甘氨酸含量为横坐标、大黄鱼的肝脏 T-AOC 水平为纵坐标,经二次曲线回归分析得: $y = -0.0157x^2 + 0.1122x + 0.219$, $R^2 = 0.9718$ 。以 T-AOC 为评价指标,经计算得出大黄鱼饲料中甘氨酸的适宜含量为 3.57% (图 1)。

表 3 饲料中不同甘氨酸含量对大黄鱼肝脏抗氧化反应的影响

Tab.3 Effects of different dietary glycine levels on anti-oxidative responses in the liver of large yellow croaker

甘氨酸 Glycine	总抗氧化力 T-AOC (U/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	过氧化氢酶 CAT (U/mg prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX (U/mg prot)
Diet 1 (1.58%)	0.34±0.01 ^{bc}	211.64±12.05 ^{ab}	13.09±1.18 ^a	3.39±0.14 ^{cd}	6.59±0.47
Diet 2 (2.15%)	0.40±0.01 ^{bc}	262.69±9.57 ^c	16.28±1.33 ^{ab}	2.70±0.19 ^{bc}	7.19±0.72
Diet 3 (2.75%)	0.43±0.04 ^c	291.12±12.50 ^c	26.71±1.69 ^c	2.02±0.07 ^{ab}	8.16±0.79
Diet 4 (3.96%)	0.40±0.02 ^{bc}	258.84±9.64 ^{bc}	22.23±1.52 ^{bc}	1.43±0.14 ^a	8.96±0.53
Diet 5 (6.33%)	0.30±0.03 ^b	201.64±10.54 ^a	17.70±1.10 ^{ab}	3.24±0.05 ^{cd}	8.36±0.41
Diet 6 (7.51%)	0.18±0.01 ^a	189.40±7.52 ^a	15.30±1.09 ^a	3.68±0.21 ^d	7.56±0.73

注: 同列数据中,具有相同上标字母的平均值之间差异不显著(Tukey 检验, $P>0.05$),表 6 同

Note: Means in the same column sharing a common superscript letter were not significantly different ($P>0.05$) as determined by Tukey's test. The same as in Tab.6

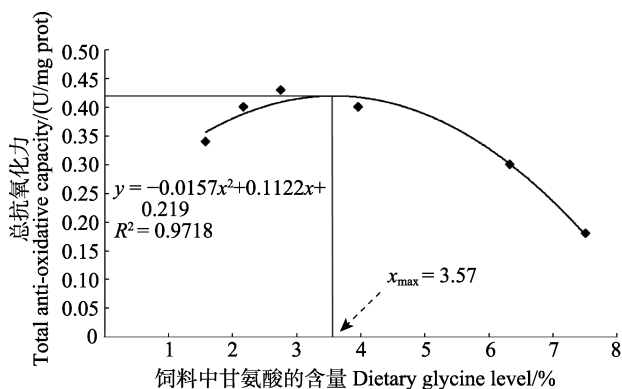


图 1 饲料中甘氨酸含量与肝脏总抗氧化力水平的关系
Fig.1 Relationship between hepatic total anti-oxidative capacity and dietary glycine level

2.3 抗应激反应

大黄鱼抗拖网应激反应的结果见表 4。拖网应激前,饲料中甘氨酸含量为 2.75%和 3.96%时,血糖含量显著高于对照组($P<0.05$)。拖网应激后,各处理组大黄鱼血糖含量差异不显著($P>0.05$)。分析同一处理组拖网应激前后血糖含量的变化后发现:饲料甘氨酸含量为 2.75%和 3.96%时,拖网应激前后血糖含量差异不显著($P>0.05$)。其他各处理组拖网应激后血糖含量显著高于应激前($P<0.05$)。

拖网应激前,饲料甘氨酸含量为 2.75%时,血清中皮质醇含量显著高于对照组($P<0.05$)。拖网应激后,饲料甘氨酸含量为 2.75%和 3.96%时,血清皮质醇含

表 4 饲料中不同甘氨酸含量对大黄鱼抗拖网应激反应的影响

Tab.4 Effects of different dietary glycine levels on anti-stress responses of large yellow croaker

甘氨酸 Glycine	血糖 Glucose (mmol/L)		皮质醇 Cortisol (ng/ml)	
	应激前 Before stress	应激后 After stress	应激前 Before stress	应激后 After stress
Diet1 (1.58%)	1.82±0.06 ^a	3.64±0.17	60.53±5.19 ^a	223.61±17.98 ^{bc}
t-test		X=0.001		Y=0.001
Diet2 (2.15%)	2.20±0.20 ^{ab}	3.91±0.24	73.73±9.20 ^a	159.64±8.93 ^{ab}
t-test		X=0.005		Y=0.003
Diet3 (2.75%)	2.74±0.21 ^{bc}	3.27±0.26	119.78±7.86 ^b	137.76±14.69 ^a
t-test		X=0.186		Y=0.341
Diet4 (3.96%)	3.19±0.19 ^c	3.76±0.20	91.49±6.84 ^{ab}	134.50±10.76 ^a
t-test		X=0.109		Y=0.028
Diet5 (6.33%)	2.17±0.14 ^{ab}	3.75±0.28	83.11±4.52 ^{ab}	191.87±13.45 ^{abc}
t-test		X=0.005		Y=0.002
Diet6 (7.51%)	2.08±0.08 ^{ab}	4.07±0.21	60.97±5.21 ^a	225.59±14.63 ^c
t-test		X=0.001		Y=0.000

注: t 检验中, X 为同一个处理组在拖网应激前后血糖的比较值, Y 为同一个处理组在拖网应激前后皮质醇的比较值

Note: In the t test, X is the comparison value of glucose of the same treatment group before and after net stress. Y is the comparison value of cortisol of the same treatment group before and after net stress

量显著低于对照组($P<0.05$)。分析同一处理组大黄鱼在拖网应激前后血清皮质醇含量的变化后发现: 饲料甘氨酸含量为 2.75% 时, 拖网应激前后血清皮质醇含量差异不显著($P>0.05$), 其他各处理组拖网应激后血清皮质醇含量显著高于应激前($P<0.05$)。

2.4 鱼体成分分析

大黄鱼体成分分析数据见表 5。饲料中甘氨酸的含量对大黄鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分的影响不显著($P>0.05$)。

2.5 肝脏和血清转氨酶活性

大黄鱼肝脏和血清 GOT 和 GPT 活性数据见表 6。饲料中不同甘氨酸含量对肝脏 GOT 和 GPT 的活性没有显著影响($P>0.05$)。血清 GOT 和 GPT 活性均在饲料甘氨酸含量为 2.75% 时取得最小值($P<0.05$), 分别为 6.70 和 3.38 U/L。与对照组相比, 7.51% 甘氨酸组血清 GOT 水平显著升高($P<0.05$)。

3 讨论

由于甘氨酸不是鱼类的必需氨基酸, 有关甘氨酸在养殖鱼类中营养作用的研究并不多。在以往的一些鱼类必需氨基酸需求量的研究中, 需要配制含不同浓度梯度的必需氨基酸的系列饲料, 常使用甘氨酸等非必需氨基酸来调节饲料的总氮含量。如 Zhou 等(2006)在研究军曹鱼(*Rachycentron canadum*)饲料中蛋氨酸的需求量时, 采用甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸调节饲料中总氮含量; Zhang 等(2008)在确定大黄鱼饲料中赖氨酸需求量时, 采用谷氨酸来调节饲料中的总氮含量。这样进行实验设计的前体假设是: 甘氨酸等非必需氨基酸, 鱼体内自身能够合成并能满足正常生理需要, 饲料中甘氨酸的含量在一定范围变动, 对养殖鱼类的生长和存活等不会产生显著的影响。本研究 30 d 的养殖实验结果表明, 饲料中甘氨酸的含量在 1.58%–7.51% 的范围内变动时, 对大黄鱼幼鱼的存活和生长都没有显著影响。

表 5 饲料中不同甘氨酸含量对大黄鱼体常规指标的影响

Tab.5 Effects of different dietary glycine levels on the body composition of large yellow croaker

甘氨酸 Glycine	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (% dry weight)	粗脂肪 Crude lipid (% dry weight)	灰分 Ash (% dry weight)
Diet 1(1.58%)	67.46±1.68	52.71±2.13	12.89±0.64	3.67±0.06
Diet 2(2.15%)	65.80±1.89	52.30±2.04	13.24±0.84	3.74±0.11
Diet 3(2.75%)	66.80±0.90	53.54±0.88	12.93±0.40	3.56±0.20
Diet 4(3.96%)	67.15±1.26	52.42±1.26	13.14±0.72	3.48±0.15
Diet 5(6.33%)	66.42±1.22	52.25±1.84	13.03±0.98	4.09±0.15
Diet 6(7.51%)	66.44±0.84	52.27±0.81	13.40±0.27	3.58±0.23

表6 饲料中不同甘氨酸含量对大黄鱼肝脏和血清转氨酶活性的影响

Tab.6 Effects of different dietary glycine levels on activity of transaminase in liver and serum of large yellow croaker

甘氨酸 Glycine	肝脏谷草转氨酶 Liver GOT (U/mg prot)	肝脏谷丙转氨酶 Liver GPT (U/mg prot)	血清谷草转氨酶 Serum GOT (U/L)	血清谷丙转氨酶 Serum GPT (U/L)
Diet 1(1.58%)	42.61±4.62	20.18±2.85	10.13±0.96 ^b	5.53±0.82 ^{ab}
Diet 2(2.15%)	40.76±2.37	24.13±2.34	9.58±0.50 ^{ab}	5.23±0.39 ^{ab}
Diet 3(2.75%)	43.82±2.26	17.81±2.31	6.70±0.64 ^a	3.38±0.30 ^a
Diet 4(3.96%)	40.15±1.72	22.05±2.64	10.01±0.35 ^b	4.77±0.27 ^{ab}
Diet 5(6.33%)	42.05±3.50	21.24±2.38	10.75±0.66 ^b	6.26±0.30 ^b
Diet 6(7.51%)	39.36±2.71	19.44±3.28	14.50±0.33 ^c	6.58±0.64 ^b

然而,从抗氧化和抗应激的角度来分析,本研究发现饲料中不同含量的甘氨酸对养殖大黄鱼产生了显著影响。

3.1 饲料中添加甘氨酸对大黄鱼肝脏抗氧化能力的影响

SOD、CAT 和 GSH-PX 是机体内抗氧化酶系统的重要组成酶, T-AOC 水平反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外界刺激的代偿能力及机体自由基代谢状态,而 MDA 含量常用来表示脂质过氧化水平的高低,间接反映出体内自由基水平的变化情况(周显青等, 2003; 赵敏等, 2015)。

本研究结果显示,饲料中 2.75% 的甘氨酸显著提高了大黄鱼肝脏 CAT 和 SOD 的活性,显著降低了肝脏 MDA 含量,且肝脏 T-AOC 水平在饲料甘氨酸含量为 2.75% 时取得最大值。当以 T-AOC 为评价指标,得出大黄鱼饲料甘氨酸的适宜含量为 3.57%。类似的研究结果在凡纳滨对虾和陆生脊椎动物中也有发现(Wang *et al*, 2013; Xie *et al*, 2014; Ito *et al*, 2008; Wijekoon *et al*, 2004; Yin *et al*, 2002)。由于甘氨酸在鱼类中的营养作用研究甚少,目前没有直接相关数据来解释本研究中所发现的甘氨酸在大黄鱼体内表现出的抗氧化功能。然而,甘氨酸是机体内抗氧化系统中的内源性抗氧化剂—还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione, GSH)的组成氨基酸,其抗氧化作用可能是通过提高 GSH 的合成量而实现,而 GSH 的含量与 GSH-PX 的活性密切相关,共同参与体内自由基的代谢调节。从分子水平上来看,Sheth 等(2011)研究表明,甘氨酸对机体氧化损伤的保护机制可能是:甘氨酸受体被激活,引发了氯离子的内流和随后的膜超极化,从而维持细胞的能量生成,降低了氧化损伤。

3.2 饲料中添加甘氨酸对大黄鱼抗应激能力的影响

鱼类遭受应激源刺激时,血清中皮质醇含量会显著升高,进而促进血糖含量增加,血糖的增加为肌肉和神经提供更多能量,使得鱼类适应应激环境。因此,血清中葡萄糖和皮质醇含量的变化是评价鱼类抗应激能力的重要指标(Fanouraki *et al*, 2011; Millán-Cubillo *et al*, 2016)。

本研究中,饲料甘氨酸含量为 2.75% 时,在拖网应激前,大黄鱼血清皮质醇的含量最高,而在拖网应激后,该饲料处理组的大黄鱼的血清皮质醇的变化幅度最小,且与应激前相比,没有发生显著变化。同时,血糖维持在一个稳定的水平。由此表明,饲料甘氨酸的含量为 2.75% 时,有利于保持大黄鱼较强的抗应激能力。在水生动物中, Xie 等(2014)研究发现,饲料中添加 2.58% 的甘氨酸,能够显著提高凡纳滨对虾的抗盐度突变应激能力。甘氨酸在其他鱼类中抗应激作用的研究还未见报道。目前,还未有可用于解释甘氨酸在鱼虾体内提高抗应激能力现象的直接数据,需要进一步研究。在陆生脊椎动物中的相关研究结果认为,饲料中添加甘氨酸可提高机体抗应激能力的原因可能是:(1)甘氨酸本身为生糖氨基酸,同时在体内甘氨酸还会转化为丝氨酸、谷氨酸和丙氨酸等生糖氨基酸。机体受到刺激后,与应激密切相关的生糖氨基酸浓度会升高,糖异生作用增强,以补充应激时的能量需求(Matthews *et al*, 1981; 吴艳等, 2008)。(2)在动物消化道内,甘氨酸可与多种微量元素螯合成结构比较稳定的有机微量元素,可有效提高动物对矿物质的利用率,增强抗应激能力(Dean *et al*, 2006; Tan *et al*, 2001; 马文强等, 2010¹⁾)。

1) Ma WQ. Research on intestinal absorption characteristics of iron glycine chelate and its biological effects. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2010, 1-151 [马文强. 甘氨酸亚铁螯合物的肠道吸收特点及其生物学效应研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2010, 1-151]

由此可见, 饲料中添加适量甘氨酸可以有效提升大黄鱼的抗氧化和抗应激能力。然而, Mertz 等(1952)在猪的研究中表明, 过量的甘氨酸会造成饲料中氨基酸不平衡, 甚至会产生毒性, 对肝脏造成损伤。在肝脏受到损伤或坏死时, 血清中谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)的活性会显著增强, 因此, GOT、GPT可作为判断肝脏受损程度的重要指标(Wang *et al.*, 2005)。本研究结果显示, 各处理组肝脏 GOT 和 GPT 水平差异不显著, 血清 GOT 和 GPT 水平均在饲料甘氨酸含量为 2.75% 时取得显著最小值。由此可见, 饲料中添加适量的甘氨酸对大黄鱼肝脏没有损伤作用。但当饲料的甘氨酸含量达到 7.51% 时, 血清 GOT 水平显著升高, 说明过量甘氨酸可能对大黄鱼肝脏造成了一定的损伤, 然而, 本研究缺乏肝脏组织观察等直接数据, 关于饲料中甘氨酸的含量与大黄鱼肝脏健康的关系有待于进一步研究。

综上所述, 对于提高大黄鱼抗应激能力, 同时不影响存活和肝脏健康, 本研究推荐饲料中甘氨酸的使用量为 2.75%–3.57%。

参 考 文 献

- Benfey TJ, Biron M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 2000, 184(1): 167–176
- China Fishery Statistical Yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2015, 28–29 [中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2015, 28–29]
- Dean DW, Bidner TD, Southern LL. Glycine supplementation to low protein, amino acid-supplemented diets supports optimal performance of broiler chicks. *Poultry Science*, 2006, 85(2): 288–296
- de Koning TJ, Snell K, Duran M, *et al.* L-serine in disease and development. *Biochemical Journal*, 2003, 371(3): 653–661
- Fanouraki E, Mylonas CC, Papandroulakis N, *et al.* Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(2): 313–322
- Fei WL, Liang CY. Comparison of three serum glucose measurements. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2012, 9(20): 2573–2574 [费维伦, 梁春阳. 3种血清葡萄糖测定方法的比较. 检验医学与临床, 2012, 9(20): 2573–2574]
- Ito K, Ozasa H, Noda Y, *et al.* Effect of non-essential amino acid glycine administration on the liver regeneration of partially hepatectomized rats with hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinical Nutrition*, 2008, 27(5): 773–780
- Lewis RM, Godfrey KM, Jackson AA, *et al.* Low serine hydroxymethyl transferase activity in the human placenta has important implications for fetal glycine supply. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90(3): 1594–1598
- Li P, Mai KS, Trushenski J, *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43–53
- Matilla B, Mauriz JL, Culebras JM, *et al.* Glycine: Cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutricion Hospitalaria*, 2002, 17(1): 2–9
- Matthews DE, Conway JM, Young VR, *et al.* Glycine nitrogen metabolism in man. *Metabolism*, 1981, 30(9): 886–893
- Mertz ET, Beeson WM, Jackson HD. Classification of essential amino acids for the weanling pig. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 38(1): 121–128
- Millán-Cubillo AF, Martos-Sitcha JA, Ruiz-Jarabo I, *et al.* Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 2016, 451: 87–92
- Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 73(2): 121–146
- Sheth H, Hafez T, Glantzounis GK, *et al.* Glycine maintains mitochondrial activity and bile composition following warm liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 26(1): 194–200
- Tan BP, Mai KS. Zinc methionine and zinc sulfate as sources of dietary zinc for juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 2001, 192(1): 67–84
- Wang WW, Wu ZL, Dai ZL, *et al.* Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health. *Amino Acids*, 2013, 45(3): 463–477
- Wang Y, Xiong L, Yang KJ, *et al.* Effect of beta-cypermethrin on GPT and GOT activities of crucian serum. *Agricultural Science & Technology*, 2005, 6(1): 20–23
- Wijekoon EP, Skinner C, Brosnan ME, *et al.* Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: Effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2004, 82(7): 506–514
- Wu GY, Bazer FW, Burghardt RC, *et al.* Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition. *Amino acids*, 2011, 40(4): 1053–1063
- Wu GY, Wu ZL, Dai ZL, *et al.* Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids*, 2013, 44(4): 1107–1113
- Wu Y, Miao JF, Liu Y, *et al.* Effect of glutamine on amino acid profile of serum and tissues in rats by simulating transport stress. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2008, 29(2): 21–25 [吴艳, 苗晋锋, 刘仪, 等. 谷氨酰胺对模拟运输应激大鼠体内氨基酸的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2008, 29(2): 21–25]
- Xie SW, Tian LX, Jin Y, *et al.* Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. *Aquaculture*, 2014, 418: 159–164
- Yin M, Zhong Z, Connor HD, *et al.* Protective effect of glycine on renal injury induced by ischemia-reperfusion *in vivo*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2002, 282(3): F417–F423
- Zhang CX, Ai QH, Mai KS, *et al.* Dietary lysine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*, 2008, 283(1): 123–127
- Zhang DR, Zhang LM, Wang JY, *et al.* Effect of dairy-yeast prebiotic on growth performance and antioxidant capability

- of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(4): 34–42 [张德瑞, 张利民, 王际英, 等. 乳制品-酵母益生元对星斑川鲷幼鱼生长性能和抗氧化能力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 34–42]
- Zhao M, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* Effects of dietary taurine on the reproductive performance and the larval quality in tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 101–108 [赵敏, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 牛磺酸对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)亲鱼繁殖性能及仔鱼质量的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 101–108]
- Zhong Z, Wheeler MD, Li XL, *et al.* L-Glycine: A novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2003, 6(2): 229–240
- Zhou QC, Wu ZH, Tan BP, *et al.* Optimal dietary methionine requirement for Juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, 2006, 258(1): 551–557
- Zhou XQ, Liang HM. Change in the contents of lipid peroxide, and activity of antioxidant enzymes in the liver of mice under crowding stress. Zoological Research, 2003, 24(3): 238–240 [周显青, 梁洪蒙. 拥挤胁迫下小鼠肝脏脂质过氧化物含量和抗氧化酶活性的变化. 动物学研究, 2003, 24(3): 238–240]

(编辑 冯小花)

Dietary Glycine Improved the Capacity of Anti-Oxidation and Anti-Stress of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

PAN Xiaoyi¹, ZHANG Qin², LI Jun¹, LIU Dong¹, ZHANG Hanle¹, ZHANG Wenbing^{1①}, MAI Kangsen¹

(1. Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai 536000)

Abstract Large yellow croaker *Larimichthys crocea* is one of the most successful marine fish culture operations in terms of the number of juveniles produced and commercial size fish production annually in China. The production of this farmed species was more than 120000 metric tons in 2014 in China. However, large yellow croaker was often encountered with many stress situations, such as net cage changing, typhoon and water temperature oscillations during the grown-up farming. Generally, these could result in the decreases of feed utilization, anti-diseases ability and growth, even causing great economy losses. So, it is important to improve the anti-stress ability of large yellow croaker. The purpose of this study was to investigate the effects of dietary glycine on anti-oxidative and anti-stress responses of large yellow croaker (initial body weight 130.35±8.37 g). There were 6 experimental diets containing graded levels of glycine (1.58%, 2.15%, 2.75%, 3.96%, 6.33% and 7.51%) with different levels of glycine supplementation (0, 0.6%, 1.2%, 2.4%, 4.8% and 6.0%). After a 30 d feeding trial, the experimental animals were challenged with a 30 s trawl stress for three times. The results showed that the survival and body compositions of large yellow croaker had no significant differences among all the treatments ($P>0.05$). The significant highest value of the total anti-oxidative capacity in liver was found in the treatment with 2.75% dietary glycine. The lowest value of the malondialdehyde in liver was found in the treatment with 3.96% dietary glycine. However, this value of malondialdehyde did not significantly differ from that in the treatment with 2.75% dietary glycine ($P>0.05$). On the basis of hepatic total anti-oxidative capacity, using the second-order regression analysis, the most reasonable dietary glycine content for large yellow croaker was estimated to be 3.57%. Both the glutamic-oxaloacetic transaminase and the glutamic-pyruvic transaminase activities in serum had the lowest value in the treatment with 2.75% dietary glycine ($P<0.05$). Before the trawl stress, treatment with 2.75% dietary glycine resulted in the highest concentration of cortisol in serum ($P<0.05$). After the trawl stress, the serum cortisol concentration in this group kept little change. Meanwhile, the glucose concentration in serum kept at a relative higher level. In conclusion, for the purpose of improving the capacities of anti-stress in large yellow croaker, while had no significant negative effects on the survival and liver health, 2.75%–3.57% of dietary glycine were recommended for large yellow croaker.

Key words Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*); Glycine; Anti-oxidation; Anti-stress; Nutrition

① Corresponding author: ZHANG Wenbing, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn; ZHANG Qin, E-mail: zhangqin821220@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20160215001

http://www.yykxjz.cn/

胆汁酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响*

曾本和^{1,2} 廖增艳^{1#} 向 泉^{1①} 何文萧¹ 岑 敏¹ 何善成¹

(1. 西南大学荣昌校区水产系 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室 水产科学重庆市市级重点实验室 重庆 402460; 2. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所 拉萨 850002)

摘要 为研究胆汁酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响,选取初始体重为(13.11±0.58) g 的草鱼 540 尾,随机分成 6 个实验组,分别饲喂胆汁酸添加量为 0、75、150、225、300、375 mg/kg 的等氮等能饲料(粗蛋白含量 34.56%,总能 13.54 kJ/g),养殖时间为 60 d。结果显示,随着胆汁酸浓度的增加,草鱼的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)均呈先上升后下降的变化趋势,且均在胆汁酸添加量为 300 mg/kg 时达到最大值(分别为 281.18%和 2.23%/d);饲料系数(FCR)则呈先下降后上升的趋势,且在胆汁酸添加水平为 225 mg/kg 时达最低值(1.26)。由二次回归方程可知,WGR、SGR、FCR 等生产性能最优时,胆汁酸添加水平分别为 222.15、265.00、242.86 mg/kg。实验鱼肌肉粗脂肪含量随胆汁酸添加量的增加而呈先下降后趋于稳定的变化趋势,粗蛋白质含量则呈先上升后降低的变化趋势。肠道各段及肝胰脏的消化酶活性均随胆汁酸添加量的增加呈先升高后下降的趋势。由此说明,适量的胆汁酸能提高草鱼生长性能,促进其脂肪代谢,降低机体脂肪沉积,改善其肌肉品质。本研究考虑到草鱼消化酶活性、肌肉品质及生长性能等因素,其饲料中胆汁酸适宜的添加量为 222.15–265.00 mg/kg。

关键词 草鱼;胆汁酸;生长性能;肌肉营养成分;消化酶活性

中图分类号 S963.73 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0099-08

胆汁酸是由胆固醇降解所产生的一类固醇类物质(唐俊英, 2011),可与动物消化道中的胰脂肪酶结合,将胰脂肪酶的催化基团暴露出来并发生空间结构的改变,完全发挥胰脂肪酶的活性,完成对长链脂肪酸的消化和吸收(杨汉博, 2008);同时,胆汁酸是动物肠道中脂类物质的乳化剂,可促进脂肪及各种脂溶性物质的消化利用。赖悦丰(2015)研究表明,熊去氧胆酸对非酒精性脂肪肝患者的临床治疗有效率高达

82.35%,较对照组提高了 55.56%;沈昕等(2015)报道,在 35%的高脂饲料中添加 16.70–150.00 mg/kg 胆酸后可显著提高大鼠(*Rattus norvegicus*)的增重率,且高剂量的胆酸显著降低了大鼠的脂肪系数及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,说明高剂量的胆酸可促使营养性肥胖的大鼠减肥。林仕梅等(2003)研究表明,胆汁酸能促进鲫鱼(*Carassius auratus*)生长,提高其饲料转化率,降低内脏比,改善鱼体品质。研究表明,一

* 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2013jcyjA80033)、2015 年西南大学青年基金项目 and 2015 年西南大学信豚基金项目共同资助[This work was supported by Basic and Advanced Research Projects in Chongqing (cstc2013jcyjA80033), Youth Fund Project of Southwestern University in 2015, and Xintun Fund Project of Southwestern University in 2015]. 曾本和, E-mail: 675426776@qq.com

#共同第一作者: 廖增艳, E-mail: 1170143774@qq.com

① 通讯作者: 向 泉, 副教授, E-mail: howlet@126.com

收稿日期: 2016-02-15, 收修改稿日期: 2016-04-12

定浓度的胆汁酸可促进饲料脂肪的乳化, 显著提高军曹鱼(*Rachycentron canadum*)的增重率, 降低其体内脂肪的沉积(周书耘等, 2010)。且胆汁酸可参与肠肝循环, 具有作为信号因子调节机体代谢(Norlin *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008)、抑制胃肠致癌因子(Copaci *et al.*, 2005)、保肝利胆(唐精等, 2011)及防治疾病(张久聪等, 2008)等作用。目前, 胆汁酸在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)中的研究鲜有报道。本研究拟探讨不同胆汁酸水平对草鱼生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响, 以期胆汁酸在草鱼配合饲料中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、豆粕、菜粕、棉粕等为蛋白源, 鱼油为脂肪源配制草鱼基础饲料, 分别在基础饲料中添加 0、75、150、225、300、375 mg/kg 的胆汁酸(胆汁酸由广东信豚饲料有限公司提供, 有效成分的质量分数为 15%)配制成 6 种等氮等能实验饲料, 饲料原料经粉碎后过 60 目筛, 各原料按配方比例定量并逐级扩大混合均匀。用实验室小型绞肉机制成直径为 1 mm 的颗粒, 自然晾干后于-20℃保存。基础饲料配方以及营养成分含量见表 1。

1.2 实验鱼的采集及饲养管理

实验草鱼购自重庆市双河养殖场的同一批繁殖的幼鱼, 购回后用 3%–5% 的食盐水消毒后放入暂养池, 暂养 10 d 后, 选取健康、无伤病、初始体重为 (13.11±0.58) g 的草鱼 540 尾, 随机分成 6 个实验组, 每组设 3 个重复, 每个重复 30 尾实验鱼, 随机放养在实验水族箱(1.2 m×0.4 m×0.6 m)中。分别投喂不同胆汁酸水平的实验饲料, 养殖时间为 60 d。每天表观饱食投喂 3 次(08:00、12:00 和 19:00)。实验期间, 每天换水 1 次, 每次换水 1/3。水温保持在 25–30℃, pH 值 6.5–7.5、溶氧>6.0 mg/L、NH₃-N<0.2 mg/L、NO₂-N>0.01 mg/L。每日监测实验鱼的摄食行为和死亡数量等。

1.3 样品的采集

在实验结束前一天对实验鱼饥饿 24 h, 对各实验水族箱中的草鱼称重并统计尾数, 分别从每个实验组中随机抽取 10 尾鱼, 并用 50 mg/L 的 MS-222 溶液麻醉后, 称重并解剖。取出内脏, 分离出肝胰脏和肠道, 清除肠道内的食物, 去除脂肪、肠系膜, 用预冷

表 1 基础饲料配方及营养组成(干物质基础, %)

Tab.1 Composition and nutrient levels of basal diet (Dry matter basis, %)

原料 Ingredient	含量 Content	营养成分 Nutrient	含量 Content
鱼粉 Fish meal	10	粗蛋白 Crude protein	34.56
豆粕 Soybean meal	23	粗脂肪 Crude lipid	6.12
菜粕 Rapeseed meal	25	粗灰分 Crude ash	9.76
棉粕 Cotton meal	8	水分 Moisture	9.68
次粉 Wheat middling	22	总能	13.54
麸皮 Wheat bran	5	Total energy (kJ/g)	
鱼油 Fish oil	4		
预混料 Premix ¹	1		
氯化胆碱 Choline chloride	1		
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1		

1. 复合预混料为每千克饲料提供: 维生素 A 2000 IU, 维生素 C 300 mg, 维生素 D₃ 2000 IU, 维生素 E 100 mg, 维生素 K₃ 10 mg, 维生素 B₁ 5 mg, 维生素 B₂ 10 mg, 维生素 B₆ 10 mg, 维生素 B₁₂ 0.02 mg, 尼克酸 100 mg, 泛酸钙 40 mg, 生物素 1 mg, 叶酸 5 mg, 肌醇 100 mg, FeSO₄·7H₂O 600 mg, CuSO₄·5H₂O 15 mg, MnSO₄·H₂O 80 mg, ZnSO₄·7H₂O 300 mg, KI (1%) 60 mg, Na₂SeO₃·5H₂O (1%) 60 mg, CoCl₂·6H₂O (1%) 7 mg。饲料营养成分为实测值

1. The premix ingredient provides vitamin and mineral for one kilogram of diet: vitamin A 2000 IU, vitamin C 300 mg, vitamin D₃ 2000 IU, vitamin E 100 mg, vitamin K₃ 10 mg, vitamin B₁ 5 mg, vitamin B₂ 10 mg, vitamin B₆ 10 mg, vitamin B₁₂ 0.02 mg, nicotinic acid 100 mg, calcium pantothenate 40 mg, biotin 1 mg, folic acid 5 mg, inositol 100 mg, FeSO₄·7H₂O 600 mg, CuSO₄·5H₂O 15 mg, MnSO₄·H₂O 80 mg, ZnSO₄·7H₂O 300 mg, KI (1%) 60 mg, Na₂SeO₃·5H₂O (1%) 60 mg, CoCl₂·6H₂O (1%) 7 mg. The feed nutrient contents were measured values

的生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干, 将肠道分为前肠、中肠和后肠; 同时, 取下实验鱼背鳍以下侧线以上的肌肉, 用样品袋分别将肝胰脏、各段肠道及肌肉密封, 用液氮速冻后转入-80℃冰箱中保存备用。

1.4 指标的测定

1.4.1 生长性能的测定 根据实验测定数据计算草鱼的增重率、特定生长率、饲料系数、成活率。

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(W_t-W₀)×100/W₀

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=
(lnW_t-lnW₀)×100/t

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=F/(W_t-W₀)

成活率(Survival rate, SR, %)= $100 \times N_t / N_0$ 。

式中, W_0 、 W_t 分别为实验鱼的初始体重和终末体重(g), t 为实验时间(d), N_0 、 N_t 分别为实验开始和结束时实验鱼的尾数, F 为摄食量(g)。

1.4.2 实验饲料及肌肉营养成分的测定 实验饲料及实验鱼背部肌肉粗蛋白质采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-1994);粗脂肪采用索氏抽提仪测定(GB/T 6433-1994);水分采用干燥法(105℃)测定(GB 6435-1986);粗灰分采用马福炉灼烧(550℃)法测定(GB/T 6438-1992)。

1.4.3 消化酶活性的测定 粗酶液的制备参照叶元士等(2015)的方法制备各段肠道、肝胰脏的粗酶液。将实验鱼的前肠、中肠、后肠和肝胰脏按组分别合并称重。分别加入相当于其重量 20 倍的生理盐水,迅速用冰冻玻璃匀浆器匀浆后,用离心机在 3500 r/min 转速下离心 20 min,取其上清液作为粗酶液提取液,保存于 4℃ 冰箱中,用于测定消化酶的活性。蛋白酶活性采用 Folin-酚法测定(中山大学生物系, 1979)。蛋白酶活性单位定义为: pH 7.4、28℃ 条件下,以 1% 的酪蛋白为底物,酶液每分钟催化生成 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活性单位(U);淀粉酶活性采用淀粉-碘显色法测定(中山大学生物系, 1979)。淀粉酶活性单位定义为: pH 7.4、28℃ 条件下, 1 g 组织与底物作用 30 min,水解 10 mg 淀粉的酶量为 1 个淀粉酶活性单位(U);脂肪酶活性采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法(中山大学生物系, 1979)。脂肪酶活性单位定义为: pH 7.4、28℃ 条件下, 1 g 组织每 1 h 所产生 1 μmol 游离脂肪酸的酶量为 1 个酶活性单位(U)。

1.5 数据统计与处理

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用 SPSS 19.0 中的单因素方差分析(One-way ANOVA)

进行数据统计,若组间差异显著,再用 Duncan 氏方法进行多重比较,差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 胆汁酸对草鱼生长性能的影响

由表 2 可知,实验草鱼的 WGR、SGR 均随着胆汁酸添加量的增加呈先上升后下降的趋势,且在胆汁酸添加量均为 300 mg/kg 时达到最大,分别为 281.18%和 2.23%/d, WGR 显著高于对照组($P < 0.05$); SGR 除与 150 mg/kg 组和 225 mg/kg 组差异不显著外($P > 0.05$),显著高于其余各实验组($P < 0.05$)。以二次回归方程可知,实验鱼 WGR、SGR 的回归方程分别为 $Y_1 = -0.0023X^2 + 1.0219X + 159.83$ ($R^2 = 0.8789$) (图 1)、 $Y_2 = -0.00001X^2 + 0.0053X + 1.0693$ ($R^2 = 0.9039$) (图 2)。在抛物线的最高点分别获得草鱼 WGR、SGR 的最大值,此时对应的胆汁酸添加量分别为 222.15 mg/kg 和 265.00 mg/kg; FCR 则随胆汁酸添加量的增加而呈先下降后上升的趋势,且在胆汁酸添加量为 225 mg/kg 时最低,为 1.26,除与 300 mg/kg 组差异不显著($P > 0.05$)外,显著低于其余各实验组($P < 0.05$),FCR 的回归方程为 $Y_3 = 0.000007X^2 - 0.0034X + 1.6886$ ($R^2 = 0.8589$) (图 3),FCR 最小时的胆汁酸添加量为 242.86 mg/kg。实验期间各实验组的 SR 差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 胆汁酸对草鱼肌肉营养成分的影响

由表 3 可知,随着胆汁酸添加水平的提高,实验鱼肌肉中粗脂肪含量呈先下降后趋于稳定的趋势,且在添加水平为 225 mg/kg 时最低(为 3.51%),除显著低于对照组和 75 mg/kg 组($P < 0.05$)外,与其余各实验组差异不显著($P > 0.05$);粗蛋白质含量则呈先上升后降低的变化趋势,且在胆汁酸含量为 300 mg/kg 时最

表 2 胆汁酸添加水平对草鱼生长性能的影响(平均值±标准差, $n=3$)
Tab.2 Effects of dietary bile acids on growth of *C. idellus* (Mean±SD, $n=3$)

项目 Items	胆汁酸水平 Levels of bile acids (mg/kg)					
	0	75	150	225	300	375
初重 Initial weight (g)	13.19±0.03	13.02±0.01	13.11±0.04	13.07±0.06	13.23±0.05	13.06±0.04
末重 Final weight (g)	35.75±2.30 ^a	39.82±1.01 ^a	47.14±2.93 ^b	48.27±4.44 ^b	50.43±3.05 ^b	39.59±1.86 ^a
增重率 Weight gain rate (%)	171.04±5.40 ^a	205.84±9.08 ^b	259.57±5.39 ^c	269.32±7.40 ^{cd}	281.18±6.75 ^d	203.17±6.06 ^b
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	1.66±0.06 ^a	1.86±0.09 ^b	2.13±0.11 ^c	2.18±0.17 ^c	2.23±0.08 ^c	1.85±0.10 ^b
饲料系数 Feed conversion ratio	1.65±0.02 ^c	1.52±0.07 ^b	1.42±0.04 ^b	1.26±0.03 ^a	1.30±0.05 ^a	1.53±0.11 ^b
存活率 Survival rate (%)	98.89±1.92	98.89±1.04	100.0±0.00	97.78±2.13	98.89±1.28	98.89±2.09

注:同行中,相同肩标字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同肩标字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

Note: Within the same row, values with same superscripts or no superscripts indicated no significant difference ($P > 0.05$), values with different superscripts indicated significant difference ($P < 0.05$). The same as below

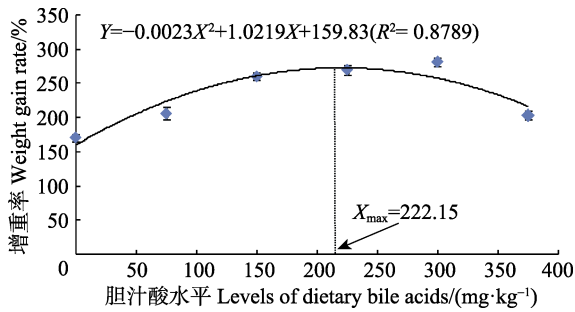


图1 胆汁酸添加水平对草鱼增重率的影响

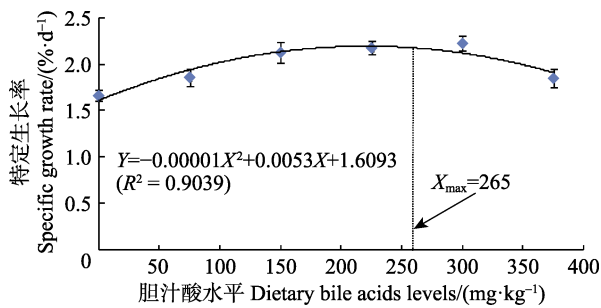
Fig.1 Effects of different levels of bile acids on the weight gain rate of *C. idellus*

图2 胆汁酸添加水平对草鱼特定生长率的影响

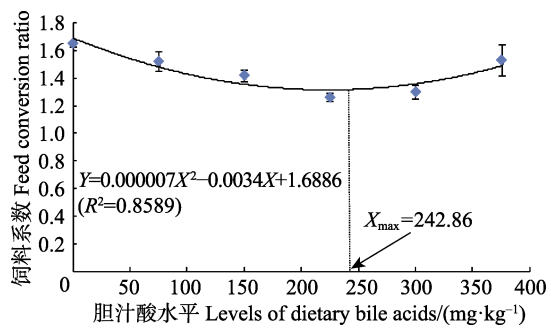
Fig.2 Effects of different levels of bile acids on the specific growth rate of *C. idellus*

图3 胆汁酸添加水平对草鱼饲料系数的影响

Fig.3 Effects of different levels of bile acids on the feed conversion ratio of *C. idellus*

高(为15.05%),除与150 mg/kg组和225 mg/kg组无明显差异外($P>0.05$),显著高于其余各实验组($P<0.05$);各实验组水分和灰分均无明显差异($P>0.05$)。

2.3 胆汁酸对草鱼消化酶活性的影响

由表4可知,胆汁酸添加水平对草鱼消化酶活性有显著影响。实验鱼肠道各段及肝胰脏中,蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶的活性均随胆汁酸添加水平的提高呈先上升后下降的变化趋势。肠道各段及肝胰脏蛋白酶活性均在胆汁酸添加量为150 mg/kg时活性最强,此时前肠、后肠及肝胰脏的蛋白酶活性显著高于其他各实验组($P<0.05$),而中肠蛋白酶活性与胆汁酸水平为0~75 mg/kg时的差异不显著($P>0.05$),但显著高于其他各实验组($P<0.05$);中肠及肝胰脏脂肪酶活性在225 mg/kg组最强,前肠脂肪酶活性在300 mg/kg组最强,而后肠脂肪酶活性在150 mg/kg组最强,且均显著高于其他各实验组($P<0.05$);前肠及后肠淀粉酶活性在150 mg/kg组最强,但此时前肠淀粉酶活性与胆汁酸水平为75~375 mg/kg时的差异不显著($P>0.05$),而后肠淀粉酶活性显著高于其他各实验组($P<0.05$);中肠及肝胰脏淀粉酶活性则在300 mg/kg组最强,且中肠淀粉酶活性在胆汁酸水平为225~375 mg/kg时差异不显著($P>0.05$),肝胰脏淀粉酶活性除与225 mg/kg组差异不显著($P>0.05$)外,显著高于其他各实验组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 胆汁酸对草鱼生长性能的影响

胆汁酸能乳化脂肪,扩大脂肪与脂肪酶的接触面积,促进鱼类对脂肪的消化吸收,提高饲料脂肪利用率(Chou *et al*, 1996)。胡田恩等(2015)研究发现,饲料中添加一定量的胆汁酸能有效提高牛蛙(*Rana catesbeiana*)的生长速度,且胆汁酸添加量为200 mg/kg时其特定生长率、饲料效率和氮保留率达到最高;胆汁酸添加量>300 mg/kg时能显著提高军曹鱼的增重率和饲料利用率(周书耘等, 2010),Deshimaru等(1982)认为,饲料中添加熊去氧胆酸能显著提高黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)的增重率和饲料效率;同时,胆汁酸能明显提高大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)

表3 胆汁酸添加水平对草鱼肌肉营养成分的影响

Tab.3 Effects of different levels of dietary bile acids on the muscle composition of *C. idellus* (%)

项目 Items	胆汁酸水平 Levels of bile acids (mg/kg)					
	0	75	150	225	300	375
水分 Moisture	78.69±0.62	78.47±0.75	79.02±0.29	78.83±0.81	79.14±0.55	78.71±0.46
粗蛋白质 Crude protein	13.66±0.14 ^a	14.07±0.36 ^{ab}	14.38±0.28 ^{bc}	14.73±0.10 ^c	15.05±0.69 ^{bc}	14.17±0.22 ^{ab}
粗脂肪 Crude lipid	4.98±0.08 ^c	4.16±0.12 ^b	3.73±0.14 ^a	3.51±0.13 ^a	3.39±0.18 ^a	3.80±0.27 ^{ab}
灰分 Ash	2.67±0.04	1.86±0.08	1.81±0.15	1.90±0.11	1.84±0.72	2.09±0.18

表 4 胆汁酸添加水平对草鱼消化酶活性的影响(鲜物质基础, U/g)

Tab.4 Effects of different levels of dietary bile acids on digestive enzyme activities of *C. idellus* (Fresh matter base, U/g)

项目 Items	胆汁酸水平 Levels of bile acids (mg/kg)						
	0	75	150	225	300	375	
蛋白酶 Protease	前肠 Foregut	7.36±0.21 ^a	9.54±0.15 ^d	10.31±0.27 ^e	8.69±0.31 ^c	8.25±0.56 ^{bc}	7.95±0.52 ^{ab}
	中肠 Midgut	8.08±0.41 ^{ab}	8.92±0.39 ^b	10.59±0.40 ^b	7.90±0.55 ^a	8.19±0.64 ^{ab}	7.79±0.46 ^a
	后肠 Hindgut	8.67±0.10 ^b	9.68±0.12 ^c	10.66±0.42 ^f	9.35±0.09 ^c	8.87±0.29 ^b	8.27±0.08 ^a
	肝胰脏 Hepatopancreas	8.68±0.20 ^a	9.64±0.06 ^b	10.26±0.36 ^c	9.75±0.09 ^b	8.48±0.26 ^a	8.48±0.26 ^a
脂肪酶 Lipase	前肠 Foregut	206.15±29.51 ^a	255.56±88.53 ^b	281.11±51.11 ^c	306.67±51.11 ^d	415.72±193.50 ^f	383.33±0.00 ^e
	中肠 Midgut	385.04±78.08 ^a	415.71±106.39 ^b	654.22±51.11 ^e	739.417±59.02 ^f	487.26±156.15 ^d	470.22±51.11 ^c
	后肠 Hindgut	369.70±29.51 ^c	402.074±78.07 ^d	492.37±59.02 ^f	424.22±51.11 ^e	315.19±59.02 ^b	267.48±29.51 ^a
	肝胰脏 Hepatopancreas	345.85±29.51 ^a	403.78±88.53 ^b	511.11±102.22 ^d	606.52±59.017 ^f	534.96±59.018 ^e	429.33±153.33 ^c
淀粉酶 Amylase	前肠 Foregut	227.81±7.22 ^a	241.71±1.30 ^b	242.03±1.86 ^b	240.39±0.28 ^b	240.39±1.24 ^b	240.56±1.24 ^b
	中肠 Midgut	252.04±4.85 ^a	254.18±5.83 ^a	254.10±0.85 ^a	261.73±3.69 ^b	266.65±1.99 ^b	264.68±2.80 ^b
	后肠 Hindgut	239.74±6.28 ^a	265.01±5.49 ^c	277.64±2.74 ^d	251.88±6.68 ^b	240.56±2.22 ^a	234.32±2.26 ^a
	肝胰脏 Hepatopancreas	246.46±2.84 ^a	255.16±3.13 ^b	264.19±4.41 ^c	294.71±1.73 ^d	299.14±5.22 ^d	250.24±4.13 ^{ab}

幼鱼的特定生长率和蛋白质效率,显著降低其饲料系数(孙建珍等, 2014)。本研究中, 实验草鱼的 WGR、SGR、FCR 均与胆汁酸添加水平呈明显的二次曲线关系。通过二次回归模型分析可知, 当胆汁酸添加水平在 239.61–265.00 mg/kg 时, 可显著促进草鱼的生长, 提高其饲料效率和蛋白沉积率。与对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) (Maita *et al.*, 1996)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (颜志刚等, 2002)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (谭永刚等, 2008)等的研究结果基本一致, 说明在饲料中添加适量的胆汁酸可促进鱼类的生产性能。其可能原因有: 首先, 胆汁酸具有杀菌抑菌的作用(刘敬盛等, 2010), 改善肠道健康, 利于肠道中各种消化酶的分泌, 提高鱼类的生长速度和饲料效率。其次, 胆汁酸有利于脂类物质的乳化, 可促进对脂肪的消化利用率, 从而节约蛋白质(黄炳山等, 2015), 促进鱼类生长; 第三, 胆汁酸可提高动物对饲料营养物质的消化利用率。饲料中添加 200 mg/kg 的胆汁酸可使牛蛙对饲料蛋白质和脂肪的表观消化率较对照组分别提高 73.47%和 77.92% (胡田恩等, 2015); 王优军(2006)¹⁾发现, 添加 800 mg/kg 的胆汁酸可使大菱鲃对

饲料粗蛋白消化率提高 1.5%, 粗脂肪消化率提高 3.0%, 说明胆汁酸可促进鱼类对饲料营养物质的消化和吸收, 提高其生长速度。王恒(2010)²⁾则认为, 添加胆汁酸虽然可显著降低罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的饲料系数, 但对其增重率无明显影响。说明胆汁酸对水产动物生长的影响因实验对象、生长阶段、实验饲料组成等不同而有一定的差异。

3.2 胆汁酸对草鱼肌肉营养成分的影响

本研究中, 胆汁酸能有效降低草鱼肌肉中粗脂肪的含量, 提高其粗蛋白质的含量。与对军曹鱼(周书耘等, 2010)、大菱鲃(孙建珍等, 2014; 黄炳山等, 2015)、罗氏沼虾(王恒等, 2010)²⁾等的研究结果基本一致。说明胆汁酸能改善养殖动物肌肉品质。胆汁酸能促进动物体内脂肪的分解, 提高 PUFA 在鱼体内的吸收和利用率(孙建珍等, 2014)。Watanabe 等(2006)研究表明, 胆汁酸可激活大鼠(*Rattus norvegicus*)褐色脂肪细胞表面 G 蛋白偶联胆汁酸受体(TGR5), 从而提高胞内环腺苷酸(cAMP)和甲状腺激素水平, 加快其机体的基础代谢速度, 提高机体中脂肪组织的代谢速

1) Wang YJ. Effect and mechanism of several non-nutritional and non-pollution additives on turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Master's Thesis of Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2006, 26–33 [王优军. 几种非营养无公害添加剂对大菱鲃的效应和机制研究. 中国科学院研究生院硕士研究生学位论文, 2006, 26–33]

2) Wang H. Effect of different lipid sources and bile acid on growth performance and fatty acid composition in *Macrobrachium rosenbergii*. Master's Thesis of Yangzhou University, 2010, 64–72 [王恒. 不同脂肪源及胆汁酸对罗氏沼虾生长性能及脂肪酸组成的影响. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2010, 64–72]

度,改善脂肪在动物体内的转运,降低鱼体粗脂肪的含量;且胆汁酸能显著提高牛蛙对饲料氮的保留率(胡田恩等,2015),因此,胆汁酸可通过促进动物脂肪分解代谢而节约饲料蛋白质,提高养殖动物体内蛋白质的沉积。同时,胆汁酸降低了脂肪在肝脏中的沉积,降低了养殖鱼类脂肪肝发生的可能性(唐精等,2011)。说明胆汁酸可有效地改善水产动物机体营养组成,提高养殖产品品质;同时减少肝脏中脂肪的沉积,预防养殖过程中脂肪肝的发生。

3.3 胆汁酸对草鱼消化酶活性的影响

消化酶活性是反映动物对营养物质消化能力的重要指标。胆汁酸能够将小肠内脂肪酶原激活为有活性的脂肪酶使其发挥作用,并能增强其酶活性(刘敬盛等,2010),同时胆汁酸具有特殊的生物活性,可以部分溶解肠道内容物中脂肪的分解产物,并将其从酶作用位点及时移除,避免这些产物对脂肪分解系统的抑制作用(Bauer *et al.*, 2005),从而促进脂肪分解生成脂肪酸,而脂肪酸水平提高又可以增强胆囊收缩素(CCK)的释放,进而刺激胰腺分泌消化酶(周旭春等,2002)。武中会等(2008)研究发现,添加 800 mg/kg 胆汁酸复合乳化剂可使肉鸡胰蛋白酶、糜蛋白酶、脂肪酶活性显著提高;翟少伟等(2015)认为,添加 300 mg/kg 的胆汁酸可显著提高吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)脂肪酶和蛋白酶活性。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)饲料中添加适宜水平的胆汁酸可显著提高其肠道脂肪酶活性(Alam *et al.*, 2001);牛蛙饲料中添加适宜水平的胆汁酸可显著提高其肠道蛋白酶和脂肪酶活性(胡田恩等,2015)。在本研究中,添加胆汁酸显著提高了草鱼肠道各段及肝胰脏中蛋白酶及脂肪酶的活性,与上述研究结果基本一致。说明胆汁酸可提高动物消化道中脂肪酶和蛋白酶的活性,促进对饲料中脂肪和蛋白质的消化吸收,促进动物的生长。研究表明,胆汁酸对幼鳗(*Anguilla anguilla*)(Maita *et al.*, 1996)、牛蛙(胡田恩等,2015)、吉富罗非鱼(翟少伟等,2015)肠道淀粉酶活性无显著影响。本研究中,添加胆汁酸可显著提高草鱼肠道各段及肝胰脏中淀粉酶的活性,与上述研究有一定的差异。这可能与实验鱼的种类和生长发育阶段有关,具体原因还有待于进一步的研究。

4 结论

胆汁酸对草鱼的生长性能、饲料转化率、肌肉营养成分及消化酶活性有显著的影响。本实验条件下,建议草鱼饲料中胆汁酸的适宜添加水平为 222.15–

265.00 mg/kg。

参 考 文 献

- Alam MS, Teshima S, Ishikawa M, *et al.* Effects of ursodeoxycholic acid on growth and digestive enzyme activities of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research*, 2001, 32(S1): 235–243
- Bauer E, Jakob S, Mosenthin R. Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2005, 18(2): 282–295
- Biology Department of Sun Yat-sen University. Introduction to biochemical technology. Beijing: People's Education Press, 1979: 26–29 [中山大学生物系. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1979: 26–29]
- Chou BS, Shiau SY. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 1996, 143(2): 185–195
- Copaci I, Micu L, Iliescu L, *et al.* New therapeutical indications of ursodeoxycholic acid. *Romanian Journal of Gastroenterology*, 2005, 14(3): 259–266
- Deshimaru O, Kuroki K, Yone Y. Suitable levels of lipids and ursodesoxycholic acid in diet for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48(9): 1265–1270
- Hu TE, Wang L, Zhang CX, *et al.* Effects of dietary bile acid supplementation on the growth, whole-body composition and apparent nutrient digestibility of bullfrog (*Rana Catesbeiana*). *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2015, 39(4): 677–685 [胡田恩, 王玲, 张春晓, 等. 饲料中添加胆汁酸对牛蛙生长性能、体组成和营养物质表观消化率的影响. *水生生物学报*, 2015, 39(4): 677–685]
- Huang BS, Li BS, Zhang LM, *et al.* Effects of dietary bile acid on growth performance, fatty enzymatic activities and biochemical indices of turbot *Scophthalmus maximus* L. juveniles. *Journal of Shanghai Ocean University*. 2015, 24(5): 737–744 [黄炳山, 李宝山, 张利民, 等. 胆汁酸对大菱鲆幼鱼生长、脂肪代谢酶及血清生化指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(5): 737–744]
- Lai YF. The clinical value of treatment of ursodeoxycholic acid to nonalcoholic fatty liver. *Journal of Qiqihar University of Medicine*, 2015, 36(7): 977–978 [赖悦丰. 熊去氧胆酸治疗非酒精性脂肪肝的临床价值分析. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015, 36(7): 977–978]
- Lin SM, Ye YT, Luo L. Effects of bile acid on growth of *Carassius auratus gibelio*. *Guangdong Feed*, 2003, 12(3): 14–15 [林仕梅, 叶元土, 罗莉. 胆汁酸添加剂对异育银鲫生长的影响. *广东饲料*, 2003, 12(3): 14–15]
- Liu JS, Yang YZ, Wang JR, *et al.* The advances in bile acid nutritional function and mechanism. *China Feed*, 2010(6):

- 35-37, 43 [刘敬盛, 杨玉芝, 王君荣, 等. 胆汁酸营养功能及作用机制的研究进展. 中国饲料, 2010(6): 35-37, 43
- Maita M, Tachiki, Kaibara A, *et al.* Pharmacological effect of ursodeoxycholic acid in juvenile eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1996, 62(1): 129-130
- Norlin M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Current Molecular Medicine*, 2007, 7(2): 199-218
- Shen X, Li PF, Li X, *et al.* The effect of cholic acid on the lipid mobilization of diet-reduced obesity model rats. *China Feed*, 2015(20): 14-17 [沈昕, 李培锋, 李欣, 等. 胆酸对大鼠脂肪代谢的影响. 中国饲料, 2015(20): 14-17
- Shun JZ, Wang JY, Ma JJ, *et al.* Effects of dietary bile acids on growth, body composition and lipid metabolism of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) at different lipid levels. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 617-625 [孙建珍, 王际英, 马晶晶, 等. 不同脂肪水平下添加胆汁酸对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长、体组成和脂肪代谢的影响. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 617-625]
- Tan YG, Wei WZ, Zeng DS, *et al.* Effect of bile acids growth performance in *Carassius auratus gibelio*. *Guangdong Feed*, 2008, 17(1): 25-26 [谭永刚, 魏志志, 曾党胜, 等. 饲料中添加胆汁酸对异育银鲫生长性能的影响. 广东饲料, 2008, 17(1): 25-26]
- Tang JY. The use of bile acid in animal nutrition. *Aquaculture Technical Advisor*, 2011(9): 47 [唐俊英. 胆汁酸在动物营养中的应用. 养殖技术顾问, 2011(9): 47]
- Tang J, Wang JQ, Zhang BT, *et al.* Metabolic and physiological function of bile acids. *Marine and Fisheries*, 2011(7): 65-66 [唐精, 王继强, 张宝彤, 等. 胆汁酸的代谢与生理功能. 海洋与渔业, 2011(7): 65-66]
- Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K. Bile acid and the membrane bile acid receptor TGR5-connecting nutrition and the metabolism. *Thyroid*, 2008, 18(2): 167-174
- Watanabe M, Houten SM, Matakaki C, *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 2006, 439(7075): 484-489
- Wu ZH, Han XM. Effects of bile acid compound emulsifier on performance and digestive enzymatic activities of broilers. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2008, 27(5): 1-4 [武中会, 韩向敏. 胆汁酸复合乳化剂对肉鸡生产性能及肠道消化酶活性的影响. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(5): 1-4]
- Xie ZG, Niu CJ. Effect of Kelikang on growth performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Feed Research*, 2002(10): 22, 25 [颀志刚, 牛翠娟. 可利康对虹鳟生长的影响. 饲料研究, 2002(10): 22, 25]
- Yang HB. Bile acid: The fat digestion accelerator. *Feed China*, 2008(11): 49-50 [杨汉博. 胆汁酸—脂肪消化促进剂. 饲料广角, 2008(11): 49-50]
- Ye YT, Cai CF, Xu F, *et al.* Feeding grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*) with oxidized fish oil up-regulates the gene expression in the cholesterol and bile acid synthesis pathway in intestinal mucosa. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 90-100 [叶元土, 蔡春芳, 许凡, 等. 灌喂氧化鱼油使草鱼肠道黏膜胆固醇胆汁酸合成基因通路表达上调. 水生生物学报, 2015, 39(1): 90-100]
- Zhai SW, Li J, Lu P, *et al.* Effect of different feed emulsifier on growth performance and intestinal digestive enzyme activity of tilapia. *Cereal and Feed Industry*, 2015, 12(15): 58-60 [翟少伟, 李剑, 陆鹏, 等. 不同饲用乳化剂对吉富罗非鱼生长性能和肠道消化酶活性的影响. 粮食与饲料工业, 2015, 12(15): 58-60]
- Zhang JC, Nie QH. Bile acid metabolism and related progress. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 17(11): 953-955 [张久聪, 聂青和. 胆汁酸代谢及相关进展. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(11): 953-955]
- Zhou SY, Liu YJ, Liang HO, *et al.* Effect of bile acids on growth and body composition of cobia (*Rachycentron canadum*). *South China Fisheries Science*, 2010, 6(4): 20-25 [周书耘, 刘永坚, 梁海鸥, 等. 饲料中添加胆汁酸对军曹鱼生长及体组成的影响. 南方水产, 2010, 6(4): 20-25]
- Zhou XC, Tang CW. Nerve of pancreatic secretion: Hormonal regulation. *Chinese Journal of Pancreatology*, 2002, 2(2): 113-115 [周旭春, 唐承薇. 胰液分泌的神经—激素调节. 胰腺病学, 2002, 2(2): 113-115]

Effects of Bile Acids on Growth Performance, Muscle Composition and Digestive Enzyme Activities of *Ctenopharyngodon idellus*

ZENG Benhe^{1,2}, LIAO Zengyan^{1#}, XIANG Xiao^{1①}, HE Wenxiao¹, CEN Min¹, HE Shancheng¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquaculture Science of Chongqing, Department of Fisheries in Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460;

2. Institute of Fisheries Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasa 850002)

Abstract This experiment was conducted to study the effects of dietary bile acids levels on growth, muscle composition and digestive enzyme activities of juvenile *Ctenopharyngodon idellus*. Five hundred and forty healthy fish, mean body weight of (13.11±0.58) g, were randomly selected and divided into six groups, with three replicates in each group (30 fish/replicate). Each group was fed a diet containing bile acids level of either 0 (control group), 75 mg/kg, 150 mg/kg, 225 mg/kg, 300 mg/kg and 375 mg/kg for a period of 60 days. The results showed that the increase of dietary bile acids levels resulted in an initial elevation of weight gain rate (WGR), specific growth rate (SGR) and followed by a decrease in WGR and SGR when bile acids was 375 mg/kg in the diet. Furthermore, inclusion of 300 mg/kg dietary bile acids produced the highest WGR and SGR (281.18% and 2.23%/d respectively). By contrast, coupled with the increase of dietary bile acids, the feed conversion ratio (FCR) decreased initially and then increased. The FCR reached the lowest (1.26) level when the dietary bile acids level was 225 mg/kg. Based on square regression analysis, to optimize each growth parameter: WGR, SGR and FCR during *C. idellus* juvenile growth, the most appropriate inclusion levels of dietary bile acids were 222.15 mg/kg, 265.00 mg/kg and 242.86 mg/kg respectively. The crude lipid of muscle during the experiment decreased initially and then leveled out, while the crude protein of muscle increased with the increase of dietary bile acids levels (0–300 mg/kg) and then decreased. Similarly, digestive enzyme activities of segments intestinal and hepatopancreas had a tendency of increasing with the elevated bile acids inclusion and then leveled out at the end. Results indicated that certain range of dietary bile acids levels could promote growth, fat metabolism, reduce fat deposition in muscle and improve meat quality. In conclusion, the bile acids supplementary level of 222.15–265.00 mg/kg is recommended for growing juvenile *C. idellus* based on the consideration of digestive enzyme activities, meat quality and growth performance.

Key words *Ctenopharyngodon idellus*; Bile acids; Growth performance; Muscle composition; Digestive enzyme activities

① Corresponding author: XIANG Xiao, E-mail: howlet@126.com

油酸诱导建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian) 肝细胞脂肪变性模型的建立*



杜金梁^{1,2} 曹丽萍^{1,2} 贾睿^{1,2} 王涛³ 顾郑琰³
张春云³ 骆仁军³ 徐跑^{1,2,3①} 殷国俊^{1,2,3①}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部鱼类免疫药理学国际联合实验室 无锡 214081;
3. 南京农业大学 无锡渔业学院 无锡 214081)

摘要 通过对油酸诱导时间及有效作用浓度的研究,建立油酸致建鲤肝细胞脂肪变性模型。本研究以胰蛋白酶消化法获得的原代肝细胞作为实验材料,加入不同浓度油酸(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L)与肝细胞共培养 24–48 h,诱导肝细胞脂肪变性,分别收集不同时间段的肝细胞及上清液,采用试剂盒测定肝细胞中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)的含量,同时测定上清培养液中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,MTT 法测定肝细胞的存活情况,确定油酸最佳诱导浓度,油红 O 染色法观察细胞内脂肪滴的形成情况。研究结果显示,0.4 mmol/L 油酸与肝细胞共培养 48 h,可以显著提高肝细胞内 TG、TC 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),极显著提高上清培养液中 GOT、GPT、LDH、 γ -GT 的活性,显著降低上清培养液中 SOD 的活性,但与 24 h 相比有升高趋势,0.4 mmol/L 油酸与肝细胞共培养 24 h,光镜下可见细胞内有脂肪滴形成,以 48 h 最明显。综上所述,油酸浓度 0.4 mmol/L、诱导时间 48 h 成功构建了肝细胞脂肪变性模型,为研究鱼类脂肪肝病奠定了基础。

关键词 建鲤;肝细胞脂肪变性;油酸

中图分类号 S942 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0107-07

近年来,鱼类脂肪肝的发病率呈不断扩大趋势。鱼类脂肪肝是养殖过程中的一种常见病,已知容易发生此病的鱼类有鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、罗非鱼(*Oreochromis* sp.)等(赵蕾等,2011)¹⁾,本病发病初期鱼类体色无明显变化,仅表现出食欲不振、生长速度缓慢等症状;一旦病情严重,鱼体色发黑、反应呆滞、昏迷翻转(彭勇鳌等,2007),如

果得不到及时治疗,病鱼往往不久便会死亡,对养殖户造成很大的损失。肝脏是鱼体内重要的代谢器官,肝脏如果发生病变或者损伤,常常导致机体抵抗力下降而易受传染病影响。关于鱼类脂肪肝的发病原因,有报道称其发病原因是由于营养不均衡造成肝脏脂类代谢发生障碍,导致甘油三酯在肝细胞内异常堆积(王菊花等,2008;李秀梅,2001);也有报道称是由于

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2015JBFM01) [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2015JBFM01)]. 杜金梁, E-mail: dujl@ffrc.cn

① 通讯作者: 徐跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn; 殷国俊, 研究员, E-mail: yingj@ffrc.cn

收稿日期: 2016-01-12, 收修改稿日期: 2016-04-07

1) Zhao L, Hou SL, Yang XL, et al. The research on fish hepatobiliary damage. Proceedings of the 2011 Annual Meeting of the Chinese Academy of Fisheries, 2011, 240–240 [赵蕾, 侯三玲, 杨先乐, 等. 鱼类肝胆损伤研究进展. 2011 年中国水产学会学术年会论文集, 2011, 240–240]

滥用抗生素或化学药物所致(向朝林, 2011)¹⁾。关于此病的防治, 在实践中虽然已经摸索出某些中药或者西药有一定效果(胡金城, 2004; 张盈娇等, 2009; 陈兴发; 2008²⁾; 李国春, 2015), 但还没有获得理想的保肝药物。

当前, 国内外关于脂肪肝疾病的研究涉及对象主要是人和哺乳动物(Xu *et al*, 2006), 而关于水产动物方面的报道还相对较少且主要为体内研究, 利用体外培养的鱼肝细胞进行研究则更少。虽然已有报道用氧化油脂成功制备草鱼脂肪肝细胞(肝细胞系 L8824)模型(秦洁, 2012)³⁾, 化学药物诱导青鳉鱼(*Oryzias latipes*)脂肪肝变性模型(Kuwashiro *et al*, 2011), 但未见用鲤鱼原代肝细胞来构建脂肪肝细胞变性模型的相关报道。

本研究主要采用建鲤(*Cyprinus carpio var. Jian*)原代肝细胞作为实验材料, 用油酸来构建肝细胞脂肪变性模型。肝细胞脂肪变性模型的成功构建, 可以大大缩短研发药物周期, 提高筛选药物效率, 为筛选治疗鱼类脂肪肝类药物奠定良好基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 实验用建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场, 健康, 无伤, 体重为 30 g 左右。取回后将建鲤饲养于循环水系统中, 暂养 7 d。

1.1.2 试剂和仪器 L15 培养基、油酸(二甲基亚砜为助溶剂, 终浓度不超过 0.1%)、PBS 溶液、链霉素/青霉素购自美国 Sigma 公司; 新生小牛血清(FCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 细胞培养板购自美国康宁公司; 谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 建鲤原代肝细胞的分离和培养 无菌条件

下于超净台内取建鲤肝脏, 用含双抗的 PBS 缓冲液进行漂洗, 修剪, 加入浓度为 0.125%的胰蛋白酶消化液, 27℃水浴条件下消化 10–15 min。过滤, 滤液用 PBS 缓冲液洗 3 次, 采用梯度离心法(离心转数分别为 1100、900 和 800 r/min)分别离心 5 min。离心结束后弃上清液, 用含有 10%新生小牛血清(FCS)的 L-15 培养基制成细胞悬液, 台盼蓝染色法进行细胞存活率检测, 计数结束后将细胞接种于 24 孔培养板中, 27℃条件下培养。

1.2.2 MTT 法确定油酸浓度 将肝细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 随机将其分为 6 个处理组, 每组设定 3 个重复, 将不同浓度油酸(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L)与肝细胞进行共培养 24 h、48 h。培养结束后, 每孔加 50 μ l 1 \times MTT 溶液, 孵育 4 h 后, 吸出上清液, 每孔加 150 μ l DMSO, 放在平板摇床上摇匀, 使甲臞颗粒充分溶解, 形成均匀的蓝紫色溶液。使用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔吸光度值。

细胞存活率(%)=(OD_{加药细胞}/OD_{对照细胞}) \times 100

1.2.3 油酸诱导肝细胞脂肪变性模型的建立 将肝细胞接种于 24 孔培养板中培养 24 h 后进行后续实验操作, 设空白对照组和模型组, 每组设定 4 个重复, 接种密度为 1 \times 10⁶/ml。空白对照组仅加入含有 10%新生小牛血清(FCS)的 L-15 培养基, 模型组中分别用含 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L 的油酸与肝细胞共培养 24 h、48 h。培养结束后, 收集上层培养液及肝细胞, 于-20℃保存待用。

1.2.4 油红 O 染色法观察肝细胞内脂肪滴的沉积情况 将培养 24 h 和 48 h 的肝细胞爬片取出, 用 PBS 进行清洗, 然后采用 4%的多聚甲醛固定 30 min。肝细胞染色操作参照南京建成科技有限公司油红 O 染液说明书。脂肪变性细胞结果判定以细胞质内出现脂肪滴为准。

1.2.5 肝细胞及培养液中生化指标的测定 GOT、GPT、TG、TC、 γ -GT 等的测定参照试剂盒说明书。

1) Xiang CL. A grass carp thioacetamide liver injury model establishment and its application research. Master's Thesis of Soochow University, 2011, 4–27 [向朝林. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)硫代乙酰胺肝损伤实验模型建立及其应用研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2011, 4–27]

2) Chen XF. Study on the effect of curcumin on growth, antioxidation and lipid metabolism of Tilapia. Master's Thesis of South China Agricultural University, 2008, 7–30 [陈兴发. 姜黄素对罗非鱼生长、抗氧化及脂类代谢的影响. 华南农业大学硕士研究生学位论文, 2008, 7–30]

3) Qin J. The effect of oxidized oil on primary culture of hepatocytes from *Ctenopharyngodon idellu*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012, 27–32 [秦洁. 氧化油脂对草鱼肝细胞损伤机制的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 27–32]

1.2.6 统计学处理 实验数据采用SPSS 16.0软件进行分析处理,各药物处理组与空白对照组之间采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行显著性分析,结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 结果

2.1 建鲤原代肝细胞的形态学观察

采用胰蛋白酶消化液分离培养的肝细胞生长状态良好,细胞存活率在90%以上,可用于后续实验。通过显微镜观察发现,刚分离的原代肝细胞呈透明圆球状(图1-A),接种4 h后开始贴壁,培养24 h后,多数细胞已经贴壁,肝细胞相互粘连,呈岛屿状连接(图1-B),有个别细胞出现了伸展变形,活力较差的肝细胞由于没有贴壁而呈悬浮状态。

2.2 油酸对建鲤肝细胞存活率的影响

由图2可以看出,油酸与肝细胞共培养24 h和48 h后,各浓度处理组的肝细胞存活率呈一定下降趋势,2个时间段0.8 mmol/L油酸均显著降低了肝细胞的存活率($P < 0.01$),对肝细胞造成较严重损伤,0.4 mmol/L及以下浓度油酸培养肝细胞24–48 h对细胞的活性无显著影响。

2.3 油酸对建鲤肝细胞上清培养液中 GOT、GPT、LDH 活性的影响

由图3可知,加入不同浓度的油酸与肝细胞共培养24 h和48 h后发现,0.2、0.4、0.8 mmol/L的油酸可以不同程度升高肝细胞中GOT、GPT、LDH的活性,与空白对照组相比,差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,随着培养时间的延长,肝细胞内GOT、GPT两种酶的释放量增加比较明显。

2.4 油酸对建鲤肝细胞中 TG、TC 含量的影响

由图4可以看出,与空白对照组相比,0.4、0.8 mmol/L油酸可以诱导肝细胞内TG、TC含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着时间延长,其含量水平增加越明显。

2.5 油酸对建鲤肝细胞上清培养液中 γ -GT 活力的影响

由图5可以看出,油酸与肝细胞共培养24 h后,肝细胞中 γ -GT活力无显著变化,共培养48 h后,0.4、0.8 mmol/L油酸诱导肝细胞内 γ -GT活力显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 油酸对建鲤肝细胞上清培养液中 SOD 活力的影响

由图6可以看出,油酸与肝细胞共培养24 h后,各药物处理浓度肝细胞内SOD活力明显下降,与空白对照组相比,差异极显著($P < 0.01$)。共培养48 h后发现,0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L油酸可以显著降低肝细胞的抗氧化能力($P < 0.05$)。

2.7 建鲤肝细胞内脂肪的蓄积情况

油红O染色后显微镜下观察肝细胞内脂肪的蓄积情况发现,空白对照组的细胞边缘整齐,细胞核清晰可见,细胞核大且呈蓝色,细胞内可见少量脂肪滴(图7-A)。0.4 mmol/L油酸处理肝细胞24 h后,与空白对照组相比,细胞边缘以及细胞核稍显不清晰,细胞内出现较大红色脂肪滴,脂肪变性细胞明显比空白对照组多(图7-B);0.4 mmol/L油酸处理肝细胞48 h后,细胞内堆积了大量脂肪滴,部分脂肪滴出现融合现象,此时间段脂肪变性细胞最多(图7-C)。

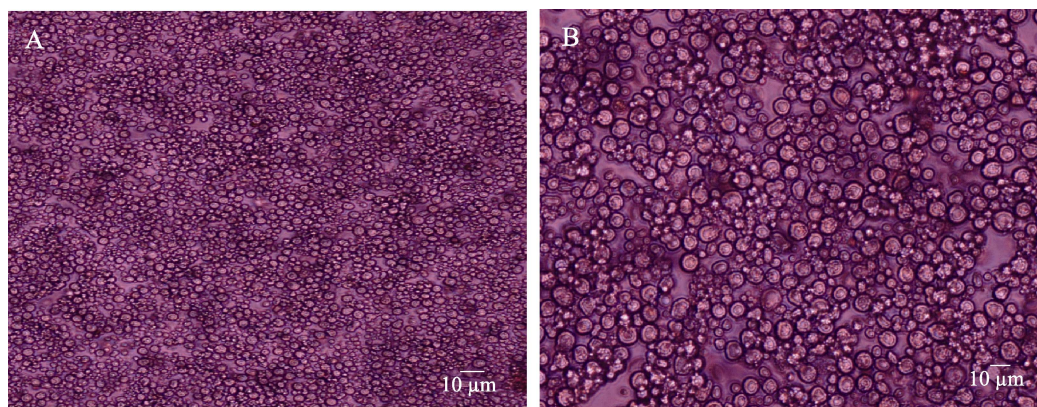


图1 建鲤肝细胞形态

Fig.1 Morphology of hepatocytes of *C. carpio* var. Jian

A: 4 h, $\times 100$; B: 24 h, $\times 200$

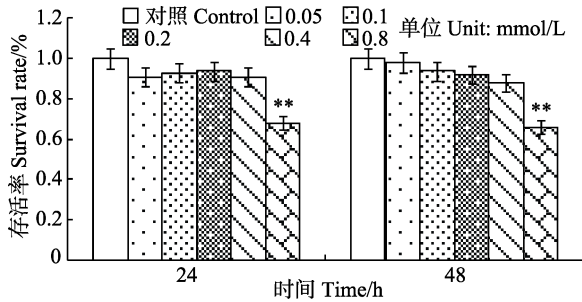


图2 油酸对建鲤肝细胞存活率的影响

Fig.2 Changes in the survival rate of the hepatocytes of *C. carpio* var. Jian induced by oleic acid

与空白对照组相比较, *为 $P < 0.05$; **为 $P < 0.01$, 下同
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, compared to the control group, the same as below

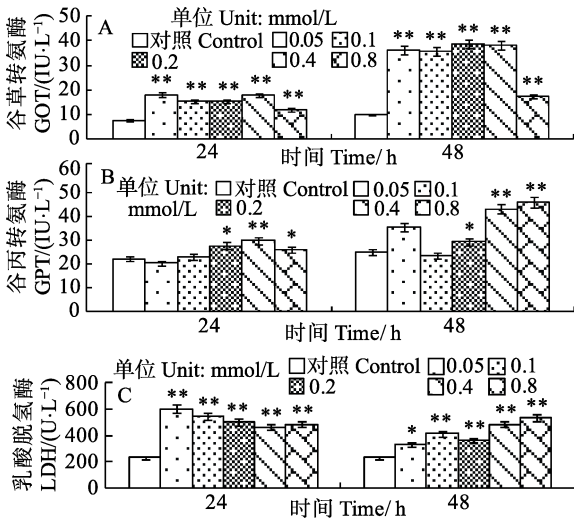


图3 油酸对建鲤肝细胞上清液中 GOT(A)、GPT(B)和 LDH(C)活性的影响

Fig.3 The changes in activities of GOT(A), GPT(B), and LDH(C) in the supernatant of the hepatocytes of *C. carpio* var. Jian induced by oleic acid

3 分析与讨论

鱼类脂肪肝是一种养殖过程常见的营养性疾病(张水波, 2011)。鱼类所摄取的脂肪主要存储于肝脏内, 容易造成脂肪在鱼体内聚集, 形成脂肪肝疾病。为了缓解脂肪肝疾病给水产养殖业造成的影响, 急需研发能够预防和治疗脂肪肝疾病的药物。研究人员对脂肪肝类疾病进行了大量研究, 但关于脂肪肝类疾病的具体发病机制还未探明(邱德凯, 2001)。目前, 在学术界普遍认可的理论是“二次打击学说”, 该学说认为氧化应激反应在对肝脏损伤的过程中起到了关键作用, 加剧了脂肪肝类疾病的发生(董姝等, 2012; 刘树军等, 2007)。本研究利用分离的原代肝细胞作为实验材料来构建脂肪肝细胞损伤模型, 可以更好地模拟在体鱼类肝组织损伤, 同时也可以在很大程度上缩短筛选

保肝药物的研发周期。已有研究报道称, 酒精、化学药物、脂肪乳等成功构建了脂肪肝细胞变性模型(杨林辉等, 2007; 张红锋等, 2002; 廖于等, 2010)。

本研究设置不同浓度油酸与建鲤肝细胞共培养24-48 h, 诱导建鲤肝细胞发生变性。利用油酸来构建脂肪肝细胞变性模型, 符合非酒精性脂肪肝的病理过程, 为深入研究非酒精性脂肪肝的发病机制研究提供了良好的技术手段(刘江等, 2009)。GOT、GPT 是临床上常被用来判定肝脏是否正常的经典指标, 在肝炎、脂肪肝等疾病测定时常常会发现, 这2种转氨酶的活性升高, 并以此作为肝脏功能异常的依据(李彦娜, 2015; 颜宏华, 2015)。在本研究中, 随着油酸浓度的不断提高以及作用时间的延长, 与空白对照相比, GOT、GPT 两种酶的活性显著升高($P < 0.01$), 这说明在一定程度上油酸对肝细胞造成了损伤, 致使细胞膜通透性增加, 使得肝细胞内的酶类物质从细胞内释放出来, 从而使这2种酶的活性增加。

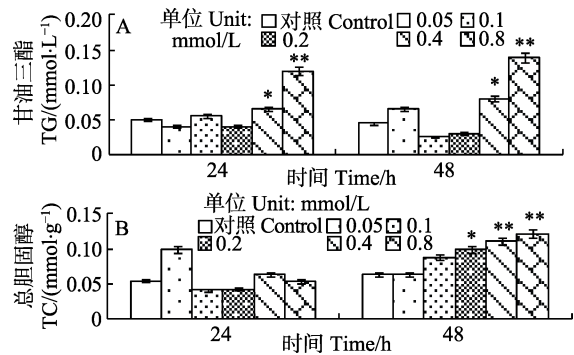


图4 油酸对建鲤肝细胞中 TG(A)、TC(B)含量的影响
Fig.4 The changes in contents of TG(A), and TC(B) in the hepatocytes of *C. carpio* var. Jian induced by oleic acid

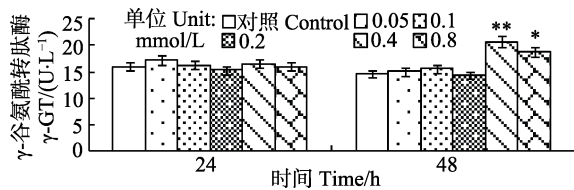


图5 油酸对建鲤肝细胞上清液中 γ -GT 活性的影响
Fig.5 The changes in activity of γ -GT in the supernatant of *C. carpio* var. Jian hepatocytes induced by oleic acid

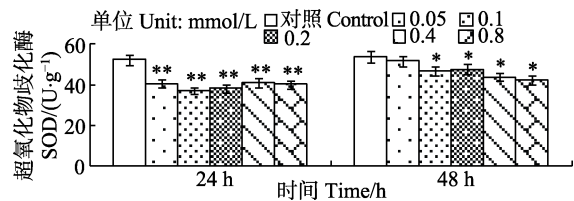


图6 油酸对建鲤肝细胞上清液中 SOD 活性的影响
Fig.6 The changes in SOD activity in the supernatant of Jian Carp hepatocytes induced by oleic acid

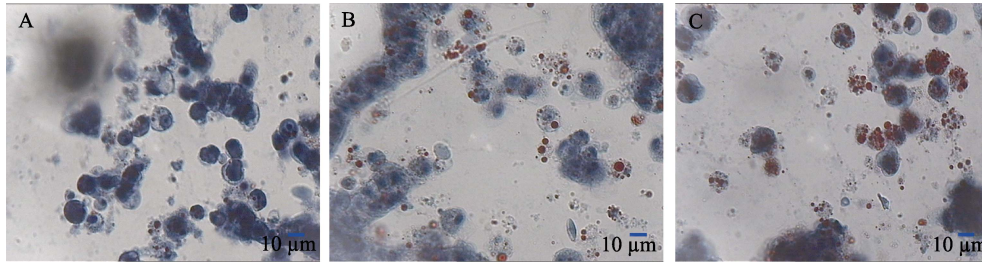


图 7 油红 O 染色后建鲤的肝细胞形态 ($\times 400$)

Fig.7 Morphological changes and lipid accumulation in *C. carpio* var. Jian hepatocytes after Oil Red O staining ($\times 400$)

A: 空白对照组; B: 0.4 mmol/L 油酸诱导 24 h; C: 0.4 mmol/L 油酸诱导 48 h

A: Negative control; B: Treated with 0.4 mmol/L oleic acid for 24 h; C: Treated with 0.4 mmol/L oleic acid for 48 h

γ -谷氨酰转移酶(γ -GT)是一种主要分布于肾、肝、胰等脏器的肽转移酶,临床上常被用作肝脏疾病检测辅助指标。孙琳等(2014)认为, γ -GT与肝脏疾病存在一定关联,能够反映肝脏炎症及纤维化情况,当肝脏出现异常时, γ -GT活力值会升高。本研究中,0.4、0.8 mmol/L油酸与肝细胞共培养 48 h后, γ -GT活力明显升高,这是由于油酸破坏了肝细胞内的酶系统,引发了代谢障碍,导致了肝细胞变性,致使其活性升高,本结果与李瑞芳(2015)的实验结果类似。

乳酸脱氢酶(LDH)是一种广泛存在于肝、肾等组织中的糖酵解酶,是肝功能检查中的一项重要指标,肝脏等组织受到损伤可引起其活性升高(Jia *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015)。LDH共有 5 种同工酶,而与肝功能有关联的同工酶主要是 LDH4 和 LDH5,当肝细胞受损伤时,肝细胞就会释放大量的 LDH4 和 LDH5,使得 LDH5 与 LDH4 比值变大,临床上常常把二者比值大于 1 作为肝损伤的信号指标。本研究中,各浓度 LDH 活性在 24 h 和 48 h 两个时间段,均表现出活性显著升高,表明油酸对肝细胞造成了较明显损伤,使得 LDH 催化丙酮酸与 L-乳酸之间的还原与氧化反应出现了紊乱。

肝脏是动物体内重要的代谢器官,机体发生脂肪肝疾病主要是肝脏的脂肪代谢能力出现异常,造成肝脏内甘油三酯(TG)在肝细胞内过多蓄积(张海苗等, 2015)。总胆固醇(TC)包括游离胆固醇和胆固醇酯,是构成细胞膜的主要成分,可用作脂代谢指标,当胆固醇的酯化发生障碍时,就会造成肝脏合成胆固醇的能力增强,发生肝损伤后,主要是造成游离胆固醇含量升高(Dixon *et al.*, 2004; Tainaka *et al.*, 2011)。本研究中,0.4、0.8 mmol/L油酸可以显著增加肝细胞中 TG、TC 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明油酸对肝细胞造成了较为严重的损伤。卢荣华等(2015)利用脂肪乳构

建草鱼肝细胞脂肪变性研究也发现,脂肪乳明显造成肝细胞内甘油三酯的升高。

当机体发生脂肪肝疾病时,机体抗氧化系统就会出现失衡状态,导致大量氧自由基的产生。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗氧化酶,SOD可以清除体内过多的氧自由基,保护组织免受氧自由基的侵害(Hammes *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2008)。本研究中,油酸各浓度处理组与肝细胞共培养 24 h后,SOD活性显著降低($P < 0.01$),这说明一定浓度油酸诱导肝细胞损伤,而在油酸作用 48 h后,SOD活性有所恢复,说明机体自身也在不断抵抗氧自由基给肝细胞带来的损害,努力使抗氧化系统恢复正常。

4 结论

本研究利用油酸成功建立了建鲤肝细胞脂肪变性模型,且油酸浓度在 0.4 mmol/L、作用时间为 48 h 构建效果最好。本实验模型的成功建立,可以较好地模拟鱼类脂肪肝的特征,为后期筛选保肝类药物提供了很好的技术手段,对于深入研究鱼类脂肪肝的发病机制也具有重要意义。

参 考 文 献

- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1647-1654
- Dong S, Liu P, Sun MY, *et al.* Role of "two-hit" in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Hepatology*, 2012, 28(7): 551-555 [董姝, 刘平, 孙明瑜, 等. 非酒精性脂肪肝发病机制—“二次打击”学说研究进展. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(7): 551-555]
- Du ZY, Clouet P, Degrace P, *et al.* Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(6): 1200-1212

- Gupta V, Mah XJ, Garcia MC, *et al.* Oily fish, coffee and walnuts: Dietary treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(37): 10621–10635
- Hammes TO, Pedrosa GL, Hartmann CR, *et al.* The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(3): 675–682
- Hu JC. The prevention and control of factory farming *Trachinotus ovatus* of fatty liver disease. *Scientific Fish Farming*, 2004(1): 42 [胡金城. 工厂化养殖卵形鲳鲹脂肪肝病的防治. *科学养鱼*, 2004(1): 42]
- Jia R, Cao LP, Du JL, *et al.* Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 2014, 152: 11–19
- Kuwashiro S, Terai S, Toshiyuki O, *et al.* Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell and Tissue Research*, 2011, 344: 125–134
- Li GC. Protective effects of *Penthorum chinense* extract in the treatment of alcoholic fatty liver in Rats. *Chinese Journal of Gerontology*, 2015(14): 3845–3846, 3847 [李国春. 赶黄草对大鼠酒精性脂肪肝的保护作用及机制. *中国老年学杂志*, 2015(14): 3845–3846, 3847]
- Li RF. The serum AST/ALT ratio, gamma GT, ALP and AFP combined detection for the diagnosis value of primary hepatic carcinoma. *Proceeding of Clinical Medicine*, 2015(10): 757–758, 792 [李瑞芳. 血清 AST/ALT 比值、 γ -GT、ALP 及 AFP 联合检测对原发性肝癌的诊断价值. *临床医药实践*, 2015(10): 757–758, 792]
- Li XM. Causes of fatty liver in fish and its control measure. *Animal Science & Veterinary Medicine*, 2001, 18(6): 57 [李秀梅. 鱼类脂肪肝病因及防治. *动物科学与动物医学*, 2001, 18(6): 57]
- Li YN. Liver function and serum indexes inspection in the diagnosis of fatty liver. *China Rural Health*, 2015(20): 48 [李彦娜. 肝功与血清学指标水平检验在脂肪肝诊断中的应用探讨. *中国农村卫生*, 2015(20): 48]
- Liao Y, Li LH, Zuo GQ, *et al.* Establishment and identification of alcohol induced steatotic hepatocytes model. *Chongqing Medicine*, 2010, 39(8): 902–904 [廖于, 李龙辉, 左国庆, 等. 体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的建立、鉴定及机制探讨. *重庆医学*, 2010, 39(8): 902–904]
- Liu J, Li YM, Chen SH, *et al.* An *in vitro* hepatic steatosis cell model for study of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2009, 38(6): 626–629 [刘江, 厉有名, 陈韶华, 等. 一种实用的体外非酒精性脂肪肝细胞模型. *浙江大学学报(医学版)*, 2009, 38(6): 626–629]
- Liu SJ, Huang JJ, Che NC, *et al.* Research advances on mechanism of nonalcohol fatty liver. *Journal of Capital Medical University*, 2007, 28(2): 216–219 [刘树军, 黄静娟, 车念聪, 等. 非乙醇性脂肪肝病发病机制研究进展. *首都医科大学学报*, 2007, 28(2): 216–219]
- Lu RH, Liang XF, Sun JJ, *et al.* Establishment of a model of grass carp hepatocyte steatosis and analysis of lipid metabolism gene expression. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015(1): 24–32 [卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析. *中国水产科学*, 2015(1): 24–32]
- Peng YA, He YG. Liver disease symptoms and prevention of fish diseases. *Ocean and Fishery*, 2007(2): 36 [彭勇鳌, 何有根. 鱼类疾病中肝脏病变症状与防治. *海洋与渔业*, 2007(2): 36]
- Qiu DK. Research progress of fatty liver. *Contemporary Medicine*, 2001, 7(5): 23–26 [邱德凯. 脂肪肝研究进展. *当代医学*, 2001, 7(5): 23–26]
- Sun L, Liu QY, Pei B, *et al.* The preliminary discussion of changes of serum γ -GT level in patients with chronic hepatitis B and early liver cirrhosis. *Chinese Hepatology*, 2014(7): 511–512, 524 [孙琳, 刘沁毅, 裴彬, 等. 慢性乙型肝炎及早期肝硬化患者血清谷氨酰转肽酶活性变化的初步探讨. *肝脏*, 2014(7): 511–512, 524]
- Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, *et al.* Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutrition & Metabolism*, 2011, 8(1): 1926–1932
- Wang JH, Xue M, Ding JZ, *et al.* Research progress of fish nutritional fatty liver. *Feed Industry*, 2008, 29(4): 34–37 [王菊花, 薛敏, 丁建中, 等. 鱼类营养性脂肪肝的研究进展. *饲料工业*, 2008, 29(4): 34–37]
- Xu P, Zhang XG, Li YM, *et al.* Research on the protection effect of pioglitazone for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2006, 7(8): 627–633
- Yan HH. Application of liver function and serum index level test in the diagnosis of fatty liver. *Medical Information*, 2015(31): 213 [颜宏华. 肝功与血清学指标水平检验在脂肪肝诊断中的应用. *医学信息*, 2015(31): 213]
- Yang LH, Chen DF. Establishment of hepatocyte steatosis models induced by oleic acid. *Chongqing Medicine*, 2007, 36(8): 698–700 [杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立. *重庆医学*, 2007, 36(8): 698–700]
- Zhang HF, Yang HP, Wang YF, *et al.* Fatty liver models on cellular level *in vitro* induced by ethanol and palmitic acid. *Journal of East China Normal University(Natural Science)*, 2002(4): 88–95 [张红锋, 杨慧萍, 王耀发, 等. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2002(4): 88–95]
- Zhang HM, Gao YM. Clinical study on the relationship between fatty liver and blood lipid. *For All Health*, 2015(2): 343 [张海苗, 高玉梅. 脂肪肝与血糖血脂的相关性临床研究. *大家健康*, 2015(2): 343]
- Zhang SB. Causes of fatty liver in fish and its control measure.

China Fisheries, 2011(2): 55 [张水波. 鱼类脂肪肝的成因及防治对策. 中国水产, 2011(2): 55]
Zhang YJ, Zhu Y, Wang J, *et al.* The combination of Chinese and Western medicine prevention and treatment of fish liver and

gallbladder disease in summer. Modern Agricultural Science and Technology, 2009(20): 336, 339 [张盈娇, 朱宇, 王娟, 等. 中西药结合防治养殖鱼类夏季肝胆疾病. 现代农业科技, 2009(20): 336, 339]

(编辑 冯小花)

Oleic Acid Induced Hepatocyte Steatosis Model in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)

DU Jinliang^{1,2}, CAO Liping^{1,2}, JIA Rui^{1,2}, WANG Tao³, GU Zhengyan³,
ZHANG Chunyun³, LUO Renjun³, XU Pao^{1,2,3①}, YIN Guojun^{1,2,3①}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

2. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081)

Abstract Fatty liver was a common disease in aquaculture. In recent years, the occurrence of fatty liver in fish has significantly increased, but the mechanism of this disease remains unclear. Most researches have focused on the pathogenesis of the disease, while little is known at the cellular level. In this study, we used primary hepatocyte culture of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) as the experimental material, and induced the hepatocyte injury by optimal exposure (dose and time) to oleic acid. The hepatocytes of Jian Carp were isolated and purified with trypsin digestion and then were cultured in a medium. To identify the proper concentration of oleic acid, the hepatocytes were treated with a gradient of concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L) for 24–48 h, and the supernatants and hepatocytes were then collected at different time points. We measured the contents of multiple biochemical parameters in the collected samples, including triglyceride (TG) and the total cholesterol (TC), as well as the activities of enzymes such as alanine aminotransferase (GPT), aspartate aminotransferase (GOT), γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), lactate dehydrogenase (LDH), and superoxide dismutase (SOD). We also determined the survival rate of hepatocytes using the MTT method. Lipid droplets in the cells were observed using the oil red staining method. Our results suggested that the cultured hepatocytes grew properly with a normal morphology, and that the hepatocytes could be used for the study of lipid metabolism. After the oleic acid treatment at different concentrations of oleic acid for 24–48 h, we found that the exposure to 0.4 mmol/L oleic acid for 48 h significantly elevated the levels of GOT, GPT, LDH, TG, TC, and γ -GT, but reduced the activity of SOD ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Lipid droplets were detected in the hepatocytes under light microscope after the treating with 0.4 mmol/L oleic acid for 24–48 h. The biochemical indices described above indicated that 0.4 mmol/L oleic acid and 48 hours could be the optimal conditions to induce hepatocyte steatosis in cultured hepatocytes. Therefore, in this study we successfully established a hepatocyte steatosis model that will be a useful tool in the future study of fatty liver disease in fish.

Key words Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian); Hepatocyte steatosis; Oleic acid

① Corresponding author: XU Pao, E-mail: xup@ffrc.cn; YIN Guojun, E-mail: yingj@ffrc.cn

投喂水平对黄鳝(*Monopterus albus*)生长、肠道 消化酶活性及部分血清生理生化指标的影响*

陈云飞^{1,2} 彭慧珍^{1,2†} 刘庄鹏^{1,2} 胡毅^{1,2①}
吕怡航³ 李昭林^{1,2} 张德洪³



(1. 湖南农业大学 湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心 长沙 410128;
2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心 常德 415000; 3. 通威股份有限公司 成都 610041)

摘要 为探究不同投喂水平对黄鳝(*Monopterus albus*)生长、肠道消化酶活性及血清生理生化指标的影响,分别以初始体重为(68.85±0.44) g和(26.67±0.17) g的2种规格黄鳝为研究对象,大规格按照体重的2.8%、3.6%、4.4%和5.2%投喂;小规格按照体重的3.0%、4.0%、5.0%、6.0%和7.0%投喂;每个处理组设置3个重复,大规格组50尾/箱,小规格组100尾/箱,实验持续56 d。实验结果显示,随着投喂水平的增加,2种规格黄鳝增重率、饲料系数、肝体比以及全鱼脂肪含量都显著升高($P<0.05$),但全鱼蛋白含量呈下降趋势。大规格黄鳝在投喂水平为4.4%和5.2%时增重率达到最高水平,且组间差异不显著($P>0.05$);大规格黄鳝肠道脂肪酶和胰蛋白酶活性随投喂水平的增加而显著升高($P<0.05$);大规格黄鳝血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、总胆固醇(TC)含量先升后降,血清甘油三脂(TG)含量呈上升趋势;大规格黄鳝在投喂水平为4.4%时,SOD和溶菌酶(LZM)活性达到组间较高水平。随着投喂水平的增加,小规格黄鳝肠道胰蛋白酶活性显著升高($P<0.05$);血清TG、TC含量升高,SOD活性降低,血糖含量呈先升后降趋势。在投喂水平为6%时,小规格黄鳝的SOD和LZM活性均处在较高水平。本研究表明,当大规格黄鳝投喂水平为4.4%、小规格黄鳝投喂水平为5%–6%时,黄鳝的生长性能达到较佳状态。

关键词 黄鳝;投喂水平;生长;肠道消化酶;血清生理生化指标

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0114-07

饲料投喂水平对养殖动物的生长性能会造成显著影响(覃希,2014)¹⁾,适宜的投喂水平可以增强鱼类的生长性能,也可提高幼鱼的成活率;但投喂过量可能会适得其反,当鱼类摄食的能量满足生长所需后,

多余的能量将会以脂肪的形式储存起来,与此同时,用于代谢和排泄的能量增加,这就导致饲料利用效率降低,影响了养殖鱼类的品质;当投喂水平过高时甚至可能会引起养殖环境恶化,导致养殖鱼类暴发疾病。

* 国家自然科学基金项目(31572626)和湖南省教育厅优秀青年项目(14B089)资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31572626) and Excellent Youth Foundation of Hunan Education Committee (No.14B089)]. 陈云飞, E-mail: cyfei0813@163.com

†同等贡献作者

① 通讯作者: 胡毅, 教授, E-mail: huyi740322@163.com

收稿日期: 2016-07-29, 收修改稿日期: 2016-09-14

1) Qin X. The effects of feeding frequency and feeding level on growth performance and physiological function of juvenile GIFT, *Oreochromis niloticus*. Master's Thesis of Guangxi University, 2014 [覃希. 投喂频率和投喂水平对吉富罗非鱼幼鱼生长性能和生理机能的影响. 广西大学硕士研究生学位论文, 2014]

黄鳝(*Monopterus albus*)是我国特有淡水养殖经济鱼类之一,因其肉质细嫩、味道鲜美,深受广大消费者的喜爱。近年来,黄鳝养殖发展迅速,但养殖过程中发现,当投喂量不足或过量的时候,黄鳝疾病暴发率增加,同时越冬后死亡率增加,严重限制了黄鳝规模化养殖的发展进程。目前,黄鳝饲料营养在蛋白源、脂肪源以及维生素等方面研究较多(潘望城等, 2013; 周秋白等, 2011; 黎德兵等, 2015),而有关投喂水平对黄鳝的影响研究鲜有报道。本研究以2种规格黄鳝为实验对象,研究不同投喂水平对黄鳝生长、肠道消化酶和部分血清生理生化指标的影响,探究2种规格黄鳝的适宜投喂水平,为黄鳝养殖过程中合理的饲料投喂提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用黄鳝购于常德西湖春晓黄鳝养殖厂,以1.5 m×2.0 m×1.5 m的无结节聚乙烯网箱为养殖箱,网箱内种植水花生,覆盖网箱水面90%以上。实验用饲料为商品饲料和鱼浆按1:1比例拌匀;所用商品饲料“黄鳝配合饲料2号”购于嘉康生物技术有限公司,粗蛋白含量为43%,粗脂肪含量为3%,钙含量为4.5%。养殖实验于2014年8月20日-10月20日在湖南省常德市西湖管理区进行,水温为(28.0±3.4)℃,溶氧量为(6.4±0.6) mg/L, pH为7.3±0.4,氨氮浓度在0.1-0.3 mg/L之间,亚硝酸盐低于0.1 mg/L。

1.2 饲养与管理

黄鳝放养前先进行驯食,直至养殖黄鳝全部摄食实验饲料后开始实验。挑选规格均匀、体格健壮的大[(68.85±0.44) g]、小[(26.67±0.17) g]的2种规格黄鳝为养殖对象,按投喂量不同分别设置4个和5个处理组,大规格黄鳝分别按体重的2.8%、3.6%、4.4%和5.2%投喂,小规格黄鳝分别按体重的3.0%、4.0%、5.0%、6.0%和7.0%投喂,每个处理组设3个平行。大规格黄鳝每个网箱放养50尾,小规格每个网箱放养100尾,日投喂1次(17:00-18:00),养殖周期为56 d。

1.3 样品采集与指标测定

1.3.1 样品采集 养殖实验结束后,停食24 h后进行称重采样。记录每个网箱黄鳝总数量和总重量,用于计算饵料系数(FCR)、成活率(SR)和增重率(WGR);每个网箱随机取10尾黄鳝进行尾静脉抽血,血液混合后置于10 ml 无菌离心管中,4℃静置过夜后,3500 r/min 离心15 min,取上清液分装,置于-80℃

冰箱保存,用于血清指标的测定。抽完血的黄鳝立即于冰上进行解剖,迅速取全肠,去除肠道附着物和粪便,用生理盐水清洗后,用滤纸擦干水分,分装于10 ml 离心管中,置于-80℃冰箱保存,用于消化酶的测定。另外,分别称取空壳重和肝重,用于计算肝体比(HSI)和脏体比(VSI)。随机从每箱中挑选5尾黄鳝,于-20℃保存全鱼,用于体成分的测定。

1.3.2 生长指标的计算 饵料系数(FCR)、成活率(SR)、增重率(WGR)、肝体比(HSI)和脏体比(VSI)计算公式如下:

$$\begin{aligned} SR(\%) &= 100 \times N_t / N_0 \\ WGR(\%) &= 100 \times (W_t - W_0) / W_0 \\ FCR &= W_f / (W_n - W_m) \\ HSI(\%) &= 100 \times W_h / W_q \\ VSI(\%) &= 100 \times W_v / W_q \end{aligned}$$

式中, W_0 为黄鳝平均初始体重(g), W_t 为黄鳝平均末体重(g), W_f 为投喂总量(g), W_q 为全鱼重(g), W_n 为终末总重, W_m 为初始总重, W_h 为肝脏重(g), W_v 为内脏重(g), N_0 为实验鱼初始尾数, N_t 为实验鱼终末尾数。

1.3.3 全鱼体成分的测定 实验鱼体的常规指标的分析方法参考 AOAC (Association of Official Analytical Chemists)。将实验全鱼于105℃恒温烘箱中烘干,检测其水分含量,样品中粗蛋白质含量采用凯氏定氮法测定;样品中粗脂肪含量采用索氏抽提法分析;样品中灰分含量采用马福炉550℃灼烧法进行分析。

1.3.4 肠道消化酶活性和血清指标的测定 以下试剂盒均购自南京建成科技有限公司,按说明书要求进行样品处理和指标测定。测定试剂盒: 肠道胰蛋白酶(PRS)(A080-2)、 α -淀粉酶(AMS)(C016-1)、脂肪酶(LPS)(A054); 血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)(A001-1)、溶菌酶(LZM)(A050-1)、甘油三酯(TG)(A110-1)、总胆固醇(TC)(A111-1)、血清葡萄糖(GLU)(F006)。

1.4 数据统计与分析

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,数据分析采用软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA),用 Duncan's 多重比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 不同投喂水平对黄鳝生长的影响

投喂水平对黄鳝生长的影响见表1。当投喂水平增加时,2种规格黄鳝的增重率、饵料系数、终末均

重都显著升高($P<0.05$)。大规格黄鳢在投喂水平为4.0%、5.0%时,增重率无显著差异($P<0.05$);小规格黄鳢的增重率、饵料系数、终末均重在投喂水平为7.0%时都达到最高,显著高于其他各投喂组;大规格黄鳢在投喂水平为5.2%时,肝体比和脏体比都高于其他各组;小规格黄鳢肝体比和脏体比随投喂水平增加呈升高趋势,且都在6.0%投喂水平时达到最高值。

2.2 不同投喂水平对黄鳢体成分的影响

投喂水平对黄鳢体成分影响见表2。投喂水平对2种规格黄鳢的全鱼水分、粗灰分都未造成显著影响($P>0.05$)。大规格黄鳢粗脂肪含量随投喂水平的增加先升后降,在投喂水平为5.2%时,粗脂肪含量显著低于其他组($P<0.05$);小规格黄鳢粗脂肪含量随投喂水平增加呈升高趋势,但组间差异不显著($P>0.05$);2种规格黄鳢粗蛋白含量随投喂水平的升高呈下降趋势,且都在投喂水平最低时,粗蛋白含量显著高于其他投喂水平组($P<0.05$)。

2.3 投喂水平对黄鳢肠道消化酶的影响

投喂水平对黄鳢肠道消化酶影响如表3所示,不同投喂水平对2种规格黄鳢肠道淀粉酶活性未造成显著影响,但显著影响脂肪酶和蛋白酶活性。大规格黄鳢脂肪酶活性随投喂水平的增加有增强趋势,且在投喂水平为4.4%、5.2%(两组间差异不显著 $P>0.05$)时显著高于其他组($P<0.05$);投喂水平未对小规格黄鳢脂肪酶活性造成显著性影响($P>0.05$)。2种规格黄鳢肠道蛋白酶活性随投喂水平增加呈升高趋势,且分别在投喂水平为5.2%和7.0%时达到最高,显著高于其他投喂组($P<0.05$)。

2.4 投喂水平对黄鳢部分血清生理生化指标的影响

由表4可知,大规格黄鳢血清SOD活性在投喂水平为2.8%和5.2%时显著低于其他投喂组($P<0.05$),小规格黄鳢血清SOD活性在投喂水平为7.0%时显著低于其他各组,且在投喂水平小于7%时各组间SOD活性差异不显著($P>0.05$)。

表1 不同投喂水平对黄鳢生长的影响

Tab.1 Effects of different feeding levels on the growth of *M. albus*

规格 Size	投喂水平 Feeding level(%)	初始均重 IBW(g)	终末均重 FBW(g)	增重率 WGR(%)	饵料系数 FCR	成活率 SR(%)	肝体比 HIS(%)	脏体比 VSI(%)
大规格 Big size	2.8	68.94±0.87	132.3±0.7 ^b	90.8±1.3 ^c	1.92±0.04 ^d	85.3±3.1 ^c	6.39±0.26 ^b	15.93±0.75
	3.6	68.66±0.25	133.7±2.5 ^b	96.6±2.0 ^b	2.17±0.04 ^c	100.0±0.0 ^a	6.81±0.34 ^{ab}	16.04±0.76
	4.4	69.08±0.28	139.37±4.2 ^a	104.9±2.0 ^a	2.50±0.00 ^b	94.0±4.0 ^b	6.46±0.26 ^b	15.76±2.34
	5.2	68.85±0.45	141.7±3.0 ^a	107.0±3.6 ^a	2.87±0.09 ^a	96.7±1.2 ^{ab}	7.03±0.24 ^a	16.32±1.14
小规格 Small size	3.0	26.67±0.35	53.77±0.24 ^e	101.6±1.4 ^c	1.76±0.05 ^d	95.3±4.5 ^{ab}	5.82±0.51 ^{bc}	16.03±0.82 ^{ab}
	4.0	26.69±0.30	60.16±0.26 ^d	125.3±0.9 ^d	1.89±0.00 ^c	96.0±0.0 ^{ab}	5.36±0.47 ^c	15.07±0.76 ^b
	5.0	26.65±0.03	62.81±0.50 ^c	135.6±1.7 ^c	2.20±0.03 ^b	94.7±0.6 ^b	6.20±0.31 ^{abc}	16.31±1.04 ^{ab}
	6.0	26.73±0.15	68.30±0.07 ^b	155.5±1.3 ^b	2.27±0.02 ^b	97.0±1.0 ^{ab}	6.82±0.87 ^a	17.24±0.36 ^a
	7.0	26.60±0.03	70.20±0.21 ^a	163.9±1.0 ^a	2.50±0.00 ^a	99.0±1.0 ^a	6.45±0.66 ^{ab}	16.79±1.18 ^a

注:表中同一规格同一列数据上标字母不同表示差异显著, $P<0.05$,下同

Note: Within the same size and the same column, data with different letters indicated significant difference ($P < 0.05$). The same as below

表2 不同投喂水平对黄鳢体成分的影响

Tab.2 Effects of different feeding levels on the body composition of *M. albus*

规格 Size	投喂水平 Feeding level (%)	水分 Moisture (%)	粗灰分 Crude Ash (%)	粗脂肪 Crude lipid (%)	粗蛋白 Crude protein (%)
大规格 Big size	2.8	71.75±1.99	3.05±0.36	6.37±0.31 ^c	17.21±0.06 ^b
	3.6	71.46±1.06	2.69±0.28	6.92±0.31 ^{bc}	17.18±0.12 ^b
	4.4	71.00±1.58	3.20±0.84	7.73±0.44 ^{ab}	17.44±0.02 ^a
	5.2	71.98±1.42	3.13±1.09	8.00±0.06 ^a	16.98±0.00 ^c
小规格 Small size	3.0	71.39±0.48	3.81±1.55	7.19±0.67	17.29±0.34 ^a
	4.0	71.85±1.56	3.44±1.52	6.61±0.91	16.85±0.10 ^{ab}
	5.0	71.41±0.56	2.95±0.77	7.07±0.45	17.05±0.22 ^a
	6.0	71.07±0.34	2.56±0.08	7.58±0.53	16.92±0.16 ^{ab}
	7.0	71.84±1.21	3.18±1.44	8.65±2.16	16.43±0.18 ^b

表 3 不同投喂水平对黄鳝肠道消化酶指标的影响

Tab.3 Effects of different feeding levels on the intestinal digestive enzyme activity of *M. albus*

规格 Size	投喂水平 Feeding level (%)	淀粉酶 AMS (U/g prot)	脂肪酶 LPS (U/g prot)	胰蛋白酶 PRS (U/g prot)
大规格	2.8	0.10±0.01 ^b	23.64±2.41 ^b	29.23±0.36 ^d
Big size	3.6	0.09±0.00 ^b	20.62±1.79 ^b	38.65±2.18 ^c
	4.4	0.07±0.01 ^a	34.45±3.58 ^a	53.91±2.27 ^b
	5.2	0.09±0.00 ^{ab}	34.37±3.43 ^a	64.90±5.25 ^a
	3.0	0.10±0.00	31.52±4.71	24.61±0.48 ^c
小规格	4.0	0.09±0.01	31.18±1.52	59.14±1.38 ^b
	5.0	0.10±0.01	31.26±2.54	64.88±3.27 ^b
	6.0	0.10±0.01	26.97±1.07	89.15±9.36 ^a
	7.0	0.10±0.01	31.37±2.46	92.59±4.09 ^a

表 4 不同投喂水平对黄鳝血清生理生化指标的影响

Tab.4 Effects of different feeding levels on the physiological and biochemical serum indices of *M. albus*

规格 Size	投喂水平 Feeding level (%)	超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)	溶菌酶 LZM (μg/ml)	血糖 GLU (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	总胆固醇 TC (mmol/L)
大规格	2.8	151.01±7.33 ^b	1.11±0.06 ^b	3.08±0.33	0.47±0.01 ^b	3.55±0.19 ^c
Big size	3.6	182.62±5.55 ^a	1.18±0.00 ^b	2.69±0.46	0.66±0.02 ^a	4.15±0.33 ^{bc}
	4.4	177.03±5.83 ^a	2.35±0.10 ^a	2.72±0.51	0.65±0.04 ^a	6.07±0.51 ^a
	5.2	154.01±9.19 ^b	1.36±0.20 ^b	2.71±0.13	0.70±0.02 ^a	4.60±0.05 ^b
	3.0	180.25±4.99 ^a	0.80±0.03 ^c	2.13±0.04 ^b	0.24±0.01 ^c	3.72±0.68 ^b
小规格	4.0	170.76±10.45 ^a	1.03±0.04 ^a	2.10±0.13 ^b	0.34±0.03 ^b	4.26±0.17 ^{ab}
	5.0	168.38±1.58 ^a	0.82±0.02 ^{bc}	2.97±0.71 ^a	0.34±0.00 ^b	4.47±0.43 ^{ab}
	6.0	173.09±6.31 ^a	1.11±0.08 ^a	2.65±0.45 ^{ab}	0.47±0.04 ^a	4.97±0.10 ^a
	7.0	152.84±13.13 ^b	0.89±0.02 ^b	2.48±0.13 ^{ab}	0.35±0.02 ^b	4.87±0.39 ^a

大规格黄鳝血清 LZM 活性在投喂水平为 4.4% 时显著高于其他各组 ($P < 0.05$), 小规格黄鳝血清 LZM 活性随投喂水平增加呈波动性变化, 分别在投喂量为 3.0% 和 6.0% 时达到最低值和最高值。投喂水平最大规格黄鳝血糖含量无显著影响 ($P > 0.05$), 小规格黄鳝血糖含量随投喂量增加先升高后降低, 在投喂量为 5.0% 时达到最高值。大规格黄鳝血清甘油三酯 (TG) 含量随投喂水平增加呈上升趋势, 在投喂水平为 2.8% 时最低; 大规格黄鳝血清总胆固醇 (TC) 含量随投喂水平增加先升后降, 在投喂水平为 3.6% 时达到最高; 小规格黄鳝血清 TG 和 TC 含量随投喂水平增加都呈上升趋势, 且都在投喂水平为 6.0% 时达到最高。

3 讨论

3.1 投喂水平对黄鳝生长的影响

摄食水平是影响鱼类生长的重要影响因素之一 (崔奕波等, 1990), 在合适的投喂水平内, 随着投喂

水平的增加, 用于鱼类生长的能量分配率会随之增加, 鱼类的生长性能也随之提高 (黄建盛等, 2012), 本研究发现, 随投喂水平增加, 黄鳝增重率和特定生长率都显著升高; 小规格黄鳝在投喂水平 $\leq 7.0\%$ 时, 其生长与投喂水平呈正相关关系, 这与段国庆等 (2015) 对黄鳝仔稚鱼和刘变枝等 (2013) 对长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*) 幼鱼研究结果相似。大规格黄鳝在投喂水平为 4.4%–5.2% 时生长差异不显著, 说明大规格黄鳝在投喂水平为 4.4% 时摄食的能量可能已经足够维持生长代谢。研究表明, 鱼类在中间投喂水平时饲料转化效率最高 (崔奕波等, 1989), 饲料转化效率随摄食水平增加呈上升趋势, 但在较高水平变化不大 (朱晓明等, 2000); 特定生长率随摄食水平的增加呈减速增长趋势 (孙耀等, 2001)。本研究显示, 随着投喂水平增加, 2 种规格黄鳝饲料系数都显著升高, 这可能是投喂水平增加后饲料中能量多为代谢和排泄消耗, 用于生长的能量随投喂水平增加而减少, 从而使得饲料中的营养物质利用效率降低, 这

与袁勇超等(2011)¹⁾对胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)的研究结果一致。当投喂水平较高时,肝脏代谢负荷加重,过多的能量物质在肝脏组织中转变为脂肪进行储存,从而使鱼体肝体比和脏体比增加。本研究结果显示,当大黄鳊投喂水平高于 5.2%时,小规格黄鳊投喂水平高于 6.0%时,黄鳊肝体比显著增加,全鱼粗脂肪含量呈升高趋势,说明黄鳊高投喂水平投喂有使黄鳊肝脏负荷加重的趋势。

3.2 投喂水平对黄鳊肠道消化酶的影响

鱼类肠道消化酶活性与其食性(吴婷婷等, 1994)、生长阶段(戴贤军等, 2001)、生长环境(伍莉等, 2002)、饵料(杨代勤等, 2003)等因素密切相关。本研究结果显示, 2 种规格黄鳊肠道脂肪酶、胰蛋白酶活性随投喂水平增加呈上升趋势, 这可能是由于随着投喂水平增加, 增加的脂肪和蛋白质的摄入刺激肠道分泌相关的酶对其进行消化吸收, 与黄厚见等(2013)对鲮鱼(*Liza haematocheila*)的研究结果相似。研究表明, 黄鳊淀粉酶活力显著低于体内蛋白酶活性(刘家芳等, 2007), 受饥饿应激后, 肠道淀粉酶活性都无显著变化(阮国良等, 2013), 本研究中, 黄鳊淀粉酶活性也没有受到显著影响, 这可能是由于黄鳊为杂食偏肉食性, 对碳水化合物化合物的利用有一定的限度所致。

3.3 投喂水平对黄鳊血清生理生化指标的影响

血清生理生化指标在一定程度上反映鱼体的免疫、代谢功能状况。超氧化物歧化酶(SOD)可以清除机体内代谢产生的有害超氧化物, 防止机体受损; 溶菌酶(LZM)可以抵御细菌和异物的侵入, 其活性是机体内非特异性免疫的重要指标之一。研究表明, 随着摄食水平的升高, 鱼类免疫机能随之提高(王艺超等, 2016)。本研究中, 大规格黄鳊在投喂水平为 4.4%时, SOD 和 LZM 活性都较高; 小规格黄鳊在投喂水平为 4.0%和 6.0%时, SOD 和 LZM 活性都处在较高水平, 而高于 6.0%水平时, 2 种酶活出现显著性降低($P < 0.05$)。这说明投喂水平过高或过低均可影响黄鳊的免疫功能, 这可能是由于低投喂水平下因营养需要的不足导致黄鳊处在较低的代谢水平(刘庄鹏等, 2015), 而投喂水平过高时, 会导致肝脏受损, 进而

导致代谢紊乱(覃希, 2014)²⁾。血糖(GLU)是代谢所需能量的直接来源, 血糖水平保持恒定是糖、脂肪、氨基酸代谢途径之间, 肝、肌、脂肪组织之间相互协调的结果; 血清甘油三酯(TG)含量一定程度上反映了脂肪代谢的状况, 而胆固醇(TC)则是动物合成胆汁酸、类固醇激素等生理活性物质的前体, 与糖、脂肪、蛋白质代谢密切相关(邹思湘等, 2010)。本研究中, 投喂水平升高, 小规格黄鳊血清 GLU 含量呈升高趋势, 2 种规格黄鳊 TG、TC 都呈升高趋势, 说明投喂水平影响了黄鳊的代谢功能。

4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 大规格黄鳊在投喂水平为 4.4%时生长性能达到较佳状态, 而小规格黄鳊在投喂水平为 5%–6%时其生长达到较佳状态。因此, 根据生长及血清生理生化指标, 建议大规格黄鳊适宜投喂水平为 4.4%, 小规格黄鳊适宜投喂水平为 5.0%–6.0%。

参 考 文 献

- Cui YB, Wootton RJ. Components of the energy budget in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.) in relation to ration, body weight and temperature. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990(3): 3–14 [崔奕波, 吴登 RJ. 真鳊 (*Phoxinus phoxinus* (L.)) 的能量收支各组分与摄食量、体重及温度的关系. *水生生物学报*, 1990(3): 3–14]
- Cui YB. Bioenergetics of fishes: Theory and methods. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, 13(4): 369–383 [崔奕波. 鱼类生物能量学的理论与方法. *动物营养学报*, 1989, 13(4): 369–383]
- Dai XJ, Shu MA. Changes of the digestive organs and digestive enzymes of *Monopterus albus* at different growth stage. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition)*, 2001, 20(2): 113–116 [戴贤君, 舒妙安. 黄鳊不同生长阶段消化器官及其消化酶的变化. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2001, 20(2): 113–116]
- Duan GQ, Jiang H, Hu W, et al. Effects of feeding level on growth in young *Monopterus albus*. *Guangdong Agricultural Science*, 2015(7): 105–109 [段国庆, 江河, 胡王, 等. 投喂水平对黄鳊幼鱼生长的影响. *广东农业科学*, 2015(7):

1) Yuan YC. Optimum protein and energy levels, feeding levels and phosphorus requirement and utilization of plant protein source for *Myxocyprinus asiaticus*. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2011 [袁勇超. 胭脂鱼适宜蛋白能量水平、投喂水平和磷需要量及对植物蛋白源的利用研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2011]

2) Qin X. The effects of feeding frequency and feeding level on growth performance and physiological function of juvenile GIFT, *Oreochromis niloticus*. Master's Thesis of Guangxi University, 2014 [覃希. 投喂频率和投喂水平对吉富罗非鱼幼鱼生长性能和生理机能的影响. 广西大学硕士研究生学位论文, 2014]

- 105–109]
- Huang HJ, Jiang M, Li L, *et al.* Effect of ration level and ammonia exposure on food digestion and growth of juvenile mullet *Liza haematocheila*. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(4): 521–528 [黄厚见, 蒋玫, 李磊, 等. 摄食水平和氨氮对鲮鱼幼鱼食物消化及生长的影响. *生态毒理学报*, 2013, 8(4): 521–528]
- Huang JS, Chen G, Zhang JD, *et al.* Effects of feeding level on growth and energy budgets in young *Trachinotus ovatus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 30(1): 18–22 [黄建盛, 陈刚, 张健东, 等. 摄食水平对卵形鲳鲹幼鱼的生长和能量收支的影响. *广东海洋大学学报*, 2012, 30(1): 18–22]
- Li DB, Shao SS, Zhang GW, *et al.* Effects of vitamin D3 supplemental level on growth performance and immune function of *Monopterus albus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(4): 1145–1151 [黎德兵, 邵珊珊, 张龚炜, 等. 饲料中维生素 D3 添加水平对黄鳝生长性能及免疫功能的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(4): 1145–1151]
- Liu BZ, Zhu XM, Han D, *et al.* Effects of feeding level on growth performance of Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther) larvae. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 261–267 [刘变枝, 朱晓鸣, 韩冬, 等. 投喂水平对长吻鮠仔稚鱼生长和存活的影响. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 261–267]
- Liu JF, Yang DQ, Ruan GL. The study on digestive enzymatic activities in *Monopterus albus*. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007, 46(5): 804–807 [刘家芳, 杨代勤, 阮国良. 黄鳝消化酶活性的研究. *湖北农业科学*, 2007, 46(5): 804–807]
- Liu ZP, Hu Y, Lv F, *et al.* Effect of overwintering on body indices, intestinal digestive enzymes and immune indices in *Monopterus albus*. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(3): 72–76 [刘庄鹏, 胡毅, 吕富, 等. 越冬对黄鳝形体、肠道消化酶及免疫指标的影响. *水生态学杂志*, 2015, 36(3): 72–76]
- Pan WC, Gong SY, Tian G, *et al.* Effect of different plant protein sources on growth performance and muscle nutrition in *Monopterus albus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(5): 84–88 [潘望城, 龚世园, 田罡, 等. 不同植物蛋白源饲料对黄鳝生长及肉质的影响. *华中农业大学学报*, 2013, 32(5): 84–88]
- Ruan GL, Liu JF, Yang DQ. The effects of intermittent food-deprivation on growth, digestive enzyme activities and serum biochemical indices in the rice-field eel (*Monopterus albus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 1058–1065 [阮国良, 刘家芳, 杨代勤. 间歇性禁食对黄鳝生长、消化酶活性及血液生化指标的影响. *水产学报*, 2013, 37(7): 1058–1065]
- Sun Y, Zhang B, Tang QS, *et al.* Effects of ration level and food species on energy budget of *Sabastodes fuscescens*. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(2): 32–37 [孙耀, 张波, 唐启升, 等. 摄食水平和饵料种类对黑鲮能量收支的影响. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 32–37]
- Wang YC, Liang MQ, Zheng KK. Effects of different ration levels on growth, activities of digestive enzymes and immunity-related enzymes in *Apostichopus japonicus* Selenka. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(10): 87–92 [王艺超, 梁萌青, 郑珂珂. 不同投喂水平对刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)生长、消化酶及免疫相关酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(10): 87–92]
- Wu TT, Zhu XM. Studies on the activity of digestive enzymes in mandarin fish, black carp, grass carp, common carp, crucian carp and silver carp. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1994, 1(2): 10–17 [吴婷婷, 朱晓鸣. 鳊鱼、青鱼、草鱼、鲤、鲫、鲢消化酶活性的研究. *中国水产科学*, 1994, 1(2): 10–17]
- Wu L, Chen PF, Xing KC, *et al.* The study on intestinal and hepatic main pancreatic digestive enzymes activity in rice field eel. *Journal of Hubei Agricultural College*, 2002(1): 36–39 [伍莉, 陈鹏飞, 幸坤财, 等. 黄鳝肠道和肝胰脏主要消化酶活力的研究. *湖北农学院学报*, 2002(1): 36–39]
- Yang DQ, Yan AS, Chen F, *et al.* Effects of different diets on activities of digestive enzymes of *Monopterus albus*. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(6): 558–563 [杨代勤, 严安生, 陈芳, 等. 不同饲料对黄鳝消化酶活性的影响. *水产学报*, 2003, 27(6): 558–563]
- Zhou QB, Zhu CS, Wu HD, *et al.* Effects of dietary lipid sources on tissue fatty acids profile and growth performance in female rice field eel *Monopterus albus*, *Zuiew*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 246–255 [周秋白, 朱长生, 吴华东, 等. 饲料中不同脂肪源对黄鳝生长和组织中脂肪酸含量的影响. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 246–255]
- Zhu XM, Xie SQ, Cui YB. Effect of ration level on growth and energy budget of the gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2000, 31(5): 471–479 [朱晓鸣, 解绶启, 崔奕波. 摄食水平对异育银鲫生长及能量收支的影响. *海洋与湖沼*, 2000, 31(5): 471–479]
- Zou SX, Li QZ, Zhu SJ, *et al.* *Animal biochemistry*. Beijing: China Agriculture Press, 2010, 203 [邹思湘, 李庆章, 朱素娟, 等. *动物生物化学*. 北京: 中国农业出版社, 2010, 203]

Effects of Feeding Level on Growth, Intestinal Digestive Enzymes Activity and Physiological and Biochemical Characteristics of Serum in the Asian Swamp Eel (*Monopterus albus*)

CHEN Yunfei^{1,2}, PENG Huizhen^{1,2†}, LIU Zhuangpeng^{1,2}, HU Yi^{1,2①}, LÜ Yihang³,
LI Zhaolin^{1,2}, ZHANG Dehong³

(1. Hunan Agricultural University, Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Changsha 410128;

2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Healthy Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000;

3. Tongwei Co., LTD, Chengdu 610041)

Abstract An 8-week feeding experiment was conducted to study the effects of different feeding levels on growth performance, intestinal digestive enzyme activities and serum physiological and biochemical indices of Asian swamp eel (*Monopterus albus*) at two different sizes [mean initial body weight: big-size (68.85±0.44 g) and small-size (26.67±0.17 g)]. There were four big-size groups which had 4 feeding rates (2.8%, 3.6%, 4.4% and 3.6% body weight/day); And five small-size groups which had 5 feeding rates (3.0%, 4.0%, 5.0%, 6.0% and 7.0% body weight/day). The stocking densities were 50 fry/4500-litre tank of big-size groups and 100 fry/4500-litre tank of small-size groups. Each group had three biological repeats. The results showed that with the increase of feeding levels for the two sizes of swamp eel, the weight gain rate, feed coefficient, liver body rate, and content of fat in the whole fish were significantly higher ($P<0.05$), but the content of protein in the whole fish had a decreasing tendency. When the feeding level was 4.4% and 5.2% for big-size swamp eel, the weight gain rate reached a peak, and there were no significant differences between the two groups. The activities of intestinal lipase and trypsin were significantly increased ($P<0.05$) with the increase of feeding level; serum superoxide dismutase (SOD) activity and total cholesterol (TC) content showed a trend from rise to decline; serum triglycerides (TG) content was rising. When the feeding level was 4.4%, the activities of SOD and lysozyme (LZM) reached the highest level among all the groups of big-size swamp eel. In pace with the rising of feeding level for the small-size groups, intestinal trypsin activity was increased significantly ($P<0.05$); the content of serum TG and TC rose gradually; the SOD activity was decreased; the content of blood sugar had a fluctuated trend. Compared with other groups of small-size swamp eel, the activities of SOD and LZM had higher standards when the feeding level was 6%. In conclusion, when the feeding level were 4.4% for the big-size and 5%–6% for the small-size respectively, the growth performance of swamp eel reached a better status.

Key words *Monopterus albus*; Feeding level; Growth; Intestinal digestive enzymes; Serum physiological and biochemical indices

① Corresponding author: HU Yi, E-mail: huyi740322@163.com

两种养殖模式下泥鳅养成品体色、质构及其脏器 消化酶、抗氧化酶和 ATP 酶活力的差异*

袁向阳¹ 王志铮^{1①} 杨程¹ 富裕¹
李鸿鹏¹ 白晓倩¹ 朱卫东²



(1. 浙江海洋大学水产学院 舟山 316022; 2. 余姚市水产技术推广中心 余姚 315400)

摘要 随机选取池塘专养模式(M₁)和稻田养殖模式(M₂)养成的平均体长和体重分别为(113.37±4.55) mm、(13.35±1.23) g 和(122.69±5.22) mm、(16.43±1.36) g 的 1 龄泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)作为实验对象,以养殖泥鳅的稻田鲜土样为色差对照(M₀),比较分析了 2 种模式下泥鳅间体色、背肌质构、脏器消化酶、抗氧化酶和 ATP 酶的差异,以期阐述稻田生境下泥鳅生活策略、2 种养殖模式下泥鳅的品质鉴定及其养殖模式的优化提供理论依据。结果显示:(1) M₁ 泥鳅养成品背部体色与对照具有显著差异($P<0.05$),二者测量值呈 $M_0>M_1$ ($P<0.05$);(2) 所测背肌质构指标中, M₁ 和 M₂ 均具显著差异($P<0.05$),除黏着性外,其余各指标测量值均呈 $M_2>M_1$ ($P<0.05$);(3) 所测消化酶中, M₁ 和 M₂ 间仅蛋白酶和脂肪酶具有显著差异($P<0.05$),其测量值依次呈 $M_2>M_1$ 和 $M_1>M_2$ ($P<0.05$);(4) 所测脏器抗氧化酶和消化酶中, M₁ 和 M₂ 间均具有显著差异($P<0.05$),各测量值均呈 $M_2>M_1$ ($P<0.05$)。

关键词 泥鳅; 养殖模式; 体色; 质构; 消化酶; 抗氧化酶; ATP 酶

中图分类号 S966.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0121-07

鱼类的商品价值主要取决于其体色和肌肉品质,其中,体色由色素细胞的数量决定(徐建瑜等, 2009),同时也受到外界环境因素的影响(高保全等, 2015; Salm *et al.*, 2005; Yanar *et al.*, 1999)。质构作为评定食物品质的四大要素之一(李云飞等, 2009),养殖模式的差异会对其产生显著影响(王志铮等, 2013; 奉琳琳等, 2015)。抗氧化酶、消化酶和 ATP 酶活力的变化一定程度上反映水产动物的生理状况(赵峰等, 2008; 高攀等, 2009; Partridge *et al.*, 2002),常用以研究水产动物对外界环境胁迫的内在响应机制。因此,比较不同养殖模式下泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)养成

品间体色、背肌质构及其脏器消化酶、抗氧化酶和 ATP 酶活力的差异,不仅有利于从宏观角度揭示由养殖模式差异造成泥鳅的体色变化,而且有助于在微观水平上阐述泥鳅对生存环境胁迫的生理响应特征。

泥鳅是我国一种重要的经济淡水鱼类。迄今,国内外有关泥鳅的研究主要集中在毒性实验(雷忻等, 2009; 高晓莉等, 2004)、捕食行为学(袁向阳等, 2014)和基因遗传学(Morishima *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 1985)等方面,而有关养殖模式尚未见报道。本研究以泥鳅养成品作为研究对象,开展了 2 种养殖模式下泥鳅养成品体色、背肌质构及其脏器消化酶、抗氧化

* 宁波市农业领域科技重大攻关择优委托项目(2012C10032)和浙江海洋学院优秀硕士学位论文培育项目[浙海院学位(2013)7号]共同资助 [This work was supported by Major projects of science and technology in agricultural field of Ningbo, No. 2012C10032, and Excellent master thesis cultivation project of Zhejiang Ocean University [Degree No.(2013)7 of Zhejiang Ocean University] 袁向阳, E-mail: xiangyangyuan007@163.com

① 通讯作者: 王志铮, 教授, E-mail: wzz_1225@163.com

收稿日期: 2016-01-18, 收修改稿日期: 2016-04-01

酶和 ATP 酶活力的差异实验研究, 以期为泥鳅的品质鉴定及其养殖模式的优化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验泥鳅

供试样品系 1 龄泥鳅个体, 于 2015 年 7 月分别购自浙江省余姚市鼎源生态家庭农场(池塘专养模式 M_1 , 养殖密度为 6.75×10^5 尾/hm², 养殖期间投喂泥鳅专用饲料)和余姚市鼎绿生态农庄有限公司(稻田养殖模式 M_2 , 养殖期间不投喂任何饲料)。运至实验室后, 将泥鳅暂养于规格为 60 cm×40 cm×30 cm 的塑料桶内, 并停饲 7 d。实验时, 从中随机选取体色自然、有活力的个体作为实验对象。其中, M_1 和 M_2 实验泥鳅的平均体长和体重分别为 (113.37±4.55) mm、(13.35±1.23) g 和 (122.69±5.22) mm、(16.43±1.36) g。

1.2 实验方法

1.2.1 实验泥鳅体色的测量 将养殖泥鳅的稻田鲜土样设为色差对照 M_0 。泥鳅左侧鳃盖后缘至尾柄基部之间的区段为测量部位, 采用等距法将背、腹侧均分为 5 个位点, 并借助 CR-400 色差仪(柯尼卡美能达中国投资有限公司)依次对其色泽进行测量, 每种养殖模式下泥鳅均测 6 尾。其中, 测量值中 L 表示亮度, L 值越大表明亮度越强, 其取值范围为 0–100;

A 表示红绿色方向, +A 为红色反向, -A 为绿色方向, 其取值范围为 -60 – +60; B 表示黄蓝色方向, +B 为黄色反向, -B 为蓝色方向, 其取值范围为 -60 – +60。

1.2.2 实验泥鳅背肌质构的测量 采用 TA.XTplus 型质构分析仪(上海超级仪器有限公司), 以实验泥鳅左侧背鳍基点为起点, 向后割取 10 mm×7 mm×4 mm 的背肌组织块, 对其硬度、黏着性、弹性、凝聚性、咀嚼性、恢复性等 6 项指标进行测定。测量时, 质构仪采用 TPA 测量模式, 测量探头为 P/36R, 测前速率、测中速率和测后速率分别为 1、0.5 和 1 mm/s, 测距为 2 mm, 停留间隔时间为 5 s, 每种养殖模式下泥鳅均测 6 尾。其中, 测量指标及其定义见表 1。

1.2.3 实验泥鳅酶活力的测定 每种养殖模式下随机选取 6 尾泥鳅, 经低温麻醉后, 将其置于冰盘进行解剖, 取出鳃、胃、肠和肝胰脏, 经 4℃ 超纯水冲洗后, 先用滤纸吸干脏器表面水分, 再用精度为 1 mg 的 BS223S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)分别称重、标记, 然后放入 -80℃ 冰箱中暂存待用。

本实验所测抗氧化酶器官为肝胰脏和鳃, 抗氧化酶种类包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)

表 1 测量指标及其定义

Tab.1 Measured indices and their definitions

指标 Indices	定义 Definition
硬度 Hardness	肌肉达到一定形变所需要的外力
黏着性 Adhesiveness	第 1 次压缩后探头撤回时负数峰值下的面积
弹性 Springiness	将肌肉压缩至一定形变量后, 其所能恢复的程度
凝聚性 Cohesiveness	肌肉经过第 1 次压缩变形后所表现出来的对第 2 次压缩的相对抵抗能力
咀嚼性 Chewiness	吞咽状态所需的能量, 嫩度越高则该值越低
恢复性 Resilience	可恢复功与压缩功之比, 其值介于 0–1 之间

和过氧化氢酶(CAT); 所测消化酶器官为肝胰脏、胃和肠, 消化酶包括蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶; 所测三磷酸腺苷(ATP)酶器官为肝胰脏, ATP 酶种类包括 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase 和 Na^+ - K^+ ATPase。实验所用仪器为岛津 UVmini-1240 型紫外可见分光光度计和 Eppendorf 5804R/5810R 高速冷冻离心机(广州安邦生物科技有限公司)。实验所用酶和总蛋白测量试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司, 测量步骤和计算方法按说明书所述进行操作。

1.3 数据处理

整理实验所得数据, 利用 SPSS 19.0 计算出各测量值的平均值、标准误, 在此基础上, 采用 LSD 对组间和组内进行差异显著性检验($\alpha=0.05$), 并利用 Excel 2003 作图。

2 结果与分析

2.1 两种养殖模式下泥鳅养成品的地貌特征

经观察发现, 池塘专养模式下, 泥鳅养成品规格较均匀, 背、腹部间体色差异明显, 其中, 背部呈深黑色, 而腹部呈淡黄色; 稻田养殖模式下, 泥鳅个体间规格差异较大, 背、腹部间体色差异相对较弱, 体色多呈棕黄色, 部分鱼鳍边缘黄中泛红, 其中, 少数个体体表具有明显外伤。

2.2 两种养殖模式下泥鳅养成品的体色特征

由表 2 可见, 两种养殖模式下泥鳅养成品的体色特征表现为背部体色 L 值呈 $M_0 \approx M_2 > M_1$ ($P < 0.05$), 而 A 值和 B 值均呈 $M_0 > M_2 \approx M_1$ ($P < 0.05$), 表明 M_0 和 M_2

背部皮肤亮度显著强于 M_1 , 而 M_0 所含红色和黄色成分显著高于 M_2 和 M_1 ; 腹部体色 L 值和 B 值呈 $M_2 \approx M_1 > M_0$, 而在 A 值上 M_0 、 M_1 和 M_2 任意两者间均无显著差异 ($P > 0.05$), 表明泥鳅腹部体色亮度显著强于对照。以上揭示稻田养殖模式下泥鳅养成品的背部体色与土样色泽间较接近, 而池塘专养模式下泥鳅养成品的背部体色与土样色泽间具较好区分度。

由表 3 可见, 池塘专养模式下, 泥鳅背、腹部和 M_0 色差 L 值和 B 值均呈腹部 $> M_0 >$ 背部 ($P < 0.05$), 表明腹部体色不仅亮度显著强于 M_0 和背部, 且所含的黄色成分也最多。除腹部外, 背部和 M_0 色差 A 值呈 $M_0 >$ 背部 ($P < 0.05$), 表明 M_0 所含红色成分显著高于背部; 稻田养殖模式下, 泥鳅背、腹部和 M_0 色差 A 值任意两者间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 L 值和 B 值均呈腹部 $> M_0 \approx$ 背部 ($P < 0.05$), 表明腹部体色亮度及其所含黄色成分显著高于 M_0 和背部。

2.3 两种养殖模式下泥鳅养成品的背肌质构特征

由表 4 可见, 两种养殖模式下泥鳅养成品背肌除黏着性外, 硬度、弹性、凝聚性、咀嚼性、恢复性指标测量值均呈 $M_1 < M_2$ ($P < 0.05$), 表明稻田养殖模式下泥鳅养成品的背肌质构显著优于池塘专养模式下泥鳅个体。

2.4 两种养殖模式下泥鳅养成品脏器消化酶活力的特征

由表 5 可见, 两种养殖模式下泥鳅间脏器消化酶活力特征表现为肝胰脏、胃蛋白酶活力测量值均呈 $M_1 < M_2$ ($P < 0.05$); 肝胰脏脂肪酶活力测量值呈 $M_1 > M_2$ ($P < 0.05$), 而肠淀粉酶活力测量值无显著差异 ($P > 0.05$)。以上表明泥鳅间脏器消化酶活力的变化与养殖模式差异密切相关。

表 2 两种养殖模式泥鳅养成品的体色特征

Tab.2 The epidermal characteristics of adult *M. anguillicaudatus* cultured in two models

测量部位 Measured sites	测量指标 Measurement indices	养殖模式 Stocking models		
		对照 Control M_0	M_1	M_2
背部 Dorsal part	L 值	36.700±0.767 ^a	30.304±0.896 ^b	34.302±1.122 ^a
	A 值	1.300±0.051 ^a	-0.155±0.078 ^b	0.018±0.341 ^b
	B 值	6.737±0.124 ^a	4.443±0.359 ^b	5.054±0.580 ^b
腹部 Ventral side	L 值	36.700±0.767 ^a	43.729±1.419 ^b	48.422±2.076 ^b
	A 值	1.300±0.051 ^a	0.165±0.459 ^a	1.095±0.688 ^a
	B 值	6.737±0.124 ^a	10.650±0.705 ^b	11.423±0.577 ^b

注: 同一行中, 不同字母表示显著差异 ($P < 0.05$), 表 4、表 5 同

Note: Different letters within the same row indicated significant difference ($P < 0.05$). The same as in Tab.4 and Tab.5

表 3 同一养殖模式下泥鳅养成品不同部位的体色特征

Tab.3 The epidermal characteristics of different parts of adult *M. anguillicaudatus* cultured in the same model

测量部位 Measured sites	M_1			M_2		
	L 值	A 值	B 值	L 值	A 值	B 值
背部 Dorsal part	30.304±0.896 ^m	-0.155±0.078 ^m	4.443±0.359 ^m	34.302±1.122 ^m	0.018±0.341 ^m	5.054±0.580 ^m
腹部 Ventral side	43.729±1.419 ⁿ	0.165±0.459 ^{mn}	10.650±0.705 ⁿ	48.422±2.076 ⁿ	1.095±0.688 ^m	11.423±0.577 ⁿ
M_0	36.700±0.767 ^o	1.300±0.051 ⁿ	6.737±0.124 ^o	36.700±0.767 ^m	1.300±0.051 ^m	6.737±0.124 ^m

注: 同一列中, 不同字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

Note: Different letters within the same column indicated significant difference ($P < 0.05$)

表 4 两种养殖模式泥鳅养成品的背肌质构特征

Tab.4 Physical characteristics of the dorsal muscle of adult *M. anguillicaudatus* cultured in two models

指标 Indices	养殖模式 Stocking models	
	M_1	M_2
硬度 Hardness	7027.188±200.308 ^a	7891.998±236.627 ^b
黏着性 Adhesiveness	-40.818±3.909 ^a	-55.204±2.934 ^b
弹性 Springiness	0.601±0.029 ^a	0.782±0.032 ^b
凝聚性 Cohesiveness	0.464±0.022 ^a	0.548±0.019 ^b
咀嚼性 Chewiness	1939.174±255.919 ^a	2850.147±98.507 ^b
恢复性 Resilience	0.324±0.019 ^a	0.408±0.022 ^b

表5 两种养殖模式下泥鳅成品的脏器消化酶活力
Tab.5 The activity of digestive enzymes of *M. anguillicaudatus* cultured in two models

消化酶 Digestive enzymes	脏器 Organs	酶活力 Enzyme activity (U/mg prot)	
		M ₁	M ₂
蛋白酶 Protease	肝胰脏 Hepatopancreas	2022.626±92.061 ^a	3150.466±189.158 ^b
	胃 Stomach	9.229±1.181 ^a	34.204±4.216 ^b
脂肪酶 Lipase	肝胰脏 Hepatopancreas	92.409±5.656 ^a	63.922±8.020 ^b
淀粉酶 Amylase	肠 Intestine	0.570±0.041 ^a	0.553±0.047 ^a

2.5 两种养殖模式下泥鳅养成品脏器 SOD、POD、CAT 活力的特征

由图1可见,池塘专养模式下,泥鳅养成品肝胰脏和鳃间除 POD 活力外, CAT 和 SOD 活力均无显著

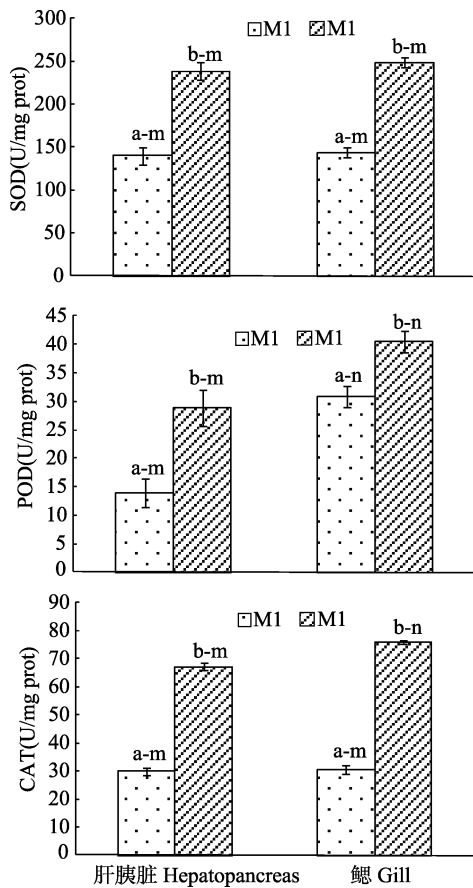


图1 两种养殖模式泥鳅成品肝胰脏和鳃的抗氧化酶活力
Fig.1 Activity of the antioxidant enzymes in hepatopancreas and gill of *M. anguillicaudatus* cultured in two models

a、b 标注两种模式下同一脏器酶活力差异,字母不同表示显著差异;m、n 标注同一模式下不同脏器酶活力差异,字母不同表示显著差异,图2同

a and b indicated significant difference between enzyme activity in the same organ under two aquaculture models ($P < 0.05$); m and n indicated significant difference between enzyme activity in two organs under the same aquaculture model ($P < 0.05$), the same as in Fig.2

性差异($P > 0.05$);稻田养殖模式下,泥鳅养成品肝胰脏和鳃间除 SOD 活力外,POD 和 CAT 活力均存在显著性差异($P < 0.05$);两种养殖模式间泥鳅养成品 CAT、SOD 和 POD 活力均存在显著性差异($P < 0.05$),且酶活力测量值均呈 $M_2 > M_1$ ($P < 0.05$),表明泥鳅肝胰脏和鳃是由养殖模式差异造成泥鳅抗氧化酶活力产生显著变化的靶器官。

2.6 两种养殖模式下泥鳅养成品肝胰脏 ATP 酶活力的特征

由图2可见,泥鳅养成品肝胰脏 ATP 酶活力的特征表现为两种养殖模式间泥鳅养成品肝胰脏的 ATP 酶活力均呈 $M_2 > M_1$,且差异显著($P < 0.05$);同一养殖模式下泥鳅养成品肝胰脏的 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活力显著高于 Na^+ - K^+ ATP 酶活力($P < 0.05$)。

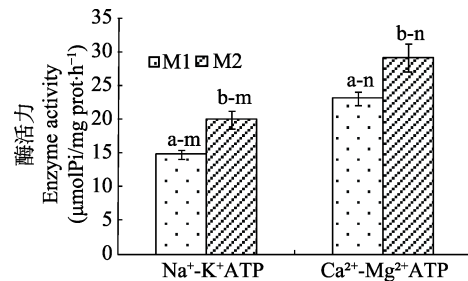


图2 两种养殖模式泥鳅养成品肝胰脏的 ATP 酶活力
Fig.2 Activity of ATP enzymes in hepatopancreas of *M. anguillicaudatus* cultured in two models

3 讨论

3.1 两种养殖模式下泥鳅体色的差异

已有研究表明,鱼类的体色由色素细胞释放的色素通过选择性吸收和反射特定波长的光产生,其中,色素释放的过程受神经系统和内分泌调控(冯幼等,2014),而环境和饲料也是影响鱼类体色的主要外界因素(沈志刚等,2009;袁立强等,2008)。由表2可知,两种养殖模式下,泥鳅养成品背部体色亮度强弱呈 $M_0 \approx M_2 > M_1$ ($P < 0.05$),不仅表明泥鳅的体色变化受养殖环境差异影响,而且揭示稻田养殖模式下泥鳅个体

通过采取改变体色的手段,以达到适应环境和躲避捕食的目的。刘建平(2005)也曾报道,生活在海洋或深水湖中的七彩鲑鱼(*Salvelinus fontinalis*)体色多呈浅色或银白色,而生活在小溪或浅水河流中的七彩鲑鱼体色较鲜艳。冷向军等(2003)发现,野生胡子鲶(*Clarias fuscus*)体色为金黄、土黄和褐黄色不等,半人工养殖胡子鲶为黄褐、褐和灰褐色不等,而全人工养殖胡子鲶为灰褐、灰和灰黑色不等。

3.2 两种养殖模式下泥鳅质构的差异

由表4可知,两种养殖模式下,泥鳅养成品背肌在硬度、弹性、凝聚性、咀嚼性和恢复性指标上均呈 $M_1 < M_2$ ($P < 0.05$),究其原因,这可能与因养殖模式差异造成泥鳅个体采取不同的觅食策略有关,即稻田养殖模式下,泥鳅个体由于长期处于食物保障程度较池塘专养模式相对匮乏状态,致使其采取游动搜索觅食策略。刘凌云等(2009)研究表明,鱼类向前游动的推动力主要借助于背部发达的轴上肌通过左右摆动所产生的收缩波,在此过程中肌小节间的 ATP 酶活性和肌纤维间的结合力会分别增大和增强,从而造成泥鳅养成品肌肉硬度增强以及弹性、凝聚性、咀嚼性和恢复性增大。此外,造成这一现象也可能与泥鳅采食不同饵料有关,即池塘专养模式下泥鳅个体由于长期采食富含高蛋白和高脂肪的配合饲料,造成鱼体脂肪含量过高而降低鱼肉质度。综上可知,稻田养殖模式下泥鳅养成品肌肉质构显著好于池塘主养模式下泥鳅个体。这不仅与 Haard(1992)认为鱼体低脂肪含量是导致野生鱼肉质度较人工养殖鱼类更加结实的主要原因的结果相符,而且也与张玉龙等(2014)发现野生环境下黄鳝(*Monopterus albus*)和泥鳅肌肉的硬度、弹性和咀嚼性均显著高于人工养殖模式($P < 0.01$)的情形相一致。

3.3 两种养殖模式下泥鳅脏器消化酶的差异

消化酶主要由消化器官和消化腺分泌(林浩然, 2007),可将消化系统内食物从难以吸收的大分子物质分解为易吸收的小分子物质,经过机体消化、吸收和转运后,以满足机体代谢的需求。消化酶活力的变化不仅有利于揭示鱼类的消化生理机制,而且有助于反映养殖环境的差异。由表5可知,两种养殖模式下,泥鳅养成品除肠淀粉酶活力无显著差异外($P > 0.05$),其他各消化酶活力间均存在显著性差异($P < 0.05$)。这也与不同养殖模式下日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)养成品脏器消化酶活力间存在差异相一致(王志铮等, 2013),认为造成消化酶活力的变化可能与其养殖模

式差异相关。

3.4 两种养殖模式下泥鳅脏器抗氧化酶的差异

鱼类体内存在一套完整的抗氧化防御机制,主要包括 SOD、CAT 和 POD 等酶(胡毅等, 2012)。由于抗氧化酶能够清除受养殖密度、水温、光照和溶解氧等外环境的变化造成机体产生过量的自由基,因此,常常将抗氧化酶活性作为衡量环境适宜程度的重要指标(Yu, 1994)。由图1可知,两种养殖模式之间,泥鳅养成品 CAT、SOD 和 POD 活力均存在显著性差异($P < 0.05$),且酶活力大小均呈 $M_2 > M_1$,究其原因,可能是由于稻田养殖模式下泥鳅养成品长期处于环境胁迫程度相对较高的状态,导致机体进行氧化应激反应,在产生大量自由基的同时,也激活了泥鳅肝脏抗氧化酶活性,通过消除机体中过多的活性氧自由基来维持机体的正常运作。这也与本研究肝胰脏 ATP 酶活力的变化趋势相一致。

3.5 两种养殖模式下泥鳅肝胰脏 ATP 酶活力的差异

肝胰脏不仅在脂肪分解、蛋白质消化和碳水化合物代谢等方面起着重要作用,而且还能起到分解毒物和调节血糖平衡的作用(王军等, 2008),故肝胰脏功能可作为指示鱼体健康状况的重要依据。目前,国内外关于鱼类个体脏器 ATP 酶的研究多集中于肾和鳃丝(尹飞等, 2011; 罗海忠等, 2015; Lin *et al.*, 2004),而涉及肝胰脏的研究尚未见报道。在鱼类体内,ATP 酶不仅能维持细胞内外的离子平衡,而且也是一项评价环境胁迫影响的生物学指标(孙鹏等, 2014)。由图2可知,本研究中稻田养殖模式下,泥鳅养成品肝胰脏的 ATP 酶活力显著高于池塘专养模式下泥鳅养成品($P < 0.05$),这可能与因稻田生境中环境胁迫导致肝胰脏 ATP 酶被快速激活有关,从而有效稳定细胞内外渗透压平衡,保持机体内环境稳定有关。这也与在实验过程中观察到稻田养殖模式下少数泥鳅体表存在明显外伤的现象相吻合。

参 考 文 献

- Feng LN, Lin XD, Cheng YW. Effects of two culture models on the fresh quality of *Oplegnathus punctatus*. *Fishery Modernization*, 2015, 42(2): 35-38 [奉琳娜, 林向东, 成一伟. 不同养殖模式对斑石鲷鱼肉品质的影响及分析. *渔业现代化*, 2015, 42(2): 35-38]
- Feng Y, Xu HJ, Liu D, *et al.* Research status of skin color on fish. *Aquaculture*, 2014(2): 49-52 [冯幼, 许合金, 刘定, 等. 鱼类体色研究现状. *水产养殖*, 2014(2): 49-52]
- Gao BQ, Liu P, Li J, *et al.* Analysis of body color variations

- among four wild populations of *Portunus trituberculatus*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 79–84 [高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹 4 个地理群体体色差异分析. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 79–84]
- Gao P, Jiang M, Wen H, *et al.* Effect of dietary protein-energy ratio on digestive enzyme activities of juvenile *Ctenopharyngodon idellus*. Freshwater Fisheries, 2009, 39(6): 54–58 [高攀, 蒋明, 文华, 等. 不同蛋白能量比饲料对草鱼幼鱼消化酶活性的影响. 淡水渔业, 2009, 39(6): 54–58]
- Gao XL, Feng S, Wang LM, *et al.* The joint toxicity studies of anthracene and five kinds of phenolic compounds to *Misgurnus anguillicadatus*. Reservoir Fisheries, 2004, 24(2): 65–66 [高晓莉, 凤生, 王丽敏, 等. 蒽与 5 种酚类化合物对泥鳅的联合毒性研究. 水利渔业, 2004, 24(2): 65–66]
- Haard NF. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. Food Research International, 1992, 25(4): 289–307
- Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al.* Effects of ammonia stress on the gill Na^+/K^+ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 538–545 [胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 2012, 36(4): 538–545]
- Leng XJ, Li XQ, Wei YC, *et al.* Effect of xanthophyll addition on body color of *Clarias fuscus*. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(1): 38–42 [冷向军, 李小勤, 韦友传, 等. 饲料中添加叶黄素对胡子鲶体色的影响. 水产学报, 2003, 27(1): 38–42]
- Lei X, Li ZQ, Lian ZM, *et al.* Acute toxicity effects of bisphenol A and *p*-nitrophenol to *Misgurnus anguillicadatus*. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(11): 2257–2261 [雷忻, 李宗强, 廉振民, 等. 双酚 A 和对硝基酚对泥鳅的急性毒性效应. 生态学杂志, 2009, 28(11): 2257–2261]
- Lin HR. Fish physiology. Second edition. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2007, 37–40 [林浩然. 鱼类生理学. 第二版. 广州: 广东高等教育出版社, 2007, 37–40]
- Li YF, Yin YG, Xu SL, *et al.* Physical properties of foods. Beijing: China Light Industry Press, 2009, 99–101 [李云飞, 殷涌光, 徐树来, 等. 食品物性学. 北京: 中国轻工业出版社, 2009, 99–101]
- Lin CH, Tsai RS, Lee TH. Expression and distribution of Na^+/K^+ -ATPase in gill and kidney of the green spotted pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular & Integrative Physiology, 2004, 138(3): 287–295
- Liu JP. Breeding technology of *Salvelinus fontinalis*- characteristic, habit and its breeding experience. China Fisheries, 2005(2): 83–84 [刘建平. 七彩鲑鱼养殖技术——特征、习性及其饲养经验. 中国水产, 2005(2): 83–84]
- Liu LY, Zheng GM. General zoology. Beijing: Higher Education Press, 2009, 340–341 [刘凌云, 郑光美. 普通动物学. 北京: 高等教育出版社, 2009, 340–341]
- Luo HZ, Li WY, Fu RB, *et al.* The effects of salinity on the growth of juvenile *Eleutheronema tetradactylum* and Na^+/K^+ -ATP enzyme. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 94–99 [罗海忠, 李伟业, 傅荣兵, 等. 盐度对四指马鲛幼鱼生长及其鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 94–99]
- Morishima K, Nakayama IK. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). Genetica, 2008, 132(3): 227–241
- Partridge GJ, Jenkins GI. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). Aquaculture, 2002, 210(S1–4): 219–230
- Salm AL, Spaninqs FA, Gresniqt R, *et al.* Background adaptation and water acidification affect pigmentation and stress physiology of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. General and Comparative Endocrinology, 2005, 144(1): 51–59
- Shen ZG, Yang L, Sun CJ, *et al.* Research progress on body color of fisheries. Hebei Fisheries, 2009(11): 48–51 [沈志刚, 杨磊, 孙存军, 等. 养殖鱼类体色改良研究进展. 河北渔业, 2009(11): 48–51]
- Sun P, Yin F, Wang JJ, *et al.* Effects of handling stress on activities of antioxidant enzymes in liver and Na^+/K^+ -ATPase in gill of *Epinephelus moara*. Marine Fisheries, 2014, 36(3): 247–251 [孙鹏, 尹飞, 王建军, 等. 操作胁迫对云纹石斑鱼肝脏抗氧化和鳃 Na^+/K^+ ATPase 活力的影响. 海洋渔业, 2014, 36(3): 247–251]
- Suzuki R, Oshiro T, Nakanishi T. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 1985, 48(1): 45–55
- Wang J, Chen MR, Xie YJ. Ichthyology. Xiamen: Xiamen University Press, 2008, 59 [王军, 陈明茹, 谢仰杰. 鱼类学. 厦门: 厦门大学出版社, 2008, 59]
- Wang ZZ, Fu YJ, Yang L, *et al.* Variations in body color and flesh quality of *Anguilla japonica* populations in different culture models. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(4): 1042–1029 [王志铮, 付英杰, 杨磊, 等. 三种不同养殖模式下日本鳗鲡养成品体色和肌肉品质的差异. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 1042–1029]
- Wang ZZ, Zhao J, Yang L, *et al.* Variations of serum biochemical indices, viscera digestive enzymes activity and antioxidant enzymes activity of three cultured population of *Anguilla japonica*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 403–408 [王志铮, 赵晶, 杨磊, 等. 三种养殖模式下日本鳗鲡养成品血清生化指标和脏器消化酶、抗氧化酶活力的差异. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 403–408]
- Xu JY, Liu Y. Study on color modification of tilapia *Oreochromis niloticus* under environmental background and stress by computer vision. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 164–169 [徐建瑜, 刘鹰. 基于计算机视觉的罗非鱼适应环境的体色变化研究. 水生生物学报, 2009, 33(2): 164–169]
- Yanar M, Tekelioglu N. The effect of zeaxanthin and tank color on pigmentation and growth of goldfish (*Carassius auratus*). Turkish Journal of Biology, 1999(3): 303–307
- Yin F, Sun P, Peng SM, *et al.* Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the ATPase activities in its gill and kidney. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1059–1066 [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1059–1066]
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological Reviews, 1994, 74(1): 139–62
- Yuan LQ, Ma XZ, Wang W, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth and body pigmentation of darkbarbel catfish.

Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(5): 577-584 [袁立强, 马旭洲, 王武, 等. 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长和鱼体色的影响. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 577-584]

Yuan XY, Zou LC, Shentu Y, *et al.* Predation habit of *Trionyx sinensis* on juvenile *Misgurnus anguillicadatus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(1): 206-211 [袁向阳, 邹李昶, 申屠琰, 等. 中华鳖对泥鳅幼鱼的捕食效应. 海洋与湖沼, 2014, 45(1): 206-211]

Zhang YL, Zhang C, Tao SY, *et al.* The meat quality

characteristics of the eel and loach growing in wild and captivity environment. *Journal of Suzhou University*, 2014, 29(3): 90-93 [张玉龙, 张余, 陶善云, 等. 野生与人工养殖黄颡、泥鳅肉的品质差异性分析. 宿州学院学报, 2014, 29(3): 90-93]

Zhao F, Zhuang P, Zhang LZ, *et al.* Responses of antioxidases in different tissues of *Acipenser schrenckii* to increased salinity in water. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(5): 65-69 [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 施氏鲟不同组织抗氧化酶对水体盐度升高的响应. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 65-69]

(编辑 冯小花)

Comparison of the Body Color, Texture, Activities of Viscera Digestive Enzymes, Antioxidant Enzymes and ATP Enzymes of Two Cultured Population of *Misgurnus anguillicaudatus*

YUAN Xiangyang¹, WANG Zhizheng¹①, YANG Cheng¹, FU Yu¹, LI Hongpeng¹,
BAI Xiaoqian¹, ZHU Weidong²

(1. Fishery College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022;

2. Fishery Technology Extension Center of Yuyao, Yuyao 315400)

Abstract *Misgurnus anguillicaudatus* is a fish species with high economical values, and is widely distributed in China except for the Qinghai-Tibet Plateau. The popularity of this fish has been growing due to its high contents of minerals, amino acids and vitamins. Environment is one of the main factors that affect the body color, the texture and the visceral enzyme activities of the fish; hence it has been a hotspot in the research of *M. anguillicaudatus*. In this study we explored the living strategies of *M. anguillicaudatus* raised in two culture models, the pond monoculture (M₁) and the polyculture of turtles, fish and shrimp in the rice field (M₂). The wet earth from the paddy field served as the control (M₀). We analyzed the differences in the body color, the texture, digestive enzymes, antioxidant enzymes and ATP enzymes between the two populations. The average body length and weight of the samples were (113.37±4.55) mm and (13.35±1.23) g for M₁, and (122.69±5.22) mm and (16.43±1.36) g for M₂. SPSS 19.0 and Excel 2003 were employed for data analysis. The results were as follows: (1) The measures of the dorsal chromatism of adult *M. anguillicaudatus* were M₀>M₁ ($P<0.05$). (2) There were significant differences in the measured indicators of the textures of dorsal muscles between the two populations, and all the values followed the order M₂>M₁ ($P<0.05$) except for that of adhesiveness. (3) There was no difference in the activities of the visceral digestive enzymes except for protease (M₂>M₁, $P<0.05$) and lipase (M₁>M₂, $P<0.05$). (4) Activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and POD) of M₂ were higher than those of M₁ ($P<0.05$). There were significant differences in activities of hepatopancreas enzymes between the two populations ($P<0.05$). The activities of Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase and Na⁺-K⁺ ATPase of M₂ were significantly higher than those of M₁ ($P<0.05$).

Key words *Misgurnus anguillicaudatus*; Aquaculture models; Body color; Texture; Digestive enzymes; Antioxidant enzymes; ATPase

① Corresponding author: WANG Zhizheng, E-mail: wzz_1225@163.com

热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应*

曹家旺^{1,2,3} 孔 杰^{1,2} 罗 坤^{1,2} 栾 生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 史晓丽^{1,2}
卢 霞^{1,2} 冯亚萍^{1,2,3} 王 军^{1,2,3} 王明珠^{1,2,3} 孟宪红^{1,2①}

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

摘要 本研究拟探究经热灭活的白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)能否诱导中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)产生免疫致敏反应。将具有典型白斑综合征症状的对虾肌肉剁碎后经 60℃ 灭活 1 h, 采用单尾定量口饲的方法, 连续 6 d 投喂不同水温条件(15℃、23℃、28℃、32℃)下的实验组对虾(E_{15℃}、E_{23℃}、E_{28℃}、E_{32℃}); 同时设置常温(23℃)条件下阳性对照组 C_{23℃}(投喂未经灭活的 WSSV 毒饵)、对照组 CF_{23℃}(只投喂商业配合饲料)。在实验第 13 天对存活个体进行第二次人工 WSSV 感染, 结果显示, WSSV 经 60℃ 处理 1 h 可彻底失活, 表现为连续投喂 6 d 至第二次人工感染期间无对虾死亡, 而阳性对照组 C_{23℃} 死亡率为 100%。截止实验第 19 天, E_{15℃}、E_{23℃}、E_{28℃}、E_{32℃} 各组存活率分别为 80.41%、33.29%、8.47%、16.43%, CF_{23℃} 组的存活率为 8.89%, E_{15℃} 组与其他各实验组差异极显著($P < 0.01$), E_{23℃} 与 CF_{23℃}、E_{28℃}、E_{32℃} 组差异显著($P < 0.05$), E_{28℃} 和 E_{32℃} 组差异不显著($P > 0.05$); 对各组实验材料进行 WSSV 绝对荧光定量检测, 结果显示, 经热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾二次感染 WSSV 后, 28℃ 环境下病毒增殖速度最快, 高温(32℃)和低温(15℃)都会不同程度抑制 WSSV 的增殖速度。实验表明, 热灭活 WSSV 可以诱导中国明对虾产生免疫致敏反应, 对受 WSSV 感染的中国明对虾具有一定的保护作用; 温度与 WSSV 的增殖速度密切相关。

关键词 免疫致敏; 热灭活; 存活率; 绝对荧光定量; 白斑综合征病毒

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0128-09

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)又称东方对虾, 旧称中国对虾(*Penaeus chinensis*), 主要分布在黄、渤海海域, 是我国重要的土著海水养殖动物之一, 其养殖产业近十几年来一直受病原困扰。在诸多病原中, 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)引起的白斑综合征发病快、破坏性强且防治困难。对虾感染 WSSV 后, 一般 3-10 d 内累积死亡率可达到

100% (Chou *et al.*, 1995; Hossain *et al.*, 2015), 成为危害对虾养殖业最大的病原之一, 对我国乃至全球范围内的对虾产业造成了重大经济损失, 严重阻碍了对虾产业的持续健康发展(衣启麟等, 2014)。经过育种学家不懈的努力, 我国已有“黄海 1 号”(2003 年)、“黄海 2 号”(2008 年)、“黄海 3 号”(2013 年)3 个中国明对虾养殖新品种, 一定程度上恢复了中国明对虾养殖业(李健

* 国家自然科学基金(31372523)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和泰山学者良种工程项目共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31372523), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), and Taishan Scholar Program for Seed Industry]. 曹家旺, E-mail: weifengchui555@yeah.net

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-23, 收修改稿日期: 2016-02-04

等, 2005、2015; 孔杰等, 2012)。

对虾等甲壳类作为重要的水产养殖经济对象, 较脊椎动物缺少完善的免疫系统, 更容易受到暴发性疾病的影响而大面积患病或死亡(刘昂等, 2013; 曾祥兴等, 2009)。疾病的发生与对虾本身的免疫水平、感染方式和环境因素紧密相关(吴信忠, 2005; 孙成波等, 2006), 国内外学者用多种实验技术对 WSSV 展开研究, 涉及对虾免疫学、WSSV 感染机理及环境因素对疾病产生的影响等(李一宁等, 2010)。

普遍认为, 对虾等无脊椎动物缺少抗体这一类关键性的免疫分子, 因此相关研究主要以天然的免疫反应为主。然而, 随着研究的深入, 发现对虾血清同样存在与脊椎动物免疫球蛋白(Ig, Immunoglobulin)功能非常类似、能识别“异己”成分的特异性免疫分子(章跃陵等, 2001; 王雷等, 1995; 王伟庆等, 1998)。研究发现, 对虾等能够产生特异性的免疫保护, Venegas 等(2000)对感染 WSSV 后存活的日本囊对虾(*Marsupenaesu japonicus*)进行二次感染, 与对照相比, 其死亡率降低了 49%; 李战军等(2012)用 γ 射线照射含有 WSSV 的患病对虾肌肉, 连续饲喂 20 d 后进行二次感染, 存活率提高 45%以上。朱斐(2009)¹⁾利用双乙烯亚胺(BEI)灭活 WSSV 病毒悬液, 注射诱导 7 d 后二次感染, 相对保护率达到 60%。有学者将这种再次受到相同病原感染后, 免疫保护作用显著增强、死亡率降低的现象, 称之为特异性的免疫致敏(Immune priming)(Tom *et al*, 2004; Schmid-Hempel *et al*, 2005), 也有学者称之为类免疫反应(Quasi-immune response)(Venegas *et al*, 2000)。

疾病的发生不仅与对虾的抗病力相关, 还与环境因子密切相关, 内外因共同作用, 才会促使疾病暴发(刘波等, 2003)。Hewitt 等(2001)研究发现, 温度作为对虾生存环境的重要因子, 影响对虾代谢、摄食、生长、存活和免疫力的强弱, 且与疾病的感染密切联系。Vidal 等(2001)和 Rahman 等(2007)研究发现, 高温可延长感染 WSSV 后对虾的存活时间; 宋晓玲等(1996)发现, 17–19℃是中国明对虾白斑综合征发生的最低温度, 17℃是 WSSV 在其体内增殖的最低温度。

目前, 针对对虾免疫致敏现象的研究还处在初步阶段, 本研究通过热灭活(60℃处理 1 h) WSSV 诱导对虾免疫致敏反应, 并设置不同的实验温度, 用实时荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR)进行病毒载量的检测, 探究热灭活 WSSV 诱导免疫致敏反应的有效性及其温

度与 WSSV 增殖之间的关系, 以期为白斑综合征的预防提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用健康中国明对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心, 平均体重为(0.21±0.08) g, 平均体长为(24.71±3.90) mm。实验用水为经砂滤的自然海水, 盐度为 29±1。实验前随机取 3 尾对虾提取 DNA 后进行 WSSV 荧光定量 PCR 检测, 检测结果为阴性。

1.2 口饲感染毒饵的制备

取感染 WSSV 且症状明显的中国明对虾腹节肌肉, 剁碎成泥状后装入钵中继续充分研磨, 加入适量食用红色素并混合均匀, -80℃冰箱冷藏。

1.3 热灭活 WSSV 饵料的制备

材料选择及破碎的方法同 1.2 所述, 参考 Balasubramanian 等(2006)的灭活方法, 将粉碎后的对虾肌肉于 60℃恒温培养箱中灭活处理 1 h, 充分研磨后加入适量可食用红色素并充分混合均匀, -80℃冰箱保存。

1.4 实验分组及管理

根据实验温度(低温 15℃、常温 23℃、高温 28℃、高温 32℃)及投喂的饵料(未经灭活的 WSSV 毒饵、热灭活饵料、商业配合饵料)的不同, 将实验用中国明对虾随机分成 6 组, 分别为阳性对照组 C_{23℃}(投喂未经灭活的 WSSV 毒饵+商业配合饲料)、商业饵料对照组 CF_{23℃}(只投喂商业配合饲料)、实验组 E_{15℃}、E_{23℃}、E_{28℃}、E_{32℃}(投喂热灭活饵料+商业配合饲料), 每组设置 3 个重复(30 尾/重复), 放入 26.5 cm×20 cm×16.5 cm 的整理箱。每个整理箱内安放一个气石, 然后将每组 3 个小整理箱放入 72 cm×52 cm×44 cm 大整理箱中, E_{15℃}组放入泡沫箱中。实验期间自然水温为(23.0±1.8)℃, C_{23℃}、CF_{23℃}和 E_{23℃}组维持自然水温, E_{28℃}和 E_{32℃}组放置加热棒控制温度, E_{15℃}组通过调整常温海水与冰块配比来控制温度。分组后自然温度暂养 3 d, 随后开始升温或降温操作, E_{28℃}和 E_{32℃}组在自然水温基础上每天升高 1℃, E_{15℃}组在自然水温的基础上每天降低 1℃, 升(降)至设定温度后保持此温度到实验结束。每

1) Zhu F. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus with inactivated WSSV and polysaccharide. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009, 20–34 [朱斐. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)灭活制剂及多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 作用的研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009, 20–34]

天吸底换水 1 次, 每 3 h 观察 1 次, 捞出死虾并记录死亡时间。

1.5 热灭活饵料的饲喂及二次感染

对照组 CF_{23℃}每天投喂 4 次配合饲料; C_{23℃}组每天投喂 1 次未经灭活的 WSSV 毒饵(约 5 mg/尾), 其余时间投喂商业配合饲料。实验组在实验第 1–6 天每天投喂 3 次配合饲料及 1 次热灭活的 WSSV 饵料(约 5 mg/尾), 日投喂总量约为体重的 5%。在实验第 12 天对存活个体进行二次 WSSV 人工感染, 投喂含 WSSV 饵料时采用单尾定量口饲方法(授权专利号: ZL201210 107377.8), 5 mg 毒饵含有 WSSV 约为 8.24×10^8 copies。

1.6 样品采集及处理

在实验开始第 2、4、6、10、12 天及二次感染(12 d)后第 6、12、24、48、72、120 h, 共 11 个时间点取样, 每重复、每取样点分别取 1 尾存活对虾(即每组取 3 尾), 置于 -80°C 保存; 实验共进行 19 d, 然后收集所有存活个体置于 -80°C 冰箱冻存, 取肌肉组织用于提取基因组 DNA。

1.7 DNA 提取及实时荧光定量 PCR

DNA 提取参照王伟继(2008)¹⁾的方法。DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 利用 EC3 Imaging system 检测 DNA 完整性, 使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis Bo-2000)测定 DNA 质量及浓度, 稀释至 40 ng/ μl 备用。WSSV 含量采用 TaqMan qRT-PCR 方法测定(Durand *et al.*, 2002), 目标片段长度为 69 bp, 引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

qRT-PCR 反应体系(20 μl): 1 \times Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)、正反向引物各 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、ROX Reference Dye II 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、探针 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 、病毒 DNA 模板 2 μl , 灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火及延伸 34 s, 共 40 个循环。以本实验室自行制备含有目的片段的重组质粒 PUCm-T/WSSV69 为标准品, 将 WSSV 标准品进行 10 倍系列梯度稀释, 共 7 个梯度, 分别为 $(1.02 \times 10^2 - 1.02 \times 10^8)$ copies/ μl , 无菌双蒸水作为阴性对照, 每个稀释度设 3 个平行, 用作阳性对照及标准曲线的构建。每个 DNA 样品平行检测 3 次, 取其平均值作为该样品 WSSV 载量。

1.8 数据处理及分析

存活时间(h)从二次感染后(13 d)0 h 开始计算:

存活率=存活对虾数/初始对虾数 $\times 100\%$;

死亡率=对虾死亡数/初始对虾数 $\times 100\%$;

数据处理分析使用 SPSS 19.0、Origin 9.0 等软件进行差异显著性分析和多重比较, 分别在差异显著水平 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 进行分析。

2 结果

2.1 二次感染前死亡率及病毒载量变化

实验第 1–12 天各实验组(E_{15℃}、E_{23℃}、E_{28℃})以及 CF_{23℃} 组未出现死亡个体, 阳性对照 C_{23℃} 在投喂未经灭活的 WSSV 饵料后 35 h 开始出现死亡个体, 至 126 h 累积死亡率达到 100%。表明 60°C 处理 1 h 可以将 WSSV 完全灭活。

表 1 1–12 d 内(二次感染前)各组别中国明对虾病毒载量变化(copies/ng DNA)

Tab.1 The change of *F. chinensis* viral load between 1–12 d (before subsequent rechallenge) (copies/ng DNA)

时间 Time(d)	组别 Groups					
	C _{23℃}	CF _{23℃}	E _{23℃}	E _{15℃}	E _{28℃}	E _{32℃}
2	$4.54 \times 10^4 \pm 1.25 \times 10^2$ ^A	9.32 ± 1.62 ^{Ba}	6.31 ± 2.58 ^{Ba}	2.54 ± 0.99 ^{Ba}	11.89 ± 5.65 ^{Ba}	12.79 ± 7.55 ^{Ba}
4	$1.55 \times 10^6 \pm 4.28 \times 10^3$ ^A	14.68 ± 3.15 ^{Ba}	8.12 ± 0.98 ^{Ba}	8.28 ± 1.26 ^{Ba}	17.10 ± 3.34 ^{Ba}	6.35 ± 2.56 ^{Ba}
6	$4.10 \times 10^6 \pm 1.89 \times 10^3$ ^A	54.12 ± 2.86 ^{Ba}	15.34 ± 6.75 ^{Bb}	5.75 ± 4.24 ^{Bb}	7.14 ± 4.78 ^{Bb}	4.93 ± 1.67 ^{Bb}
10	—	71.99 ± 15.66 ^b	25.67 ± 6.22 ^c	6.31 ± 2.53 ^d	109.64 ± 45.32 ^a	10.77 ± 3.21 ^{cd}
12	—	91.55 ± 12.32 ^d	143.81 ± 25.55 ^c	9.96 ± 3.78 ^e	465.73 ± 88.90 ^a	208.34 ± 74.32 ^b

注: 同行标有不同大写字母者表示组间差异极显著($P < 0.01$); 标有不同小写字母者表示组间差异显著($P < 0.05$); 标有相同小写字母者表示组间差异不显著($P > 0.05$)

Note: Different capital letters within the same line showed highly significant difference between groups ($P < 0.01$); different small letters showed significant difference between groups ($P < 0.05$); same small letters indicated no significant difference between groups ($P > 0.05$)

1) Wang WJ. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008, 66–73 [王伟继. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状 QTL 定位. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 66–73]

实验开始后, 阳性对照组 C_{23}° 在实验第 2 天病毒载量达到 1.55×10^6 copies/ng DNA, 而 CF_{23}° 、 E_{23}° 、 E_{15}° 、 E_{32}° 组对虾体内病毒含量一直处于较低水平 $[(2.54 \pm 0.99) - (465.73 \pm 88.90)$ copies/ng DNA], 与 C_{23}° 组病毒载量差异极显著 ($P < 0.01$) (表 1)。 E_{32}° 组在 166 h 出现 1 尾死亡个体, 截至到二次感染前(12 d), E_{32}° 组共出现 6 尾死亡个体, 对 6 尾死亡个体进行病毒含量检测, 结果显示, 其平均病毒载量为 (29.60 ± 8.65) copies/ng DNA, 表明 E_{32}° 组在二次感染前出现的死亡个体不是由 WSSV 导致。

2.2 不同条件下中国明对虾二次感染 WSSV 后存活时间的差异

E_{23}° 组连续 6 d 饲喂热灭活 WSSV 饵料诱导免疫致敏, CF_{23}° 组在整个实验过程中只投喂商业配合饲料, 作为对照组, 在实验第 13 天对所有存活对虾进行二次感染。截止到实验第 19 天, E_{23}° 和 CF_{23}° 组死亡个体的平均存活时间分别为 (106.19 ± 26.83) h 和 (92.05 ± 25.38) h, 2 组进行独立样本 T 检验, 结果显示, 2 组平均存活时间差异显著 ($P < 0.05$)。 E_{15}° 、 E_{28}° 、 E_{32}° 与 E_{23}° 组同样连续 6 d 饲喂经热灭活 WSSV 饵料, 平均存活时间分别为 (136.00 ± 9.80) h、 (89.24 ± 27.19) h、 (84.53 ± 26.70) h 和 (106.19 ± 26.83) h, 结果表明, 随着实验温度升高, 各温度组对虾感染 WSSV 后平均存活时间下降(图 1)。经过单因素方差分析, E_{23}° 、 E_{28}° 、 E_{32}° 与 E_{15}° 组对虾的平均存活时间差异极显著 ($P < 0.01$), E_{28}° 、 E_{32}° 与 E_{23}° 组对虾的平均存活时间差异显著 ($P < 0.05$), 而 E_{28}° 和 E_{32}° 组平均存活时间差异不显著 ($P > 0.05$)。

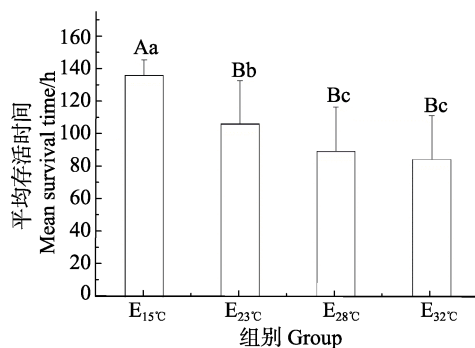


图 1 中国明对虾二次感染 WSSV 后不同温度组平均存活时间

Fig.1 The mean survival time of *F. chinensis* under different temperature after subsequent rechallenge

不同的大写字母表示极显著差异 ($P < 0.01$), 不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)

Different capital letters on the graph showed highly significant difference ($P < 0.01$), different small letters on the graph showed significant difference ($P < 0.05$)

2.3 不同条件对中国明对虾二次感染 WSSV 后存活率、累积死亡率的影响

二次感染从第 13 天持续到第 19 天, CF_{23}° 和 E_{23}° 组存活率分别为 $(8.89 \pm 3.85)\%$ 和 $(33.29 \pm 2.02)\%$ (表 2)。经独立 T 检验, 2 组存活率存在显著差异 ($P < 0.05$)。热灭活 WSSV 诱导的各实验组存活率随着实验水温的提高而逐渐降低, 其中, E_{28}° 组的存活率最低, 为 $(8.47 \pm 9.50)\%$; E_{15}° 组的存活率最高, 达到 $(80.41 \pm 5.84)\%$; E_{15}° 、 E_{23}° 组与其他各组之间的存活率具有显著差异 ($P < 0.05$), 而 E_{28}° 和 E_{32}° 组无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 中国明对虾二次感染 WSSV 后的存活率

Tab.2 The survival rate of *F. chinensis* after subsequent rechallenge

组别 Groups	存活数/总数(存活率) Survival number/Sum (Survival rate %)			平均存活率 Mean survival rate (%)
	1	2	3	
CF_{23}°	1/15(6.67)	1/15(6.67)	2/15(13.33)	8.89±3.85
E_{23}°	5/16(31.25)	6/17(35.29)	5/15(33.33)	33.29±2.02 ^a b
E_{15}°	16/19(84.21)	15/18(83.33)	14/19(73.68)	80.41±5.84 ^a
E_{28}°	1/15(6.67)	3/16(18.75)	0/15(0)	8.47±9.50 ^c
E_{32}°	1/10(10.0)	3/12(25.00)	2/14(14.29)	16.43±7.73 ^c

注: E_{23}° 与 CF_{23}° 组进行独立样本 T 检验, 同列中标有 * 表示组间差异显著 ($P < 0.05$); 对 E_{15}° 、 E_{28}° 、 E_{32}° 和 E_{23}° 组进行多重比较, 同列中标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Using the independent samples T-test to E_{23}° and CF_{23}° , the means marked with “*” within the same row were significantly different at the 0.05 probability level ($P < 0.05$); Having multiple comparison to E_{15}° 、 E_{28}° 、 E_{32}° and E_{23}° , the means with different letters within the same row were significantly different at the 0.05 probability level ($P < 0.05$)

各实验组在二次感染后 48 h 前后出现死亡个体, CF_{23}° 、 E_{28}° 和 E_{32}° 组在感染后 4 d 累积死亡率分别为 57.78%、54.35% 和 61.11%, 此时, E_{15}° 组和 E_{23}° 组的累积死亡率仅为 5.36% 和 25.00% (图 2)。到实验结束, CF_{23}° 、 E_{28}° 和 E_{32}° 组累积死亡率达到 91.11%、91.30% 和 83.33%, E_{15}° 和 E_{23}° 组累积死亡率为 19.64% 和 66.67%。经热灭活 WSSV 诱导的 E_{23}° 组比未经诱导的 CF_{23}° 组累积死亡率低 24.44%。

2.4 二次感染后各实验组取样及存活个体病毒载量

二次感染后 12 h, 各实验组对虾体内病毒载量开始快速增加, 其中, E_{28}° 组增加速度最快, E_{23}° 和 CF_{23}° 组次之, E_{15}° 组增加速度最慢, 而 E_{32}° 组呈现先增加

后降低的趋势(图 3)。二次感染后 24 h, E₂₈c 组病毒载量达到 2.37×10⁶ copies/ng DNA, E₃₂c 组病毒载量为 8.97×10⁵ copies/ng DNA, E₂₃c 和 CF₂₃c 组病毒载量分别为 1.60×10⁴ 和 4.54×10⁴ copies/ng DNA, 但 E₁₅c 组病毒载量仅有 52 copies/ng DNA(表 3)。

对各实验组和对对照组的存活个体进行病毒载量检测, 对照组 CF₂₃c 的平均病毒载量为 1.59×10⁷ copies/ng DNA, 而相同温度条件下的实验组 E₂₃c 的平均病毒载量为 6.54×10⁶ copies/ng DNA, 二者差异显著(P < 0.05)。

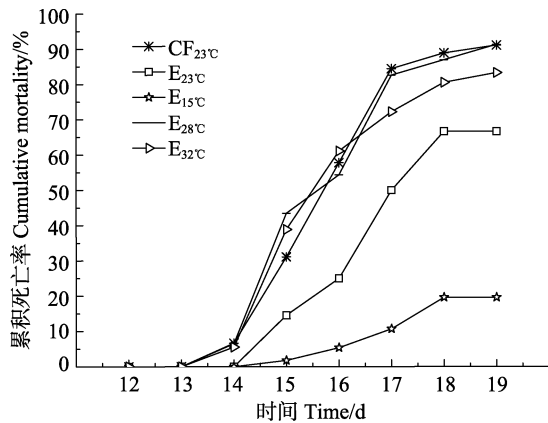


图 2 不同条件下中国明对虾的累积死亡率
Fig.2 The cumulative mortality of *F. chinensis* under different conditions

典型特征之一就是无特异性免疫, 不能产生免疫记忆。但越来越多的研究发现, 无脊椎动物的免疫系统没有普遍认为的那么简单, 无脊椎动物在受到病原体的感染后也会启动复杂的免疫防御机制。在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)(曹慧等, 2009)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)(张涛, 2014)¹⁾ 以及日本囊对虾 (*Venegas et al, 2000*) 等无脊椎动物中都曾发现, 经过特定病原免疫刺激后, 再次用同样病原二次感染, 其感染率和致死率均呈下降趋势。这一发现对无脊椎动物的疾病防控指引了新的方向, 也对饱受病害困扰的对虾等无脊椎动物的健康养殖带来了曙光。

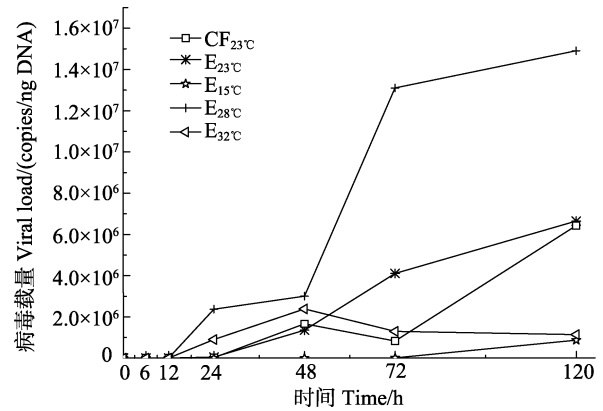


图 3 二次感染后不同组别的病毒载量变化
Fig.3 The change of viral load after subsequent rechallenge in different groups

3 讨论

3.1 免疫致敏对中国明对虾的保护

在以往的认识中, 无脊椎动物区别于脊椎动物的

白斑综合征是一种严重危害对虾健康养殖的病毒性疾病, 许多学者以 WSSV 为病原体感染对虾, 围绕着白斑综合征的囊膜蛋白与对虾自身的免疫防御机制展开了大量细致的研究。Witteveldt 等(2004)

表 3 不同组别中国明对虾二次感染 WSSV 后的病毒载量变化(copies/ng DNA)

Tab.3 The change of viral load of *F. chinensis* in different groups after subsequent rechallenge (copies/ng DNA)

组别 Groups	时间 Time (h)						存活 Survived
	6	12	24	48	72	120	
CF ₂₃ c	2.32×10 ²	1.31×10 ^{3a}	1.60×10 ^{4b}	1.66×10 ^{6a}	8.21×10 ^{5c}	6.42×10 ^{6b}	1.59×10 ^{7a}
E ₂₃ c	2.28×10 ²	1.39×10 ^{3a}	4.54×10 ^{4b}	1.35×10 ^{6a}	4.10×10 ^{6b}	6.64×10 ^{6b}	6.54×10 ^{6b}
E ₁₅ c	3.88×10 ¹	4.29×10 ^{1b}	5.20×10 ^{1c}	8.52×10 ^{2b}	4.30×10 ^{3c}	8.60×10 ^{5c}	1.77×10 ^{3c}
E ₂₈ c	7.91×10 ²	1.67×10 ^{3a}	2.37×10 ^{6a}	3.00×10 ^{6a}	1.31×10 ^{7a}	1.49×10 ^{7a}	1.74×10 ^{7a}
E ₃₂ c	2.17×10 ²	2.56×10 ^{2b}	8.97×10 ^{5b}	2.38×10 ^{6a}	1.29×10 ^{6bc}	1.13×10 ^{6c}	8.41×10 ^{5c}

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著(P<0.05); 标有相同小写字母者表示组间差异不显著(P>0.05)

Note: Different small letters within the same row showed significant difference between groups (P<0.05); the same small letters indicated no significant difference between groups (P > 0.05)

1) Zhang T. A preliminary study on the mechanism of immune sensitization of *Crassostrea gigas*. Master's Thesis of Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, 2014, 17-33 [张涛. 长牡蛎免疫致敏机制的初步研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2014, 17-33]

用原核表达系统表达出 WSSV 主要囊膜蛋白 VP28, 将该蛋白作为抗原免疫对虾, 取得了一定的效果。Jha 等(2006)用酵母细胞表达出了 VP28 和 VP19 蛋白, 发现将这 2 种蛋白组合免疫对虾, 免疫效果比单个免疫更为有效。但这些研究仅融合了一种或几种囊膜蛋白, 导致病毒的免疫原性降低。有学者对完整 WSSV 进行灭活, 朱斐(2009)¹⁾利用双乙炔亚胺(BEI)灭活 WSSV 悬液后注射克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*), 免疫保护率高达 60%。但上述研究诱导对虾产生免疫反应均是通过注射诱导的方式, 而注射方式不适用于本研究中较小的对虾个体[平均体重为(0.21±0.08) g, 平均体长为(24.71±3.90) mm]。

Balasubramanian 等(2006)用 60℃ 灭活 WSSV 悬液, 注射感染印度对虾(*Penaeus indicus*), 感染后 20 d 死亡率为 0。本研究在 1–6 d 连续投喂 60℃ 灭活的 WSSV 毒饵, 未出现因感染 WSSV 而死亡的个体, 证明了灭活的有效性。通过热灭活方式处理患病对虾的肌肉, 人工饲喂热灭活 WSSV 诱导中国明对虾产生免疫致敏现象, 连续 6 d 投喂热灭活 WSSV 饵料的实验组与只投喂配合饵料的对照组相比, 平均存活时间和存活率有了显著性提高(表 2), 其死亡趋势也要比对照组 CF_{23℃}更为缓慢(图 2)。对实验结束后存活个体的病毒载量检测发现, 饲喂商业配合饲料的 CF_{23℃}组病毒载量要高于投喂灭活饵料的 E_{23℃}组(表 3), 这可能是由于灭活 WSSV 进入对虾体内后, 使对虾血清中产生中和 WSSV 的物质, 抑制了 WSSV 的复制, 从而在一定程度上保护了感染 WSSV 的对虾(Venegas *et al.*, 2000)。Wu 等(2005)则认为, 免疫致敏的作用机制是前期免疫诱导阶段进入对虾体内 WSSV 囊膜蛋白抢占了 WSSV 与靶细胞的结合位点, 但不能否认还会有大量的 WSSV 可以进入宿主细胞。热灭活诱导免疫致敏的方法简单经济, 适合大规模应用, 尤其适合筛选在免疫致敏反应上有差异的群体或家系, 对进一步加速中国明对虾抗性遗传选育、实施 WSSV 的有效防治具有重要实际应用价值, 同时, 为进一步揭示免疫致敏现象的分子机制提供可能性。但热灭活的局限性在于其导致蛋白构象发生部分改变, 在一定程度上降低了免疫原性。实验也存在着诱导后二

次感染存活率不高的问题, 这可能与中国明对虾的 WSSV 易感性相关(江世贵等, 2000; 盖春蕾等, 2013)。

3.2 不同温度对 WSSV 增殖的影响

温度不仅直接影响对虾的新陈代谢、抗病能力、饲料转化率和生存发育, 还对病毒及细菌在对虾体内的增殖有重要影响(向赞等, 2014)。许多水产动物疾病的发生与季节有密切关系, 对虾白斑综合征的发生也有明显的季节性, 吴定虎等(1995)²⁾研究发现, 对虾流行病的高峰期是在 4–5 月和 9–10 月, 水温较低和水温较高时疾病不容易暴发, 许多病原体都需要较合适的增殖温度范围。本研究设置 15℃、23℃、28℃ 和 32℃ 共 4 个温度梯度, 研究结果显示, 中国明对虾经过热灭活 WSSV 诱导后, 28℃ 条件下 WSSV 致病力最强, 这表现 28℃ 组在实验结束时累积死亡率最高(图 2)。实验还通过 qRT-PCR 方法跟踪了各个温度条件下病毒的增殖情况, 发现 28℃ 条件下病毒复制速度最快(表 2 和图 3), 这与李侃等(2013)和张俊儒等(2008)在未经诱导直接感染 WSSV 病毒所得出的结论一致。本研究中, E_{15℃}组存活率最高(80.41%)(表 2), 病毒载量变化(图 3)也揭示了此温度下病毒增殖速度要比 23℃、28℃ 和 32℃ 组要缓慢。这与张俊儒等(2008)和 Jiravanichpaisal 等(2004)的研究结论一致: 当水温低于 16℃ 时, 低温抑制了病毒的增殖从而使对虾体内的病毒载量处在一个比较低的水平, 从而使 WSSV 的致病力降低。

温度对 WSSV 影响研究更多集中在高温(30℃ 以上)对 WSSV 的抑制上, You 等(2010)设置 27℃ 和 31℃ 两个梯度对日本囊对虾幼虾和成虾分别感染, 发现 31℃ 条件下对虾死亡率大大降低。李侃等(2013)通过激光共聚焦显微镜发现, WSSV 进入宿主细胞的能力与温度密切相关, 33℃ 条件下进入细胞的病毒数明显比 27℃ 少。Wongmaneeprateep 等(2010)在研究水温对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染 WSSV 的影响时发现, 对虾持续在(32±1)℃ 下养殖或在此温度下养殖 7 d 后水温降至(28±1)℃, 感染了 WSSV 的对虾没有出现疾病症状和死亡, 大大提高了对虾的存活率。本研究中, 32℃ 组病毒载量的变化呈现先上升后下降的趋势(图 3), 说明

1) Zhu F. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus with inactivated WSSV and polysaccharide. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009, 20–34 [朱斐. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)灭活制剂及多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 作用的研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009, 20–34]

2) Wu DH, Chen XF. Epidemiological study on virus disease of cultured shrimp. Proceedings of the second national symposium on disease control and environmental management of cultured shrimp. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1995, 84–87 [吴定虎, 陈细法. 养殖对虾病毒病的流行病学研究. 第二届全国人工养殖对虾疾病防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995, 84–87]

高温抑制了 WSSV 的增殖。但本实验 32℃组在二次感染之前出现部分死亡个体,二次感染后最终累积死亡率也高达 83.33%(图 2),说明高温对中国明对虾并没有提供有效的保护。Rahman 等(2007)的研究证明,当以较高剂量感染对虾或者当对虾出现典型的白斑综合征症状后再将温度升到 33℃左右时,不仅不能对已感染的对虾提供保护,反而加速了 WSSV 病毒的增殖过程,加速了对虾死亡进程。这可能是因为以较大剂量感染时,WSSV 在较短的时间内就会侵入全身各组织,给对虾机体造成不可逆转的损伤;也可能是因为较高的水温造成了水体溶解氧含量减少、水质变坏、细菌滋生等,从而损伤对虾的身体机能(Limsuwan *et al.*, 2012),这说明高温对对虾的保护是条件性的、不确定性的。

综上所述,饲喂热灭活 WSSV 饵料可以诱导中国明对虾产生免疫致敏现象,但免疫保护强度较弱,仅在一定程度上增加了中国明对虾感染 WSSV 后存活的时间,需要对病毒的灭活方式以及如何高效诱导免疫致敏现象进一步探究。在实际生产中,温度作为一个重要的环境因子,应该引起足够的重视,适时地根据水体温度的变化采取有效措施,防止疾病的发生。

参 考 文 献

- Balasubramanian G, Sudhakaran R, Syed Musthaq S, *et al.* Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(9): 569–572
- Cao H, Li ZY, Wang QX. The progress of research on *Drosophila* innate immunity. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2009, 46(2): 196–202 [曹慧, 李宗芸, 王秋香. 果蝇先天性免疫研究进展. *昆虫知识*, 2009, 46(2): 196–202]
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 23(3): 165–173
- Durand SV, Lightner DV. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381–389
- Gai CL, Xu L, Ye HB, *et al.* Comparison of sensitivities of *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus Japonicus* to white spot syndrome virus (WSSV). *Fisheries Science and Technology Information*, 2013, 40(4): 207–209 [盖春蕾, 许拉, 叶海斌, 等. 中国对虾和日本对虾对白斑综合征病毒(WSSV)敏感性的比较. *水产科技情报*, 2013, 40(4): 207–209]
- Hewitt DR, Duncan PF. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 305–313
- Hossain A, Nandi SP, Siddique MA, *et al.* Prevalence and distribution of White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(2): 128–134
- Jha RK, Xu ZR, Shen J, *et al.* The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology Letters*, 2006, 105(1): 68–76
- Jiang SG, He JG, Ma ZM, *et al.* The infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) to larvae and postlarvae of *Penaeus monodon*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 172–176 [江世贵, 何建国, 马之明, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(S1): 172–176]
- Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(3): 265–275
- Kong J, Luo K, Luan S, *et al.* The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1854–1862 [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]
- Li J, He YY, Wang QY, *et al.* Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 61–66 [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 3 号”新品种的培育. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 61–66]
- Li J, Liu P, He YY, *et al.* Artificial selection in the new breed of *Fenneropenaeus chinensis* named “Yellow Sea 1” based on fast growth trait. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 1–5 [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]
- Li K, Luo SY, Xu LM. A study on the mechanism of temperature impact on the proliferation of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Applied Oceanography*, 2013, 32(1): 61–66 [李侃, 罗淑娅, 徐丽美. 温度影响对虾白斑综合症病毒增殖机制的研究. *应用海洋学学报*, 2013, 32(1): 61–66]
- Li YN, Liang Y, Huang J, *et al.* Research progress on the molecular pathogenic mechanism of white spot syndrome virus. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(7): 3533–3536 [李一宁, 梁艳, 黄捷, 等. 对虾白斑综合症病毒分子致病机制的研究进展. *安徽农业科学*, 2010, 38(7): 3533–3536]
- Li ZJ, Meng XH, Kong J, *et al.* Quasi-immune response of *Fenneropenaeus chinensis* to WSSV and its verification. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 989–993 [李战军, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾对白斑综合症病毒的类免疫反应与验证. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 989–

- 993]
- Limsuwan C, Ching CA. Temperature affects shrimp survival, feed conversion. *Global Aquaculture Advocate*, 2012(4): 17-19
- Liu A, Cha GC, Zhang ZX, *et al.* Research progress of immunity systems and regulatory mechanisms of penaeid shrimps. *Journal of Hanshan Normal University*, 2013, 34(3): 60-66 [刘昂, 查广才, 张振霞, 等. 对虾免疫系统及调控机制的研究进展. 韩山师范学院学报, 2013, 34(3): 60-66]
- Liu B, Yu ZM. A method research of establishing the latent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus japonicus*. *Marine Sciences*, 2003, 27(8): 72-76 [刘波, 俞志明. 建立白斑综合症病毒在日本对虾体内潜伏性感染的方法研究. 海洋科学, 2003, 27(8): 72-76]
- Rahman MM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, *et al.* Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 2007, 269(1): 107-113
- Rahman MM, Corteel M, Wille M, *et al.* The effect of raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 240-245
- Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 2005, 50: 529-552
- Song XL, Huang J, Wang CM, *et al.* Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *Journal of Fisheries of China*, 1996, 20(4): 374-379 [宋晓玲, 黄捷, 王崇明, 等. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染. 水产学报, 1996, 20(4): 374-379]
- Sun CB, He JG, Li ZL, *et al.* Sensitivity difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2006, 26(3): 17-20 [孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(3): 17-20]
- Tom JL, Alex RK. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(2): 58-60
- Venegas CA, Nonaka L, Mushiake K, *et al.* Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(2): 83-89
- Vidal OM, Granja CB, Aranguren F, *et al.* A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2001, 32(4): 364-372
- Wang L, Li GY, Mao YX. Measuring methods and variations of some haemolymph factors in *Penaeus chinensis* after their oral ingestion of immuno drugs. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(1): 34-41 [王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 34-41]
- Wang WQ, Li AJ, Lan CX, *et al.* Measuring immune factors in the serum of *Penaeus chinensis* with the method of nephelometry. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(2): 75-79 [王伟庆, 李爱杰, 兰翠霞, 等. 用免疫消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子. 水产学报, 1998, 22(2): 75-79]
- Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlak JM, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, 2004, 78(4): 2057-2061
- Wongmaneeprateep S, Chuchird N, Baoprasertkul P, *et al.* Effects of high water temperature on the elimination of white spot syndrome virus in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Magic Publication Co Ltd*, 2010, 34(2): 13-26
- Wu DH, Chen XF. Epidemiological study on virus disease of cultured shrimp. *Proceedings of the second national Symposium on disease control and environmental management of cultured shrimp*. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1995, 84-87 [吴定虎, 陈细法. 养殖对虾病毒病的流行病学研究. 第二届全国人工养殖对虾疾病防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995, 84-87]
- Wu XZ. Mainstream research progress of Chinese marine disease. *Pacific Journal*, 2005(10): 49-59 [吴信忠. 中国海洋病害学主流研究的进展. 太平洋学报, 2005(10): 49-59]
- Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 2005, 332(2): 578-583
- Xiang Y, Wang G, Yang SW, *et al.* The pathogenicity of *Micrococcus lysodeikticus* and white spot syndrome virus to *Litopenaeus vannamei* under different temperature conditions. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2014, 33(4): 304-310 [向赞, 王刚, 杨绍文, 等. 不同温度条件下溶壁微球菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2014, 33(4): 304-310]
- Yi QL, Wang LL, Song LS, *et al.* White spot syndrome in shrimp and its immunological prevention and control. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, 26(9): 903-911 [衣启麟, 王玲玲, 宋林生. 对虾白斑综合征及其免疫防控. 生命科学, 2014, 26(9): 903-911]
- You X, Su Y, Mao Y, *et al.* Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*, 2010, 305(1-4): 133-137
- Zeng XX, Zhang C, Li KS. The study advance on cellular immunity of invertebrates. *International Journal of Immunology*, 2009, 32(5): 354-358 [曾祥兴, 张驰, 李康生. 无脊椎动物细胞免疫研究进展. 国际免疫学杂志, 2009, 32(5): 354-358]
- Zhang JR, Liu P, Wang QY, *et al.* Effect of water temperature on the infectivity of white spot syndrome virus to the brooders

of *Fenneropenaeus chinensis*. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2008, 38(3): 395–400 [张俊儒, 刘萍, 王清印, 等. 温度对 WSSV 感染中国对虾越冬亲虾的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(3): 395–400]

Zhang YL, Peng XX, Wang SY. Study on three classes of immunoglobulin-like components in *Penaeus japonicus*. Marine Sciences, 2001, 25(5): 37–41 [章跃陵, 彭宣宪, 王三英. 日本对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究. 海洋科学, 2001, 25(5): 37–41]

(编辑 冯小花)

Immune Priming Response Induced by Heat-Inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at Different Temperature

CAO Jiawang^{1,2,3}, KONG Jie^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, SHI Xiaoli^{1,2}, LU Xia^{1,2}, FENG Yaping^{1,2,3}, WANG Jun^{1,2,3}, WANG Mingzhu^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2①}

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao;

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

Abstract This study was designed to explore whether the heat-inactivated WSSV could induce immune priming response on *Fenneropenaeus chinensis*. During the initial 6 days, four experiment groups (E_{15°C}, E_{23°C}, E_{28°C}, and E_{32°C}) were fed with typical symptoms of WSSV prawn muscle, which was dealt with at 60°C for 1 h using the equivalent and quantitative test method. At the same time, we set a positive control group C_{23°C} (fed with the unheat-inactivated WSSV muscle) and a control group CF_{23°C} (fed with commercial compound feed only). At the 13th day of the experiment, all shrimps were infected with WSSV again. The result showed that 60°C could decrease the activity of WSSV absolutely, there were no dead shrimp in the initial 12 d, but the mortality of positive control group C_{23°C} was 100%. The survival rates of different experiment (E_{15°C}, E_{23°C}, E_{28°C}, and E_{32°C}) and control groups were 80.41%, 33.29%, 8.47%, 16.43% and 8.89%, respectively, after 19 days. The survival rate of E_{15°C} showed highly significant difference from other experiments ($P < 0.01$). In addition, there was a significant difference between E_{23°C} experiment group and other experiment groups ($P < 0.05$). Nevertheless, there was no significant difference between E_{28°C} and E_{32°C} groups ($P > 0.05$). Compared to the results of absolute quantitation, it was found that the multiplication rate of WSSV was the highest under 28°C, high (32°C) and low (15°C) temperature would inhibit the multiplication of WSSV in the shrimps which accepted the subsequent rechallenge of WSSV after the heat-inactivated WSSV induced. Experimental results showed that heat-inactivated WSSV could induce immune priming response and provide some protection to the infected shrimp by WSSV. The multiplication rate of WSSV is closely related to temperature.

Key words Immune priming; Heat-inactivated; Survival rate; Absolute quantitation; WSSV

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

栉江珧(*Atrina pectinata*)EST-SSR 标记的 开发与应用



李东明^{1,2} 杨爱国^{2①} 吴彪² 孙秀俊²
周丽青² 刘寒苗^{1,2} 张广明^{1,2}

(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)

摘要 本研究以前期获得的栉江珧(*Atrina pectinata*)转录组数据为基础, 筛选获得 10550 条微卫星标记(SSR), 检出率为 8.2%, 平均 9.01 kb 出现 1 个 SSR 位点。设计并合成 120 对 SSR 引物, 筛选得到 36 对能够稳定扩增的引物, 并利用已获得的 36 对 SSR 引物对青岛海区栉江珧进行了群体遗传多样性分析。结果显示, 12 对引物的扩增片段表现出多态性, 共产生 42 个等位基因, 平均每个位点产生 3.5 个等位基因, 平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)和平均多态信息含量(PIC)分别为 0.417、0.604 和 0.526, 表明青岛海区栉江珧群体的遗传多样性较高。本研究获得的 EST-SSR 标记和群体遗传信息为栉江珧的种质资源保护提供了重要的参考资料。

关键词 栉江珧; EST-SSR; 遗传多样性; 杂合度

中图分类号 Q178.53 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0137-06

微卫星标记(Simple sequence repeat, SSR)因具有多态性丰富、共显性等优点而被广泛应用于种群的遗传结构分析、遗传连锁图谱构建和分子标记辅助育种等。与传统 SSR 开发技术相比, 基于 EST 序列开发 SSR 具有成本低、周期短、与功能基因关联性等特点而被广泛应用。在海洋双壳贝类中, EST-SSR 标记的开发和应用已在泥蚶(*Tegillarca granosa*)(董迎辉等, 2013)、文蛤(*Meretrix meretrix*)(齐晓艳等, 2013)、蛤仔(*Ruditapes variegata*)(闫路路等, 2015)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)(刘博等, 2012a、b)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)(王忠良等, 2015)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)(李云峰等, 2010)等多种贝类

中报道。

栉江珧(*Atrina pectinata*)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、翼形亚纲(Pterimorphia)、贻贝目(Mytiloida)、江珧科(Pinnidae)、江珧属(*Atrina*), 俗称“土杯”、“马蹄”、“骚蛤蜊”等, 广泛分布于温、热带近海海域, 为海产底栖贝类, 具有较高经济价值(王如才等, 2008)。近年来, 栉江珧遭遇生存环境的破坏和过度捕捞, 出现资源量下降、种质资源退化和遗传多样性降低等问题, 因此, 开展栉江珧群体的种质资源评估和保护非常有必要。

目前, 有关栉江珧群体遗传结构的研究较少。主要有采用 AFLP 标记对栉江珧不同地理群体进行遗传

*山东省重点研发计划项目(2016GSF115012)、青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-60-hy)和科技基础条件平台项目(2060503-01)共同资助 [This work was supported by Shandong Province Key Development Program for Research (2016GSF115012), the Cultivate Project for Strategic Emerging Industries of Qingdao City (13-4-1-60-hy), and the National R & D Infrastructure and Facility Development Program of China(2060503-01)]. 李东明, E-mail: 1044578418@qq.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-16, 收修改稿日期: 2015-12-23

多样性分析(陈丽娜, 2012)¹⁾, 而 SSR 标记都通过磁珠富集法开发(陈晓姣, 2012²⁾; 白临建, 2012³⁾; 李明爽, 2008⁴⁾)。本研究基于前期的栉江珧转录组测序, 从得到的 EST 数据库中筛选和开发微卫星标记, 并应用于栉江珧青岛群体的遗传多样性分析, 以期为栉江珧的种质资源评估和保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 DNA 提取

实验用栉江珧于 2015 年 6 月取自山东青岛野生群体, 活体运回实验室, 取 30 个个体解剖, 剪取闭壳肌, 于 -80℃ 保存备用。采用常规酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA, 然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 并用分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

1.2 SSR 序列获得和引物设计

根据本实验室转录组测序获得的 EST 序列, 利用 MISA 软件进行微卫星序列搜索, 搜索标准为二碱基至少重复 6 次, 三碱基至少重复 5 次, 四碱基至少重复 5 次, 五碱基至少重复 5 次, 六碱基至少重复 5 次。采用 Primer premier 5.0 软件设计引物, 挑取 120 对引物由华大基因公司合成。

1.3 微卫星引物的筛选和优化

将 8 个栉江珧个体的 DNA 混合成基因池, 模板浓度调整至 100 ng/μl。PCR 反应体系 20 μl: 0.5 U *Taq* 酶, 2 μl 10×*Taq* Buffer (含 Mg²⁺), 2 μl dNTPs (10 mmol/L), 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl, 补水至 20 μl。PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 退火温度 45 s (退火温度视引物而定), 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 银染。根据电泳图谱确定引物的最佳退火温度。然后分别用 8 个个体作为对象, 使用筛选出的最适退火温度进行 PCR 扩增, 反应体系和反应条件同上, 产物经 8% 非变性

聚丙烯酰胺电泳检测, 银染, 用于检测引物多态性。

1.4 青岛海区栉江珧群体 SSR 标记的多态性分析

在栉江珧青岛群体 30 个个体中, 根据引物筛选结果进行多态性验证, 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测。根据电泳图谱, 并参照引物设计时预期片段的大小统计条带, 用 POPGENE 1.31 计算微卫星引物的等位基因数(*Na*)、期望杂合度(*He*)、观望杂合度(*Ho*), PIC-CAL 计算多态信息含量(PIC)。

2 结果

2.1 栉江珧 EST-SSR 序列筛选

在获得的 127263 条 EST 序列中, 检测出含有 SSR 的 EST 序列 10550 条(8.2%), 包括二核苷酸重复 8132 条, 三核苷酸重复 2010 条, 四核苷酸重复 401 条, 五核苷酸重复 7 条。二核苷酸重复最多, 占 77.08%; 其次为三核苷酸和四核苷酸重复, 分别占 19.05% 和 3.80%; 五核苷酸重复最少, 占 0.07%(表 1)。

表 1 栉江珧 SSR 在 EST 中出现的频率
Tab.1 The frequency of *A. pectinata* SSR in the EST

类型 Type	数目 Number	比例 Rate (%)
二核苷酸 Dinucleotide	8132	77.08
三核苷酸 Trinucleotide	2010	19.05
四核苷酸 Teranucleotide	401	3.80
五核苷酸 Pentanucleotide	7	0.07
合计 Total	10550	100

在二核苷酸重复单元中, AC/GT 最多, 共 3096 条, 占 38.07%; 其次是 AT/TA 和 AG/CT, 分别占 32.97% 和 28.85%; CG/CG 最少, 共 9 条, 占 0.11%(表 2)。

在三核苷酸重复单元中, ATC/ATG 最丰富, 共 625 条, 占 31.09%; AAC/GTT 和 AAT/ATT 分别有 554 和 374 条, 分别占 27.56% 和 18.61%; 其次为 AAG/CTT 和 ACC/GGT, 分别占 6.12% 和 5.30%; 最少的是 CCG/CGG, 共 2 条, 占总数的 0.10%(表 3)。

1) Chen LN. Analysis of genetic structure of the comb pen shell *Atrina pectinata* and development of microsatellite loci in *Acrossocheilus labiatus*. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [陈丽娜. 栉江珧的群体遗传结构及厚唇光唇鱼微卫星位点的研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]

2) Chen XJ. Development of the microsatellite and genetic structure of *Atrina pectinata* population. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [陈晓姣. 栉江珧微卫星分子标记的发育及其群体遗传结构的研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]

3) Bai LJ. Effects of morphometric traits on weight traits and microsatellite markers based genetic diversity in the *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [白临建. 栉江珧形态性状对重量性状的影响及五个野生群体遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

4) Li MS. Identification of microsatellite markers and analysis of genetic diversity of *Atrina pectinate*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 [李明爽. 栉江珧微卫星标记的筛选及其遗传多样性的研究. 南京农业大学研究生学位论文, 2008]

表 2 二核苷酸重复中各重复单元的数量与比例

Tab.2 The number and proportion of all the repeat motifs in the binucleotide repeats

类型 Type	数量 Number	比例 Rate (%)
AC/GT	3096	38.07
AT/TA	2681	32.97
AG/CT	2346	28.85
CG/CG	9	0.11
合计 Total	8132	100

表 3 三核苷酸重复中各重复单元的数量与比例

Tab.3 The number and proportion of all the repeat motifs in the trinucleotide repeats

类型 Type	数量 Number	比例 Rate (%)
ATC/ATG	625	31.09
AAC/GTT	554	27.56
AAT/ATT	374	18.61
AAG/CTT	123	6.12
ACC/GGT	106	5.30
ACT/AGT	89	4.43
AGC/CTG	71	3.53
AGG/CCT	53	2.64
ACG/CGT	13	0.65
CCG/CGG	2	0.10
合计 Total	2010	100

2.2 栉江珧 EST-SSR 引物筛选

利用 Primer premier 5.0 软件, 对 10550 条含有 SSR 的 EST 进行引物设计, 共设计 3401 对。随机选取 120 对引物合成, 以 8 个青岛群体栉江珧个体组成

的基因池为模板, 退火温度上下波动 5℃为梯度, 对 120 对引物进行初步筛选。结果显示, 有 36 对引物获得稳定、清晰的扩增片段, 扩增成功率为 30%; 36 对引物在青岛栉江珧群体中进行多态性检测, 其中 12 对引物表现出多态性(表 4), 多态引物比例为 33.3%。

2.3 EST-SSR 在青岛海区栉江珧群体的多态性评价

利用筛选的 12 对多态性引物对青岛海区栉江珧群体的 30 个个体进行遗传变异分析, 结果见表 5。12 对引物共获得 42 个等位基因, 每对引物在青岛栉江珧群体中检测到 2–5 个等位基因, 平均每个位点有 3.5 个等位基因, 其中, c62721_g1 位点的等位基因最少(2 个), c67433_g5 位点的等位基因最多(5 个)。观测杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态信息含量 PIC 分别为 0.167–0.667、0.432–0.794、0.368–0.746, 平均观测杂合度 H_o 、平均期望杂合度 H_e 、平均多态信息含量 PIC 分别为 0.417、0.604、0.526。依据 PIC 判断标准: PIC<0.25 为低度多态, 0.25<PIC<0.5 为中度多态, PIC>0.5 为高度多态, 12 个多态性位点中, 有 6 个高度多态位点(PIC>0.5), 6 个中度多态位点(0.25<PIC<0.5), 可以看出栉江珧 EST-SSR 在青岛群体中表现出较高的多态性, 说明青岛栉江珧群体遗传多样性水平较高。

3 讨论

本研究利用栉江珧转录组测序获得的 127263 条 EST 序列进行 SSR 筛选, 检出率为 8.2%, 结果与缢蛏 EST 中 SSR 比例(8.89%)相似(刘博等, 2012a), 但

表 4 栉江珧多态性 EST-SSR 引物序列及参数

Tab.4 Primer sequences and parameters of polymorphic EST-SSR in *A. pectinata*

引物 Primer	重复单 元 Repeat motif	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence	预扩片段 大小 Expected size(bp)	退火温度 Annealing temperature(℃)
c65097_g1	(GTG)7	TGGGGTCAACCACTAGGACA	TGCGAGTTCGGTTAATCCC	241	57.5
c55835_g1	(AC)9	GACCATCCAAGACCAGCTCA	CGGTTTGTGTGTCAAGCCA	247	55.4
c29478-g1	(TG)8	CGACAACGCCAATTCTGACC	TTGAAGCGGTCAGGCGTATT	149	55.4
c73921_g1	(GA)8	CTCATGCATGCATAGCAGTGT	TTGTCTGTCCATCCCTCCCT	119	55.4
c72420_g2	(TGTC)5	CCCCCTAGCACATATCAAACA	TGTTGTCATCAGGAGGAGGA	205	55.4
c73582_g4	(CTGT)5	TATCTGTCTGTCTGCCTGCC	CAGCCTCGATGACGCAAATG	172	57.4
c73109_g2	(CTGT)5	TGTCCATCTTGCTGTCTGTCC	TGACACACAGACAGCAAGACT	135	55.4
c72142_g2	(GT)10	GCTTGTAAGCGCTTATGAACCT	CCCACACATCATACCCATGC	170	56.2
c67726_g1	(AT)11	CCATGTGGAGTCCAGTGCAT	TCTAGGGGCCACAAAGCAAC	181	54.1
c69026_g3	(CA)11	TCACAGTTGGACAGGTCTTTGT	ATTACAGAGCAGGTGCCAGTC	226	57.4
c62721_g1	(CAA)7	AGAGGCTTTCACAAACAACAAC	TCTTCCATCAAGAGCAGCGG	264	54.6
c67433_g5	(CA)9	GGCAGACCCTTGATGTACCA	GGCAAAACAAGAAACAAAACGCA	232	60.8

表 5 青岛海区栉江珧群体 EST-SSR 分析统计

Tab.5 Statistics of the EST-SSR analysis for the Qingdao population of *A. pectinata*

基因座位 Locus	等位基因数 Na	观测杂合 度 Ho	期望杂合 度 He	多态信息 含量 PIC
c65097_g1	4	0.633	0.667	0.590
c55835_g1	3	0.400	0.623	0.541
c29478_g1	3	0.667	0.567	0.496
c73921_g1	3	0.533	0.432	0.383
c72420_g2	4	0.167	0.584	0.483
c73582_g4	4	0.233	0.625	0.562
c73109_g2	4	0.467	0.607	0.541
c72142_g2	3	0.300	0.513	0.428
c67726_g1	3	0.200	0.583	0.479
c69026_g3	4	0.467	0.758	0.697
c62721_g1	2	0.567	0.494	0.368
c67433_g5	5	0.367	0.794	0.746
平均值 Mean	3.5	0.417	0.604	0.526

该比例低于马氏珠母贝 EST-SSR 出现频率(13.34%) (王忠良等, 2015), 高于菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) EST-SSR 出现频率(3.57%)(闫喜武等, 2011)。造成这种差异的原因主要有筛选标准、数据库大小以及物种的不同。如, 张秀英等(2012)以 3 个不同标准对栉孔扇贝同一 BES 文库进行 SSR 筛选, 筛选率随着筛选标准的提高而降低。同样, 数据库丰富程度不同也会造成 EST-SSR 位点出现频率不同, 王忠良等(2015)和石耀华等(2008)分别从马氏珠母贝 74007 和 6979 条 EST 序列中筛选得到 9872 和 243 个 EST-SSR 位点, 其位点出现频率分别为 13.34%和 3.48%。在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中也有相似报道, 王艳红等(2011)和马宁等(2013)对凡纳滨对虾不同数量的 EST 序列进行 EST-SSR 筛选, 其筛选率也不同。

本研究中, 栉江珧 EST 微卫星中以二核苷酸重复所占比例最高, 其次是三核苷酸重复, 分别占 77.08%和 19.05%, 这和马氏珠母贝(石耀华等, 2008)和凡纳滨对虾(王艳红等, 2011)的研究结果相似。在位点多态率方面, 本研究设计合成了 120 对 EST-SSR 引物, 其中, 36 对引物获得稳定、清晰的扩增位点, 扩增成功率为 30.0%; 12 对引物表现出多态性, 多态引物比例为 33.3%, 其比率分别低于 G-SSR 的

63.15%、62.5% (李明爽, 2008)¹⁾和 81.25%、80.76% (白临建, 2012)²⁾。这与泥蚶(周小龙等, 2013)、文蛤(齐晓艳等, 2013)和红鳍东方鲀(郝君等, 2007)G-SSR 位点多态率高于 EST-SSR 位点多态率结果相似。

刘博等(2012a)得到的缢蛭 EST-SSR 平均观测杂合度 H_o (0.569)和平均期望杂合度 H_e (0.490)分别低于吴雪萍等(2014)的结果(缢蛭基因组 SSR 的 H_o 为 0.6866, H_e 为 0.7525)。闫路路等(2015)在研究基于转录组平台的蛤仔微卫星标记也得到了相似的结果, 其所得的 Na 、 H_o 、 H_e 和 PIC 也分别低于 Yasuda 等(2007)和 An 等(2009)通过 G-SSR 得到的结果。本研究也得到了与之基本一致的结果, 平均每个位点产生 3.5 个等位基因, H_o 、 H_e 、PIC 分别为 0.417、0.604、0.526。与白临建(2012)²⁾通过基因组来源 SSR 所得平均位点、 H_o 、 H_e 分别为 6.43、0.4215、0.5857 相比, 除 H_e 略高外, 其他均低, 造成 H_e 略高的原因可能是标记本身不同造成的, 也可能是实验所用的地理群体不同造成的, 白临建(2012)²⁾是使用蓬莱长岛县的栉江珧群体进行多态性引物的筛选, 而本研究使用青岛地区的栉江珧进行多态性引物的筛选, 具体原因有待于进一步探究。

本研究获得的 12 对 EST-SSR 引物, 具有多态性丰富、稳定性高和重复性好等优点, 并可应用于栉江珧群体的遗传多样性分析, 揭示了栉江珧青岛群体的种质资源现状, 将为栉江珧的种质资源保护提供重要的参考资料。

参 考 文 献

- An HS, Kim EM, Park JY. Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics*, 2009, 10(6): 1821-1823
- Dong YH, Wu GX, Yao HH, et al. Characterization of 34 polymorphic EST-SSR markers in *Tegillarca granosa* and their transferability in *Anadara craticulata*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 70-77 [董迎辉, 吴国星, 姚韩韩, 等. 泥蚶 34 个 EST-SSR 标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测. *水产学报*, 2013, 37(1): 70-77]
- Hao J, Sun XW, Meng XS, et al. Identification and application of microsatellite makers from BAC and ESTs sequence in redfin puffer (*Takifugu rubripes*). *Journal of Dalian*

1) Li MS. Identification of microsatellite markers and analysis of genetic diversity of *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 [李明爽. 栉江珧微卫星标记的筛选及其遗传多样性的研究. 南京农业大学研究生学位论文, 2008]

2) Bai LJ. Effects of morphometric traits on weight traits and microsatellite markers based genetic diversity in the *Atrina pectinata*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [白临建. 栉江珧形态性状对重量性状的影响及五个野生群体遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

- Fisheries University, 2007, 22(2): 97–101 [郝君, 孙效文, 孟雪松, 等. 红鳍东方鲀 BAC 数据库和 ESTs 数据库中微卫星的筛选与应用. 大连水产学院学报, 2007, 22(2): 97–101]
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 578–585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产科学, 2010, 17(3): 578–585]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2012a, 43(1): 132–137 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 海洋与湖沼, 2012a, 43(1): 132–137]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Genetic variation of cultured population structure in *Sinonovacula constricta* using microsatellites. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012b, 28(2): 69–73 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 乐清湾养殖缢蛏群体遗传结构的微卫星标记分析. 中国农学通报, 2012b, 28(2): 69–73]
- Ma N, Zeng DG. Isolation of microsatellite sequences from *Litopenaeus vannamei*. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 2013(6): 2629–2633 [马宁, 曾地刚. 凡纳滨对虾微卫星序列的筛选. 西南农业学报, 2013(6): 2629–2633]
- Qi XY, Dong YH, Yao HH, *et al.* Identification of 30 microsatellite markers in *Meretrix meretrix* and their transferability in *Meretrix lamarckii* and *Meretrix lyrata*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1147–1154 [齐晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 文蛤 30 个微卫星标记的开发及在斧文蛤和帘文蛤中的通用性检测. 水产学报, 2013, 37(8): 1147–1154]
- Shi YH, Hong K, Guo XM, *et al.* Microsatellite markers screening from EST sequences of *Pinctada martensii Dunker*. *Journal Of Fisheries Of China*, 2008, 32(2): 174–181 [石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 2008, 32(2): 174–181]
- Wang RC, Wang ZP. *Seawater shellfish culture*. Qingdao: Publishing House of Ocean University of China, 2008, 532–534 [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, 532–534]
- Wang YH, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* A preliminary study on microsatellite markers screening from EST sequences of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 969–976 [王艳红, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾 EST 微卫星标记初步筛选. 水产学报, 2011, 35(7): 969–976]
- Wang ZL, Ding Y, Xu YH, *et al.* Polymorphism of EST-SSRs from *Pinctada martensii* based on transcriptom datasets. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 687–693 [王忠良, 丁燊, 许尤厚, 等. 基于转录组数据的马氏珠母贝 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 687–693]
- Wu XP, Ma HT, Feng YY, *et al.* Isolation of microsatellite loci from razor clam *Sinonovacula constricta* and transferability to related species. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1330–1337 [吴雪萍, 马海涛, 冯艳微, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)微卫星标记的分离及近缘物种通用性. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1330–1337]
- Yan LL, Qin YJ, Yan XW, *et al.* Development of microsatellite markers in *Ruditapes philippinarum* using next-generation sequencing. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1573–1580 [闫路路, 秦艳杰, 闫喜武, 等. 基于转录组平台的蛤仔微卫星标记筛选. 生态学报, 2015, 35(05): 1573–1580]
- Yan XW, Yu ZF, Qin YJ, *et al.* Development of EST-SSRs markers and analysis of genetic diversities among different geographical populations of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(15): 4190–4198 [闫喜武, 虞志飞, 秦艳杰, 等. 菲律宾蛤仔 EST-SSRs 标记开发及不同地理群体遗传多样性. 生态学报, 2011, 31(15): 4190–4198]
- Yasuda N, Nagai S, Yamaguchi S, *et al.* Development of microsatellite markers for the Manila clam *ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(1): 43–45
- Zhang XY, Zhang XJ, Zhao C, *et al.* The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and analysis on population genetic diversity in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 815–824 [张秀英, 张晓军, 赵翠, 等. 栉孔扇贝 BES-SSR 的开发及遗传多样性分析. 水产学报, 2012, 36(6): 815–824]
- Zhou XL, Zhu QH, Dong YH, *et al.* Development and comparative study of genomic-SSR and EST-SSR in *Tegillarca granosa*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 467–475 [周小龙, 朱靖华, 董迎辉, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 467–475]

Development and Application of the EST-SSR Markers in *Atrina pectinata*

LI Dongming^{1,2}, YANG Aiguo²①, WU Biao², SUN Xiujun², ZHOU Liqin²,
LIU Hanmiao^{1,2}, ZHANG Guangming^{1,2}

(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)

Abstract *Atrina pectinata* is a large deep-water mollusk species that has high economic values. It is distributed in the coastal areas of China, from the Liaodong Peninsula in the north to the Qiongzhou Strait in the south. Its habitat is adjacent to China's provinces such as Fujian, Guangdong, Liaoning and Shandong. In recent decades, the natural resource of *A. pectinata* has declined due to the environment destruction and overfishing. To better protect the resource of *A. pectinata*, we need to understand its population genetic structure. Microsatellites is a widely used method to assess the genetic diversity in farmed aquatic species and construct QTL due to its characteristics such as the abundant polymorphism, the rich information, the co-dominance and conservation. The EST-SSR marker is inexpensive and is probably associated with functional regions of the genome. Therefore, in this research, we developed a series of EST-SSR markers using a transcriptome-based platform to study the genetic diversity of *A. pectinata*. We identified 10550 EST-SSR (8.2%) using MISA software, and the corresponding frequency was 1 EST-SSR per 9.01 kb of the sequence. Dinucleotide repeats were dominant among all EST-SSRs, counting for 77.08%. We designed 120 primers for PCR, and 36 out of 120 resulted in successful amplification. Fragments amplified with 12 primers were polymorphic. Next we used these SSR primers to explore the genetic variation of 30 *A. pectinata* samples collected from the Qingdao Bay. The number of alleles for the 12 SSR makers varied from 2 to 5 in these samples with an average of 3.5 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0.1667 to 0.6667, and the expected heterozygosity varied from 0.4316 to 0.7938. Polymorphic information content ranged from 0.3679 to 0.7459. These indicated high genetic diversity of the *A. pectinata* population in the Qingdao Bay. Moreover, we verified that the polymorphic EST-SSR markers could be a useful tool in comparative mapping, gene tagging and QTL mapping.

Key words *Atrina pectinata*; EST-SSR; Genetic diversity; Heterozygosity

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mai: yangag@ysfri.ac.cn

高盐胁迫对黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*) 呼吸排泄和免疫酶活性的影响*

唐保军^① 邹 雄 尹 飞

(中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)



摘要 为了探讨急性高盐胁迫对黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*)生理代谢和免疫酶活性的影响,分析了盐度自 31 骤升至 37 后 2、12、24、48 和 72 h 黄边糙鸟蛤耗氧率、排氨率和不同组织 Na⁺/K⁺-ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)的活性。结果显示,处理后 2 h 耗氧率先降低,然后逐渐升高,在 24 和 72 h 显著高于对照组($P<0.05$);排氨率在 2 h 极显著降低($P<0.01$),且在各时间点均低于对照组。外套膜、肝胰腺中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力在 12 h 显著降低($P<0.05$),肌肉和鳃中活力与对照组无显著差异。外套膜、肝胰腺和鳃中 SOD 活力在 24 h 达到最高值,显著高于对照组($P<0.05$),其后逐渐降低;肌肉中 SOD 活力在 48 h 达到最高值后降低。外套膜和鳃中 ACP 活力先升高后降低,肝胰腺中 ACP 活力显著降低($P<0.05$)后逐渐升高,肌肉中 ACP 活力与对照组无显著差异。肝胰腺和鳃中 ALP 活力先降低后显著升高($P<0.05$),与对照组相比,外套膜和肌肉中 ALP 活力无显著差异。结果表明,急性高盐胁迫对黄边糙鸟蛤的代谢水平和免疫酶活性均有显著影响且表现出时间效应性,高盐胁迫对免疫酶活性的影响具有组织特异性。

关键词 黄边糙鸟蛤;高盐胁迫;耗氧率;排氨率;Na⁺/K⁺-ATP 酶;免疫酶活性

中图分类号 S944.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0143-08

盐度是决定海洋生物分布并影响其生长、存活的重要环境因子。沿海近岸地区,尤其是河口附近,因为潮汐、降雨、高温干旱或人类活动等影响,经常发生不同程度的海水盐度波动。目前,大多数海洋经济贝类分布或养殖于潮间带、滩涂或河口地区,盐度变化可能会对贝类造成不同程度的胁迫(Gagnaire *et al.*, 2006; Carregosa *et al.*, 2014)。

盐度胁迫会影响贝类的免疫功能,增加贝类感染疾病的风险。Reid 等(2003)研究发现,菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)血细胞 THC 随盐度升高而升高。高盐胁迫下,鸡帘蛤(*Chamelea gallina*)的细胞

吞噬活性降低(Matozzo *et al.*, 2007)。随盐度上升,牡蛎(*Crassostrea virginica*)对寄生虫 *Perkinsus marinus* 和 *Haplosporidium nelsoni* 的感染率和死亡率也上升(Ford *et al.*, 1988; Chu *et al.*, 1993)。盐度胁迫还会影响海水贝类的呼吸、摄食以及生长(Navarro *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2005),贝类需要调整生理活动以适应盐度的改变。研究表明,免疫反应需要消耗能量,免疫功能的变化也会导致机体能量代谢的改变(Roch, 1999; Rolff *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012)。因此,生理代谢变化可以在一定程度上反应海水贝类所受到的胁迫。

在复杂多变的近海环境中,贝类进化产生了独特

*“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD13B0903)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD0102)共同资助 [This work was supported by National Key Technology Support Program (2011BAD13B0903), Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0102)].

① 通讯作者:唐保军,副研究员, E-mail: bjtang@yeah.net

收稿日期: 2015-12-09, 收修改稿日期: 2016-01-18

的逆境适应机制(Zhang *et al.*, 2012), 了解这些机制对于海水贝类资源保护、新品种选育具有重要意义。黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*)分布于我国广东、广西和海南潮间带, 是一种重要的经济贝类(唐保军等, 2010)。受海表蒸发等因素影响, 广东、海南沿海海水盐度会出现异常升高, 有时达 34 以上(叶龙飞, 1988; 袁淑尧等, 1998), 此时, 黄边糙鸟蛤会遭遇高盐胁迫。本研究通过测定高盐胁迫下代谢率和免疫相关酶活性的变化, 探讨黄边糙鸟蛤的盐度胁迫适应机制, 为该贝类的养殖和资源保护提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

黄边糙鸟蛤采自海南文昌沿海, 取回实验室后挑选大小一致的个体[壳高为(50.35±2.64) mm, 体重为(46.51±6.91) g], 清除表面附着物后放入 2000 L 玻璃钢桶暂养 14 d, 桶底铺 10 cm 厚细砂, 暂养期间, 海水盐度为 31.0±0.5, 通过室内空调控制水温为(26.0±0.5)°C, 每天换水 1/2, 早晚各投喂 1 次小球藻(*Chlorella pyrenoidsa*)和金藻(*Isochrysis galbana*)的混合藻液。

1.2 盐度处理

取暂养的黄边糙鸟蛤 150 只, 平均分为 2 组, 一组仍在盐度为 31 的海水中作为对照, 另外一组直接转入盐度为 37 的海水中。将海水晶溶于水配制成高浓度盐水, 经脱脂棉过滤后调节海水盐度至 37, 盐度用比重计和温度计测定。实验持续 72 h, 期间每天换水 1/2。于实验开始后 2、12、24、48 和 72 h 测定耗氧率和排氨率。每个时间点取 3 只黄边糙鸟蛤, 分别取肝胰腺、鳃、外套膜和斧足肌肉样品, 于-80°C 保存, 用于组织酶活分析。

1.3 耗氧率和排氨率的测定

用静水法测定耗氧率和排氨率。每个 1.5 L 塑料呼吸瓶内放 1 只黄边糙鸟蛤, 虹吸式注入实验用水后密封, 26°C 水浴, 每个时间点分别设 3 个平行和 1 个空白对照。因每次实验持续 2 h, 故测得的耗氧率和排氨率分别为处理后 1-3、11-13、23-25、47-49 和 71-73 h 内的均值。实验结束后用虹吸法取水样分析, 解剖实验用蛤, 取软体部于 65°C 烘干 24 h, 称量组织干重。

(1) 采用 Winkler 法(Stickland *et al.*, 1968)测定水中的溶解氧含量, 根据下式计算耗氧率:

$$R = V \times (O_0 - O_t) / (W \times t)$$

式中, R 为单位体重耗氧率, O_0 和 O_t 分别为实验结束时空白对照组和实验组水中的溶解氧浓度(mg/L), V 为呼吸瓶体积(L), W 为蛤组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

(2) 采用次溴酸盐氧化法(Solorzano, 1969)测定水中的氨氮含量, 根据下式计算排氨率:

$$E = V \times (N_t - N_0) / (W \times t)$$

式中, E 为单位体重排氨率, N_0 和 N_t 分别为实验结束时空白对照组和实验组水中的氨氮浓度($\mu\text{g/L}$), V 为呼吸瓶体积(L), W 为蛤组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

1.4 酶活测定

1.4.1 样品制备 各组织样品于 4°C 解冻后, 分别按质量体积比加入 9 倍预冷的生理盐水(150 mmol/L NaCl, pH=7.4)匀浆。制备好的匀浆液以 2500 r/min、4°C 离心 15 min, 取上清液用于酶活分析。

1.4.2 酶活力测定 分析测定上清液中 Na^+/K^+ -ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)的活力, 各酶活力均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定, 具体测定方法按照试剂盒说明书进行。采用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白浓度。 Na^+/K^+ -ATP 酶活力定义为每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷(Pi)的量为 1 个活力单位。SOD 活力定义为每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位。ACP 活力定义为 30 min 内产生 1 mg p -硝基酚为 1 个活力单位。ALP 活力定义为 15 min 内产生 1 mg p -硝基酚为 1 个活力单位。

1.5 数据处理

实验数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 高盐胁迫对呼吸排泄的影响

盐度 37 处理后 2 h, 黄边糙鸟蛤的耗氧率低于对照组, 其后逐渐上升, 至 48 h 达到最大值(图 1), 在 24 和 72 h 显著高于对照组($P < 0.05$)。处理组黄边糙鸟蛤 2 h 时耗氧率显著低于 24、48 和 72 h 时的耗氧率($P < 0.05$)。排氨率在处理 2 h 极显著低于对照组($P < 0.01$), 其后逐渐升高。处理组 2 h 的排氨率显著高于其他时间点($P < 0.05$)。

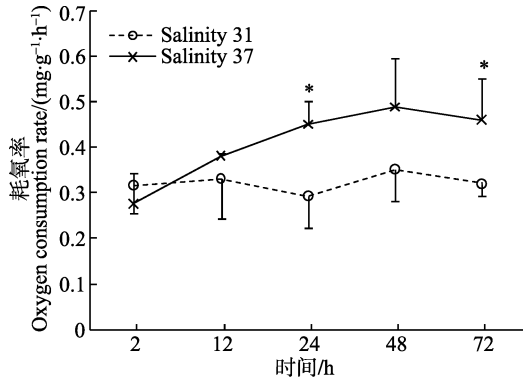


图 1 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤耗氧率变化

Fig.1 Variation of oxygen consumption rate of *T. flavum* under hypersaline stress

*表示对照组与处理组有显著差异, 下同

* indicated significant difference between the control and treatment, the same as below

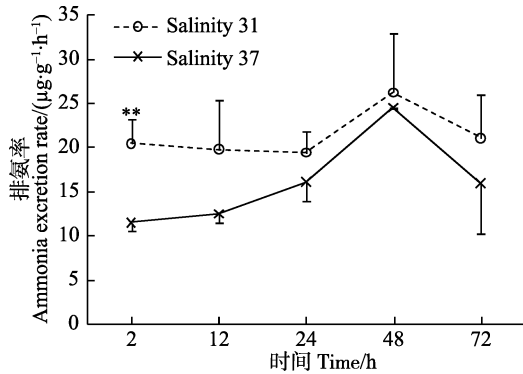


图 2 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤排氨率变化

Fig.2 Variation of ammonia excretion rate of *T. flavum* under hypersaline stress

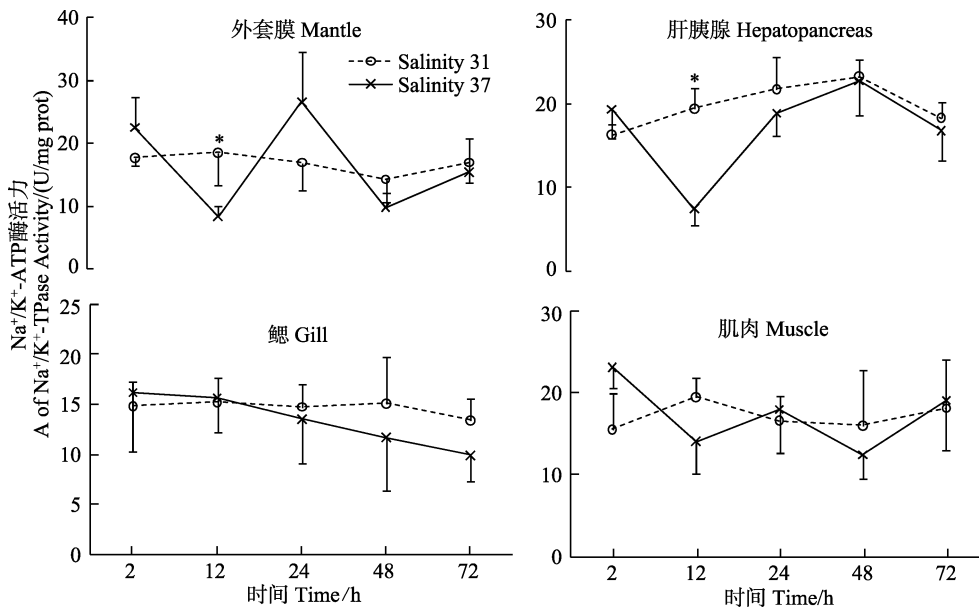


图 3 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力变化

Fig.3 Variation of Na⁺/K⁺-ATPase activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

2.2 高盐胁迫对 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的影响

由图 3 可知, 盐度 37 处理后 2 h, 外套膜、肝胰腺中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力在 12 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在其他各时间点与对照组无显著差异。肌肉和鳃中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力与对照组无显著差异。盐度胁迫后, 外套膜、肝胰腺和肌肉中不同时间点之间 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 高盐胁迫对免疫相关酶活性的影响

盐度 37 处理后, 各组织中 SOD 活力呈先升高后下降的趋势(图 4)。处理后 2 h, 与对照组相比, 各组织中 SOD 活力下降, 其后逐渐升高; 24 h, 肝胰腺中 SOD 活力极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 至 72 h, 各组织中 SOD 活力降至对照组水平。盐度处理后, 各组织中不同时间点之间 SOD 活力存在显著差异 ($P < 0.05$)。

高盐度胁迫下, 黄边糙鸟蛤外套膜和鳃中 ACP 活力呈先升高后降低的趋势, 在 24 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在 48 和 72 h 下降(图 5)。肝胰腺中 ACP 活力在 12 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 随后逐渐升高, 在 72 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 肌肉中 ACP 活力无显著差异。肝胰腺中 ACP 活力显著高于其他各组织 ($P < 0.01$)。高盐胁迫下, 各组织中不同时间点之间 ACP 活力出现显著变化 ($P < 0.05$)。

盐度 37 处理后, 与对照组相比, 黄边糙鸟蛤外套膜和肌肉中 ALP 活力无显著差异(图 6)。鳃中 ALP 活力在 2 h 和 12 h 极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其后

升高, 在 48 h 显著高于对照组($P<0.01$)。肝胰腺中 ALP 活力变化趋势与鳃相似, 在 24 h 和 72 h 显著高于对照组($P<0.05$)。肝胰腺中 ALP 活力显著高于其他各组织($P<0.01$)。盐度处理后, 各组织中不同时间点之间 ALP 活力出现显著变化($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 代谢率

当外界盐度发生突然改变时, 海水贝类通过关闭贝壳保护内部组织免受伤害(Pierce, 1971)。Brown 等(1981)报道, *Bullia digitalis* 在盐度升高或降低时会关

闭水管。本研究中, 盐度处理初期, 黄边糙鸟蛤贝壳开放程度明显降低, 这可能是导致 2 h 耗氧率下降的原因。盐度胁迫条件下, 呼吸率的降低也是贝类在不利环境中保存能量的一种方式(Brown *et al*, 1990)。为了维持内环境的稳定, 当环境改变时, 海水无脊椎动物会进行生理补偿(Bayne, 1973、1998; McMahon *et al*, 1991)。补偿后, 如果新的稳定态与环境改变之前一致, 说明补偿是完全的; 如果新的稳定态与之前的不一致, 说明补偿不完全, 仍然存在环境胁迫(Bayne, 1973)。本研究中, 耗氧率 12 h 后逐渐升高, 可能是贝类对盐度改变的生理补偿所致。唐保军等(2010)的研究中, 盐度缓慢升至 36、40 并暂养 7 d 后, 黄边

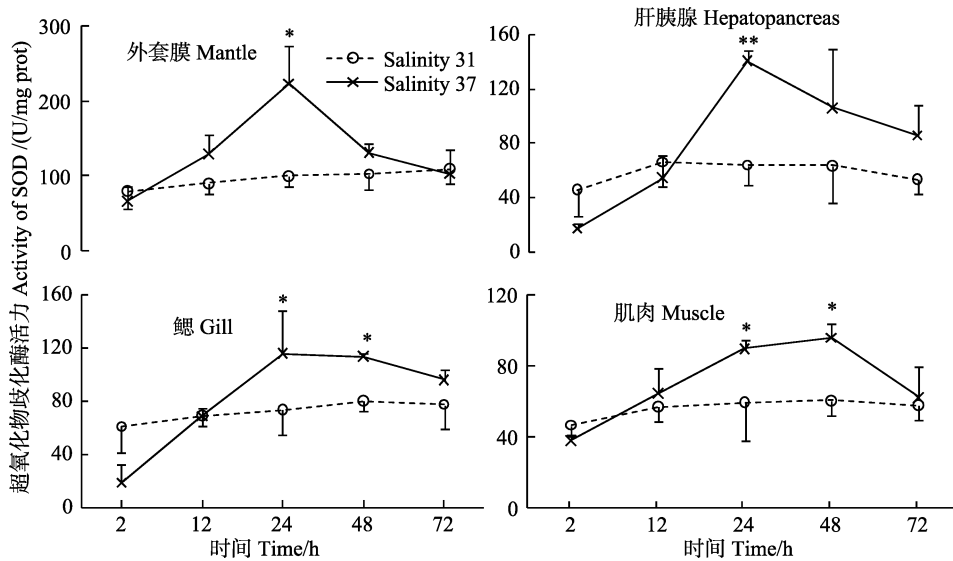


图 4 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织超氧化物歧化酶活力变化

Fig.4 Variation of SOD activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

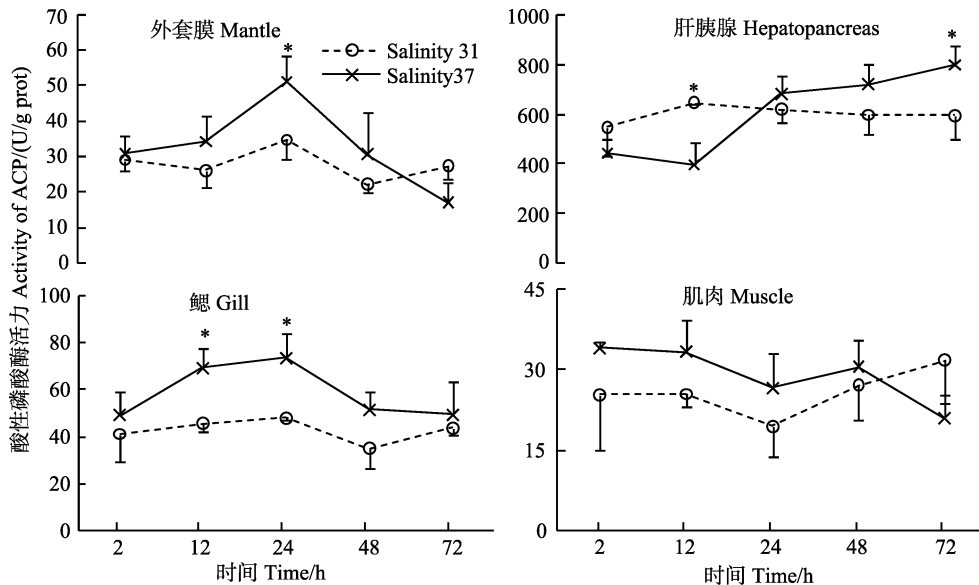


图 5 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织酸性磷酸酶活力变化

Fig.5 Variation of ACP activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

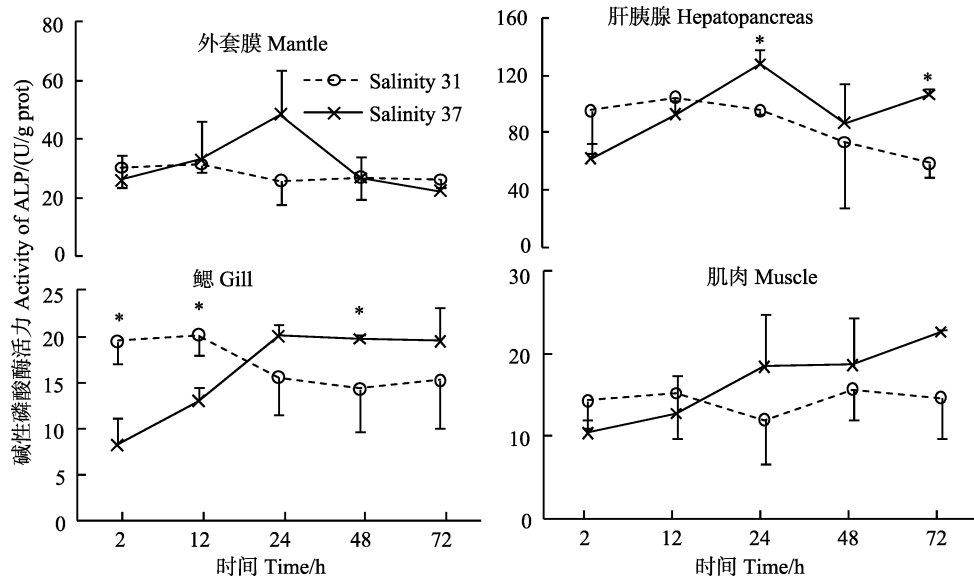


图 6 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织碱性磷酸酶活力变化

Fig.6 Variation of ALP activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

糙鸟蛤耗氧率与对照组(盐度 32)无显著差异,表明达到完全补偿需要的时间与盐度胁迫程度有关,具体机制需要进一步研究。

作为主要的氮代谢终产物,氨离子参与海水动物渗透调节(Silvia *et al*, 2004)。本研究中,高盐度处理后,排氨率下降,这与之之前慢性盐度胁迫下的研究报道一致(唐保军等, 2010)。其他贝类中也有类似报道:织纹螺(*Nassarius festivus*)从盐度 25 转入 30、35 后 72 h,排氨率下降(Cheung, 1997)。在高盐度胁迫下,双壳贝类组织细胞体积缩小并快速合成游离氨基酸,以应对高渗透压(Baginski *et al*, 1977),首先合成丙氨酸,其后为甘氨酸、牛磺酸等(Baginski *et al*, 1977; Henry *et al*, 1980; Deaton *et al*, 1985)。丙氨酸的合成需要将游离铵离子固定转化为丙酮酸酯或 2-酮戊二酸,游离铵离子来自尿酸代谢、蛋白降解以及代谢氨等(Zurburg *et al*, 1981)。本研究中,在 2 h,排氨率显著低于对照组,可能因为黄边糙鸟蛤通过对代谢氨氮的重新利用以应对高渗透胁迫;随着内环境逐渐达到新的平衡状态,排氨率也逐渐上升;至 72 h 排氨率又下降,表明机体尚未达到稳定态。对照组黄边糙鸟蛤的排氨率在 48 h 出现上升,可能为个体差异所致,多重比较显示,各时间点之间排氨率无显著差异。

Na^+/K^+ -ATP 酶对维持细胞中 Na^+ 、 K^+ 稳态发挥着重要作用,可有效调节和维持机体渗透压(Cheng *et al*, 2002; 沈永龙等, 2013)。本研究中,外套膜、肝胰腺中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力在 12 h 显著低于对照组,表明 Na^+/K^+ -ATP 酶参与黄边糙鸟蛤渗透稳态(Osmolality homeostasis)调节。高盐度下 Na^+/K^+ -ATP 酶活力降低

的现象在其他贝类中也有报道。盐度自 23 骤升至 26 后,青蛤(*Cyclina sinensis*)鳃中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力下降,在第 15 天达到最小值后逐渐回升趋于平稳,但仍低于初始值(林昕昕等, 2012)。盐度自 30 升至 35、40 后,魁蚶(*Anadara broughtonii*)稚贝鳃中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力下降,分别在 24 h 和 12 h 出现最小值后回升,但均低于对照组(蔡星媛等, 2015)。

3.2 免疫酶活性变化

环境突然变化会影响海水无脊椎动物的免疫功能,激活机体的 NADPH 氧化酶系统,导致耗氧率上升(呼吸暴发),产生大量活性氧(ROS)。活性氧能够杀伤异物,但也会损害机体的膜组织、DNA 和酶等(Roch, 1999; Finkel *et al*, 2000)。SOD 是机体抗氧化防御系统的重要组成部分,可清除体内活性氧自由基(Hermes-Lima *et al*, 1998)。Monari 等(2007)报道,盐度自 34 升至 40 后,鸡帘蛤血清中 Cu/Zn-SOD 活力升高。将仿刺参(*Apostichopus japonicas*)自盐度 30 转入盐度 35 海水中,其体腔液中 SOD 活力在 3 h 极显著升高($P < 0.01$),其后下降至对照组水平(Wang *et al*, 2008)。本研究中,各组织中 SOD 活力均呈现“先降低再回升,然后下降”的变化规律,说明胁迫初期黄边糙鸟蛤体内自由基浓度降低,进而黄边糙鸟蛤产生应激反应,体内生成大量自由基, SOD 等抗氧化酶被诱导激活以清除过多的自由基。

ACP 和 ALP 是重要的水解酶,具有促进血细胞吞噬、清除异物的作用(Cheng, 1978)。本研究中,胁迫初期黄边糙鸟蛤肝胰腺、鳃中 ACP 和 ALP 活力先降低,

表明高盐度胁迫影响了黄边糙鸟蛤的免疫酶活性。这与盐度骤升后近江牡蛎(*C. hongkongensis*)血淋巴 ALP 活力的变化一致(时少坤等, 2013)。酸性磷酸酶还是检测溶酶体的标志酶(Cajaraville *et al*, 2000), ACP 活力的变化, 表明高盐度胁迫影响了溶酶体的稳定性。

本研究还发现, 黄边糙鸟蛤的免疫反应具有组织特异性。对照组黄边糙鸟蛤外套膜 SOD 活力显著高于其他组织($P < 0.05$), 肝胰腺中 ACP 和 ALP 活力显著高于其他组织($P < 0.05$)。这种组织差异性在其他贝类中也有报道。紫贻贝(*Mytilus edulis*)鳃中 SOD 活力较高(Manduzio *et al*, 2004), 而褐贻贝(*Perna perna*)鳃和肝胰腺中 SOD 活力相当(Almeida *et al*, 2005)。浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)肝胰腺中 ACP 和 ALP 活力较高, 其次为鳃、足、水管和外套膜(Mazorra *et al*, 2002)。这种组织差异性可能与蛋白的合成、转运有关, 具体的机制需要借助免疫细胞化学、原位杂交等技术进一步开展研究。

参 考 文 献

- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, *et al*. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 318(1): 21–30
- Baginski RM, Pierce SK. The time course of intracellular free amino acid accumulation in tissues of *Modiolus demissus* during high salinity adaptations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1977, 57(4): 407–412
- Bayne BL. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: An introduction to the Plymouth “TROPHEE” workshop. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, 219(1): 1–19
- Bayne BL. The responses of three species of bivalve mollusc to declining oxygen tension at reduced salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1973, 45(3): 793–806
- Brown AC, McLachlan A. *Ecology of sandy shores*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1990
- Brown AC, Meredith FL. The effects of salinity changes on respiration in the sandy-beach whelk *Bullia digitalis* (Dillwyn). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1981, 69(3): 599–601
- Cai XY, Zhang XM, Tian L, *et al*. Effect of salinity stress on hemolymph osmolality and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of juvenile ark shell (*Anadara broughtonii*). *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 12–19 [蔡星媛, 张秀梅, 田璐, 等. 盐度胁迫对魁蚶稚贝血淋巴渗透压及鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 12–19]
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, *et al*. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2): 295–311
- Carregosa V, Figueira E, Gil AM. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 171(3): 36–43
- Cheng TC. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge. *Invertebrate Models for Biomedical Research*. Springer US, 1978, 59–71
- Cheng W, Yeh SP, Wang CS, *et al*. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture*, 2002, 203(3): 349–357
- Cheung SG. Physiological and behavioural responses of the intertidal scavenging gastropod *Nassarius festivus* to salinity changes. *Marine Biology*, 1997, 129(2): 301–307
- Chu FLE, La Peyre JF, Burrenson CS. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62(3): 226–232
- Deaton LE, Hilbish TJ, Koehn RK. Hyper-osmotic volume regulation in the tissues of the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1985, 80(4): 571–574
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408(6809): 239–247
- Ford SE, Haskin HH. Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1988, 90(1): 183–187
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, *et al*. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 536–547
- Henry RP, Mangum CP, Webb KL. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 1980, 211(1): 11–24
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 437–448
- Lin TT, Lai QF, Lu JX, *et al*. Effects of abrupt variations in salinity on the Na^+/K^+ -ATPase activity in gills of *Cyclina sinensis*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(1): 54–58 [林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 盐度突变对青蛤(*Cyclina sinensis*)鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(1): 54–58]
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, *et al*. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis*

- collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(1): 83–93
- Matozzo V, Monari M, Foschi J. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I. alterations in immune responses. *Marine Biology*, 2007, 151(3): 1051–1058
- Mazorra MT, Rubio JA, Blasco J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(2): 241–249
- McMahon BR, Burggren WW, Pinder AW, *et al.* Air exposure and physiological compensation in a tropical intertidal chiton, *Chiton stokesii* (Mollusca: Polyplacophora). *Physiological Zoology*, 1991, 64(3): 728–747
- Monari M, Serrazanetti GP, Foschi J, *et al.* Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina* haemocytes. Part II: Superoxide dismutase response. *Marine Biology*, 2007, 151(3): 1059–1068
- Nakamura Y, Hashizume K, Koyama K. Effects of salinity on sand burrowing activity, feeding and growth of the clams *Macra veneriformis*, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix lusoria*. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1053–1059
- Navarro JM, Gonzalez CM. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture*, 1998, 167(3): 315–327
- Pierce SK. Volume regulation and valve movements by marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1971, 39(1): 103–117
- Reid HI, Soudant P, Lambert C. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 56(3): 249–258
- Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 1999, 172(1): 125–145
- Rolff J, Siva-Jothy M. Invertebrate ecological immunology. *Science*, 2003, 301(5632): 472–475
- Shen YL, Ge XP, Huang JT, *et al.* Effects of salinity on Na^+/K^+ -ATPase activity, the osmolality of pericardial cavity fluid and peritoneal fluid and ion content in *Onchidium struma*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 851–857 [沈永龙, 戈贤平, 黄金田, 等. 盐度对瘤背石磺不同部位 Na^+/K^+ -ATP 酶活性、围心腔液和腹腔液渗透压及离子含量的影响. *水产学报*, 2013, 37(6): 851–857]
- Shi SK, Wang RX, Wang JY, *et al.* Effects of salinity stress on immune factors of *Crassostrea hongkongensis*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 26–30 [时少坤, 王瑞璇, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 26–30]
- Silvia GJ, Antonio URA, Francisco VO, *et al.* Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, 2004, 233(1): 573–581
- Solorzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 1969, 14: 799–801
- Stickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968, 67: 1–11
- Tang BJ, Yan WG, Wang H, *et al.* Effects of salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion rate of different-size of *Trachycardium flavum*. *Marine Fisheries*, 2010, 32(1): 30–34 [唐保军, 闫文罡, 王慧, 等. 盐度对不同规格黄边糙鸟蛤呼吸排泄的影响. *海洋渔业*, 2010, 32(1): 30–34]
- Wang FY, Yang HS, Gao F, *et al.* Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 491–498
- Wang XQ, Wang LL, Zhang H, *et al.* Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 1016–1026
- Ye LF. Standing tidal waves and salinity mixing in the Qinglan Estuary, Hainan Island. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1988(3): 9–14 [叶龙飞. 海南岛清澜河口的驻波型潮波和盐度混和. *海洋湖沼通报*, 1988(3): 9–14]
- Yuan SY, Deng JZ. Temperature and salinity thermal structures in the northern South China Sea—III. spatial and temporal salinity distribution characteristics in the northern South China Sea. *South China Sea Research and Development*, 1998(2): 28–36 [袁淑尧, 邓九仔. 南海北部的温盐热结构——III. 南海北部盐度时空分布特征. *南海研究与开发*, 1998(2): 28–36]
- Zhang GF, Fang XD, Guo XM, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 2012, 490(7418): 49–54
- Zurburg W, De Zwaan A. The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. *Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215(3): 315–325

Effects of Acute Hyperosmotic Stress on Metabolic Rates and Immune-Related Enzymatic Activities in Clam (*Trachycardium flavum*)

TANG Baojun^①, ZOU Xiong, YIN Fei

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

Abstract To investigate the effects of acute hypersaline stress on the physiological metabolism and immunity of clam *Trachycardium flavum*. The oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and activities of Na⁺/K⁺-ATPase, superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) in different tissues were measured at 2, 12, 24, 48 and 72 h as water salinity increased from 31 to 37. Results showed that the oxygen consumption rate of clams in treatment group decreased at 2 h and then gradually increased, and was significantly higher than the control group at 24 and 72 h ($P<0.05$). The ammonia excretion rate significantly decreased ($P<0.01$) at 2 h and was lower than the control group at all time points. At 12 h, the clams showed significant lower Na⁺/K⁺-ATPase activity ($P<0.05$), but no significant difference of Na⁺/K⁺-ATPase activity in muscle was found between the control and treatment groups. SOD activities in mantle, hepatopancreas and gill reached maximum values at 24 h, which was significantly higher than the control group ($P<0.05$), and then decreased; SOD activity in muscle reached a peak at 48 h and then declined. ACP activity in mantle and gill showed similar variation as SOD. ACP activity was significantly reduced ($P<0.05$) and then gradually rose. No significant difference of enzymatic activity in muscle was found between the control and treatment groups. ALP activity in hepatopancreas and gill decreased followed by significant increase ($P<0.05$). Compared with the control group, no significant difference of enzymatic activity in mantle and muscle was found. The results suggested that acute hypersaline stress significantly affected the metabolism and immunity of *T. flavum*, and such effects varied with time. The impact of hypersaline on the immune enzymatic activities is tissue-specific.

Key words *Trachycardium flavum*; Hyperosmotic stress; Oxygen consumption rate; Ammonia excretion rate; Na⁺/K⁺-ATPase; Immune-related enzymes activity

① Corresponding author: TANG Baojun, E-mail: bjtang@yeah.net

条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)源美人鱼发光 杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*)的分离鉴定*



王庚申^{1,2} 许文军¹ 谢建军¹ 汪玮¹ 施慧^{1①}

(1. 浙江省海洋水产研究所 舟山 316021; 2. 浙江省海水增殖重点实验室 舟山 316021)

摘要 2013 年浙江省舟山市某网箱养殖条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)暴发了一种严重的疾病, 病鱼主要症状为脾、肾出现 1–2 mm 的白色类结节。从患病鱼内脏处分离得到 1 株优势菌 OF-1, 经人工感染实验证实为此次引起条石鲷死亡的致病菌, 半数致死量为 5.93×10^4 CFU/g。形态学观察结果显示, 菌株 OF-1 为革兰氏阴性、短杆状, 在 TCBS 培养基上不生长。API 20E 细菌鉴定系统、16S rRNA 系统发育树分析结果证实, 该菌株为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela subsp. piscicida*)。该菌对庆大霉素、青霉素、氟哌酸、氧氟沙星、氨苄青霉素等药物高度敏感, 对红霉素、链霉素、卡那霉素、苯唑青霉素等药物具有抗性。

关键词 条石鲷; 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种; 细菌鉴定

中图分类号 S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0151-07

条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)俗称日本鸚鵡鱼, 主要分布在我国的海黄、东海、台湾沿海以及日本北海道以南等海域, 系温热带近海岩礁鱼类(朱元鼎等, 1963)。条石鲷体态优美, 色泽鲜艳, 肉质细致, 营养丰富, 具有较高的经济价值和观赏价值(武云飞等, 1999)。我国于 2004 年首次完成条石鲷规模化人工育苗, 目前, 条石鲷已成为我国海水网箱养殖和人工增殖放流的优良品种之一(牛化欣等, 2008)。近年来, 国外关于条石鲷营养需求(Shan *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009)、免疫(Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Zoysa *et al.*, 2012)及病害(畑井喜司雄等, 2007; Jung *et al.*, 2000)等方面的研究取得了一些进展; 国内也有一些条石鲷人工繁育(倪梦麟等, 2007)、早期发育(柳学周

等, 2008)、生理(柳敏海等, 2009; 孙鹏等, 2010)及组织学(王健鑫等, 2006; 何滔等, 2013)等方面的报道, 但有关条石鲷病害方面的研究还鲜见报道。

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela subsp. piscicida*)即原来的杀鱼巴斯德氏菌(*Pasteurella piscicida*), 最早从美国的野生美洲狼鲈(*Morone americana*)和条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)分离得到(张飞等, 2012), 随后由该菌引起的鱼类感染相继在日本和美国发生, 造成了鱼类大量死亡。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对宿主无专一性, 可感染多种养殖鱼类, 通常在 18–20℃时发病(Magarinos *et al.*, 1992)。

2013 年 8 月, 浙江省舟山市某网箱养殖条石鲷暴发了一种严重的疾病, 死亡率达到 20%以上。患病

* 浙江省自然科学基金项目(Y15C190018)、浙江省科技计划项目(2015F30003、2015F50004)、浙江省科技厅重点农业项目(2012C12010-1)和浙江省海洋与渔业科技示范推广项目(浙海渔计[2013]112 号)共同资助 [This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Y15C190018), the Science and Technology Project of Zhejiang Province (2015F30003 and 2015F50004), Key Agricultural Project from Zhejiang Province Science and Technology Department (2012C12010-1), and Demonstration and Promotion Project from Zhejiang Ocean and Fishery Bureau([2013]No.112)]. 王庚申, E-mail: wgs-1988@163.com

① 通讯作者: 施慧, 副高级工程师, E-mail: huishi2002@126.com

收稿日期: 2015-12-09, 收修改稿日期: 2015-12-21

鱼主要症状为体色加深, 离群独游, 反应迟钝, 食欲减退, 体表无明显发病症状; 解剖可见脾脏、肾脏表面出现许多 1–2 mm 左右白色类结节, 严重者肝脏、肠道也会出现相同的白点(图 1)。本研究从患病条石鲷的内脏分离得到优势菌, 对细菌进行人工感染确定其致病性, 并运用形态学观察、生理生化测定及 16S rRNA 基因序列分析对病原菌进行鉴定, 最后进行了药物敏感实验, 本研究结果将为条石鲷健康养殖和疾病防治提供理论依据。



图 1 患病条石鲷

Fig.1 Diseased *O. fasciatus*

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病条石鲷取自浙江省舟山市某养殖网箱, 体长为 10–12 cm。人工感染实验所用条石鲷为浙江省海洋水产研究所西轩岛试验场放流的健康条石鲷, 体长为 8–10 cm, 暂养 7 d 后用于感染实验。

细菌分离所用的 TSA 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; TCBS 培养基购自杭州微生物试剂有限公司; 法国 API 20E 细菌鉴定系统试剂条购自生物梅里埃中国有限公司; 细菌生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司; 切胶回收试剂盒和引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTP 等购自宝生物工程(大连)公司。

1.2 病原菌的分离培养

无菌条件下解剖病鱼, 观察体表和各器官的病变情况。取体表黏液、鳃丝、肝脏、肾脏、脾脏等处组织, 制作成水浸片, 在显微镜下进行检查, 以初步观察和确认可疑致病原。

取有典型症状的濒死条石鲷, 用 75% 的酒精棉球反复擦拭病鱼体表, 无菌解剖后, 用接种环在脾脏、肾脏及肝脏处取样, 平板划线接种于 TSA 和 TCBS

培养基, 28℃ 恒温培养 48 h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养, 获得纯培养菌株后, –80℃ 保存备用。

1.3 人工感染实验

健康条石鲷暂养 7 d 后, 选择规格均一、活力好的个体用于感染实验。实验在 80 L 水族箱中进行, 每 8 尾条石鲷为 1 组, 每个细菌浓度设 3 个平行, 并设 3 个对照组。

将分离到的优势菌经 TSA 培养基培养 48 h, 用 1.5% 灭菌生理盐水洗下细菌, 分光光度法结合平板计数法制成浓度为 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 CFU/ml 的菌悬液。采用腹腔注射法对条石鲷进行人工感染, 每尾鱼注射 0.2 ml 菌悬液, 对照组注射等量的 1.5% 灭菌生理盐水。连续观察 14 d, 随时记录发病症状和死亡情况。实验期间水温为 26–28℃, 盐度为 30–32, 充气, 不投喂, 每天换水量为 50%。采用 Reed-Muench 法(安德森, 1984)计算半数致死量 LD_{50} 。

1.4 病原菌的鉴定

1.4.1 形态学观察 将纯化菌株接种于 TSA 培养基, 28℃ 培养 24 h, 观察菌落形态并挑取纯培养物进行革兰氏染色和负染, 观察细菌形态及大小。

1.4.2 生理生化鉴定 按照产品说明所述方法以法国 API 20E 细菌鉴定系统的生化实验及细菌生化鉴定管测定细菌的生理生化指标。

1.4.3 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建 模板 DNA 的制备: 挑取单菌落置于 100 μ l 灭菌蒸馏水中, 煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 12000 g 离心 5 min, 取上清液作为模板 DNA。16S rRNA 基因扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGG(C/T)TAC CTTGTTACGACTT-3')。25 μ l PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2.5 μ l、dNTP 混合物 2 μ l、上下游引物各 0.5 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l、模板 DNA 5 μ l, 灭菌双蒸水补足反应体系。PCR 扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 进行 30 个循环; 72℃ 7 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果经 Blast 后用 ClustalX 软件进行多序列匹配排列, 然后用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.5 药物敏感实验

用灭菌生理盐水从培养 48 h 的 TSA 培养基上洗下待测菌株, 通过分光光度法结合平板计数法调整其菌液浓度为 10^9 CFU/ml。取 0.1 ml 菌悬液涂布于 TSA 培养基, 然后贴上药敏纸片(购自杭州微生物试剂有限公司), 28℃ 培养 24 h 后, 测量抑菌圈的直径。

2 结果

2.1 病原菌的分离培养

水浸片观察结果显示, 肝脏、脾脏及肾脏等处有许多活动的杆状细菌。从多条患病条石鲷肝脏、脾脏及肾脏处分离得到同一种优势菌(记为 OF-1)。该菌在 TSA 培养基上 28℃ 培养 24 h 后, 菌落呈圆形、半透明、中央隆起、边缘规则、表面光滑湿润、乳黄色, 直径为 0.3–0.5 mm, 48 h 后直径为 1.0–1.6 mm; 在 TCBS 培养基上不生长。

2.2 人工感染实验

实验鱼从第 2 天开始出现死亡(表 1), 第 3 天各实验组的死亡个体脾脏、肾脏开始出现白点, 对照组在实验期间无症状、无死亡。人工感染实验发病鱼与自然发病鱼的症状相同, 脾脏、肾脏处可见白色结节,

从感染鱼分离得到的致病菌与 OF-1 的菌落形态、生理生化特征一致, 证实菌株 OF-1 为此次条石鲷内脏白点病的致病菌。经计算, 菌株 OF-1 的半数致死量 LD₅₀ 为 5.93×10⁴ CFU/g。

2.3 病原菌的鉴定

菌株 OF-1 为革兰氏阴性菌, 短杆状, 两端着色加深; 细菌单个存在, 或两个、多个连接成长杆状(图 2)。生理生化结果显示(表 2), 氧化酶、V-P 实验、精氨酸双水解酶、发酵葡萄糖及甘露糖等为阳性; β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、柠檬酸盐利用、H₂S 产生、脲酶、色氨酸脱氨酶、产生吡啶、明胶酶以及发酵甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖等为阴性, 在 API 20E 细菌鉴定系统编号为 2005004, 与美人鱼发光杆菌杀鱼亚种生理生化特征一致。

表 1 条石鲷腹腔注射感染实验结果

Tab.1 The mortality of *O. fasciatus* infected by intraperitoneal injection

实验分组 Group	细菌浓度 Bacteria concentration(CFU/ml)	尾数 Number	注射剂量 Injection dosage(ml)	死亡时间 Time to death (d)	死亡数 Number of death	死亡率 Mortality (%)
OF-1	2×10 ⁹	24	0.2	2–4	24	100
	2×10 ⁸	24	0.2	3–5	24	100
	2×10 ⁷	24	0.2	3–8	20	83.3
	2×10 ⁶	24	0.2	4–6	4	16.7
	2×10 ⁵	24	0.2	–	0	0
	2×10 ⁴	24	0.2	–	0	0
对照 Control	生理盐水 1.5% saline	24	0.2	–	0	0

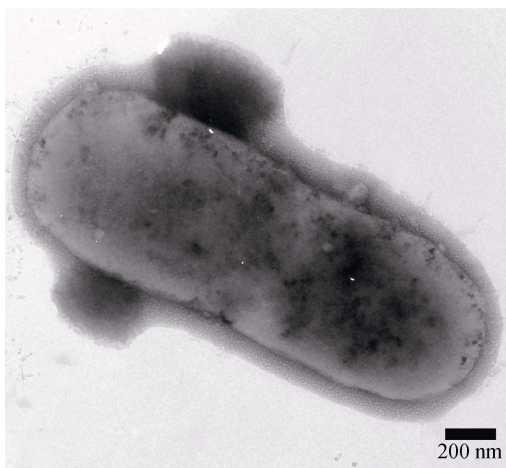


图 2 分离菌株的电镜照片

Fig.2 The electronic microphotograph of the isolated strain

2.4 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建

测序得到的 16S rRNA 基因序列长度为 1454 bp

(GenBank 登录号为: KF956381), 在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对, 与美人鱼发光杆菌同源性最高, 均达到 99% 以上。选取同源性较高的菌株 16S rRNA 序列, 用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 结果显示, 菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌 2 个亚种聚为一簇, 说明菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌亲缘关系最近。

2.5 药物敏感实验

菌株 OF-1 对 25 种抗菌药物的敏感性实验结果见表 3。结果显示, 该菌对呋喃妥因、庆大霉素、青霉素、先锋必、氟哌酸、氧氟沙星、氨苄青霉素、先锋 VI、氯霉素、环丙沙星、四环素敏感; 对先锋噻肟、利福平、头孢肤肟中度敏感; 对红霉素、万古霉素、菌必治、链霉素、卡那霉素、苯唑青霉素等药物具有抗性。

3 讨论

美人鱼发光杆菌杀鱼亚种感染不同鱼种所呈现

表 2 菌株 OF-1 生理生化指标
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of the bacterial strain OF-1

检测项目 Test items	OF-1	<i>P.damselae</i> subsp. <i>Piscicida</i> (Zorrilla <i>et al.</i> , 1999)	检测项目 Test items	OF-1	<i>P.damselae</i> subsp. <i>Piscicida</i> (Zorrilla <i>et al.</i> , 1999)
革兰氏染色 Gram stain	-	-	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	-
运动性 Motility	-	-	淀粉酶 Amylase	-	-
氧化酶 Oxidase	+	±	脂酶 Lipase	+	±
O/129 (10 µg)	-	-	明胶酶 Gelatinase	-	-
O/129 (150 µg)	-	-	脲酶 Urease	-	-
TCBS 生长 Growth on TCBS	-	-	B-半乳糖苷酶 β-galactosidase	-	-
0% NaCl 生长 Growth in 0% NaCl	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-
3% NaCl 生长 Growth in 3% NaCl	+	+	精氨酸双水解酶 Arginine digydrolase	+	±
6% NaCl 生长 Growth in 3% NaCl	-	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
8% NaCl 生长 Growth in 8% NaCl	-	-	色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	-	-
4℃ 生长 Growth at 4℃	-	-	葡萄糖 Glucose	+	+
10℃ 生长 Growth at 10℃	+	+	甘露醇 Mannitol	-	-
20℃ 生长 Growth at 20℃	+	+	甘露糖 Mannose	+	+
30℃ 生长 Growth at 30℃	+	+	麦芽糖 Maltose	-	-
37℃ 生长 Growth at 37℃	-	-	蔗糖 Sucrose	-	-
葡萄糖产气 Gas from glucose	-	-	蜜二糖 Melibiose	-	-
O-F 实验 O-F Test	F	F	鼠李糖 Rhamnose	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	肌醇 Inositol	-	-
吲哚产生 Indole production	-	-	D-山梨醇 D-sorbitol	-	-
V-P 实验 V-P test	+	±	苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	-	阿拉伯糖 Arabinose	-	-

注: +表示阳性; -表示阴性; ±表示弱阳性; F 表示发酵
Note: +: Positive; -: Negative; ±: Weak positive; F: Fermentative

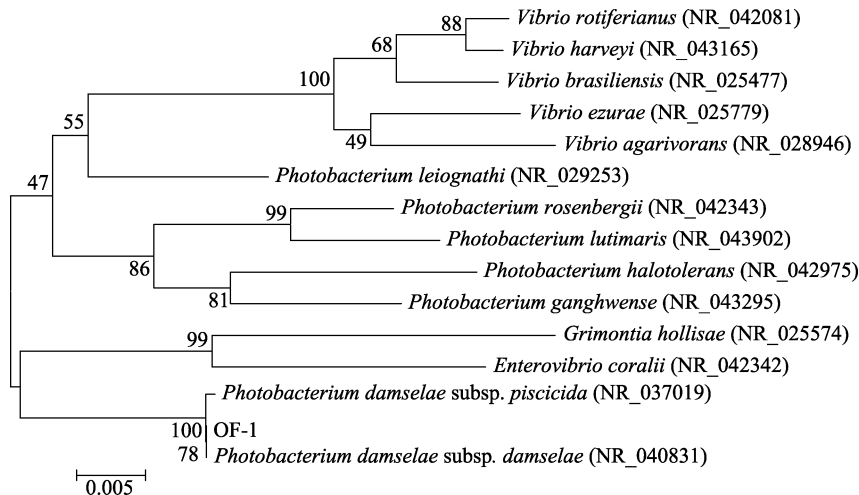


图 3 菌株 OF-1 16S rRNA 基因序列聚类分析结果
Fig.3 Cluster analysis based on the 16S rRNA sequence of strain OF-1

表 3 菌株 OF-1 药敏实验结果
Tab.3 Sensitivity of strain OF-1 to antibiotics

药物名称 Name of antibiotics	药物含量 Contents ($\mu\text{g}/\text{Tablet}$)	抑菌圈直径 Sterilizing diameter (mm)	敏感度 Sensitivity
先锋噻肟 Cefotaxime	30	19	I
红霉素 Erythromycinum	15	12	R
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	17	S
利福平 Rifampicine	5	18	I
庆大霉素 Gentamicinum	10	18	S
万古霉素 Vancomycin	30	8	R
青霉素 Penicillin G	10	16	S
先锋必 Cefoperazone	75	24	S
菌必治 Ceftriaxone	30	0	R
氟哌酸 Norfloxacin	10	26	S
链霉素 Streptomycin	10	0	R
卡那霉素 Kanamycinum	30	0	R
复达欣 Ceftazidime	30	11	R
苯唑青霉素 Proctaphlin	1	0	R
阿米卡星 Amikaxing	30	14	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	27	S
氨苄青霉素 Ampicillin	10	20	S
妥布霉素 Tobramycin	10	0	R
先锋 V Cefamezin	30	0	R
先锋 VI Cefalexin	30	20	S
复方新诺明 Sulfamethoxazolom	23.7/1.25	0	R
氯霉素 Chloromycetin	30	24	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	30	S
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	100	0	R
四环素 Tetracycline	30	35	S
头孢呋肟 Cefuroxime sodium	30	15	I

注: S 表示敏感; I 表示中度敏感; R 表示耐药

Note: S: Sensitive; I: Intermediate sensitive; R: Resistant

的症状有明显差异, 此次条石鲷感染死亡症状主要表现为脾脏、肾脏出现灰白色的结节, 最终发生死亡, 与其他多数受感染的鱼类, 如军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)等死亡症状相似(王瑞旋等, 2010; 任燕等, 2012); 但与半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)感染此菌的主要症状为体表溃烂、鳍基部出血、胆囊发黑和肾脏发黄等症状明显不同(Wang *et al.*, 2007)。目前, 关于美人鱼发光杆菌杀鱼亚种引起条石鲷感染死亡报道尚属首次。人工感染实验证实菌株 OF-1 为此次引起条石鲷死亡的致病菌, 半数致死量为 5.93×10^4 CFU/g, 与王瑞旋等(2010)从卵形鲳鲹所分离菌半数致死量(1.1×10^6 CFU/g)相比较低, 但明

显高于 Wang 等(2007)报道美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对半滑舌鲷的 LD_{50} (5.5×10^3 CFU/g), 这可能与不同菌株的毒力及不同养殖品种的抵抗力有关。

O'Hara 等(2003)采用 6 种常用的细菌鉴定系统对美人鱼发光杆菌进行鉴定, 结果发现, API 20E 对美人鱼发光杆菌的鉴定准确率为 100%。但是, Thyssen 等(2000)通过实验发现, 只有 76% 的美人鱼发光杆菌杀鱼亚种在 API 20E 测定时系统编号为 2005004, 而且必须结合杀鱼亚种对温度和盐度的严格需求进行鉴定。本研究中, 菌株 OF-1 的 API 20E 系统编号为 2005004, 在 6%NaCl 胨水以及在 4℃、37℃ 不生长, 与美人鱼发光杆菌杀鱼亚种生理生化特征一致。目前, 16S rRNA 是细菌鉴定和系统发育地位研究最常用的工具, 普遍认为 16S rRNA 同源性大于 97.5% 的

细菌可视为同种(赛文婴等, 2000)。利用 16S rRNA 通用引物扩增了菌株 OF-1 的 16S rRNA 基因片段, 测序并构建系统发育树, 显示菌株 OF-1 与美人鱼发光杆菌聚为一簇, 亲缘关系最近, 综合细菌形态学特征、生理生化及分子鉴定结果, 将菌株 OF-1 鉴定为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种。

在对抗菌药物敏感性研究方面, Thyssen 等(2001)对采自不同地区的 145 株美人鱼发光杆菌杀鱼亚种进行了抗菌药物敏感性研究, 结果显示, 93% 的菌株对红霉素具有抗性; 几乎所有的欧洲菌株对卡那霉素敏感, 而来自日本的菌株 49% 对卡那霉素具有抗性。本研究中, 菌株 OF-1 对红霉素、卡那霉素均有抗性。王瑞旋等(2010)报道, 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对受试的 20 种抗菌药物有抗性, 仅对诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、红霉素、庆大霉素、氯霉素、四环素、新霉素、链霉素等药物中度敏感; 在 28 种受试中草药中对番石榴和苍术高度敏感。而本研究中, 菌株 OF-1 对环丙沙星、氯霉素、四环素、庆大霉素高度敏感, 对复方新诺明、红霉素、链霉素具有抗性。由于氯霉素、红霉素、环丙沙星等为水产禁药, 故本结果仅为其他同类药物使用提供参考。

参 考 文 献

- Anderson DP. Immunology of Fish. Beijing: China Agriculture press, 1984 [安德森 DP. 鱼类免疫学. 北京: 中国农业出版社, 1984]
- He T, Xiao ZH, Liu QH, *et al.* Ontogeny of the gill and Na⁺, K⁺-ATPase activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 520–525 [何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷鳃的组织发育及鳃上钠钾三磷酸腺苷酶活性的早期变化. 水产学报, 2013, 37(4): 520–525]
- Jung SJ, Oh MJ. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(3): 223–226
- Kim MS, Hwang YJ, Yoon KJ, *et al.* Molecular cloning of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) tumor necrosis factor- α and its effect on the respiratory burst activity of phagocytes. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 618–624
- Kim YI, Ha YM, Ahn SJ, *et al.* Production and characterization of polyclonal antibody against recombinant ORF 049L of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) iridovirus. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 134–140
- Kishio Hatai, Kazuo Ogawa. New atlas of fish diseases. Beijing: China Agricultural University press, 2007 [畑井喜司雄, 小川和夫. 新鱼病图谱. 北京: 中国农业大学出版社, 2007]
- Liu MH, Peng ZL, Fu RB, *et al.* Annual variation of the female *Oplegnathus fasciatus* in gonadosomatic index, sex hormone and biochemical composition. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(5): 636–639 [柳敏海, 彭志兰, 傅荣兵, 等. 雌性条石鲷性体指标、性激素及生化组成的周年变化分析. 上海海洋大学学报, 2009, 18(5): 636–639]
- Lim SJ, Lee KJ. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture, 2009, 290(3–4): 283–289
- Liu XZ, Xu YJ, Wang YY, *et al.* Characters of development and growth of early life stages of the rock bream *Oplegnathus fasciatus*. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(2): 332–341 [柳学周, 徐永江, 王妍妍, 等. 条石鲷的早期生长发育特征. 动物学报, 2008, 54(2): 332–341]
- Magarinos B, Romalde JL, Bandin I, *et al.* Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3316–3322
- Ni ML, Fan WM, Mao ZZ, *et al.* Research on whole artificial breeding technique of *Oplegnathus fasciatus* from the inshore water of Zhoushan. Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science), 2007, 26(2): 143–146 [倪梦麟, 范卫明, 毛志增, 等. 舟山沿海条石鲷人工育苗技术研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007, 26(2): 143–146]
- Niu HX, Chang J, Ma S. Research progress on biology and breeding ecology of *Oplegnathus fasciatus*. Fisheries Science and Technology Information, 2008, 35(1): 50–52 [牛化欣, 常杰, 马牲. 条石鲷的生物学及养殖生态学研究进展. 水产科技情报, 2008, 35(1): 50–52]
- O'Hara CM, Sowers EG, Bopp CA, *et al.* Accuracy of six commercially available the systems for identification of members of family *Vibrionaceae*. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5654–5659
- Ren Y, Shi CB, Chang OQ, *et al.* Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and the sensitivity to antimicrobial agents. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(22): 148–152 [任燕, 石存斌, 常藕琴, 等. 五条鲫源美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定及药物敏感试验. 广东农业科学, 2012, 39(22): 148–152]
- Sai WY, Dong XZ. Application of directed evolution of orthologous gene in the bacteria phylogenetic. Microbiology China, 2000, 27(5): 377–381 [塞文婴, 东秀珠. 定向进化同源基因在细菌系统发育研究中的应用. 微生物学通报, 2000, 27(5): 377–381]
- Shan XJ, Quan HF, Dou SZ. Effects of delayed first feeding on growth and survival of rock bream *Oplegnathus fasciatus* larvae. Aquaculture, 2008, 277(1–2): 14–23
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Effect of salinity on activity of Na⁺/K⁺-ATPase in juvenile of *Oplegnathus fasciatus*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1024–1029 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 盐度对条石鲷幼鱼 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响. 水产学报, 2010, 34(8): 1024–1029]
- Thyssen A, Grisez L, van Houdt R, *et al.* Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Microbial Pathogenesis, 2000, 28(2): 119–126
- Thyssen A, Ollevier F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* to 15 different antimicrobial agents. Aquaculture, 2001, 200(3–4): 259–269
- Wang JX, Shi G, Li P, *et al.* Morphology and histology of digestive in *Oplegnathus fasciatus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(5): 618–626 [王健鑫, 石戈, 李鹏, 等. 条

- 石鲷消化道的形态学和组织学. 水产学报, 2006, 30(5): 618–626]
- Wang RX, Feng J, Su YL, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and its drug sensitivity. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 1020–1027 [王瑞旋, 冯娟, 苏友禄, 等. 卵形鲳鲹美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1020–1027]
- Wang Y, Han Y, Li Y, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 763–768
- Wu YF, Men Q, Kang B. A supplementary study on the morphology and ecology of two species rare fish from Qingdao. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(4): 581–585 [武云飞, 门强, 康斌. 两种珍稀鱼类的形态学和生态学的补充研究. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(4): 581–585]
- Zhang F, Su YQ, Wang J, *et al.* Studies on the isolation, identification and virulence of *Photobacterium damsela* isolated from *Pseudosciaena crocea*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(6): 1202–1208 [张飞, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)源美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的分离鉴定及致病性研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1202–1208]
- Zhu YD, Zhang CL, Cheng QT, *et al.* Fishes of East China Sea. Beijing: Science press, 1963 [朱元鼎, 张春霖, 成庆泰, 等. 东海鱼类志. 北京: 科学出版社, 1963]
- Zorrilla I, Balebona MC, Moriigo MA. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases, 1999, 22(3): 167–172
- Zoysa MD, Ryu JH, Chung HC, *et al.* Molecular characterization, immune responses and DNA protection activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), peroxiredoxin 6 (Prx6). Fish and Shellfish Immunology, 2012, 33(1): 28–35

(编辑 冯小花)

Isolation and Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from Diseased Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*)

WANG Gengshen^{1,2}, XU Wenjun¹, XIE Jianjun¹, WANG Wei¹, SHI Hui¹①

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021;

2. Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021)

Abstract Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) is an important economic fish cultured in China. In recent years, rock bream aquaculture has developed rapidly along the coast of China. In August 2013, an epizootic occurred among cultured rock bream in a cage culture farm in Zhoushan of Zhejiang Province, China, which caused a cumulative mortality up to 20%. The diseased fish had no obvious symptoms on body surface; the main symptom was characterized by many white nodules (1–2 mm) in the spleen and kidney. The aim of this research was to isolate and identify the bacterial isolate, then to determine the pathogenicity and test drug sensitivity of bacteria pathogen found in diseased rock bream. A dominant bacterium strain OF-1 was isolated from the liver, spleen and kidney. Artificial infection test with intraperitoneal injection method proved that the LD₅₀ value of bacterium strain OF-1 was 5.93×10⁴ CFU/g. It was identified based on the morphology, the biochemical characteristics, and the 16S rRNA sequencing. The results of morphological tests indicated that strain OF-1 was gram-negative, rod bacteria and did not grow in the TCBS plate. OF-1 exhibited an API 20E index profile of 2005004, which was identical with the profile exhibited by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. The sequence analysis of 16S rRNA gene, the morphological, physiological and biochemical characteristics indicated that the bacterium strain OF-1 could be identified as *P. damsela* subsp. *piscicida*. The strain was highly sensitive to gentamicinum, penicillin G, norfloxacin, ofloxacin and ampicillin, but was resistant to erythromycinum, vancomycin, rocephin, streptomycin, kanamycinum and proctaphlin. This paper reported for the first time that *P. damsela* subsp. *Piscicida* caused the disease of rock bream in China, which will provide reference in fish health management and disease control.

Key words *Oplegnathus fasciatus*; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; Bacterial identification

① Corresponding author: SHI Hui, E-mail: huishi2002@126.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20160123001

http://www.yykxjz.cn/

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧光定量 PCR 检测*



刘宝彬^{1,2} 杨冰^{1,2,3} 吕秀旺^{1,2} 万晓媛^{1,3} 刘珍^{1,2} 黄健^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 2013 年,河北、天津等地区养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育苗期出现死苗、出苗率低的情况,生产上,仔虾个体大小差异较大,造成了严重损失。本研究采用荧光定量 PCR 方法(Real-time PCR)对天津大港地区采集的 108 尾凡纳滨对虾仔虾样品进行单尾病原检测。结果显示,传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)和虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)均有检出。IHHNV 阳性检出率 100%,每微克对虾组织 DNA 的病毒拷贝数为 10^3-10^7 ,且个体较大的样品(1.2-2.0 cm)携带病毒拷贝数偏高;EHP 阳性检出率为 49.1%,每微克对虾组织 DNA 的拷贝数为 10^3-10^5 ,且集中于个体较小样品(0.7-1.1 cm)。对 IHHNV 和 EHP 阳性凡纳滨对虾样品进行生物学体长与病毒载量指数相关性分析,显示 IHHNV 载量指数与对虾生长速率呈正相关,虾组织 IHHNV 平均载量达 8.51×10^4 copies/ μ g DNA,为较高的感染水平;EHP 的载量与对虾生长速率呈负相关关系,与较大个体阳性检出率较低相对应,虾组织 EHP 平均载量达到 2.19×10^4 copies/ μ g DNA,为较高的感染水平。由此,该批凡纳滨对虾仔虾患病为 IHHNV 和 EHP 的混合感染所致,本研究数据为 IHHNV 和 EHP 病原混合感染流行情况及其对养殖育苗期仔虾生长的影响提供科学依据。

关键词 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); Real-time PCR; 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV); 虾肝肠胞虫(EHP)

中图分类号 S945 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0158-9

1981 年,在美国夏威夷地区细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中发现的传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis

virus, IHHNV)是引起全球养殖对虾疾病的主要病原之一, IHHNV 感染的野生和养殖对虾遍布世界各地,世界动物卫生组织(World Organization for Animal

* 国家自然科学基金(31101935)、国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和“泰山学者”建设工程专项共同资助 [This work was supported by the Project of National Natural Science Fund of China (31101935), China Agriculture Research System (CARS-47), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (No.2015ASKJ02), and the Construction Program for “Taishan Scholarship”]. 刘宝彬, E-mail: 943695389@qq.com

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

收稿日期: 2016-01-23, 收修改稿日期: 2016-03-27

Health, OIE)将其收录为甲壳类重要疫病之一(OIE, 2015)。IHHNV 能够感染多种对虾, 对幼虾危害尤为明显(Kalagayan *et al*, 1991), 至今尚无有效防治方法。该病毒可使凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)患上慢性矮小残缺综合征(Runt deformity syndrome, RDS), 导致养殖规格参差不齐, 产量下降, 损失严重(Bell *et al*, 1984; Kalagayan *et al*, 1991; Primavera *et al*, 2000; Chayaburakul *et al*, 2004)。Yang 等(2007)首次检测并报道自2001年中国养殖凡纳滨对虾中就发现IHHNV的感染和流行。虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是专性细胞内寄生的原生物, 2009年于泰国养殖池塘生长迟缓的斑节对虾(*Penaeus monodon*)中发现(Chayaburakul *et al*, 2004; Tourtip *et al*, 2009)。Flegel(2012)报道, EHP在泰国和越南出现白便综合征(White feces syndrome, WFS)的斑节对虾和凡纳滨对虾中有较高的检出率, 且严重感染虾肝肠胞虫。后虽证明, 该微孢子虫并不是引起对虾白便的病原微生物, 但无疑对凡纳滨对虾的生长和繁殖有负面影响, 且会加重其水平传播的可能性(Tangprasittipap *et al*, 2013)。2013年以来, 本实验室自国内采集的养殖对虾样品中检测到EHP, 表明EHP已在我国存在。该病原在泰国的对虾养殖中已经造成了一定的影响, 我国尚未有相关统计和报道。

实时荧光定量 PCR 用于检测对虾病毒是近期迅速发展起来的新技术, 其定量检测灵敏度高、特异性好, 已被广泛应用。现已有许多建立完善的实时荧光定量 PCR 体系用于对虾病毒的检测(韦信贤等, 2011)。Tang 等(2000)应用实时荧光定量 PCR 技术, 从感染IHHNV后31 d的红额角对虾(*Penaeus stylirostris*)中检测出 10^8 的病毒拷贝; 王忠发等(2007)应用实时荧光定量 PCR 技术检测IHHNV, 灵敏度达到50个病毒拷贝。泰国学者报道了PCR法、地高辛标记核酸探针原位杂交法以及LAMP检测方法检测寄生于斑节对虾和凡纳滨对虾肝胰腺中的EHP(Tangprasittipap *et al*, 2013; Suebsing *et al*, 2013; Tourtip *et al*, 2009), 本实验室根据GenBank中公布的EHP-SU rDNA序列设计1对特异性引物, 建立并优化了EHP实时荧光定量PCR检测方法, 检测灵敏度为80个拷贝。

2013年, 河北、天津等地区养殖凡纳滨对虾出现育苗期死苗、出苗率低的情况, 损失严重。同时, 生产上还存在虾苗个体差异较大的现象。经病原检测发现, IHHNV和EHP的感染率较高。为此, 本研究随机采集该发病群体仔虾样品, 并针对IHHNV和EHP单尾进行实时荧光定量PCR检测, 分析IHHNV

和EHP在此地区的感染水平, 为IHHNV和EHP的混合感染及流行情况提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 对虾及病毒样品

待检样品为2013年5月14日采自天津大港某育苗场的凡纳滨对虾仔虾活体样品108尾, 个体大小差异较大, 单尾对虾生物学体长的范围为0.7–2.0 cm, 单尾样品重量8–50 mg, 编号为20130521001–20130521108。取单尾对虾个体样品提取组织DNA。IHHNV阳性、EHP阳性、肝胰腺细小病毒(HPV)阳性、白斑综合征病毒(WSSV)阳性、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)阳性及无特定病原(Special pathogen free, SPF)的凡纳滨对虾组织DNA, 均由本实验室保存并提供。

1.2 引物和探针

IHHNV 荧光定量 PCR 引物及探针参考 OIE《水生动物疾病诊断手册》(2015 版)第 2.2.2 章的荧光定量 PCR 探针法中推荐的引物和探针: 上游引物(1608F): 5'-TACTCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3'; 下游引物(1688R): 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3'; 探针(TaqMan probe): 5'-FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-CT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA-3'。EHP 的荧光定量 PCR 荧光染料法检测引物由本实验室设计(刘珍等, 2016), 上游引物 EnF: 5'-GTA-GCG-GAA-CGG-ATA-GGG-3'; 下游引物 EnR: 5'-CCA-GCA-TTG-TCG-GCA-TAG-3'; 扩增片段为 185 bp。以上引物、探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 试剂材料

DNA 提取试剂盒购自 TianGen 公司。pMD™ 18-T Vector Cloning Kit, Ex Taq 聚合酶(含 10 mmol/L MgCl₂、10×PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTP each), 2×Premix Ex Taq(probe qPCR)聚合酶及 2×SYBR Green Premix Ex Taq 聚合酶均购自 TaKaRa (大连宝生物) 公司。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 IHHNV

1.4.1 标准品模板的制备 以 IHHNV 阳性样品的 DNA 为模板, 采用引物 1608F/1688R 进行常规 PCR 扩增获取目的产物, 用 pMD18-T 载体在 *E. coli* DH5α 中克隆, 克隆片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证(目的片段为 81bp)。目的产物的克隆经扩大培养后, 用质粒提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取质粒 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo)测定重组质粒 DNA 浓度为

157.9 ng/ μl , 拷贝数为 5.20×10^{10} copies/ μl DNA, 将该重组质粒作为本实验标准品原液, -80°C 保存。

1.4.2 反应体系的优化 荧光定量 PCR-IHHNV 反应体系参照 Premix Ex TaqTM (Probe qPCR) 试剂盒说明书(TaKaRa, 大连), 冰上配制, 设计 5×5 矩阵法对引物及探针浓度进行优化, 引物终浓度梯度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度梯度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。2 \times Premix Ex Taq (probe 荧光定量 PCR) 12.5 μl , 5.20×10^3 copies/ μl 的标准品模板 1 μl 。荧光定量 PCR 反应程序: 95°C 10 min 预变性; 95°C 15 s 和 60°C 1 min, 40 个循环。

1.4.3 特异性实验 以 WSSV、HPV 的阳性样品 DNA 及 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 作为模板, 以超纯水为模板做空白对照(NTC)。使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 验证引物及探针特异性。

1.4.4 构建标准曲线 将构建好的质粒标准品进行 10 倍梯度稀释, 得到 5.20×10^9 – 5.2×10^0 copies/ μl 共 10 个梯度, 每组 3 个平行, 使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 建立质粒标准品拷贝数与 C_t 值对应的标准曲线。通过分析标准曲线相关系数以及扩增效率来判断标准曲线的质量。使用前述已建立的荧光定量 PCR 方法对天津大港 108 份单尾采集的样品分别进行 IHHNV 的检测。

对已检测的天津大港地区 108 份凡纳滨对虾样品, 进行 IHHNV 载量指数与对虾生长速率分析。以每微克 DNA 中 IHHNV 的相对拷贝数的对数为 IHHNV 载量指数(Exponential relative copies, ERC), 结合样品采集时测量的对虾单尾生物学体长, 分析 IHHNV 感染对对虾生长的影响, 利用 Excel 绘制对虾生物学体长与 IHHNV 载量指数的散点图, 分析样品体长与 IHHNV 载量指数二者之间的相关性。

1.5 荧光定量 PCR 检测 EHP

1.5.1 质粒标准品的制备 以 EHP 阳性样品 DNA 为模板, 用引物 ENF185/ENR185 进行常规 PCR 扩增获取目的产物, 用 pMD18-T 载体在 *E. coli* DH5 α 中克隆, 克隆的片段送上海生工测序验证(目的片段 185 bp)。目的产物的克隆经扩大培养后, 用质粒提取试剂盒(上海生工)提取质粒 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo)测定重组质粒 DNA 浓度为 26.3 ng/ μl , 换算成拷贝数为 8.3×10^9 copies/ μl , 将该重组质粒作为本实验标准品原液, -80°C 保存。

1.5.2 反应体系和条件优化 荧光定量 PCR-EHP 反应体系参照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH

Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)说明在冰上配制, 25 μl 的反应体系含 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, 不同终浓度(0.1–1.0 $\mu\text{mol/L}$)的引物 ENF185/ENR185 和标准品 (8.3×10^3 copies)为模板。 95°C 预变性 30 s 后, 进行 95°C 10 s 和 $X^\circ\text{C}$ 45 s (X 为退火温度梯度, 设定范围 50 – 65°C)的 40 个循环扩增, 选择最佳退火温度。扩增完成后测定产物的熔解曲线。

1.5.3 特异性实验 使用 EHP 阳性样品 DNA、IHHNV、WSSV、HPV 的阳性样品 DNA 及 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 作为模板, 以超纯水为模板做空白对照(NTC)。使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 验证其特异性。

1.5.4 构建标准曲线 已明确标准质粒单位体积拷贝数约为 8.3×10^9 copies/ μl DNA, 经梯度稀释后, 分别以 8.3×10^8 – 8.3×10^1 copies/ μl DNA 共 8 个梯度作为模板, 实验设置 NTC, 每组 3 个平行, 使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 生成标准曲线。使用前述已建立的荧光定量 PCR 方法对天津大港 108 份单尾采集的样品分别进行 EHP 的检测。

对已检测的天津大港地区 108 份凡纳滨对虾样品, 进行 EHP 载量指数与对虾生长速率分析。以每微克 DNA 中 EHP 的相对拷贝数的对数为 EHP 载量指数, 结合样品采集时测量的对虾单尾生物学体长分析 EHP 感染对对虾生长的影响, 利用 Excel 绘制对虾生物学体长与 EHP 载量指数的散点图, 分析样品体长与 EHP 载量指数二者之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 IHHNV 的荧光定量 PCR 技术的建立

2.1.1 荧光定量 PCR-IHHNV 扩增条件的建立 采用 5.2×10^3 copies/ μl 含有 IHHNV 目的基因的质粒标准品为模板, 确定了荧光定量 PCR-IHHNV 扩增体系, 其中, 引物 1608F 和 1688R 的最佳浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 探针的最佳浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 即 25 μl 荧光定量 PCR-IHHNV 体系中, 含 2 \times Premix Ex Taq (probe 荧光定量 PCR) 12.5 μl 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1608F 和 1688R 各 1.25 μl 、5 $\mu\text{mol/L}$ 探针 2 μl 、5–50 ng/ μl DNA 模板 1 μl 。

2.1.2 特异性实验 荧光定量 PCR 引物及探针特异性实验结果显示(图 1-a), IHHNV 阳性样品 DNA 的 C_t 值为 28, WSSV 阳性、HPV 阳性凡纳滨对虾组织 DNA 和 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 与 NTC 均未检测到荧光信号。产物琼脂糖凝胶电泳结果(图 1-b)进

一步证实了特异性实验结果,说明此方法引物及探针
对 IHHNV 的检测方法特异性强,无非特异性扩增。

2.1.3 标准曲线的建立 将构建好的质粒 DNA(浓度为 5.2×10^{10} copies/ μl)进行 10 倍梯度稀释作为模板,分别为 10^9 – 10^0 copies/ μl DNA,共 10 个梯度。在已优化的体系条件下进行扩增。标准曲线显示,质粒浓度为 10^0 时仍可以检测到荧光信号,达到阈值线(图 2),由此本实验优化的方法检测下限可低至 5 copies/ μl DNA。

2.2 EHP 的荧光定量 PCR 技术的建立

2.2.1 荧光定量 PCR-EHP 扩增条件的建立 采用 8.3×10^3 copies/ μl 的含有 EHP 目的基因的 DNA 标准品为模板,确定了荧光定量 PCR-EHP 扩增体系,其中,引物 ENF185 和 ENR185 的最佳浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 。即 25 μl qPCR-EHP 体系中,含 $2 \times \text{SYBR}^{\text{®}}$ Premix Ex Taq[™] II 12.5 μl 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 引物 ENF185 和 ENR185

各 0.5 μl 、5–50 ng/ μl DNA 模板 1 μl 。退火温度为 60°C 时,扩增效率和引物特异性最佳,确定荧光定量 PCR-EHP 反应条件: 95°C 30 s 预变性, 95°C 10 s 和 60°C 45 s, 40 个循环。

2.2.2 特异性实验 荧光定量 PCR 引物及探针特异性的实验结果显示(图 3),除 EHP 阳性样品 DNA 在 21 循环处起峰外,WSSV 阳性、IHHNV 阳性、HPV 阳性、副溶血弧菌阳性和 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 与 NTC 均未检测到荧光信号,说明引物及探针针对 EHP 的特异性强。

2.2.3 标准曲线的构建 将构建好的质粒 DNA(浓度为 8.3×10^9 copies/ μl)10 倍梯度稀释作为模板,分别为 10^8 – 10^1 copies/ μl DNA 共 8 个梯度,在已优化的体系条件下进行扩增。标准曲线显示,质粒浓度在 10^1 处可检测到荧光信号(图 4),由此本实验优化的方法检测下限为 80 copies/ μl DNA。

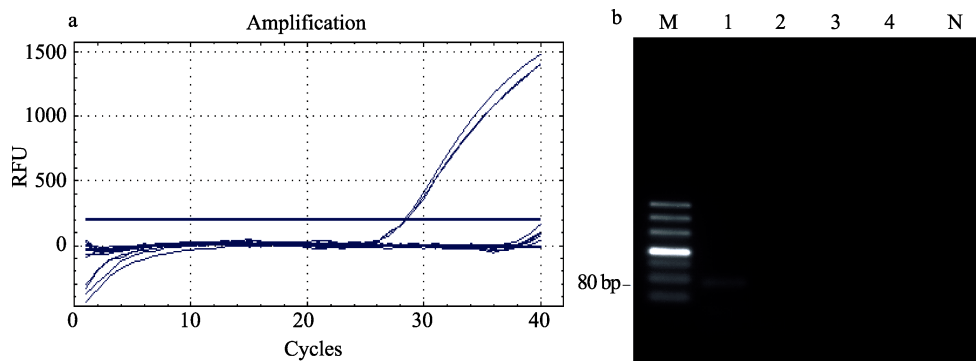


图 1 IHHNV 荧光定量 PCR 特异性
Fig.1 Specificity of IHHNV real-time PCR

a. 扩增曲线; b. 扩增产物电泳结果

M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); 泳道 1–4 分别为 IHHNV DNA、HPV DNA、WSSV DNA 和 SPF 对虾组织 DNA; N: 对照

a. Amplification plots; b. Gel electrophoresis of real-time PCR products
M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); Lane 1–4: IHHNV DNA, HPV DNA, WSSV DNA, and SPF shrimp DNA respectively; N: NTC (No template control, distilled water)

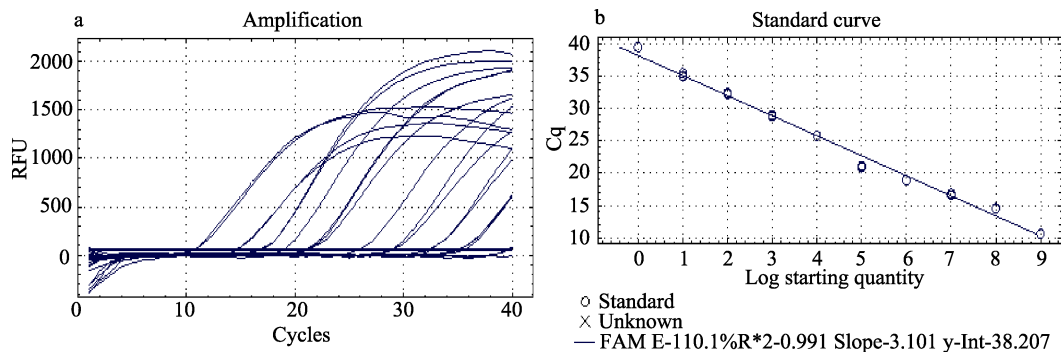


图 2 IHHNV 荧光定量 PCR 标准曲线构建
Fig.2 Generation of IHHNV real-time PCR standard curve

a. 10×梯度质粒扩增曲线; b. 标准曲线

a. 10×gradient of plasmid amplification plots; b. Standard curve

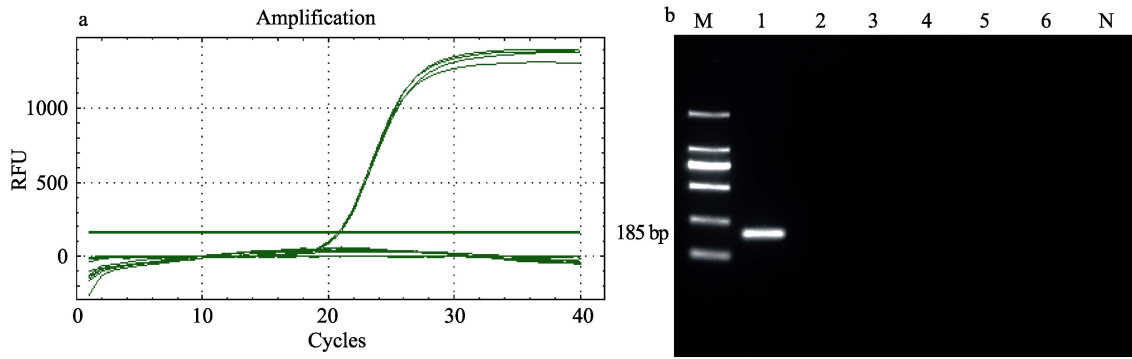


图 3 EHP 荧光定量 PCR 特异性
Fig.3 Specificity of EHP real-time PCR

a. 扩增曲线; b. 扩增产物电泳结果

M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); 泳道 1-6 分别为 EHP DNA、WSSV DNA、IHHNV DNA、HPV DNA、副溶血弧菌 DNA 和 SPF 对虾组织 DNA; N: 空白对照

a. Amplification plots; b. Gel electrophoresis of real-time PCR products

M: DL2000 DNA Marker (TaKaRa); Lane 1-6: EHP DNA, WSSV DNA, IHHNV DNA, HPV DNA, *Vibrio Parahaemolyticus* DNA, and SPF shrimp DNA respectively; N: NTC (No template control, distilled water)

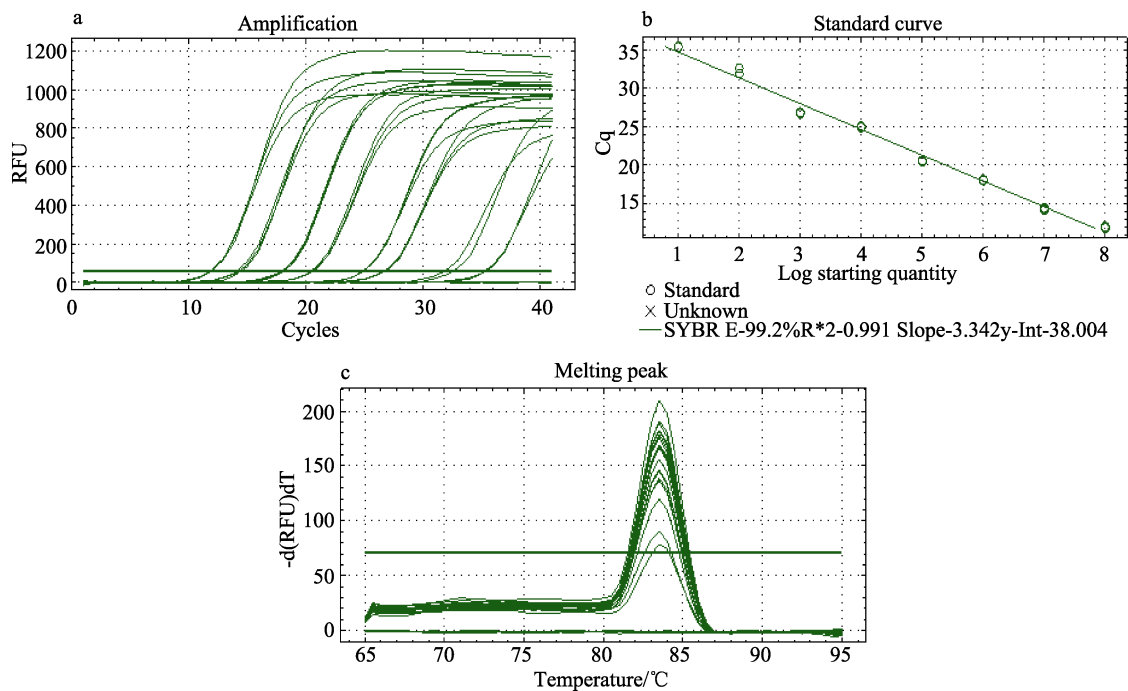


图 4 EHP 荧光定量 PCR 标准曲线构建
Fig.4 Generation of EHP real-time PCR standard curve

a. 10×梯度质粒扩增曲线; b. 标准曲线; c. 熔解曲线

a. 10×gradient of plasmid amplification plots; b. Standard curve; c. Melting curve

2.3 对虾样品荧光定量 PCR 检测结果

IHHNV 荧光定量 PCR 检测结果以每微克对虾组织 DNA 所含病毒拷贝数(copies/ μg DNA)表示。结果显示, IHHNV 的阳性率为 100%, 病毒拷贝数最低为 1.01×10^3 copies/ μg DNA(体长 0.9 cm 对虾), 最高为 3.07×10^7 copies/ μg DNA(体长 2.0 cm 对虾), 个体较

小的样品(54 尾, 体长 0.7-1.1 cm 对虾)每微克对虾组织 DNA 中病毒拷贝数在 10^3 - 10^5 copies/ μg DNA 之间; 个体较大的样品(54 尾, 体长 1.2-2.0 cm 对虾)拷贝数则在 10^4 - 10^7 copies/ μg DNA 之间。EHP 的阳性率为 49.1%, EHP 拷贝数最低为 3.26×10^2 copies/ μg DNA(体长 1.4 cm 对虾), 最高为 1.25×10^6 copies/ μg DNA(体

长 0.8 cm 对虾)。EHP 阳性的样品每微克 DNA 的拷贝数在 10^3 – 10^5 copies/ μg DNA 之间,且阳性主要集中在个体较小(体长 0.7–1.1 cm)的对虾样品中(表 1)。

2.4 对虾生长速率与 IHHNV、EHP 载量关系

对采集自天津大港 108 份凡纳滨对虾样品进行逐尾体长测定和对虾组织中 IHHNV、EHP 的 qPCR 检测,该批凡纳滨仔虾样品来源于同时放苗的样品,但批内体长大小不均匀、生长缓慢。108 份样品中,荧光定量 PCR-IHHNV 阳性检出率为 100%,平均体长(1.19 ± 0.32) cm,分布在 0.7–1.8 cm 范围。荧光定量 PCR 检测结果见表 1,平均 IHHNV 载量指数(Exponential relative copies of IHHNV, $\text{ERC}_{\text{IHHNV}}$)为 4.93 ± 0.90 ,平均拷贝数为 8.51×10^4 copies/ μg DNA,与对虾体长呈正相关性($R=1.1419$)(图 5)。

从表 1 可知,108 份凡纳滨样品中,有 55 尾对虾在 40 个循环的荧光定量 PCR-EHP 检测中未出现扩增信号,检出率为 49.1%,对 53 份阳性凡纳滨对虾样品进行 EHP 载量指数(ERC_{EHP})与对虾体长的相关性分析,其中,平均体长为(1.00 ± 0.24) cm 对虾的平均 EHP 载量指数(ERC_{EHP})为 4.34 ± 0.81 ,拷贝数为 2.19×10^4 copies/ μg DNA,两者呈轻微的负相关性($R=-0.4791$)。体长分布在 0.7–1.1 cm 对虾的 EHP 阳性率最高,且平均 EHP 载量指数达到(4.42 ± 0.078),平均拷贝数为 2.63×10^4 copies/ μg DNA(图 6)。

3 讨论

凡纳滨对虾以其盐度适应范围广、生长速度快、抗病力强等优点已成为国内主要对虾养殖品种。然而,种苗及亲虾的大量引进增加了疾病传入我国的机率,且造成了一定经济损失。Yang 等(2007)针对 2001–2004 年国内 299 份养殖对虾 IHHNV 流行情况进行分析,该病毒阳性检出率为 51.4%,在国内一直呈流行趋势。童桂香等(2013)根据广西凡纳滨对虾养殖情况,分别在北海市、钦州市、防城港市设立监测区,应用 PCR 对采集样品进行 IHHNV 检测,2010–2012 年 IHHNV 阳性率分别为 62.1%、44.3%和 32.1%。通过严格控制亲虾品质及引进无病毒感染种苗,凡纳滨对虾品质已得到提升,IHHNV 感染呈逐年下降的趋势。EHP 近年来已成为导致对虾生长缓慢的主要病原性因素之一,且在亚洲多个国家检出。我国针对 2013–2015 年的养殖对虾 EHP 携带情况进行调查,显示其具有较高的风险水平。

PCR 技术在水产养殖病原检测中的应用已非常广泛,相对于传统的组织学方法省时省力。现已建立

和报道了多种检测 IHHNV 的 PCR 方法,并且被 OIE 收录和推荐使用(Shike *et al*, 2000; Tang *et al*, 2000、2001、2007; Nunan *et al*, 2000; Krabsetsve *et al*, 2004)。荧光定量 PCR 技术以其特异性和准确性高等特点逐渐被广泛应用于水产动物病原的检测,其灵敏度高于普通 PCR,解决了常规 PCR 无法对扩增反应进行实时监测和对起始模板准确定量的问题(钟江华等, 2011),作为一种新的成熟核酸检测方法广泛用于基因检测、传染病诊断等诸多领域。任聪等(2009)建立了 IHHNV 实时荧光定量 PCR 检测方法,并优化了体系和退火温度,检测灵敏度能达到 10 个病毒拷贝。徐丽美等(2013)建立的实时荧光定量 PCR 方法检测灵敏度能达到 10 个病毒拷贝。本研究中,采用 OIE 推荐的 Real-time PCR 检测 IHHNV,在进行体系优化后,其检测灵敏度可低至 5 个病毒拷贝。本研究建立的荧光定量 PCR 检测 EHP 的灵敏度为 80 个拷贝。

荧光定量 PCR 检测 IHHNV,阳性检出率为 100%,个体较小的样品病毒拷贝数(10^3 – 10^5 copies/ μg DNA)低于个体较大的样品病毒拷贝数(10^4 – 10^7 copies/ μg DNA)。IHHNV 会造成养殖凡纳滨对虾患矮小残缺综合征,导致个体大小参差不齐,检测结果表明自然状态下感染 IHHNV 的同一批凡纳滨对虾仔虾中,个体较大的 IHHNV 的带毒量比个体较小的高 1 个数量级,研究认为 IHHNV 在宿主体内的复制取决于宿主生长的年龄阶段,IHHNV 的病毒粒子极小,其携带基因量很有限,所以病毒主要依靠其宿主细胞来进行复制增殖(Tang *et al*, 2001),结果使得个体生长较大的仔虾带毒量会高,这与本实验的检测结果相符合;EHP 阳性检出率为 49.1%,每微克 DNA 的拷贝数在 10^3 – 10^5 之间,阳性主要集中在个体较小的样品中。而通过对对虾体长与 IHHNV 载量指数分析显示 IHHNV 载量指数与对虾体长呈正相关性,平均 IHHNV 载量指数为 4.93 ± 0.90 ,拷贝数达到 8.51×10^4 copies/ μg DNA 左右时,对天津大港地区凡纳滨对虾养殖造成严重经济损失,达到较高的风险水平;而对虾体长与 EHP 载量指数成轻微的负相关性,平均 EHP 载量指数为 4.34 ± 0.81 ,拷贝数达到 2.19×10^4 copies/ μg DNA,达到较高的风险水平。这与对虾生长速率与 EHP 载量关系的荧光定量 PCR-EHP 验证结果相一致(刘珍等, 2016)。通过本实验数据,造成天津大港地区凡纳滨对虾生长缓慢参差不齐的原因,为 IHHNV 和 EHP 协同感染凡纳滨对虾仔虾造成,而两种病原相关性差异的原因可能与病原感染时间早晚、虾体对不同病原抵抗力的差异,虾苗健康状况等综合因素有关。

本实验随机采集天津大港某养殖场 108 份凡纳滨仔虾样品, IHHNV 阳性率为 100%,表明 IHHNV

表 1 荧光定量 PCR 检测天津大港凡纳滨仔虾 IHNV 和 EHP

Tab.1 Real-time PCR result of IHNV and EHP detection for *L. vannamei* from Tianjin Dagang

样品编号 Sample No.	体长 Body length(cm)	IHNV (copies/ μ g DNA)	EHP (copies/ μ g DNA)	样品编号 Sample No.	体长 Body length(cm)	IHNV (copies/ μ g DNA)	EHP (copies/ μ g DNA)
20130521001	1.10	5.29×10^4	3.43×10^4	20130521055	1.40	3.79×10^4	—
20130521002	0.90	1.06×10^4	3.88×10^4	20130521056	1.30	1.48×10^6	—
20130521003	0.80	7.43×10^4	1.23×10^5	20130521057	1.30	4.46×10^5	—
20130521004	0.90	1.41×10^4	2.60×10^5	20130521058	1.30	6.14×10^5	—
20130521005	0.70	1.19×10^4	4.07×10^5	20130521059	1.20	3.67×10^5	—
20130521006	0.90	8.76×10^3	1.08×10^5	20130521060	1.20	4.20×10^5	—
20130521007	0.90	9.19×10^3	3.21×10^5	20130521061	2.00	3.07×10^7	—
20130521008	0.70	2.45×10^3	2.46×10^5	20130521062	1.50	8.64×10^5	—
20130521009	0.90	1.82×10^4	1.79×10^4	20130521063	1.40	7.25×10^4	—
20130521010	0.90	6.52×10^3	5.19×10^4	20130521064	1.30	6.89×10^4	—
20130521011	1.00	6.43×10^3	1.77×10^4	20130521065	1.20	1.30×10^5	—
20130521012	0.90	8.71×10^3	6.20×10^4	20130521066	1.80	1.11×10^5	—
20130521013	1.00	1.06×10^4	4.43×10^4	20130521067	1.80	6.68×10^6	—
20130521014	0.80	3.66×10^3	3.78×10^4	20130521068	1.80	2.11×10^6	—
20130521015	0.90	1.01×10^3	3.79×10^4	20130521069	1.30	2.95×10^6	—
20130521016	0.80	1.38×10^3	—	20130521070	1.30	2.53×10^5	—
20130521017	1.00	8.47×10^3	—	20130521071	1.30	3.20×10^5	—
20130521018	1.00	1.60×10^4	2.81×10^3	20130521072	1.20	2.70×10^5	—
20130521019	1.00	1.87×10^4	3.34×10^4	20130521073	1.20	2.20×10^5	—
20130521020	0.90	1.46×10^3	1.98×10^5	20130521074	1.80	9.30×10^5	—
20130521021	0.90	5.84×10^3	1.04×10^5	20130521075	1.80	9.58×10^5	—
20130521022	0.90	3.82×10^5	5.70×10^3	20130521076	1.70	4.81×10^4	—
20130521023	0.80	3.74×10^3	1.25×10^6	20130521077	1.80	3.14×10^4	—
20130521024	0.90	2.14×10^3	4.53×10^4	20130521078	1.50	8.81×10^5	—
20130521025	0.80	4.70×10^4	5.62×10^3	20130521079	1.60	6.08×10^4	—
20130521026	0.90	1.11×10^3	5.94×10^4	20130521080	1.40	5.78×10^5	—
20130521027	0.80	8.19×10^4	3.84×10^4	20130521081	1.50	3.41×10^4	—
20130521028	0.90	6.78×10^4	1.81×10^3	20130521082	1.60	8.96×10^4	—
20130521029	0.80	2.20×10^4	5.39×10^2	20130521083	1.70	1.15×10^5	—
20130521030	0.90	6.08×10^4	2.90×10^3	20130521084	1.50	8.23×10^5	—
20130521031	0.90	3.09×10^4	6.50×10^3	20130521085	1.40	6.33×10^4	—
20130521032	0.90	6.04×10^4	1.79×10^4	20130521086	1.50	1.40×10^4	—
20130521033	0.90	3.91×10^4	1.28×10^3	20130521087	1.70	5.59×10^4	—
20130521034	1.00	1.33×10^4	3.84×10^5	20130521088	1.60	2.48×10^5	—
20130521035	0.80	5.94×10^4	9.14×10^2	20130521089	1.80	1.77×10^4	2.97×10^5
20130521036	0.90	4.20×10^3	2.79×10^3	20130521090	1.70	1.04×10^6	—
20130521037	0.90	3.98×10^5	1.33×10^4	20130521091	1.70	4.77×10^4	—
20130521038	0.90	2.45×10^5	6.17×10^4	20130521092	1.50	6.90×10^4	—
20130521039	1.00	1.72×10^5	3.75×10^3	20130521093	1.60	9.77×10^4	1.15×10^4
20130521040	1.00	1.60×10^6	2.35×10^4	20130521094	1.60	4.78×10^5	—
20130521041	0.80	4.43×10^5	6.09×10^3	20130521095	1.70	3.96×10^5	—
20130521042	1.10	1.90×10^6	6.34×10^3	20130521096	1.50	2.46×10^4	3.76×10^5
20130521043	0.80	5.95×10^5	3.21×10^4	20130521097	1.70	3.98×10^4	1.08×10^4
20130521044	0.90	3.05×10^5	—	20130521098	1.40	2.77×10^5	4.27×10^4
20130521045	0.90	1.30×10^6	—	20130521099	1.40	2.76×10^5	1.42×10^4
20130521046	1.10	7.52×10^5	—	20130521100	1.30	7.12×10^5	—
20130521047	1.10	2.21×10^5	—	20130521101	1.30	2.57×10^5	—
20130521048	1.00	1.25×10^6	—	20130521102	1.40	3.14×10^5	3.26×10^2
20130521049	1.00	4.82×10^4	—	20130521103	1.30	6.77×10^4	1.92×10^4
20130521050	0.90	2.36×10^4	—	20130521104	1.20	1.36×10^5	—
20130521051	1.00	1.99×10^6	5.14×10^4	20130521105	1.40	4.18×10^5	5.18×10^3
20130521052	0.80	1.28×10^5	—	20130521106	1.50	3.37×10^5	—
20130521053	1.00	4.35×10^4	—	20130521107	1.30	3.92×10^5	6.48×10^2
20130521054	1.00	4.57×10^5	5.40×10^5	20130521108	1.30	2.82×10^5	—

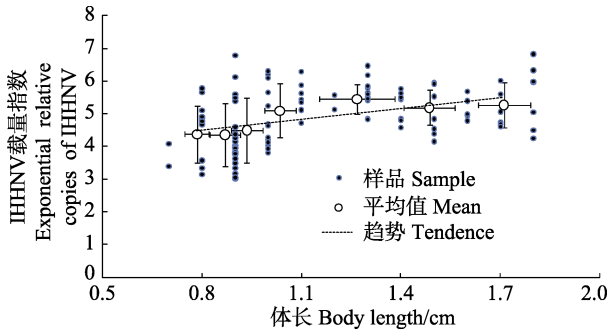


图5 凡纳滨对虾中 IHHNV 载量指数与对虾体长的相关性

Fig.5 Correlation of body length and exponential relative copies of IHHNV (ERC_{IHHNV}) in *L. vannamei*

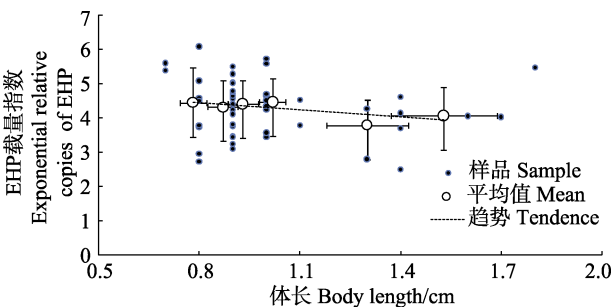


图6 凡纳滨对虾中 EHP 载量指数与对虾体长的相关性
Fig.6 Correlation of body length and exponential relative copies of EHP (ERC_{EHP}) in *L. vannamei*

在该批次养殖对虾中流行非常严重,因此,对 IHHNV 的防控应引起更多的重视。EHP 对对虾生长和繁殖的危害尚无确切的研究结果,但其感染导致对虾生长缓慢的问题应给予更多关注。近年来, EHP 在我国对虾养殖中已存在并流行,本研究通过定量的方法对对虾体长与 EHP 载量关系的荧光定量 PCR-EHP 进行了验证,对其更多的检测和研究十分必要。本研究首次提供 IHHNV 和 EHP 同时进行定量检测的数据,河北、天津地区的育苗期死苗及出苗率低的情况与两种病原的混合感染有极大相关性。研究显示,两种病原同时感染,其载量存在一定的相关性,即体长相对较小的个体 EHP 载量较 IHHNV 偏高,而体长较大则反之。导致同一批的养殖对虾个体偏小、生长缓慢的现象是由于单一病原作用还是两种病原共同导致,以及对于两种病原感染的相互作用机制和混合感染的危害评估等还需要更深入的研究。

参 考 文 献

Bell TA, Lightner DV. IHHN virus infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1984, 38(3): 185-194
Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al*. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon*

cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89-96
Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 166-173
Kalagayan H, Godin D, Kanna R, *et al*. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1991, 22(4): 235-243
Krabetsve K, Cullen BR, Owens L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 61(1-2): 153-158
Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al*. Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(2): 119-126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119-126
Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV. Use of polymerase chain reaction for detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology*, 2000(4): 319-328
OIE, World Organisation For Animal Health. *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*, Paris, France, 2014, 119-137
Primavera JH, Quintino ET. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, 2000, 20(4): 796-802
Ren C, Chen XZ, Gong YQ, *et al*. Real-time fluorescence quantitative PCR for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2009, 26(2): 38-41 [任聪, 陈信忠, 龚艳清, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死病毒. *中国动物检疫*, 2009, 26(2): 38-41]
Shike H, Dhar AK, Burns JC, *et al*. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidenso viruses. *Virology*, 2000, 277(1): 167-177
Suebsing R, Prombun P, Srisala J, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1254-1263
Tang KFJ, 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
Tang KFJ, Navarro SA, Lightner DV. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 74(2): 165-170
Tang KFJ, Lightner DV. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 44(2): 79-85
Tangprasittipap A, Srisala J, Chouwddee S, *et al*. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinay Research*, 2013(1): 1-10
Tong GX, Wei XX, Wu WJ, *et al*. Investigation and analysis of

- infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection in *Penaeus vannamei* in Guangxi. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(12): 2089–2093 [童桂香, 韦信贤, 吴伟军, 等. 广西凡纳滨对虾 IHHNV 感染情况的调查与分析. 南方农业学报, 2013, 44(12): 2089–2093]
- Tourtip SS, Wongtripop GD, Stentiford KS, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 21–29
- Wang ZF, Wang JY, Lu YY, et al. Development and application of a Real-time PCR-based diagnostic for IHHNV. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(9): 1591–1593 [王忠发, 王建跃, 卢亦愚, 等. 实时荧光定量 PCR 快速检测对虾 IHHNV 载量方法的建立和应用. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1591–1593]
- Wei XX, Li XZ, Tong GX. Technique and application of real-time fluorescent quantitative PCR in diagnosis of aquatic animal virosis: A review. Fisheries Science, 2011, 29(11): 681–687 [韦信贤, 黎小正, 童桂香, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在水生动物病毒病定量检测中的应用. 水产科学, 2011, 29(11): 681–687]
- Yang B, Song XL, Huang J, et al. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. Veterinary Microbiology 2007, 120(1–2): 63–70
- Zhong JH, Zhang GZ, Liu XY. Development of real-time fluorescent quantitative PCR and its application. Amino Acids and Biotic Resources, 2011, 33(2): 68–72 [钟江华, 张光萍, 柳小英. 实时荧光定量 PCR 技术的研究进展与应用. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2): 68–72]

(编辑 冯小花)

Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by Real-Time PCR

LIU Baobin^{1,2}, YANG Bing^{1,2,3①}, LÜ Xiuwang^{1,2}, WAN Xiaoyuan^{1,3}, LIU Zhen^{1,2}, HUANG Jie^{1,3}

(1. Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is one of the pathogens causing the significant diseases of crustaceans listed by the OIE (Office international des épizooties) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Infection with IHHNV does not produce any pathognomonic gross clinical signs, although runt-deformity syndrome (RDS) has been noted in infected juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) was first found and isolated in Thailand in 2009, which caused slow growth of *P. monodon*. IHHNV and EHP were found in the samples of *L. vannamei* postlarvae which were collected from hatchery farms in Tianjin and Hebei Province in 2013. The diseased shrimps showed some clinical signs with high mortality, slow growth and difference of individual growth rate. The IHHNV and EHP individual detection was conducted on these samples using the real-time PCR technique. In total, 108 out of 108 (100%) *L. vannamei* postlarvae samples were IHHNV positive, and 53 out of 108 (49.1%) *L. vannamei* postlarvae samples were EHP positive. Positive samples contained approximately 10^3 – 10^7 copies/(μg DNA) of IHHNV and big size of individual shrimp carried higher number of virus copies. Positive samples contained approximately 10^3 – 10^5 copies/(μg DNA) of EHP and mainly the small sized individual shrimp. The analysis showed that the IHHNV loads were positively correlated with the shrimp growth rate. IHHNV loads above 8.51×10^4 copies/ μg DNA represented a high risk level. EHP loads were negatively correlated with the shrimp growth rate. EHP loads above 2.19×10^4 copies/ μg DNA represented a high risk level. Our study showed that the diseased *L. vannamei* postlarvae samples occurred in the hatchery farms of Tianjin and Hebei Province infected with shrimp pathogens of IHHNV and EHP. Data provides scientific basis on the effects of pathogens infection on the growth of cultured penaeid shrimp.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Real-time PCR; Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV); *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

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

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCht3* 基因克隆鉴定及表达分析*



张 凤^{1,2,3} 吕建建^{1,2} 刘 萍^{1,2①} 高保全^{1,2} 李 健^{1,2}

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

摘要 为初步研究三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 *PtCht3* 的生物学功能,利用特异性引物扩增和 SMARTTM RACE 技术克隆获得三疣梭子蟹 *PtCht3* 基因全长 cDNA 序列,并对该序列进行分析。结果显示,三疣梭子蟹 *PtCht3* 基因全长为 1409 bp,对 *PtCht3* 基因序列推导出的氨基酸序列进行分析可知,该基因编码由 394 个氨基酸组成的蛋白质,预测分子量为 43.67 kDa,理论等电点为 4.80。*PtCht3* 蛋白亲水性总平均数为-0.097,属于稳定蛋白。同源性和系统进化分析发现,*PtCht3* 与日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几丁质酶 3 的同源性分别为 54%和 53%,与其他甲壳动物几丁质酶 3 聚为一支。RT-PCR 显示,*PtCht3* 基因具有较强的组织表达特异性,在肝胰腺中的相对表达量最高,在三疣梭子蟹蜕皮前期表达上调,低盐胁迫后在鳃和肝胰腺中表达量出现了波动,总体呈先上升后下降的表达趋势。推测 *PtCht3* 可能在三疣梭子蟹消化和蜕皮过程中发挥重要作用,参与三疣梭子蟹渗透压调节进程。本研究为三疣梭子蟹几丁质酶的功能研究提供了重要信息。

关键词 三疣梭子蟹; 几丁质酶; 蜕皮; 低盐胁迫; 基因克隆; 组织表达
中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0167-10

几丁质酶在甲壳动物的蜕皮过程中发挥着重要的生理作用,将旧的外骨骼消化成可溶性物质,被甲壳动物部分重新吸收后,再用于新的外骨骼的合成(Huang *et al.*, 2010)。几丁质是甲壳动物外壳的主要成分,其合成和降解在该类动物蜕皮生长过程中起着非常重要的作用。按照几丁质酶的氨基酸序列,几丁质酶可分成 6 类(陈少波等, 2004), I、II、III、IV、V 型和 N-乙酰葡萄糖胺酶。糖基化水解酶第 19 族包括 I、II、IV 型,主要存在于植物中。第 18 族包括 III 型和 V

型,在节肢动物和昆虫中广泛存在,节肢动物门下的甲壳动物三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的几丁质酶属于几丁质酶第 18 族 III 型,第 20 族则包括 N-乙酰葡萄糖胺酶(Techkarnjanaruk *et al.*, 1999)。三疣梭子蟹主要摄取含几丁质外壳的动物,只有几丁质酶才有助于消化几丁质。甲壳动物几丁质酶的活力与蜕皮存在密切的关系,与蜕皮激素含量亦有一定相关性(吕黎等, 2011),因此,自身的几丁质分解是受调控的,只有在相应的蜕皮周期才会被消化分解。Watanabe 等

* 国家自然科学基金(41576147 号)、泰山产业领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576147), Efficient Eco Agriculture Innovation Project of Taishan Leading Talent Project (LJNY2015002), and Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 张 凤, E-mail: fenger8709@126.com

① 通讯作者: 刘 萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-11, 收修改稿日期: 2016-03-31

(1998)分离出了日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)的几丁质酶 *Pjchi-3*, 发现在其肝胰腺中高表达, 与日本囊对虾对几丁质类食物的消化相关。斑节对虾(*Penaeus mondon*) *PmChi3* 也主要在肝胰腺中表达, 可能在几丁质类食物的消化中发挥作用(Proespraiwong *et al*, 2010)。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *Fcchi-3* (Zhang *et al*, 2010)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *LvCHT3* (Qian *et al*, 2010)也是肝胰腺特异性基因, 与消化相关。

本实验室对三疣梭子蟹主要组织进行了高通量转录组测序, 从中筛选获得 *PtCht3* 基因的部分序列, 采用 RACE 技术, 克隆得到该基因的全长 cDNA 序列, 并对其在不同蜕皮周期和低盐胁迫后的三疣梭子蟹组织中的表达特征进行初步研究, 以期三疣梭子蟹 *PtCht3* 的生物学功能和渗透压调节机理的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为来自山东潍坊昌邑海丰公司养殖的健康状态良好的三疣梭子蟹 1200 只, 体重为 4.67–6.89 g。蟹池 20 m³, 每池养殖 200 只三疣梭子蟹, 共 6 池, 暂养 3 d。自然海水养殖(盐度为 33), 水温控制在 24–26℃ 左右, pH=8.7, 保持供氧充足, 每天更换 1/3 的水量, 暂养期间, 每天 18:00 定时投喂蓝蛤(*Potamocorbula*), 投喂量为总体重的 5%–8%。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

参照王渝(2014)¹⁾, Trizol 法提取所取组织的总

RNA, 其质量及完整性用核酸定量仪(Biodropsis, BO-1000)与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测; 各取相同质量的肝胰腺和第 6 对鳃的总 RNA 混匀, 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书合成 3' RACE 和 5' RACE 的 cDNA。

1.2.2 全长 cDNA 的克隆及测序 利用软件 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 依据三疣梭子蟹反转录数据库中几丁质酶基因 3 的已知表达序列标签(EST), 进行 3' 和 5' RACE 特异性引物的设计。用 Advantage 2 PCR Kit 扩增 3' 和 5' 末端。分别用特异性引物 PtCht3F 和 PtCht3R 与通用引物 UPM 扩增 3' 和 5' 末端(表 1), 方法参照王渝(2014)¹⁾。

1.2.3 序列分析 参照王渝(2014)¹⁾, 用 Vector NTI 11.0 软件去除所测序列中的冗余序列, 并拼接; 用软件 DNASTar 的 EditSeq 预测开放阅读框, 翻译氨基酸; 对 *PtCht3* 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行同源性比对; 蛋白质理化性质预测、蛋白质跨膜区分析及蛋白质功能结构域分析参照徐文斐等(2014); 与其他物种几丁质酶 3 的序列进行多序列比对, 然后以邻接法进行系统进化树的构建, 具体方法参照段亚飞等(2013)。

1.2.4 三疣梭子蟹蜕皮周期实验 选取处在蜕皮间期、前期、后期的三疣梭子蟹各 3 只。参照沈洁等(2011), 各取三疣梭子蟹的第 1 对鳃、肌肉、肝胰腺、第 6 对鳃、肠、胃、心脏、表皮、眼柄、血细胞, 于液氮中冻存, 待提取 RNA。

1.2.5 盐度胁迫实验 随机挑取暂养 3 d 的三疣梭子蟹 600 只, 实验设置 2 个盐度组, 分别为低盐组(盐度为 11)和正常组(自然海水, 盐度为 33), 每组设 3 个平行, 每个平行 100 只, 于 3 m³ 蟹池中进行实验。

表 1 三疣梭子蟹 *PtCht3* 克隆所用引物序列

Tab.1 Sequences of primers used in the cloning of *P. trituberculatus PtCht3*

引物 Primers	序列 Sequences (5'–3')	作用 Purpose
PtCht3F	GCCGAGGAGGGGTGGACGATAGC	3' RACE 引物
PtCht3R	ACCGTCAGCACCATACTTCAGC	5' RACE 引物
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5' RACE 引物
PtCht3RCf	ATGATGTGGAAGGCGCTG	验证 ORF 正向引物
PtCht3RCr	TCAGCGTTTGGCCTTGTT	验证 ORF 反向引物
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	DNA 测序通用正向引物
M13R (-48)	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	DNA 测序通用反向引物

1) Wang Y. Expression analysis of salinity-related genes and development of SNP in *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014, 11–12 [王渝. 三疣梭子蟹盐度相关基因克隆、表达分析及盐度关联 SNP 的开发. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 11–12]

低盐组盐度配制方法: 参照隋延鸣等(2012)向自然海水中注入淡水, 混匀, 使其盐度降至 11, 利用 YSI 盐度仪校准盐度。实验分 2 组, 每组 3 个平行, 分别于胁迫 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时间点取 3 只三疣梭子蟹的鳃和肝胰腺, 于液氮中冷冻, 3 只蟹子组织样品混合研磨, 用于后续 RNA 的提取。

1.2.6 几丁质酶基因 *PtCht3* mRNA 的 Real-time PCR 定量检测 对照组和实验组三疣梭子蟹所取组织的总 RNA 提取和 cDNA 的反转录合成分别利用 Trizol 试剂和 PrimeScript RT Reagent Kit 完成。

根据拼接获得的 *PtCht3* cDNA 序列全长和已知的三疣梭子蟹管家基因 β -actin, 分别设计 1 对正反特异引物(β -actin-F 和 β -actin-R、*PtCht3*qF 和 *PtCht3*qR)(表 2), 对三疣梭子蟹肝胰腺和鳃中各个基因在不同时间点盐度胁迫的相对表达量进行检测。利用 Real-time PCR 对各个组织中和胁迫进程中 *PtCht3* 基因的表达情况进行统计分析。*PtCht3* 基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 总 RNA 质量检测

利用核酸定量仪对所取各个组织提取获得的总 RNA 进行检测, 其 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值均在 1.8–2.0 之间; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测呈现 3 条清晰的条带, 分别是 28S、18S 和 5S rRNA。检测结果显示, 所提取的总 RNA 纯度较高且完整性较好。

2.2 几丁质酶基因 *PtCht3* 的 cDNA 全长克隆

取三疣梭子蟹眼柄、第 6 对鳃和肝胰腺的总 RNA 的混合物作为模板, 分别反转录为 3' 和 5' RACE 的第一链 cDNA。分别用特异引物 *PtCht3*F 和 *PtCht3*R 与通用引物 UPM 配对, 进行 3' 和 5' RACE 的扩增, 得到大小分别为 457 bp 和 567 bp 的 cDNA 片段。与已知表达序列标签拼接, 获得三疣梭子蟹几丁质酶 3 基因的 cDNA 序列全长, 将其命名为 *PtCht3*。GenBank

登录号为 KM100754。*PtCht3* 的 cDNA 序列全长为 1409 bp, 包括开放阅读框(ORF)1185 bp, 3' 非编码区(3'-UTR)199 bp, 5' 端非编码区(5'-UTR) 25 bp。3' 端具有多聚腺苷酸 Poly A 尾和加尾信号 AATAAA (图 1)。

2.3 几丁质酶基因 *PtCht3* 的序列分析及结构域预测

根据 *PtCht3* 基因序列推导出的氨基酸序列进行分析可知, 它编码含有 394 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 43.67 kDa, 理论等电点 pI 为 4.80。氨基酸组成分析结果显示, *PtCht3* 蛋白含有碱性氨基酸残基 27 个(Arg 和 Lys), 酸性氨基酸残基 51 个(Asp 和 Glu), 疏水性氨基酸残基 144 个(Ala、Ile、Leu、Phe、Trp 和 Val), 极性氨基酸 98 个(Ser、Cys、Asn、Gln、Tyr 和 Thr), *PtCht3* 蛋白亲水性总平均数为 -0.097 , 属于稳定蛋白。结构域分析结果显示, 其 N 端 1–20 氨基酸处存在信号肽, *PtCht3* 序列存在 1 个几丁质酶第 18 家族活性位点 $^{138}\text{FDGLDLAWT}^{146}$ 。在 22–368 氨基酸处存在几丁质酶第 18 家族催化结构域, 含 4 个保守基序。

2.4 几丁质酶基因 *PtCht3* 的同源性分析

BLAST 同源性分析三疣梭子蟹 *PtCht3* 序列, 显示 *PtCht3* 基因与日本仿长额虾(*Pandalopsis japonica*) *Cht3* 的同源性最高, 为 54%。与其他物种如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中国明对虾和日本囊对虾的同源性分别为 53%、52%、51%、50% 和 49%。与日本仿长额虾、中华绒螯蟹和锯缘青蟹等动物的 *Cht3* 氨基酸序列比对得知, 几丁质酶第 18 家族催化结构域的保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV 在以上几个物种中都存在(图 2)。

利用软件 MEGA 5.0 进行系统进化(NJ 法)分析显示, 几丁质酶第 18 家族 III 型主要聚为 2 大类群: 甲壳类和昆虫类, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 聚类顺序依次为与中华绒螯蟹、锯缘青蟹、日本仿长额虾、日本囊对虾、日本沼虾、斑节对虾、凡纳滨对虾和中国明对虾等(图 3)。

表 2 三疣梭子蟹 *PtCht3* mRNA 相对表达分析所用引物序列

Tab.2 Sequences of primers used in the analysis of relative mRNA expression of *P. trituberculatus PtCht3*

引物 Primers	序列 Sequences (5'-3')	作用 Purpose
<i>PtCht3</i> qF	CTCTGGTCTCGGCAGTCTCT	<i>PtCht3</i> 定量正向引物
<i>PtCht3</i> qR	GGTGCGGCTTTGATAAGTTC	<i>PtCht3</i> 定量反向引物
β -actinF	CGAAACCTTCAACACTCCCG	β -actin 定量正向引物
β -actinR	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	β -actin 定量正向引物

```

1  ATGG GGA GTG CTG ACA ATC TCC GGC ATG ATG TGG AAG GCG CTG CTC CTG CTC TCC GTC TCC ACC CTC CCT CTT ATT GAG GGC GCC 88
      M M W K A L L L L L S V S T L P L I E G A
89 GTG CTG TGC TAC TTC GAG TCC TGG GCG GTA TAC AGG CTC GGC GAT GGC AAG GTG GAA ATA TCC GAC CTC GAA CCG GCA CTC TGC TCC CAC 178
      V L C Y F E S W A V Y R L G D G K V E I S D L E P A L C S H
179 TAC ATC TAT GCT TTT GCT GGC ATC AAC ACC GAT TAT ACC ATC AGG GTG TTG GAC CCG TGG GCA GAC CTG TGT GAT GGA GGC GGA AGG TGC 268
      Y I Y A F A G I N T D Y T I R V L D P W A D L C D G G G R C
269 GGC TTT GAT AAG TTC ACA GCC ATG AAG AAC GTC GAG CCG CAT CTG TTG ACC CTG CTG GCC GTG GGT GGC TGG AAC GAC GGC TCT GCT CTT 358
      G F D K F T A M K N V E P H L L T L L A V G G W N D G S A L
359 TAC TCT CAG ATG GCA GAG ACT GCC GAG ACC AGA GCA GTG TTC ATC AAG TCA TCC ATA CAG CTT CTG AAG ATT CAC AAT TTT GAC GGC CTC 448
      Y S Q M A E T A E T R A V F I K S S I Q L L K I H N F D G L
449 GAT TTG GCC TGG ACG TAT CCC ACA CAG AAT GGA GGC GCC CCT CAT GAC CGG GAG AAC TAT GTG CAT CTG CTG CGG GAA CTG AAA GAG GCG 538
      D L A W T Y P T Q N G G A P H D R E N Y V H L L R E L K E A
539 CTG GAA GCT GAA GGT ATG GTG CTG ACG GTA ACA GTT TCT CCA ACC AAG AGT GTC ATA GAC GAG GCT TAT GAC ATC CCA GGC ATT GCA CAA 628
      L E A E G M V L T V T V S P T K S V I D E A Y D I P G I A Q
629 CAC GCG GAC CTC GTC ACC GTG ACA ACC TAC GAC TTG CAC GGC TCG TGG GAG CAC CAC ACT AAC CAT CAT TCA GGC CTG TAC GCC TTC TCC 718
      H A D L V T V T T Y D L H G S W E H H T N H H S G L Y A F S
719 GAG GAT GTT GGC AGC GAT TTG TTC CTG AAC GTG GAC TAC ATA ATA AAT TAC TGG GTG GCA GGA GGG ATG CCG GAA AAA AAG CTG GTA ATG 808
      E D V G S D L F L N V D Y I I N Y W V A G G M P E K K L V M
809 GGG GTG CCC GCC TTT GGT CGC ACT TGG ACG CTG GAC TCA ATC GAG GAG CAC GGA TAC TAC GCC CCT GCC TAT TTG CCT GGG ATG ACG GGG 898
      G V P A F G R T W T L D S I E E H G Y A P A Y L P G M T G
899 CCT TGG ACG AAG ACG GAG GGT TTC ATG GCG TAC GCT GAG ATC TGC GTG AAG CAG GCC GAG GAG GGG TGG ACG ATA GCA GTG GAG AAA GGC 988
      P W T K T E G F M A Y A E I C V K Q A E E G W T I A V E K G
989 TGC AAC GAA CCT TAC ACT TAC CAA CTG TCC TCC AGC AAG ATC TGG TGC GCG TAC GAG AAC CAC GAC TCT GTC ACT CTC AAG GCC CAA TAC 1078
      C N E P Y T Y Q L S S S K I W C A Y E N H D S V T L K A Q Y
1079 GCA GCT GAC CAC GGC CTT GGA GGA GTT ATG ATC TGG TCC ATA AAT GAC GAT GAT GCG CAC GGC GTC TGC GGT GGT CGC AAG TTT GAT CTG 1168
      A A D H G L G G V M I W S I N D D D A H G V C G G R K F D L
1169 ACA TCT ACG TTG GCA GAC ACC TTC AAC AAG GCC AAA CGC TGA TGT GTC TAC AGA GTG CAA GAG TTC CCG TAC CCA CTT TTG CCA TCT TCC 1258
      T S T L A D T F N K A K R *
1259 CAA CAC TAT CCG TTC TTT CCT CGA GGC ATC TCA CCA ATC ACA ATA TTT GTA ACA TTA TCG GCG GTG GTG CCA CAC AAA ACA GTT CGT ATG 1348
1349 ATC ATA ATT CCA TAT ACA CAA TTT CGC GTA CAA AAT AAA TTA TAC ACA ACT AAA AAAAA A 1409

```

图 1 三疣梭子蟹 *PtCht3* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence encoded by *P. trituberculatus PtCht3*

起始密码子(ATG)、加尾信号(AATAAA)和终止密码子(TGA)用细线方框标出;

粗线方框内为几丁质酶第 18 家族保守基序;信号肽以细下划线标出

The letters in the box indicated the start codon (ATG), the polyadenylation signal sequence (AATAAA), and the stop codon (TGA). The conserved motifs of the catalytic domain of the 18th chitinase family were framed in black boxes. The signal peptide was underlined with a thin line

2.5 基因 *PtCht3* 的表达分析

2.5.1 *PtCht3* 基因的组织表达分布 实时荧光定量 PCR 分析可知, *PtCht3* 在表皮、胃、第 6 对鳃、肠血细胞、心脏、第 1 对鳃、肌肉、眼柄和肝胰腺中均有表达。*PtCht3* 在肝胰腺表达量最高, 与其他组织相比, 差异显著($P < 0.05$), 其次是胃, 在其他组织中的表达量均很低(图 4)。

2.5.2 *PtCht3* 在蜕皮周期中的表达 *PtCht3* 在蜕皮周期实验肝胰腺中的表达情况见图 5。后期间期至前期, 肝胰腺中 *PtCht3* 的相对表达量一直呈上升趋势, 后期至间期出现显著性上调($P < 0.05$), 间期至前期亦是明显上调表达, 表达量在前期达到相对最大值。

2.5.3 *PtCht3* 在低盐胁迫下的表达 低盐胁迫下, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 在第 6 对鳃中的相对表达情况见图 6。与对照组相比, 胁迫组 *PtCht3* 的表达量于 3、12、48 h 出现轻微下调, 于 48 h 达到最小值, 在 24、72 h 出现显著性上调($P < 0.05$), 72 h 达到最大值, 为对照组的 4.97 倍, 整体呈现上调表达趋势。

三疣梭子蟹 *PtCht3* 在低盐胁迫下肝胰腺中的相对表达情况见图 7。与对照组相比, 胁迫组 *PtCht3* 基因的相对表达量于 3 h 轻微下调, 3–6 h 时间段内出现显著性上调($P < 0.05$); 于 12 h 显著下调后, 表达量迅速回升, 24 h 上调极显著($P < 0.01$), 达到最大值, 相对表达量为对照组的 4.32 倍, 整体呈现波动式表达趋势。

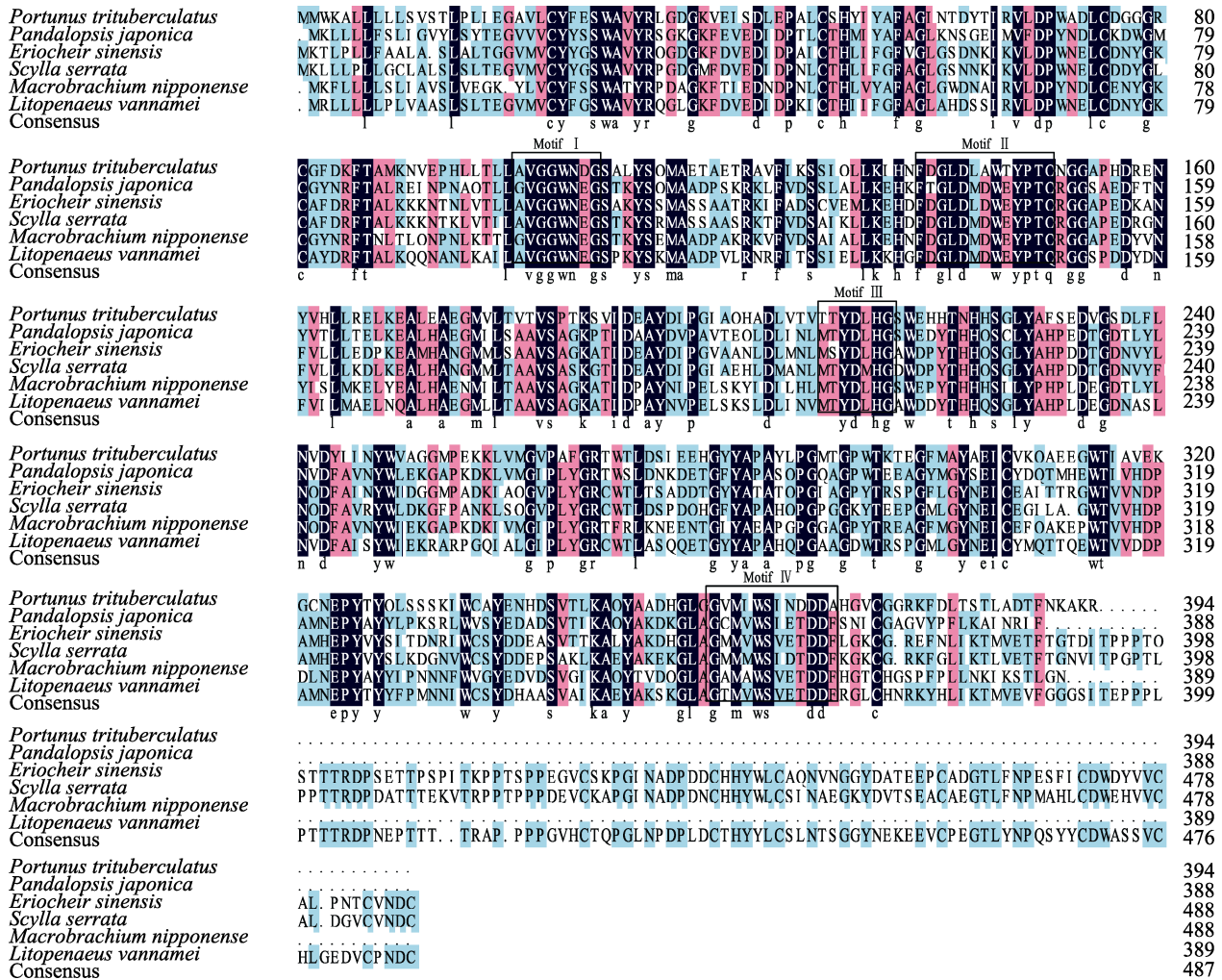


图 2 三疣梭子蟹 PtCht3 氨基酸序列的多序列比对

Fig.2 The multiple alignment of the deduced amino acid sequences encoded by *P. trituberculatus* PtCht3 and other species

几丁质酶第 18 家族保守基序以方框表示

The conserved motifs of the 18th chitinase family were framed in black boxes

3 讨论

本研究成功克隆三疣梭子蟹几丁质酶基因 *PtCht3* cDNA 序列, 全长为 1409 bp, 编码 394 个氨基酸, 分子量为 43.67 kDa, 理论等电点 *pI* 为 4.80, 其 N 端 1-20 氨基酸处存在信号肽, 存在 1 个几丁质酶第 18 家族活性位点 ¹³⁸FDGLDLAWT¹⁴⁶, 并存在几丁质酶第 18 家族催化结构域, 含 4 个保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV。该基因与日本仿长额虾 *Cht3* 的同源性最高, 为 54%。根据 cDNA 序列推导出氨基酸序列分析发现, 几丁质酶 *PtCht3* 具备典型的几丁质酶基因第 18 家族的序列特征, 包括 glyco-18 催化结构域、活性位点(FDGLDLAWT) (Boot *et al*, 2001)。PtCht3 催化结构域具有几丁质酶第 18 家族的保守基序, 分别为 Motif I、II、III、IV

(Bleau *et al*, 1999)。几丁质酶第 18 家族催化结构域的保守基序 Motif I、Motif II、Motif III 和 Motif IV 在日本仿长额虾、中华绒螯蟹和锯缘青蟹等动物的 *Cht3* 氨基酸序列中都存在。进化树分析显示, 几丁质酶第 18 家族 III 型主要聚为 2 大类群: 甲壳类和昆虫类, 三疣梭子蟹 *PtCht3* 能够很好地与甲壳类几丁质酶 Group 3 的其他成员聚为一类, 聚类顺序依次为中华绒螯蟹、锯缘青蟹、日本仿长额虾、日本囊对虾、日本沼虾、斑节对虾、凡纳滨对虾和中国明对虾等。这些高度保守的结构域和活性位点及进化分析表明, 三疣梭子蟹几丁质酶 *PtCht3* 确实是几丁质酶第 18 家族甲壳类几丁质酶 Group 3 的一员, 具有几丁质酶第 18 家族的一些功能, 如几丁质类食物的消化, 参与蜕皮过程(Coulson, 1994)。

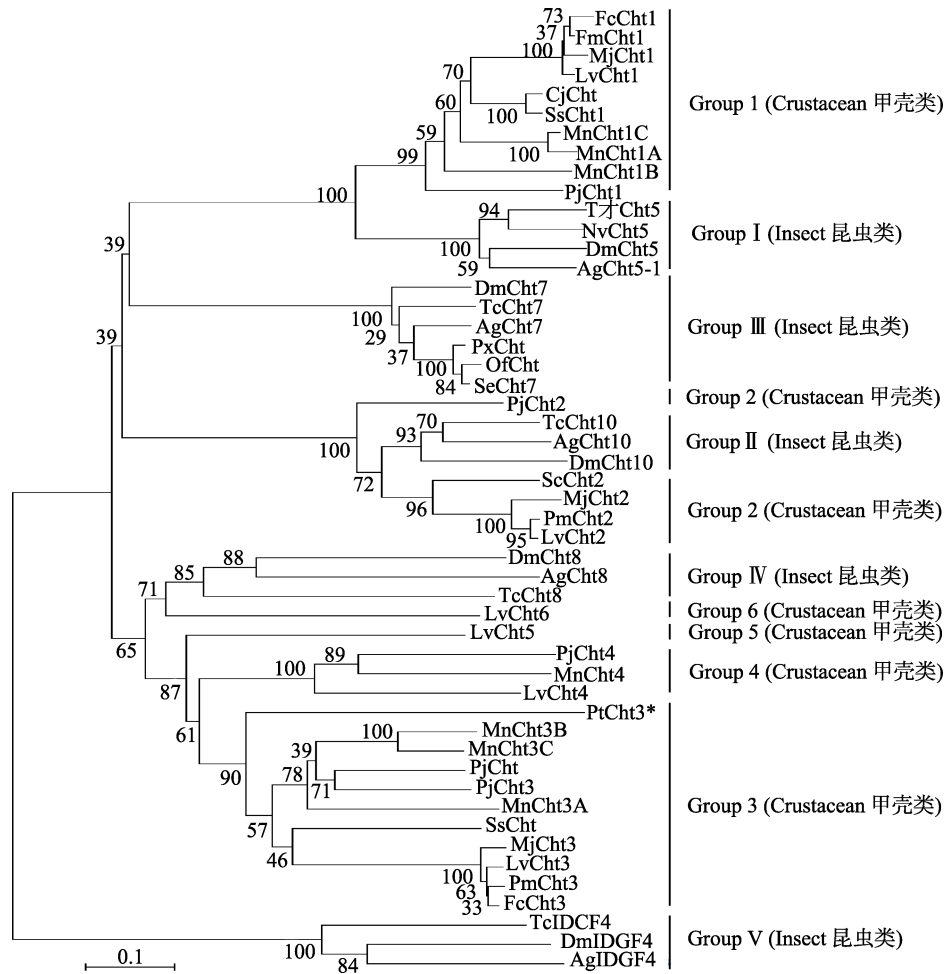


图 3 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 PtCht3 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic analysis of chitinase PtCht3 of *P. trituberculatus*

*: 三疣梭子蟹几丁质酶蛋白 PtCht3; 各物种几丁质酶蛋白 Cht GenBank 登录号: 日本沼虾 Cht1A (KF466274.1)、Cht1B (KF466275.1)、Cht1C (AHL24866.1)、Cht3A (KF466276.1)、Cht3B (KF466277.1)、Cht3C (KF466278.1)、Cht4 (KF466279.1);

中国明对虾 Cht1 (ABB85237.1)、Cht3 (DQ000159.1); 斑节对虾 Cht1 (AAD40313.1)、Cht2 (ADG22164.1)、Cht3 (ADG22163.1); 锯缘青蟹 Cht (ABY85409.1)、Cht1 (ACG60512.1)、Cht2 (ACZ53950.1); 日本蟬 Cht (AFF59213.1)、Cht1 (BAA12287)、Cht2 (BAA14014)、Cht3 (BAA22854); 凡纳滨对虾 Cht1 (EU883591.1)、Cht2 (EU861222.1)、Cht3 (AAN74647.1)、Cht4 (FJ888480.1)、Cht5 (FJ888481.1)、Cht6 (GQ916594.1); 日本仿长额虾 Cht (AFC60660.1)、Cht1 (JF694836.1)、Cht2 (JN982965.1)、Cht3 (JF694838.1)、Cht4 (JF694837.1); 黑腹果蝇 Cht5 (NP_650314.1)、Cht7 (NP_647768.2)、Cht8 (NP_611542.1)、Cht10 (EAA46011.1); 赤拟谷盗 Cht5 (NP_001034524.1)、Cht7 (NP_001036035.1);

赤拟谷盗 Cht8 (NP_001036067.1)、Cht10 (NP_001038091.1); 冈比亚按蚊 Cht5-1 (HQ456129)、Cht7 (XP_308858.4)、Cht8 (XP_316448.2)、Cht10 (XP_317398.3); 丽蝇蛹集金小蜂 Cht5 (NP_001155084.1); 亚洲玉米螟 Cht (AGX32025.1);

小菜蛾 Cht (AFI55112.1); 甜菜夜蛾 Cht7 (AFM38213.1)

*: PtCht3 from *Portunus trituberculatus*. GenBank Accession Number of Cht: *Macrobrachium nipponense* Cht1A (KF466274.1), Cht1B (KF466275.1), Cht1C (AHL24866.1), Cht3A (KF466276.1), Cht3B (KF466277.1), Cht3C (KF466278.1), and Cht4 (KF466279.1); *Fenneropenaeus chinensis* Cht1 (ABB85237.1), and Cht3 (DQ000159.1); *Penaeus monodon* Cht1 (AAD40313.1), Cht2 (ADG22164.1), and Cht3 (ADG22163.1); *Scylla serrata* Cht (ABY85409.1), Cht1 (ACG60512.1), and Cht2 (ACZ53950.1); *Charybdis japonica* Cht (AFF59213.1), Cht1 (BAA12287), Cht2 (BAA14014), and Cht3 (BAA22854); *Litopenaeus vannamei* Cht1 (EU883591.1), Cht2 (EU861222.1), Cht3 (AAN74647.1), Cht4 (FJ888480.1), Cht5 (FJ888481.1), and Cht6 (GQ916594.1); *Pandalopsis japonica* Cht (AFC60660.1), Cht1 (JF694836.1), Cht2 (JN982965.1), Cht3 (JF694838.1), and Cht4 (JF694837.1); *Drosophila melanogaster* Cht5 (NP_650314.1), Cht7 (NP_647768.2), Cht8 (NP_611542.1), and Cht10 (EAA46011.1); *Tribolium castaneum* Cht5 (NP_001034524.1), Cht7 (NP_001036035.1), Cht8 (NP_001036067.1), and Cht10 (NP_001038091.1); *Anopheles gambiae* str. Cht5-1 (HQ456129), Cht7 (XP_308858.4), Cht8 (XP_316448.2), and Cht10 (XP_317398.3); *Nasonia vitripennis* Cht5 (NP_001155084.1); *Ostrinia furnacalis* Cht (AGX32025.1); *Plutella xylostella* Cht (AFI55112.1); *Spodoptera exigua* Cht7 (AFM38213.1)

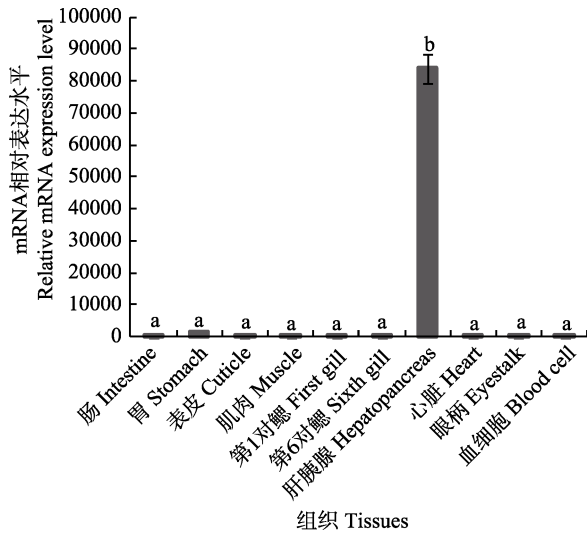


图 4 三疣梭子蟹 *PtCht3* 在不同组织中的表达分布
Fig.4 The distribution and relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in different tissues

不同组织表达量均以与血细胞相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different tissues in *P. trituberculatus* expression compared with blood cell

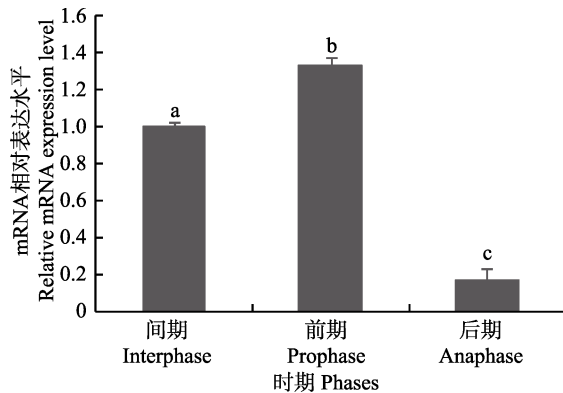


图 5 三疣梭子蟹蜕皮周期中 *PtCht3* 在肝胰腺中的表达
Fig.5 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in hepatopancreas during molting

肝胰腺各蜕皮时期表达量均以与肝胰腺间期相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different molting phases in *P. trituberculatus* expression compared with interphase in hepatopancreas

甲壳动物几丁质酶基因家族的不同成员在其蜕皮过程中发挥的作用也可能会不同(Broadway *et al.*, 1995)。中国明对虾几丁质酶基因 *FcCht1* 和 *FcCht3* 在中国明对虾蜕皮的不同阶段中呈现一定的波动变化(Priya *et al.*, 2009)。Zhang 等(2014)研究发现, 日本沼虾几丁质酶基因 *MnCht1A*、*MnCht1B* 和 *MnCht3B*

在蜕皮周期中发挥关键作用, *MnCht4* 在蜕皮过程中只起辅助作用。Zou(2009)研究发现, 中国明对虾的几丁质酶基因 *FcChi3* 在其整个蜕皮周期中都有表达, 并伴随着一定的波动性, 在蜕皮前期表达量较高。

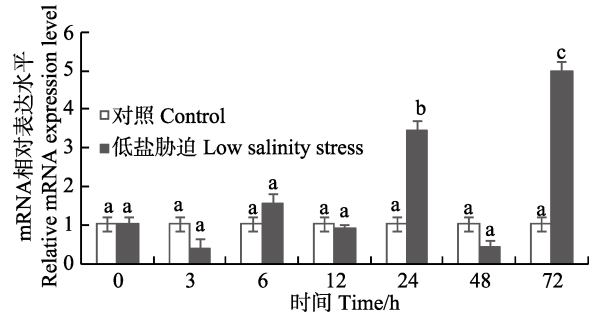


图 6 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCht3* 在第 6 对鳃中的表达
Fig.6 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in the sixth gill in response to the low salinity stress

低盐胁迫下各个时间点表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different points of time in *P. trituberculatus* expression compared with the control group under low salinity stress

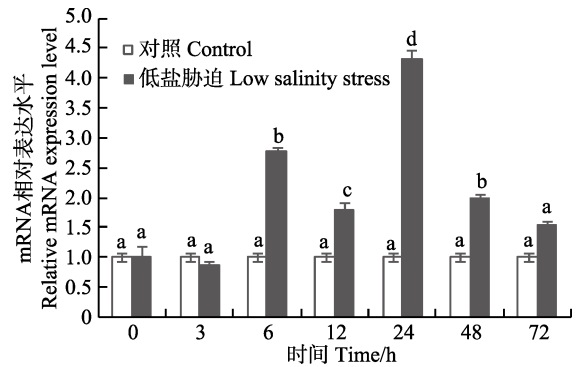


图 7 低盐胁迫下三疣梭子蟹 *PtCht3* 在肝胰腺中的表达
Fig.7 The relative expression of *P. trituberculatus PtCht3* in hepatopancreas in response to the low salinity stress

低盐胁迫下不同时间点的相对表达量均以与各时间点对照相比较的倍数表示, 不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)
Different letters indicated significant differences ($P<0.05$) between different time points in *P. trituberculatus* expression compared with the control group under low salinity stress

本研究组织表达分析显示, *PtCht3* 在各个组织中均有表达, 在肝胰腺中表达量最高, 具有较强的组织特异性, 差异显著($P<0.05$), 说明其主要功能很可能与三疣梭子蟹对几丁质类食物的消化相关。在肝胰腺中, *PtCht3* 在蜕皮后期表达量较低, 在间期表达量出现显著性提高, 到蜕皮前期表达量达到最大。在整个

蜕皮周期中, *PtCht3* 表达量整体呈上升趋势, 表明 *PtCht3* mRNA 的表达可能受到三疣梭子蟹蜕皮激素的调控, 进而辅助蜕皮作用的顺利进行。以上研究表明, *PtCht3* 在肝胰腺中的高表达量, 肝胰腺 *PtCht3* 在不同蜕皮阶段的表达量的显著变化, 进一步说明 *PtCht3* 可能与几丁质的消化相关, 作为几丁质类食物的消化酶基因, 参与了三疣梭子蟹的消化进程。与本研究结果相似的是, 日本对虾(*Penaeus japonicus*) *PjChi-1* 和 *PjChi-2* (Watanabe *et al.*, 1996、1997)、斑节对虾 *PmCht1* (Tan *et al.*, 2000)和 *PmCht2* (Enmin, 2009)、中国明对虾(Priya *et al.*, 2009) *FcCht1* 和 *FcCht3*、日本沼虾(Zhang *et al.*, 2014) *MnCht1A*、*MnCht1B* 和 *MnCht3B* 等几丁质酶基因在不同蜕皮阶段的表达量也表现出一定的波动变化, 与血淋巴中的蜕皮激素含量存在一定的相关性(吕黎等, 2011)。几丁质酶亦存在于日本对虾肝胰腺中, 涉及到日本对虾几丁质酶类食物的消化(Watanabe *et al.*, 1996、1998)。斑节对虾 *PmChi1* (Siok *et al.*, 2000)与日本对虾 *PjChi-1* (Watanabe *et al.*, 1996)高度同源, 亦是在肝胰腺中具有组织特异性, 被认为主要与几丁质类食物的降解有关。

盐度改变会启动甲壳动物的渗透压调节, 盐度的适度降低会导致其蜕皮周期缩短, 从而使蜕皮率增高, 进而促进其生长发育(Mu *et al.*, 2005; Bray *et al.*, 1994; 王冲等, 2010), 而鳃是三疣梭子蟹进行呼吸和调节渗透压的主要作用器官(韩晓琳等, 2014)。本实验室 Lv 等(2013)开展了三疣梭子蟹转录组的研究, 结果发现, 在低盐和高盐胁迫下, 三疣梭子蟹鳃中几丁质酶家族基因的表达量有显著差异。张凤等(2015)研究发现, 低盐胁迫下, 三疣梭子蟹几丁质酶 *PtCht* 在第 6 对鳃中的表达量出现了显著变化, 这些结果均暗示第 6 对鳃可能参与三疣梭子蟹渗透压调节进程。低盐胁迫下, *PtCht3* 基因的表达在第 6 对鳃中总体呈上升的趋势, 在 3、12、48 h 出现轻微的波动下调, 在肝胰腺中总体呈先上调后下调, 12 h 出现轻微波动的表达规律。综合分析第 6 对鳃和肝胰腺 *PtCht3* 基因表达情况, *PtCht3* 对低盐胁迫的应答快且敏感, 这表明了盐度影响了 *PtCht3* 的表达, 不管是第 6 对鳃还是肝胰腺, 可能参与了三疣梭子蟹抵抗低盐胁迫的渗透压调节进程。低盐胁迫下, *PtCht3* 在第 6 对鳃和肝胰腺中呈现出不同的表达趋势, 这可能表明 *PtCht3* 可能参与多种生理功能, 如渗透调节、内环境稳定、消化和发育, 并且在盐度变化时其表达可能会受到影响。

组织表达分布、蜕皮周期以及低盐胁迫实验表明, *PtCht3* 是一个很重要的几丁质酶, 既与几丁质类食物的消化相关, 又参与了三疣梭子蟹渗透压调节进

程, 其详细的作用机制尚需进一步探索。

参 考 文 献

- Bleau G, Massicotte F, Merlen Y, *et al.* Mammalian chitinase-like proteins. *EXS*, 1999, 87: 211–221
- Boot RG, Blommaert EF, Swart E, *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9): 6770–6778
- Bray WA, Lawrence AL, Leung-Trujillo JR. The effect of salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 1994, 122(2–3): 133–146
- Broadway RM, Williams DL, Kain WC, *et al.* Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 20(5): 271–276
- Chen SB, Wu GF. Recent progress on chitinase. *Bulletin of Science and Technology*, 2004, 20(3): 258–262 [陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展. 科技通报, 2004, 20(3): 258–262]
- Coulson AF. A proposed structure for ‘family 18’ chitinase: A possible function for narhonin. *FEBS Letters*, 1994, 354(1): 41–44
- Duan YF, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression analysis of cathepsin L cDNA of *Exopalaemon carinicauda*. *Zoological Research*, 2013, 34(1): 39–46 [段亚飞, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析. 动物学研究, 2013, 34(1): 39–46]
- Han XL, Gao BQ, Wang HF, *et al.* Effects of low salinity stress on microstructure of gill and hepatopancreas and family survival rate of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 104–110 [韩晓琳, 高保全, 王好锋, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹鳃和肝胰腺显微结构及家系存活的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 104–110]
- Huang QS, Yan JH, Tang JY, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75–81
- Lv JJ, Liu P, Wang Y, *et al.* Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82155
- Lv L, Ning QJ. Recent progress on gene structure and functions of crustacean chitinase. *Progress in Physiological Sciences*, 2011, 42(6): 457–459 [吕黎, 宁黔冀. 甲壳动物几丁质酶基因结构与功能的研究进展. 生理科学进展, 2011, 42(6): 457–459]

- Mu YC, Wang F, Dong SL, *et al.* The effects of salinity fluctuation in different ranges on intermolt period and growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(2): 122–126
- Priya TA, Li F, Zhang J, *et al.* Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on E75 and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 121–129
- Proespraiwong P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(2): 86–96
- Qian SH, Jiang HY, Jian YT, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75–81
- Shen J, Zhu DF, Hu ZH, *et al.* Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1481–1487 [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期. *水产学报*, 2011, 35(10): 1481–1487]
- Siok HT, Bernard MD, Sigrid AL. The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(2): 126–135
- Sui YM, Gao BQ, Liu P, *et al.* The tolerance to and optimal salinity for growth in swimming crab *Portunus trituberculatus* “Huangxuan No.1”. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(5): 398–401 [隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选1号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 398–401]
- Tan SH, Degnan BM, Lehnert SA, *et al.* The *Penaeus monodon* chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle. *Marine Biotechnology*, 2000, 2: 126–135
- Techkarnjanaruk S, Goodman AE. Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S9. *Microbiology*, 1999, 145(4): 925–934
- Wang C, Jiang LX, Wang RJ, *et al.* Effect of abrupt and gradual changes in salinity on development and feeding in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fisheries Science*, 2010, 29(9): 510–514 [王冲, 姜令绪, 王仁杰, 等. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. *水产科学*, 2010, 29(9): 510–514]
- Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Isolation of cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(4): 299–303
- Watanabe T, Kono M, *et al.* Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zoological Science*, 1997, 14(1): 65–68
- Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1382(2): 181–185
- Xu WF, Liu P, Li JT, *et al.* Cloning and expression of gene vasa during ovarian development cycle in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 574–582 [徐文斐, 刘萍, 李吉涛, 等. 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) vasa 基因 cDNA 克隆及其在卵巢发育中的表达分析. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 574–582]
- Zhang F, Lv JJ, Liu P, *et al.* Cloning and expression of chitinase under low salinity stress during molting in *Portunus trituberculatus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 948–957 [张凤, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹几丁质酶基因克隆鉴定及在低盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 948–957]
- Zhang J, Sun Y, Li F, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1913–1921
- Zhang SY, Jiang SF, Xiong YW, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167(1): 30–40
- Zou E. Effects of hypoxia and sedimentary naphthalene on the activity of N-acetyl- β -glucosaminidase in the epidermis of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 2009, 82(5): 579–582

Cloning and Expression Analysis of the cDNA of *PtCht3* in *Portunus trituberculatus*

ZHANG Feng^{1,2,3}, LÜ Jianjian^{1,2}, LIU Ping^{1,2①}, GAO Baoquan^{1,2}, LI Jian^{1,2}

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

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

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

Abstract *Portunus trituberculatus*, aka the swimming crab, is an important fishery species with high commercial value in China. They mainly inhabit the sandy and muddy bottom underneath the seawater in the coast of countries such as China, Japan and Korea. The growth and development of *P. trituberculatus* was characterized by periodic molting activities in which the new ectoskeleton grows while the old one molting. Previous studies reported that chitinase was an essential enzyme involved in the molting of crustaceans, and that it was required in chitin digestion and the immunity to the pathogen infection. However, little has been known about the effect of chitinase on molting activities, and the expression of the enzyme during rapid salinity stress is also obscure. To understand the biological function of *PtCht3* gene in *P. trituberculatus*, we cloned and analyzed the full-length cDNA sequence of *PtCht3* gene using SMARTTM RACE amplification kit. The cDNA sequence had 1409 bp encoding 394 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of the putative peptide was 4.80, and the predicted molecular mass was 43.67 kDa. *PtCht3* could be a stable protein with the hydrophilic coefficient total average of -0.097. The homology and systematic evolution analysis revealed that *PtCht3* of *P. trituberculatus* was highly homologous with the protein in other species; for example, it shared 54% similarity with *Pandalopsis japonica* and 53% similarity with *Eriocheir sinensis*. The phylogenetic analysis showed that *P. trituberculatus PtCht3* was in the same class as other arthropods' *PtCht3*. The expression of *PtCht3* in different tissues was analyzed with quantitative real-time PCR. We found that the highest expression level appeared in hepatopancreas, and that the expression was significantly up-regulated in the prophase of the molting cycle. In response to the low salinity stress the expression level fluctuated in gills and hepatopancreas, showing a general up-and-down pattern. Our results suggested that *PtCht3* might play an important role in digestion and molting activities, and it could be involved in the regulation of osmotic pressure in *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; Chitinase; Moulting; Low salinity stress; Gene cloning; Tissue expression

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

中国养殖斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*) 上皮囊肿病的发现及显微观察*



范 超^{1,2} 史成银^{1①} 刘江春³

(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; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

摘要 2015 年, 山东省某养殖场工厂化养殖的斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)幼鱼(全长为 15 cm 左右)因病陆续死亡, 15 d 内累积死亡率达 40% 以上。现场调查发现, 发病池水温为 21℃, 盐度为 30。患病鱼群散开、不聚集。病鱼身体侧偏, 活力差, 常贴底或者贴壁, 严重者随着水流漂流。病鱼呼吸困难, 口部持续张开, 鳃盖开合频繁, 对投喂的食物无反应。但病鱼反应灵敏, 难以捕捉。临床检查和剖检可见病鱼鳃表面覆盖着大量黏液, 鳃丝有损伤, 肠道无食物。取病鱼鳃丝制成水浸片, 在光学显微镜下观察, 鳃丝上可见到许多直径约为 30–70 μm 的囊肿物, 外观圆形或卵圆形, 呈浅黄棕色。在苏木精-伊红染色的石蜡切片中, 病鱼次级鳃丝末端粘连, 许多上皮细胞膨大呈囊肿状。囊肿嗜碱性, 内部均质化。在扫描电子显微镜下观察, 病鱼鳃丝呈棍棒化, 鳃小片被大量黏液覆盖, 表面光滑的囊肿细胞镶嵌其间。通过上述疾病现场调查、病鱼的临床检查、鳃组织的光学显微镜和扫描电子显微镜病理观察, 可以初步确定该病为斑石鲷上皮囊肿病。这是上皮囊肿病在中国养殖斑石鲷中首次被发现和记载。

关键词 斑石鲷; 上皮囊肿病; 衣原体; 显微观察

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0177-04

上皮囊肿病是由隶属于衣原体目(*Chlamydiales*)的细菌引起的一种鱼类传染病, 在世界范围内流行。最早关于该病的报道始于 1920 年, 至今上皮囊肿病已在全世界 90 余种海水、淡水野生和养殖鱼类中被发现(Stride *et al.*, 2014)。该病的典型特征是病鱼的鳃、表皮等组织的上皮细胞因衣原体寄生而增生、肥大, 最后形成囊肿, 严重影响鱼体的呼吸功能和气体交换。鱼类上皮囊肿病发病速率较慢, 发病初期不易被发现。后期病鱼呼吸困难, 代谢机能紊乱, 会陆续死亡, 死亡率最高可达 100% (Katharios *et al.*, 2008)。国内尚未有关于鱼类上皮囊肿病的研究报道。

衣原体是绝大多数鱼类上皮囊肿病的病原, 为严

格的细胞内寄生细菌, 革兰氏染色阴性(Draghi *et al.*, 2007), 目前尚无法在体外培养(Stride *et al.*, 2014)。该病原主要侵染鱼体的鳃和表皮的上皮细胞, 在宿主细胞质内不断分裂增殖, 形成一个大包涵体。被衣原体感染的鱼体上皮组织除出现囊肿外, 还表现为发炎、细胞坏死、分泌黏液增多等病理现象。近年来, 通过 16S rDNA 序列比对分析, 确定这些衣原体均隶属于衣原体目, 但分属于不同的科和属(Stride *et al.*, 2014)。

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)在分类上属于鲈形目(Perciformes)、石鲷科(Oplegnathidae)、石鲷属, 为温热带近海鱼类, 主要分布于我国黄海、东海、南海和日本、韩国等海域。斑石鲷生长速度快, 饵料转

* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)资助[This work was supported by the project of National Key Technology R&D Program (2012BAD17B01)]. 范 超, E-mail: fanchao1126@126.com

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

收稿日期: 2016-04-24, 收修改稿日期: 2016-05-04

化率高,肉质鲜美,是优质的可食用海水鱼类。2014年,斑石鲷在我国规模化人工繁育成功,成为有发展潜力的海水养殖鱼类新品种。国内外已报道的斑石鲷病害不多,主要有虹彩病毒感染、病毒性神经坏死病、黏孢子虫病等(Skliris *et al.*, 2001; Yanagida *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010)。此外,日本学者曾在25日龄的斑石鲷仔鱼(全长为9–12 mm)中发现过疑似上皮囊肿病的病例,但未进行更深入的研究(Egusa *et al.*, 1987)。2015年,某养殖场的斑石鲷幼鱼陆续发病死亡,15 d内累积死亡率达40%以上,造成了较大的经济损失。本研究通过对疾病的现场调查、病鱼的临床检查、病理组织的光学显微镜和扫描电子显微镜观察,将该病初步确定为斑石鲷上皮囊肿病。这是上皮囊肿病在中国养殖斑石鲷中首次被发现和记载。

1 材料与方法

1.1 疾病的现场调查与临床检查

在养殖场调查并记录疾病发生时养殖池海水的温度、盐度,病鱼大小、养殖密度、死亡特征等信息。观察病鱼的游泳、呼吸、摄食等状态。取濒死的病鱼,进行外观检查和剖检,观察、记录各器官病变情况。剪取病鱼鳃丝制成水浸片,置于光学显微镜下观察。

1.2 病理组织的显微观察

剪取濒死的斑石鲷幼鱼鳃丝,迅速放入Davidson's AFA固定液中。固定后进行常规石蜡切片和苏木精-伊红染色,用光学显微镜观察鳃组织的病变情况。同时,取病鱼的鳃丝,用解剖刀切成1–2 mm³的小块,置于多聚甲醛-戊二醛固定液中固定,然后经脱水、临界点干燥、真空镀膜等处理,制成扫描电子显微镜样品,使用日本电子公司JSM-840型扫描电子显微镜观察、拍照。

2 结果

2015年初,某养殖场40个斑石鲷幼鱼养殖池中,有9个养殖池发病。此时养殖池的水温为21℃,盐度为30。病鱼全长约为15 cm,养殖密度为70–80尾/m³水体。起初各发病池每天只有数尾鱼死亡,但随着病程的延长,每天的死鱼数量逐渐增加,15 d内累积死亡率达40%以上。患病幼鱼鱼群散开、不聚集。病鱼在水池中活力差,身体侧偏,常静止于水底或侧壁,严重者随着水流漂流。但病鱼反应灵敏,难以捕捉。病鱼的典型症状是呼吸困难,口部持续张开,鳃盖开合频繁,对投喂的食物无反应。外观检查可见病鱼体

表无明显损伤或溃疡,但鳃部覆盖有大量黏液,鳃丝残缺,颜色鲜红(图1)。剖检发现,病鱼肝、脾、肾等内脏表现正常,无明显病变。肠道无肿胀积水现象,但其中无食物。

取病鱼鳃丝制成水浸片,置于相差显微镜下观察,可见鳃丝末端有许多大小不一的包囊,直径约为30–70 μm,平均直径约为50 μm(图2-A)。在普通光学显微镜下,这些包囊大量附着在鳃丝上,外观圆形或卵圆形,呈浅黄棕色,少数包囊已从鳃丝上脱落(图2-B)。在苏木精-伊红染色的石蜡切片中,患病斑石鲷的鳃丝病变严重,鳃丝末端的许多上皮细胞膨大呈囊状,部分上皮细胞坏死、脱落(图3-A)。次级鳃丝粘连,呈棍棒化。囊肿嗜碱性,内部均质化(图3-B)。通过扫描电子显微镜观察患病斑石鲷的鳃丝,可发现鳃丝棍棒化,鳃小片被大量黏液覆盖,有许多大小不一的囊肿细胞镶嵌于鳃小片之间(图4-A),只露出光滑的上表面(图4-B)。



图1 患上皮囊肿病斑石鲷幼鱼的鳃
Fig.1 Epitheliocystis-infected gills of juvenile *O. punctatus*

3 讨论

文献报道,鱼类上皮囊肿病的主要症状包括病鱼游泳无力、在水中停滞,呼吸困难、常在水面处呼吸,食欲下降,鳃丝分泌出大量黏液,鳃丝和体表有大量的白色或淡黄色的包囊(Nylund *et al.*, 1998; Draghi *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2011)。上皮囊肿病病原体在在大西洋鲑(*Salmo salar*)鳃上皮细胞内增殖,形成包囊并不断变大,最后导致鳃小片相互粘连,鳃上皮细胞坏死、脱落,严重影响了病鱼的呼吸功能(Nylund *et al.*, 1998; Draghi *et al.*, 2004)。与上述报道相类似,本研究的调查和观察结果也表明,斑石鲷上皮囊肿病的病灶主要是鳃。囊肿的不断增大,引起鳃丝上皮细

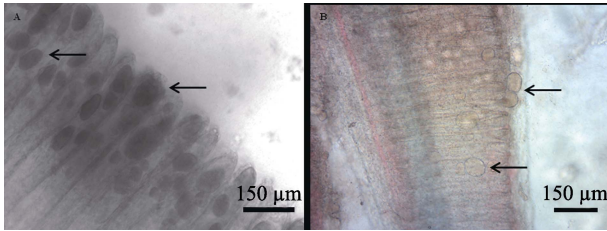


图2 患上皮囊肿病的斑石鲷鳃丝上附着的包裹
Fig.2 Cysts attached to the epitheliocystis-infected gill of *O. punctatus*

A: 鳃丝末端大小不一的包裹; B: 圆形或卵圆形的呈浅黄棕色的包裹
A: Cysts of different sizes at the end of gill filaments; B: Round or ovoid cysts with light yellow-brown color

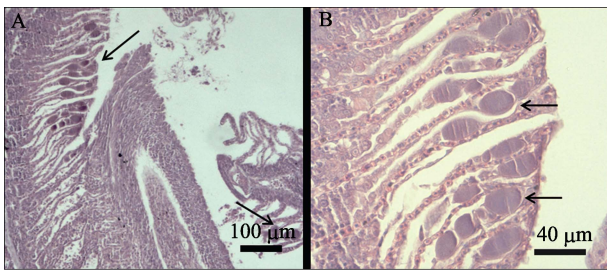


图3 病鱼鳃丝末端呈囊肿状的上皮细胞
Fig.3 Enlarged epithelial cells (cysts) in the end of secondary lamellae

A: 次级鳃丝末端粘连; B: 囊肿嗜碱性且内部均质化
A: The ends of secondary lamellae adhered each other; B: The cysts were basophilia and homogeneous

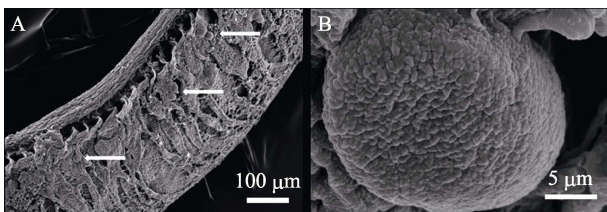


图4 扫描电子显微镜下患病斑石鲷幼鱼的鳃丝及包裹
Fig.4 Scanning electron micrographs of gill filament and cyst in epitheliocystis-infected *O. punctatus*

A: 棍棒化的鳃丝及镶嵌着上皮囊肿细胞的鳃小片;
B: 表面光滑的上皮囊肿细胞
A: Clavate gill filament and cysts embedding secondary lamellae; B: A cyst with smooth surface

胞坏死,也刺激鱼体产生应激反应,导致鳃丝分泌大量黏液。鳃丝的病变严重影响了鱼体气体交换,因此病鱼表现出严重的缺氧症状。此外,感染上皮囊肿病的斑石鲷幼鱼,15 d内的累积死亡率超过40%,该数值与北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)最高44%的累积死亡率相当,但低于尖吻重牙鲷(*Diplodus puntazzo*)仔鱼100%的死亡率(Draghi *et al.*, 2007; Katharios *et al.*,

2008)。这说明与仔鱼相比,幼鱼对该病具有更强的抵抗力,因此发病初期症状不明显,发病后仍然能够存活较长时间,其特征表现为慢性死亡。因此,通过疾病的现场调查、病鱼的临床检查、病理组织的光学显微镜和扫描电子显微镜观察,可以初步确定此次斑石鲷幼鱼罹患了上皮囊肿病。

感染不同鱼类的上皮囊肿病,其病原菌株差异较大。但通过16S rDNA序列分析发现,绝大部分菌株隶属于衣原体目,分属于不同的科、属(Stride *et al.*, 2014)。在今后的研究中,可以通过测定斑石鲷上皮囊肿病病原的16S rDNA序列,最终确定该病原的分类地位,并研发病原特异性的分子生物学检测技术,对该病进行早期诊断。

作为新兴的海水鱼类养殖品种,斑石鲷的病害少有报道。感染上皮囊肿病的斑石鲷幼鱼虽然表现为慢性死亡,但如果不及时采取治疗措施,累积死亡率仍然很高,导致较大的经济损失。养殖场曾尝试使用甲醛和硫酸铜对病鱼进行药浴,但没有治疗效果。曾有文献报道,土霉素对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)上皮囊肿病有较好的治疗效果(Goodwin *et al.*, 2005),但其是否适合治疗斑石鲷上皮囊肿病,仍需进一步研究。

参 考 文 献

- Dong C, Weng S, Luo Y, *et al.* A new marine megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Virus Research*, 2010, 147(1): 98–106
- Draghi A II, Bebak J, Popov VL, *et al.* Characterization of a Neochlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in cultured Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 76(1): 27–38
- Draghi A II, Popov VL, Kahl MM, *et al.* Characterization of “*Candidatus Piscichlamydia salmonis*” (Order Chlamydiales), a Chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(11): 5286–5297
- Egusa S, Miyazaki T, Shiomitsu T, *et al.* Epitheliocystis-like disease occurred among hatchery-reared fly of *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathology*, 1987, 22(1): 33–34
- Goodwin AE, Park E, Nowak, BF. Successful treatment of largemouth bass, *Micropterus salmoides* (L.) with epitheliocystis hyperinfection. *Journal of Fish Disease*, 2005, 28(10): 623–625
- Katharios P, Papadaki M, Papandroulakis N, *et al.* Severe mortality in mesocosm-reared sharpnose sea bream *Diplodus puntazzo* larvae due to epitheliocystis infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 82(1): 55–60
- Mitchell SO, Rodger H. A review of infectious gill disease in

- marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34 (6): 411–432
- Nylund A, Kvenseseth AM, Isdal E. A morphological study of the epitheliocystis agent in farmed Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1998, 10(1): 43–55
- Skloris GP, Krondiris JV, Sideris DC, *et al.* Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research*, 2001, 75(1): 59–67
- Stride MC, Polkinghorne A, Nowak BF. Chlamydial infections of fish: Diverse pathogens and emerging causes of disease in aquaculture species. *Veterinary Microbiology*, 2014, 170 (1–2): 258–266
- Yanagida T, Palenzuela O, Hirae T, *et al.* Myxosporean emaciation disease of cultured red sea bream *Pagrus major* and spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathology*, 2008, 43(1): 45–48

(编辑 马瑾艳)

First Report and Microscopic Examination of Epitheliocystis in Cultured Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) in China

FAN Chao^{1,2}, SHI Chengyin¹①, LIU Jiangchun³

(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; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261418)

Abstract Epitheliocystis is a kind of fish disease which is caused by bacteria in the order of Chlamydiales. Its typical characterization is epithelial hypertrophy in gills and skin of diseased fish. Fish epitheliocystis has not been reported in China. As a newly cultured marine fish species, spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) has high economic value. *O. punctatus* juveniles of 15 cm in total length died continuously in a hatchery located in Shandong Province in 2015. And the cumulative mortality was more than 40% in 15 d. The field investigation recorded that the water temperature was 21°C and the water salinity was 30 during epidemics. Diseased *O. punctatus* usually scattered in the tank. They stagnated in the water with little vitality and/or lost balance even drifted with the water flow. Clinical signs of diseased fish contained debility, anorexia and dyspnea. Diseased fish kept mouth open with operculum opening and closing at a high rate. They did not response to feeding. Clinical examination and necropsy revealed that gills of diseased fish were covered by a lot of mucus. The gill filaments were damaged and the intestinal tract was empty. Many cysts with 30–70 μm in diameter, round or ovoid in shape and light yellow-brown in color were observed on wet mounts of gill filaments from diseased fish under the light microscope. The histopathology by hematoxylin and eosin staining indicated that the ends of secondary lamellae adhered each other and many epithelial cells enlarged and formed cysts. These cysts were basophilia and homogeneous. The examination of scanning electron microscope showed that the gill filaments of diseased fish were clavate. The secondary lamellae were covered by a lot of mucus and embedded by many cysts with smooth surface. Based on the field investigation, clinical examination and necropsy of diseased fish and microscopic observation of gills, this disease was considered as epitheliocystis of *O. punctatus*. This is the first report of epitheliocystis in cultured *O. punctatus* in China.

Key words Spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*); Epitheliocystis; Chlamydia; Microscopic examination

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.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 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang	戈贤平 GE Xianping	方建光 FANG Jianguang	王清印 WANG Qingyin
王新鸣 WANG Xinming	包振民 BAO Zhenmin	司徒建通 SITU Jiantong	关瑞章 GUAN Ruizhang
刘占江 LIU Zhanjiang	刘海金 LIU Haijin	孙效文 SUN Xiaowen	孙 溢 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士瑾 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立桥 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 捷 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第38卷 第2期 2017年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.38 No.2 Apr. 2017

主管单位 中华人民共和国农业部

主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

中国水产学会

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

<http://www.ykxjz.cn>

E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛国彩印刷有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed

Subscription

Overseas Distributed

by Ministry of Agriculture, P.R.China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

by 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.ykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Tang Qisheng

by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

by China Post Group Corporation Shandong Branch

Post Offices All Over China

by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986170