

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第38卷 VOL.38

第6期 NO.6



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 38 卷 第 6 期

2017 年 12 月

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

目 次

研究论文

- 桑沟湾春季海-气界面 CO₂ 交换通量及其与养殖活动的关系分析 刘毅 张继红 房景辉 蔺凡 吴文广 (1)
- 黄河口海域夏季大型底栖动物的生态学特征 李少文 任中华 王田田 (9)
- 秦皇岛近海增殖放流区牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)回捕群体的遗传多样性分析 司飞 孙朝徽 于姗姗 赵雅贤 宋立民 王树亮 王青林 姜秀凤 王玉芬 于清海 (18)
- 洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) Cytb 和 CO I 基因序列多态性分析 李大命 李康 张彤晴 唐晟凯 刘燕山 刘小维 穆欢 黄越峰 潘建林 (25)
- 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)PRL 基因、Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因对盐度胁迫的响应 崔文晓 马爱军 黄智慧 孙志宾 刘志峰 夏丹丹 唐启政 杨志 曲江波 (32)
- 越冬对黄鳝(*Monopterus albus*)机体生化组成及部分血清生化指标的影响 李昭林 刘庄鹏 何志刚 田芊芊 张俊智 张璐 米海峰 胡毅 (41)
- 急性离水操作胁迫对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼组织结构和氧化应激的影响 刘奇奇 温久福 区又君 李加儿 周慧 (48)
- 姜黄素对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)生长、消化与抗氧化能力的影响 张滕闲 陈钱 张宝龙 林城丽 朱国霞 方珍珍 白东清 (56)
- 银鲳(*Pampus argenteus*)染色体标本制备及其核型研究 刘琨 周丽青 李凤辉 陈四清 葛建龙 刘长琳 施兆鸿 (64)
- 不同饵料及养殖环境对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态差异的影响 沈伟良 吴雄飞 申屠基康 林淑琴 (70)
- 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对白斑综合征病毒的敏感性比较 冯亚萍 孔杰 罗坤 栾生 曹宝祥 刘宁 卢霞 曹家旺 王明珠 王军 孟宪红 (78)
- 低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响 李晓丽 王玲 宋凯 鲁康乐 张春晓 袁香丽 (85)
- 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构 刘寒苗 吴彪 刘志鸿 杨爱国 周丽青 孙秀俊 (92)
- 短蛸(*Amphioctopus fangsiao*)幼体摄食行为和不同饵料对其生长、存活的影响 王卫军 董根 李焕军 刘兆存 李彬 冯艳微 杨建敏 (100)
- 莱州湾海域小刀蛸(*Cultellus attenuatus*)繁殖生物学研究 姜绪 韦秀梅 冯艳微 韩慧宗 王圣 刘相全 童潼 (107)
- 水流和光照条件对舌状蜈蚣藻 *Grateloupia livida* (Harv) Yamad 果孢子萌发生长的影响 陈素文 张文文 郭永坚 朱长波 李俊伟 颜晓勇 陈利雄 (112)
- 碳氮营养和培养条件对芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) A4 生长的影响 李莎莎 曹煜成 李卓佳 胡晓娟 徐煜 徐武杰 杨铿 苏浩昌 文国樑 (119)
- 固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定养殖海水中 17 种喹诺酮类药物 董晓 李兆新 孙晓杰 邢丽红 彭吉星 宋才湖 (127)
- 溴氰菊酯对 4 种海水养殖生物的毒性及其积累 钟硕良 郑惠东 陈宇锋 许贻斌 姜双城 吴立峰 (139)
- HMG (High-Mobility Group Box Protein)在刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道再生期间的表达情况分析 缪婷 孙丽娜 杨红生 王芳 (148)
- 《渔业科学进展》2017 年第 38 卷总目录 (155)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.38 No.6 December 2017

Analysis of the Air-Sea Surface Carbon Dioxide Flux and Its Interaction with Aquaculture Activities in Sanggou Bay	(1)
..... LIU Yi, ZHANG Jihong, FANG Jinghui, LIN Fan, WU Wenguang	
Ecological Characteristics of Macrobenthos at the Yellow River Estuary in Summer	(9)
..... LI Shaowen, REN Zhonghua, WANG Tiantian	
Analysis of the Genetic Variability of the Captured Population of Japanese Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> in the Coastal Releasing Area of Qinhuangdao	(18)
..... SI Fei, SUN Zhaohui, YU Shanshan, ZHAO Yaxian, SONG Limin, WANG Shuliang, WANG Qinglin, JIANG Xiufeng, WANG Yufen, YU Qinghai	
Genetic Polymorphism Analysis of <i>Cyrb</i> and <i>CO</i> Gene Sequences of <i>Protosalanx hyalocranius</i> in the Hongze Lake	(25)
..... LI Daming, LI Kang, ZHANG Tongqing, TANG Shengkai, LIU Yanshan, LIU Xiaowei, MU Huan, HUANG Yuefeng, PAN Jianlin	
Effects of Salinity Stress on the mRNA Expression of PRL and Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α 1 of Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	(32)
..... CUI Wenxiao, MA Aijun, HUANG Zhihui, SUN Zhibin, LIU Zhifeng, XIA Dandan, TANG Qizheng, YANG Zhi, QU Jiangbo	
Effects of Overwintering on the Body Biochemical Composition and Serum Biochemical Indices of Rice Field Eel (<i>Monopterus albus</i>)	(41)
..... LI Zhaolin, LIU Zhuangpeng, HE Zhigang, TIAN Qianqian, ZHANG Junzhi, ZHANG Lu, MI Haifeng, HU Yi	
The Effects of Acute Off-Water Handling Stress on the Tissue Structure and Oxidative Stress of Juvenile <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	(48)
..... LIU Qiqi, WEN Jiufu, OU Youjun, LI Jiaer, ZHOU Hui	
The Effects of Curcumin on the Growth, Digestion and Antioxidant Ability of Yellow Catfish (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	(56)
..... ZHANG Tengxian, CHEN Qian, ZHANG Baolong, LIN Chengli, ZHU Guoxia, FANG Zhenzhen, BAI Dongqing	
Chromosome Samples Preparation and Karyotype Analysis of Pomfret (<i>Pampus argenteus</i>)	(64)
..... LIU Kun, ZHOU Liqing, LI Fenghui, CHEN Siqing, GE Jianlong, LIU Changlin, SHI Zhaohong	
The Effects of Different Diets and Culture Environments on the Morphological Variations in the Large Yellow Croaker (<i>Larimichthys crocea</i>)	(70)
..... SHEN Weiliang, WU Xiongfei, SHENTU Jikang, LIN Shuqin	
The Comparison of the Sensitivity to the White Spot Syndrome Virus Between <i>Fenneropenaeus chinensis</i> and <i>Litopenaeus vannamei</i>	(78)
..... FENG Yaping, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LIU Ning, LU Xia, CAO Jiawang, WANG Mingzhu, WANG Jun, MENG Xianhong	
Effects of Dietary Low-Molecular-Weight Fish Hydrolysate (LWFH) on Nonspecific Immunity and Antioxidant Capacity of Pacific White Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	(85)
..... LI Xiaoli, WANG Ling, SONG Kai, LU Kangle, ZHANG Chunxiao, YUAN Xiangli	
Genetic Diversity and Geographic Population Structures of <i>Scapharca broughtonii</i>	(92)
..... LIU Hanmiao, WU Biao, LIU Zhihong, YANG Aiguo, ZHOU Liqing, SUN Xiujun	
Feeding Behavior of Larval <i>Amphioctopus fangsiao</i> and the Effect of Different Diets on Its Growth and Survival	(100)
..... WANG Weijun, DONG Gen, LI Huanjun, LIU Zhaojun, LI Bin, FENG Yanwei, YANG Jianmin	
The Reproductive Biology of <i>Cultellus attenuatus</i> in the Laizhou Bay	(107)
..... JIANG Xu, WEI Xiumei, FENG Yanwei, HAN Huizong, WANG Sheng, LIU Xiangquan, TONG Tong	
Effect of Water Velocity and Light on the Growth and Development of <i>Grateloupia livida</i> (Harv) Yamad Carpospores	(112)
..... CHEN Suwen, ZHANG Wenwen, GUO Yongjian, ZHU Changbo, LI Junwei, XIE Xiaoyong, CHEN Lixiong	
The Effects of Different Carbon and Nitrogen Nutrients and Culture Conditions on the Growth of <i>Bacillus</i> sp. Strain A4	(119)
..... LI Shasha, CAO Yucheng, LI Zhuojia, HU Xiaojuan, XU Yu, XU Wujie, YANG Keng, SU Haochang, WEN Guoliang	
Simultaneous Determination of Seventeen Quinolones in Aquaculture Seawater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	(127)
..... DONG Xiao, LI Zhaoxin, SUN Xiaojie, XING Lihong, PENG Jixing, SONG Caihu	
The Acute Toxicity and Bioaccumulation of Deltamethrin in Four Species of Mariculture Organisms	(139)
..... ZHONG Shuoliang, ZHENG Huidong, CHEN Yufeng, XU Yibin, JIANG Shuangcheng, WU Lifeng	
Expression Analysis of HMG (High-Mobility Group Box Protein) During the Intestine Regeneration of Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i>	(148)
..... MIAO Ting, SUN Lina, YANG Hongsheng, WANG Fang	
Total Contents of PROGRESS IN FISHERY SCIENCES, Vol.38, 2017	(160)

桑沟湾春季海-气界面 CO₂ 交换通量 及其与养殖活动的关系分析*



刘毅¹ 张继红^{1,2①} 房景辉¹ 蔺凡¹ 吴文广¹

(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)

摘要 为研究不同养殖活动对海-气界面 CO₂ 交换通量(F)的影响,于 2014 年 5 月采用走航式 CO₂ 分压仪对中国北方典型的多营养层次混合养殖海域—桑沟湾养殖区的表层水 CO₂ 分压($p\text{CO}_2$)进行了大面调查,并通过数据计算桑沟湾海区的 F 值。在调查过程中,选择在网箱养殖区、贝类养殖区、藻类养殖区等区域内进行 24 h 定点连续观测。探讨了春季桑沟湾海-气界面 CO₂ 的交换通量及其主要影响因素。大面调查结果显示,桑沟湾内海水中 $p\text{CO}_2$ 总体变化趋势是由湾内向湾外递减,网箱养殖区海水中 $p\text{CO}_2$ 远远高于其他区域。在大面调查中,贝类、藻类、贝藻混养、网箱养殖区的 F 值分别为 (-1.02 ± 0.83) 、 (-15.40 ± 1.28) 、 (-4.32 ± 1.41) 、 $8.14 \text{ mmol}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 。定点连续监测显示,藻类、贝类、网箱养殖区的 $p\text{CO}_2$ 24 h 平均值分别为 (320 ± 14) 、 (330 ± 10) 、 $(413\pm 37) \mu\text{atm}$ 。研究表明,光合作用是海-气界面 CO₂ 交换通量的主要影响因素之一,不同养殖区之间的海-气界面 CO₂ 交换通量差异显著。影响各养殖区海-气界面 CO₂ 交换通量日变化规律的影响因子与走航调查结果一致。养殖活动是影响海-气界面 CO₂ 交换通量的主导因素。

关键词 桑沟湾; 交换通量; CO₂ 分压; 海水养殖

中图分类号 S931.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0001-08

海洋占据了地球表面积的 70%,从海洋中获取食物,发展海洋经济,是缓解粮食短缺这一世界性的重要手段之一。工业革命之后,由于人类使用化石燃料无节的排放和对树木的乱砍乱伐,导致大气 CO₂ 浓度增加,所引起的“温室效应”是目前人类最为急切解决的问题之一。全球碳循环是国际地圈-生物圈计划(IGBP)的核心问题之一。人类通过燃烧的方式利用化石燃料,并向大气中排放 CO₂,人类活动每年向大气中排放约为 6 Gt 的碳,这些碳被海洋吸收了约 1/3,被吸收的碳量为 2.2 Gt/a(Baliño *et al.*, 2001)。海洋在吸收 CO₂、调节全球气候,缓解“温室效应”对

全球气候带来的变化做出了巨大贡献。碳是主要的生命元素,CO₂ 在海-气界面转移的生物化学过程是关键的海碳循环过程,研究海-气界面 CO₂ 交换通量是认识 CO₂ 在海水中转移与归宿的基础(李宁等, 2005)。我国在世界海水水产养殖产量和养殖规模上都稳居第一,人类的养殖活动可能成为减排增汇的有效手段(Tang *et al.*, 2011)。我国学者在 2010 年左右率先提出“碳汇渔业”的概念,近年来的不断探索在世界范围内引起了广泛关注,并逐渐被人们接受。目前,有关海-气界面 CO₂ 交换通量的研究主要集中在开阔海域,对人类活动集中的陆架边缘海中不同养殖区的

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2014A01YY01)、国家十二五支撑计划课题(2011BAD13B06)和国家自然科学基金项目(41276172)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2014A01YY01), National Key Technology R&D Program of China (2011BAD13B06), and National Natural Science Foundation of China (41276172)]. 刘毅, E-mail: liuyi@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-31, 收修改稿日期: 2016-04-28

研究鲜见报道。目前,对养殖区与非养殖区之间的不同变化影响研究(蒋增杰等, 2013)较少,随着“碳汇渔业”研究的不断深入,研究不同养殖模式对海-气界面 CO_2 交换通量的影响就显得尤为重要。

桑沟湾是我国典型的多营养层次综合养殖海域之一,同时也是我国北方重要的藻类养殖基地,养殖总面积达 135 km^2 。湾内共划分 4 个养殖区,分别是网箱养殖区、贝类养殖区、贝藻混养区以及藻类养殖区。本研究在 2014 年 5 月 20–24 日,通过对桑沟湾表层海水 $p\text{CO}_2$ 等参数的大面调查,以及不同养殖区的昼夜变化监测。分析了该海域不同养殖模式的 CO_2 交换通量及其影响机制。

1 调查海域与方法

1.1 调查海域及站位设置

桑沟湾位于山东半岛的最东端,是半岛东侧最开阔的海湾,海湾面积约为 150 km^2 。桑沟湾内分 4 类养殖区,湾内为贝类养殖区,靠近湾口为藻类养殖区,中间是贝藻混养区,网箱养殖区位于湾内的西南角。桑沟湾养殖海区分布情况以及本研究的调查站位见图 1,共设置 14 个调查站位,于 2014 年 5 月 20 日高潮时,分别由两条调查船沿海流方向同时出发,调查两条断面(断面 1 包括 18、15、10、6、3、1、21 站位;断面 2 包括 19、14、11、5、4、22 站位)。另外,于 5 月 21–24 日分别在贝类养殖区、藻类养殖区、网箱

养殖区进行 24 h 的连续观测。

1.2 调查参数与方法

所有取得的样品均按《海洋监测规范》(GB17378.3-2007)中规定的方法采集、处理和保存。现场使用美国 YSI-EXO2 型水质分析仪直接测定和读取溶解氧(DO)、水温(T)、pH(相对精度 ± 0.01)及盐度(S)等海洋监测指标。利用水样采集器采集表层水样并迅速导入 2.5 L 加仑桶,现场用 GF/F 膜及醋酸纤维素膜抽滤,将 GF/F 膜抽滤后的水样移入提前经过马弗炉 450°C 4 h 灼烧过的 30 ml 广口瓶中,用于溶解无机碳(DIC)的检测。醋酸纤维素膜和抽滤后的水样于 4°C 保存,用于叶绿素 a (Chl-a)以及总碱度(TA)的分析。TA 采用自动电位滴定法测定(自动滴定仪 848Titrino plus, Metrohm 公司,瑞士),测量精度 $\pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ 。DIC 采用德国耶拿 Multi N/C 总有机碳分析仪直接测得,表层水 CO_2 分压($p\text{CO}_2$)由德国 SubCtech 公司的 OceanPack 走航仪进行测定。

1.3 数据分析与计算方法

目前,关于海气界面 CO_2 交换通量的计算模式较多,其中,以 Wanninkhof(1999)提出的模式应用比较广泛(Rehder *et al*, 2001; Ternon, 2000),海-气界面 CO_2 交换通量采用以下公式进行估算:

$$F = k \times \alpha_s \times \Delta p\text{CO}_2$$

式中, F 为海-气界面 CO_2 交换通量($\text{mmol/m}^2 \cdot \text{d}$), F 值为 CO_2 交换通量即大气 CO_2 源汇的强度,正负代

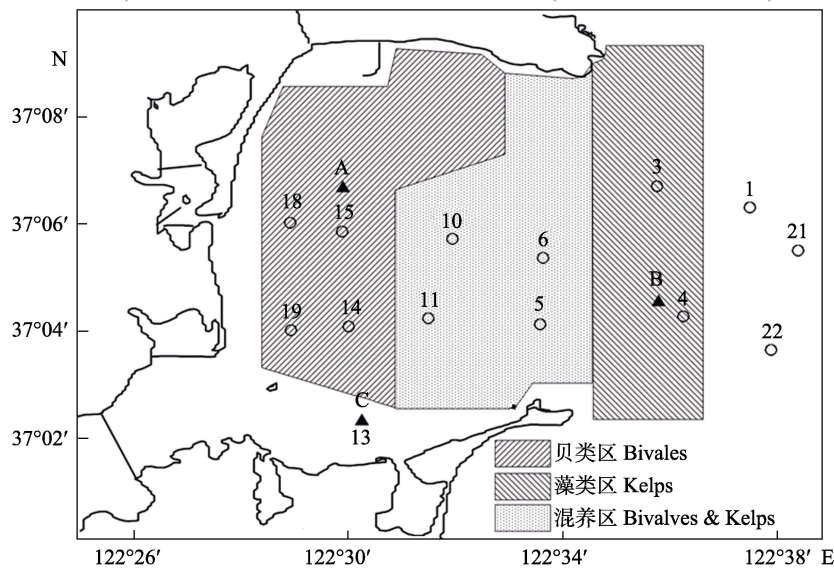


图 1 桑沟湾调查站位

Fig.1 Sampling stations in Sanggou Bay

A、B、C 分别为贝类养殖区、藻类养殖区、网箱养殖区的连续监测站

A, B and C refer to continuous observation stations in bivalves area, seaweed area and net-cage area, respectively

表源汇的方向。当海水从大气中吸收 CO₂, 表现为汇时 F 为负值; 当海水向大气中释放 CO₂ 时, 表现为源 F 为正值。 k 为海-气界面气体传输速度(cm/h); α_s 为 CO₂ 在海水中的溶解度系数(mol/kg·atm), 是与温度和盐度相关的函数, 参照 Weiss(1974)公式计算得到; $\Delta p\text{CO}_2$ 是海水与大气中 $p\text{CO}_2$ 的差值。本研究中, 大气 $p\text{CO}_2$ 取值为 397 μatm (World Meteorological Organization, 2014), 海气界面气体传输速度 k 取大陆架海区的平均值 10.3(Tsunogai *et al.*, 1999)。

等值线的绘制采用 Surfer 8.0 软件; 差异显著性及相关性分析采用 SPSS 17.0 软件, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 桑沟湾走航调查结果

2.1.1 表层水 $p\text{CO}_2$ 等参数的空间分布特征 由于桑沟湾内水位较浅, 受光照影响近岸升温较快, 水温的变化趋势由湾内向湾外递减。水温的最高值为 16.89°C(19 站位), 最低值为 11.47°C(1 站位), 相差 5.42°C。盐度集中在 30.20–30.94 之间, 变化较小。Chl- a 的浓度介于 0.14–1.40 $\mu\text{g/L}$ 之间, 平均值为 (0.67±0.39) $\mu\text{g/L}$, 平面分布从湾内向湾外逐渐升高(图 2-a)。TA 的平面分布趋势是从湾内向湾外递增(图 2-b), 变化幅度为 2251.93–2849.68 $\mu\text{mol/L}$ 。DIC 的浓度范围为 2120.74–2284.13 $\mu\text{mol/L}$, 平均值为

(2213.91±43.05) $\mu\text{mol/L}$, 平面分布的趋势是由湾内向湾外递减, 并在外海空白区有一个明显升高的趋势(图 2-c)。由于数据丢失, DO 只有一条断面的数据得以保留, 通过对剩余数据的分析, DO 的变化也大体呈现由湾内向湾外递增的趋势。 $p\text{H}$ 值的变化范围为 7.44–8.27, 最低值出现在贝类养殖区, 最高值出现在藻类养殖区, 平面分布也是由湾内向湾外递增。

调查海区表层海水中 $p\text{CO}_2$ 的平面分布见图 2-d。从图 2-d 可以看出, 在桑沟湾养殖海域表层海水的 $p\text{CO}_2$ 平面分布呈现从湾内向湾外逐渐降低的趋势, 最高值出现在网箱养殖区, 为 402.56 μatm 。且不同养殖区之间的 $p\text{CO}_2$ 差异显著($P < 0.05$)。

2.1.2 不同养殖区海-气界面 CO₂ 交换通量 表层海水中 $p\text{CO}_2$ 的变化范围在 323.42–402.56 μatm 之间。按照不同养殖海区划分各站位的 CO₂ 交换通量值 F 见表 1。空白区、藻类区、贝藻混养区、贝类区、网箱区的 CO₂ 通量分别为(-3.30±0.35)、(-15.40±1.28)、(-4.32±1.41)、(-1.02±0.83)、8.14 $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。除网箱区外, 其他各区都表现为汇区。其中, 藻类区的 F 值最大, 其次是贝藻混养区, 贝类区最小。各区之间的差异性显著($P < 0.05$)。

2.2 定点连续监测结果

藻类、贝类、网箱养殖区 24 h 连续监测的结果

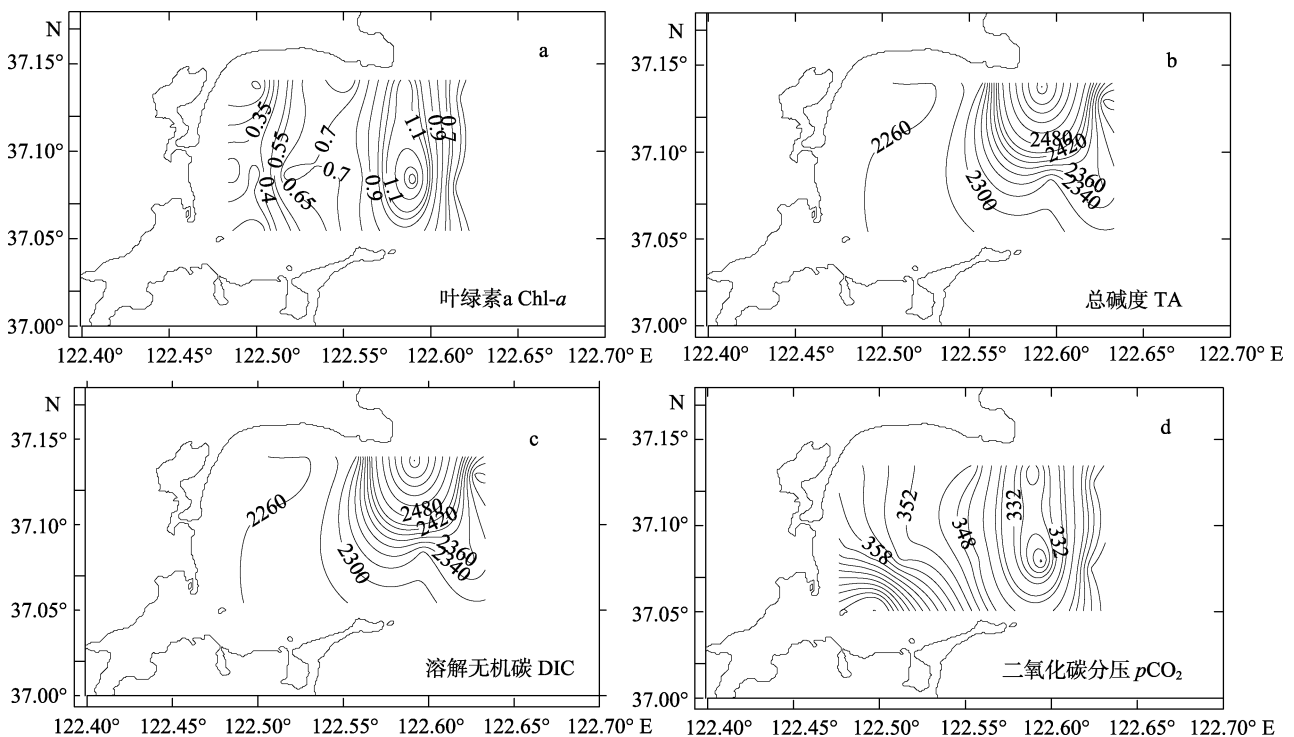


图 2 桑沟湾春季表层水中叶绿素 a、总碱度、溶解无机碳浓度和 CO₂ 分压的空间分布
Fig.2 Spatial distribution of Chl- a , TA, DIC and $p\text{CO}_2$ of surface water in Sanggou Bay in spring

表1 桑沟湾不同养殖区的 CO₂ 通量 *F*
Tab.1 Flux of CO₂ in different areas of Sanggou Bay

养殖区 Culture area	站位 Station	CO ₂ 交换通量 <i>F</i> (mmol/m ² ·d)
空白 Control	21	-3.68
	1	-3.23
	22	-3.00
	平均值 Mean	-3.30±0.35
藻类 Seaweed	3	-14.50
	4	-16.31
	平均值 Mean	-15.40±1.28
贝藻 Bivalves and seaweed	5	-6.22
	6	-4.43
	10	-3.70
	11	-2.93
	平均值 Mean	-4.32±1.41
贝类 Bivalves	14	-0.68
	15	-2.08
	18	-1.21
	19	-0.12
	平均值 Mean	-1.02±0.83
网箱 Cage	13	8.14

见图3-图5(贝类养殖区的 DO 和温度数据丢失)。从图3-图5可以看出,藻类区的温度明显低于贝类区及网箱区,与走航调查的结果一致。各监测点之间以及每个监测点的盐度昼夜变化都不大。贝类区的 pH 显著低于藻类区和网箱区($P<0.05$)。藻类区的平均 DO 浓度为(9.37±0.35) mg/L,显著高于网箱区($P<0.05$)(贝类区溶氧数据丢失无法比较)。藻类区的 Chl-*a* 浓度最高,平均值为(1.56±0.54) μg/L,网箱区最低,平均值为(1.18±0.20) μg/L。藻类区、贝类区、网箱区 pCO₂ 的 24 h 平均值分别为(320±14)、(330±10)、(413±37) μatm。相互间关系为藻类区<贝类区<网箱区,与走航调查的结果相一致。藻类区的 pCO₂ 变化范围为 298–340 μatm,最大值与最小值相差 42 μatm,贝类区 pCO₂ 变化范围为 313–344 μatm,最大值与最小值相差 31 μatm,网箱区 pCO₂ 变化范围为 324–467 μatm,最大值与最小值相差 143 μatm。藻类区与贝类区的 pCO₂ 与 Chl-*a* 浓度显著负相关,同时,藻类区 Chl-*a* 与 DO 显著正相关($R=0.97, P<0.01$)。

通过连续 24 h 观测,网箱养殖区始终是 CO₂ 的源区,Chl-*a*、pH 值等相关参数的变化幅度较小,且网箱养殖区更靠近陆地,受陆源以及人为因素的影响较大,导致网箱养殖区各时间点参数均无明显的相关性,但从总体分析来看,网箱区较其他区的低 Chl-*a* 浓度,低 pH 值仍然可以解释此区域的高 pCO₂。

3 讨论

3.1 桑沟湾表层水 pCO₂ 空间变化特征

3.1.1 CO₂ 体系各参数与环境因子的关系 走航作业中, DIC 最低值出现在藻类养殖区 3 站位,最高值出现在贝类养殖区 15 站位, DIC 含量的最高值与最低值相差约 164 μmol/L。由于调查海区筏架较多,且盐度相差较小,可以排除海流对 DIC 分布的影响作用,但是整个桑沟湾内表层海水温差较大,湾内贝类养殖区温度比湾外藻类养殖区温度高 5℃左右,通过 CO₂ SYS 软件对温度差进行校正发现,当温度升高 5℃时,会促使 DIC 降低 27 μmol/L。扣除温度的影响,藻类养殖区的 DIC 含量仍然低于贝类养殖区,可见大型藻类对 DIC 的大量消耗,所以, DIC 的浓度差异是大型藻类的光合作用消耗的结果。各站位 pH 差别较大,最低值出现在贝类养殖区,最高值出现在藻类养殖区。贝类自身的呼吸排泄导致贝类养殖区 pH 降低,而大型藻类的光合作用可以提高水体 pH 值,有效改善水体环境(Tang *et al.*, 2011)。所以,从 pH 的差别可以推断,不同养殖模式对水质的变化也有直接影响。

表层海水 pCO₂ 会受到物理、化学、生物的各种影响,水温和盐度是重要的影响因素之一(Weiss, 1974)。温带表层海水 pCO₂ 和水温之间存在显著的正相关关系(宋金明, 2004)。本研究结果并未与这种普遍规律相一致。可能的原因是养殖生物的生理活动对表层海水 pCO₂ 变化的影响强度大于温度对海水 pCO₂ 变化的影响,且桑沟湾内水温差形成的主要原因是湾内筏架较多,水体交换不明显,湾内水深较浅,受光照影响升温较快。在本次调查中由于仪器原因,丢失了其中一条断面的 DO 数据,导致数据不完整,无法准确分析相关参数的相关性。通过对剩余一条断面 DO 的分析,整体分布趋势是由湾内向湾外递增,且 DO 浓度与本条断面的 Chl-*a* 浓度呈现正相关($R=0.89, P<0.05$),与表层水 pCO₂ 呈负相关($R=0.90, P<0.05$)。可以推断,在春季桑沟湾养殖海区影响表层海水 pCO₂ 的主要因素是大型藻类的光合作用,即光合作用越强,吸收的 CO₂ 越多,释放的 O₂ 越多,海水中的 pCO₂ 越低。

3.1.2 养殖活动对 pCO₂ 及交换通量 *F* 的影响 春季是藻类的生长旺季,大型藻类在生长过程中可以通过光合作用吸收水体中的 DIC,从而降低水体中 DIC 的浓度和表层水的 pCO₂,提高水体 pH 值,有效改善

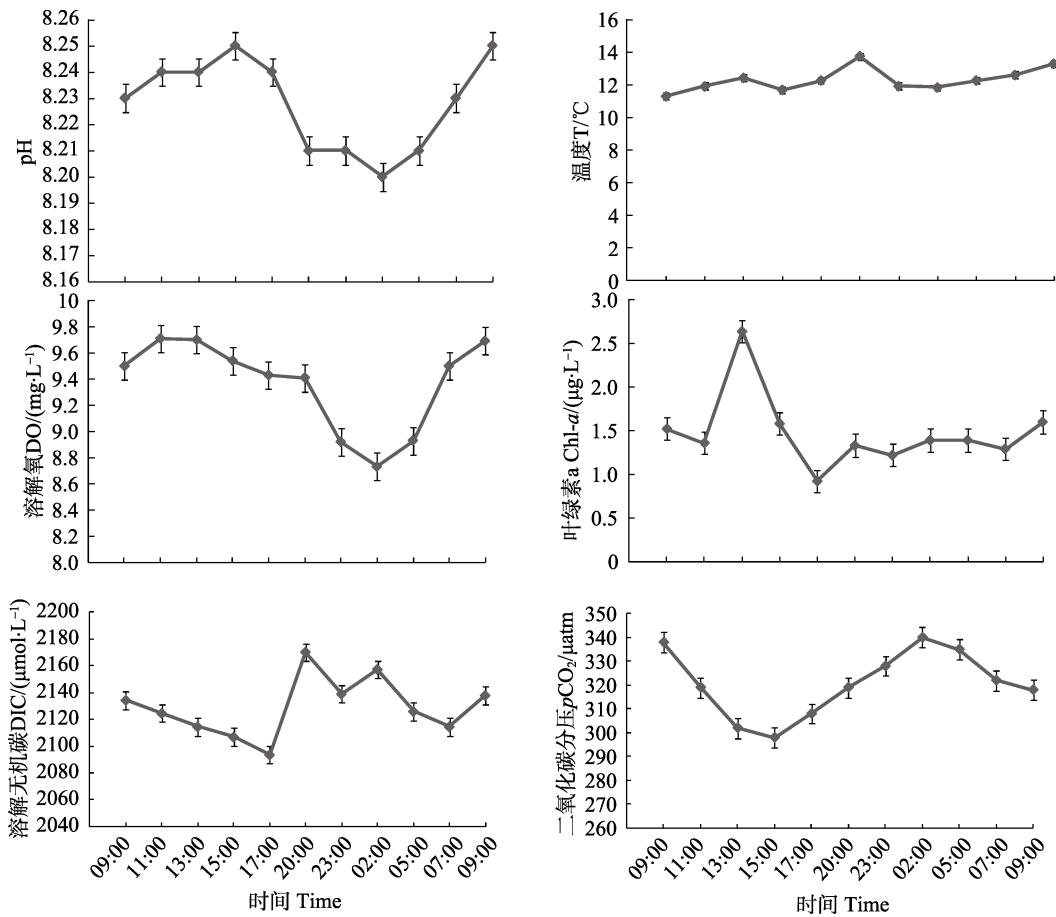


图 3 藻类养殖区环境参数的昼夜变化

Fig.3 Daily changes of environmental parameters in seaweed area

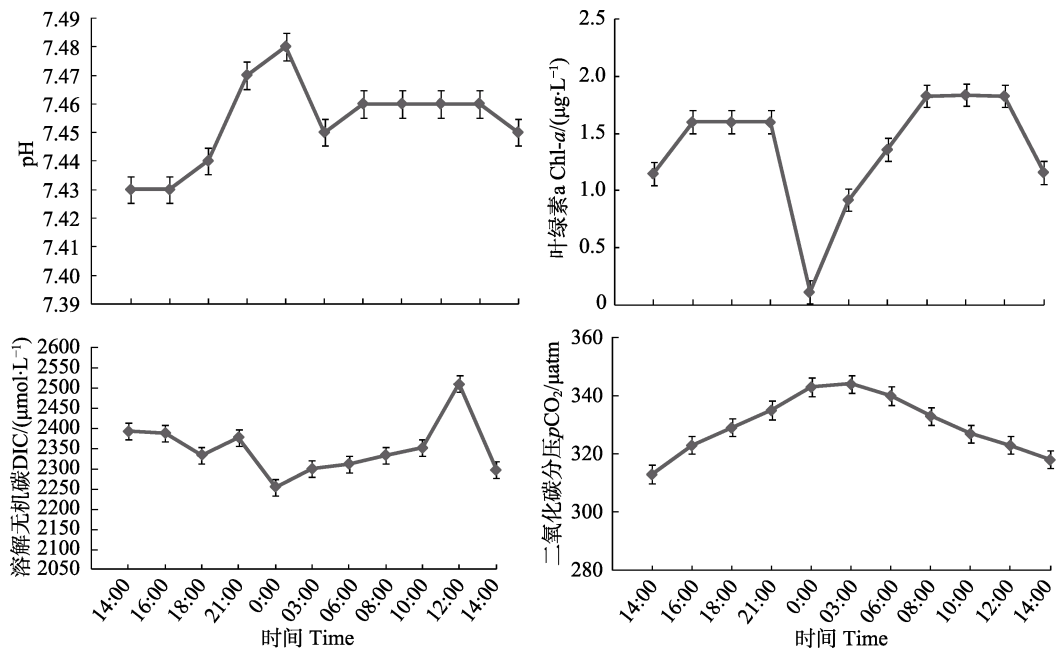


图 4 贝类养殖区环境参数的昼夜变化

Fig.4 Daily changes of environmental parameters in bivalves area

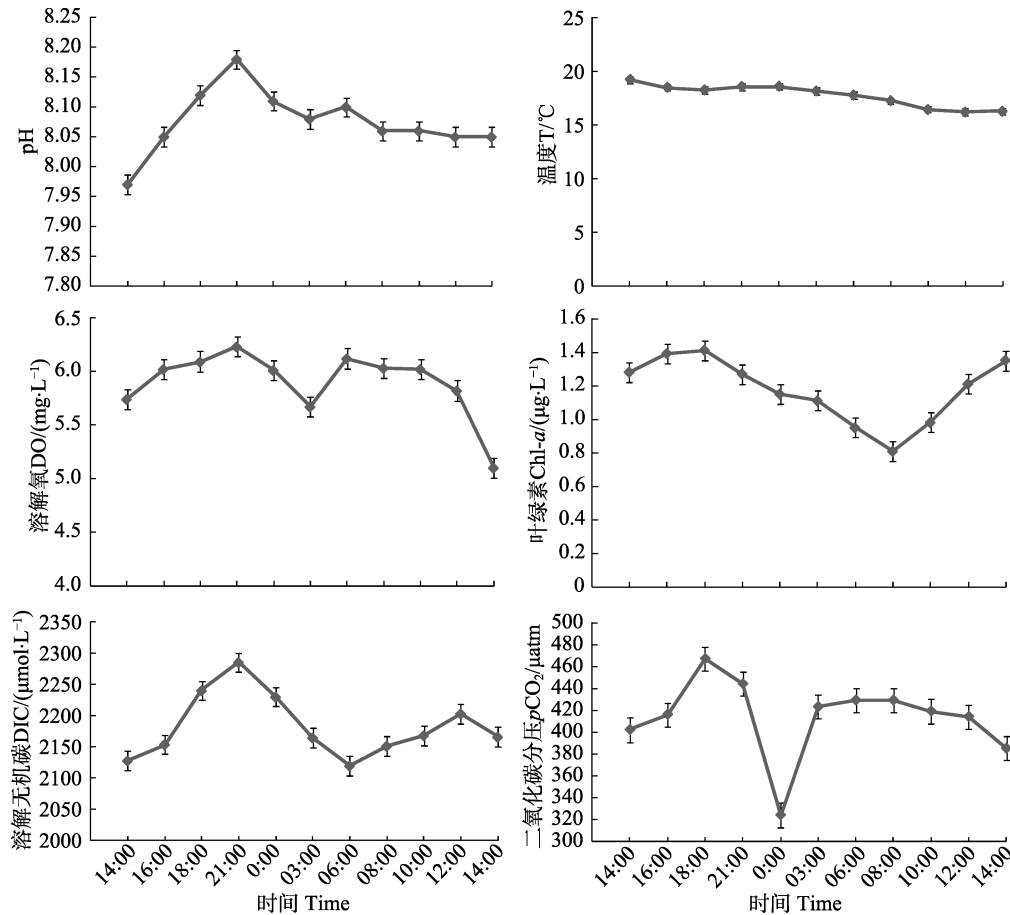


图 5 网箱养殖区环境参数的昼夜变化

Fig.5 Daily changes of environmental parameters in cage culture area

水体环境(韩婷婷, 2013)¹⁾。DIC 浓度的高低, 也会成为影响大型藻类生长的限制因子(Zou *et al.*, 2004)。走航调查和定点连续监测的结果都显示, DIC 和 $p\text{CO}_2$ 浓度最低值出现在藻类养殖区, 与上述大型藻类的光合作用功能相一致, 由于 DIC 的消耗在一定程度上也会促使海洋吸收大气中的 CO_2 , 从而使 $p\text{CO}_2$ 下降(Tang *et al.*, 2011)。藻类区的高 Chl-*a* 浓度以及高 DO 可以推断, 藻类的光合作用在海-气界面 CO_2 交换通量的变化中起到主导作用。因此, 藻类养殖区表现为 CO_2 的汇区。

春季的藻类和贝类生长活动旺盛, 桑沟湾的碳酸盐体系受藻类和贝类生长活动的影响, 以及他们之间的相互作用, 造成了这一体系的异常复杂。研究何种养殖活动对 $p\text{CO}_2$ 的影响占据主导地位, 对研究桑沟湾海区海-气界面 CO_2 交换通量起着至关重要的作用。通过相关性分析显示, $p\text{CO}_2$ 与 Chl-*a* 成显著负相

关($R=0.87, P<0.01$), 可以推断, 光合作用对影响表层水 $p\text{CO}_2$ 起到决定性作用。Chauvaud 等(2003)和 Martin 等(2006)在研究野生贝类群落对海洋碳循环影响的过程中认为, 贝类会在生长过程中呼吸和钙化释放出 CO_2 , 从而认为贝类群落应该是碳源。在本次调查中没有发现贝类养殖区的 $p\text{CO}_2$ 高于空气中的 $p\text{CO}_2$ 。虽然贝类养殖区的 CO_2 交换通量 F 最低, 但是仍然表现为 CO_2 的汇区。通过分析发现, 贝类自身旺盛的呼吸代谢作用提高了该区域表层海水中 CO_2 的含量, 这也是导致了贝类养殖区 pH 值较低的原因。虽然贝类养殖区的 Chl-*a* 浓度较其他养殖区域略低, 但是整个桑沟湾海区的营养盐浓度水平较高, 浮游植物可以大量繁殖, 贝类的滤食作用又可以促进浮游植物的生长。浮游植物的光合作用会降低水体中的 $p\text{CO}_2$ (张龙军等, 2008), 说明贝类养殖区浮游植物的光合作用可以抵消部分贝类的呼吸和钙化作用, 从而

1) Han TT. Photosynthetic physiological responses of macroalgae to different CO_2 concentrations and their ecological effects. Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences, 2013 [韩婷婷. 大型海藻对不同 CO_2 浓度的光合生理响应及其生态效应. 中国科学院研究生院博士研究生学位论文, 2013]

使得海水中的 $p\text{CO}_2$ 仍然低于大气。所以对浮游植物等的固碳作用也应有充分的认识。同时作者也认为,若养殖密度过大,贝类养殖区将对环境造成一定的负面影响。 pH 降低过多会严重影响贝类的钙化和呼吸活动,不利于贝类的生长。Zhang 等(2011)研究表明, pH 值为 7.3 时,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的钙化率接近于 0,将不能合成贝壳。所以,如何在保证经济利益的同时科学养殖贝类是我们面临的一大问题。

网箱养殖区表现为 CO₂ 的源区,可能是春季(5月)气温升高,正是鱼类繁殖与生长的季节,鱼类的呼吸作用占据了主导地位,从而影响了 CO₂ 交换通量,使网箱养殖区成为 CO₂ 的源区。不同的养殖活动对海-气界面的 CO₂ 交换通量有不同的影响结果。但本研究所得到的不同养殖区 CO₂ 交换通量的变化趋势与邱爽等(2013)对桑沟湾 2012 年春季 $p\text{CO}_2$ 分布的研究结论不同。可能的原因是,本研究海区水体环境情况良好,而张继红等(2013)在调查中遇到赤潮发生,而浮游藻类大量繁殖造成的赤潮可能会导致调查结果的偏差。最后,根据近年来对大气中 CO₂ 含量的检测,发现空气中 $p\text{CO}_2$ 有时会超过 400 μatm ,本研究仍采用世界气象组织 2014 年温室气体公报中的 CO₂ 平均值,可能会与实际情况存在差别,进而会造成实验误差。

3.2 养殖活动对 CO₂ 通量 F 昼夜变化的影响

在本研究中,通过对藻类和贝类养殖区的 24 h 连续监测,更好地验证了走航调查中所得出的相关推论。同时,根据昼夜变化的数据分析可以推断,养殖生物的生理活动对表层海水 $p\text{CO}_2$ 的变化也有影响。在藻类养殖区,夜间藻类进行呼吸作用,光合作用减弱,表层海水 $p\text{CO}_2$ 升高, pH 值降低,同时,由于光合作用的减弱,藻类对 DIC 的利用也会减弱,夜间 DIC 浓度高于日间 DIC 浓度。在贝类养殖区,表层海水中 $p\text{CO}_2$ 与 Chl-*a*、 pH 呈负相关关系,与 DIC、TA 成正相关关系(李宁等,2005)。同时,贝类养殖区的 DIC 最高、 pH 值最低也证明了不同养殖活动对水体环境的不同影响。

4 结论

本次调查中,春季桑沟湾养殖海区除网箱养殖区外都表现为大气 CO₂ 的汇区。其中,CO₂ 交换通量表现为藻类养殖区>贝藻混养养殖区>空白海区>贝类养殖区,说明在一定条件下,贝类养殖区仍然可以表现为大气 CO₂ 的汇。不同养殖模式对 CO₂ 交换通量的影响差异显著。此次调查中,Chl-*a* 是影响海-气界面

CO₂ 交换通量 F 的主要因素之一,DO、 pH 和 DIC 是表层海水中 $p\text{CO}_2$ 的影响因子。藻类对 DIC 的吸收和利用会在一定程度上影响碳酸盐体系的平衡,促使平衡向着 CO₂ 溶解的方向进行,同时提高水体 pH ,有效地改善水体环境。而贝类的呼吸排泄导致水体中 pH 降低,过度养殖贝类将会对环境有一定负面影响,并且可以预见若贝类养殖密度过大,贝类养殖区可能会出现 CO₂ 的源,所以适当的贝藻混养可以有效地保护水域环境、提高作物产量。

参 考 文 献

- Baliño BM, Fasham MJR, Bowles MC. Ocean biogeochemistry and global change. ICBP Science, 2001(2): 1-36
- Chauvaud L, Thompson JK, Cloern JE, et al. Clams as CO₂ generators: The *Potamocorbula amurensis* example in San Francisco Bay. Limnology and Oceanography, 2003, 48(6): 2086-2092
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. The specification of marine monitoring—Part 3: Sample collection, storage and transportation (GB17378.3-2007), 2007 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.海洋监测规范第3部分:样品采集、贮存与运输(GB17378.3-2007),2007]
- Jiang ZJ, Fang JG, Han TT, et al. Estimation of sea-air CO₂ flux in seaweed aquaculture area, Lido Bay. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 50-56 [蒋增杰,方建光,韩婷婷,等.大型藻类规模化养殖水域海-气界面 CO₂ 交换通量估算.渔业科学进展,2013,34(1):50-56]
- Li N, Li XG, Song JM. Key biogeochemistry processes of marine carbon cycle. Marine Environmental Science, 2005, 24(2): 75-80 [李宁,李学刚,宋金明.海洋碳循环研究的关键生物地球化学过程.海洋环境科学,2005,24(2):75-80]
- Martin S, Thouzeau G, Chauvaud L, et al. Respiration, calcification, and excretion of the invasive slipper limper, *Crepidula fornicata* L.: Implications for carbon, carbonate, and nitrogen fluxes in affected areas. Limnology and Oceanography, 2006, 51(5): 1996-2007
- Qiu S, Gong XB, Zhang JH, et al. Distribution and affecting factors of $p\text{CO}_2$ in aquaculture areas of Sanggou Bay during spring. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 31-37 [邱爽,龚信宝,张继红,等.桑沟湾养殖区春季 $p\text{CO}_2$ 分布特征及影响机制.渔业科学进展,2013,34(1):31-37]
- Rehder G, Suess E. Methane and $p\text{CO}_2$ in the Kuroshio and the South China Sea during maximum summer surface temperatures. Marine Chemistry, 2001, 75(1-2): 89-108
- Song JM. China offshore biogeochemistry. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2004, 1-591 [宋金明.中国近海生物地球化学.济南:山东科学技术出版社,2004,1-591]
- Tang QS, Zhang JH, Fang JG. Shellfish and seaweed mariculture

- increase atmospheric CO₂ absorption by coastal ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 2011(424): 97–105
- Ternon JF, Oudot C, Dessier A, *et al.* A seasonal tropical sink for atmospheric CO₂ in the Atlantic Ocean: The role of the Amazon River discharge. *Marine Chemistry*, 2000, 68(3): 183–201
- Tsunogai S, Watanabe S, Sato T. Is there a “continental shelf pump” for the absorption of atmospheric CO₂? *Tellus B*, 1999, 51(3): 701–712
- Wanninkhof R. Relationship between wind speed and gas exchange over the ocean. *Journal of Geophysical Research*, 1999, 97(C5): 7373–7382
- Weiss RF. Carbon dioxide in water and seawater: The solubility of a non-ideal gas. *Marine Chemistry*, 1974, 2(3): 203–215
- World Meteorological Organization. WMO greenhouse gas bulletin (GHG bulletin) climate cummit edition: The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2013. 2014, 10, 1–4
- Zhang JH, Wu WG, Ren LH, *et al.* Seasonal variation of *p*CO₂ and its potential influencing factors in aquaculture areas of Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 57–64 [张继红, 吴文广, 任黎华, 等. 桑沟湾表层水 *p*CO₂ 的季节变化及影响因素分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 57–64]
- Zhang LJ, Wang JJ, Zhang Y, *et al.* Distribution and controlling factors of surface seawater partial pressure of CO₂ in the northern Yellow Sea during winter. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(6): 955–960 [张龙军, 王婧婧, 张云, 等. 冬季北黄海表层海水 *p*CO₂ 分布及其影响因素探讨. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(6): 955–960]
- Zhang ML, Fang JG, Zhang JH, *et al.* Effect of marine acidification on calcification and respiration of *Chlamys farreri*. *Journal of Shellfish Research*, 2011, 30(2): 267–271
- Zou DH, Xia JR, Yang YF. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Aquaculture*, 2004, 237(1–4): 421–431

(编辑 马瑾艳)

Analysis of the Air-Sea Surface Carbon Dioxide Flux and Its Interaction with Aquaculture Activities in Sanggou Bay

LIU Yi¹, ZHANG Jihong^{1,2①}, FANG Jinghui¹, LIN Fan¹, WU Wenguang¹

(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)

Abstract To study the impact of different aquaculture activities on the air-sea carbon dioxide flux (*F*), a cruise research was carried out in May, 2014 in Sanggou Bay, the most representative area of integrated multi-trophic aquaculture in northern China. During the study, the partial pressure (*p*CO₂) of the surface sea water was measured using the *p*CO₂ underway system (OceanPack, SubCtech Co., German). The CO₂ flux of the Sanggou Bay was evaluated through following parameters. Twenty-four hours monitoring was set up and performed in the caging culture area, bivalves culture area and kelp culture areas. Furthermore, the in situ hydrodynamic, chemical, biological and culture conditions, the impact factor of the air-sea CO₂ flux in Sanggou Bay in spring were discussed. The results showed that the *p*CO₂ in cage culture areas was much higher than the other culture areas. The *F* value was (−1.02±0.83) mmol/(m²·d) in bivalves culture area, (−15.40±1.28) mmol/(m²·d) in kelp culture area, (−4.32±1.41) mmol/(m²·d) in bivalves-kelp culture area, and 8.14 mmol/(m²·d) in cage culture area. The continuous 24 h observation showed that the average values of *p*CO₂ in kelp, bivalves and cage culture area were (320±14) μatm, (330±10) μatm, (413±37) μatm, respectively. The results showed that the Chl-*a* value was one of the key factors for the air-sea carbon-dioxide flux *F*, with significant differences in *F* value among different culture areas. The *F* value was negative in the bivalves, kelp and bivalves-kelp multi-culture areas, which means these areas 'sank' or absorbed the atmospheric CO₂. By contrast, *F* value in cage culture area was positive, which indicated that it was a 'source' or producer of the atmospheric CO₂.

Key words Sanggou Bay; Sea-air flux; *p*CO₂; Mariculture

① Corresponding author: ZHANG Jihong, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

黄河口海域夏季大型底栖动物的生态学特征*



李少文^{1①} 任中华² 王田田³

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 2. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 3. 烟台市水产研究所 烟台 264003)

摘要 根据 2012 年 6 月黄河口海域的大型底栖动物调查数据,应用典范对应分析等方法对大型底栖动物生态学特征进行分析。结果显示,在调查海域共采集到大型底栖动物 67 种,隶属于 6 门 53 科,多毛类 28 种,节肢动物 17 种,软体动物 16 种,棘皮动物和其他类群各 3 种。优势种有 3 种,为无尾连虫(*Leucon* sp.)、丝异须虫(*Heteromastus filiformis*)和寡节甘吻沙蚕(*Glycinde gurjanovae*)。调查海域的生物量和栖息密度的平均值分别为 2.03 g/m² 和 358 ind./m²。物种多样性指数变化范围为 1.825–3.976; 种类丰富度指数为 0.775–4.052; 物种均匀度指数为 0.637–0.924。群落结构多元统计分析和典范对应分析表明,18 个调查站位可分为 3 组, I 组(C4、D4 站位),群落组成为长尾虫(*Apsuedes* sp.)、日本鳞缘蛇尾(*Ophiophragmus japonicus*)、钩虾 1 种(*Gammaridea* sp.), 它们的分布与水深、水温、盐度呈正相关; III 组(C1、B1 站位)为丝异须虫、背蚓虫(*Notomastus latericeus*)群落,与氨氮、硝酸盐、总氮和溶解氧呈正相关; 其余站位为 II 组,为寡节甘吻沙蚕、江户明樱蛤(*Moerella jedoensis*)、无尾连虫群落,与各环境因子不相关。ABC 曲线分析显示出黄河口海域的大型底栖动物群落倾向于受到中等程度的干扰。环境因子中,水深与大型底栖动物丰度分布相关性最高,其次为氨氮。

关键词 黄河口海域; 大型底栖动物; 群落结构; 环境因子; 典范对应分析
中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0009-09

黄河口海域是陆地海洋交汇的过渡带,受到人类活动和自然界的三重影响,生态系统较脆弱。大型底栖动物是黄河口海域生态系统的重要组成部分,它们参与生物地球化学循环,维持生态系统的结构功能,是监测生态系统变化的重要研究对象(Graf *et al.*, 1997; Heip *et al.*, 2001; 田胜燕等, 2009)。

国内对于黄河口大型底栖动物的研究基本集中于潮间带、滩涂湿地等区域,涉及到群落结构、多样

性(夏江宝等, 2009; 李佳芮, 2011¹⁾; 董贯仓等, 2012; 冷宇等, 2013a、b)、次级生产力(姚晓, 2010²⁾; 王志忠等, 2012)等诸多方面,但关于黄河口近海海域大型底栖动物的生态学研究鲜见。本研究以 2012 年夏季黄河口海域的大型底栖动物和环境调查资料为基础,阐述了大型底栖动物的生态学特征,分析了其与黄河口海域环境因子的关系,以期对黄河口海域生态系统的深入研究和保护提供依据。

* 国家海洋公益性行业科研专项(201405010)和“泰山学者”岗位基金项目(TS200651036)共同资助[This work was supported by National Special Fund for Ocean-Scientific Research in the Public Interest(201405010) and Taishan Scholars Fund(TS200651036)]

① 通讯作者: 李少文, 助理研究员, E-mail: lswyt2002@163.com

收稿日期: 2016-07-11, 收修改稿日期: 2016-09-30

1) Li JR. Macrobenthic ecology of the intertidal zones of Yellow River delta. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 [李佳芮. 黄河三角洲潮间带大型底栖生物生态学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011]

2) Yao X. Study on the benthic productivities in the southern intertidal area of the Yellow River Delta. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [姚晓. 黄河三角洲南部潮间带底栖生产力研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]

1 研究海域与方法

1.1 调查海域及站位布设

2012年6月调水调沙前对黄河口海域的18个站位进行了调查,调查范围为 $37^{\circ}40' - 38^{\circ}09'N$, $119^{\circ}00' - 119^{\circ}40'E$ (图1)。距黄河入海口由近及远设置4个断面,Ⅰ断面(B1、C1、D1站)距离入海口5 km,Ⅱ断面(A2、B2、C2、D2、E2站)距离入海口10 km,Ⅲ断面(A3、B3、C3、D3、E3站)距离入海口20 km,Ⅳ断面(A4、B4、C4、D4、E4站)距离入海口40 km。

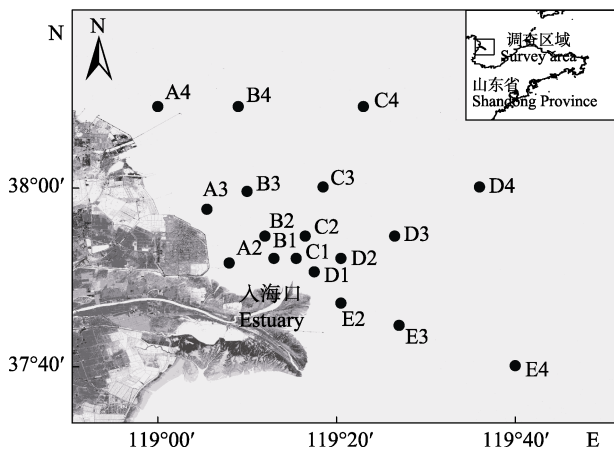


图1 黄河口调查站位

Fig.1 Sampling stations at the Yellow River Estuary

1.2 样品采集与处理

使用 0.05 m^2 的抓斗采泥器,每个站位采样4次,使用 0.5 mm 的套筛现场冲洗后用5%的甲醛溶液固定,在实验室进行分类鉴定。

同步测定站位水深(DEP)及底层水体的温度(TEM)、盐度(SAL)、pH值、悬浮物(SS)、溶解氧(DO)、化学需氧量(COD)、总氮(TN)、总磷(TP)、活性磷酸盐(DIP),包括硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)、亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)和氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)。采样和室内分析方法按《海洋调查规范》(GB/T 12763.9-2007)进行。

1.3 数据处理

1.3.1 生态优势度 计算 Pinkas 相对重要性指数(IRI)以确定物种在群落中的重要性(Pinkas *et al.*, 1971)。

$$\text{IRI} = (W_i + N_i) \times F_i \times 10^4$$

式中, W_i 为第 i 种底栖动物的重量在总样品重量中所占的百分比, N_i 为第 i 种底栖动物的个体数在总样品个体数中所占的百分比, F_i 为第 i 种底栖动物在取样站位的出现率。将 $\text{IRI} > 1000$ 的物种定义为优势种。

1.3.2 多样性指数 根据黄河口海域大型底栖动物群落的特点及取样数据,采用以下公式进行多样性分析(Margalef, 1957; Wilhm, 1968):

Margalef 种类丰富度指数

$$d = \frac{S-1}{\log_2 N} \quad (1)$$

Shannon-Wiener 多样性指数

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

Pielou 均匀度指数

$$J = \frac{H'}{\log_2 S} \quad (3)$$

式中, d 为种类丰富度指数, H' 为 Shannon-Wiener 多样性指数, J 为 Pielou 均匀度指数, S 为采泥样品中的种类总数, N 为采泥样品中所有种类的总个体数, P_i 为第 i 种的个体数与样品中的总个数的比值。

1.3.3 群落结构 采用非参数多变量分析群落结构,对各站位大型底栖动物的栖息密度进行4次方根转换,选择至少在2个或2个以上位点出现,至少1个站位的相对丰度 $\geq 1\%$ 的属种用于分析(王宗兴等, 2012),根据群落 Bray-Curtis 相似性系数,采用等级聚类的方法和非度量多维标度(NMDS)的排序方法分析调查站位的大型底栖动物结构特征(Clarke *et al.*, 2001; Field *et al.*, 1982)。

1.3.4 ABC 曲线 采用丰度/生物量比较曲线(ABC曲线)来分析群落的受干扰情况,用 W 统计量作为 ABC 曲线法的一个统计量,其公式为:

$$W = \sum_{i=1}^S \frac{(B_i - A_i)}{50(S-1)}$$

式中, B_i 和 A_i 为 ABC 曲线中种类序号对应的生物量和数量的累积百分比, S 为出现的种类数(Warwick, 1986; Clarke *et al.*, 2001)。

1.3.5 与环境因子相关分析 使用 Canoco for Windows 4.5 对大型底栖动物的丰度与环境因子间的关系进行典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)(TerBraak, 1987)。排除 $\text{IRI} \leq 10$ 的物种以减少干扰(廖一波等, 2011),物种和环境数据进行 $\lg(x+1)$ 转换,避免不同指标单位造成的统计偏差(Flores *et al.*, 1998)。

2 结果与分析

2.1 种类、数量组成和优势种

经过分析鉴定,调查海域共采到大型底栖动物67种,隶属于6门53科。其中,多毛类种数最多,为28种,占41.79%;节肢动物为17种,占25.37%;

软体动物为 16 种, 占 23.88%; 棘皮动物和其他类群各 3 种, 占 4.48%。各类群生物量和栖息密度占比情况见表 1。

该海域生物量和栖息密度的平均值分别为 2.03 g/m² 和 358 ind./m²; 以 C1-C4 站为中线, 调查海域的东侧生物量和栖息密度总体要高于西侧; 从 I-IV 断面生物量和栖息密度表现出先增后减的变化趋势, 在 D3 站位附近生物量和栖息密度均出现峰值(图 2)。

调查海域大型底栖动物优势种有 3 种, 为无尾涟虫(*Leucon* sp.)、丝异须虫(*Heteromastus filiformis*)和寡节甘吻沙蚕(*Glycinde gurjanovae*), 优势种占本次调查大型底栖动物质量的 7.49%, 数量的 42.22%; 重要种有 16 种, 分别是江户明樱蛤(*Moerella jedoensis*)、纵沟纽虫(*Lineus* sp.)、昆士兰稚齿虫(*Prionospio queenslandica*)等, 常见种和少见种分别为 16 种和 32 种。

2.2 多样性指数

调查海域的种类丰富度指数 d 平均值为 2.643, 最高值出现在 D3 站, 最低值出现在 B1 站; 物种多样性指数 H' 平均值为 3.078, 以 E3 站最高, B1 站最低; 物种均匀度指数 J 平均值为 0.793, A3 站最高, D3 站最低(表 2)。

表 1 黄河口海域大型底栖动物各类群占比
Tab.1 Proportion of each group of macrobenthos at the Yellow River Estuary (%)

类群 Group	生物量 Biomass	栖息密度 Abundance
多毛类 Polychaeta	47.13	49.91
软体动物 Mollusca	24.86	11.16
节肢动物 Arthropoda	16.92	35.34
棘皮动物 Echinodermata	1.19	1.92
其他类 Others	9.89	1.67

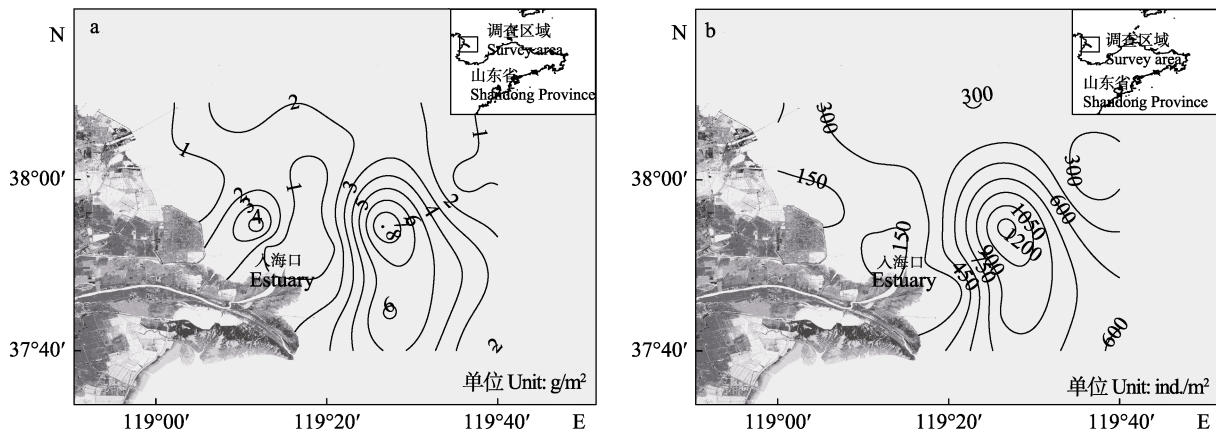


图 2 黄河口海域大型底栖动物的生物量(a)和栖息密度(b)分布
Fig.2 Biomass (a) and abundance (b) distribution of macrobenthos at the Yellow River Estuary

表 2 黄河口海域大型底栖动物多样性指数
Tab.2 Diversity indices of macrobenthos at the Yellow River Estuary

站位 Station	丰富度指数 d	多样性指数 H'	均匀度指数 J	站位 Station	丰富度指数 d	多样性指数 H'	均匀度指数 J
A2	2.652	3.022	0.774	C3	2.548	3.144	0.786
A3	2.799	3.518	0.924	C4	3.523	3.805	0.866
A4	2.867	3.384	0.866	D1	2.254	2.550	0.670
B1	0.775	1.825	0.913	D2	2.059	2.817	0.740
B2	3.081	3.454	0.845	D3	4.052	3.125	0.637
B3	3.456	3.546	0.820	D4	1.874	2.229	0.644
B4	2.464	3.233	0.808	E2	3.350	3.743	0.898
C1	1.166	1.835	0.654	E3	3.768	3.976	0.836
C2	1.895	2.870	0.830	E4	2.993	3.323	0.769

2.3 群落聚类分析

对各站位大型底栖动物群落结构进行聚类分析见图 3。从图 3 可以看出, 在 30% 的相似水平上可将 18 个站位分为 3 组, 其中, C4、D4 站为 I 组, 群落

组成为长尾虫(*Apseudes* sp.)、日本鳞缘蛇尾(*Ophiophragmus japonicus*)、钩虾 1 种(*Gammaridea* sp.); C1、B1 站为 III 组, 为丝异须虫、背蚓虫(*Notomastus latericeus*)群落; 其余站位为 II 组, 为寡

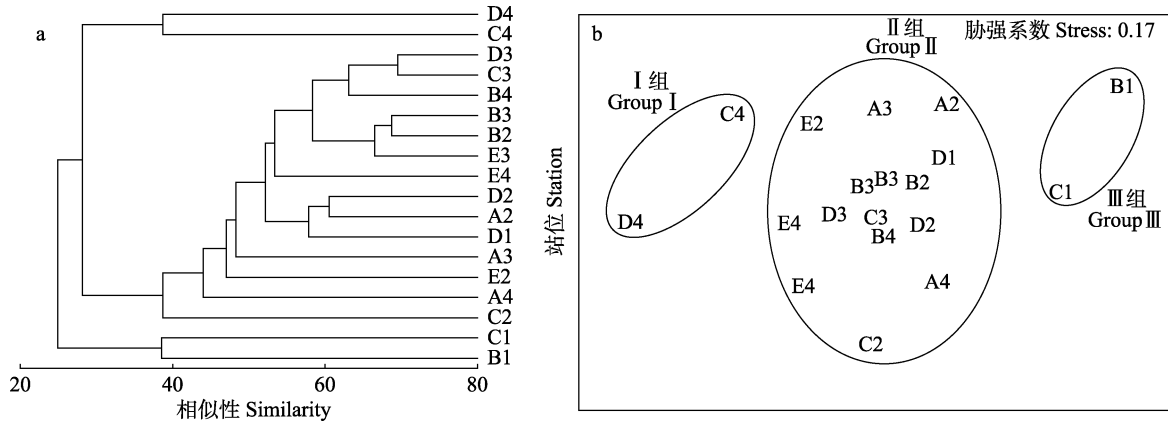


图 3 黄河口海域大型底栖动物聚类树枝图(a)和 MDS(b)排序分析
 Fig.3 Cluster(a) and MDS(b) analysis of macrobenthos at the Yellow River Estuary

节甘吻沙蚕、江户明樱蛤、无尾涟虫群落。多维排序尺度方法(MDS)分析图中胁强系数 $Stress=0.17 < 0.2$ ，表示分析结果有一定的解释意义。

2.4 ABC 曲线分析

根据调查海域大型底栖动物的丰度和生物量绘制 ABC 曲线见图 4。从图 4 可以看出，丰度和生物量曲线重叠相交，表明黄河口海域的大型底栖动物群落倾向于受到中等程度的扰动。

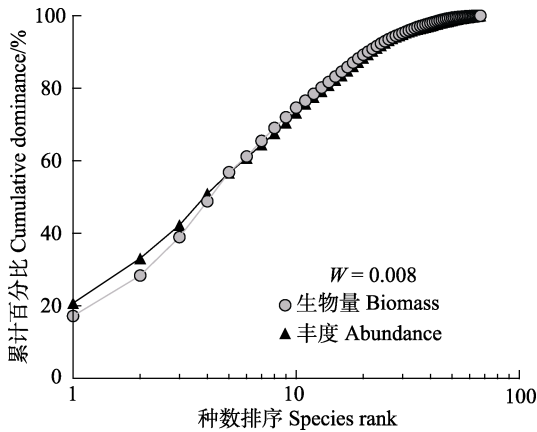


图 4 黄河口海域大型底栖动物 ABC 曲线
 Fig.4 ABC curve of macrobenthos at the Yellow River Estuary

2.5 CCA 排序分析

对黄河口海域的大型底栖动物种类数据进行筛选后得到 34 种，对其进行编号(表 3)。经 DCA 分析，前 2 个排序轴的特征值分别为 0.264 和 0.151，4 个轴分布的最大梯度长度为 3.324，说明可以采用单峰模型的典范对应分析(CCA)进行排序。

CCA 排序结果前 2 轴与物种和环境因子的相关系数分别达到 0.960 和 0.984，所有排序轴对物种和环境因子关系的累积贡献率达到 57.2%(图 5)。水深

与第 1 排序轴相关性最高($r=0.590$)，其次为氨氮($r=-0.427$)；盐度与第 2 排序轴相关性最高($r=0.588$)，其次为水温($r=-0.349$)。

由图 5 可以看出，I 组出现的优势种类有长尾虫、钩虾 1 种和日本鳞缘蛇尾，它们集中分布在第 1 排序轴右侧，说明这些种类与水深、水温、盐度呈正相关；II 组出现的优势种类有无尾涟虫、江户明樱蛤、寡节甘吻沙蚕，分布在第 1 排序轴的左侧靠近中心区域，这些种类与各环境因子的相关性不明显；III 组的优势种类丝异须虫、背蚓虫分布在第 1 排序轴左侧，与氨氮、硝酸盐、总氮和溶解氧呈正相关性。

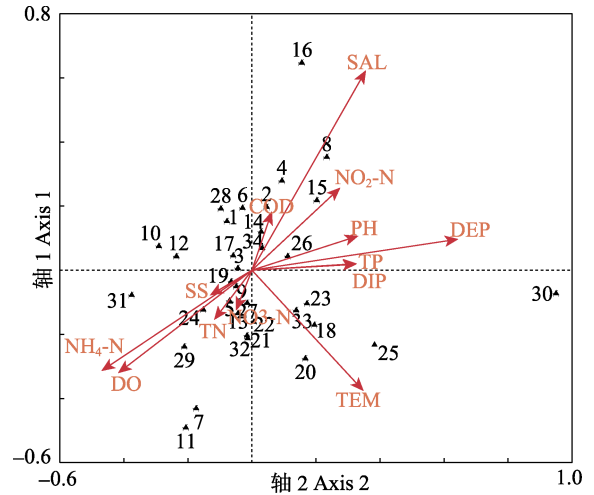


图 5 黄河口海域大型底栖动物与环境因子关系的 CCA 排序
 Fig.5 CCA ordination of the relationships between macrobenthos and environmental factors at the Yellow River Estuary

SAL: 盐度; DEP: 水深; COD: 化学需氧量;
 DO: 溶解氧; NH₄-N: 氨氮; NO₂-N: 亚硝酸盐;
 NO₃-N: 硝酸盐; DIP: 无机磷; TP: 总磷;
 TN: 总氮; SS: 悬浮物; TEM: 水温; pH: 酸碱度

表 3 黄河口海域主要大型底栖动物种名录
Tab.3 List of main macrobenthos species at the Yellow River Estuary

编号 Number	种类 Species	站位 Station																	
		B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E2	A3	B3	C3	D3	E3	A4	B4	C4	D4	E4
多毛类 Polychaeta																			
1	巴氏钩毛虫 <i>Sigambra bassi</i>	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+		
2	独指虫 <i>Aricidea fragilis</i>				+			+		+		+	+		+	+			+
3	寡节甘吻沙蚕 <i>G. gurjanovae</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	寡鳃齿吻沙蚕 <i>Nephtys oligobranchia</i>			+					+			+				+	+		
5	昆士兰稚齿虫 <i>P. queenslandica</i>			+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+
6	花索沙蚕 <i>Arabella iricolor</i>		+			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7	异足索沙蚕 <i>Lumbrineris heteropoda</i>					+	+						+						
8	拟特须虫 <i>Paralacydonia paradoxa</i>										+	+	+		+	+	+		+
9	乳突半突虫 <i>Phyllodoce papillosa</i>		+	+	+			+			+	+	+	+		+			+
10	背蚓虫 <i>N. latericeus</i>	+	+	+	+	+					+		+		+				
11	丝鳃虫 <i>Cirratulus cirratus</i>						+	+					+						+
12	丝异须虫 <i>H. filiformis</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			
13	小头虫 <i>Capitella capitata</i>	+		+		+		+	+		+		+						+
14	狭细蛇潜虫 <i>Ophiodromus angutifrons</i>					+						+	+	+					
15	不倒翁虫 <i>Sternaspis sculata</i>										+	+	+			+			
16	日本长手沙蚕 <i>Magelona japonica</i>				+										+		+		
17	长吻沙蚕 <i>Glycera chirori</i>				+				+			+							
软体动物 Mollusca																			
18	扁玉螺 <i>Neverita didyma</i>								+	+	+		+	+				+	+
19	江户明樱蛤 <i>M. jodoensis</i>			+	+			+	+	+	+	+	+	+		+			+
20	小亮樱蛤 <i>Nitidotellina minuta</i>								+		+		+						+
21	微小海螂 <i>Leptomya minuta</i>							+				+	+						
22	锐齿缘壳蛞蝓 <i>Vokoyamaia acutangula</i>								+				+	+					
23	紫壳阿文蛤 <i>Alvenius ojanus</i>											+	+	+					+
24	纵肋织纹螺 <i>Nassarius variciferus</i>								+		+								
节肢动物 Arthropoda																			
25	英高虫 Ingolfiellidae					+			+		+		+		+			+	+
26	钩虾 1 种 <i>Gammaridea</i> sp.			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	无尾涟虫 <i>Leucon</i> sp.			+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+
28	细长涟虫 <i>Iphinoe tenera</i>			+		+				+		+	+		+	+			

续表 3

编号 Number	种类 Species	站位 Station																			
		B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2	E2	A3	B3	C3	D3	E3	A4	B4	C4	D4	E4		
29	亚洲异针尾涟虫 <i>Dimorphostylis asiatica</i>			+			+		+				+								
30	长尾虫 <i>Apseudes</i> sp.																	+	+	+	
31	长额超刺糠虾 <i>Hyperacanthomysis longirostris</i>			+			+			+											
32	细螯虾 <i>Leptocheila gracilis</i> 棘皮动物 Echinodermata	+					+							+						+	
33	日本鳞缘蛇尾 <i>O. japonicus</i> 纽形动物 Nemertean																				+
34	纵沟纽虫 <i>Lineus</i> sp.				+	+		+		+	+	+	+	+	+			+			+

3 讨论

3.1 群落时空分布

结合历史调查资料,在相同的采样条件下,2004–2009年黄河口海域调查大型底栖动物生物量平均值为 8.74 g/m²,栖息密度平均值为 260 ind./m²(冷宇等,2013a),本次调查栖息密度高于历史调查值,而生物量却低于历史调查值,可以推测黄河口海域大型底栖动物种群总体可能向小个体种类演变。

从空间尺度上看,根据调查结果可以发现,调查海域大型底栖动物的生物量、栖息密度以及生物多样性指数的高值区域都出现在Ⅲ断面的东侧海域,而低值区域则出现在黄河入海口周围。形成这种分布格局的原因可能是入海口处直接受河水和泥沙扰动,生态环境较复杂,而远离河口处的海域环境较为稳定,所以大型底栖动物群落结构也相对稳定。刘录三等(2008)在研究辽东湾北部海域大型底栖动物时发现,辽河、双台子河等河流携带大量陆源污染物入海,这些污染物会对河口的底栖生物产生抑制作用;王瑜等(2010)研究渤海湾近岸海域底栖动物群落时发现,位于海河口附近站位的底栖动物群落组成受到了限制,而位于流速低、颗粒沉降快、含沙量高的远河口站位由于生境适宜,大型底栖动物种类数量丰富,上述研究报告与本研究结果是一致的。

3.2 多样性

Shannon-Wiener 多样性指数常用来监测淡水、海水底栖动物群落结构的变化,是一个较好的评价工具(李永祺等,1991)。Chainho 等(2007)提出的多样性指数合理范围,黄河口海域大型底栖动物的物种多样性指数为“好(3.0–4.0)”。多样性的低值区域为河口的

B1 和 C1 站位,级别为“差(1.0–2.0)”,2 个站位出现的种类数分别为 5 种和 7 种,其原因可能是河口存在盐度梯度和其他物理化学因子的变化,仅有少数生物能够适应和忍受生存条件的快速变化,最终导致河口海域相对较低的生物多样性(Miller *et al.*, 1985; 沈国英等,2010)。多样性指数的高值区域分布在远离河口的海域,多数站位级别为“好”,推测原因有两点,其一,离河口较远的海域受扰动相对较小;其二,黄河会携带大量营养物质入海,这些营养物质可能扩散一定的距离后才会沉淀,这种营养物质的输移对于维系黄河口海域的生物多样性水平和生态系统稳定性有非常重要的作用(张敬怀,2014)。

3.3 优势种及其与环境因子的关系

根据以往的调查资料,20 世纪 80–90 年代黄河口底栖动物占据优势的种类是棘皮动物和软体动物(张志南等,1990),本次调查发现,大型底栖动物多毛类占比最大,优势种为小型个体的寡节甘吻沙蚕和丝异须虫,棘皮动物所占比重最小,且重要种也鲜见大个体底栖动物。据何明海等(1988)对厦门西港底栖生物的研究报道,棘皮动物数量减少甚至绝迹,多毛类机会种大量繁殖,这是底栖动物群落对于环境污染或人为扰动做出的反应,这种变化与莱州湾大型底栖动物的种类组成变化是相同的(李少文等,2013)。

本次调查发现,各采样站位无机氮均达Ⅳ类海水水质标准(GB3097-1997《海水水质标准》),B2、B3 和 D2 站位劣于Ⅳ类海水水质标准,可见黄河口海域无机氮水平较高。Pearson 等(1978)早在 20 世纪 70 年代就提出,多毛类机会种(如丝异须虫、小头虫等)在环境受到污染或人为扰动后可以迅速增殖,可作为环境扰动的指示生物。本研究的排序分析结果显

示, 优势种丝异须虫与氨氮、硝酸盐呈正相关性; 此外, ABC 曲线显示, 丰度和生物量曲线重叠相交, 说明黄河口海域的大型底栖动物群落倾向于受到中等程度的干扰。

黄河调水调沙也是长期影响黄河口海域大型底栖动物群落的重要因素。调水调沙的时间一般在每年 6 月中下旬, 历时 20 d, 这个时间是各种海洋生物的生长繁殖季节, 尤其是浮游生物的大量繁殖, 可以为大型底栖动物提供充足的食物来源。而黄河口海域每年受调水调沙带来的大量水沙和上游物质影响, 其水环境和沉积物环境可能发生一定程度的改变, 这种改变具有延滞效应, 需要长期监测才能发现其作用规律(李少文等, 2015)。

参 考 文 献

- Chainho P, Costa JL, Chaves ML, *et al.* Influence of seasonal variability in benthic invertebrate community structure on the use of biotic indices to assess the ecological status of a Portuguese estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(10): 1586–1597
- Clarke KR, Warwick RM. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation (2nd edition). Plymouth, UK: PRIMER-E Ltd., 2001
- Dong GC, Li XQ, Liu F, *et al.* Community characteristics of macrozoobenthos and environmental quality assessment in intertidal zone of the Huanghe Delta. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(3): 370–374 [董贯仓, 李秀启, 刘峰, 等. 黄河三角洲潮间带底栖动物群落结构分析及环境质量评价. *海洋环境科学*, 2012, 31(3): 370–374]
- Field JG, Clarke KR, Warwick RM. A practical strategy for analysing multispecies distribution patterns. *Marine Ecology Progress Series*, 1982, 8(1): 37–52
- Flores LN, Barone R. Phytoplankton dynamics in two reservoirs with different trophic state (Lake Rosamarina and Lake Arancio, Sicily, Italy). In: Alvarez-Cobelas M, Reynolds CS, Sánchez-Castillo P, *et al.* (eds). *Phytoplankton and trophic gradients. Developments in Hydrobiology*, vol 129. Dordrecht: Springer, 1998
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Specification of oceanographic survey—Part 9: Guidelines for marine ecological survey (GB/T12763.9-2007), 2007 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范第 9 部分: 海洋生态调查指南 (GB/T12763.9-2007), 2007]
- Graf G, Rosenberg R. Bioresuspension and biodeposition: A review. *Journal of Marine Systems*, 1997, 11(3–4): 269–278
- He MH, Cai EX, Wu QQ, *et al.* Ecology of benthos in west harbour of Xiamen. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1988, 7(2): 189–194 [何明海, 蔡尔西, 吴启泉, 等. 厦门西港底栖生物的生态. *台湾海峡*, 1988, 7(2): 189–194]
- Heip CHR, Duineveld G, Flach E, *et al.* The role of the benthic biota in sedimentary metabolism and sediment-water exchange processes in the Goban Spur area (NE Atlantic). *DeepSea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2001, 48(14–15): 3223–3243
- Leng Y, Liu YT, DU M, *et al.* Temporal and spatial variation of macrofaunal communities in the Estuary of Yellow River during spring of 2004–2009. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013a, 35(6): 128–139 [冷宇, 刘一霆, 杜明, 等. 黄河口海域 2004–2009 年春季大型底栖动物群落的时空变化. *海洋学报*, 2013a, 35(6): 128–139]
- Leng Y, Liu YT, Liu S, *et al.* Community structure and diversity of macrobenthos in southern intertidal zone of Yellow River Delta, China. *Chinese Journal of Ecology*, 2013b, 32(11): 3054–3062 [冷宇, 刘一霆, 刘霜, 等. 黄河三角洲南部潮间带大型底栖动物群落结构及多样性. *生态学杂志*, 2013b, 32(11): 3054–3062]
- Li SW, Liu YJ, Li F, *et al.* Macrobenthic functional groups in Laizhou Bay, East China. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(2): 380–388 [李少文, 刘元进, 李凡, 等. 莱州湾大型底栖动物功能群现状. *生态学杂志*, 2013, 32(2): 380–388]
- Li SW, Zhang Y, Li F, *et al.* Effects of water and sediment discharge regulation on macrobenthic community in the Yellow River Estuary. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(2): 259–266 [李少文, 张莹, 李凡, 等. 调水调沙对黄河口海域大型底栖动物群落的影响. *环境科学研究*, 2015, 28(2): 259–266]
- Li YQ, Ding ML. *Marine pollution biology*. Beijing: Ocean Press, 1991 [李永祺, 丁美丽. *海洋污染生物学*. 北京: 海洋出版社, 1991]
- Liao YB, Shou L, Zeng JN, *et al.* Spatiotemporal distribution of macrobenthic communities and its relationships with environmental factors in Sanmen Bay. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(9): 2424–2430 [廖一波, 寿鹿, 曾江宁, 等. 三门湾大型底栖动物时空分布及其与环境因子的关系. *应用生态学报*, 2011, 22(9): 2424–2430]
- Liu LS, Meng W, Zheng BH, *et al.* Studies on macrobenthos in the northern waters of Liaodong Bay: I. species composition and number distribution. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(6): 118–123 [刘录三, 孟伟, 郑丙辉, 等. 辽东湾北部海域大型底栖动物研究: I. 种类组成与数量分布. *环境科学研究*, 2008, 21(6): 118–123]
- Margalef R. Information theory in ecology. *General Systems*, 1958, 3: 36–71
- Miller JM, Crowder LB, Moser ML. Migration and utilization of estuarine nurseries by juvenile fishes: An evolutionary perspective. *Contributions in Marine Science*, 1985, 27:

- 338–352
- Pearson TH, Rosenberg R. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 1978(16): 229–231
- Pinkas L, Oliphant MS, Iverson ILK. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California waters. *Fishery Bulletin*, 1971(152): 1–105
- Shen GY, Huang LF, Guo F, *et al.* *Marine ecology*, 3rd edn. Beijing: Science Press, 2010 [沈国英, 黄凌风, 郭丰, 等. 海洋生态学(第三版). 北京: 科学出版社, 2010]
- State Environmental Protection Administration. Sea water quality standard (GB3097-1997), 1997 [国家环境保护局. 海水水质标准(GB3097-1997), 1997]
- TerBraak CJF. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio*, 1987, 69(1–3): 69–77
- Tian SY, Zhang WL, Zhang R. Role of macrobenthos in marine ecosystem. *Journal of Salt and Chemical Industry*, 2009, 38(2): 50–54 [田胜艳, 张文亮, 张锐. 大型底栖动物在海洋生态系统中的作用. 盐业与化工, 2009, 38(2): 50–54]
- Wang Y, Liu LS, Liu CQ, *et al.* Community structure characteristics of macrobenthos in the coastal seawaters of Bohai Bay in spring. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(4): 430–436 [王瑜, 刘录三, 刘存歧, 等. 渤海湾近岸海域春季大型底栖动物群落特征. 环境科学研究, 2010, 23(4): 430–436]
- Wang ZX, Wei QS, Liu J, *et al.* Canonical correspondence analysis on macrobenthos community in summer and its environment in the offshore water of Rushan Bay. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18(4): 599–604 [王宗兴, 韦钦胜, 刘军, 等. 乳山湾外海夏季大型底栖动物分布与环境因子的典范对应分析. 应用与环境生物学报, 2012, 18(4): 599–604]
- Wang ZZ, Zhang JL, Chen SJ, *et al.* Community characteristics and secondary production of macrozoobenthos in intertidal zone of the Yellow River Estuary. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(5): 657–661 [王志忠, 张金路, 陈述江, 等. 黄河入海口潮间带大型底栖动物群落组成及次级生产力. 海洋环境科学, 2012, 31(5): 657–661]
- Warwick RM. A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. *Marine Biology*, 1986, 92(4): 557–562
- Wilhm JL. Use of biomass units in Shannon's formula. *Ecology*, 1968, 49(1): 153–156
- Xia JB, Li CR, Xu JW, *et al.* Quantitative characteristics of macrobenthos in the Yellow River Delta estuary. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(4): 1368–1373 [夏江宝, 李传荣, 许景伟, 等. 黄河三角洲滩涂区大型底栖动物群落数量特征. 生态环境学报, 2009, 18(4): 1368–1373]
- Zhang JH. The variation of biodiversity of macrobenthic fauna with salinity and water depth near the Pearl Estuary of the northern South China Sea. *Biodiversity Science*, 2014, 22(3): 302–310 [张敬怀. 珠江口及邻近海域大型底栖动物多样性随盐度、水深的变化趋势. 生物多样性, 2014, 22(3): 302–310]
- Zhang ZN, Tu LH, Yu ZS. Preliminary study on the macrofauna in the Huanghe River Estuary and its adjacent waters (I) the biomass. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1990, 20(1): 37–45 [张志南, 图立红, 于子山. 黄河口及其邻近海域大型底栖动物的初步研究. 青岛海洋大学学报, 1990, 20(1): 37–45]

(编辑 马瑾艳)

Ecological Characteristics of Macrobenthos at the Yellow River Estuary in Summer

LI Shaowen¹①, REN Zhonghua², WANG Tiantian³

(1. Shandong Marine and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006; 2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai 264003)

Abstract Based on the survey data at the Yellow River estuary in June 2012, the characteristics of macrobenthos were analyzed using canonical correspondence analysis and other methods. Sixty-seven species of macrobenthos were identified, which belonged to 6 phylums and 53 families. Among them, 28 species were crustacea; 17 were arthropods; 16 were mollusca; 3 were echinodermata; 3 belonged to other benthic groups. There were three dominant species including *Leucon* sp., *Heteromastus filiformis* and *Glycinde gurjanovae*. The average biomass and the habitat density were 2.03 g/m² and 358 ind./m², respectively. The ranges of Margalef species richness index, Shannon-Wiener diversity index and Pielou's evenness index were 0.775–4.052, 1.825–3.976, and 0.637–0.924, respectively. The results of MDS and CCA indicated that 18 stations could be divided into three groups. The community of Group I (C4, D4) was composed of *Apseudes* sp.-*Ophiophragmus japonicus*-*Gammaridea* sp., and their distribution were positively correlated with the water depth, water temperature and salinity. Group III (C1, B1) had *H. filiformis*-*Notomastus latericeus*, of which the distribution were positively correlated with ammonia, nitrate, total nitrogen and dissolved oxygen. Group II included all other stations, and it had *G. gurjanovae*-*Moerella jodoensis*-*Leucon* sp., and their distribution had no obvious relationship with environmental factors. ABC curving analysis showed that the macrobenthic community tend to be disturbed moderately. The depth and ammonia were the most and second most relevant factors in the distribution of abundance.

Key words Yellow River Estuary; Macrobenthos; Community structure; Environmental factors; Canonical correspondence analysis

① Corresponding author: LI Shaowen, E-mail: lswyt2002@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20161013001

http://www.yykxjz.cn/

秦皇岛近海增殖放流区牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)回捕群体的遗传多样性分析



司 飞¹ 孙朝徽¹ 于姗姗² 赵雅贤¹ 宋立民¹
王树亮³ 王青林^{1①} 姜秀凤¹ 王玉芬¹ 于清海¹

(1. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100; 2. 河北农业大学海洋学院 秦皇岛 066100;
3. 潍坊市海洋与渔业局 潍坊 261000)

摘要 本研究利用 12 对微卫星标记对秦皇岛近海增殖放流区内的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)回捕群体的遗传多样性进行分析,并与放流用牙鲆亲本群体和放流前群体的遗传多样性进行对比。结果显示,在 3 个群体中,等位基因数(N_a)为 11.917–22.167 个,平均观测杂合度(H_o)为 0.800–0.836,平均期望杂合度(H_e)为 0.814–0.845,平均多态信息含量(PIC)为 0.775–0.818。其中,回捕群体的平均 N_a 最多,为 22.167,放流前群体的平均 N_a 最少,为 11.917。平均 H_o 最大的是回捕群体(0.836),最小的是放流前群体(0.800)。平均 H_e 最大的是亲本群体(0.845),最小的是放流前群体(0.814)。在 36 个群体-位点组合中,有 23 个群体-位点组合显著偏离哈迪-温伯格平衡状态($P < 0.05$)。3 个群体的基因分化系数 G_{st} 值为 0.005–0.043,遗传分化均为较弱。研究表明,3 个群体均保持较高的遗传多样性,放流人工培育苗种对回捕群体的遗传多样性和遗传结构未产生明显的影响。

关键词 牙鲆; 回捕群体; 增殖放流; 遗传多样性

中图分类号 Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0018-07

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是渤海重要土著经济鱼类,其个体硕大、肉质细嫩鲜美,深受消费者喜爱。但由于掠夺式的捕捞和严重的近海污染等原因,牙鲆野生资源日渐枯竭。为了应对资源衰退,我国自 20 世纪 80 年代开始在渤海海域进行牙鲆的增殖放流活动(金显仕等, 2014)。秦皇岛近海增殖放流区位于河北省东北部近海,每年有数百万的牙鲆苗种被投放到该海域,是我国牙鲆增殖放流的主要区域之一。增殖放流活动在促进渔民增产增收和修复渔业种群资源方面起到了积极的作用,但大规模放流人工培育群体所引起的生态和遗传风险同样不能忽视(Araki *et al*,

2010; González-Wangüemert *et al*, 2012; Taranger *et al*, 2015)。

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分,它是衡量一个种群种质资源质量的重要标准,通过衡量生物所携带遗传信息的变异程度来反映遗传多样性的高低,由于 DNA 是遗传信息的载体,所以 DNA 的变化直接反应了物种遗传变异的程度(刘海金等, 2008; 姚韩韩, 2011¹⁾)。微卫星 DNA 分子标记,又称简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR),在基因组中数量众多且分布均匀,具有多态性丰富、杂合度高和检测方便等优点,已经广泛应用于群体遗传多样

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2013B01XK02)资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Science (2013B01XK02)]. 司 飞, E-mail: beyond702@163.com

① 通讯作者: 王青林, 副研究员, E-mail: wangqinglin_1984@163.com

收稿日期: 2016-10-13, 收修改稿日期: 2016-10-31

1) Yao HH. Studies on molecular genetic basis of wild and breeding populations in *Tegillarca granosa*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011, 70–90 [姚韩韩. 泥蚶野生群体与选育群体的分子遗传基础研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 70–90]

性的研究(Wang *et al.*, 2013)。至今, 利用微卫星 DNA 分子标记进行牙鲆遗传多样性及遗传结构分析报道较多, 主要集中在自然群体、养殖群体和繁育后代群体, 如马晓冰等(2012)和刘永新等(2013)分别用 18 对和 72 对微卫星分子标记对 90 尾和 74 尾野生牙鲆群体进行了遗传多样性分析; 刘海金等(2008)和邵长伟等(2009)分别利用 5 对和 16 对微卫星分子标记对 3 个和 5 个牙鲆养殖群体进行了遗传多样性分析; 徐田军等(2009)利用 10 对微卫星分子标记对由 3 个牙鲆基础群体组合交配建立的 4 个选择性繁育后代群体进行遗传多样性分析。但关于增殖放流对牙鲆回捕群体遗传多样性影响的研究还未见报道。本研究利用 12 对微卫星分子标记对秦皇岛近海增殖放流区内的牙鲆回捕群体的遗传多样性进行分析, 并与放流用牙鲆亲本和放流前群体的遗传多样性进行对比, 从分子遗传学角度对牙鲆增殖放流可能引起的遗传风险进行评估, 以期为我国牙鲆种质资源保护和增殖放流工作提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

共 3 个群体: 2015 年河北北戴河中心实验站放流用野生牙鲆亲鱼(以下简称亲本 M)、增殖放流前牙鲆幼鱼(以下简称放流前群体 P)及 2015 年禁渔期结束后从秦皇岛近海增殖放流区回捕的牙鲆幼鱼(以下简称回捕群体 C)。亲本群体及放流前群体各采集样本 30 尾。其中, 亲本 M 体重为(3675.22±1572.45) g, 体长为(81.66±12.38) cm; 放流前群体 P 体重为(1.59±1.06) g, 体长为(5.94±0.97) cm。回捕群体 C 分别从河北山海关、北戴河和昌黎码头收集, 每处采集样本 30 尾, 该群体体重为(55.84±48.65) g, 体长为(12.49±6.82) cm。剪取胸鳍平铺于采样纸上, 37℃烘干后保存。使用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP324)提取基因组 DNA。提取完成后, 采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别检测 DNA 的质量和浓度。

1.2 微卫星分析

从马晓冰等(2012)和刘永新等(2013)发表的 72 对牙鲆微卫星标记中选取 12 对多态性高的标记用于本研究。各标记的名称、引物序列、退火温度等见表 1, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μ l: dH₂O 7.4 μ l, 2×Es Taq MasterMix 10 μ l, 上下游引物(10 pmol/ μ l)各 0.3 μ l, DNA 模板 2 μ l。PCR

反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 54℃复性 35 s, 72℃延伸 40 s, 共 35 个循环; 最终 72℃延伸 3 min。PCR 扩增在 PE9700 型 PCR 仪上进行。将甲酰胺与分子量内标按 100 : 1 的体积比混匀后, 取 15 μ l 加入上样板中, 再加入 1 μ l 稀释 10 倍的 PCR 产物。然后使用 3730XL 测序仪进行毛细管电泳, 利用 Genemarker 中的 Fragment (Plant)片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析, 将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置进行比较分析, 得到片段大小。

1.3 数据分析

利用 Genepop 4.0 软件分析分型结果, 统计各位点等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC), 并分析群体的 Hardy-Weinberg 遗传平衡状态。计算群体间各群体的基因分化系数(G_{st})、基因流、遗传相似性系数(I 对角线下方)和 Nei 氏遗传距离。使用 MEGA 5.0 软件, 采用 UPGMA 方法根据 3 个群体的遗传距离进行聚类。

2 结果

2.1 遗传多样性分析

12 对微卫星标记的遗传多样性参数 N_a 、 H_o 、 H_e 、PIC 值列于表 2。从表 2 可以看出, 12 对微卫星标记在 3 个群体中的 PCR 扩增得到的平均 N_a 为 11.917–22.167 个, 平均 H_o 为 0.800–0.836, 平均 H_e 为 0.814–0.845, 平均 PIC 为 0.775–0.818。其中, 回捕群体 C 的平均 N_a 最多, 为 22.167, 放流前群体 P 的平均 N_a 最少, 为 11.917。平均 H_o 最大的是回捕群体 C (0.836), 最小的是放流前群体 P (0.800)。平均 H_e 最大的是亲本 M (0.845), 最小的是放流前群体 P (0.814)。哈迪-温伯格平衡检验结果显示, 在 36 个群体-位点组合中, 有 23 个群体-位点组合显著偏离哈迪-温伯格平衡状态($P < 0.05$)。在 3 个群体中偏离哈迪-温伯格平衡相对最少的是放流前群体 P, 仅在微卫星标记 *Poli1396TUF*、*8-D2* 和 *Poli1024TUF* 中显著偏离($P < 0.05$)。偏离哈迪-温伯格平衡相对最多的是回捕群体 C。

2.2 遗传分化

3 个群体各位点的基因分化系数 G_{st} 值为 0.005–0.043, 位点 *HLJYP90* 的基因分化系数 G_{st} 值最大(0.043), 位点 *Poli1408TUF* 的基因分化系数 G_{st} 值最小(0.005)。3 个群体各位点的基因流 N_m 值为 5.515–45.983(表 3)。位点 *Poli1408TUF* 的 N_m 值最大,

表 1 12 对微卫星标记的名称、重复序列、引物序列、退火温度及 GenBank 登录号

Tab.1 Loci, repeat motifs, primer sequences, annealing temperatures and GenBank accession numbers of 12 microsatellite markers

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>Poli1345TUF</i>	F: AATGGTGAGGAGCCAGATTG R: AGTGGGCGATGGAGATGTAG	60	DQ888920
<i>Poli1491TUF</i>	F: AGGGAGGGAACAAGCACTG R: TGATACCACGCTGTGTCGTC	60	DQ889053
<i>HLJYP90</i>	F: TTCTACACAAAACACCCGACT R: GAGCTTTGAGCAGTACCTGGAT	60	FJ915043
<i>Poli1124TUF</i>	F: CTAGAAGACGGACCCACGAG R: AACACAACATGGCAGCTGAG	60	EF112920
<i>Newpao202</i>	F: GTCCAGACCAGGACAGTGGT R: AGGCATGGCCCTACCTACAT	60	HQ528205
<i>Poli1396TUF</i>	F: ACATGTGACAGCTCGTGAGGC R: AGGATCACAGCCACAGTTTGGAC	60	DQ888961
<i>8-G3</i>	F: CCCTAAATCTTCTGCGTGGA R: AGGGAGGCAAGAGGAGAGAG	60	GQ421174
<i>8-D2</i>	F: CTGGTGGTGTGGAGTCACAT R: AAAGGGCTGAAAACCTGAGCA	60	GQ421181
<i>Poli1024TUF</i>	F: CACCAACTGGCCTTTGTTTT R: CCCACCACAACCTGGTCTTT	60	AB458916
<i>Poli1408TUF</i>	F: AGCAACAGCTCAGTATGGCAGTGTA R: TTCCAGAGGCCAGGGAGTT	60	DQ888973
<i>Poli1377TUF</i>	F: CCCTCGGGGATGAATAAAGT R: TGAGTGCATTCCATTTTCAG	60	DQ888946
<i>Poli866TUF</i>	F: TGTGTGCTCTTGCATGCTCT R: GAGCGATAGGGACTGTCAGG	57	EF112814

表 2 牙鲆不同群体的哈迪-温伯格平衡(HWE)检验及遗传多样性

Tab.2 The genetic diversity and HWE test of different populations of *P. olivaceus*

群体 Populations	位点 Loci	遗传参数 Genetic parameters					
		N_a	H_o	H_e	PIC	P	
亲本 M Brood stock	<i>Poli1345TUF</i>	29	0.967	0.942	0.930	0**	
	<i>Poli1491TUF</i>	7	0.717	0.732	0.681	0.215	
	<i>HLJYP90</i>	7	0.433	0.767	0.722	0**	
	<i>Poli1124TUF</i>	21	0.900	0.907	0.891	0**	
	<i>Newpao202</i>	21	0.900	0.879	0.860	0.004*	
	<i>Poli1396TUF</i>	8	0.817	0.791	0.754	0.516	
	<i>8-G3</i>	21	0.900	0.896	0.880	0**	
	<i>8-D2</i>	8	0.717	0.829	0.798	0.051	
	<i>Poli1024TUF</i>	20	0.867	0.888	0.870	0**	
	<i>Poli1408TUF</i>	6	0.617	0.619	0.565	0.009*	
	<i>Poli1377TUF</i>	36	0.917	0.941	0.930	0**	
	<i>Poli866TUF</i>	28	0.983	0.949	0.938	0**	
	平均值 Mean		17.667	0.811	0.845	0.818	
	放流前群体 P Pre-releasing population	<i>Poli1345TUF</i>	21	0.967	0.926	0.904	0.117
<i>Poli1491TUF</i>		6	0.667	0.737	0.681	0.590	
<i>HLJYP90</i>		6	0.567	0.740	0.681	0.118	
<i>Poli1124TUF</i>		13	0.933	0.897	0.871	0.287	

续表

群体 Population	位点 Loci	遗传参数 Genetic parameters				
		N_a	H_o	H_e	PIC	P
放流前群体 P Pre-releasing population	<i>Newpao202</i>	13	0.900	0.859	0.828	0.401
	<i>Poli1396TUF</i>	7	0.833	0.778	0.729	0**
	<i>8-G3</i>	16	0.833	0.893	0.868	0.118
	<i>8-D2</i>	5	0.567	0.764	0.715	0.003*
	<i>Poli1024TUF</i>	10	0.867	0.802	0.761	0.003*
	<i>Poli1408TUF</i>	5	0.600	0.535	0.482	0.992
	<i>Poli1377TUF</i>	23	0.967	0.933	0.912	0.574
	<i>Poli866TUF</i>	18	0.900	0.898	0.873	0.445
	平均值 Mean	11.917	0.800	0.814	0.775	
回捕群体 C Captured population	<i>Poli1345TUF</i>	41	0.965	0.952	0.944	0**
	<i>Poli1491TUF</i>	10	0.802	0.747	0.710	0**
	<i>HLJYP90</i>	9	0.419	0.730	0.676	0**
	<i>Poli1124TUF</i>	21	0.930	0.867	0.848	0.340
	<i>Newpao202</i>	20	0.872	0.869	0.851	0**
	<i>Poli1396TUF</i>	14	0.872	0.825	0.800	0**
	<i>8-G3</i>	29	0.907	0.887	0.873	0**
	<i>8-D2</i>	9	0.756	0.791	0.760	0**
	<i>Poli1024TUF</i>	28	0.849	0.865	0.850	0**
	<i>Poli1408TUF</i>	10	0.791	0.657	0.617	0**
	<i>Poli1377TUF</i>	40	0.895	0.924	0.914	0**
	<i>Poli866TUF</i>	35	0.977	0.936	0.927	0**
	平均值 Mean	22.167	0.836	0.838	0.814	
总计 Total	<i>Poli1345TUF</i>	46	0.966	0.958	0.954	
	<i>Poli1491TUF</i>	11	0.750	0.744	0.706	
	<i>HLJYP90</i>	10	0.449	0.774	0.736	
	<i>Poli1124TUF</i>	27	0.920	0.897	0.886	
	<i>Newpao202</i>	24	0.886	0.879	0.866	
	<i>Poli1396TUF</i>	16	0.847	0.807	0.781	
	<i>8-G3</i>	34	0.892	0.900	0.890	
	<i>8-D2</i>	10	0.710	0.809	0.783	
	<i>Poli1024TUF</i>	34	0.858	0.870	0.857	
	<i>Poli1408TUF</i>	10	0.699	0.622	0.579	
	<i>Poli1377TUF</i>	51	0.915	0.939	0.934	
	<i>Poli866TUF</i>	43	0.966	0.943	0.937	
	平均值 Mean	26.333	0.822	0.843	0.826	

注: N_a 为等位基因数, H_o 为观测杂合度, H_e 为期望杂合度, PIC 为多态信息含量, 哈迪-温伯格平衡检验经过 Bonferroni 校正, * 为显著偏离 ($P < 0.05$), ** 为极显著偏离 ($P < 0.01$)

Note: N_a : Number of alleles; H_o : Observed heterozygosity; H_e : Expected heterozygosity; PIC: Polymorphism information content. HWE test was corrected by Bonferroni, * Indicated significant difference ($P < 0.05$), ** Indicated highly significant difference ($P < 0.01$)

为 45.983, 位点 *HLJYP90* 的 N_m 值最小, 为 5.515。3 个群体相互间的遗传相似系数和 Nei 氏遗传距离分别为 0.848–0.941 和 0.061–0.164(表 4)。根据各群体

之间的遗传距离, 对 3 个群体进行聚类(图 1), 3 个群体主要分为两类, 放流前群体 P 和回捕群体 C 遗传距离较小, 首先聚类, 然后再与亲本 M 聚类。

表 3 牙鲈 3 个群体各位点的基因分化系数(G_{st})和基因流(N_m)Tab.3 The coefficient of gene differentiation (G_{st}) and gene flow (N_m) among three *P. olivaceus* populations

位点 Loci	G_{st}	N_m	位点 Loci	G_{st}	N_m
<i>Poli1345TUF</i>	0.023	10.491	8-G3	0.018	13.974
<i>Poli1491TUF</i>	0.011	21.983	8-D2	0.021	11.965
<i>HLJYP90</i>	0.043	5.515	<i>Poli1024TUF</i>	0.018	13.383
<i>Poli1124TUF</i>	0.019	13.139	<i>Poli1408TUF</i>	0.005	45.983
<i>Newpao202</i>	0.019	12.896	<i>Poli1377TUF</i>	0.017	14.106
<i>Poli1396TUF</i>	0.010	25.330	<i>Poli866TUF</i>	0.018	13.326
平均值 Mean	0.019	13.025			

表 4 牙鲈 3 个群体遗传相似性系数(I 对角线下方)和 Nei 氏遗传距离(D 对角线上方)Tab.4 The genetic identity (under the diagonal) and Nei's unbiased genetic distances (above the diagonal) of three *P. olivaceus* populations

群体 Populations	亲本 M Brood stock	放流前群体 P Pre-releasing population	回捕群体 C Captured population
亲本 M Brood stock	—	0.164	0.132
放流前群体 P Pre-releasing population	0.848	—	0.061
回捕群体 C Captured population	0.876	0.941	—

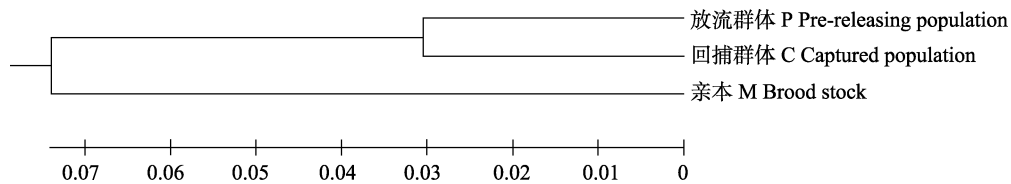


图 1 根据 Nei 氏遗传距离用 UPGMA 法构建的牙鲈 3 个群体的进化树

Fig.1 UPGMA dendrogram for three *P. olivaceus* populations based on Nei's unbiased genetic distances

3 讨论

牙鲈是黄渤海重要的增殖放流鱼类,北戴河中心实验站自2009年开始在秦皇岛近海增殖放流区进行牙鲈增殖放流活动,至今累计放流不同规格牙鲈苗种1300万尾。随着放流数量的增多,放流群体对固有群体遗传多样性的影响值得关注。鉴于此,本研究以秦皇岛近海增殖放流区域捕捞的牙鲈幼鱼为研究对象,分析回捕群体的遗传多样性,并与放流用牙鲈亲鱼和放流前群体的遗传多样性参数作对比分析。

多态信息含量(PIC)为衡量标记遗传信息含量高低的主要参数,当 $PIC > 0.5$ 时,表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性,即高度多态;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,表明该遗传标记能够较为合理地提供遗传信息,为中度多态;而当 $PIC < 0.25$ 时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差,为低度多态(McDonald *et al.*, 2003)。本研究中,除标记 *Poli1408TUF* 在放流前群体中的 PIC 值为 0.482 外,各标记的 PIC 范围为 0.565–

0.944,表明所选用的微卫星标记具有高度多态性,可以用于分析牙鲈群体的遗传多样性。各标记在 3 个群体中的平均 N_a 范围为 11.917–22.167,其中,回捕群体的 N_a 最高(22.167),说明这 3 个群体的遗传信息含量都比较丰富,且回捕群体的多态性水平要高于其他群体。马晓冰等(2012)和刘永新等(2014)分别于 2009 年和 2012 年对秦皇岛附近海域牙鲈自然群体的等位基因数进行研究,结果分别为 8.9 和 6.789,均低于本研究结果(17.667)。这说明,作为国家级牙鲈良种场,我站每年春季从秦皇岛海域捕捞野生牙鲈对放流用牙鲈亲本群体进行补充更换,确保了放流牙鲈亲本群体遗传多样性的丰富度。

杂合度包括观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e),是反映微卫星标记在群体中遗传变异程度的最优参数,是描述遗传多样性的最适参数,杂合度越高,表明群体内遗传多样性就越高,遗传变异程度就越大,反之则群体内遗传变异程度就小(Nei *et al.*, 1975)。本研究 H_e 在 3 个群体中的范围为 0.814–0.845,亲本群

体最高(0.845), 放流前群体最低(0.814)(表 2)。放流前群体 H_e 低于亲本群体的主要原因是并非所有的亲鱼都参与繁殖活动。之前的研究表明, 牙鲆亲本对后代的贡献率严重失衡(Hara *et al.*, 2006; 陈睿毅等, 2013), 存在有效亲本群体比实际群体小的问题, 且后代仅来自少数几尾亲本。生产上为了克服这个问题, 常用的方法是增加繁殖亲本的数量。此外, 生殖细胞移植技术在水产动物方面的发展应用为解决这个问题提供了新的方法(Lacerda *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016)。回捕群体 C 的 H_e 值为 0.838, 远高于邵长伟等(2009)研究中的养殖群体, 略低于野生群体(马晓冰等, 2012), 说明秦皇岛近海增殖放流区的人工放流活动未引起明显的遗传风险。

基因分化系数(G_{st})是反映群体间遗传分化程度的重要参数。一般认为, G_{st} 值在 0–0.05 之间时, 群体的遗传分化较弱, 为轻度遗传分化; G_{st} 值在 0.05–0.15 之间时, 遗传分化水平中等; G_{st} 值大于 0.15 时, 遗传分化较大(Balloux *et al.*, 2002)。本研究中, 牙鲆 3 个群体不同位点的遗传分化系数 G_{st} 值为 0.005–0.043, 3 个群体之间表现为轻度分化水平, 遗传分化均为较弱。不同群体之间遗传分化系数平均值为 0.019, 说明 3 个群体的变异中约有 1.9%是由不同群体之间的基因变异引起的, 而 98.1%的变异来源于群体内。检验结果表明, 亲本群体 M 和回捕群体 C 微卫星位点偏离哈迪-温伯格平衡较多, 其中, 亲本群体 M 多数表现出显著的杂合子缺失, 回捕群体 C 多数表现为显著的杂合子过剩。基因流是指一些个体从一个群体迁移到另一个群体时把某些基因带到新的群体, 从而产生的基因流动(曲若竹等, 2004)。基因流与基因分化系数呈负相关, 即基因流越大, 群体间相似性越大, 遗传分化越小(曲若竹等, 2004; 刘海金等, 2008)。本研究各位点基因流较大($N_m > 5$), 说明 3 个群体间遗传分化较小, 足以抵抗遗传漂变, 与本研究中基因分化系数相关结果相互支持。

遗传多样性和遗传结构是种群繁衍生息的重要原因, 遗传多样性降低可能导致种群生长缓慢、个体变小、性成熟提早、抗病力下降等不良影响(黎中宝等, 2009; 李树华, 2014¹⁾)。本研究中, 亲本群体 M 与回捕群体 C 较高的遗传多样性水平说明秦皇岛附近海域牙鲆资源在增殖放流活动的实施下, 其遗传多样性得到了有效的保护, 进而说明, 保持放流亲本群体较

高的遗传多样性, 对有效提高资源量修复水平有促进作用, 对渔业资源及生态平衡保护有重要意义。

参 考 文 献

- Araki H, Schmid C. Is hatchery stocking a help or harm?: Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, 2010, 308(S1): 2–11
- Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 155–165
- Chen RY, Wang GX, Liu HJ, *et al.* Difference in parental contribution to reproduction in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fishery Science of China*, 2013, 20(4): 698–705 [陈睿毅, 王桂兴, 刘海金, 等. 牙鲆亲本对子代贡献率的实验研究. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 698–705]
- González-Wangüemert M, Fernández TV, Pérez-Ruzafa A, *et al.* Genetic considerations on the introduction of farmed fish in marine protected areas: The case of study of white seabream restocking in the Gulf of Castellammare (Southern Tyrrhenian Sea). *Journal of Sea Research*, 2012, 68(1–2): 41–48
- Hara M, Sekino M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, 2003, 217(1–4): 107–114
- Jin XS, Qiu SY, Liu XZ, *et al.* The foundation and prospect of fisheries resources of Huanghai and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 2014, 1–407 [金显仕, 邱盛尧, 柳学周, 等. 黄渤海渔业资源增殖基础与前景. 北京: 科学出版社, 2014, 1–407]
- Lacerda S, Costa GMJ, Campos-Junior PHA, *et al.* Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(1): 3–11
- Li ZB, Fang X, Chen J, *et al.* Loss of the genetic diversity in cultivated populations of *Pseudosciaena crocea* by AFLP. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(4): 446–450 [黎中宝, 方秀, 陈锦, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体遗传多样性的降低. *海洋与湖沼*, 2009, 40(4): 446–450]
- Liu HJ, Zhu XC, Sun XW, *et al.* Analysis of genetic structure among 5 cultured stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fishery Science of China*, 2008, 15(1): 30–37 [刘海金, 朱晓琛, 孙效文, 等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2008, 15(1): 30–37]
- Liu YX, Zhu YM, Liu YJ, *et al.* Analysis of genetic diversity in Bohai natural population of *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1609–1617 [刘永新, 朱以美, 刘英杰, 等. 牙鲆渤海自然群体的遗传多样性分析. *水产学报*, 2013, 37(11): 1609–1617]

1) Li SH. Genetic and enhancement effects of released parent grass carp in the middle Yangtze River. Master's Thesis of Huazhong Agriculture University, 2014, 27–44 [李树华. 长江中游草鱼亲本放流的增殖效果及遗传多样性影响评估. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2014, 27–44]

- Ma XB, Wang GX, Liu HJ, *et al.* Genetic diversity analysis of the offshore Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) population within Qinhuangdao, China. *Journal of Fishery Science of China*, 2012, 19(6): 963–969 [马晓冰, 王桂兴, 刘海金, 等. 秦皇岛海域野生牙鲆群体遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 963–969]
- McDonald GM, Wiley J. *Space, time and life*. Seattle: University of Washington Press, 2003: 109–120
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1975, 29(1): 1–10
- Qu RZ, Hou L, Lv HL, *et al.* The gene flow of population genetic structure. *Hereditas*, 2004, 26(3): 377–382 [曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流. *遗传*, 2004, 26(3): 377–382]
- Shao CW, Liao XL, Tian YS, *et al.* Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(1): 41–46 [邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2009, 30(1): 41–46]
- Silva MA, Costa GMJ, Lacerda S, *et al.* Successful xenogeneic germ cell transplantation from *Jundia catfish (Rhamdia quelen)* into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 230: 48–56
- Taranger GL, Karlsen Ø, Bannister RJ, *et al.* Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 2015, 72(3): 997–1021
- Wang YH, Fu DK, Xia JJ. The genetic diversity of the noble scallop (*Chlamys nobilis*, Reeve 1852) in China assessed using five microsatellite markers. *Marine Genomics*, 2013, 9(1): 63–67
- Xu TJ, Chen SL, Tian YS. Genetic structure analysis among four selective offspring stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* by microsatellite markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(4): 57–63 [徐田军, 陈松林, 田永胜. 牙鲆 4 个选择性繁育后代群体遗传结构的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2009, 30(4): 57–63]

(编辑 冯小花)

Analysis of the Genetic Variability of the Captured Population of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the Coastal Releasing Area of Qinhuangdao

SI Fei¹, SUN Zhaohui¹, YU Shanshan², ZHAO Yaxian¹, SONG Limin¹, WANG Shuliang³
WANG Qinglin¹①, JIANG Xiufeng¹, WANG Yufen¹, YU Qinghai¹

(1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100;

2. Ocean College, Agriculture University of Hebei, Qinhuangdao 066100;

3. Weifang Municipal Ocean and Fishery Administration, Weifang 261000)

Abstract Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is the major species of released fish in the coastal area of Qinhuangdao. In recent years, the ecological and genetic risks caused by releasing a large number of hatchery-reared fish to the sea have attracted more and more attention. In this study, we used 12 microsatellite markers to analyze the genetic variability of the captured population of *P. olivaceus* from the coastal releasing area of Qinhuangdao. We also compared parameters of genetic diversity among the brood stock, the pre-releasing population and the captured population. The mean number of alleles was between 11.917 and 22.167, and the maximum and minimum values were found in the captured population and the pre-releasing population respectively. The mean observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.800 to 0.836, and the mean expected heterozygosity (H_e) was between 0.814 and 0.845. The brood stock had the highest H_e value, and the pre-releasing population had the lowest value. The mean polymorphism information content (PIC) ranged from 0.775 to 0.818. Twenty-three out of 36 group-loci combinations were significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). The G_{st} values among the five populations varied from 0.005 to 0.043, indicating a low level of differentiation. Results of this study suggested the high genetic diversity of these three populations. Moreover, no obvious genetic risk was caused by the large-scale releasing of hatchery-reared fish in the coastal releasing area of Qinhuangdao.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Captured population; Artificial release; Genetic diversity

① Corresponding author: WANG Qinglin, E-mail: wangqinglin_1984@163.com

洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) *Cytb* 和 *CO I* 基因序列多态性分析*



李大命¹ 李 康² 张彤晴¹ 唐晟凯¹ 刘燕山¹
刘小维¹ 穆 欢³ 黄越峰³ 潘建林^{1①}

(1. 江苏省淡水水产研究所 江苏省内陆水域渔业资源重点实验室 南京 210017;

2. 南京师范大学生命科学学院 南京 210046; 3. 江苏省洪泽湖渔业管理委员会办公室 淮安 223300)

摘要 为揭示我国洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)遗传多样性现状,科学保护和合理利用大银鱼种质资源,采用线粒体细胞色素 b 基因(*Cytb*)和细胞色素 c 氧化酶 I 亚基基因(*CO I*)序列,分析了洪泽湖 40 尾大银鱼的遗传多样性。通过 PCR 扩增与序列测定分别获得了长度为 1141 bp 和 630 bp 的 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列。40 条 *Cytb* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7%和 32.3%,检出 6 个变异位点,定义 7 个单倍型,单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.775 和 0.00129,碱基平均差异数为 1.469。40 条 *CO I* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.6%、26.0%、19.2%和 33.2%,检出 5 个变异位点,定义 6 个单倍型,单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.700 和 0.00207,平均碱基差异数是 1.303。*Cytb* 及 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离较小,且 NJ 系统进化树聚为一支,说明大银鱼单倍型没有出现遗传分化。Fu's F_s 中性检验结果和碱基歧点分布图均表明,洪泽湖大银鱼近期经历了种群扩张事件。

关键词 遗传多样性; 细胞色素 b 基因; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因; 大银鱼; 洪泽湖
中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0025-07

大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)为 1 年生的小型鱼类,隶属于胡瓜鱼目(Osmeriformes)、银鱼科(Salangidae)、大银鱼属(*Protosalanx*),对环境变化反应敏感,是典型的 r-选择物种(王忠锁等,2002)。大银鱼广泛分布于我国钱塘江河口、长江口、长江下游湖泊及黄海、渤海沿岸河口和朝鲜西海岸,为近海河口洄游或淡水定居鱼种。大银鱼肉质鲜美,营养丰富,经济价值较高,曾经是我国重要的出口创汇水产品。近年来,由于环境污染、过度捕捞、水利工程以及生境破碎化等多种因素的影响,大银鱼的种群数量急剧下降,天然资源已逐渐枯竭(王忠锁等,2002)。因此,开展大银鱼资源保护已经迫在眉睫。

鱼类遗传多样性的研究一方面能够掌握渔业种质资源遗传多样性现状,另一方面可以为渔业资源的可持续发展提供重要的科学依据。鱼类线粒体 DNA(mtDNA)是遗传物质的主要载体,具有进化速率快、严格的母系遗传和几乎无重组等特点,是揭示群体遗传多样性及遗传结构的理想材料(吕国庆等,1998)。线粒体细胞色素 b (Cytochrome b, *Cytb*)和细胞色素 c 氧化酶亚基 I (Cytochrome c oxidase subunit I, *CO I*) 基因序列具有进化速度较快、易扩增等优点,适用于种群水平遗传多样性的检测,已被广泛地应用于鱼类等水生生物的系统学和种群遗传学研究中(孙鹏等,2011; 胡静等,2014; 李大命等,2015a)。

* 江苏省水生生物资源重大专项(ZYHB16-3)资助[This work was supported by Major Project of Hydrobios Resources in Jiangsu Province(ZYHB16-3)]. 李大命, E-mail: ldm8212@126.com

① 通讯作者: 潘建林, 研究员, E-mail: Jianlinpan2006@126.com

收稿日期: 2016-08-08, 收修改稿日期: 2016-08-29

洪泽湖面积为 1597 km², 是江苏省第二大湖泊, 也是我国第四大淡水湖泊(朱松泉等, 1993)。洪泽湖渔业资源丰富, 对湖区经济发展具有重要作用(王欣等, 2008)。在 20 世纪六七十年代, 洪泽湖大银鱼资源非常丰富, 每年都形成大规模的银鱼鱼汛, 创造了巨大的经济效益(江苏省地理研究所等, 1977)。近年来, 洪泽湖大银鱼天然资源量急剧下降, 已无法形成有效的捕捞群体。有关洪泽湖大银鱼的研究主要集中在生长、摄食、繁殖及增殖等生物学方面(江苏省地理研究所湖泊室洪泽湖银鱼增殖研究课题组, 1975; 张开翔等, 1981; 林明利等, 2013)。张颖(2005)¹⁾和薛丹(2015)²⁾采用分子生物学技术探究了我国不同地理分布大银鱼群体的遗传多样性及遗传结构, 而有关洪泽湖大银鱼的遗传学特征则尚未见报道。本研究通过对洪泽湖大银鱼的 *Cytb* 和 *CO I* 序列片段进行扩增、测序, 分析其遗传多样性及遗传结构, 不仅有利于丰富我国大银鱼的遗传学资料, 同时可为洪泽湖大银鱼资源的保护及合理利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015 年 8 月从洪泽湖的韩桥水域(33°24'05"N, 118°41'20"E)采集 40 尾大银鱼样本, 体长在 3.5–7.0 cm 之间(平均值为 5.2 cm), 体重在 0.1562–0.7680 g 之间(平均值为 0.4375 g)。剪取大银鱼尾鳍, 放入无水乙醇中保存, 带回实验室备用。

1.2 基因组 DNA 提取

剪取大银鱼尾鳍组织约 100 mg, 装入 1.5 ml 离心管, 剪碎。采用广谱性基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa, 日本)提取大银鱼基因组 DNA, 将 DNA 溶于 200 μl TE 溶液中, 置于–20℃保存备用。

1.3 *Cytb* 和 *CO I* 基因扩增、纯化与测序

本研究中, *Cytb* 扩增和测序引物为 L14321 (5'-CCAGTGACTTGAAAAACCACCG-3')、H15634 (5'-CTTAGCTTTGGGAGTTAAGGGT-3')(Zhang *et al.*, 2007)。*CO I* 扩增和测序引物为 F1(5'-TCAACC-AACCACAAAGACATTGGCAC-3')、R1 (5'-TAGACT-

TCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3')(Ward *et al.*, 2005)。PCR 反应总体积均为 50 μl, 其中 10×PCR Buffer (含 Mg²⁺) 5 μl, *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.4 μl, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μl, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μl, DNA 模板 2 μl (50 ng/μl), ddH₂O 补足体积。PCR 扩增反应程序均为 94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 50 s, 72℃延伸 90 s(*Cytb*)或 50 s(*CO I*), 30 个循环, 72℃最后延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 经 DNA 胶回收试剂盒(TaKaRa, 日本)纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。为保证所测序列的准确性, 所有样品均采用双向测序。

1.4 数据分析

所得序列用 ClustalX 软件进行编辑、校对和排序(Thompson *et al.*, 1997)。用 DnaSP4.10 分析软件(Rozas *et al.*, 2003)计算多态位点数目(Number of polymorphic sites)、单倍型数目(Number of haplotypes)、单倍型多样性(Haplotype diversity)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity)和平均碱基差异数(Average number of nucleotide differences)。用 MEGA 4.0 软件(Tamura *et al.*, 2007)统计碱基组成, 并基于 Kimura 双参数模型计算单倍型之间的遗传距离。以太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)的同源序列(GenBank 登录号为 JX524196.1)作为外群, 采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)分别构建 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型系统进化树, 进化树中节点的自举置信度水平由自引导值(Bootstrap value)估计, 共 1000 次循环。

用 Fu's *F_s* 中性检验和核苷酸不配对分布(Mismatch distribution)检测洪泽湖大银鱼种群的历史动态。

2 结果

2.1 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列分析

经 PCR 扩增、测序和校对, 获得洪泽湖大银鱼线粒体 *Cytb* 基因全长序列, 其长度为 1141 bp。40 条 *Cytb* 基因同源序列包含 6 个变异位点, 其中有 4 个简约信息位点, 2 个单一信息位点。碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7% 和 32.3%, 其中 A+T 的含量(51.0%)略高于 G+C 含量

1) Zhang Y. The study on the genetic diversity of *Protosalanx hyalocranius*. Master's Thesis of Tianjin Normal University, 2005, 1–63 [张颖. 大银鱼遗传多样性的研究. 天津师范大学硕士研究生学位论文, 2005, 1–63]

2) Xue D. Genetic diversity of 9 populations of *Protosalanx hyalocranius* in China based on *Cyt b* sequences. Master's Thesis of Jinan University, 2015, 1–53 [薛丹. 基于细胞色素 b 的中国 9 个大银鱼群体遗传多样性研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2015, 1–53]

(49.0%)。40 条 *Cytb* 基因序列定义了 7 个单倍型(Hb1–Hb7), 其中, 单倍型 Hb1 数量最多(16 个), 单倍型 Hb2 和 Hb6 数量最少, 均只有 1 个。

经 PCR 扩增、测序和校对, 获得洪泽湖大银鱼线粒体 *CO I* 基因序列片段, 其长度为 630 bp。40 条 *CO I* 基因同源序列共有 5 处变异位点, 其中, 有 4 个简约信息位点, 1 个单一信息位点。碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.6%、26.0%、19.2% 和 33.2%, 其中, A+T 的含量(47.6%)略低于 G+C 含量(52.4%)。40 条 *CO I* 基因序列定义了 6 个单倍型(Hc1–Hc2), 其中, 单倍型 Hc3 数量最多(17 个), 单

倍型 Hc2 数量最少(1 个)。

2.2 洪泽湖大银鱼遗传多样性参数

采用 DnaSP 软件获得洪泽湖大银鱼的遗传多样性参数(表 1)。从表 1 可以得出, *Cytb* 基因单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.755 ± 0.045 和 0.00129 ± 0.00010 , 碱基平均差异数为 1.469; *CO I* 基因单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.700 ± 0.047 和 0.00207 ± 0.00016 , 碱基平均差异数为 1.303。结果显示, *Cytb* 和 *CO I* 基因的遗传多样性水平均表现出较高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性模式。

表 1 洪泽湖大银鱼遗传多样性参数

Tab.1 Genetic diversity parameters of *P. Hyalocranius* population in the Hongze Lake

群体 Population	样本数 Sample number	基因 Gene	多态位点数 Polymorphic sites	单倍型数 Haplotypes number	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	碱基平均差异数 Average number of nucleotide differences
大银鱼 <i>P. hyalocranius</i>	40	<i>Cytb</i>	6	7	0.755 ± 0.045	0.00129 ± 0.00010	1.469
		<i>CO I</i>	5	6	0.700 ± 0.047	0.00207 ± 0.00016	1.303

2.3 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型系统进化树

采用 Mega 软件分别计算 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离。*Cytb* 基因单倍型之间的遗传距离在 0.001–0.004 之间(表 2); *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离在 0.002–0.005 之间(表 3)。由此可以得出, 洪泽湖大银鱼的 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离较小。

以太湖新银鱼作为外类群, 采用 NJ 法构建了洪泽湖大银鱼 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型的系统树(图 1 和图 2)。由图 1 和图 2 可知, *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型聚为一支, 表明单倍型之间的遗传关系较近, 这与 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离(表 2 和表 3)具有一致性。单倍型之间的遗传距离及系统进化树表明, 洪泽湖大银鱼单倍型之间未出现遗传分化。

表 2 大银鱼 *Cytb* 基因单倍型间的遗传距离
(基于 Kimura-2 parameter 法)

Tab.2 Genetic distance of the haplotypes of *Cytb* of *P. hyalocranius* (by Kimura-2 parameter method)

单倍型 Haplotypes	Hb1	Hb2	Hb3	Hb4	Hb5	Hb6	Hb7
Hb1	–						
Hb2	0.001	–					
Hb3	0.001	0.002	–				
Hb4	0.002	0.003	0.001	–			
Hb5	0.002	0.003	0.001	0.002	–		
Hb6	0.003	0.004	0.002	0.003	0.001	–	
Hb7	0.003	0.004	0.002	0.003	0.001	0.002	–

表 3 大银鱼 *CO I* 基因单倍型间的遗传距离
(基于 Kimura-2 parameter 法)

Tab.3 Genetic distance of the haplotypes of *CO I* of *P. hyalocranius* (by Kimura-2 parameter method)

单倍型 Haplotypes	Hc1	Hc2	Hc3	Hc4	Hc5	Hc6
Hc1	–					
Hc2	0.002	–				
Hc3	0.002	0.003	–			
Hc4	0.003	0.005	0.005	–		
Hc5	0.002	0.003	0.003	0.002	–	
Hc6	0.003	0.005	0.005	0.003	0.002	–

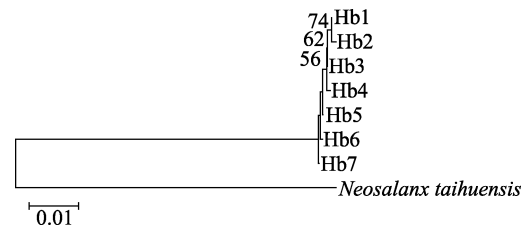


图 1 洪泽湖大银鱼 *Cytb* 基因单倍型的 NJ 系统发生树
Fig.1 Neighbor-joining tree of *Cytb* haplotypes in *P. hyalocranius*

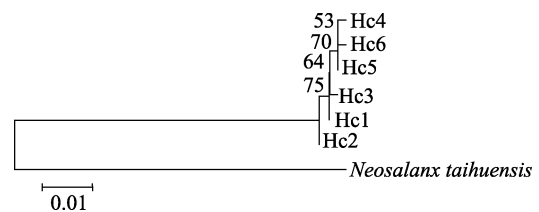


图 2 洪泽湖大银鱼 *CO I* 基因单倍型的 NJ 系统发生树
Fig.2 Neighbor-joining tree of *CO I* haplotypes in *P. hyalocranius*

2.4 大银鱼种群历史动态

中性检验分析结果显示, *Cytb* 和 *CO I* 基因的 Fu's F_s 值均为负值, 分别为 -0.32836 和 -0.52548 , 但统计检验均不显著($P>0.1$), 显示种群偏离中性进化。碱基歧点分布(Mismatch distribution)分析图谱呈现单峰型(图 3、图 4), 中性检验和碱基歧点分布图均表明, 洪泽湖大银鱼在历史上可能经历了种群扩张事件。

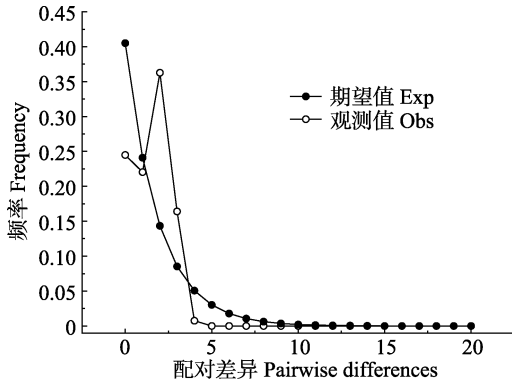


图 3 大银鱼 mtDNA *Cytb* 基因序列错配碱基分布

Fig.3 The distribution of mismatched bases in mtDNA *Cytb* gene sequences of *P. hyalocranius*

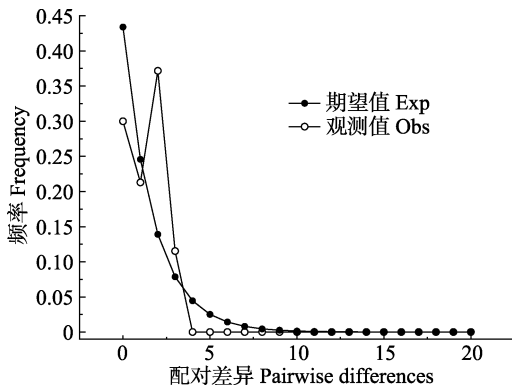


图 4 大银鱼 mtDNA *CO I* 基因序列错配碱基分布

Fig.4 The distribution of mismatched bases in mtDNA *CO I* gene sequences of *P. hyalocranius*

3 讨论

本研究基于线粒体 DNA 的 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列探讨了洪泽湖大银鱼的遗传多样性。通过对 *Cytb* 和 *CO I* 基因分析得出序列的碱基组成呈现出不均一性, 与鱼类线粒体 DNA 碱基组成具有一致性(孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014)。其中, *Cytb* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7% 和 32.3%, *CO I* 基因序列碱基含量分别是 21.6%、26.0%、19.2% 和 33.2%, 2 个基因序列中碱基 G 含量最低, C 含量最高, 表现出明显的偏倚性(张迪等, 2012; 罗旭光等, 2014)。另外, *Cytb* 基因的 A+T 含量(51.0%)

略大于 G+C 含量(49.0%), 而 *CO I* 基因片段的 A+T 含量(47.6%)略小于 G+C 含量(52.4%), 说明大银鱼线粒体 DNA 不同基因的 A+T 含量与 G+C 含量存在差异。

遗传多样性是指物种内的遗传变异度, 是生物适应环境与进化的基础。单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数是衡量一个物种群体多样性的两个非常重要的指标(Vrijenhoek, 1994)。本研究结果显示, 基于 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列的洪泽湖大银鱼单倍型多样性分别为 0.755 ± 0.045 和 0.700 ± 0.047 , 核苷酸多样性分别为 0.00129 ± 0.00010 和 0.00207 ± 0.00016 , 呈现出高单倍型多样性和低核苷酸多样性特征, 与太湖和三峡水库的大银鱼及银鱼科其他种类的多样性特征具有一致性。比如, 太湖大银鱼单倍型和核苷酸多样性分别为 0.850 ± 0.045 和 0.02960 ± 0.00017 (李大命等, 2015b), 三峡水库大银鱼的单倍型和核苷酸多样性分别为 0.804 ± 0.032 和 0.00146 ± 0.00009 (罗宏伟等, 2009)。大银鱼的遗传多样性特征显示, 该类型鱼类群体可能经历过历史扩张事件, 即由一个较小的有效群体在短时间内快速成长为一个大的群体(Grant, 1998)。本研究结果显示, *Cytb* 和 *CO I* 基因的 Fu's F_s 值为负值, 且碱基歧点分布图谱呈现单峰型, 均表明洪泽湖大银鱼历史上经历了种群扩张。在种群扩张的过程中, 随着种群数量的增加, 单倍型多样性会有所提高, 但没有足够的时间来积累核苷酸产生的变异, 因此, 会造成单倍型多样性较高而核苷酸多样性较低的遗传多样性模式(Grant, 1998)。另外, *Cytb* 基因单倍型高于 *CO I* 基因单倍型多样性, 说明大银鱼中 *Cytb* 基因较 *CO I* 基因序列变异速率快, 这与其他鱼类中的规律相似(毕潇潇等, 2009; 孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014)。

已有研究结果显示, 洪泽湖的太湖新银鱼单倍型和核苷酸多样性分别为 0.686 ± 0.039 和 0.0021 ± 0.0003 (Zhao *et al*, 2008), 乔氏新银鱼(*Neosalanx jordani*)单倍型和核苷酸多样性分别为 0.583 ± 0.109 和 0.00067 ± 0.00017 (赵亮等, 2010)。本研究的洪泽湖大银鱼的遗传多样性高于太湖新银鱼和乔氏新银鱼, 但低于太湖及三峡库区的大银鱼遗传多样(罗宏伟等, 2009; 李大命等, 2015b)。从整体来看, 洪泽湖银鱼种质资源遗传多样性处于较低水平。一般来说, 物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存潜力、丰富的育种和遗传改良潜力。相反, 物种遗传变异的减少可能导致严重的后果, 如成活率、生长与繁殖效率变低, 降低种群个体对环境变化的适应能力(Yang *et al*, 2007)。因此, 需要加大洪泽湖银鱼资源保护力度, 逐步恢复银鱼资源量, 提高其遗传多样性,

为洪泽湖银鱼资源可持续发展及利用奠定基础。

从单倍型间的遗传距离和 NJ 系统树可以看出, 洪泽湖大银鱼单倍型之间的遗传距离非常低, 且所有单倍型聚为一支, 表明大银鱼种群内没有出现遗传分化。这表明洪泽湖大银鱼个体间不存在地理隔离, 且有频繁的基因交流, 导致大银鱼具有遗传同质性。同样地, 太湖及三峡库区大银鱼群体的单倍型之间也具有相似规律(罗宏伟等, 2009; 李大命等, 2015b)。本研究表明, 洪泽湖大银鱼单倍型组成有较大差异, 比如, 在 *Cytb* 基因的 7 个单倍型中, 单倍型 Hb1 数量有 16 个, 而单倍型 Hb2 和 Hb6 数量均只有 1 个; 在 *CO I* 基因的 6 个单倍型中, 单倍型 Hc3 数量有 17 个, 而单倍型 Hc2 数量仅有 1 个。相较而言, 对单倍型数量较少的大银鱼种质资源保护显得尤为重要。目前, 增殖放流是恢复渔业资源量及维持渔业资源可持续发展的重要措施, 但增殖放流群体对野生鱼类资源遗传结构及遗传多样性的影响缺乏科学评价(张燕萍等, 2013; 陈文静等, 2013)。通过分析研究增殖放流群体与野生资源之间的遗传关系, 尽可能补充单倍型数量较少的群体数量, 才能更有利于恢复和提高鱼类种质资源的遗传多样性。因此, 本研究也可以为开展洪泽湖大银鱼增殖放流提供重要参考依据。

参 考 文 献

- Bi XX, Gao TX, Xiao YS, *et al.* Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, CO I and Cyt *b* gene fragments in four species of Gadidae fish. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(3): 46–52 [毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳕鱼线粒体 16S rRNA、CO I 和 Cyt *b* 基因片段序列的比较研究. 南方水产, 2009, 5(3): 46–52]
- Chen WJ, Zhang YP, Duan XB, *et al.* Genetic diversity analysis of *Hypophthal michthys molitrix* between wild and stock enhancement based on mitochondrial control region sequences in the Poyang Lake water system. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(35): 89–95 [陈文静, 张燕萍, 段辛斌, 等. 基于线粒体控制区全序列的鄱阳湖水系鲢增殖放流群体与野生群体的遗传多样性分析. 中国农学通报, 2013, 29(35): 89–95]
- Grant WAS, Bowen BW. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415–426
- Hu J, Hou XY, Yin SW, *et al.* Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the South China Sea revealed by CO I and *Cytb* gene analyses. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008–1016 [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA CO I 和 *Cytb* 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1008–1016]
- Jiangsu Institute of Geography, Hongze Lake Icefish Breeding Research Group of Lake Laboratory. Studies on the proliferation of icefish in the Hongze Lake. *Freshwater Fisheries*, 1975(11): 4–6 [江苏省地理研究所湖泊室洪泽湖银鱼增殖研究课题组. 洪泽湖银鱼增殖的研究. 淡水渔业, 1975(11): 4–6]
- Jiangsu Institute of geography, Hongze Lake Fisheries Research Institute, the Hongze Lake Economic Fish Research Group. Prediction and forecasting of fishing conditions of icefish in the Hongze Lake. *Freshwater Fisheries*, 1977(12): 13–16 [江苏省地理研究所, 洪泽县水产研究所洪泽湖经济鱼类增殖研究组. 洪泽湖银鱼渔情的预测和预报. 淡水渔业, 1977(12): 13–16]
- Li DM, Zhang TQ, Tang SK, *et al.* Genetic diversity of wild *Corbicula fluminea* population in the Hongze Lake analyzed by mitochondrial DNA CO I gene sequence. *Progress in Fishery Sciences*, 2015a, 36(5): 81–86 [李大命, 张彤晴, 唐晟凯, 等. 洪泽湖野生河蚬(*Corbicula fluminea*)线粒体 CO I 基因序列的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2015a, 36(5): 81–86]
- Li DM, Zhang TQ, Tang SK, *et al.* Genetic polymorphism of mitochondrial DNA cytochrome b (*cytb*) sequences of *Protosalanx chinensis* in Lake Taihu. *Jiangsu Journal of Agricultural of Sciences*, 2015b, 31(4): 840–845 [李大命, 张彤晴, 唐晟凯, 等. 太湖大银鱼(*Protosalanx chinensis*)细胞色素 b 基因序列多态性分析. 江苏农业学报, 2015b, 31(4): 840–845]
- Lin ML, Zhang TL, Ye SW, *et al.* Status of fish resources, historical variation and fisheries management strategies in Hongze Lake. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(6): 1118–1127 [林明利, 张堂林, 叶少文, 等. 洪泽湖鱼类资源现状、历史变动和渔业管理策略. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1118–1127]
- Lu GQ, Li SF. Advances in the study and application of fish mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(3): 94–99 [吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展. 中国水产科学, 1998, 5(3): 94–99]
- Luo HW, Duan XB, Wang K, *et al.* Genetic polymorphism analysis of mitochondrial DNA cytochrome b sequences of three species of salangids in the Three Gorges Reservoir. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(6): 16–21 [罗宏伟, 段辛斌, 王珂, 等. 三峡库区 3 种银鱼线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列多态性分析. 淡水渔业, 2009, 39(6): 16–21]
- Luo XG, Qi JW, Zhang LQ, *et al.* Analysis of CO I gene sequences of *Leuciscus waleckii* population in two lakes in Inner Mongolia. *Journal of Inner Mongolia Agricultural*

- University, 2014, 35(2): 1–4 [罗旭光, 齐景伟, 张立群, 等. 内蒙古两个湖泊东北雅罗鱼群 CO I 基因序列分析. 内蒙古农业大学学报, 2014, 35(2): 1–4]
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio CJ, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496–2497
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Population genetic structure of three *Pampus* species from East China Sea inferred by CO I and Cytb sequences. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 398–404 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 利用 CO I 和 Cytb 序列探讨东海区 3 种鲳属鱼类的种群遗传结构. 海洋渔业, 2011, 33(4): 398–404]
- Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882
- Vrijenhoek RC. Genetic diversity and fitness in small populations. *Conservation Genetics*, 1994, 68: 37–53
- Wang X, Zhang SY. Basic way for fishery development and protection of ecological environment at Hongze Lake. *Modern Fisheries Information*, 2008, 23(3): 19–21, 23 [王欣, 张胜宇. 洪泽湖渔业发展与生态环境保护的基本途径. 现代渔业信息, 2008, 23(3): 19–21, 23]
- Wang ZS, Fu CZ, Lei GC. Biodiversity of Chinese icefishes (Salangidae) and their conserving strategies. *Biodiversity Science*, 2002, 10(4): 416–424 [王忠锁, 傅萃长, 雷光春. 中国银鱼的多样性及其保护对策. 生物多样性, 2002, 10(4): 416–424]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2005, 360(1462): 1847–1857
- Yang P, Zhang H, Chen LQ, *et al.* Genetic structure of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* from the Yangtze and Lancang Rivers inferred from CO I gene sequence. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 113–118
- Zhang D, Lei GC, Gong C, *et al.* Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial CO I sequences. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(2): 299–306 [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 CO I 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 J, Li M, Xu MQ, *et al.* Molecular phylogeny of icefish Salangidae based on complete mtDNA cytochrome *b* sequences, with comments on estuarine fish evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2007, 91(2): 325–340
- Zhang KX, Zhuang DD, Zhang L, *et al.* On the *Protosalanx hyalocranius* and its propagation in Hongze Hu. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(1): 29–39 [张开翔, 庄大栋, 张立, 等. 洪泽湖所产大银鱼生物学及其增殖的研究. 水产学报, 1981, 5(1): 29–39]
- Zhang YP, Chen WJ, Wang DQ, *et al.* Genetic analysis of wild and proliferation groups of grass carp from Poyang Lake system by multiplex PCR. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(9): 207–211 [张燕萍, 陈文静, 汪登强, 等. 鄱阳湖水系草鱼野生及增殖放流群体遗传多样性分析. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 207–211]
- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Complex population genetic and demographic history of the *Salangid*, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome *b* sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(5): 201
- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Neosalanx jordani* based on cytochrome *b* sequences. *Biodiversity Science*, 2010, 18(3): 251–261 [赵亮, 张洁, 刘志瑾, 等. 乔氏新银鱼基于细胞色素 *b* 序列的种群遗传结构和种群历史. 生物多样性, 2010, 18 (3): 251–261]
- Zhu SQ, Dou HS. *Lake Hongze-water and aquatic resources*. Hefei: Press of University of Science and Technology of China, 1993, 174–181 [朱松泉, 窦鸿身. 洪泽湖-水资源和水生生物资源. 合肥: 中国科技大学出版社, 1993, 174–181]

(编辑 马瑾艳)

Genetic Polymorphism Analysis of *Cytb* and *CO I* Gene Sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake

LI Daming¹, LI Kang², ZHANG Tongqing¹, TANG Shengkai¹, LIU Yanshan¹,
LIU Xiaowei¹, MU Huan³, HUANG Yuefeng³, PAN Jianlin^{1①}

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Key Laboratory of Fisheries Resources in Inland Water of Jiangsu Province, Nanjing 210017; 2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046;
3. Hongze Lake Fisheries Administration Committee Office of Jiangsu Province, Huai'an 223300)

Abstract In order to analyze the genetic diversity of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake, the mitochondrial cytochrome b (*Cytb*) and cytochrome c oxidase subunit I (*CO I*) gene sequences were investigated in this study. Using PCR amplification and sequencing, 1141 bp of *Cytb* and 630 bp of *CO I* sequences were identified. For the *Cytb* sequence, the contents of A, T, G and C accounted for 21.7%, 29.3%, 16.7%, and 32.3% respectively. Six polymorphic sites and 7 haplotypes were obtained from 40 individuals. The haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.775 and 0.00129 respectively. The average nucleotide difference was 1.469. For the *CO I* sequence, the contents of A, T, G and C accounted for 21.6%, 26.0%, 19.2% and 33.2% respectively. Five polymorphic sites and 6 haplotypes were obtained from 40 individuals. The haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.700 and 0.00207 respectively. The average nucleotide difference was 1.303. The kimura-two-parameters analysis showed that the genetic distances of the haplotypes varied between 0.001 and 0.004 for *Cytb*, and between 0.002 and 0.005 for *CO I*. Furthermore, the phylogenetic tree constructed with the neighbor-joining (NJ) method indicated that the haplotypes of *P. hyalocranius* formed one clade, which suggested that there was no genetic differentiation in the haplotypes of *Cytb* and *CO I* of *P. hyalocranius*. Fu's F_s values (−0.32836 for *Cytb* and −0.52548 for *CO I*) in the neutrality test was negative, but there was no significant difference. The mismatched bases distribution analysis showed a peak type, which indicated that *P. hyalocranius* in the Hongze Lake had experienced a population expansion.

Key words Genetic diversity; *Cytb*; *CO I*; *Protosalanx hyalocranius*; Hongze Lake

① Corresponding author: PAN Jianlin, E-mail: Jianlinpan 2006@126.com

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)PRL 基因、 Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因对盐度胁迫的响应*

崔文晓^{1,2} 马爱军^{1,3①} 黄智慧^{1,3} 孙志宾^{1,3} 刘志峰^{1,3}
夏丹丹^{1,3} 唐启政^{1,3} 杨 志⁴ 曲江波⁴



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266071;
4. 烟台开发区天源水产有限公司 烟台 264003)

摘要 采用荧光定量 PCR 技术对不同盐度胁迫下各时间点大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼肠、鳃中催乳素(PRL)基因和 Na⁺-K⁺-ATPase α1 两种基因的表达量进行检测。以盐度 30 为对照组,盐度 5、10、40 和 50 为实验组进行数据分析。结果显示,两种基因在两种组织中均有表达,且基因的表达量具有组织和时间特异性。肠组织 PRL、Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因的表达量,在盐度 50 和 5 条件下,随胁迫时间的延长呈先升高后降低的变化趋势;鳃组织 PRL 基因表达量,在盐度 50 和盐度 5 条件下,随胁迫时间延长先升高后降低,而 Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因表达量在低盐条件下(盐度 5)没有显著变化,在高盐条件下(盐度 50)随时间延长呈现先降低后升高的变化趋势。在肠组织中,两种基因存在极显著的协同作用,随着盐度的升高,两种基因的表达量都呈现先升高后降低的趋势,且相关系数均接近于 1;在鳃组织中,在 10–40 盐度范围内,两种基因的表达存在明显的拮抗作用,当 PRL 基因的表达量呈现升高(或下降)趋势时,Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因的表达量呈现下降(或升高)趋势,且两种基因的相关系数均为负值。研究表明,PRL 具有抑制 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的作用,为今后盐度胁迫分子调控机理研究提供理论依据。

关键词 大菱鲂; 荧光定量 PCR; PRL 基因; Na⁺-K⁺-ATPase α1 基因; 盐度胁迫

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0032-09

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)是原产于欧洲大西洋海域的底栖硬骨鱼类,成鱼在 12–40 盐度范围内能较好的生长,甚至能在盐度低至 5 的水环境中生存(马爱军等, 2002)。为了适应大范围的盐度变化,鱼类往往进化出较为复杂的渗透调节机制,并通过控制基因的表达来控制离子平衡,从而达到渗透压平衡的

效果(Burel *et al*, 1996)。近年来,有关广盐性鱼类渗透压调节机制的研究日趋完善。人们对鱼类渗透调节的研究,已经从由观察鳃丝及其氯细胞的形态变化、测定鳃丝等渗透调节器官 Na⁺-K⁺-ATPase 的活性和血浆激素浓度等生理生化方面(唐贤明等, 2006; 曾霖等, 2014; 郭黎等, 2012; 罗海忠等, 2015),深入到了分子

* 现代农业产业技术体系项目(CARS-47-01)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山人才计划资助项目、山东省重点研发计划项目(2016GSF115019)和山东省农业良种工程项目(2016LZGC031)共同资助[This work was supported by the China Agriculture Research System (CARS-47-01), the “Aoshan” Talent Plan of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, the Key Research and Development Plan of Shandong Province (2016GSF115019), and the Agricultural Fine Breed Project of Shandong Province (2016LZGC031)]. 崔文晓, E-mail: cuiwenxiao2010@163.com

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

收稿日期: 2016-07-29, 收修改稿日期: 2016-08-31

水平的研究(刘珊等, 2011), 而从分子方面揭示大菱鲂渗透压调节机制却少有报道。

催乳素(Prolactin, PRL)和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATase}$ 作为盐度调控相关的主要功能基因, 受到国内外越来越多学者的关注。王杰等(2012)在研究建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)催乳素基因时发现, PRL 在建鲤的多个渗透调节器官和组织都有表达。目前, 已报道了金头鲷(*Sparus aurata*) (Laiz-Carrión *et al*, 2009)、建鲤(王杰等, 2012)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(Lee *et al*, 2006)、平鲷(*Rhabdosargus sarba*)(Kwong *et al*, 2008)、黄金鲈(*Perca flavescens*)(Lynn *et al*, 2007)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)(Shepherd *et al*, 1999)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Zhang *et al*, 2004)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)(Chang *et al*, 2007)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)(Breves *et al*, 2011)、金鱼(*Carassius auratus*)(Imaoka *et al*, 2000)、大西洋鲑(*Salmo salar*)(Ágústsson *et al*, 2003)、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)(Li *et al*, 2011)等鱼的 PRL 基因序列及其在不同盐度环境下的表达变化研究。

广盐性硬骨鱼盐度适应过程中血液皮质醇、生长激素水平增加刺激鳃上氯细胞内 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ mRNA 的表达提高, 酶活性的增加与氯细胞数量的增加及鳃 Na^+ 外排量成正比(McCormick, 2001)。目前, 已报道了斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)(Rajarao *et al*, 2001)、萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)(Hwang *et al*, 1998)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Richards *et al*, 2003)、大西洋鲑(D'cotta *et al*, 1996)等鱼的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因序列, 并且证明了不同物种间的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因的氨基酸序列极为保守。

研究表明, PRL 与 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 两个功能基因具有极其显著的相关性, 其中, PRL 在脊椎动物中具有多种生理作用, 而在鱼类中已知的主要功能是通过改变 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性来调控血浆渗透压的大小, 以调节鱼体渗透压和离子平衡(Li *et al*, 2011)。广盐性鱼类从海水到淡水适应过程中, 催乳素分泌增加明显使氯细胞变小并抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的活性, 减少鳃对 Na^+ 、 Cl^- 的排出量(魏渲辉等, 2001)。因此, 研究不同盐度条件下两种功能基因的相互作用极其表达变化, 对于揭示鱼类渗透压调节的分子机制有着重要的理论意义, 而此类研究鲜有报道。因此, 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 检测不同盐度条件下不同组织内 PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 两种功能基因的表达量变化, 探索 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 、PRL 基因在大

菱鲂渗透调节过程中的作用和二者之间的相互作用, 以期为大菱鲂的耐盐性研究提供科学依据, 并为大菱鲂推广工作打下坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验大菱鲂幼鱼取自山东省烟台天源水产有限公司, 体长为 (10.14 ± 0.29) cm ($n=300$)的健康个体。正式实验前暂养 2 周, 25 尾/桶, 盛水 160 L, 采用静水充气养殖, 养殖用水为深井过滤海水。养殖用水盐度在 30 ± 1 (对照组)的基础上, 分别调至 5 ± 0.5 、 10 ± 1 、 30 ± 1 、 40 ± 1 和 50 ± 1 这 5 个盐度, 每个盐度设 3 个重复组, 高盐度和低盐度由天然海水(盐度为 30 ± 1)与海水晶或淡水调配而成, 每天换水率为 90%。实验过程中不喂食。实验开始后 5、12、24、53、102 h 分别取样, 每个盐度取 4 尾鱼, 每条鱼分别取鳃和肠组织, 迅速浸入 10 倍体积 RNA 保存液中, 4°C 暂存一昼夜, 再转入 -20°C 冰箱长期保存, 带回实验室进行实验。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 文库构建

总 RNA 的提取按照总 RNA 试剂盒(RNA prep pure Tissue Kit, 天根)进行, 琼脂糖电泳检测 RNA 的纯度, 紫外分光光度计检测样品浓度。RNA 原液置于 -80°C 保存。取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA, 用 Quant Reverse Transcriptase 逆转录酶(TIANscript RT Kit, 天根), 按照说明书合成 cDNA 第一链, -20°C 保存。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 试剂盒为北京天根生化科技有限公司的 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green); 实时荧光定量 PCR 反应采用上海启文生物科技有限公司生产的 FTC-3000P Real-Time Quantitative Thermal Cycler。根据 GenBank 中斑马鱼(*Barchydanio rerio* var) PRL 序列, 用 Primer 5.0 设计 PRL 基因引物, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因的引物引用刘珊等(2012) (表 1), 以大菱鲂 $\beta\text{-actin}$ 基因为内参, 由北京擎科新业生物技术有限公司合成。用 Oligo6.0 检验引物优劣, BLASTX 验证引物特异性和唯一性。分别检测 PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因在各组织的 mRNA 相对表达量。在 96 孔板中装入以下体系: $2 \times$ SuperReal PreMix Plus $10 \mu\text{l}$ 、 $50 \times$ ROX Reference Dye $0.4 \mu\text{l}$ 、RNase-Free ddH₂O $7.4 \mu\text{l}$ 、引物 F 和引物 R 各 $0.6 \mu\text{l}$ 、cDNA 模板 $1 \mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为 95°C 15 min, 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 最后在 $55\text{--}95^\circ\text{C}$ 制作熔解曲线。

表 1 PRL 和 Na⁺-K⁺-ATPase α1qPCR 引物序列
(刘珊等, 2012)

Tab.1 Primers of PRL and Na⁺-K⁺-ATPase α1 in quantitative PCR (Liu *et al.*, 2012)

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence(5'-3')
PRL-F	GTCCTCGTCACCATAAGCAT
PRL-R	ACACATCTGGGACCCTCTTC
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α1F	GTGGGCCGATTGATCAATTGCG
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α1R	CCTGGGCTGCGTCGAATGATAAG
β-actin F	GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA
β-actin R	CTGGGTCATCTTCTCCCTGT

1.4 数据分析

利用网上资源 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> 的 blastN 和 blastX 工具进行同源基因搜索。在保证扩增效率的前提下, 正常条件下基因的组织分布表达分析采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法, $\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{reference})$, 盐胁迫下基因在组织中的表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{test}) - \Delta Ct(\text{control})$, 其中, $\Delta Ct(\text{test}) = Ct(\text{test, target}) - Ct(\text{test, reference})$, $\Delta Ct(\text{control}) = Ct(\text{control, target}) - Ct(\text{control, reference})$ (Schmittgen *et al.*, 2000)。数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。用 Excel 软件进行作图。应用 SPSS19.0 统计软件单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Duncan 检验对数据进行统计学分析($P < 0.05$ 为显著水平), 相关性用分析-相关-双变量方法进行皮尔逊检验(Pearson correlation), 判断两个基因是否具有相关性, Pearson 系数相关公式为:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

2 结果

2.1 盐度胁迫对 PRL mRNA 表达的影响

以大菱鲆 β-actin 为内参基因, 荧光定量 PCR 检测肠、鳃中 PRL mRNA 的相对表达量, 以盐度 30 数据为对照组, 盐度 5、10、40 和 50 为实验组, 进行数据分析。结果显示, PRL mRNA 在肠、鳃中均有表达。鳃组织和肠组织中 PRL mRNA 的相对表达量, 在高盐胁迫条件下, 随盐度的升高呈现降低趋势; 在低盐胁迫条件下, 随盐度的降低呈现降低趋势, 其中, 正常盐度条件下表达量最高且差异极显著($P < 0.01$) (图 1)。

根据预实验结果, 选取了在鳃、肠道 2 个组织中 PRL mRNA 表达差异性显著的 2 个极端盐度(50 和 5)开展时间累积效应分析。结果显示, 鳃组织在盐度

50 和盐度 5 两组极端胁迫条件下, 随实验时间延长, PRL mRNA 的表达呈先升高后降低的趋势, 且在第 12 小时达到峰值(图 2); 而在盐度 50 和盐度 5 条件下的肠组织, 在实验时间内 PRL mRNA 的表达均呈现先增加后减少的趋势, 并且均在实验进行的第 24 小时达到峰值(图 3)。

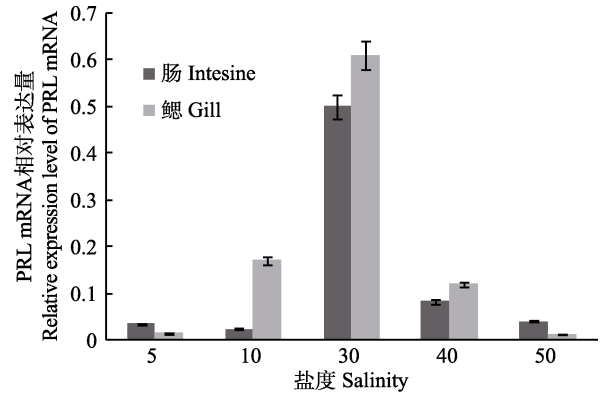


图 1 PRL mRNA 在肠、鳃中的表达

Fig.1 The mRNA expression of PRL in the gill and intestine

不同的字母代表组间差异显著($P < 0.05$), 下同
Different letters represented significant differences between groups ($P < 0.05$), the same as below

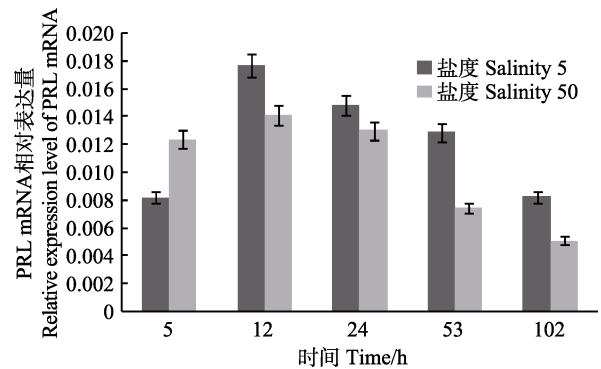


图 2 鳃组织中 PRL mRNA 表达量

Fig.2 The mRNA expression of PRL in the gill

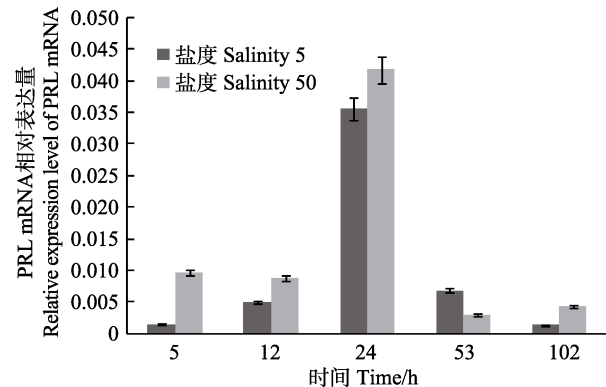


图 3 肠组织中 PRL mRNA 表达量

Fig.3 The mRNA expression of PRL in the intestine

2.2 盐度胁迫对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的影响

以大菱鲂 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因, 荧光定量 PCR 检测肠、鳃中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的相对表达量, 以盐度 30 数据为对照组进行数据分析。结果显示, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 在肠和鳃中均有表达。肠组织中该基因表达量在高、低盐度胁迫条件下, 随盐度的升高(或降低)呈现先升高后降低趋势, 在正常盐度(30)时最高, 差异极显著($P < 0.01$); 鳃组织中该基因表达量在高、低盐度胁迫条件下, 随盐度的升高(或降低)均呈现降低趋势, 其中, 在盐度 10 时最高, 差异极显著($P < 0.01$)(图 4)。

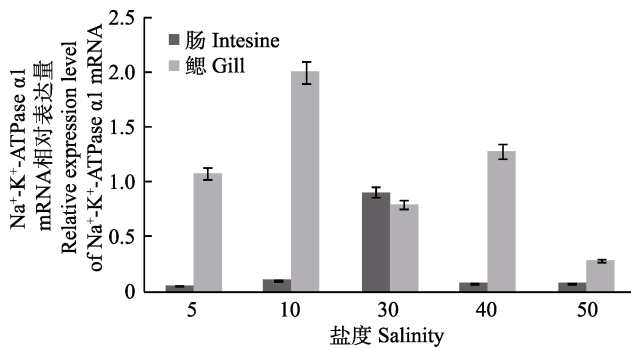


图 4 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 在肠、鳃中的表达
Fig.4 The mRNA expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ in the gill and intestine

根据预实验结果, 选取了 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 在鳃、肠道两个组织中表达差异性显著的两个极端盐度(50 和 5)开展时间累积效应分析, 具体结果如下: 低盐(盐度 5)胁迫后, 鳃组织中的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 随时间没有显著性变化; 高盐(盐度 50)胁迫后, 大菱鲂鳃组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 表达水平整体呈先减少后增加的变化趋势, 且在 24 h 内达到最低值后 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.05$)(图 5); 盐度 50 和盐度 5 胁迫下的肠组织表现出相同的变化趋势, 在胁迫 24 h mRNA 表达量达到最大值, 其后出现显著降幅($P < 0.05$)(图 6)。

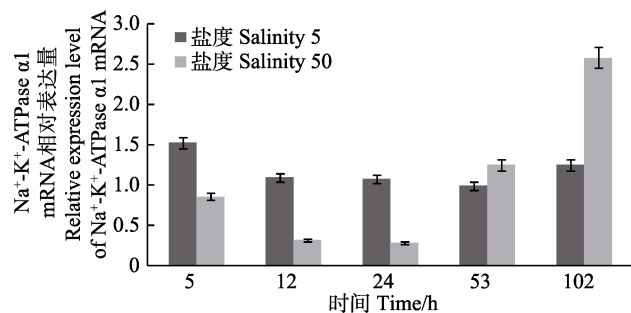


图 5 鳃组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 表达量
Fig.5 The mRNA expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ in the gill

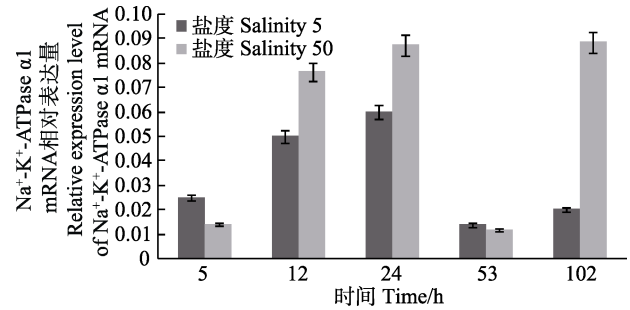


图 6 肠组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 表达量
Fig.6 The mRNA expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ in the intestine

2.3 两种基因在盐度胁迫下的相互作用

不同盐度胁迫 12 h、24 h 和 53 h 条件下, PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 两种基因在肠组织中 mRNA 表达量变化趋势均相似, 即以正常盐度(30)为对照, 随着盐度升高或者降低两种基因的 mRNA 表达量都呈降低趋势(图 7); 两种基因在 3 个时间点的相关系数分别为 0.999、0.992 和 1, 正相关性极显著($P < 0.01$)。在鳃组织中, 以正常盐度(30)为对照, 3 个时间点的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 的 mRNA 表达量随着盐度的升高或下降, 均呈现先升高后降低的趋势, 而 PRL 的 mRNA 表达量则呈现下降趋势(图 8); 二者表达量变化的拮抗作用表现为盐度在 10–40 区间内, 当 PRL 的 mRNA 表达量呈现升高趋势时, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 的 mRNA 表达量呈现下降趋势, 而当 PRL 的 mRNA 表达量呈现下降趋势时, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 的 mRNA 表达量都呈现上升趋势, 而在盐度 5 和盐度 50 的极端胁迫条件下全部降低到最低点, PRL mRNA 表达量较低时 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 有较高的表达量; 两种基因在 3 个时间点的相关系数分别为 -0.864 、 -0.742 、 -0.945 , 负相关性不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

鳃是鱼类主要的渗透压调节器官, 当水环境中的盐度发生变化时, 鱼鳃中的氯细胞会分泌体内过多的 Na^+ 、 Cl^- , 调节体液渗透压平衡。在低盐环境中, 氯细胞中的线粒体数量少且不发达; 在高盐环境下, 氯细胞中的线粒体数量多且发达。氯细胞的这种结构和功能, 是鱼类能够调整自身来适应环境中复杂的盐度变化的重要原因。王兵等(2011)对不同盐度下吉丽罗非鱼(*O.niloticus* × *S.melanotheron* F₂)不同组织中 NKCC1a 基因 mRNA 表达量进行分析表明, 鳃组织在吉丽罗非鱼高渗透压调节中起最主要作用。Pisam 等(1993)研究发现, 注射催乳素后的罗非鱼鳃中 α 氯细

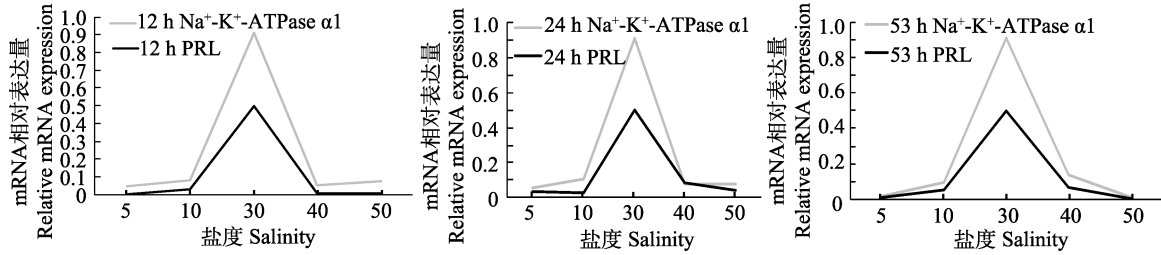


图 7 不同时间、不同盐度条件下 PRL 与 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 在肠中表达变化

Fig.7 The variations in the mRNA expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ in the intestine under different salinities at different time

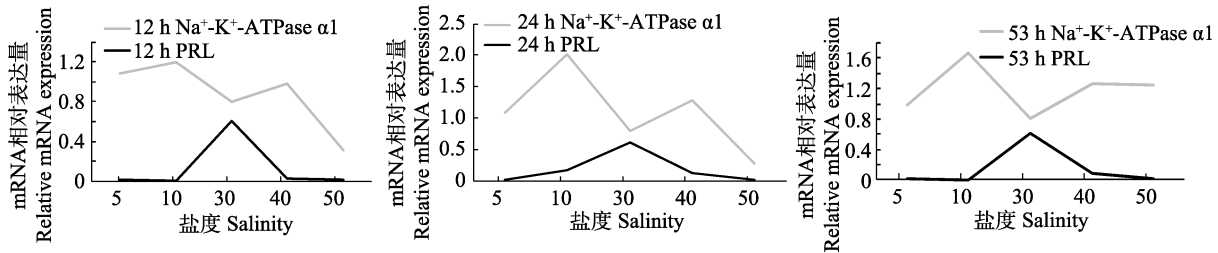


图 8 不同时间、不同盐度条件下 PRL 与 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 在鳃中表达变化

Fig. 8 The variations in the mRNA expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ in the gill under different salinities at different time

胞体积变小并出现了一些小的 β 氯细胞。肠是鱼体内营养物质消化吸收、水和离子(Na^+)交换的主要场所,当肠内的 Na^+ 、 Cl^- 较高时,肠道是被动吸收 Na^+ 、 Cl^- ,也是维持水和盐平衡的重要器官(Hirose *et al.*, 2003)。两种器官功能的实现都需要 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 。

催乳素 PRL 是由动物脑垂体分泌的一种单链多肽类激素(Kelly *et al.*, 2001),其作用是防止体内离子的流失和外界水分的进入,降低体内器官的渗透性(Bole-Feysot *et al.*, 1998)。PRL 是 Farmer 等(1977)首先从非鲫脑垂体中分离出来。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 又称 Na-K 泵,其由 α 、 β 两亚基组成。 α 亚基是催化亚基,由 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha$ 基因编码, α 亚基存在 4 种同工型,分别是 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$,其中, $\alpha 1$ 型在各种组织中广泛存在,是一种维持 Na^+ 、 K^+ 浓度梯度及渗透压的管家基因(Lingrel *et al.*, 2007)。左映平等(2007)研究表明,PRL 可以降低肠对水和盐的通透性以及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的活性,从而减少对 Na^+ 、 Cl^- 和水的吸收;在淡水环境中,PRL 降低鳃中盐的排出量,增加肠中盐和水的摄取量。探讨不同盐度胁迫下鳃和肠组织中 PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 两种基因的表达,对于研究大菱鲂渗透压调节机制有着非常重要的意义。

3.1 PRL 基因对盐度胁迫的响应

采用实时荧光定量 PCR 技术对大菱鲂幼鱼肠和鳃中 PRL mRNA 的表达量进行检测,结果显示 PRL

mRNA 在两种组织中均有表达,这与王杰等(2012)的研究结果相似。Ágústsson 等(2003)对大西洋鲑海水适应研究发现,PRL 基因的表达量随着盐度的升高表达量明显上升,这与本研究结果基本一致,即从低盐度(5)到正常盐度(30)的升高过程中,PRL mRNA 的相对表达量逐渐升高。但与 Laiz-Carrión 等(2009)对金头鲷(*Sparus auratus*)在高盐度(38)、中盐度(12)和低盐度(6)3 种盐度条件下的 PRL mRNA 表达水平研究结果存在较大的差异。研究发现,随着盐度的升高,PRL mRNA 的相对表达水平逐渐降低。这可能与大菱鲂较强的低盐度水体适应能力有密切的关系。大菱鲂有较强的渗透压调节能力,在淡水适应过程中随盐度的降低,进入鱼体的离子减少,需要调节离子的氯细胞的数量减少、体积减小,从而离子排出量减少,不需要通过催乳素的增加来减少鳃对 Na^+ 、 Cl^- 的排出量来调节渗透压;也可能不需要通过增加催乳素降低上皮对离子和水的渗透性来调节离子平衡。

3.2 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因对盐度胁迫的响应

采用实时荧光定量 PCR 技术对大菱鲂幼鱼肠和鳃中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量进行检测,结果显示, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因在两种组织中均有表达。当环境盐度发生变化时,机体细胞为了适应外界环境而快速应答,细胞内盐度有关的基因(如 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$)通过表达量的变化来调节机体细

胞渗透压。在本研究的鳃组织中,以正常盐度(30)为对照, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量随着盐度的升高或下降,均呈现先升高后降低的趋势,原因可能是在高盐适应过程中,环境盐度升高后,会有更多的离子进入体内,为了排出过多的离子,鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力逐步上升,以调节血清中过高的离子浓度,直至平衡。随着盐度的降低,进入鱼体内的离子减少,通过调节使氯细胞数量减少,体积缩小,所以 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性下降。随着盐度的进一步降低,进入体内的离子急剧减少,为防止各种离子的流失,需从外界水体中吸收离子,因此 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性会增加。

本研究结果显示,在盐度 50 和 5 的肠组织中, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 随时间呈先升高后降低最后趋于平缓的趋势,证明当环境盐度增加时伴随着 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的剧烈升高,而随着盐度和时间的升高和延长, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性逐渐降低。此阶段基因调控系统通过反馈调节系统使得机体与外界环境逐渐相适应,细胞内基因表达调控系统也随着环境的改变而改变。冯平等(2006)对青鳉鱼(*Oryzias latipes*)的研究发现, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha$ 基因表达量不受盐度变化的影响,这与本研究盐度 5 中的鳃组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量随时间没有出现显著性变化的发现相一致。而 Romão 等(2001)认为盐度对鱼类鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的活力无显著影响,但是对河鲀鱼(*Takifugu sp.*)的研究发现,盐度对鳃丝 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活力有显著的影响。这可能是不同种类的鱼渗透压调节能力和方式不同。本研究还发现,在盐度 50 中的鳃组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量随时间呈先降低后升高的趋势,推测其是在高盐度胁迫初期,大菱鲆不需要 Na-K 泵排出 Na^+ 、泵进 K^+ ,来防止细胞水肿,胁迫后期细胞失水严重从而需要 Na-K 泵吸收离子保持细胞形态,进而细胞中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因表达量上调。

3.3 两种基因在盐度胁迫下的相互作用

本研究发现,在肠组织中 PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达存在极显著($P < 0.01$)的协同作用,两种基因在正常盐度时的表达量最高且差异最大,随着盐度升高或者降低两种基因的表达量都呈现出降低的趋势。由于肠是鱼类吸收水分和盐的重要器官,需要两种基因的协同作用调节体内渗透压来适应外界环境的变化。但在鳃组织中,两种基因的表达存在相关性较好但不显著($P > 0.05$)的拮抗作用,在盐度为 10–40 区间内,当 PRL mRNA 表达量呈现升高趋势

时, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量呈现下降趋势,而当 PRL mRNA 的表达量呈现下降趋势时, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量都呈现上升趋势。推测鳃是机体与外界接触的第一道防线,盐度变化对鳃的胁迫应激较为显著,从而使功能基因在分子水平上表现出较为敏感的变化。但大菱鲆具有较强的渗透压调节能力,盐度的变化并没有使得 PRL 对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达水平产生较强的抑制作用。也可能是由于在高盐度和低盐度下,环境盐度与体内渗透压差距过大,需要消耗大量的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 来维持生命活动,从而导致两种基因的拮抗作用不显著。但是,在相同盐度胁迫下 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 表达水平显著高于 PRL 的表达量,其中,PRL mRNA 表达量的降低减少了对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因的抑制,使得 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达水平在短时间内提高。证实了 PRL 具有抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的作用,这与 Herndon 等(1991)和 Pisam 等(1993)对海水罗非鱼注射 PRL 后会导致鳃盖氯细胞中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 斑状分布以及数量的减少的结果相吻合。

4 结论

本研究采用实时荧光定量 PCR 技术,检测大菱鲆不同盐度下不同时间点不同组织中 PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ mRNA 的表达量。对结果的统计分析发现,两种基因存在组织和时间特异性。研究表明,两种基因作为渗透压调节基因在鱼体内的定量分布和鱼的种类、生长环境和生长阶段相关。基因对环境变化做出的应答机制是多种基因相互作用的复杂过程,PRL 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ 基因具有相同的作用位点,因此可能存在表达上的相互作用。为在分子水平上阐述大菱鲆的渗透压调节机制,为大菱鲆的内陆推广和海陆交接提供科学依据,大菱鲆盐度基因有待更深入的研究。

参 考 文 献

- Ágústsson T, Sundell K, Sakamoto T, *et al.* Pituitary gene expression of somatolactin, prolactin, and growth hormone during Atlantic salmon parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 2003, 222(1–4): 229–238
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, *et al.* Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 1998, 19(3): 225–268
- Breves JP, Seale AP, Helms RE, *et al.* Dynamic gene expression of GH/PRL-family hormone receptors in gill and kidney

- during freshwater-acclimation of Mozambique tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 158(2): 194–200
- Burel C, Ruyet JPL, Gaumet F, *et al.* Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *Journal of Fish Biology*, 1996, 49(4): 678–692
- Chang YJ, Min BH, Choi CY. Black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) prolactin cDNA sequence: mRNA expression and blood physiological responses during freshwater acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 147(1): 122–128
- D’Cotta HC, Gallais C, Saulier B, *et al.* Comparison between parr and smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) α subunit gene expression of Na^+/K^+ ATPase in gill tissue. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, 15: 29–39
- Farmer SW, Papkoff H, Bewley TA, *et al.* Isolation and properties of teleost prolactin. *General and Comparative Endocrinology*, 1977, 31(1): 60–71
- Feng P, Wang F, Fan GL. The effect of salinity on intestine Na^+/K^+ -ATPase genes expression of medaka (*Oryzias latipes*). *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2006, 15(6): 24–27 [冯平, 王峰, 范光丽. 盐度对青鳉鱼肠内 Na^+/K^+ -ATPase 基因表达的影响. *西北农业学报*, 2006, 15(6): 24–27]
- Guo L, Mai AJ, Wang XA, *et al.* Effects of temperature and salinity on the activities of antioxidant enzymes of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(5): 422–428 [郭黎, 马爱军, 王新安, 等. 盐度和温度对大菱鲆幼鱼抗氧化酶活性的影响. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 422–428]
- Herndon TM, McCormick SD, Bern HA. Effects of prolactin on chloride cells in opercular membrane of seawater-adapted tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 83(2): 283–289
- Hirose S, Kaneko T, Naito N, *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 593–620
- Hwang PP, Fang MJ, Tsai JC, *et al.* Expression of mRNA and protein of Na^+/K^+ -ATPase α subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 18(4): 363–373
- Imaoka T, Matsuda M, Mori T. Extrapituitary expression of the prolactin gene in the goldfish, African clawed frog and mouse. *Zoological Science*, 2000, 17(6): 791–796
- Kelly PA, Binart N, Lucas B, *et al.* Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2001, 22(2): 140–145
- Kwong AKY, Woo NYS. Prolactin-releasing peptide, a possible modulator of prolactin in the euryhaline silver sea bream (*Sparus sarba*): A molecular study. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 158(2): 154–160
- Laiz-Carrión R, Fuentes J, Redruello B, *et al.* Expression of pituitary prolactin, growth hormone and somatolactin is modified in response to different stressors (salinity, crowding and food-deprivation) in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 162(3): 293–300
- Lee KM, Kaneko T, Aida K. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(3): 318–328
- Lei JL. *Marine fish culture theory and techniques*. Beijing: China Agriculture Press, 2005, 524–591 [雷霖. *海水鱼类养殖理论与技术*. 北京: 中国农业出版社, 2005, 524–591]
- Li C, Chen X, Zhang Y, *et al.* Molecular and expression characterization of growth hormone/prolactin family genes in the Prenant’s schizothoracin. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4595–4602
- Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, *et al.* Na, K-ATPase and the role of α isoforms in behavior. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2007, 39(5–6): 385–389
- Liu S, Li B, Zhang CF, *et al.* Research advance on osmoregulation in teleost fish. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(20): 12239–12242, 12245 [刘珊, 李冰, 张成锋, 等. 硬骨鱼类渗透调控的研究进展. *安徽农业科学*, 2011, 39(20): 12239–12242, 12245]
- 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 (*Eleutheronema tetradactylum*) 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]
- Lynn SG, Shepherd BS. Molecular characterization and sex-specific tissue expression of prolactin, somatolactin and insulin-like growth factor-I in yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 147(3): 412–427
- Ma AJ, Lei JL, Chen SQ, *et al.* Effects of spawning season on biologic and biochemistry characteristic of eggs of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(1): 75–82 [马爱军, 雷霖, 陈四清, 等. 大菱鲆产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响. *海洋与湖沼*, 2002, 33(1): 75–82]
- McCormick SD. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 2001, 41(4): 781–794
- Pisam M, Auperin B, Prunet P, *et al.* Effects of prolactin on α and β chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia “*Oreochromis niloticus*”. *The Anatomical Record*, 1993, 235(2): 275–284

- Rajarao SJR, Canfield VA, Mohideen MAPK, *et al.* The repertoire of Na, K-ATPase α and β subunit genes expressed in the zebrafish, *Danio rerio*. *Genome Research*, 2001, 11(7): 1211–1220
- Richards JG, Semple JW, Bystriansky JS, *et al.* Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206: 4475–4486
- Romão S, Freire CA, Fanta E. Ionic regulation and Na⁺, K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic agglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59(2): 463–468
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by realtime, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2000, 46(1): 69–81
- Shepherd BS, Sakamoto T, Hyodo S, *et al.* Is the primitive regulation of pituitary prolactin (tPRL177 and tPRL188) secretion and gene expression in the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) hypothalamic or environmental? *Journal of Endocrinology*, 1999, 161(1): 121–129
- Tang XM, Sui Z, Tian JB, *et al.* Effects of salinity on metabolic rate of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *South China Fisheries Science*, 2006, 2(4): 54–58 [唐贤明, 隋墨, 田景波, 等. 盐度对大菱鲂幼鱼耗氧率和排氨率的影响. *南方水产科学*, 2006, 2(4): 54–58]
- Wang B, Fan WJ, Li SF. Tissue-specific changes of *NKCC1a* mRNA expression by salinity in “GILI” tilapia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 515–522 [王兵, 范武江, 李思发. 不同盐度下“吉丽”罗非鱼(尼罗罗非鱼 \times 萨罗罗非鱼 δ) *NKCC1a* mRNA 的组织特异性表达. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 515–522]
- Wang J, Li B, Zhang CF, *et al.* Full-length cDNA cloning and tissue expression of PRL from *Cyprinus carpio var. jian*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(6): 935–944 [王杰, 李冰, 张成锋, 等. 建鲤催乳素基因全长 cDNA 的克隆及序列分析和组织表达. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(6): 935–944]
- Wei XH, Ru SG, Xu L, *et al.* Structural and functional changes of euryhaline fish branchial chloride cell and hormonal regulation during seawater and freshwater adaptation. *Marine Sciences*, 2001, 25(4): 16–20 [魏渲辉, 汝少国, 徐路, 等. 海水和淡水适应过程中广盐性鱼类鳃氯细胞的形态与功能变化及其激素调节. *海洋科学*, 2001, 25(4): 16–20]
- Zeng L, Lei JL, Liu B, *et al.* Effects of salinity on Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills, and concentrations of ions and hormones in serum of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Chinese Journal of Zoology*, 2014, 49(3): 407–414 [曾霖, 雷霖霖, 刘滨, 等. 盐度对大菱鲂幼鱼鳃 Na⁺-K⁺-ATPase 活力, 血清离子浓度和激素水平的影响. *动物学杂志*, 2014, 49(3): 407–414]
- Zhang W, Tian J, Zhang L, *et al.* cDNA sequence and spatio-temporal expression of prolactin in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 136(1): 134–142
- Zuo YP, Cao JS. The role of prolactin on fish osmotic adjustment. *Chemistry of Life*, 2007, 27(5): 455–457 [左映平, 曹劲松. 鱼类体内催乳素的渗透调节作用. *生命的化学*, 2007, 27(5): 455–457]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Salinity Stress on the mRNA Expression of PRL and Na⁺-K⁺-ATPase α 1 of Turbot (*Scophthalmus maximus*)

CUI Wenxiao^{1,2}, MA Aijun^{1,3}①, HUANG Zhihui^{1,3}, SUN Zhibin^{1,3}, LIU Zhifeng^{1,3},
XIA Dandan^{1,3}, TANG Qizheng^{1,3}, YANG Zhi⁴, QU Jiangbo⁴

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, Yantai 264003)

Abstract Turbot (*Scophthalmus maximus*) is an economically important species extensively cultured in China. In this study, we exerted acute salinity stress on turbot to identify their response in the expression of certain genes including prolactin (PRL) and Na⁺-K⁺-ATPase α 1 in the intestine and gill. Relative mRNA expression of PRL and Na⁺-K⁺-ATPase α 1 in four salinity groups (salinity 5, 10, 40, 50) and a control group (salinity 30) were tested using quantitative real-time PCR. Sampling of the control group conducted at 5 h, 12 h, 24 h, 53 h, and 102 h. Data analysis demonstrated that the two genes expressed in all tissues in a spatio and time specific pattern. Over the time, the relative mRNA expression of intestinal PRL and Na⁺-K⁺-ATPase α 1 firstly increased and then decreased under the stress of salinity 5 and 50. The expression of PRL mRNA in the gill firstly increased and then decreased under salinity 50; under the same salinity, the expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 1 mRNA showed a reversed pattern which was a decrease followed by an increase. Compared to the control group, the mRNA expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 1 in the gill did not change significantly under salinity 5. In the intestine, the mRNA expression of the two genes were highly synergic, and they both firstly increased and decreased along with the increase of salinity, and the correlation coefficient was close to 1. However, there was an obvious antagonistic effect between the two genes in the gill under salinities 10 to 40. When the expression of PRL rose/fell, the expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 1 declined/rose, and the correlation coefficient was negative. This confirmed that PRL could inhibit the Na⁺-K⁺-ATPase activity. Our study provided theoretical information in the turbot gene regulation mechanism in response to salinity stress.

Key words Turbot *Scophthalmus maximus*; Quantitative real-time PCR; PRL; Na⁺-K⁺-ATPase α 1; Salinity stress

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

越冬对黄鳢(*Monopterus albus*)机体生化组成及部分血清生化指标的影响*



李昭林^{1,2,4} 刘庄鹏¹ 何志刚³ 田芊芊^{1,2} 张俊智¹
张璐⁴ 米海峰⁴ 胡毅^{1,2①}

(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. 湖南省水产科学研究所 长沙 410153; 4. 通威股份有限公司 成都 610041)

摘要 以初始体重为(118.42±4.38) g 的黄鳢(*Monopterus albus*)为研究对象, 研究越冬对黄鳢机体生化组成及部分血清生理生化指标的影响。实验结果显示, 与越冬前相比, 1) 越冬后黄鳢全鱼、肝脏和肌肉组成显著改变, 越冬后鱼体粗脂肪含量显著下降($P<0.05$), 鱼体水分和粗灰分含量显著升高($P<0.05$), 肝体比和肝糖原含量极显著降低($P<0.01$), 肝脏粗脂肪含量显著升高($P<0.05$), 肌肉中总氨基酸和必需氨基酸含量极显著升高($P<0.01$), 肌肉中饱和脂肪酸含量极显著降低($P<0.01$), 多不饱和脂肪酸含量显著升高($P<0.05$); 2) 越冬后黄鳢血清甘油三酯、葡萄糖和总蛋白含量以及血清氨基酸发生显著改变, 越冬导致黄鳢血清甘油三酯、葡萄糖含量显著降低($P<0.05$), 总蛋白含量极显著升高($P<0.01$), 黄鳢血清中总氨基酸和必需氨基酸含量显著下降($P<0.05$), 但越冬对血清总胆固醇和尿素氮含量、谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力无显著影响。上述结果表明, 越冬期间黄鳢营养物质消耗以肝糖原和鱼体脂肪为主, 越冬后肌肉氨基酸和脂肪酸组成显著改变。

关键词 黄鳢; 越冬; 机体生化组成; 血清生化指标; 脂肪酸; 氨基酸

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0041-07

温度是影响水产动物生长发育、生理功能和行为活动的重要环境因素之一, 水产动物生长的适宜温度差异较大, 冷水性鱼类适温小于 15℃, 温水性鱼类适温为 15–25℃, 暖水性鱼类适温为 25–35℃(董双林等, 2004)。水温较低时, 水产动物活动明显减弱, 摄食减少甚至停止, 新陈代谢下降, 抵抗力降低, 出现病症和死亡(许友卿等, 2012), 此时水产动物主要通过利用体内储蓄的蛋白质、脂肪和碳水化合物等营养物质来维持生命活动, 营养物质消耗一般优先动用脂肪或碳水化合物, 其次为蛋白质(麦康森等, 2011), 从而引起鱼类机体生化组成改变。

黄鳢(*Monopterus albus*)亦称鳢鱼, 营穴居生活, 具有较高的营养价值和药用价值, 是我国重要的淡水经济鱼类, 其适宜生长温度为 15–28℃, 当水温低于 15℃时, 黄鳢摄食明显减少; 水温低于 12.5℃时, 黄鳢基本停止摄食; 水温低于 5℃时, 黄鳢开始进入冬眠(杨代勤等, 1997; 周文宗等, 2008)。我国华中地区寒冷季节长达 4–5 个月, 越冬期间, 黄鳢遭受寒冷与饥饿双重胁迫, 除自身营养物质消耗导致体重减轻外, 还可能引起黄鳢部分死亡。关于黄鳢越冬的研究仅在体重、肠道消化酶、免疫能力、肌肉和肝脏脂肪含量的变化上有报道(刘庄鹏等, 2015; 吴湘香等,

* 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)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31572626), and Excellent Youth Foundation of Hunan Education Committee (14B089)]. 李昭林, E-mail: lizhaolin910829@163.com

① 通讯作者: 胡毅, 教授, E-mail: huyi740322@163.com

收稿日期: 2016-01-15, 收修改稿日期: 2016-02-16

2005),但对越冬期间黄鳝的营养物质消耗和生理适应并不完全了解。因此,探索越冬对黄鳝机体生化组成及部分血清生理生化指标的变化具有重要意义,可为华中地区黄鳝养殖安全越冬提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及管理

越冬实验在常德西湖黄鳝养殖基地进行,实验鱼为基地同一批次养殖的商品黄鳝,挑选规格一致[初始平均体重为(118.42±4.38)g]、健康的黄鳝(已停食7d)置于实验网箱中(网箱规格1.5m×2.0m×1.5m),每箱70尾(越冬前取样除外),共5个网箱。越冬时间约为4个月,共124d,期间网箱水温在4.1–13.2℃之间,溶氧量为(6.5±0.7)mg/L,pH为7.9±0.5,氨氮浓度在0.1–0.3mg/L之间,亚硝酸盐低于0.1mg/L。

1.2 样品收集、分析与计算

1.2.1 体形指标的测定 实验开始和结束时分别对各实验网箱中黄鳝进行称重、记数,计算成活率(Survival rate, SR),随机挑选5尾黄鳝记录体重,然后解剖,分离内脏和肝脏并称重,计算肝体比(Hepatosomatic index, HSI)、脏体比(Visceral index, VSI),收集肝脏置于–20℃保存备用。计算公式如下:

$$\begin{aligned} SR(\%) &= 100 \times N_t / N_0 \\ VSI(\%) &= 100 \times W_{fv} / W_f \\ HSI(\%) &= 100 \times W_{fh} / W_f \end{aligned}$$

N_0 、 N_t 分别表示黄鳝初始尾数、终末尾数; W_f 、 W_{fv} 、 W_{fh} 分别表示终末鱼体重(g)、内脏重(g)、肝脏重(g)。

1.2.2 体组成的测定 越冬前后分别从每箱随机取5尾黄鳝,全鱼样品置于–20℃冰箱保存,鱼体常规成分测定参照AOAC的方法。其中,水分的测定采用105℃烘箱干燥恒重法;粗蛋白的测定采用凯氏定氮法;粗脂肪的测定采取索氏抽提法;粗灰分采用550℃马福炉灼烧法。

越冬前后分别从每箱随机取5尾黄鳝,解剖取肝脏,置于–80℃冰箱保存备用,肝糖原采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.2.3 血清生理生化指标的测定 越冬前后分别从每个网箱中随机取5尾黄鳝,用2.0ml无菌注射器尾静脉采血。每个网箱抽取的血液合并置于10ml无菌离心管中,4℃静置过夜后,3500r/min离心15min,取上层血清置于–80℃冰箱保存备用。血清总蛋白(TP)、总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)、葡萄糖(GLU)、尿素氮(UN)、谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.2.4 氨基酸和脂肪酸的测定 越冬前后分别从每个网箱中随机取5尾黄鳝,剪取相同部位的背部白肌合并后制成肌肉样品,用于氨基酸和脂肪酸的测定;血清氨基酸取已保存的血清进行测定;氨基酸的测定采用氨基酸自动分析仪(日立L-8900);脂肪酸的测定采用气相色谱–质谱仪(Thermo Quest Trace GC/MS),将样品质谱图与NIST标准图库质谱图进行匹配,确认样品中的脂肪酸类别,采用面积归一化法计算组分的相对含量。氨基酸和脂肪酸均在湖南农业大学分析测试中心测定。

1.3 数据统计分析

实验结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示,用SPSS 17.0软件进行配对样本t检验。 $P < 0.05$ 时为差异显著, $P < 0.01$ 时为差异极显著。

2 结果

2.1 越冬对黄鳝体组成的影响

越冬显著影响池塘网箱养殖黄鳝的成活率、体重、体成分及肝组成。由表1可知,越冬使黄鳝的成活率、平均体重、脏体比显著下降($P < 0.05$),鱼体粗脂肪含量显著降低($P < 0.05$),鱼体水分和粗灰分含量显著升高($P < 0.05$),肝脏粗脂肪含量显著升高($P < 0.05$),越冬使鱼体粗蛋白含量有一定的降低,但差异不显著($P > 0.05$),越冬极显著降低了肝体比和肝糖原含量($P < 0.01$)。

2.2 越冬对黄鳝血清部分生理生化指标的影响

由表2可知,越冬显著影响了黄鳝血清血糖、甘油三酯和总蛋白含量,越冬后黄鳝血清血糖和甘油三酯含量显著降低($P < 0.05$),血清总蛋白含量极显著升高($P < 0.01$),但越冬对血清尿素氮、总胆固醇含量及血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶活力无显著影响($P > 0.05$)。

2.3 越冬对黄鳝氨基酸和脂肪酸组成的影响

2.3.1 越冬对黄鳝血清和肌肉氨基酸组成的影响

由表3可知,越冬显著影响了血清氨基酸含量,导致黄鳝血清中总氨基酸和必需氨基酸含量显著下降($P < 0.05$),血清中组氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸等必需氨基酸含量显著降低($P < 0.05$),血清中的精氨酸、蛋氨酸含量在越冬后极显著降低($P < 0.01$)。

由表4可知,越冬显著影响肌肉氨基酸组成,越冬后黄鳝肌肉中的必需氨基酸、鲜味氨基酸和总氨基酸的含量极显著升高($P < 0.01$),其中,天门冬氨酸、苏

表 1 越冬对黄鳝体组成的影响

Tab.1 Effects of overwintering on the body composition of *M. albus*

体组成 Body composition	越冬前 Before overwintering	越冬后 After overwintering	P 值 Significance
成活率 Survival rate (%)	100.00±0.00	97.14±0.45*	0.035
平均体重 Average body weight (g)	118.42±4.38	110.72±3.99*	0.023
肝体比 Hepatosomatic index (%)	7.47±0.83	5.01±1.05**	0.001
脏体比 Visceral index (%)	13.76±1.32	11.03±1.66*	0.034
鱼体水分 Body moisture (%)	72.13±1.67	73.43±2.49*	0.027
鱼体粗脂肪 Body crude lipid (%)	6.84±0.27	6.01±0.19*	0.028
鱼体粗蛋白质 Body crude protein (%)	16.65±0.19	16.36±0.61	0.136
鱼体粗灰分 Body crude ash (%)	2.04±0.08	2.25±0.11*	0.021
肝脏粗脂肪 Liver crude lipid (%)	3.61±0.17	4.09±0.09*	0.033
肝糖原 Liver glycogen (%)	20.77±1.17	16.95±1.30**	0.009

注: 表格中同列肩标无字母表示差异不显著($P>0.05$), *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。下同

Note: In the same column, values without superscripts were not significantly different ($P>0.05$), *: Significant difference ($P<0.05$), **: Highly significant difference ($P<0.01$). The same as below

表 2 越冬对黄鳝血清部分生化指标的影响

Tab.2 Effects of overwintering on the partial serum biochemical indices of *M. albus*

血清生化指标 Serum biochemical indices	越冬前 Before overwintering	越冬后 After overwintering	P 值 Significance
总蛋白 TP (mg/ml)	26.36±3.41	32.24±2.93**	0.002
总胆固醇 T-CHO (mmol/L)	5.09±0.31	5.24±0.19	0.377
甘油三酯 TG (mmol/L)	1.76±0.28	0.79±0.20*	0.017
葡萄糖 GLU (mmol/L)	3.81±0.23	3.24±0.04*	0.038
尿素氮 UN (mmol/L)	2.01±0.10	1.81±0.18	0.229
谷草转氨酶 AST (U/L)	364.88±14.18	354.14±9.63	0.096
谷丙转氨酶 ALT (IU/L)	184.36±6.03	178.76±10.91	0.625

氨酸、谷氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸的含量极显著升高($P<0.01$), 丝氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、组氨酸的含量显著升高($P<0.05$)。

2.3.2 越冬对黄鳝肌肉脂肪酸组成的影响 由表 5 可知, 越冬使黄鳝肌肉中的饱和脂肪酸(SFA)含量极显著下降($P<0.01$), 但其中的 C24:0 含量显著上升($P<0.05$); 越冬对黄鳝肌肉中单不饱和脂肪酸(MUFA)含量无显著性影响, 但其中的 C17:1 和 C20:1n-9 含量显著上升($P<0.05$), C18:1n-9c 含量显著下降($P<0.05$); 越冬使黄鳝肌肉中的多不饱和脂肪酸(PUFA)含量显著升高($P<0.05$), 使 $n-3/n-6$ 值显著升高($P<0.05$), 其中, C22:5n-3 含量显著升高($P<0.05$), C20:3n-6 上升幅度最大($P<0.01$)。

表 3 越冬前后黄鳝血清氨基酸含量的变化(ml/100 ml)

Tab.3 Effects of overwintering on amino acid contents in the serum of *M. albus* (ml/100 ml)

氨基酸 ¹ Amino acids ¹	越冬前 Before overwintering	越冬后 After overwintering	P 值 Significance
天门冬氨酸 Asp*	0.33±0.03	0.29±0.03	0.602
苏氨酸 Thr [☆]	0.78±0.00	0.37±0.02*	0.022
丝氨酸 Ser	0.24±0.01	0.12±0.01*	0.017
谷氨酸 Glu*	0.70±0.01	0.60±0.01	0.171
脯氨酸 Pro	0.73±0.02	0.64±0.20	0.116
甘氨酸 Gly*	0.39±0.00	0.57±0.04	0.126
丙氨酸 Ala*	0.75±0.01	1.12±0.04**	0.006
缬氨酸 Val [☆]	0.74±0.03	0.67±0.13	0.718
蛋氨酸 Met [☆]	0.10±0.00	0.04±0.01**	0.007
异亮氨酸 Ile [☆]	0.37±0.01	0.35±0.06	0.676
亮氨酸 Leu [☆]	0.77±0.02	0.70±0.15	0.756
苯丙氨酸 Phe [☆]	0.39±0.02	0.32±0.02*	0.044
赖氨酸 Lys [☆]	0.54±0.05	0.30±0.06	0.070
组氨酸 His [☆]	0.40±0.00	0.15±0.01*	0.044
精氨酸 Arg [☆]	0.72±0.03	0.47±0.01**	0.006
必需氨基酸 TEAA	4.83±0.04	3.35±0.20*	0.012
鲜味氨基酸 TDEE	2.18±0.04	2.58±0.03**	0.001
总氨基酸 TAA	8.33±0.09	6.77±0.06*	0.018

1. 色氨酸未测定; * . 鲜味氨基酸; ☆ . 必需氨基酸; 下同

1. Tryptophane was not determined; * . Delicious amino acid; ☆ . Essential amino acids. The same as below

3 讨论

3.1 越冬对黄鳝机体组成的影响

寒冷的冬季使黄鳝很少摄食甚至停止摄食, 新陈代谢下降, 但处于饥寒交迫状态下的黄鳝需要消耗体内积蓄的营养物质维持基本生命活动, 从而导致了黄

表4 越冬前后黄鳝肌肉氨基酸含量的变化(g/100 g)

Tab.4 Effects of overwintering on the amino acid composition in muscles of *M. albus* (g/100 g)

氨基酸 ¹ Amino acids ¹	越冬前 Before overwintering	越冬后 After overwintering	P 值 Significance
天门冬氨酸 Asp [*]	0.46±0.01	0.68±0.33 ^{**}	0.007
苏氨酸 Thr [☆]	0.24±0.08	0.35±0.01 ^{**}	0.003
丝氨酸 Ser	0.25±0.01	0.36±0.02 [*]	0.011
谷氨酸 Glu [*]	0.79±0.02	1.05±0.03 ^{**}	0.002
脯氨酸 Pro	0.24±0.01	0.33±0.02 [*]	0.035
甘氨酸 Gly [*]	0.33±0.02	0.54±0.04 [*]	0.015
丙氨酸 Ala [*]	0.37±0.02	0.53±0.04 [*]	0.013
缬氨酸 Val [☆]	0.25±0.01	0.36±0.02 ^{**}	0.004
蛋氨酸 Met [☆]	0.09±0.00	0.15±0.01 [*]	0.012
异亮氨酸 Ile [☆]	0.17±0.01	0.25±0.01 ^{**}	0.005
亮氨酸 Leu [☆]	0.40±0.02	0.58±0.03 ^{**}	0.005
苯丙氨酸 Phe [☆]	0.22±0.01	0.31±0.02 ^{**}	0.008
赖氨酸 Lys [☆]	0.34±0.01	0.50±0.02 ^{**}	0.004
组氨酸 His [☆]	0.13±0.01	0.20±0.02 [*]	0.027
精氨酸 Arg [☆]	0.24±0.01	0.37±0.02 ^{**}	0.006
必需氨基酸 TEAA	2.08±0.08	3.08±0.15 ^{**}	0.004
鲜味氨基酸 TDEE	1.95±0.07	2.81±0.13 ^{**}	0.006
总氨基酸 TAA	4.59±0.17	6.68±0.32 ^{**}	0.005

鳝体重下降, 机体组成发生变化, 长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)(梁友光, 2005)¹⁾和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(胡雪松等, 2010; 于森等, 2015)的越冬研究中也得到了相似的结果。

糖原是碳水化合物在机体内的主要贮存形式, 血糖(葡萄糖)是糖类在体内的主要运输形式, 葡萄糖氧化分解是水产动物重要的能量供给途径。饥饿时, 哺乳类动物肝糖原迅速分解成葡萄糖提供能量, 但水产动物饥饿时不一定优先利用糖原, 研究表明, 薄氏大弹涂鱼(*Boleophthalmus boddarti*)(Lim *et al.*, 1989)饥饿时优先分解肌肉蛋白质, 卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(苏慧等, 2012)饥饿早期主要利用脂肪, 后期消耗蛋白质。本研究表明, 越冬后黄鳝肝体比、肝糖原、血清血糖含量均显著降低, 说明越冬期间黄鳝和哺乳动物一样, 可以利用肝糖原提供能量, 与异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(吕林兰等, 2007)和史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)(高露娇等, 2004)饥饿研究的结果一致。

脂类是水产动物所必需的营养物质, 是组织细胞的组成成分。脂肪又称甘油三酯, 由甘油的3个羟基

表5 越冬对黄鳝肌肉脂肪酸组成的影响(%)

Tab.5 Effects of overwintering on the fatty acid composition in muscles of *M. albus* (%)

脂肪酸 Fatty acids	越冬前 Before overwintering	越冬后 After overwintering	P 值 Significance
C13:0	0.12±0.01	0.12±0.00	0.861
C14:0	4.55±0.24	4.06±0.03	0.165
C15:0	1.54±0.15	1.57±0.02	0.873
C16:0	14.42±0.23	13.43±0.12 [*]	0.049
C17:0	1.73±0.09	1.19±0.06 [*]	0.013
C18:0	4.89±0.12	4.83±0.12	0.776
C19:0	0.23±0.04	0.31±0.01	0.166
C20:0	0.54±0.04	0.55±0.02	0.821
C24:0	0.09±0.01	0.13±0.01 [*]	0.026
Σ SFA	28.11±0.23	26.18±0.02 ^{**}	0.004
C14:1	0.32±0.03	0.26±0.02	0.232
C16:1	9.11±0.20	9.01±0.32	0.815
C17:1	1.27±0.01	1.46±0.05 [*]	0.035
C18:1n-9t	18.67±1.21	18.95±0.55	0.795
C18:1n-9c	3.26±0.04	2.62±0.10 [*]	0.011
C20:1n-9	1.34±0.03	1.61±0.03 ^{**}	0.009
Σ MUFA	34.04±1.42	34.03±0.97	0.992
C18:3n-3	7.38±0.29	7.60±0.12	0.614
C20:5n-3	2.43±0.09	2.29±0.09	0.446
C22:5n-3	5.60±0.12	6.07±0.20 [*]	0.019
C22:6n-3	5.50±0.12	5.62±0.16	0.687
Σ n-3 PUFA	20.90±0.26	21.59±0.19	0.191
C18:2n-6	2.55±0.07	2.67±0.21	0.789
C18:3n-6	5.77±0.20	5.74±0.15	0.992
C20:2n-6	0.89±0.12	1.66±0.20 [*]	0.014
C20:3n-6	0.30±0.01	0.34±0.01 ^{**}	0.007
C20:4n-6	4.19±0.45	4.25±0.82	0.955
Σ n-6 PUFA	14.21±0.27	13.98±0.76	0.681
n-3/n-6	1.46±0.02	1.58±0.01 [*]	0.015
Σ PUFA	34.29±0.13	36.54±0.35 [*]	0.038

与3个脂肪酸在肝脏中缩合而成, 通过血液循环贮存在脂肪组织中备用。当机体需要时, 脂肪动员脂肪细胞中的甘油三酯逐步水解产生游离脂肪酸, 为机体生命代谢提供能量, 如肝脏脂肪是鲤鱼和鳕鱼(*Gadus* sp.)饥饿时首先动用的能源(麦康森等, 2011)。黄鳝越冬后鱼体粗脂肪含量、血清甘油三酯含量显著下降, 说明越冬期间黄鳝可分解脂肪, 氧化游离脂肪酸, 释放能

1) Liang YG. The physiological and biochemical adaptation of long-snout catfish (*Leiocassis longirostris*) to overwintering. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005, 31-119 [梁友光. 长吻鲩越冬的生理生化适应. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2005, 31-119]

量, 这与长吻鲢(梁友光, 2005)¹⁾越冬的结果相似。与肝糖原相比, 越冬后黄鳢肝脏粗脂肪含量显著上升, 说明肝脏的脂肪消耗量要远少于肝糖原, 使肝脏粗脂肪相对含量上升, 这可能与肝脏是糖原的主要存储器官有关(麦康森等, 2015)。越冬使鱼体脂肪含量下降, 肌肉中饱和脂肪酸含量显著下降, 可能与越冬期间消耗的脂肪主要来自肌肉脂肪有关, 在黑鲷(*Sparus macrocephalus*) (邓利等, 2003)的饥饿研究中有类似报道。

蛋白质是动物机体的主要构成成分, 也具有供能作用, 在机体能量供应不足时, 蛋白质可直接分解供能以维持机体的代谢活动。越冬对鱼体粗蛋白含量无显著影响, 但导致黄鳢体重显著下降, 从而致使机体的实际蛋白质重量同比体重质量减少, 说明越冬期间黄鳢除了利用肝糖原和脂肪外, 也利用了一部分蛋白质来提供能量。褐菖鲈(*Sebastiscus marmoratus*)饥饿时除了消耗脂肪外, 也消耗蛋白质供能(江丽华等, 2011)。越冬后黄鳢血清总氨基酸和必需氨基酸含量均显著下降, 可能也是蛋白质被消耗所导致, 也可能是由于新陈代谢水平降低所导致, 肌肉总氨基酸和必需氨基酸含量升高, 与遮目鱼(*Chanos chanos*) (Shiau *et al.*, 2001)和鳊鱼(*Miichthys miiuy basilewsky*) (柳敏海等, 2009)饥饿实验的结果相悖, 这可能是肌肉中的脂肪和糖原被大量消耗导致蛋白质相对含量升高的结果。

水产动物脂肪酸组成与其生存环境的水温有关, 冷水性鱼类不饱和脂肪酸含量比温水性鱼类更高。低水温可导致鱼类细胞膜磷脂中多不饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸比例升高, 而饱和脂肪酸比例下降(Tocher, 2003)。越冬后, 黄鳢肌肉中的饱和脂肪酸被消耗, 多不饱和脂肪酸比例增加, 可能是黄鳢对寒冷环境适应的变化, 这在鲤科鱼类(童圣英, 1997)和大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (张春丹等, 2014)越冬研究中也得到相似的结果。脂肪酸去饱和化及延长被认为是水产动物适应低温的一种重要机制(许友卿等, 2012; 谢帝芝等, 2013), 低温时, 水产动物通过激活和强化硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)和脂肪酸延长酶活性, 使饱和脂肪酸去饱和并延长, 从而不饱和脂肪酸比例升高, 增强膜流动性, 提高机体御寒能力。黄鳢越冬后, 肌肉中 C16:0 和 C18:1n-9c 含量显著降低, C20:1n-9 含量显著升高, 这表明低温环境下黄鳢也可通过脂肪酸去饱和化和延长这种机制抵御寒冷。冷水性鱼类对 n-3 系列脂肪酸的需求量大于 n-6 系列的脂

肪酸, 越冬后, 黄鳢肌肉中 n-3/n-6 值显著升高, 这可能是 n-3 系列脂肪酸更有利于鱼类在低温环境中生存。

3.2 越冬对黄鳢血清部分生理生化指标的影响

血液是鱼类维持动物生命活动的重要组织之一, 其成分随着机体生理状态的变化而改变, 故血清生理生化指标变化可反映黄鳢对越冬的适应。血清总蛋白包括白蛋白和球蛋白, 具有修补组织、免疫、运输脂肪酸等功能(Luk'ianenko *et al.*, 2002); 胆固醇是构成细胞膜的重要组成部分, 是维持细胞膜功能的关键物质(邹思湘等, 2010)。长期饥饿可导致水产动物的免疫能力下降(刘庄鹏等, 2015; 田青等, 2014; 刘波等, 2009), 但越冬后血清总蛋白含量升高, 可能是低温环境下机体可以自身激发少数免疫, 如增加血清总蛋白含量, 弥补免疫力的下降, 达到免疫平衡, 从而有利于黄鳢抵御越冬的胁迫, 这与对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (石桂成等, 2012)低温胁迫研究中的结果相似。越冬对黄鳢血清总胆固醇含量没有显著影响, 可能与血清总胆固醇维护细胞膜结构提供物质基础, 增强细胞膜的流动性, 适应低温环境有关, 这种现象在吉富罗非鱼的低温应激研究中也得到了验证(刘波等, 2011)。

谷草转氨酶主要存在于心肌细胞中, 谷丙转氨酶是反映肝组织健康完整的重要指标(Srivastava *et al.*, 2007), 当心肌和肝脏组织受损, 谷草转氨酶和谷丙转氨酶将大量溢出到血液中(蔡林婷等, 2013)。低温饥饿胁迫大黄鱼时(冀德伟等, 2009; 徐浩等, 2015), 血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力显著升高, 但本越冬实验并不影响血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力, 可能高水平的多不饱和脂肪酸和稳定水平的胆固醇对维护肝脏和心肌细胞膜的结构起到了重要作用。

参 考 文 献

- Cai LT, Li SY, Ge MF, *et al.* Effect of three pathogenic *Vibrio* on the blood biochemical parameters of *Pseudosciaena crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 65-72 [蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 65-72]
- Deng L, Zhang WM, Lin HR. Effects of starvation on the contents of growth hormone and triiodothyronine in serum, and lipid and protein of white muscles and livers in black seabreams. *Zoological Research*, 2003, 24(2): 94-98 [邓利, 张为民, 林浩然. 饥饿对黑鲷血清生长激素、甲状腺激素以及白肌和肝脏脂肪、蛋白质含量的影响. *动物学研究*, 2003, 24(2): 94-98]

1) Liang YG. The physiological and biochemical adaptation of long-snout catfish (*Leiocassis longirostris*) to overwintering. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005, 31-119 [梁友光. 长吻鲢越冬的生理生化适应. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2005, 31-119]

- Dong SL, Zhao W, Tian XL, *et al.* Ecology for aquaculture. Beijing: China Agriculture Press, 2004, 21–16 [董双林, 赵文, 田相利, 等. 养殖水域生态学. 北京: 中国农业出版社, 2004, 21–26]
- Gao LJ, Chen LQ, Song B. Effect of starvation and compensatory growth on feeding, growth and body biochemical composition in *Acipenser schrenckii* juveniles. Journal of Fishery of China, 2004, 28(3): 279–284 [高露娇, 陈立桥, 宋兵. 饥饿和补偿生长对史氏鲟幼鱼摄食、生长和体组成的影响. 水产学报, 2004, 28(3): 279–284]
- Hu XS, Li CT, Xu W, *et al.* The preliminary study on growth performance and overwintering weight loss of Heilongjiang carp, selective line of German mirror carp and the cold-resistant line of Hebao red carp. Journal of Fishery of China, 2010, 34(8): 1182–1189 [胡雪松, 李池陶, 徐伟, 等. 黑龙江鲤、德国镜鲤选育系与荷包红鲤抗寒品系生长及越冬体重损失的初步研究. 水产学报, 2010, 34(8): 1182–1189]
- 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 Science, 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]
- Jiang LH, Zhu AY, Yuan SB. Effects of starvation on the digestive organs and muscle composition of *Sebastes marmoratus*. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(2): 22–26 [江丽华, 朱爱意, 苑淑宾. 饥饿对褐菖鲉消化道组织及肌肉营养成分的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(2): 22–26]
- Lim ALL, Ip YK. Effect of fasting on glycogen metabolism and activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in the mudskipper *Boleophthalmus boddarti*. Journal of Fish Biology, 1989, 34(3): 349–367
- Liu B, He QG, Tang YK, *et al.* Effects of starvation on growth, physiological and biochemical parameter of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 230–237 [刘波, 何庆国, 唐永凯, 等. 饥饿胁迫对吉富罗非鱼生长及生理生化指标的影响. 中国水产科学, 2009, 16(2): 230–237]
- Liu B, Wang MY, Xie J, *et al.* Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(17): 4866–4873 [刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响. 生态学报, 2011, 31(17): 4866–4873]
- Liu MH, Luo HZ, Fu RB, *et al.* Biochemical composition, amino acid and fatty acid composition in juvenile of *Miichthys miiuy* under short-time starvation. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 230–235 [柳敏海, 罗海忠, 傅荣兵, 等. 短期饥饿胁迫对鳊鱼生化组成、脂肪酸和氨基酸组成的影响. 水生生物学报, 2009, 33(2): 230–235]
- 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]
- Luk'ianenko VI, Khabarov MV, Luk'ianenko VV. Heterogeneity and polymorphism of functionally specialized blood proteins in migratory fish: The case study of the North Caspian population of the Russian sturgeon during sea and river periods of life. 1. Albumins. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 2002, 29(3): 293–299
- Lv LL, Dong XX, Wang AM, *et al.* Effect of starvation on body composition, trypsinase and amylase in crucian carp *Carassius auratus gibelio*. Reservoir Fisheries, 2007, 27(5): 26–28 [吕林兰, 董学兴, 王爱民, 等. 饥饿对异育银鲫体成分及蛋白酶和淀粉酶的影响. 水利渔业, 2007, 27(5): 26–28]
- Mai KS, Chen LQ, Chen NS, *et al.* Nutrition and feed of aquatic animals. Beijing: China Agriculture Press, 2011, 10–53 [麦康森, 陈立桥, 陈乃松, 等. 水产动物营养与饲料学. 北京: 中国农业出版社, 2011, 10–53]
- Mai KS, Li P, Zhao JM, *et al.* Translation: Nutrient requirements of fish and shrimp. Beijing: China Agriculture Press, 2015, 167 [麦康森, 李鹏, 赵建明, 等主译: 鱼类与甲壳动物营养需要. 北京: 科学出版社, 2015, 167]
- Shi GC, Dong XH, Chen G, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance of genetic improvement of farmed Tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) and its serum biochemical indices and fatty acid composition under cold stress. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(11): 2154–2164 [石桂成, 董晓慧, 陈刚, 等. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长性能及其在低温应急下血清生化指标和肝脏脂肪酸组成的影响. 动物营养学报, 2012, 24(11): 2154–2164]
- Shiau CY, Pong YJ, Chiou TK, *et al.* Effect of starvation on free histidine and amino acids in white muscle of milkfish *Chanos chanos*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(3): 501–506
- Srivastava AR, Kumar S, Agarwal GG, *et al.* Blunt abdominal injury: Serum ALT: A marker of liver injury and a guide to assessment of its severity. Injury, 2007, 38(9): 1069–1074
- Su H, Ou YJ, Li JE, *et al.* Effects of starvation on antioxidative capacity, Na⁺/K⁺-ATPase activity and biochemical composition in juvenile *Trachinotus ovatus*. South China Fisheries Science, 2012, 8(6): 28–36 [苏慧, 区又君, 李加儿, 等. 饥饿对卵形鲳鲹幼鱼不同组织抗氧化能力、Na⁺/K⁺-ATP酶活力和鱼体生化组成的影响. 南方水产科学, 2012, 8(6): 28–36]
- Tian Q, Rong XJ, Li B, *et al.* Starvation stress effect on the immunity and growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(4): 71–76 [田青, 荣小军, 李彬, 等. 饥饿胁迫对刺参免疫和生长的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 71–76]
- Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in Fisheries Science, 2003, 11(2): 107–184
- Tong SY. Changes of fatty acid composition in Carp during winter. Journal of Fishery of China, 1997, 21(4): 373–379 [童圣英. 四种鲤科鱼类越冬时脂肪酸组成的变化. 水产学报, 1997, 21(4): 373–379]
- Wu XX, Zhou QB, Su ZJ. Changes on muscle and liver lipid composition of *Monopterus albus* in overwintering. Feed Industry, 2005, 26(22): 33–34 [吴湘香, 周秋白, 苏增金. 黄鳝越冬前后肌肉及肝脏中脂肪含量变化. 饲料工业, 2005, 26(22): 33–34]
- Xie DZ, Wang SQ, You CH, *et al.* Influencing factors and mechanisms on HUFA biosynthesis in teleosts. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 456–466 [谢帝芝, 王树启, 游翠红, 等. 鱼类高度不饱和脂肪酸合成的影响因素及其机理. 中国水产科学, 2013, 20(2): 456–466]
- Xu H, Zhang DL, Chen QK, *et al.* Effect of starvation on serum biochemical indexes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) at low temperature. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(6): 195–199 [徐浩, 张东玲, 陈庆凯, 等. 低温下饥饿胁迫对大黄鱼血清生化指标的影响. 生物技术通报, 2015, 31(6): 195–199]
- Xu YQ, Chen Z, Ding ZK. Effects of low temperature on fish and its prevention, Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(15): 132–136 [许友卿, 陈哲, 丁兆坤. 低温对鱼类的影响及其预防. 广东农业科学, 2012, 39(15): 132–136]
- Yang DQ, Chen F, Li DX, *et al.* Preliminary study on the food

- composition of mud eel *Monopterus albus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(1): 24–30 [杨代勤, 陈芳, 李道霞, 等. 黄鳝食性的初步研究. *水生生物学报*, 1997, 21(1): 24–30]
- Yu M, Hu XS, Li CT, *et al.* Changes in morphology, histological structure, and biochemical composition during overwintering in Songpu mirror carp, *Cyprinus carpio* var. *Songpu mirror*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 460–468 [于淼, 胡雪松, 李池陶, 等. 松浦镜鲤越冬期的形态、组织结构及生化组成变化. *中国水产科学*, 2015, 22(3): 460–468]
- Zhang CD, Hu YZ, Miao L, *et al.* Changes of fatty acid composition and content in *Pseudosciaena* from net cage during the winter. *Journal of Marine Sciences*, 2014, 32(2): 80–84 [张春丹, 胡玉珍, 苗亮, 等. 网箱养殖大黄鱼越冬期间脂肪酸相对含量变化. *海洋学研究*, 2014, 32(2): 80–84]
- Zhou WZ, Li HT, Zhang L, *et al.* Effects of body weight and water temperature on the maximum ration levels of *Monopterus albus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(6): 889–893 [周文宗, 李洪涛, 张砾, 等. 体重和温度对黄鳝最大摄食率的影响. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 889–893]
- 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]

(编辑 冯小花)

Effects of Overwintering on the Body Biochemical Composition and Serum Biochemical Indices of Rice Field Eel (*Monopterus albus*)

LI Zhaolin^{1,2,4}, LIU Zhuangpeng¹, HE Zhigang³, TIAN Qianqian^{1,2}, ZHANG Junzhi¹,
ZHANG Lu⁴, MI Haifeng⁴, HU Yi^{1,2①}

(1. *Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Hunan Agricultural University, Changsha 410128*; 2. *Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000*; 3. *Hunan Fisheries Science Institute, Changsha 410153*; 4. *Tongwei Co., Ltd, Chengdu 610041*)

Abstract Temperature is one of the key environmental factors affecting the growth and physiological functions of fish. Both the physical activity and the feeding behavior of fish can be significantly reduced or even stopped at low temperature. In this case, fish may consume stored nutrients to stay alive. Rice field eel *Monopterus albus* is a subtropical freshwater fish with great commercial values. They are prone to diseases and have a high mortality rate in winter. Previous studies suggested that overwintering could significantly affect the intestinal digestive enzymes, the immune and antioxidant functions (serum catalase and lysozyme), muscles and the liver lipid content of *M. albus*. However, changes in nutrients and physiological adaptation during overwintering have been unclear. In this study, we conducted a 124-day experiment to investigate effects of overwintering on the body biochemical composition and partial serum biochemical indices of *M. albus* with the initial average body weight of (118.42±4.38) g. Results showed that after overwintering: 1) The compositions of the whole body, the liver and muscles of *M. albus* were significantly affected. The body crude lipid decreased compared to that before overwintering ($P<0.05$), whereas the body moisture and body crude ash were increased ($P<0.05$). The hepatosomatic ratio and the content of the liver glycogen were dramatically reduced ($P<0.01$), but the liver crude lipid was significantly increased ($P<0.05$). In muscles, the level of saturated fatty acids dropped ($P<0.01$), the content of polyunsaturated fatty acids rose ($P<0.05$), and the total amino acids and essential amino acids were markedly increased ($P<0.01$). 2) The serum triglycerides, glucose, total amino acids and essential amino acids became lower than those before overwintering ($P<0.05$), and the level of total serum proteins was greatly increased ($P<0.01$). However, there were no differences in the total cholesterol, the blood urea nitrogen, the aspartate transaminase and the alanine aminotransferase before and after overwintering ($P>0.05$). In conclusion, *M. albus* may consume the liver glycogen and body lipids to maintain life activities during overwintering, which consequently changes the compositions of amino acids and fatty acids in the muscle.

Key words *Monopterus albus*; Overwintering; Body biochemical composition; Serum biochemical indices; Fatty acids; Amino acids

① Corresponding author: HU Yi, E-mail: huyi740322@163.com

急性离水操作胁迫对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼组织结构和氧化应激的影响*

刘奇奇^{1,2} 温久福¹ 区又君^{1①} 李加儿¹ 周 慧^{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 为探究急性离水操作胁迫对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼组织结构和氧化应激的影响,本研究通过组织切片和酶活性测定来观察及检测鳃和肌肉显微结构的变化、抗氧化酶活性以及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,以探究四指马鲛应激反应规律。结果显示,急性离水操作胁迫 2 h 后,鳃小片、扁平上皮细胞以及线粒体丰富细胞都出现不同程度的损伤;肌肉从肌纤维变性、肌纤维束之间的间隙增宽、空泡化至肌肉组织整体失去固有形态,并且呈逐渐分解的趋势;超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)有相同的变化趋势,胁迫后的 2 h 显著下降($P<0.05$),但 12 h 时则升至最高值。过氧化氢酶(CAT)和总抗氧化能力(T-AOC)水平在处理 2 h 无显著变化($P>0.05$),之后升高,直到 12 h 达到峰值。丙二醛(MDA)含量在胁迫后的 2 h 无显著差异($P>0.05$),直到 6 h 达到峰值。SOD 和 CAT 活性在处理 24 h 后显著低于处理前,其他酶变化不显著。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性在处理 2 h 显著升高($P<0.05$),12 h 达到峰值,24 h 恢复到处理前水平。本研究表明,操作胁迫会对鳃和肌肉的组织结构造成损伤,而且随时间持续,损伤呈现加重趋势;肌肉抗氧化酶系统在受到氧化压力 2 h 后才启动,处理后 12 h 肌肉受到的氧化压力最大,抗氧化酶活性最强;在受到外界刺激时,SOD 和 GSH 之间可能存在协同作用;MDA 可以作为四指马鲛氧化损伤的快速响应生物标记物。

关键词 四指马鲛;操作胁迫;抗氧化酶; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0048-08

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)俗称午鱼、马友、章跳、鲤后等,隶属于鲱形目(Mugiliformes)、马鲛科(Polynemidae)、四指马鲛属(孙典荣等,2013),在我国多分布于东海、南海海域,在全球范围内主要分布于中国、日本、越南及东南亚沿海区域(张涛等,2009)。四指马鲛肉质鲜美、生长速度快、经济价值高,极具发展前景。目前,人工繁

育技术已经突破,对四指马鲛胚胎发育、盐度耐受性、消化道结构和功能细胞的发育等已有系统研究(谢木娇等,2015、2016a、2016b),大规模苗种生产技术为其作为新兴养殖品种的推广奠定了物质基础。但是,四指马鲛对应激反应十分敏感,在养殖过程中容易因手工操作受伤死亡,影响了该鱼养殖产业的健康发展。

* 广东省省级科技计划项目(2013B090300009; 2017B020204002; 2017020208001)和广东省海洋渔业科技推广专项科技攻关与研发项目(A201401A05)共同资助[This work was supported by the Provincial Scientific and Technology Planning Project of Guangdong Province (2013B090300009; 2017B020204002; 2017020208001), and Special Item about Science and Technology Research and Development in the Scientific and Technical Extension Project in Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201401A05)]. 刘奇奇, E-mail: 1158055407@qq.com

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

收稿日期: 2016-09-12, 收修改稿日期: 2016-10-06

应激是机体对外界或内部的各种异常刺激所产生的非特异性全身反应,是生物体在长期进化中形成的一种适应性和防御性功能。翁朝红等(2008)的研究表明,在水产养殖生产管理中,一些不可避免的操作,如运输、拉网捕捉、吸残饵排污等,会对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)造成一定的胁迫,从而导致鱼类产生应激反应。这些应激反应会对鱼类的生理生化等方面产生不利影响。孙鹏等(2014)的研究表明,长时间的应激胁迫会降低云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)的抵抗力以及生长速率。目前,有关鱼类环境胁迫的研究相对较多,主要包括盐度对龙虎斑(*Epinephelus ianceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)和鲮(*Mugil cephalus*)(王成桂等, 2014; 于娜等, 2011)、温度对舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)和银鲟(*Pampus argenteus*)(Besson *et al*, 2016; 施兆鸿等, 2016)、pH 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(马广智等, 2001)、鱼毒性赤潮藻对青鳉(*Oryzias latipes*)(李昌伟, 2014)¹⁾、养殖密度对北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)(Wallace *et al*, 1988)的胁迫等,而有关养殖过程中操作胁迫的研究主要集中在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Wiseman *et al*, 2007)、刀鲚(*Coilia nasus*)(王宇等, 2014; 徐钢春等, 2015; 高金伟等, 2015; Du *et al*, 2014),而对四指马鲛的研究相对较少。鱼类机体抗氧化系统在抵御由环境变化导致的氧化压力中有重要作用,包括小分子非酶物质[如谷胱甘肽、维生素 C (V_C)、维生素 E (V_E)]和抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶等)。四指马鲛受到急性应激时口裂完全张开、肌肉抽搐而死。本研究通过模拟拉网对四指马鲛进行操作胁迫,以探究四指马鲛应激反应特点,为其健康养殖技术的建立提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用的四指马鲛于 2015 年 6–8 月在中国水产科学研究院南海水产研究所珠海试验基地培育所得,体长为(6.00±0.21) cm,体重为(4.00±0.15) g。实验开始前暂养 1 周,暂养期间,每天换水 1 次,每次换水量 1/2 左右,连续充气。随机挑选体色正常、健康的幼鱼 240 尾进行实验。

1.2 实验设计

采用操网捕捉的方式对四指马鲛进行急性离水

操作胁迫,每次先将四指马鲛全部聚拢在操网内拥挤胁迫 5 s,然后捞起暴露于空气中 5 s,再放入水中 3 min,重复以上操作共持续 10 个循环。

将四指马鲛分为 3 个平行组,然后胁迫结束后的 2 h、6 h、12 h 和 24 h 以及各时间点的对照组,分别取样 15 尾,采集前先用 MS-222 麻醉实验鱼 2–3 min,解剖鱼体,采集肌肉、鳃组织样品,用作组织切片观察的样品固定于 4%多聚甲醛溶液中;测量酶活的样品置于液氮中保存以备后续实验使用。

1.3 样品测定

组织切片观察,采用区又君等(2015)的研究方法:取多聚甲醛固定的肌肉和鳃,经过流水冲洗、70%–100%的乙醇脱水和二甲苯透明、石蜡包埋处理后,用 Leica 切片机进行连续切片,切片厚度为 5–6 μm,采用 HE 染色和中性树脂封片,于 Zeiss 显微镜下拍照。

肌肉抗氧化酶以及鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性测定,取经液氮固定的肌肉和鳃,准确称取组织重量,按重量(g):体积(ml)=1:9 的比例加入 9 倍生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,250 r/min 离心 10 min,取上清液(10%的组织匀浆液)。按照南京建成试剂盒说明书分别测定酶活,以 BCA 法测定蛋白含量。总抗氧化能力(T-AOC)通过 520 nm 波长 37℃条件下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来测定;过氧化氢酶(CAT)活性通过 405 nm 波长处测定过氧化氢减少量来测定,单位定义为每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为 1 个活性单位;超氧化物歧化酶(SOD)活性单位定义为:反应体系中 SOD 抑制率达到 50%时所对应的酶量为 1 个 SOD 活性单位(U);过氧化脂降解产物丙二醛(MDA)通过 TBA 法来测定,其测定原理为 MDA 分子与硫代巴比妥酸(TBA)分子在酸性条件下共热,形成粉红色复合物,该复合物在波长 532 nm 处有最大吸收峰;还原型谷胱甘肽(GSH)可与二硫代二硝基甲酸(DTNB)反应,生成一种黄色化合物,可在 405 nm 波长处进行比色定量测定 GSH 含量;鳃组织的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性定义为:每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活性单位。

1.4 数据分析

经实验测量得到的数据都表示为平均值±标准差

1) Li CW. The detrimental mechanism of ichthyotoxic microalgae species on marine medaka (*Oryzias melastigma*). Master's Thesis of Jinan University, 2014 [李昌伟. 鱼毒性赤潮藻对海洋青鳉鱼的致害机理研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2014]

(Mean±SD)。利用 Excel 2003 以及 SPSS 22.0 软件进行方差分析, Duncan 氏检验进行显著性分析和多重比较, $P<0.05$ 时, 认为数据有显著性差异。由于对照组在各时间点的数据之间无显著差异($P>0.05$), 故都归于同一组。

2 结果

2.1 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃和肌肉组织形态的影响

2.1.1 鳃 对照组未经胁迫, 鳃组织表现为正常的生理形态, 鳃丝整齐密集, 两侧鳃小片对称完整, 上皮细胞排列规则, 线粒体丰富细胞呈椭圆形(图 1-1)。离水胁迫后 2 h, 鳃组织轻微损伤, 部分鳃丝两侧的鳃小片出现轻微弯曲, 其中, 鳃丝血管、基底层细胞未见异常(图 1-2)。胁迫后 6 h, 鳃组织损伤明显, 鳃小片血管收缩, 血细胞减少且红细胞染色不明显, 着色力减弱, 鳃丝部分区域的鳃小片出现弯曲, 有些在中上部出现断裂。高倍镜下观察, 鳃小片基底部的黏液细胞和线粒体丰富细胞数量增多, 部分细胞出现水肿, 体积增大(图 1-3)。胁迫后 12 h, 鳃损伤更为明显, 主要表现为鳃小片严重弯曲, 其末端出现肿胀, 鳃小片出现多处断裂, 大部分上皮细胞水肿变性

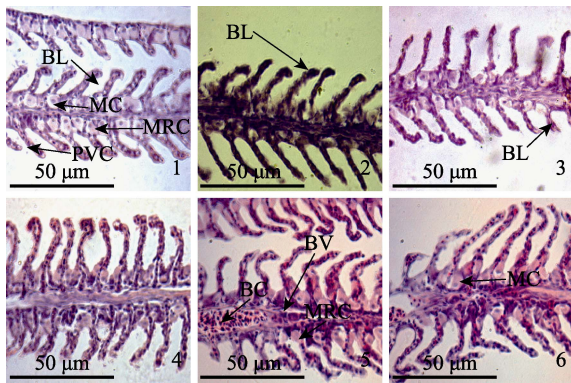


图 1 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃组织结构的影响
Fig.1 The effects of acute off-water handling stress on microstructure of gills of *E. tetradactylum*

1: 对照组; 2: 胁迫后 2 h; 3: 胁迫后 6 h; 4: 胁迫后 12 h; 5、6: 胁迫后 24 h; MC: 黏液细胞; PVC: 扁平上皮细胞; MRC: 线粒体丰富细胞; BL: 鳃小片; BV: 血管; BC: 血细胞
1: Control group; 2: 2 h after off-water handling stress; 3: 6 h after off-water handling stress; 4: 12 h after off-water handling stress; 5 and 6: 24 h after off-water handling stress; MC: Mucous cells; PVC: Pavement cells; MRC: Mitochondrion-rich cells; BL: Gill lamella; BV: Blood vessel; BC: Blood cell

(图 1-4)。胁迫后 24 h, 鳃组织表现为不可逆的损伤, 鳃丝整体偏离正常形态, 鳃小片扭曲紊乱, 细胞变形严重, 部分细胞核发生溶解(图 1-5、图 1-6)。

2.1.2 肌肉 未经胁迫的对照组肌细胞呈现其正常形态, 其外形呈纺锤状, 肌纤维之间排列紧密, 无弯曲现象, 细胞核位于肌纤维的中央一侧(图 2-1); 在胁迫后 2 h, 肌肉组织部分区域出现肌纤维轻微变形扭曲, 纤维束间隙增宽, 肌细胞未见异常(图 2-2)。胁迫后 6 h, 肌组织损伤明显, 肌纤维变形加剧, 部分区域可见纤维束弯曲紊乱, 有些部位发现肌纤维断裂, 肌纤维间隙明显增宽, 形成空泡(图 2-3)。胁迫后 12 h, 肌组织损伤更为明显, 肌纤维排列紊乱, 扭曲变形呈锯齿状, 多处出现肌纤维断裂, 肌细胞轻微变形, 有些部位出现肌细胞核聚集现象, 部分细胞核变形, 肌纤维束间隙增宽, 空泡化严重(图 2-4、图 2-5)。胁迫后 24 h, 肌肉组织损伤程度进一步加重, 而肌纤维和肌细胞变形程度均加深, 肌肉组织整体失去固有形态, 呈逐渐分解的趋势(图 2-6)。

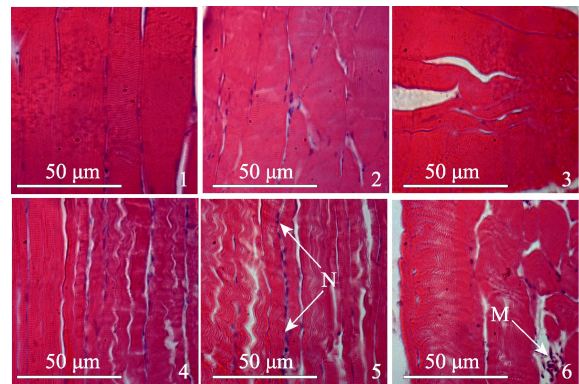


图 2 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉组织结构的影响
Fig.2 The effects of acute off-water handling stress on microstructure of muscles of *E. tetradactylum*

1: 对照组; 2: 胁迫后 2 h; 3: 胁迫后 6 h; 4、5: 胁迫后 12 h; 6: 胁迫后 24 h; N: 细胞核; M: 肌细胞
1: Control group; 2: 2 h after off-water handling stress; 3: 6 h after off-water handling stress; 4 and 5: 12 h after off-water handling stress; 6: 24 h after off-water handling stress; N: Nucleus; M: Muscle cells

2.2 急性离水操作胁迫对四指马鲛相关酶活性的影响

2.2.1 对肌肉 SOD 活性的影响 与对照组相比, 离水胁迫后 2 h 的 SOD 活性显著下降($P<0.05$)。随着时间的延长, SOD 活性渐渐升高, 直到胁迫后 12 h, SOD 活性达到最高值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。处理后 24 h, SOD 活性降到较低水平, 显著低于对照组($P<0.05$)(图 3)。

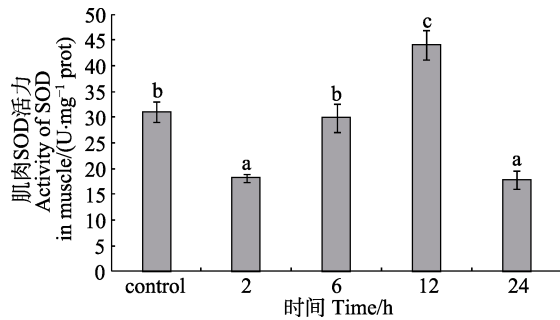


图 3 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 SOD 活性的影响
Fig.3 The effects of acute off-water handling stress on the activity of SOD in muscles of *E. tetradactylum*

不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$), 下同
Different letters indicated significant differences among groups ($P<0.05$), the same as below

2.2.2 对肌肉 CAT 活性的影响 胁迫后 2 h, CAT 活性无明显变化($P>0.05$)。随后, CAT 活性明显升高, 直到 12 h 达到最高值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。处理后 24 h, CAT 活性降到最低值, 显著低于对照组及其他处理组($P<0.05$)(图 4)。

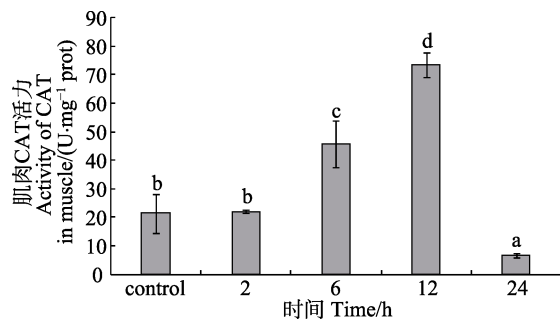


图 4 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 CAT 活性的影响
Fig.4 The effects of acute off-water handling stress on the activity of CAT in muscles of *E. tetradactylum*

2.2.3 对肌肉 MDA 含量的影响 离水胁迫 2 h, 肌肉中 MDA 含量无明显变化($P>0.05$)。处理 6 h 后, MDA 含量达到最大值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。随着时间延长, MDA 含量逐渐降低, 直至 24 h MDA 含量降到处理前水平(图 5)。

2.2.4 对肌肉 GSH 含量的影响 胁迫后 2 h, GSH 含量显著降低($P<0.05$)。随后其含量升高, 直到胁迫后的 12 h GSH 含量达到最高值, 显著高于对照组及其他实验组($P<0.05$)。胁迫后 24 h, GSH 含量恢复到正常水平, 与对照组无显著差异($P>0.05$)(图 6)。

2.2.5 对肌肉 T-AOC 的影响 在胁迫开始的 2 h, 肌肉 T-AOC 无显著变化($P>0.05$)。胁迫后 2-12 h, 肌肉 T-AOC 逐渐升高, 直到胁迫后 12 h 达到最大值。胁迫后 24 h, 肌肉 T-AOC 与对照组无显著差异(图 7)。

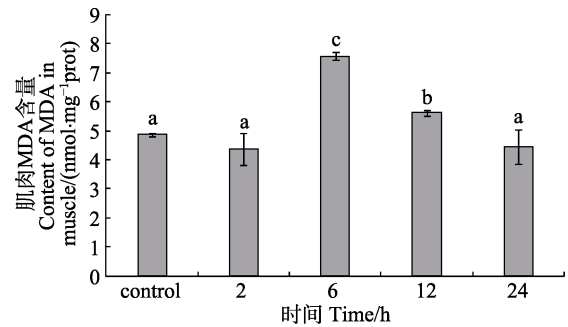


图 5 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉中 MDA 含量的影响

Fig.5 The effects of acute off-water handling stress on the content of MDA in muscles of *E. tetradactylum*

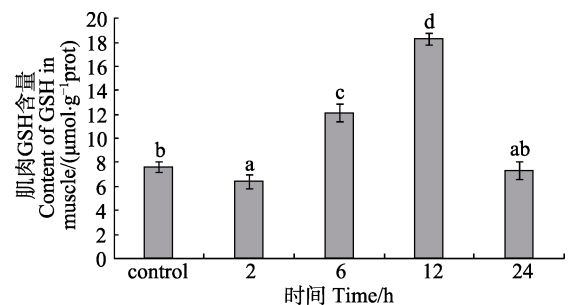


图 6 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉中 GSH 含量的影响

Fig.6 The effects of acute off-water handling stress on the content of GSH in muscles of *E. tetradactylum*

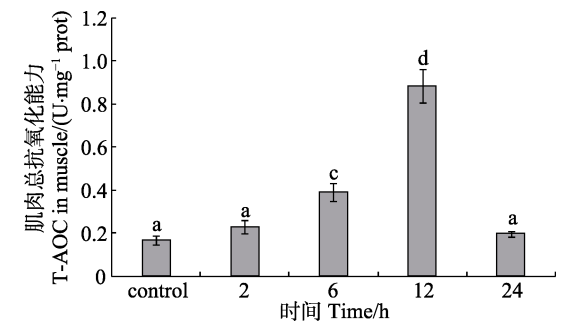


图 7 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 T-AOC 的影响
Fig.7 The effects of acute off-water handling stress on T-AOC in muscles of *E. tetradactylum*

2.2.6 对鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响 离水胁迫后 2 h, 鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性明显升高($P<0.05$); 胁迫后 6 h, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性与胁迫后 2 h 无显著差异($P>0.05$); 胁迫后 12 h, 鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性达到较高水平($P<0.05$), 24 h 后酶活水平下降, 与对照组无显著差异($P>0.05$)(图 8)。

2.3 急性离水操作胁迫后四指马鲛幼鱼的生存状态

未经胁迫的四指马鲛幼鱼表现正常, 即沿暂养池壁集体朝同一方向不停地游动; 胁迫后 2 h, 其主要

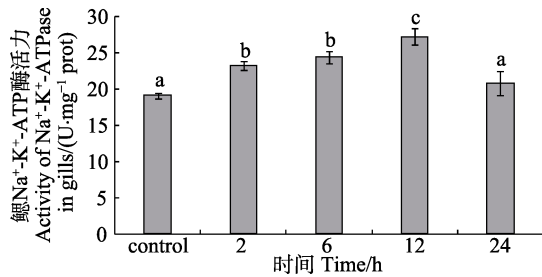


图8 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响

Fig.8 The effects of acute off-water handling stress on the activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills of *E. tetradactylum*

表现为向不同的方向快速、杂乱无章地游动，并撞击池壁；胁迫后6 h，个别幼鱼死亡，其他则仍无规律地游动、撞击池壁，但游动速度明显下降；胁迫后12 h，部分幼鱼死亡，其他则游泳动作不协调，速度减慢，甚至侧游或翻身游动；胁迫后24 h，四指马鲛幼鱼出现大量死亡，剩余幼鱼大部分处于侧游或翻身游动状态。

3 讨论

3.1 操作胁迫对四指马鲛鳃和肌肉组织结构的影响

鱼类在进化过程中对内外界刺激形成了一定的适应能力，轻度刺激可促进鱼类的生长，改善鱼类体质(刘小玲, 2007)。但剧烈或长期的刺激会对鱼体产生危害，导致机体各种生理功能紊乱、甚至死亡。刘小玲(2007)的研究表明，鱼类的应激包括一系列复杂的生理变化，可分为初级、次级和第三级应激反应，其中，次级反应是由初级反应引起的组织和器官水平上的一系列功能和结构的变化。本研究表明，经过急性离水操作胁迫2 h后鳃小片、扁平上皮细胞及线粒体丰富细胞开始出现不同程度的损伤；肌肉从肌纤维变性、肌纤维束之间的间隙增宽，空泡化至肌肉组织整体失去固有形态呈逐渐分解的趋势，表明急性胁迫确实会引起四指马鲛显著的应激反应。急性离水操作胁迫后，鳃小片基底部的线粒体丰富细胞数量增多，这个结果与盐度胁迫遮目鱼(*Chanos chanos*)幼鱼实验的结果(区又君等, 2014)相类似。类比翁朝红等(2008)对大黄鱼的研究结果推测，这可能与四指马鲛为克服操作胁迫造成的应激反应，调动相关生理反应，增加额外的能量代谢有关。鱼类鳃部的黏液细胞可分泌大量黏液性物质，在鳃的表面形成一层对鳃组织具有保护作用的屏障，本研究发现，操作胁迫后6 h，黏液细胞数量增多，体积增大，也是机体抵御应激的保护机制(图 1-3、图 2-3)。在操作胁迫后6 h，鳃和

肌肉的组织结构开始出现损伤，表明胁迫后6 h四指马鲛的应激反应已经进入次级反应阶段，随时间持续操作胁迫对机体鳃和肌肉组织造成的损伤逐渐加剧，表明所施加的胁迫强度已经超出机体能够适应和调控的范围，对鳃和肌肉产生不可逆的损伤。本研究结果显示，在四指马鲛的养殖管理过程中要科学操作，适当添加抗应激制剂，严格控制各种胁迫因子，避免造成不良影响。

3.2 操作胁迫对四指马鲛肌肉抗氧化系统的影响

Martínez-Álvarez 等(2005)的研究表明，通常情况下，鱼体代谢产生的自由基处在动态平衡中。当受到外界环境干扰之后，平衡被打破，自由基大量积累，过量的自由基会对鱼体产生不利影响。一般情况下，鱼体率先利用第一道防线(如 V_C 、 V_E 等小分子非酶物质)清除过多的自由基；当第一道防线不足以清除过多的自由基时，鱼体则会启动第二道防线，即合成相应的抗氧化酶以减少氧化压力。本研究中，操作胁迫后2 h，肌肉 SOD、GSH 活性出现显著性下降，表明 SOD、GSH 可以作为四指马鲛受到氧化应激的灵敏指示物，这也与其功能相一致。CAT、GSH 活性也在操作胁迫后2 h下降，但变化不显著，T-AOC 稍微增加，表明此时肌肉组织主要依靠第一道防线抵御胁迫造成的氧化应激，尚未启动抗氧化酶系统来应对操作胁迫。在整个处理过程中，SOD、GSH 与 CAT 活性有相同的变化趋势，也证明了四指马鲛肌肉组织 SOD、CAT 和 GSH 之间在抗氧化应激方面具有协同作用，此结论与杨唐斌等(1994)的研究结果相似。胁迫后6 h，实验所测抗氧化酶都出现显著增加，表明机体已经启动抗氧化系统清除逐渐增多的自由基，这与孙鹏等(2014)对云纹石斑鱼进行惊扰胁迫的研究结果类似；操作胁迫后12 h，四指马鲛肌肉组织内积累的自由基达到最高峰，随后就逐渐下降，这也是操作胁迫后机体内氧化压力与抗氧化防御响应之间动态互作过程，表明抗氧化酶系统在应对氧化压力过程中发挥主要作用。

Srikanth 等(2013)的研究表明，鱼类氧化应激响应在不同种类的鱼中呈现特定的时间变化趋势。在研究胁迫因子对银鲳、广东鲂(*Megalobrama terminalis*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)影响的实验中发现，随处理时间延长，抗氧化酶呈现增高的变化趋势，之后体内新的平衡机制建立，抗氧化酶活性也恢复到正常水平(尹飞等, 2011; 谢明媚等, 2015; 曾艳艺等, 2014; 孙鹏等, 2010; 张晨捷等, 2015)。本研究中，相应的抗氧化酶活性先下降，可

能是机体尚未形成有效的抵抗机制, 之后才逐渐升高, 并在处理后 24 h 又下降, 这与以上研究结果相似。宋林生等(2004)在温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝胰腺中抗氧化酶活性的研究结果显示, 温度升高后, CAT 和 SOD 马上出现显著降低, MDA 含量一直增加, 认为抗氧化系统受到一定程度的影响, 造成机体细胞结构和功能的丧失。本研究中, 虽然抗氧化酶活性在胁迫后 2 h 出现下降, 但从 6 h 又出现上升, 表明其细胞结构和功能仍然正常, 其下降的原因可能是四指马鲛迅速启动第一道防线, 大量释放还原性物质 V_C 、 V_E 消除自由基, 导致机体氧化水平迅速降低有关, 但具体作用机制还需要进一步的深入研究。在处理后 24 h, SOD、CAT、MDA 和 GSH 抗氧化指标均低于处理前, 而 T-AOC 和处理前保持一致, 表明此时肌肉组织的氧化应激主要是非酶促反应。在本研究中, 只观察到胁迫后 24 h 的变化过程, 尚不能判定四指马鲛肌肉抗氧化酶系统是否受到损伤, 故不能确定其抗氧化酶系统和氧化压力之间平衡机制是否仍然有效运行。基于本研究结果, 初步认为四指马鲛肌肉组织应对氧化应激的策略是先依靠第一道防线, 然后启动抗氧化酶系统, 新平衡建立阶段仍然是非酶促反应。

3.3 操作胁迫对四指马鲛肌肉 MDA 含量的影响

Papadimitriou 等(2002)对湖蛙(*Rana ridibunda*)的研究表明, 细胞中过氧化脂降解产物 MDA 的含量反映了机体脂质过氧化程度, 其间接反映了细胞损伤程度。本研究中, 胁迫处理后 2 h, MDA 含量逐渐升高直到 6 h 达到最高值, 之后 MDA 降低(图 3), 这表明, 操作胁迫后 6 h MDA 含量逐渐积累到最大值, 机体细胞已经受到损伤, 这也与组织切片观察的结果相一致。然而, 其他抗氧化酶在胁迫后 12 h 活性最高, MDA 高峰出现早于其他抗氧化酶, 表示如果抗氧化酶不能及时清除多余的自由基, 膜脂氧化的程度就会加重。表明鱼体通过调节体内抗氧化酶活性, 可以使体内脂质过氧化程度降低。本研究结果显示, MDA 可以作为四指马鲛氧化损伤的快速响应生物标记物。

3.4 操作胁迫对四指马鲛 Na^+K^+ -ATPase 活性的影响

尹飞等(2011)的研究表明, Na^+K^+ -ATPase 是组成 Na^+K^+ 泵活性的主要部分, Na^+K^+ -ATPase 可水解 ATP 产生 ADP 和能量, 同时也是一项评价环境胁迫影响的生物学指标。经过离水胁迫后, 四指马鲛幼鱼鳃中 Na^+K^+ -ATPase 活性显著升高($P<0.05$), 直到胁迫后 12 h, Na^+K^+ -ATPase 活性达到峰值。组织学观察结果也显示, 鳃小片基底部的线粒体丰富细胞数量

增多, 这两方面的结果相互支持, 表明四指马鲛鳃在应对氧化应激过程中耗能较大, 需要 Na^+K^+ -ATPase 活性增强, 提供抗氧化应激所需能量。胁迫处理后 24 h, Na^+K^+ -ATPase 活性和处理前无显著差异, 表明鳃结构和功能尚未受到严重破坏, 由于氧化压力降低, 鳃中 Na^+K^+ 泵耗能也恢复到处理前水平。

参 考 文 献

- Besson M, Vandeputte M, van Arendonk JAM, et al. Influence of water temperature on the economic value of growth rate in fish farming: The case of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cage farming in the Mediterranean. *Aquaculture*, 2016, 462: 47-55
- Du FK, Xu GC, Nie ZJ, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response. *BMC Genomics*, 2014, 15: 558
- Gao JW, Du FK, Gu RB, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizin on transport response in *Coilia nasus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(6): 817-825 [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(6): 817-825]
- Liu XL. Studies on the emergency responses of fishes. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(3): 1-3 [刘小玲. 鱼类应激反应的研究. *水利渔业*, 2007, 27(3): 1-3]
- Ma GZ, Tang M, Xu J. Effects of low pH on superoxide dismutase (SOD) activities of branchial and liver tissue of grass carp. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 23-25 [马广智, 唐玫, 徐军. 低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 23-25]
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88
- Ou YJ, Lin XZ, Li JE, et al. The morphological structure of mitochondrion-rich cells in the gills of juveniles of the milkfish (*Chanos chanos*) and its changes in various salinities. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2014, 36(12): 1622-1629 [区又君, 林先智, 李加儿, 等. 遮目鱼幼鱼鳃线粒体丰富细胞的形态结构及其在不同盐度下的变化. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(12): 1622-1629]
- Ou YJ, Liu JH, Li JE, et al. Morphology and histology of head-kidney and spleen in *Cromileptes altivelis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(11): 2034-2039 [区又君, 刘江华, 李加儿, 等. 驼背鲈头肾和脾脏的形态组织学观察. *南方农业学报*, 2015, 46(11): 2034-2039]
- Papadimitriou E, Loumbourdis NS. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 69(6): 885-891
- 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]
- Song LS, Ji YB, Cai ZH, *et al.* The immunochemical variation of mitten hand crab *Eriocheir sinensis* after the increment of temperature. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(1): 74–77 [宋林生, 季延宾, 蔡中华, 等. 温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几种免疫化学指标的影响. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 74–77]
- Srikanth K, Pereira E, Duarte AC, *et al.* Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(4): 2133–2149
- Sun DR, Chen Z. The retrieval of fishes in South China Sea. Beijing: Ocean Press, 2013, 380–382 [孙典荣, 陈铮. 南海鱼类检索. 北京: 海洋出版社, 2013, 380–382]
- Sun P, Yin F, Peng SM, *et al.* Effects of salinity on the activity of antioxidant enzymes in livers of juvenile *Oplegnathus fasciatus*. *Marine Fisheries*, 2010, 32(2): 154–159 [孙鹏, 尹飞, 彭士明, 等. 盐度对条石鲷幼鱼肝脏抗氧化酶活力的影响. 海洋渔业, 2010, 32(2): 154–159]
- Sun P, Yin F, Wang JJ, *et al.* Effects of handling stress activities of antioxidant enzymes in liver and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase in gill of *Epinephelus moara*. *Marine Fisheries*, 2014, 36(3): 247–251 [孙鹏, 尹飞, 王建建, 等. 操作胁迫对云纹石斑鱼肝脏抗氧化和鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 活力的影响. 海洋渔业, 2014, 36(3): 247–251]
- Wallace JC, Kolbeinshavn AG, Reinsnes TG. The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, 1988, 73(1–4): 101–110
- Wang CG, Liang HF, Huang DK, *et al.* Effect of different salinity on growth and feeding of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(4): 40–44 [王成桂, 梁华芳, 黄东科, 等. 不同盐度对龙虎斑生长和摄食的影响. 广东海洋大学学报, 2014, 34(4): 40–44]
- Wang Y, Lu DQ, Li WP, *et al.* The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 803–812 [王宇, 卢丹琪, 李伟萍, 等. 急性操作胁迫对刀鲚应激反应相关神经内分泌因子的影响. 水产学报, 2014, 38(6): 803–812]
- Weng ZH, Wang ZY, Xie FJ, *et al.* Effect of handling stress on fingerlings of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(1): 100–105 [翁朝红, 王志勇, 谢芳靖, 等. 操作胁迫对大黄鱼幼鱼的影响. 中国水产科学, 2008, 15(1): 100–105]
- Wiseman S, Osachoff H, Bassett E, *et al.* Gene expression pattern in the liver during recovery from an acute stressor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(3): 234–244
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, *et al.* A comparative histochemical study on mucous cells in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* with juvenile, young and adult fish. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(9): 1226–1234 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 四指马鲛稚鱼、幼鱼和成鱼消化道黏液细胞组织化学研究. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(9): 1226–1234]
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, *et al.* Histology observation in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* at different developmental stages. *South China Fisheries Science*, 2016a, 12(2): 51–58 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 不同发育阶段的四指马鲛消化道组织学比较研究. 南方水产科学, 2016a, 12(2): 51–58]
- Xie MJ, Ou YJ, Wen JF, *et al.* Salinity tolerance of fertilized eggs and larva *Eleutheronema tetradactylum*. *Chinese Journal of Ecology*, 2016b, 35(5): 1263–1267 [谢木娇, 区又君, 温久福, 等. 四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)受精卵和仔鱼对不同盐度的耐受性. 生态学杂志, 2016b, 35(5): 1263–1267]
- Xie MM, Peng SM, Zhang CJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(6): 541–549 [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541–549]
- Xu GC, Du FK, Nie ZJ, *et al.* Effects of 10‰ salinity to the plasma osmotic pressure, cortisol, glucose and liver glycogen in *Coilia nasus* stressed during loading and transportation. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 66–72 [徐钢春, 杜富宽, 聂志娟, 等. 10‰盐度对长江刀鲚幼鱼装载和运输胁迫中应激指标的影响. 水生生物学报, 2015, 39(1): 66–72]
- Yang TB, Mei SY. Stress response and antioxidant enzymes. *Space Medicine & Medical Engineering*, 1994, 7(1): 75–78 [杨唐斌, 梅尚筠. 应激反应与抗氧化酶. 航天医学与医学工程, 1994, 7(1): 75–78]
- 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 N, Li JE, Ou YJ, *et al.* Effects of salinity stress and diurnal variation on digestive enzyme activity of juvenile grey mullet (*Mugil cephalus*). *South China Fisheries Science*, 2011, 7(6): 52–57 [于娜, 李加儿, 区又君, 等. 盐度胁迫和昼夜变化对鲮鱼幼鱼消化酶活力的影响. 南方水产科学, 2011, 7(6): 52–57]
- Zeng YY, Lai ZN, Yang WL, *et al.* Responses towards oxidative stress of juvenile Guangdong bream *Megalobrama terminalis* to Cu^{2+} and Cd^{2+} exposure. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(12): 1972–1979 [曾艳艺, 赖子尼, 杨婉玲, 等. 广东鲮幼鱼对铜、镉胁迫的氧化应激响应及其指示意义. 生态环境学报, 2014, 23(12): 1972–1979]
- Zhang CJ, Zhang YL, Gao QX, *et al.* Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea albiflora*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 59–64 [张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响. 南方水产科学, 2015, 11(4): 59–64]
- Zhang T, Zhuang P, Liu J, *et al.* Species composition and biodiversity of fish community in Chongming Dongtan of Yangtze River estuary. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2056–2062 [张涛, 庄平, 刘健, 等. 长江口崇明东滩鱼类群落组成和生物多样性. 生态学杂志, 2009, 28(10): 2056–2062]

The Effects of Acute Off-Water Handling Stress on the Tissue Structure and Oxidative Stress of Juvenile *Eleutheronema tetradactylum*

LIU Qiqi^{1,2}, WEN Jiufu¹, OU Youjun^{1①}, LI Jiaer¹, ZHOU Hui^{1,2}

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

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

Abstract *Eleutheronema tetradactylum* is subordinate to Mugiliformes, Polynemida, *Eleutheronema* in taxonomy. As a new aquaculture species, it has gained popularity in most farmers in recent years because of the delicious meat, the fast growth, the high market value and other advantages. However, this species is prone to stress from the pulling capture and the transport due to its weak anti-stress ability. In order to understand the effects of acute off-water handling stress on the tissue structure and oxidative stress of juvenile *E. tetradactylum*, we stocked the juvenile fish in the outdoor water tank and stressed them by simulating the pulling capture. The samples were collected at 2 h, 6 h, 12 h and 24 h after the off-water handling stress, and fixed separately with poly formaldehyde and liquid nitrogen. The samples fixed with poly formaldehyde were used in tissue sectioning and we observed the changes in the micro-structure of gills and muscles. The samples fixed with liquid nitrogen were used to examine the activities of antioxidant enzymes in muscles and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills. Results showed that varying degrees of damages were induced in the gill lamella, the squamous epithelium cells and mitochondrion-rich cells (MRC) in 2 h after stress. Firstly, the muscle fiber necrosis appeared and then the gap of muscle fiber became widened, followed by vacuolation and even muscle fiber loss. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) had the same changing pattern, which was a significant drop ($P<0.05$) in 2 h after stress, followed by the rise to the highest level 12 h later. Then they began to decline slightly lower than the control level at 24 h. Catalase (CAT) and total antioxidant capacity (T-AOC) did not change significantly ($P>0.05$) at the beginning of 2 h, but then it rose to a highest value at 12 h and subsequently recovered to the normal level at 24 h. The content of malondialdehyde (MDA) did not have a marked change ($P>0.05$), and it reached the highest value at 6 h, and then fell back to the normal value at 24 h. The activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was elevated ($P<0.05$) at 2 h, stayed stable, and rose again until 12 h when it reached the highest value, then it went back to the normal value at 24 h. In conclusion, muscles and gills of *E. tetradactylum* will be damaged by acute off-water handling stress; besides, the damage will deteriorate as the off-water time goes over. The muscle antioxidant enzyme system will only be activated at 2 h after the handling stress. The synergy may exist between SOD and GSH when the organism was stressed by external factors. At 24 h after the stress, the activities of SOD and CAT will be in a state of equilibrium and the values will be significantly lower ($P<0.05$) than the control level, and this explains that antioxidant enzymes were affected to certain extent by off-water handling stress. In addition, MDA, the degrading product of peroxide lipid, can be used as a biological marker of rapid stress response in *E. tetradactylum*. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills can provide energy support during this process to improve the anti-stress ability of *E. tetradactylum*.

Key words *Eleutheronema tetradactylum*; Handling stress; Antioxidant enzymes; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

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

DOI: 10.11758/yykxjz.20161009001

http://www.yykxjz.cn/

姜黄素对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 生长、消化与抗氧化能力的影响*



张滕闲^{1#} 陈钱^{1#} 张宝龙² 林城丽¹ 朱国霞¹ 方珍珍¹ 白东清^{1①}

(1. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384;
2. 天津现代晨辉科技集团有限公司 天津 301800)

摘要 选取初始体重为(13.17±0.68) g、初始体长为(11.86±0.53) cm黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 720尾,随机分为6组,每组3个重复,每个重复40尾鱼。分别投喂添加0、50、100、200、400、800 mg/kg姜黄素的实验饲料,分别标记为T1-T6。实验周期为60 d,实验结束后,测定黄颡鱼生长、消化和抗氧化能力指标。结果显示,各实验组特定增长率和存活率均显著高于对照组($P<0.05$), T4组增重率和蛋白质效率显著高于对照组($P<0.05$), T3、T4组饲料系数显著低于对照组(T1组)($P<0.05$); T3、T4、T5组前肠脂肪酶活力显著高于对照组($P<0.05$), T4组前肠淀粉酶活力显著高于对照组($P<0.05$); T6组肝胰脏、T5组脑与T4组头肾超氧化物歧化酶(SOD)活力均较对照组有显著提升($P<0.05$); 脑实验各组丙二醛(MDA)含量均显著低于对照组($P<0.05$); T6组肝胰脏、T5组脾脏过氧化氢酶(CAT)活力显著高于对照组($P<0.05$); T4组肝胰脏、T5组脾脏、T5组中肾谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力显著提升($P<0.05$); 血清实验各组GSH-PX活力均显著高于对照组($P<0.05$); 肝胰脏实验各组谷胱甘肽(GSH)含量均显著高于对照组($P<0.05$); T5组肝胰脏、T4组脾脏和血清一氧化氮(NO)含量显著高于对照组($P<0.05$)。研究表明,在饲料中添加适量的姜黄素可以显著提高黄颡鱼的生长性能、消化能力以及抗氧化能力,以200 mg/kg添加量为最佳。

关键词 姜黄素; 黄颡鱼; 生长; 消化能力; 抗氧化能力

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0056-08

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是一种小型底层淡水经济鱼类,在我国众多水域都有分布,尤其是在长江中下游的湖泊、池塘、溪流中分布广泛(倪勇等, 2006; 李明锋, 2010)。黄颡鱼对生态环境适应性强,且具有极强的耐受性,其味道鲜美,营养价值高,深受人们青睐。随着养殖规模的扩大和养殖密度的增加,黄颡鱼的抗应激能力下降,疾病频发,经济损

失很大,开发黄颡鱼用纯天然环保型免疫增强剂迫在眉睫。

姜黄素(Curcumin)是从植物姜黄(*Curcumin longa* L)中提取的一种黄色酸性酚类物质,是姜黄发挥药理作用最主要的活性成分,主要产于中国、日本、印度等国家热带、亚热带地区(杨小萍等, 2009)。姜黄素色泽稳定且无毒,已经被广泛用作食品色素和调味

* 天津市科委科技特派员项目(16JCTPJC44600)、天津市科委农业科技成果转化项目(16YFNZNC00070)、国家级大学生创新项目(201610061042)和天津市农委“天津市水产产业技术体系创新团队”(ITFRS2017001)共同资助[This work was supported by the Tianjin Science and Technology Correspondent Project (16JCTPJC44600), Tianjin Agriculture Science and Technology Achievements Transformation Projects (16YFNZNC00070), the National College Students' Innovation Project (201610061042) and Innovation Team of Tianjin Fisheries Research System(ITFRS2017001)]. 张滕闲, E-mail: 496072329@qq.com

#共同第一作者

① 通讯作者: 白东清, 教授, E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn

收稿日期: 2016-10-09, 收修改稿日期: 2016-11-30

剂。随着对姜黄素研究的不断深入, 其抗炎、抑菌、抗氧化、增强免疫等功能不断被人们发掘(顾军等, 2000)。但姜黄素在水产方面应用的报道仍较少。故本研究通过在黄颡鱼饲料中添加不同水平的姜黄素, 探讨其对黄颡鱼生长、肠道消化酶活性和抗氧化能力的影响, 以期姜黄素在黄颡鱼饲料中的应用提供进一步参考。

1 材料与方法

1.1 姜黄素

购于郑州永尚化工产品有限公司, 纯度为 10%。

1.2 实验设计与饲养管理

实验在天津市蓝科水产有限公司进行, 选取健康的 1 龄黄颡鱼 720 尾, 平均体重为(13.17±0.68) g, 初始体长为(11.86±0.53) cm, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 40 尾鱼。在基础饲料中添加 0、50、

100、200、400、800 mg/kg 姜黄素的 6 种实验饲料, 分别饲喂 6 组实验鱼, 分别标记为 T1-T6, T1 为对照组。各种原料经粉碎机粉碎后, 过 60 目筛, 混匀加水, 用江苏牧羊集团牧羊 MUZLM V4 型饲料制粒机加工成粒径为 2 mm 的沉性颗粒饲料, 于室温通风处晾干 2 h, 保存于-20℃冰箱中待用。

每组实验鱼饲养在 1.5 m (直径)×0.75 m (高)的玻璃拉丝鱼缸中, 实验期间水温为(24±2)℃, 连续充氧, 每天换水 1/2, 日投饲率为 3%, 每天投喂 2 次, 根据具体情况进行调整。实验周期为 60 d。实验饲料组成及营养水平见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 养殖实验结束后, 每个重复随机抽取黄颡鱼 15 尾, 使用 MS-222 麻醉, 擦拭体表后, 使用 2 ml 一次性无菌注射器进行尾静脉取血, 4500 r/min 离心 15 min, 制得血清样品。在冰浴条件下解剖抽血后的黄颡鱼, 剥取脑、鳃、肝胰脏、脾脏、

表 1 实验饲料组成及营养水平(风干基础)
Tab.1 Formulation and nutrient composition of test diets (Air-dry basis)(%)

原料成份 Ingredients	饲料组 Dietary group					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
鱼粉 Fish meal	29	29	29	29	29	29
豆粕 Soybean meal	20	20	20	20	20	20
面粉 Flour	13	13	13	13	13	13
花生粕 Peanut meal	8	8	8	8	8	8
菜粕 Canola meal	13	13	13	13	13	13
麸皮 Bran	8.50	8.45	8.40	8.30	8.10	7.70
豆油 Soybean oil	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
预混料 Premix ¹⁾	4	4	4	4	4	4
羧甲基纤维素 CMC	2	2	2	2	2	2
姜黄素 Curcumin	0	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
合计 Total	100	100	100	100	100	100
营养组成 Proximate composition						
粗蛋白 Crude protein	38.67	38.67	38.65	38.64	38.61	38.56
粗脂肪 Crude lipid	6.28	6.28	6.28	6.28	6.27	6.26
总能 General energy (MJ/kg) ²⁾	11.95	11.95	11.95	11.94	11.93	11.91
粗灰分 Crude ash	10.15	10.18	10.12	10.16	10.09	10.13
水分 Moisture	6.33	6.42	6.29	6.37	6.85	6.62

1) 预混料为每千克饲料提供: Fe 150 mg, Zn 30 mg, Mn 13 mg, Cu 3 mg, Co 0.1 mg, I 0.6 mg, Se 0.15 mg, 维生素 C 100 mg, 维生素 B1 3 mg, 维生素 B2 10 mg, 维生素 B6 12 mg, 泛酸钙 30 mg, 烟酸 30 mg, 生物素 0.1mg, 叶酸 2 mg, 维生素 B12 0.01 mg, 肌醇 mg, 胆碱 1000 mg, 维生素 A 2000 IU, 维生素 D3 1000 IU, 维生素 E 60 mg, 维生素 K 6 mg

2) 总能为计算值总能=(总蛋白×5.64+总脂肪×9.44+总糖×4.11)/100×4.184

1) Premix provided the following per kg of diet: Fe 150 mg; Zn 30 mg; Mn 13 mg; Cu 3 mg; Co 0.1 mg; I 0.6 mg; Se 0.15 mg; V_C 100 mg; V_{B1} 3 mg; V_{B2} 10 mg; V_{B6} 12 mg; Calcium pantothenate 30 mg; Nicotinic acid 30 mg; Biotin 0.1mg; Folic acid 2 mg; V_{B12} 0.01 mg; Inositol 1400 mg; Choline 1000 mg; V_A 2000 IU; V_{D3} 1000 IU; V_E 60 mg; V_K 6 mg

2) Total energy can always be equal to (total protein×5.64+total fat×9.44+total sugar×4.11)/100×4.184

中肾、头肾、前肠、中肠、后肠、胃组织。从食道括约肌后到第一个弯曲止为前肠,中肠自第一弯曲到第二弯曲止,此后至肛门一段的直肠为后肠。肠道、胃组织按质量体积比 1:4 加入预冷生理盐水,其余组织加入 1:9 预冷生理盐水,所有组织均用 YQ-3 型电动匀浆机在冰浴条件下进行组织匀浆。匀浆液使用 Eppendorf 冷冻离心机于 4℃、3000 r/min 离心 15 min,提取上清液即为粗酶液。

1.3.2 生长指标的测定

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

特定增长率(SGR, %/d)= $(\ln W_t - \ln W_0) \times 100 / t$;

饲料系数(FCR)= $I_d / (W_t - W_0)$

蛋白质效率(PER, %)= $(W_t - W_0) / (I_d \times P_d)$;

存活率(SR, %)= $N_t \times 100 / N_0$

式中, W_t 和 W_0 分别为鱼的终末体重和初始体重(g); t 为实验天数; I_d 为摄食量的干重(g); N_t , N_0 分别为实验末期和初期的鱼体总数; P_d 为饲料中蛋白含量。

1.3.3 生化指标的测定 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、一氧化氮(NO)、消化酶等指标,均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

1.3.4 饲料常规成分测定方法 参照最新国标要求,测定饲料常规成分含量,方法如下:水分用 105℃ 常压恒温烘干法(GB/T5009.3-2010)测定,粗蛋白用杜马斯灼烧法(GB/T24318-2009)测定,粗脂肪用索氏抽提法(GB/T5009.6-2010)测定,粗灰分用 550℃ 高温灼烧法(GB/T5009.4-2010)测定。

1.4 数据处理

实验数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示,数据分析采用 SPSS 17.0 软件中的单因素方差分析(One-

way ANOVA)处理,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 姜黄素对黄颡鱼生长性能的影响

投喂添加不同水平姜黄素的饲料,60 d 后,测定实验鱼的体重和体长,计算增重率、特定增长率、存活率、饲料系数和蛋白质效率(表 2)。从表 2 可以看出,随着姜黄素含量的增加,增重率呈现先升高后下降的变化趋势,其中, T4 组增重率显著高于对照组 ($P < 0.05$),其余各组之间差别不显著 ($P > 0.05$); 特定增长率呈现先升高后下降的变化趋势,各实验组均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 饲料系数呈现先下降后升高的变化趋势, T3、T4 组饲料系数显著低于对照组 ($P < 0.05$); 存活率呈现先升高后下降的变化趋势,各实验组均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 蛋白质效率呈现先升高后下降的变化趋势,其中, T4 组蛋白质效率与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$),其余各组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。参考生长指标,200 mg/kg 姜黄素水平(第 4 组)可显著提高黄颡鱼生长性能。

2.2 姜黄素对黄颡鱼消化酶活力的影响

黄颡鱼脂肪酶活力为前肠>中肠>胃>后肠。前肠 T3 组、T4 组、T5 组脂肪酶活力显著高于对照组 ($P < 0.05$),随着姜黄素添加量的升高,脂肪酶活力呈现先上升后下降的趋势; T5 组后肠脂肪酶活力显著高于对照组 ($P < 0.05$); 各实验组,中肠脂肪酶活力与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$); T5、T6 组胃脂肪酶显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

黄颡鱼淀粉酶活力为中肠>后肠>前肠>胃。T4 组前肠淀粉酶活力显著高于对照组 ($P < 0.05$),随着姜黄素添加量的升高,淀粉酶活力呈现先上升后下降的趋势; 各实验组中肠、后肠和胃淀粉酶活力与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 姜黄素对黄颡鱼生长指标的影响

Tab.2 Effects of dietary curcumin at different levels on the growth performance of *P. fulvidraco*

组别 Groups	增重率 WGR (%)	特定增长率 SGR (%/d)	饲料系数 FCR	存活率 SR (%)	蛋白质效率 PER (%)
T1	131.05±13.28 ^b	1.39±0.09 ^d	1.93±0.05 ^a	81.67±1.44 ^c	1.43±0.15 ^b
T2	135.84±13.16 ^{ab}	1.54±0.06 ^c	1.70±0.02 ^{abc}	85.83±1.44 ^b	1.49±0.14 ^{ab}
T3	142.82±13.21 ^{ab}	1.73±0.03 ^b	1.61±0.03 ^{bc}	86.67±1.44 ^b	1.56±0.14 ^{ab}
T4	163.18±5.00 ^a	1.84±0.02 ^a	1.47±0.05 ^c	88.33±1.44 ^b	1.79±0.05 ^a
T5	144.96±27.37 ^{ab}	1.66±0.00 ^b	1.70±0.33 ^{abc}	93.33±1.44 ^a	1.59±0.30 ^{ab}
T6	135.54±4.82 ^{ab}	1.52±0.03 ^c	1.87±0.17 ^{ab}	86.67±1.44 ^b	1.51±0.08 ^{ab}

注: 同列数据上标字母不同者之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 下同

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

黄颡鱼蛋白酶活力为胃>前肠>中肠>后肠。T2 组黄颡鱼中肠蛋白酶活力显著高于对照组($P<0.05$)。各实验组前肠、后肠和胃蛋白酶活力与对照组相比无显著差异($P>0.05$)(表 3)。

2.3 姜黄素对黄颡鱼各组织抗氧化能力的影响

2.3.1 姜黄素对黄颡鱼各组织 SOD 活力的影响

黄颡鱼体内 SOD 活力为脑>鳃>肝胰脏>脾脏>中肾>头肾>血清(表 4)。与对照组相比, T6 组肝胰脏、T5 组脾脏、T4 组头肾的 SOD 活力均有显著提升($P<0.05$)。T4 组鳃、T5 组脑、各组血清的 SOD 活力与对照组相比显著升高($P<0.05$)。

2.3.2 姜黄素对黄颡鱼各组织 MDA 含量的影响

黄颡鱼体内 MDA 含量为肝胰脏<鳃<头肾<中肾<血清<脾脏<脑(表 5)。T4 组肝胰脏的 MDA 含量显著低于对照组($P<0.05$); T5、T6 组头肾的 MDA 含量均显著低于对照组($P<0.05$); 实验各组脑的 MDA 含量均显著低于对照组($P<0.05$); 其余各组织实验组的

MDA 含量与对照组相比无显著差异($P>0.05$)(表 5)。

2.3.3 姜黄素对黄颡鱼各组织 CAT 活力的影响

黄颡鱼体内各组织 CAT 活力为肝胰脏>脑>鳃>血清>中肾>头肾>脾脏。T6 组肝胰脏、T5 组脾脏的 CAT 活力显著高于对照组($P<0.05$); 其余组织的 CAT 活力与对照组相比无显著差异($P>0.05$)(表 6)。

2.3.4 姜黄素对黄颡鱼各组织 GSH-PX 活力的影响

黄颡鱼体内各组织 GSH-PX 活力为头肾>肝胰脏>血清>中肾>脾脏>鳃>脑。与对照组相比, T4 组肝胰脏、T5 组脾脏与 T5 组中肾的 GSH-PX 活力显著提升($P<0.05$); 各组血清的 GSH-PX 活力均显著高于对照组($P<0.05$), 且呈现先上升后下降的趋势; 姜黄素对黄颡鱼头肾、鳃、脑的 GSH-PX 活力无显著影响($P>0.05$)(表 7)。

2.3.5 姜黄素对黄颡鱼各组织 GSH 含量的影响

黄颡鱼体内各组织 GSH 含量为血清>脑>头肾>肝胰脏>鳃>中肾>脾脏。各组肝胰脏的 GSH 含量均显著高于对照组($P<0.05$), 且呈现先上升后下降的趋势;

表 3 姜黄素对黄颡鱼消化酶活力的影响

Tab.3 Effects of dietary curcumin at different levels on the digestive enzyme activities of *P. fulvidraco* (U/g prot)

项目 Items	组织 Tissue	姜黄素添加组 Curcumin groups					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
脂肪酶 LPS	前肠 Foregut	52.55±4.89 ^b	99.30±1.87 ^{ab}	109.08±10.73 ^a	121.57±53.83 ^a	115.97±6.61 ^a	75.28±29.41 ^{ab}
	中肠 Midgut	50.23±4.29 ^a	38.79±9.12 ^a	45.01±13.38 ^a	68.41±26.86 ^a	60.01±18.84 ^a	58.56±5.27 ^a
	后肠 Hindgut	28.87±4.30 ^b	42.26±10.57 ^{ab}	42.51±9.54 ^{ab}	39.98±6.56 ^{ab}	59.25±14.95 ^a	41.33±18.43 ^{ab}
	胃 Stomach	36.02±6.42 ^b	45.86±9.71 ^a	28.98±3.34 ^b	30.76±8.14 ^b	46.89±24.19 ^a	51.50±15.11 ^a
淀粉酶 AMS	前肠 Foregut	1.32±0.59 ^b	2.73±1.35 ^{ab}	3.25±2.07 ^{ab}	3.54±0.77 ^a	2.69±0.51 ^{ab}	2.67±0.08 ^{ab}
	中肠 Midgut	13.07±1.42 ^a	13.07±4.69 ^a	11.03±0.93 ^a	9.95±1.20 ^a	12.49±2.19 ^a	12.68±0.99 ^a
	后肠 Hindgut	2.29±1.57 ^a	2.22±1.59 ^a	2.35±2.08 ^a	2.05±0.58 ^a	3.27±0.71 ^a	3.01±1.32 ^a
	胃 Stomach	0.78±0.22 ^a	0.38±0.17 ^b	0.50±0.06 ^{ab}	0.71±0.13 ^{ab}	0.63±0.32 ^{ab}	0.42±0.22 ^{ab}
蛋白酶 TRY	前肠 Foregut	67.82±8.76 ^a	62.56±3.55 ^a	61.59±4.12 ^a	64.51±16.95 ^a	64.70±7.59 ^a	69.70±3.68 ^a
	中肠 Midgut	64.96±13.28 ^{ab}	54.65±5.64 ^b	57.77±6.36 ^{ab}	72.55±4.11 ^a	63.47±12.75 ^{ab}	65.03±5.59 ^{ab}
	后肠 Hindgut	63.60±9.89 ^a	54.72±7.98 ^a	57.31±12.49 ^a	48.10±11.68 ^a	57.18±12.00 ^a	68.34±11.05 ^a
	胃 Stomach	109.58±5.64 ^a	112.50±1.66 ^a	107.83±4.13 ^a	106.34±4.99 ^a	100.00±3.97 ^a	122.75±3.41 ^a

表 4 姜黄素对黄颡鱼各组织 SOD 活力的影响

Tab.4 Effects of dietary curcumin at different levels on the SOD activities of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas (U/mg prot)	脾脏 Spleen (U/mg prot)	中肾 Middle kidney (U/mg prot)	头肾 Head kidney (U/mgprot)	鳃 Gill (U/mg prot)	脑 Brain (U/mg prot)	血清 Serum (U/ml)
T1	249.64±99.58 ^b	193.65±39.11 ^b	178.02±19.36 ^b	141.74±29.88 ^b	307.32±38.12 ^b	311.07±99.87 ^b	56.71±7.96 ^b
T2	247.82±7.64 ^b	177.70±20.03 ^b	182.85±15.70 ^{ab}	112.59±8.84 ^{abc}	312.50±20.62 ^b	433.59±123.67 ^a	75.26±5.66 ^a
T3	209.39±33.67 ^b	210.00±41.50 ^b	190.10±3.71 ^b	92.10±15.37 ^{bc}	390.62±36.78 ^a	280.94±49.26 ^b	70.55±7.54 ^a
T4	161.63±32.09 ^b	170.57±21.40 ^b	180.38±43.89 ^{ab}	170.29±6.07 ^a	399.34±68.83 ^a	372.83±96.17 ^{ab}	79.90±6.94 ^a
T5	230.80±24.42 ^b	485.74±272.52 ^a	252.86±7.88 ^a	98.37±25.48 ^{bc}	384.68±33.97 ^a	423.70±49.47 ^a	74.17±13.01 ^a
T6	373.81±92.48 ^a	396.55±127.70 ^{ab}	168.05±40.37 ^{ab}	62.88±6.40 ^c	382.25±25.88 ^a	375.13±93.12 ^{ab}	67.29±6.95 ^a

T6组脾脏、T5组中肾、T4组鳃、T5组血清中的GSH含量均显著高于对照组($P<0.05$)；姜黄素对黄颡鱼头肾、脑GSH含量无显著影响($P>0.05$)(表8)。

2.3.6 姜黄素对黄颡鱼各组织NO含量的影响

黄颡鱼体内各组织NO含量为血清>中肾>脑>鳃>肝胰脏>脾脏>头肾。各实验组中肾、头肾、脑、鳃NO含量与对照组相比无显著差异($P>0.05$)；T5组肝胰脏、T4组脾脏和T4组血清的NO含量显著高于对照组($P<0.05$)(表9)。

3 讨论

3.1 姜黄素对黄颡鱼生长性能的影响

本研究发现,在饲料中添加不同水平的姜黄素饲

喂黄颡鱼,对促进鱼体的增重率、特定增长率、存活率、降低饲料系数及提高蛋白质效率均有一定的功效。其中,400 mg/kg姜黄素水平对黄颡鱼存活率和肥满度的提高效果最佳,而200 mg/kg姜黄素水平对黄颡鱼增重率、特定增长率的促进效果和降低饲料系数的效果最佳。陈征义等(2010)研究发现,姜黄素能显著提高实验前期肉仔鸡的末重、日增重、料重比及肉仔鸡的存活率($P<0.05$),促进肉仔鸡的生长,这与本研究结果相似。王斌等(2010)报道,杜长大肥育猪饲料中添加400 mg/kg的姜黄素,饲喂3周,发现对肥育猪的生长性能影响显著($P<0.05$),这与本研究结果类似。但其达到最佳效果的姜黄素添加量比本研究高,这可能是由于实验动物不同造成的。对水产动物的研究表明,在饲料中添加姜黄素可以提高水产动物

表5 姜黄素对黄颡鱼MDA含量的影响

Tab.5 Effects of dietary curcumin at different levels on the MDA activities of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas (nmol/mg prot)	脾脏 Spleen (nmol/mg prot)	中肾 Middle kidney (nmol/mg prot)	头肾 Head kidney (nmol/mg prot)	鳃 Gill (nmol/mg prot)	脑 Brain (nmol/mg prot)	血清 Serum (nmol/ml)
T1	0.53±0.27 ^{ab}	8.08±2.78 ^b	4.25±0.54 ^a	4.19±0.34 ^a	0.95±0.69 ^a	13.04±4.14 ^a	4.68±0.62 ^b
T2	0.49±0.11 ^{ab}	7.43±1.31 ^b	5.50±2.19 ^a	6.15±1.40 ^a	1.13±0.97 ^a	7.47±4.37 ^b	7.05±2.76 ^{ab}
T3	0.42±0.12 ^b	8.85±2.32 ^b	4.86±0.57 ^a	4.32±0.23 ^{ab}	1.28±0.89 ^a	8.83±3.17 ^b	15.58±10.86 ^a
T4	0.27±0.17 ^b	10.01±1.41 ^b	5.31±0.71 ^a	3.91±2.11 ^{ab}	0.89±0.61 ^a	5.81±1.90 ^b	15.32±1.24 ^a
T5	0.34±0.15 ^b	23.80±13.67 ^a	4.06±0.19 ^a	2.99±1.21 ^b	0.82±0.45 ^a	6.67±2.16 ^b	8.27±0.33 ^{ab}
T6	1.12±0.77 ^a	9.98±5.95 ^b	5.99±2.24 ^a	2.77±0.38 ^b	0.62±0.23 ^a	8.80±4.10 ^b	5.77±1.89 ^b

表6 姜黄素对黄颡鱼CAT活力的影响

Tab.6 Effects of dietary curcumin at different levels on the CAT activities of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas (U/mg prot)	脾脏 Spleen (U/mg prot)	中肾 Middle kidney (U/mg prot)	头肾 Head kidney (U/mg prot)	鳃 Gill (U/mg prot)	脑 Brain (U/mg prot)	血清 Serum (U/ml)
T1	241.18±114.49 ^b	7.18±0.50 ^b	21.10±2.46 ^a	12.75±2.73 ^a	134.07±18.51 ^a	215.96±53.70 ^a	42.53±1.65 ^a
T2	246.35±37.40 ^b	7.07±2.23 ^b	19.63±3.07 ^a	10.49±1.93 ^{ab}	123.84±6.50 ^{ab}	215.98±32.35 ^a	46.84±0.89 ^a
T3	227.27±73.77 ^b	7.05±3.04 ^b	17.18±0.78 ^a	10.96±3.24 ^{ab}	107.33±13.46 ^{abc}	183.11±19.89 ^a	45.42±0.90 ^a
T4	190.46±10.01 ^b	6.12±2.29 ^b	18.29±3.66 ^a	9.91±2.46 ^{ab}	103.48±22.15 ^{bc}	188.27±67.34 ^a	45.27±1.94 ^a
T5	250.69±37.99 ^b	22.85±15.74 ^a	23.96±6.88 ^a	6.68±4.28 ^{bc}	88.23±12.12 ^c	177.08±24.68 ^a	42.77±0.18 ^a
T6	404.62±59.30 ^a	16.86±9.66 ^{ab}	20.73±2.11 ^a	4.71±0.59 ^c	86.52±11.51 ^c	199.68±54.15 ^a	43.74±5.39 ^a

表7 姜黄素对黄颡鱼GSH-PX活力的影响

Tab.7 Effects of dietary curcumin at different levels on the GSH-PX activities of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas (μmol/g prot)	脾脏 Spleen (μmol/g prot)	中肾 Middle kidney (μmol/g prot)	头肾 Head kidney (μmol/g prot)	鳃 Gill (μmol/g prot)	脑 Brain (μmol/g prot)	血清 Serum (μmol/ml)
T1	177.78±17.82 ^b	24.78±2.18 ^b	52.65±0.71 ^b	516.78±52.48 ^a	10.82±2.75 ^{ab}	2.63±0.40 ^b	137.14±55.07 ^b
T2	127.32±37.05 ^b	24.26±11.02 ^b	57.90±24.41 ^b	384.41±48.12 ^a	12.39±2.05 ^{ab}	3.37±2.78 ^{ab}	215.38±5.49 ^a
T3	136.67±35.19 ^b	31.33±10.20 ^b	47.07±15.04 ^b	244.66±96.92 ^a	16.27±4.10 ^{ab}	6.31±2.33 ^b	214.51±42.96 ^a
T4	238.50±18.13 ^a	37.08±3.91 ^{ab}	60.65±10.66 ^b	391.45±72.87 ^a	19.36±5.14 ^a	2.51±1.02 ^b	251.43±35.61 ^a
T5	194.75±20.88 ^b	62.50±20.26 ^a	71.34±25.00 ^a	555.59±27.00 ^a	10.07±2.77 ^{ab}	4.51±3.35 ^{ab}	251.54±37.20 ^a
T6	184.08±94.82 ^b	45.99±24.66 ^{ab}	61.74±11.60 ^b	488.70±55.28 ^a	6.57±0.76 ^b	11.33±9.67 ^a	260.22±45.40 ^a

表 8 姜黄素对黄颡鱼 GSH 含量的影响
Tab.8 Effects of dietary curcumin at different levels on the GSH content of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas ($\mu\text{mol/g prot}$)	脾脏 Spleen ($\mu\text{mol/g prot}$)	中肾 Middle kidney ($\mu\text{mol/g prot}$)	头肾 Head kidney ($\mu\text{mol/g prot}$)	鳃 Gill ($\mu\text{mol/g prot}$)	脑 Brain ($\mu\text{mol/g prot}$)	血清 Serum ($\mu\text{mol/ml}$)
T1	36.44±14.83 ^d	2.88±0.98 ^b	13.29±9.14 ^b	39.89±31.26 ^a	20.12±16.77 ^b	44.56±33.29 ^a	524.38±89.00 ^c
T2	72.09±9.54 ^c	3.11±1.38 ^b	17.31±1.90 ^b	31.87±25.51 ^a	15.05±20.39 ^b	35.10±25.62 ^a	607.17±113.53 ^c
T3	74.63±14.24 ^c	4.58±2.66 ^b	16.24±11.96 ^b	43.45±27.71 ^a	47.52±12.43 ^a	22.32±9.58 ^a	572.62±167.78 ^c
T4	80.88±5.88 ^{bc}	5.70±4.41 ^{ab}	28.06±9.70 ^{ab}	35.95±20.40 ^a	40.45±23.02 ^a	50.19±13.91 ^a	782.76±427.12 ^b
T5	118.66±22.97 ^a	5.05±2.47 ^b	35.33±6.55 ^a	37.76±15.12 ^a	15.62±12.77 ^b	46.95±1.01 ^a	938.03±194.57 ^a
T6	104.32±8.03 ^{ab}	9.85±3.77 ^a	27.87±5.25 ^{ab}	26.25±14.10 ^a	21.62±19.73 ^b	55.32±7.75 ^a	801.87±288.77 ^{bc}

表 9 姜黄素对黄颡鱼 NO 含量的影响
Tab.9 Effects of dietary curcumin at different levels on the NO content of *P. fulvidraco*

组别 Groups	肝胰脏 Hepatopancreas ($\mu\text{mol/g prot}$)	脾脏 Spleen ($\mu\text{mol/g prot}$)	中肾 Head kidney ($\mu\text{mol/g prot}$)	头肾 Head kidney ($\mu\text{mol/g prot}$)	鳃 Gill ($\mu\text{mol/g prot}$)	脑 Brain ($\mu\text{mol/g prot}$)	血清 Serum ($\mu\text{mol/ml}$)
T1	0.29±0.13 ^b	0.21±0.02 ^b	2.20±1.04 ^a	0.18±0.17 ^b	0.54±0.35 ^a	1.15±1.16 ^a	3.03±1.63 ^b
T2	0.37±0.13 ^b	0.19±0.05 ^b	0.83±0.62 ^{ab}	0.37±0.28 ^b	0.40±0.27 ^a	0.53±0.22 ^a	5.93±2.27 ^{ab}
T3	0.47±0.25 ^b	0.34±0.14 ^b	2.10±1.68 ^{ab}	0.45±0.27 ^a	0.37±0.26 ^a	0.79±0.57 ^a	6.32±2.08 ^a
T4	0.47±0.10 ^b	1.17±1.21 ^a	1.35±0.37 ^{ab}	0.25±0.14 ^b	0.21±0.02 ^a	0.38±0.09 ^a	5.41±1.79 ^{ab}
T5	0.70±0.22 ^a	0.59±0.13 ^b	0.14±0.28 ^{ab}	0.24±0.27 ^b	0.12±0.09 ^a	0.87±0.70 ^a	2.77±2.11 ^b
T6	0.51±0.22 ^b	0.45±0.26 ^b	1.20±1.28 ^{ab}	0.12±0.06 ^b	0.39±0.32 ^a	0.48±0.52 ^a	3.47±1.51 ^b

的生长性能。胡忠泽等(2003)在姜黄素喂食草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的研究中,分别在草鱼基础饲料中添加姜黄素,实验时间为 30 d,结果显示,在草鱼饲料中添加 0.02%、0.04%和 0.06%的姜黄素可以分别使相对增长率提高 14.67%、16.22%和 22.93%,同时,饲料系数分别降低 13.29%、9.79%和 18.88%,表明姜黄素对草鱼生长具有明显的促进作用,可提高饲料利用率和蛋白质效率,这与本研究结果一致。姜黄素可能通过提高鱼体对蛋白质的利用率,从而促进其生长性能。俞军等(2015)研究表明,投喂含姜黄素的饵料 45 d 后,大黄鱼 SR 和 SGR 显著提高。饵料中添加 300 mg/kg 姜黄素能有效提高大黄鱼的生长性能,且长期投喂效果更佳,是一种安全高效的饲料添加剂。史合群等(2013)的实验结果显示,草鱼基础饲料中添加 200 mg/kg 的姜黄素能够显著提高草鱼相对增重率($P < 0.05$),降低饲料系数($P < 0.05$),该研究中添加剂量与本研究较为接近,但由于研究对象规格种类的不同,姜黄素在黄颡鱼基础饲料中的最适添加量仍需进一步研究。

3.2 姜黄素对黄颡鱼消化能力的影响

鱼类体内消化酶活力直接影响着机体对营养物质的消化与吸收,对鱼体的生长速度起决定性作用(吴旋,2011)¹⁾。蛋白酶能够将难被机体直接吸收的蛋白质降解为蛋白胨和氨基酸等小分子物质;脂肪酶能够催化油脂水解为脂肪酸、甘油等;淀粉酶能够将淀粉、糖原等水解为麦芽糖、葡萄糖等容易被鱼类吸收的单糖(牛凤池等,2015)。已有研究表明,饲料中添加姜黄素可以提高鱼类肠道消化酶的活力。张宝彤等(2014)在罗非鱼(*Oreochromis spp*)的基础饲料中添加姜黄素,发现罗非鱼中肠绒毛数和绒毛高度显著增加,进而提高了罗非鱼肠道消化酶活力,此结果在一定程度上揭示了姜黄素促进罗非鱼肠道消化酶活力的机理。胡忠泽等(2003)研究表明,当在草鱼饲料中姜黄素添加量为 0.02%–0.06%时,可以极显著提高草鱼肠道蛋白酶和淀粉酶的活力($P < 0.01$)。与上述研究结果相似,本研究中添加 200–400 mg/kg 姜黄素可以有效提高黄颡鱼肠道和胃的消化酶活力,从而促进黄

1) Wu X. Effects of four kinds of Chinese herbal polysaccharides on the growth performance, body composition, part of physiological and biochemical indicator of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Master's Thesis of Tianjin Agricultural University, 2011, 39–40 [吴旋. 四种中草药多糖对黄颡鱼生长、体成分及部分生理生化指标的影响. 天津农学院硕士研究生学位论文, 2011, 39–40]

鲩的生长,但本研究中未涉及姜黄素对黄颡鱼肠道和胃组织结构影响,姜黄素对黄颡鱼肠道及胃的作用机理仍需今后进一步深入探讨。

3.3 姜黄素对黄颡鱼抗氧化能力的影响

姜黄素分子中具有多个功能基团,如 2 个苯丙烯酸基骨架、苯环上的酚羟基和甲氧基及丙烯基与 β -双酮/烯醇式结构的连接,使姜黄素具有很强的抗氧化活性(Ramassamy, 2006)。姜黄素可通过诱导抗氧化酶及还原性物质的生成和活化,如 SOD、CAT、GSH 等,将多种超氧化物、过氧化物、氧化物等自由基分解或还原,从而起到抗氧化、减少氧化应激损伤的作用(李薇等, 2009)。卢婉怡(2014)用姜黄素添加到饲料中投喂奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*),结果显示,饲料中添加姜黄素能有效提高罗非鱼机体的 SOD 和 CAT 活力,800 mg/kg 剂量对肝胰脏 SOD 和 CAT 活力的提高作用显著($P<0.05$)。张宝彤等(2014)将姜黄素添加到罗非鱼的基础饲料中,结果显示,姜黄素可显著提高罗非鱼的抗氧化能力($P<0.05$),添加姜黄素实验组罗非鱼肝胰脏、肌肉和血清等组织中 MDA 含量以 0.02% 水平组最低,显著低于其他实验组($P<0.05$)。本研究结果显示,姜黄素添加到饲料中投喂黄颡鱼,鱼体内各组织 SOD、CAT 活力均提高,且在鳃和脑等气体交换密切的组织中 SOD、CAT 活力明显高于肾脏、脾脏等组织,同时,肝胰脏、脑和头肾的 MDA 含量也显著降低。说明姜黄素通过诱导黄颡鱼体内抗氧化酶和还原性物质的生成,提高了黄颡鱼抗氧化能力。目前,未见关于姜黄素对黄颡鱼脑组织抗氧化酶活性的研究报道,本研究发现脑组织抗氧化酶活性较强,且在投喂添加姜黄素的饲料后效果更显著,表明姜黄素在今后的生产实践中具有良好的开发前景及应用空间。

GSH-PX 可分解过氧化物,可在 CAT 含量少的组织中代替 CAT 清除 H_2O_2 ,从而防止机体遭受氧化损伤(Kohen *et al.*, 2002)。GSH 能自行或经 GSH-PX 催化还原 H_2O_2 和过氧化脂质,消除自由基造成的损伤(Chen *et al.*, 2009)。本研究中,添加不同水平姜黄素投喂黄颡鱼可以显著提高黄颡鱼肝胰脏、脾脏、血清的 GSH-PX 活性和 GSH 含量($P<0.05$)。

iNOS 是介导炎症反应的重要酶, iNOS 催化 L-精氨酸氧化成 NO(Murakami, 2009)。NO 在生理上涉及血管舒张、神经传递、血小板凝集、免疫防御和胞内信号转导。NO 和 O_2 反应形成强烈氧化性物质过氧化亚硝酸盐(狄建彬等, 2010)。在本研究的各组织中,姜黄素对黄颡鱼肝胰脏、头肾的 NO 含量有促进作用,对鳃、脑这类氧交换密切的组织的 NO 含量有抑制作

用,此结果印证了以上理论,姜黄素可以抑制氧交换密切组织中 NO 的含量,保护组织不受过氧化亚硝酸盐的损伤。姜黄素对黄颡鱼体内 NO 含量的影响与姜黄素添加水平、鱼体组织中 NO 分布等因素有关,其调控机理仍需深入探讨。

4 结 论

综上所述,饲料中姜黄素添加水平为 200–400 mg/kg 时,可显著提高黄颡鱼机体的生长性能、消化能力和抗氧化能力。本研究为姜黄素作为功能性饲料添加剂的开发和利用提供了理论依据。

参 考 文 献

- Chen J, Zhou X, Feng L, *et al.* Effects of glutamine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*, 2009, 288(3–4): 285–289
- Chen ZY, Wu D. Effects of curcumin and antibiotic on performance and immune function in broiler. *Guangdong Feed*, 2010, 19(6): 24–26 [陈征义, 吴迪. 姜黄素和饲用抗生素对肉鸡生产性能和免疫机能的影响. *广东饲料*, 2010, 19(6): 24–26]
- Di JB, Gu ZL, Zhao XD, *et al.* Advances in studies on antioxidant and anti-inflammation of curcumin. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, 41(5): 854–857 [狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展. *中草药*, 2010, 41(5): 854–857]
- Gu J, Han X, Gu X. The basic pharmacological effects of curcumin. *Tianjin Pharmacy*, 2000, 12(2): 5–6 [顾军, 韩香, 顾欣. 姜黄素的基础药理作用. *天津药学*, 2000, 12(2): 5–6]
- Hu ZZ, Yang JF, Tan ZJ, *et al.* Effect of curcumin on the growth and activity of digestive enzyme in grass carps (*Ctenopharyngodon idells*). *Cereal and Feed Industry*, 2003 (11): 29–30 [胡忠泽, 杨久峰, 谭志静, 等. 姜黄素对草鱼生长和肠道酶活力的影响. *粮食与饲料工业*, 2003(11): 29–30]
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30(6): 620–650
- Li MF. Progress of study on the biology of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Modern Fisheries Information*, 2010, 25(9): 16–22 [李明锋. 黄颡鱼生物学研究进展. *现代渔业信息*, 2010, 25(9): 16–22]
- Li W, Li HL. Curcumin inhibits hyperoxia-induced pulmonary fibrosis in neonatal rats. *Journal of Medical Postgraduates*, 2009, 22(6): 574–577 [李薇, 李海浪. 姜黄素对高氧致新生大鼠肺纤维化的保护作用及机制探讨. *医学研究生学报*, 2009, 22(6): 574–577]
- Lu WY. Research on antioxidation of curcumin. *China Practical Medicine*, 2014, 9(2): 34–35 [卢婉怡. 姜黄素的抗氧化研究. *中国实用医药*, 2014, 9(2): 34–35]
- Murakami A. Chemoprevention with phytochemicals targeting inducible nitric oxide synthase. In Yoshikawa T (ed): *Food factors for health promotion*. Forum Nutrition, Basel, Karger, 2009, 61: 193–203

- Ni Y, Wu HL, *et al.* Fish fauna of Jiangsu. Beijing: China Agriculture Press, 2006, 392–404 [倪勇, 伍汉霖, 等. 江苏鱼类志. 北京: 中国农业出版社, 2006, 392–404]
- Niu FC, Huang YH, Cao JM, *et al.* Effects of five additives on growth performance, body composition and serum biochemical indices of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(7): 2176–2183 [牛凤池, 黄燕华, 曹俊明, 等. 5 种添加剂对黄颡鱼生长性能、体成分及血清生化指标的影响. 动物营养学报, 2015, 27(7): 2176–2183]
- Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. European Journal of Pharmacology, 2006, 545(1): 51–64
- Shi HQ, Zhou YK, Xie XH. The physiological function of curcumin and its application in aquatic feed industry. Feed Research, 2013(6): 9–11 [史合群, 周永奎, 谢晓晖. 姜黄素的生理功能及其在水产饲料工业中的应用. 饲料研究, 2013(6): 9–11]
- Wang B, Hou FQ, Zhu GQ, *et al.* Effect of curcumin on growth performance, meat quality and carcass parameters. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 42(7): 47–50 [王斌, 侯风琴, 祝国强, 等. 姜黄素对育肥猪生产性能、肉品质及胴体参数的影响. 畜牧与兽医, 2010, 42(7): 47–50]
- Yang XP, Zhou LY. Application research of curcumin in animal feed. Feed Review, 2009(7): 22–24 [杨小萍, 周隆英. 动物饲料中姜黄素的应用研究. 饲料博览, 2009(7): 22–24]
- Yu J, Chen QT, Li SY, *et al.* Effects of curcumin on growth and non-specific immunity of *Pseudosciaena crocea*. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1315–1321 [俞军, 陈庆堂, 李宋钰, 等. 姜黄素对大黄鱼生长及非特异性免疫功能的影响. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1315–1321]
- Zhang BT, Zhang B, Xiao PZ, *et al.* Effects of curcumin on growth performance, serum biochemical parameters and intestinal morphology of Tilapia. China Feed, 2014(2): 34–37 [张宝彤, 张波, 萧培珍, 等. 姜黄素对罗非鱼生长性能、血清生化指标及肠道组织形态的影响. 中国饲料, 2014(2): 34–37]

(编辑 马璀艳)

The Effects of Curcumin on the Growth, Digestion and Antioxidant Ability of Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

ZHANG Tengxian^{1#}, CHEN Qian^{1#}, ZHANG Baolong², LIN Chengli¹, ZHU Guoxia¹,
FANG Zhenzhen¹, BAI Dongqing^{1①}

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. Tianjin Chenhui Modern Technology Limited Company, Tianjin 301800)

Abstract A feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary curcumin at different levels on the growth performance, digestive enzyme activities and antioxidant ability of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Juvenile yellow catfish with an initial body weight of (13.17±0.68) g were fed with 6 different experimental diets containing curcumin at the concentration of 0 (control), 50, 100, 200, 400, and 800 mg/kg (namely T1, T2, T3, T4, T5 and T6 respectively) for 60 days. There were 3 replicates per group of 40 yellow catfish. The results were described as follows. The specific growth rate (SGR) and the survival rate (SR) of fish fed in the control group were significantly lower than those of all treatment groups ($P<0.05$), and the feed conversion ratio (FCR) was higher in T3 and T4 than the control group ($P<0.05$). The lipase activity in the foregut of fish from T3, T4 and T5 was significantly higher than the control group ($P<0.05$). The amylase activity in the foregut of fish from T4 was significantly higher than the control group ($P<0.05$). The level of superoxide dismutase (SOD) was higher in the hepatopancreas of fish from T6, in the brain of fish from T5 and in the head kidney of fish from T4 ($P<0.05$). A significantly lower content of malondialdehyde (MDA) was observed in the brain of fish from all treatment groups ($P<0.05$). In T5 and T6, there was a significant increase in the catalase (CAT) activity in the spleen and hepatopancreas ($P<0.05$). The glutathione peroxidase (GSH-PX) activity was enhanced ($P<0.05$) in the fish from T4, in the spleen of fish from T5 and in the mid-kidney of fish from T5, furthermore, it was also higher in the serum of fish from all treatment groups compared to the control group ($P<0.05$). The GSH activity in the hepatopancreas of fish from all treatment groups was higher than that in the control group ($P<0.05$). A significantly higher level of nitric oxide was found in the hepatopancreas of fish from T5 and in the spleen and serum of fish from T4, compared to all other treatment groups ($P<0.05$). The results indicated that 200 mg/kg curcumin supplemented into the diets could effectively boost the growth performance, and enhance the intestinal digestive enzyme activities and the antioxidant ability of juvenile yellow catfish.

Key words Curcumin; *Pelteobagrus fulvidraco*; Growth; Digestive activities; Antioxidant ability

① Corresponding author: BAI Dongqing, E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn

银鲳(*Pampus argenteus*)染色体标本制备及其核型研究*



刘琨^{1,2} 周丽青² 李凤辉² 陈四清^{2①}
葛建龙² 刘长琳² 施兆鸿³

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 200090;

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

3. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 为保护银鲳(*Pampus argenteus*)种质资源、为遗传育种提供理论基础,本研究在银鲳鳃组织细胞处于高活性状态下进行染色体标本制备,采用热滴加法制备银鲳染色体标本,并分析其染色体核型,初步探讨了银鲳的进化程度。实验银鲳为70–80日龄,体长为7–9 cm,设置3个重复组,每组3尾银鲳。将银鲳暂养于秋水仙素终浓度为0.005%的海水中4 h,剪取鳃组织制备染色体标本。该实验方法避免了对银鲳离水操作造成的物理伤害,确保银鲳在活力正常的前提下获得实验样本。染色体核型分析表明,银鲳二倍体染色体数为 $2n=48$,核型为 $2n=2SM+10ST+36T$,其染色体臂数(NF)为50。未发现与性别相关的异型染色体。其核型符合典型的高位类群鱼类的核型特征。由于研究对象为未性成熟银鲳幼鱼,无法分辨雌雄,因此,尚不能确定银鲳是否存在异形性染色体,有待性成熟之后进一步验证。

关键词 银鲳; 鳃组织; 染色体; 核型

中图分类号 TS201.4; S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0064-06

银鲳(*Pampus argenteus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲳科(Stromateidae)、鲳属(*Pampus*),是近海暖水性鱼类,在我国渤海、黄海、东海和南海等海区皆有分布(尹飞等, 2011; 徐善良等, 2012; 秦玉等, 2013^①)。银鲳俗称镜鱼、平鱼或车片鱼,鱼体呈卵圆形,体形侧扁,体背面与体腹面狭窄,体长为体高的1.4–1.6倍,头长为吻长的3.8–4.8倍; 4鼻孔,口小,上下颌具细小牙一行;体被银白色的

细小圆鳞,易脱落,头部除两颌及吻部外全部被鳞;背鳍隆起呈镰刀状,臀鳍与背鳍对称且同形(图1)。银鲳繁殖期在每年的5–6月,受精卵为浮性球形卵。银鲳具有生长快、个体大、肉质细嫩鲜美等特点,且具有较高的经济价值与营养价值(赵峰等, 2009),是我国重要的海洋经济鱼类,但由于过度捕捞和生存环境受到破坏,其资源量正在逐年下降(李建生等, 2014)。目前,国内外对银鲳的研究主要集中在分类、

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB403605)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金项目(20603022015011)共同资助 [This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (2011CB403605), and the Scientific Institution Basal Research Fund of Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022015011)]. 刘琨, E-mail: lkstardust@163.com

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

收稿日期: 2016-11-07, 收修改稿日期: 2016-11-23

1) Qin Y. Development of polymorphic microsatellites for *Pampus argenteus* and its analysis on population genetic structure. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2013 [秦玉. 银鲳微卫星标记开发及群体遗传结构分析. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2013]

资源评估、胚胎发育、繁殖习性和环境胁迫等(刘静等, 2002; 赵峰等, 2011; 施兆鸿等, 2016; Almatar *et al.*, 2004), 有关染色体方面的研究还未见报道, 仅有淡水白鲳(*Colossoma brachypomum*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(白俊杰等, 1988; 舒琥等, 2007)的染色体核型分析的相关报道。银鲳作为新开发的工厂化养殖品种, 研究其染色体核型对银鲳的遗传、变异、分类、系统演化和育种等都有重要意义。本研究以银鲳鳃组织为材料, 观察银鲳的染色体及其核型, 以期对银鲳遗传育种的研究提供理论基础。



图 1 银鲳
Fig.1 *Pampus argenteus*

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2016 年 7 月在山东青岛金沙滩水产开发有限公司进行, 所用银鲳为 70–80 日龄, 体长范围为 7–9 cm。

1.2 染色体标本制备

染色体标本的制备参照半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)鱼苗染色体标本制备方法(周丽青等, 2005), 略作修改, 将银鲳置于秋水仙素终浓度为 0.005% 的海水中暂养 4 h, 设置 3 个平行组, 每组 10 尾银鲳。

每组取 3 尾银鲳, 剪取鳃组织, 置于 10 ml KCl 溶液(0.0375 mol/L)中, 低渗 1 h, 再将鳃组织转移至现配制预冷的卡诺氏(Carnoy)液(甲醇:冰醋酸=3:1)中, 每隔 30 min 更换 1 次固定液, 重复 3 次。固定鳃组织 4℃ 保存过夜, 次日将固定的鳃组织用 50%冰醋酸解离约 10 min, 用滴管吹打加速解离, 挑去未解离的鳃组织, 吸取解离液采用热滴片法制备染色体标本。每尾鱼制备 4 张滴片, 用 10% Giemsa 染色 40 min, 自来水冲洗, 晾干并用 100 倍油镜镜检。

1.3 核型分析与比较

染色体核型分析参考波纹唇鱼(*Cheililuh uhdulatus*)

的染色体分析方法(周丽青等, 2010), 略作修改。从制备的滴片中选取轮廓清晰的染色体中期分裂相进行染色体计数(周丽青等, 2005), 再从中选取染色体收缩适中且分散最清晰的 10 个中期分裂相进行显微拍照, 经放大打印后, 描绘染色体轮廓进行核型分析, 并计算相对长度和臂比。

相对长度=(实测染色体长度/全部染色体长度总和)×100;

臂比=长臂长度/短臂长度;

求出它们的平均值和标准差, 按 Levan 等(1964)确定的标准进行染色体分类, 得出银鲳的染色体核型公式。

2 结果

2.1 银鲳染色体数目的确定

实验结果显示, 通过热滴法制备的 9 尾银鲳的染色体标本, 均观测到了染色体中期分裂相(图 2-a), 未见有异形性染色体, 统计清晰分裂相 120 个, 并对银鲳二倍体中期分裂相进行染色体计数, 结果列于表 1。由表 1 可见, 染色体数为 $2n=48$ 占 71.6%, 确定染色体众数为 48。

表 1 银鲳二倍体染色体计数

Tab.1 Counts of the diploid chromosome in *P. argenteus*

项目 Items	染色体数目 Number of chromosome					总和 Sum
	≤47	47	48	49	≥49	
分裂项数目 Number of metaphase	12	6	86	8	8	120
所占百分比 Percentage of metaphase (%)	10.0	5.0	71.6	6.7	-6.7	100

2.2 染色体相对长度分析

银鲳染色体相对长度和臂比值统计结果见表 2。银鲳所有染色体都为同型染色体(图 2-b)。根据 Levan 等(1964)方法进行染色体分类, 1 号染色体臂比值在 1.67–2.90 范围内, 属亚中

部着丝粒染色体; 2–6 号染色体臂比值在 3.0–7.0 范围内, 属亚端部着丝粒染色体; 7–24 号染色体臂比值 >7.0。因此, 确认银鲳染色体核型为 $2n=2SM+10ST+36T$, 并且部分染色体带有随体。

3 讨论

已知的海水鱼类染色体核型研究中, 常见的染色

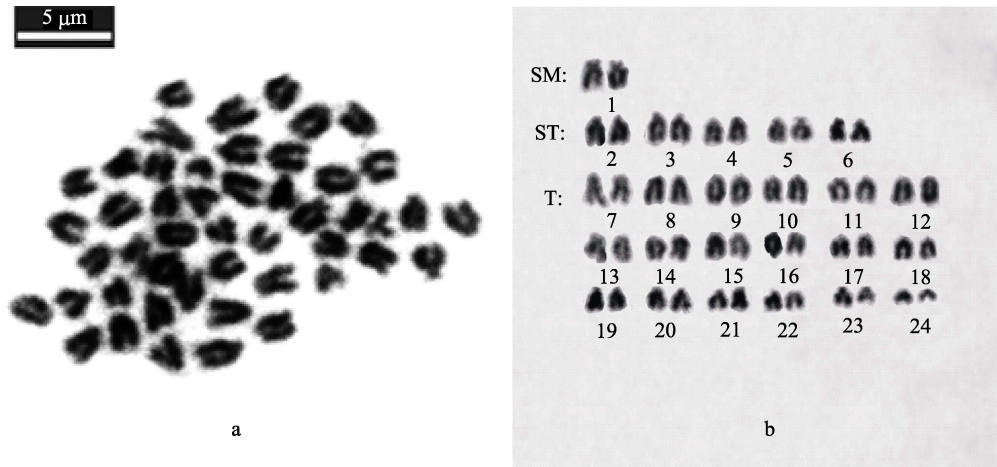


图2 银鲟中期分裂相染色体及核型

Fig.2 The metaphase chromosome and karyotype of *P. argenteus*

a. 具有同型染色体银鲟的中期分裂相染色体; b. 具有同型染色体银鲟的染色体核型

a. The metaphase chromosomes of *P. argenteus* with homotypic sex chromosomes; b. The karyotype of *P. argenteus* with homotypic sex chromosome

表2 银鲟中期分裂相染色体相对长度和臂比值
(平均值±标准差)

Tab.2 The relative length and arm ratio of metaphase chromosome in *P. argenteus* (Mean±SD)

染色体序号 Number of chromosome	相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	染色体类型 Chromosome type
1	2.86±0.07	2.21±0.03	SM
2	2.70±0.09	5.20±0.04	ST
3	2.84±0.10	4.41±0.02	ST
4	2.00±0.04	3.62±0.09	ST
5	1.88±0.05	5.10±0.06	ST
6	1.87±0.06	5.10±0.13	ST
7	1.70±0.32	∞	T
8	1.60±0.21	∞	T
9	1.24±0.11	∞	T
10	1.00±0.12	∞	T
11	1.10±0.15	∞	T
12	1.11±0.16	∞	T
13	1.84±0.09	∞	T
14	1.86±0.06	∞	T
15	1.74±0.04	∞	T
16	1.64±0.13	∞	T
17	1.66±0.09	∞	T
18	1.60±0.05	∞	T
19	1.46±0.07	∞	T
20	1.44±0.03	∞	T
21	1.30±0.02	∞	T
22	1.20±0.06	∞	T
23	0.94±0.13	∞	T
24	0.72±0.02	∞	T

体制备方法有外周血淋巴细胞培养、血细胞培养、鳞片培养、鳍条再生组织培养、肾细胞培养和胚胎培养等(马纲, 1996; 杨效文等, 2000), 多以细胞分裂增生能力较强的器官组织为实验样本制备标本。最常用的方法是注射植物血凝素(PHA)体内培养肾细胞制片法(林义浩, 1982; 舒琥等, 2010), 而银鲟的体表细小鳞片容易脱落, 且对外界敏感且反抗激烈, 当对其捞取进行实验操作时, 容易受惊吓后剧烈游动、擦伤等导致体被细小鳞片脱落或体表受伤死亡。因此, 向体内注射 PHA 或秋水仙素等离水实验操作均会对银鲟造成较大物理伤害, 导致银鲟活力低下甚至过早死亡, 不利于制备和获得中期分裂相。因此, 常用的染色体制备方法不适用于银鲟。本研究首先让银鲟在含 0.005%浓度秋水仙素的海水中游泳 4 h, 然后直接活体取鳃组织样本, 该方法避免了对银鲟离水实验操作造成的物理伤害, 确保银鲟在活力正常的前提下获得实验样本。另外, 鳃作为鱼的呼吸器官, 与水体直接接触, 相比鳍、头肾等其他器官, 鳃组织内的血液与水体的交换率更高, 可以更好地发挥秋水仙素的作用, 因此, 本研究通过改良秋水仙素处理方式和取材方法, 获得大量染色体形态好且分散好的银鲟中期分裂相。

研究鱼类染色体的多样性, 对生物进化、变异与遗传都有重要的参考价值, 而且对鱼类的分类、进化和不同鱼种的相关性也有重要意义, 可为鱼类遗传育种提供细胞遗传学依据(Poltev, 2008), 也为鱼类工厂化养殖的种质标准评定提供参考。目前, 已有核型报

道的海洋鱼类中, $2n=48$ 的核型数目占 72%, 鲈形目占大多数(朱香萍等, 2007; 赵金良, 2000), 如七带石斑鱼(*Epihaphelus septemfasciatus*) $2n=48$ (钟声平等, 2010)、卵形鲳鲹 $2n=48$ (舒琥等, 2007)和波纹唇鱼 $2n=48$ 等(周丽青等, 2010)。本研究结果显示, 银鲳染色体数目 $2n=48$, 这与鲈形目大多数鱼类染色体数目一致。染色体形态观察确定银鲳染色体核型没有异型染色体, 由于研究对象为 70–80 日龄稚鱼, 性腺外观分辨不出雌雄, 体表也看不出性征, 因此, 尚不能确定银鲳是否存在异形性染色体, 有待性成熟之后再验证, 猜测也有可能银鲳的性别分化仍属于基因水平, 尚未达到染色体水平。核型分析结果为 $2n=2SM+10ST+36T$, 其中, 1 对为亚中部着丝粒染色体, 5 对为亚端部着丝粒染色体, 18 对为端部着丝粒染色体。在不同标本的中期分裂相中, 同时存在亚中部、亚端部和端部着丝粒染色体, 染色体核型较一般鱼类更为复杂。同时, 在染色体臂比值分析中, 同一种染色体在不同中期分裂相中, 染色体的形态差异较大, 在一些分裂相中, 染色体长臂相对细长, 而在另一些分裂相中, 染色体长臂相对粗短, 推测是秋水仙素作用力度不同导致的, 秋水仙素作用力度大的, 染色体臂粗短, 染色深; 反之, 染色体臂细长, 染色浅。

Gosline(1971)将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群, 并在此基础上, 日本学者小岛吉雄(1979)认为, 越处于上位类群, 染色体数目变异范围分布越收敛, 端部着丝点染色体越多, 臂数越少。由银鲳染色体组型可知, 其臂数 $NF=50$, 符合典型的高位类群鱼类核型特征。从进化角度讲, 臂数的变化是从低位类群到高位类群表现为逐渐升高的趋势(李康等, 1984), 即中部或亚中部着丝点染色体的增加代表着进化的趋势, 由此可以说明, 银鲳染色体核型是相对进化类型。其具体的进化程度有待进一步研究。

参 考 文 献

- Almatar SM, Lone KP, Abu-Rezq TS, *et al.* Spawning frequency, fecundity, egg weight and spawning type of silver pomfret, *Pampus argenteus*, (Euphrasen) (Stromateidae), in Kuwait waters. *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, 20(3): 176–188
- Bai JJ, Ma ZB. The karyotype of freshwater spadefish *Colossoma brachypomum*. *Freshwater Fisheries*, 1988(3): 9 [白俊杰, 马仲波. 淡水白鲳(*Colossoma brachypomum*)染色体组型分析. *淡水渔业*, 1988(3): 9]
- Gosline WA. Functional morphology and classification of teleostean fishes. University Press of Hawaii, 1971
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201–220
- Li JS, Hu F, Yan LP. Study on the rational utilization of *Pampus argenteus* resources in the East China Sea region. *Journal of Natural Resources*, 2014, 29(8): 1420–1429 [李建生, 胡芬, 严利平. 东海区银鲳资源合理利用的研究. *自然资源学报*, 2014, 29(8): 1420–1429]
- Li K, Gui JF, Hong YH, *et al.* Studies on the karyotypes of Chinese cyprinid fishes. V. Karyotypes of species of Gobionid fishes. *Journal of Wuhan University (Natural Science)*, 1984(3): 115–124 [李康, 桂建芳, 洪云汉, 等. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究-V. 鲈亚科 10 种鱼的染色体组型. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1984(3): 115–124]
- Lin YH. A PHA injection method *in vivo* for the rapid obtainment of large numbers of metaphase figures from kidney cells of teleosts. *Journal of Fisheries of China*, 1982, 6(3): 201–208 [林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. *水产学报*, 1982, 6(3): 201–208]
- Liu J, Li CS, Li XS. Studies on Chinese pomfret fishes of the genus *Pampus*. *Studia Marina Sinica*, 2002(44): 240–252 [刘静, 李春生, 李显森. 中国鲳属鱼类的分类研究. *海洋科学集刊*, 2002(44): 240–252]
- Ma G. The research progress in chromosome pattern and numerical variation of freshwater fish in China. *Journal of Gansu Sciences*, 1996(3): 77–80 [马纲. 中国淡水鱼类染色体形态及数目变异的研究进展. *甘肃科学学报*, 1996(3): 77–80]
- Poltev YN. Some issues related to reproduction of Pacific cod, *Gadus macrocephalus* in waters of the eastern coast of the northern Kuril Islands and the southern extremity of Kamchatka. *Journal of Ichthyology*, 2008, 48(4): 345–355
- 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]
- Shu H, Cai XY, Liu F, *et al.* Karyotypes analysis for three species of Tetraodontiformes fishes. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 101–106 [舒琥, 蔡晓阅, 刘锋, 等. 鲈形目 3 种鱼的染色体组型分析. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 101–106]
- Shu H, He ML, Zhang HF, *et al.* Study on the karyotype in the *Trachinotus ovatus*. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2007, 6(2): 23–25 [舒琥, 何敏莲, 张海发, 等. 卵形鲳鲹染色体组型研究. *广州大学学报(自然科学版)*, 2007, 6(2): 23–25]
- Xiao DJX. Aquatic biology and genetic breeding. Tokyo, 1979, 46–62 [小岛吉雄. 水生生物及遗传育种. 东京: 水交出版社, 1979, 46–62]
- Xu SL, Wang DL, Xu JL, *et al.* Analysis and evaluation of

- nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* from the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 775–782 [徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳(*Pampus argenteus*)、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳(*P. sinensis*)肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 775–782]
- Yang XW, Zhang SF, Zhang XY. Karyotypes of green peach aphids from different host plants. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2000, 6(1): 56–60 [杨效文, 张素方, 张孝羲. 不同寄主植物上烟蚜的染色体组型研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6(1): 56–60]
- 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 APTase 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]
- Zhao F, Zhuang P, Shi ZH, *et al.* A comparative analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus* from four wild populations. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(5): 117–123 [赵峰, 庄平, 施兆鸿, 等. 银鲳 4 野生群体肌肉营养成分的比较分析与评价. 动物学杂志, 2009, 44(5): 117–123]
- Zhao F, Zhuang P, Zhang LZ, *et al.* Morphological variation of *Pampus argenteus* among five samples near the coastal area of the Bohai Sea, Huanghai Sea and East China Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(1): 104–110 [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 渤海、黄海及东海近海五个银鲳地理群体的形态变异. 海洋学报, 2011, 33(1): 104–110]
- Zhao JL. A survey of karyotype study of marine and brackish water fish in China. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2000, 9(4): 344–347 [赵金良. 我国海水鱼和咸淡水鱼染色体组型研究概述. 上海海洋大学学报, 2000, 9(4): 344–347]
- Zhong SP, Chen C, Wang J, *et al.* Chromosome karyotype of sevenband grouper *Epihaphelus septemfasciatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 150–155 [钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究. 中国水产科学, 2010, 17(1): 150–155]
- Zhou LQ, Yang AG, Liu XZ, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 417–419 [周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析. 水产学报, 2005, 29(3): 417–419]
- Zhou LQ, Yang AG, Wu B, *et al.* A preliminary study on chromosome preparation and karyotype of humphead wrasse *Cheililhus uhdulatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 54–58 [周丽青, 杨爱国, 吴彪, 等. 波纹唇鱼染色体制备及核型的初步研究. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 54–58]
- Zhu XP, Lin MM, Li Z, *et al.* Search for peripheral blood lymphocytic cell cultivation and chromosome preparation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Qingdao Aquaculture University (Natural Science Edition)*, 2007, 24(4): 253–256 [朱香萍, 林明敏, 李桢, 等. 牙鲆外周血淋巴细胞的培养及染色体制备条件的探讨. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2007, 24(4): 253–256]

(编辑 冯小花)

Chromosome Samples Preparation and Karyotype Analysis of Pomfret (*Pampus argenteus*)

LIU Kun^{1,2}, ZHOU Liqing², LI Fenghui², CHEN Siqing^{2①},
GE Jianlong², LIU Changlin², SHI Zhaohong³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090;
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. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract In order to protect the germplasm resources of pomfret (*Pampus argenteus*) and provide some theoretical basis for its genetic breeding, this research was carried out by thermal titration method for preparing chromosome specimens of pomfret in living state and analyzed its chromosome karyotype. Finally, the evolutionary taxonomy of pomfret had been preliminary discussed. The pomfret involved in this experiment were juveniles 70–80 days old and their sizes ranged in 7.0–9.0 cm. They were divided into three groups, each group of three fishes, and kept in seawater containing 0.005% colchicine for 4 hours. Then, each group took three individuals, and a part of the gill tissues were sheared for preparing the chromosome specimens. The methods in this experiment prevented the pomfret from the physical damage caused by the operations off the water and ensured the experimental materials were obtained from pomfret with normal vitality. The analysis of chromosome karyotype showed that there were 48 telocentric chromosomes in the diploid and their karyotype formulae is $2n = 2SM + 10ST + 36T$, namely, there were one pair of submetacentric chromosomes (SM) and 5 pairs of acrocentric chromosomes (ST) and 18 pairs of telocentric chromosomes (T), and their fundamental number (NF) was 50. There was no visible evidence of polyploidy chromosome and sex chromosome. and the karyotype was in accordance with the typical characters of karyotype in the higher group of fish evolutionary taxonomy. As the research objects were juveniles which had the immature sexual gland, and were unable to distinguish between male and female, it is uncertain whether there is a sexual chromosome in pomfret, and it needs to be further studied when the gonads are ready.

Key words *Pampus argenteus*; Pectoral gills; Chromosome; Karyotype

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

不同饵料及养殖环境对 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态差异的影响*

沈伟良^{1,2} 吴雄飞^{1①} 申屠基康¹ 林淑琴¹

(1. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315103; 2. 宁波大学 宁波 315211)



摘要 本研究通过采集不同环境和不同饲料养殖的岱衢洋大黄鱼(*Larimichthys crocea*)形态数据,利用聚类分析、主成分分析以及判别分析对 3 组大黄鱼形态差异进行分析。结果显示,不同环境对大黄鱼体高、尾长存在显著影响,而不同饲料对大黄鱼体高、尾高、尾长、体厚存在显著影响,同时对 D3-4、D3-6、D4-6、D5-6 框架形态存在显著影响,差异主要集中于躯干前部。表明不同环境下大黄鱼形态变化可能与流速适应相关,而饵料对体型的影响可能是因为营养组成及物质积累的不同。聚类分析显示,配合饲料组与深水网箱组形态更接近,而与冰鲜饲料相距较远。通过主成分分析提取 3 个主成分,其中配合饲料组与深水网箱组在主成分 1 上相近,但在主成分 3 上存在差异,而冰鲜饲料组在各主成分上均离散,表明小网箱冰鲜饲料养殖大黄鱼形态分离较大,体型一致性低。利用判别分析,构建 3 种条件下大黄鱼体型判别函数,经交互验证,判别函数与预期无显著差异,可用于不同养殖模式大黄鱼的形态判别。本研究初步表明,通过改变养殖环境水流、养殖空间大小、饲料可在一定程度实现养殖大黄鱼形态改良。

关键词 大黄鱼; 形态; 饵料; 环境; 多元分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0070-08

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Larimichthys*),自 20 世纪福建省科技人员率先突破大黄鱼人工繁殖和育苗技术难关,大黄鱼逐步发展成为我国海水养殖鱼类主要品种之一,养殖规模和产量迅猛发展。伴随大黄鱼养殖产量的不断提升,品质问题日渐成为制约大黄鱼产业发展的重要因素,大黄鱼的品质研究逐渐成为大黄鱼研究新的热点。学者们就大黄鱼不同群体(郑炜强等, 2014; 李星云等, 2010)、不同饵料组分(易新文等, 2013)等对其生长、品质影响进行了相关研究,但对养殖大黄鱼外在品质集中体现的形态研究较少,缺乏不同养殖模式及饵料对大黄

鱼形态影响的研究。

利用聚类分析、主成分分析、判别分析等多元分析方法开展形态差异研究,已在包括鱼类(林艳红等, 2010; 邵锋等, 2008; 庆宁等, 2007; 廖锐等, 2009; 胡海彦等, 2011; 岳亮等, 2016)、贝类(钱荣华等, 2003)、甲壳类(王志铮等, 2016)等多个物种中应用,具有良好的适用性。形态作为物种的外在特征,不仅是物种鉴别的依据,同时也是生物遗传和生存环境共同作用的外在表现。在影响鱼类形态的诸多外在因素中,环境和饵料是两个重要的非遗传因子。因此,本研究通过对不同养殖模式及饵料对岱衢洋大黄鱼形态的影响进行研究,以期对仿野生大黄鱼品质养殖技

* 宁波市科技重大专项(2015C110005)和宁波大学浙江省重中之重学科开放基金项目(XKZSC01)共同资助[This work was supported by Ningbo Science and Technology Major Project (2015C110005) and the Open Foundation of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Ningbo University (XKZSC01)]. 沈伟良, E-mail: sweleon@163.com

① 通讯作者: 吴雄飞, 研究员, E-mail: 1058837162@qq.com

收稿日期: 2016-07-24, 收修改稿日期: 2016-08-31

术及不同饲料选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选取浙江象山港湾水产苗种公司繁育的 F₂ 代岱衢洋大黄鱼, 初始规格为(8.5±1.1) g。选择配合饲料和天然饵料 2 种养殖饲料。配合料由中国海洋大学麦康森院士团队提供, 由七好生物科技有限公司制造; 天然饵料为宁波地区海水鱼养殖常规青占鱼(*Pneumatophorus japonicus*)冰鲜料。

1.2 实验方法

将实验大黄鱼暂养驯化 3 d 后, 进行分组。实验设置冰鲜饲料组、配合饲料组、深水网箱组 3 个组, 每组设置 3 个平行网箱。其中, 冰鲜饲料组设置在象山护港大黄鱼养殖区, 投喂普通冰鲜饲料, 养殖网箱规格为 5 m×5 m×3.5 m; 配合饲料组设置于冰鲜饲料组同一渔排, 投喂配合饲料, 养殖网箱规格同为 5 m×5 m×3.5 m; 深水网箱组设置在象山港白石山海区, 投喂普通冰鲜饲料, 养殖网箱为直径 12 m 的深水网箱。3 个组均采用相同养殖管理操作, 饲料日投喂量以鱼群摄食情况做适当调整, 并做好日常投喂管理记录, 至翌年 12 月养殖大黄鱼达 22 月龄商品规格, 测定各组大黄鱼形态。

1.3 形态测定方法

形态测量选择大黄鱼传统形态学可量性状, 包括: 体重、体长、全长、头长、吻长、体高、尾柄长、尾柄高、体厚作为常规形态参数, 测定标准参照(GB/T18654.3-2008)性状测定部分(图 1), 并测定大黄鱼形态框架, 测量位点见图 2。每组随机取 30 尾鱼进行测量。使用电子天平测量体重, 精确到 0.1 g; 使用普通直尺测量体长及全长, 精确到 0.1 cm; 用游标卡尺测量其他数据, 精确到 0.01 mm。

1.4 分析方法

利用 SPSS 23.0 对测量数据进行分析, 采用聚类分析、主成分分析、判别分析对大黄鱼形态差异进行分析。由于大黄鱼个体之间存在大小差异, 将各鱼所有形态测量数据除以其体长后进行统计分析。判别准确率的计算公式为:

判别准确率 P1=判别正确的尾数/实际尾数

判别准确率 P2=判别正确的尾数/判别尾数

$$\text{综合判别率} = \frac{\sum_{n=1}^K A_i}{\sum_{n=1}^K B_i}$$

式中, A_i 为第 i 个判别准确的尾数, B_i 为第 i 个群体的实际尾数, K 为群体数。

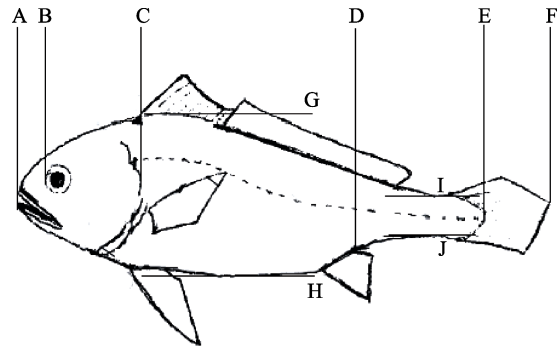


图 1 大黄鱼常规形态测量

Fig.1 Morphological characters of *L. crocea*

AF: 全长 Total length; AE: 体长 Body length; AC: 头长 Head length; AB: 吻长 Snout length; DE: 尾柄长 Caudal peduncle length; IJ: 尾柄高 Caudal peduncle width; GH: 体高 Body height

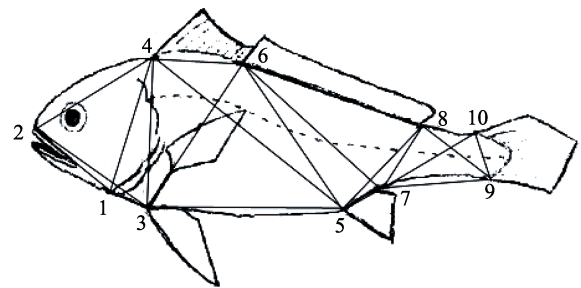


图 2 大黄鱼框架

Fig.2 The scheme of *L. crocea*

1: 下颌骨末端; 2: 吻前沿; 3: 腹鳍基起点; 4: 背鳍基起点; 5: 臀鳍基起点; 6: 背鳍棘基部末端; 7: 臀鳍基末端; 8: 背鳍基末端; 9: 尾鳍基腹部起点; 10: 尾鳍基背部起点

1: Mandible end; 2: Snout frontier; 3: Pelvic fin starting point; 4: Dorsal fin starting point; 5: Anal fin starting point; 6: Dorsal fin spines ending point; 7: Anal fin ending point; 8: Dorsal fin ending point; 9: Caudal fin ventral starting point; 10: Caudal fin back starting point

2 结果

2.1 养殖生长情况

测量结果显示, 配合饲料组平均体重为(406.7±65.5) g, 平均体长为(28.6±1.2) cm。冰鲜饲料组平均体重为(435.8±82.6) g, 平均体长为(28.4±1.8) cm。深水网箱组的平均体重为(428.6±97.9) g, 平均体长为(27.9±1.9) cm。各组生长经方差分析, 无显著差异($P>0.05$)。

2.2 外形参数方差分析

通过对测量数据进行方差分析,结果显示,不同的养殖环境及饲料条件下,岱衢洋大黄鱼在体高、尾柄长、尾柄高、体厚上存在极显著差异,而形态框架参数 D4-6、D5-6、D7-8 存在显著差异,在 D3-4、D3-6 上存在极显著差异(表 1)。各组间差异主要集中在躯干部及尾部。

从表 2 可以看出,通过 Duncan 检验,在体高性状上 3 组间均存在显著差异,深水网箱组体高最大、冰鲜饲料组次之、配合饲料组最小。在尾长性状上,深水网箱组尾柄最长,且与其他 2 组存在显著差异。在尾柄高性状上,冰鲜饲料组尾柄最高,与其他 2 组存在显著差异。在体厚性状上,配合饲料组最小,与

其他 2 组存在显著差异。在 D3-4、D3-6、D4-6 表征躯干部前端参数上,配合饲料组与其他 2 组存在显著差异;而表征躯干末端及尾部形态的 D7-8 参数,深水网箱组与其他 2 组存在显著差异。

2.3 聚类分析

利用 3 组大黄鱼形态参数平均值,以最近邻元素法进行聚类分析。结果显示,深水网箱组与配合饲料组首先聚为一类,而与冰鲜饲料组相距较远(图 3),深水网箱组与配合饲料组形态更为接近。

2.4 主成分分析

通过对不同饵料组成和养殖环境数据进行主成分分析(表 3),获取前 3 个主成分,各主成分贡献率

表 1 大黄鱼形态参数方差分析
Tab.1 ANOVA of morphological traits of *L. crocea*

形态参数 Morphological traits	平均值±标准差 Mean±SD	F 值 F value	显著性 Significance
体高体长比 Body height/Body length	0.291±0.019	21.431	0**
全长体长比 Total length/Body length	1.175±0.047	1.273	0.285
头长体长比 Head length/Body length	0.233±0.009	2.861	0.063
吻长体长比 Snout length/Body length	0.088±0.009	2.405	0.096
尾长体长比 Caudal peduncle length/Body length	0.248±0.012	13.082	0**
尾长尾高比 Caudal peduncle length/Caudal peduncle width	3.495±0.215	12.248	0**
体厚体长比 Body thickness/Body length	0.140±0.009	11.919	0**
D1-2 The scheme D1-2/Body length	0.144±0.010	0.720	0.490
D1-3 The scheme D1-3/Body length	0.171±0.011	0.478	0.622
D1-4 The scheme D1-4/Body length	0.282±0.016	0.524	0.594
D2-3 The scheme D2-3/Body length	0.307±0.018	0.560	0.573
D2-4 The scheme D2-4/Body length	0.297±0.018	1.722	0.185
D3-4 The scheme D3-4/Body length	0.273±0.018	7.274	0.001**
D3-6 The scheme D3-6/Body length	0.324±0.023	10.052	0**
D3-5 The scheme D3-5/Body length	0.413±0.028	0.080	0.924
D4-6 The scheme D4-6/Body length	0.178±0.012	4.709	0.011*
D4-5 The scheme D4-5/Body length	0.491±0.028	1.028	0.362
D5-6 The scheme D5-6/Body length	0.358±0.022	3.222	0.045*
D5-8 The scheme D5-8/Body length	0.243±0.016	1.349	0.265
D5-7 The scheme D5-7/Body length	0.087±0.009	2.652	0.076
D6-7 The scheme D6-7/Body length	0.389±0.025	1.815	0.169
D7-10 The scheme D7-10/Body length	0.256±0.017	0.805	0.450
D7-9 The scheme D7-9/Body length	0.243±0.017	1.397	0.253
D7-8 The scheme D7-8/Body length	0.161±0.011	4.362	0.016*
D6-8 The scheme D6-8/Body length	0.471±0.029	0.504	0.606
D8-9 The scheme D8-9/Body length	0.141±0.010	0.176	0.839
D8-10 The scheme D8-10/Body length	0.103±0.011	0.670	0.514
D9-10 The scheme D9-10/Body length	0.097±0.006	2.966	0.057

*为差异显著($P<0.05$), **为差异极显著($P<0.01$)

* indicated significant difference ($P<0.05$), ** indicated highly significant difference ($P<0.01$)

表 2 岱衢洋大黄鱼形态多重比较
Tab.2 Duncan's multiple range test of morphological traits of *L. crocea*

形态参数 Morphological traits	Duncan 检验 Duncan's multiple range test		
	配合饲料组 Formulated dietary group	冰鲜饲料组 Fresh dietary group	深水网箱组 Net-cage group
体高体长比 Body height/Body length	0.277 ^a	0.292 ^b	0.304 ^c
尾长体长比 Caudal peduncle length/Body length	0.243 ^a	0.244 ^a	0.256 ^b
尾长尾高比 Caudal peduncle length/Caudal peduncle width	3.544 ^a	3.355 ^b	3.585 ^a
体厚体长比 Body thickness/Body length	0.134 ^a	0.141 ^b	0.144 ^b
D3-4 The scheme D3-4/Body length	0.264 ^a	0.280 ^b	0.274 ^b
D3-6 The scheme D3-6/Body length	0.311 ^a	0.329 ^b	0.334 ^b
D4-6 The scheme D4-6/Body length	0.173 ^a	0.179 ^b	0.182 ^b
D5-6 The scheme D5-6/Body length	0.351 ^a	0.365 ^b	0.359 ^{ab}
D7-8 The scheme D7-8/Body length	0.159 ^a	0.158 ^a	0.165 ^b

注: 同列数据中含有不同的上标字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: In the same column, values with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$)

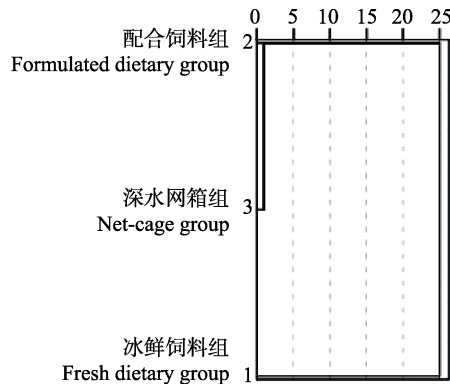


图 3 不同组大黄鱼形态聚类分析

Fig.3 The cluster analysis of *L. crocea* in different groups

分别为 51.022%、9.440%、8.419%，累积贡献率为 68.882%，其中，主成分 1 为大黄鱼体型差异的主要来源。成分矩阵得分表明，主成分 1 主要表征躯干部位框架形态差异；主成分 2 表征尾部形态变异；主成分 3 表征体高与体厚形态差异。

对各组主成分 1 与主成分 2、主成分 1 与主成分 3 绘制散点图(图 4、图 5)。结果显示，不同饵料与不同养殖条件下，养殖大黄鱼体型呈现不同的分布趋势。其中，配合饲料组与深水网箱组在主成分 1、主成分 2 上较为集中，但在主成分 3 上存在分离，表明二者在体高与体厚上存在较大差异，这与方差分析结果吻合。而冰鲜饲料组则在 3 个主成分上均呈现一定的离散性，表明小网箱冰鲜饲料养殖大黄鱼个体间形态差异较大。

2.5 判别分析

将各组大黄鱼群体性状指标进行判别分析，采用

逐步判别法对 27 个形态参数进行判别分析，筛选得到 7 个对判别贡献较大的参数，分别建立 3 个群体的判别函数并作图(图 6)，表明函数能较好区分 3 个群体。

深水网箱大黄鱼:

$$Y_1 = -694.836 + 1732.071X_1 + 168.065X_2 + 891.577X_3 - 568.378X_4 + 930.396X_5 + 13.138X_6 - 1542.221X_7$$

配合饲料大黄鱼:

$$Y_2 = -649.384 + 1659.057X_1 + 162.308X_2 + 1129.876X_3 - 683.916X_4 + 858.222X_5 - 48.065X_6 - 1422.479X_7$$

冰鲜饲料大黄鱼:

$$Y_3 = -636.438 + 1670.692X_1 + 156.880X_2 + 953.536X_3 - 567.274X_4 + 748.050X_5 + 92.607X_6 - 1397.701X_7$$

式中， X_1 是体高体长比、 X_2 是尾长尾高比、 X_3 是 D2-4、 X_4 是 D3-6、 X_5 是 D5-6、 X_6 是 D6-7、 X_7 是 D8-10。将大黄鱼测量值代入各判别函数计算 Y 值，最大 Y 值类别即为个体判别类别。

将本次所有测定个体相关形态参数代入进行预测分类。判别准确率 P_1 为 66.7%–93.3%， P_2 为 79.4%–86.9%，综合判别率为 62.5%。经交互验证后结果无显著差异($P > 0.05$)，说明上述判别公式可靠且稳定。

3 讨论

形态作为鱼类的一个重要性状，在分类学上具有重要意义，通过形态差异分析能实现近缘物种或不同种群的区分。在大黄鱼研究中，已开展基于形态差异多元分析统计方法研究不同家系、不同养殖群体(张雅芝等, 2005)、不同生长阶段(刘贤德等, 2010)、不同性别(谌微等, 2014)的大黄鱼形态差异，并构建相应判别函数模型，实现对不同群体的区别。

表3 主成分分析因子成分矩阵及主成分对变异的贡献率
Tab.3 The component matrix and the contribution of principal components to the total variance in PCA analysis

形态参数 Morphological traits	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3
体高体长比 Body height/Body length	0.265	-0.292	0.824
全长体长比 Total length/Body length	0.354	0.131	0.254
头长体长比 Head length/Body length	0.224	-0.459	-0.381
吻长体长比 Snout length/Body length	0.121	-0.576	-0.008
尾长体长比 Caudal peduncle length/Body length	0.165	0.459	0.582
尾长尾高比 Caudal peduncle length/Caudal peduncle width	-0.022	0.777	0.037
体厚体长比 Body thickness/Body length	0.238	-0.437	0.691
D1-2 The scheme D1-2/Body length	0.793	-0.206	-0.103
D1-3 The scheme D1-3/Body length	0.647	0.020	-0.205
D1-4 The scheme D1-4/Body length	0.922	-0.094	-0.015
D2-3 The scheme D2-3/Body length	0.885	-0.096	-0.174
D2-4 The scheme D2-4/Body length	0.863	-0.055	-0.287
D3-4 The scheme D3-4/Body length	0.855	-0.110	0.341
D3-6 The scheme D3-6/Body length	0.823	-0.158	0.396
D3-5 The scheme D3-5/Body length	0.845	-0.012	-0.110
D4-6 The scheme D4-6/Body length	0.696	-0.220	0.076
D4-5 The scheme D4-5/Body length	0.940	-0.120	-0.094
D5-6 The scheme D5-6/Body length	0.902	-0.085	0.019
D5-8 The scheme D5-8/Body length	0.836	0.026	-0.112
D5-7 The scheme D5-7/Body length	0.623	-0.175	-0.299
D6-7 The scheme D6-7/Body length	0.891	-0.098	-0.135
D7-10 The scheme D7-10/Body length	0.825	0.420	0.034
D7-9 The scheme D7-9/Body length	0.806	0.433	0.019
D7-8 The scheme D7-8/Body length	0.761	0.124	0.074
D6-8 The scheme D6-8/Body length	0.863	0.022	-0.203
D8-9 The scheme D8-9/Body length	0.735	0.368	0.029
D8-10 The scheme D8-10/Body length	0.637	0.514	-0.013
D9-10 The scheme D9-10/Body length	0.854	-0.044	0.124
贡献率 Contribution rate (%)	51.022	9.440	8.419

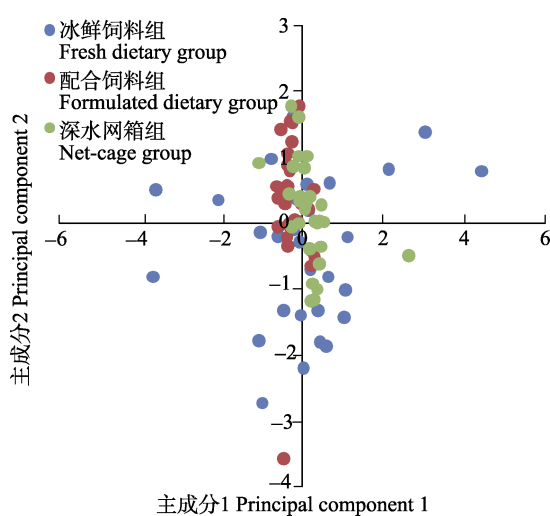


图4 不同组大黄鱼形态主成分1与主成分2分析
Fig.4 The morphology analysis of principal component 1 and principal component 2 of *L. crocea* in different groups

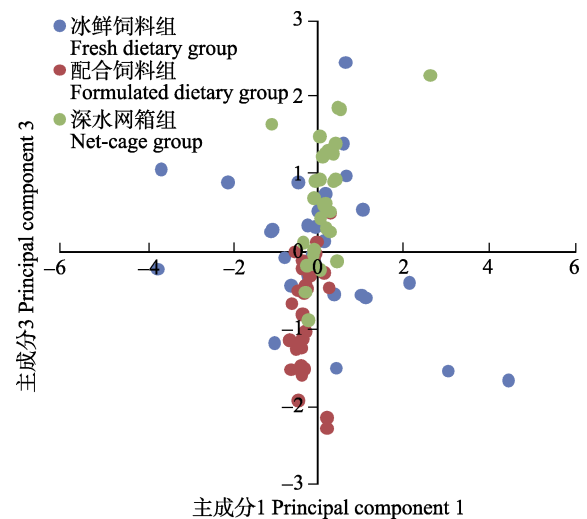


图5 不同组大黄鱼形态主成分1与主成分3分析
Fig.5 The morphology analysis of principal component 1 and principal component 3 of *L. crocea* in different groups

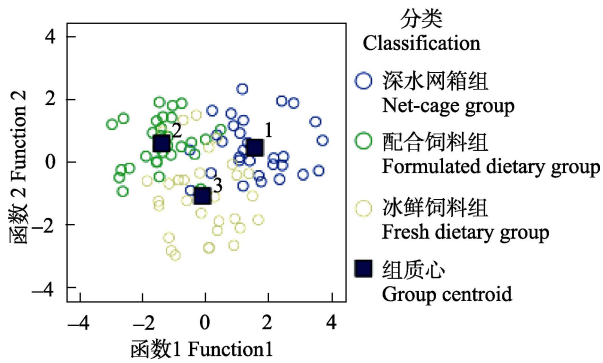


图6 不同组大黄鱼判别分析

Fig.6 The discriminant analysis of *L. crocea* in different groups

表4 不同组大黄鱼判别分析结果

Tab.4 The discrimination analysis of *L. crocea* in different groups (%)

判断准确率 Identification accuracy	深水网箱组 Net-cage group	配合饲料组 Formulated dietary group	冰鲜饲料组 Fresh dietary group
判断准确率 P1	90.0	93.3	66.7
判断准确率 P2	79.4	84.8	86.9
综合判别率 Total discriminant accuracy		62.5	
交互验证 Cross validation			
判断准确率 P1	86.6	90.0	76.7
判断准确率 P2	74.2	81.8	91.3
综合判别率 Total discriminant accuracy		61.6	

在影响鱼类外部形态的众多非遗传影响因子中,水环境是极其重要的外部因素,对鱼类形态有着强烈的影响,因地理隔离形成的不同水环境条件是形成不同地理种群的重要因素之一。费骥慧等(2012)对不同高原湖泊中外来物种麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)的体型差异进行了研究,结果显示,相同来源的麦穗鱼会在相对隔离的环境中彼此形成种内形态差异。Haas等(2010)和 Langerhans 等(2003)的研究表明,水生动物外部形态的变化影响其游泳能力,且这种形态变异还受到环境因子的影响。李秀明等(2013)在对中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)游泳能力的研究中发现,高流速组的体高及体高体长比显著大于低流速组,这与本研究中深水网箱组体高体长比最大的结果相一致。同时,鱼类外部形态的改变对抵抗水流的游泳能力存在显著影响。Li 等(2009)对转 GH 基因鲤鱼(*Cyprinus carpio*)与非转基因鲤鱼游泳能力比较证明,尾长、尾

高、尾柄基部长度等性状改变是导致游泳能力出现差异的主要原因。本研究中与游泳能力相关的尾部形态特征,如尾长、尾高、尾柄基部长度(D7-8)等也出现显著差异。由于深水网箱养殖模式与普通网箱养殖模式不仅在养殖空间、水深等方面存在差异,在流速上也存在较大差异。而本研究中,大黄鱼多个差异的形态参数与已报道研究中鱼类游泳能力相关的形态部位类同,但这些差异是否是个体对流速变化作出适应仍需进一步研究。

饵料是鱼类生长发育的物质能量基础,其不同的营养组成会影响养殖鱼类的生长及外部形态。陈慧等(2007)、王映等(2016)对不同来源的大黄鱼形态进行比较研究表明,养殖群体的体高、体厚等躯干参数显著高于野生群体。这些显著差异是由于2个群体在饵料营养、饱食度、生存压力等方面的不同,使养殖群体的营养物质积累远多于野生群体。表征个体饱满度的体高、体厚等躯干形态参数能在一定程度上反应鱼类生长过程中物质能量的积累状况。本研究中,不同饵料养殖大黄鱼在体高、体厚、D3-4、D3-6、D5-6存在显著差异,表明投喂不同类型饵料对养殖大黄鱼体的物质积累存在影响,这与上述研究的观点一致。高有领等(2014)对投喂不同类型饵料大黄鱼营养成分测试结果显示,投喂冰鲜饲料的养殖大黄鱼在全鱼粗脂肪含量上显著高于投喂配合饲料养殖个体。由于本研究所使用的饵料及养殖海区均与高有领等(2014)相同,因此,饲料不同的营养配比不仅影响养殖个体的营养组成,也可能因营养代谢的不同而影响养殖大黄鱼的营养物质积累,使表征个体营养状态的体高、体厚性状出现差异。

通过本研究对不同养殖环境和饵料对大黄鱼形态的影响分析表明,通过改变流速、扩大养殖空间可影响养殖大黄鱼尾部形态,使其具有更大的尾部体长占比;使用配合饲料养殖可使养殖大黄鱼体型趋于细长,更符合消费市场价值取向,但其机理及最适养殖参数仍需进一步研究确定。

参 考 文 献

- Chen H, Chen W, Lin GW, *et al.* The morphological characteristics and growth pattern of cage-cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in Guanjing-Yang population. *Marine Fisheries*, 2007, 29(4): 331-336 [陈慧, 陈武, 林国文, 等. 官井洋种群网箱养殖大黄鱼的形态特征与生长式型. *海洋渔业*, 2007, 29(4): 331-336]
- Chen W, Wang PP, Xiao SJ, *et al.* Analysis of morphological index system and sexual differences of large yellow croaker

- (*Larimichthys crocea*). Journal of Jimei University (Natural Science), 2014, 19(6): 401–408 [谌微, 王盼盼, 肖世俊, 等. 大黄鱼形态指标体系及雌雄差异分析. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(6): 401–408]
- Fei JH, Shao XY. Studies on the growth characteristics and morphological differences of fish in plateau lakes. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 789–796 [费骥慧, 邵晓阳. 高原湖泊鱼类生长特性与形态差异研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 789–796]
- Gao YL, Jiang LL, Xu XD, *et al.* Effects of dietary type on nutritional components in whole fish and muscle, body color and muscle color in Dai-Ju race large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 1–9 [高有领, 江玲丽, 徐旭栋, 等. 饵料类型对岱衢族大黄鱼鱼体和肌肉营养成分、体色、肉色的影响. 动物营养学报, 2014, 26(8): 1–9]
- Haas TC, Blum MJ, Heins DC, *et al.* Morphological responses of a stream fish to water impoundment. *Biology Letters*, 2010, 6(6): 803–806
- Hu HY, Di Y, Zhao YF, *et al.* Comparative study on the morphological characteristics of four species of *Culter* and *Culterichthys* in Lihu Lake. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2011, 26(4): 488–494 [胡海彦, 狄瑜, 赵永锋, 等. 蠡湖 4 种鲈鱼形态特征的比较研究. 云南农业大学学报, 2011, 26(4): 488–494]
- Langerhans RB, Layman CA, Langerhans AK *et al.* Habitat-associated morphological divergence in two neotropical fish species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2003, 80(4): 689–698
- Li D, Hu W, Wang Y, *et al.* Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(1): 186–197
- Li MY, Hu YZ, Miao L, *et al.* Studies on the growth characteristics and heterosis of genealogies of *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(6): 859–864 [李祥云, 胡玉珍, 苗亮, 等. 岱衢洋和官井洋大黄鱼自交与杂交子代生长性能及杂交优势分析. 水产学报, 2010, 34(6): 859–864]
- Li XM, Wang C, Yu LJ, *et al.* The effects of aerobic exercise training on the morphological characteristics of juvenile *Spinibarbus sinensis*. *Journal of Southwest University (Natural Science)*, 2013, 35(7): 21–26 [李秀明, 王川, 于丽娟, 等. 有氧运动训练对中华倒刺鲃幼鱼形态特征的影响. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(7): 21–26]
- Liao R, Qu YJ, Gou XW, *et al.* Morphological variations and discrimination of four fish species Chinese bahaba *Bahaba flavolabata*, large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, Ting'wak *Wak tingi* and spinyhead croaker *Collichthys lucidus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(4): 305–310 [廖锐, 区又君, 勾效伟, 等. 黄唇鱼、大黄鱼、丁氏鲷和棘头梅童鱼的形态差异和判别分析. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 305–310]
- Lin YH, An M, Jiang HB. Study on morphological differences among three *Schizothorax* species. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2010, 38(10): 121–126 [林艳红, 安苗, 姜海波. 3 种裂腹鱼的形态差异研究. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 121–126]
- Liu XD, Cai MY, Wang ZY, *et al.* Correlation analysis of morphometric traits and body weight of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* at different growth stage. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(5): 159–163 [刘贤德, 蔡明夷, 王志勇, 等. 不同生长期大黄鱼形态性状与体重的相关性分析. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 159–163]
- Qian RH, Li JL, Dong ZG, *et al.* Morphological variations analysis among populations of *Hyriopsis cumingii* in five large lakes of China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(4): 436–443 [钱荣华, 李家乐, 董志国, 等. 中国五大湖三角帆蚌形态差异分析. 海洋与湖沼, 2003, 34(4): 436–443]
- Qing N, Lv FY, Zhao J, *et al.* Morphological variations and geographical differentiations of *Pelteobagrus intermedius* in different drainage systems from the coastal area of western south China. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 207–212 [庆宁, 吕凤义, 赵俊, 等. 华南沿海地区西部入海水系中间黄颡鱼的形态变异及地理分化. 动物学研究, 2007, 28(2): 207–212]
- Shao F, Chen XJ, Li G, *et al.* Morphological variations and discriminant analysis of *Scomber japonicus* and *Scomber australasicus* in the Yellow Sea and East China Sea. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(2): 204–209 [邵锋, 陈新军, 李纲, 等. 东黄海鲈鱼形态差异分析. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 204–209]
- Wang Y, Ke QZ, Liu JF, *et al.* Comparison on morphology, scales and otolith characteristics between cultured stock and wild stock of *Larimichthys crocea*. *Marine Fisheries*, 2016, 38(2): 149–156 [王映, 柯巧珍, 刘家富, 等. 大黄鱼养殖群体和野生群体形态、鳞片及耳石特征比较. 海洋渔业, 2016, 38(2): 149–156]
- Wang ZZ, Zhu HJ, Ren SY, *et al.* Correlation between morphological traits and flow velocity of post larva *marsipenaes japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(2): 360–367 [王志铮, 朱海军, 任凤艺, 等. 日本囊对虾(*Marsipenaes japonicus*)秋繁仔虾形态表型与抗流性能间的相关性. 海洋与湖沼, 2016, 47(2): 360–367]
- Yi XW, Zhang WB, Mai KS, *et al.* Effects of dietary fish oil replaced with rapeseed oil on the growth, fatty acid composition and skin color of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 751–760 [易新文, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中菜籽油替代鱼油对大黄鱼生长、肌肉脂肪酸组成和体色的影响. 水产学报, 2013, 37(5): 751–760]
- Yue L, Wang XA, Ma AJ, *et al.* Comparison of the morphological traits between male and female individuals of *Takifugu rubripes*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016,

37(1): 30–35 [岳亮, 王新安, 马爱军, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)雌、雄个体的形态特征比较. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 30–35]

Zhang YZ, Wang ZY, Lin LM, *et al.* Comparative study on differences of morphologic characters of seven different stocks of the cultured large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea*) belonging to the Min-Yuedong tribe in Guanjingyang sea area, Fujian Province. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2005, 10(3): 193–199 [张雅芝, 王志勇,

林利民, 等. 养殖条件下闽-粤东族大黄鱼不同群体形态特征的比较研究. 集美大学学报(自然科学版), 2005, 10(3): 193–199]

Zheng WQ, Huang WQ, Han KH, *et al.* Growth traits of F₁ crossed between wild and selective breeding large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fisheries Science*, 2014, 33(11): 667–673 [郑炜强, 黄伟卿, 韩坤煌, 等. 大黄鱼选育群体与野生群体杂交 F₁ 生长性状研究. 水产科学, 2014, 33(11): 667–673]

(编辑 马瑾艳)

The Effects of Different Diets and Culture Environments on the Morphological Variations in the Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

SHEN Weiliang^{1,2}, WU Xiongfei¹⊙, SHENTU Jikang¹, LIN Shuqin¹

(1. Ningbo Academy of Oceanology and Fishery, Ningbo 315103; 2. Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract The morphological character is an important external indicator of the value of a large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Therefore, it has become a hotspot how to improve the morphology of the cultured large yellow croaker in the fishery industry. In this paper, we analyzed the morphological differences among the large yellow croakers cultivated in different environments and fed with different diets. We collected the morphological data of three groups of large yellow croakers, and then applied methods such as cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis to analyze the data. The results showed that there were significant differences in the body height, the caudal peduncle length, the caudal peduncle width and the trunk width between the groups. The environment and the diets also had effects on the frame morphology of D3–4, D3–6, D4–6 and D5–6. The morphological differences primarily existed in anterior trunk of the fish, which indicated that the morphological changes caused by the environment might be associated with the flow velocity. We also speculated that the diet might affect the fish morphology due to different nutrition compositions and accumulation. The cluster analysis showed that the formula diet group and the net-cage group clustered closer than the fresh diet group. Three principal components were extracted by principal component analysis, and it showed that the formula diet group and the net-cage group shared similarity in principal component 1, but were different in principal component 3. The fresh diet group was discrete on each principal component. This finding suggested that the large yellow croaker cultured in the small net cage and fed with fresh diet were more diverse in morphology. We also applied discriminant analysis and established the discriminant functions of the large yellow croaker under different conditions. The cross validation analysis showed that there was no significant difference between the discriminant functions and the expectation, which indicated that the discriminant functions could be used in the morphological identification of the large yellow croaker cultured in different patterns. Our study suggested that the morphological improvement of the large yellow croaker would be achieved to some extent by altering the flow velocity, the size of the cultural space and diets.

Key words Large yellow croaker *Larimichthys crocea*; Morphology; Diet; Environment, Multivariate analysis

⊙ Corresponding author: WU Xiongfei, E-mail: 1058837162@qq.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20160912001

http://www.yykxjz.cn/

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对白斑综合征病毒的敏感性比较



冯亚萍^{1,2,3} 孔 杰^{1,2} 罗 坤^{1,2} 栾 生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 刘 宁^{1,2}
卢 霞^{1,2} 曹家旺^{1,2,3} 王明珠^{1,2,3} 王 军^{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 本研究分别对中国对虾野生群体(Wild-*Fenneropenaeus chinensis*, W-Fc)、中国对虾选育群体‘黄海 2 号’(Selected-*Fenneropenaeus chinensis*, S-Fc)和凡纳滨对虾商业一代苗种(Commercial-*Litopenaeus vannamei*, C-Lv)采用单尾定量口饲感染白斑综合征病毒(WSSV), 比较 W-Fc、S-Fc 及 C-Lv 对 WSSV 的敏感性差异。结果显示, 感染同等含量 WSSV 后, W-Fc、S-Fc 和 C-Lv 的平均存活时间分别为(124.11±39.49) h、(166.79±51.54) h 和(136.90±41.99) h, 3 组对虾间的平均存活时间存在显著性差异($P<0.05$)。3 组对虾在感染期间的死亡趋势: W-Fc 在 96 h 达到死亡高峰, 并且一直持续到 216 h; S-Fc 和 C-Lv 在 144 h 出现死亡高峰。另外, 分别在感染后的 3、6、12、24、36、48、72、144 h 共 8 个时间点对 3 组对虾进行活体取样, 利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对其进行了病毒载量检测, 从对虾存活时间和体内肌肉组织病毒载量的角度比较不同对虾抗病性能的差异, 结果如下: 48 h 时, W-Fc、S-Fc 和 C-Lv3 对虾体内肌肉组织的病毒载量分别为($1.22\times 10^6\pm 6.14\times 10^5$)、($7.10\times 10^3\pm 7.26\times 10^2$)和($1.50\times 10^4\pm 4.19\times 10^3$) copies/ng DNA; 144 h 时, 3 组对虾体内肌肉组织病毒载量分别为($8.44\times 10^6\pm 1.25\times 10^6$)、($3.21\times 10^6\pm 8.21\times 10^5$)和($1.49\times 10^6\pm 6.59\times 10^5$) copies/ng DNA。实验结果显示, 3 组对虾对 WSSV 敏感性从高到低依次为中国对虾野生群体、凡纳滨对虾商业苗种、中国对虾选育群体, 表明中国对虾选育群体‘黄海 2 号’在人工感染 WSSV 条件下表现出了良好的抗病性能。

关键词 中国对虾; 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒(WSSV)

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0078-07

对虾产业是我国海洋渔业的重要组成部分, 而病斑综合征(White spot syndrome, WSS)是造成养殖对虾死亡的主要病症, 其发病速度快, 具有极强的破坏性

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022017001)、国家自然科学基金(31372523)、现代产业技术体系专项资金(CARS-46)和泰山学者良种工程项目共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022017001), National Natural Science Foundation of China (31372523), China Agriculture Research System (CARS-46), and Taishan Scholar Program for Seed Industry]. 冯亚萍, E-mail: 505390349@qq.com

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-09-12, 收修改稿日期: 2016-09-24

(衣启麟等, 2015), 一旦在养殖池内暴发, 在 3–10 d 内对虾死亡率会达到 100%, 致使全球对虾养殖业遭受巨大的经济损失(薛晖等, 2010; Cavalli *et al*, 2008; Verbruggen *et al*, 2016)。对虾患 WSS 后, 会出现摄食减少、空胃; 游泳无力, 反应迟钝; 甲壳上, 尤其是头胸甲处出现 2–3 mm 大小的白色斑点, 甲壳易剥离; 体色暗, 直至最后体内细胞解体、器官坏死, 导致病虾死亡(魏克强等, 2005; Dutta *et al*, 2013)。而白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)为水产动物中已知基因组最大的病毒, 2009 年被农业部《一、二、三类动物疫病病种名录》列为水生生物一类动物疫病病毒(马晓燕等, 2012)。为了了解和控制疾病的发生, 减少经济损失, 诸多学者探究 WSSV 的防治措施(闫冬春, 2006)。然而, 这些方法都不能有效控制 WSS 的大规模暴发(Verbruggen *et al*, 2016)。

研究发现, 当对虾种类、感染方式和感染剂量不同时, 对虾的死亡时间存在差别(江世贵等, 2000; 何建国等, 1999)。孙成波等(2006)研究发现, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*) 在人工注射感染 WSSV 后, 其病毒复制的时间和抵抗力存在明显的差异。Jiang 等(2006)研究发现, 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)在 WSSV 人工感染下, 日本囊对虾的存活时间长于中国对虾。张天时等(2010)研究发现, 中国对虾自然感染与人工感染 WSSV, 其部分家系对 WSSV 的抵抗力较强。研究中国对虾与凡纳滨对虾, 以及中国对虾选育群体和野生群体感染 WSSV 后存活时间及其体内 WSSV 病毒载量变化; 阐明不同对虾种类对 WSSV 抗病力的差异及影响因素, 可为实践中进一步优化选育策略、合理地选择养殖品种、减少和控制对虾疾病的暴发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验条件

实验在中国水产科学研究院黄海水产研究所对虾性状测试车间进行, 实验所用玻璃钢圆池容积为 10 m³, 实际加水量约为 6 m³, 保证 24 h 充气。实验用水为经砂滤的自然海水, 海水盐度为 30±1, 实验期间水温维持在(24±2)℃, 实验前, 圆池用次氯酸钠浸泡消毒 12 h 后清洗干净。

1.2 健康对虾来源

实验所用中国对虾野生群体是从韩国引进的朝鲜半岛西海岸野生群体(W-Fc); 中国对虾选育群体来自山东青岛海水养殖引种育种中心, 为经过连续 10 代人工选育的抗病新品种‘黄海 2 号’(S-Fc); 凡纳滨对虾群体为购自广州某育苗场的商业一代苗种(C-Lv)。3 组对虾体长为 5–7 cm, 体重为 1.6–2.1 g, 各 600 尾。实验前暂养 3 d, 每日投喂 3 次(06:00、14:00、22:00)配合饲料(日投饵量占对虾总体重的 3%–5%), 吸污 1 次, 换水 1 次(约为 50%)。实验前, 3 组对虾各随机抽取 10 尾对虾, 经实时荧光定量 RT-PCR 检测其体内 WSSV 病毒载量, 结果均为阴性。

1.3 WSSV 毒饵的制备

取甲壳有明显白斑、濒死发病的对虾, 经实时荧光定量 PCR 检测肌肉中 WSSV 拷贝数, 最后制成病毒载量为 10⁷ copies/mg 的毒饵。在充分预冷的组织匀浆机中搅匀, 加入可食用红色素, 制成混合均匀、颜色醒目的毒饵, 毒饵制备过程必须在低温环境中快速进行, –80℃ 冰箱保存。

1.4 人工饲喂感染

对虾各设置 2 个平行组和 1 个对照组(各 200 尾)。饲喂毒饵前, 对虾饥饿处理 6 h, 保证其胃肠排空。分别将不同实验组的对虾捞出, 放入单独容器中, 将制备的新鲜 WSSV 毒饵置于冰上, 用镊子夹取毒饵(约 10 mg)轻轻送至对虾口器处, 待抱食后的对虾胃部出现明显的红色, 将其放回圆池。对照组饲喂经检验不含病毒的对虾肌肉。饲喂完毕后, 正常投饵、换水, 观察对虾死亡情况, 清除 24 h 内死亡的对虾。

1.5 样品采集及处理

实验开始后, 分别选取 3、6、12、24、36、48、72、144 h 共 8 个时间点活体取样, 用于检测体内肌肉组织的病毒载量。每组对虾每个时间点取 3 个样品的肌肉组织并置于–80℃ 冰箱保存, 实验共进行 13 d。

1.6 WSSV 载量检测方法

取 8 个时间点的各组对虾肌肉组织按照王伟继(2008)¹⁾方法进行 DNA 的提取。DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统(BioImaging Systems)检测

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的 QTL 定位. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 66–73]

其完整性,使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis Bo-2000)测定 DNA 质量及浓度,并将其稀释至 40 ng/ μ l。WSSV 载量测定采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法(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。荧光定量 PCR 反应体系(20 μ l): 1 \times Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)、正反向引物各 0.25 μ mol/L(表 1)、ROX Reference Dye II 0.25 μ mol/L、探针 0.125 μ mol/L、病毒 DNA 模板 2 μ l,灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ 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 10²)–(1.02 \times 10⁸) copies/ μ l,无菌双蒸水作为阴性对照,每个稀释度设置 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的 WSSV 载量。

表 1 实验所用引物序列
Tab.1 Sequences of PCR primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
WSS probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA
WSS1011F	TGGTCCCGTCCTCATCTCAG
WSS1079R	GCTGCCTTGCCGAAATTA

1.7 数据统计及分析

从出现第 1 尾对虾死亡开始,每隔 1 h 进行观察,捞出死亡对虾,记录其死亡时间,装入取样管并放置于–20 $^{\circ}$ C 冰箱中,直至对虾全部死亡。统计感染 WSSV 后每组对虾的平均存活时间,结果表示为平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)。采用 SPSS 19.0 软件和 Origin 9.0 进行数据统计分析,并用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行对虾平均存活时间和体内肌肉组织病毒载量的差异分析。

表 2 WSSV 感染后 3 组对虾存活时间
Tab.2 Survival time of the three groups of shrimps after WSSV infection

存活时间 Survival time (h)	W-Fc	S-Fc	C-Lv
最大 Max	212	273	264
最小 Min	41	48	42
平均 Mean	124.11 \pm 39.49 ^a	166.79 \pm 51.54 ^c	136.90 \pm 41.99 ^b

注:不同的字母表示组间差异显著($P < 0.05$); W-Fc 代表中国对虾野生群体, S-Fc 代表中国对虾选育群体, C-Lv 代表凡纳滨对虾商业苗种,下同

Note: Different letters indicated significant differences between groups ($P < 0.05$); W-Fc: Wild population of *F. chinensis*; S-Fc: Selective breeding population of *F. chinensis*; C-Lv: Commercial *L. vannamei* seed. The same as below

2 结果

2.1 WSSV 感染后对虾存活时间差异的比较

3 组对虾均在 40 h 后开始出现死亡个体。S-Fc 最大存活时间比 C-Lv 长 9 h,比 W-Fc 长 62 h; S-Fc 最小存活时间比 C-Lv 长 6 h,比 S-Fc 长 7 h。对照组无死亡,而 WSSV 感染组的死亡率为 100%。用单因素方差分析比较同种含量病毒感染下 3 组对虾的平均存活时间的差异,结果显示, S-Fc、W-Fc 和 C-Lv 两两之间平均存活时间均存在显著性差异(表 2)。

2.2 WSSV 感染后 3 组对虾各时间段的死亡情况

WSSV 感染后 3 组对虾各时间段的死亡情况: 40 h 前, 3 组对虾无死亡; 40–48 h, W-Fc、S-Fc 和 C-Lv 组死亡尾数分别为 8、2 和 2 尾; 72–96 h, 3 组对虾的死亡尾数分别为 78、39 和 9 尾, W-Fc 死亡数量迅速上升, S-Fc 上升较慢; 96–120 h, W-Fc 最先达到单位时间死亡尾数最大值,为 80 尾; 120–144 h, S-Fc 和 C-Lv 同时达到单位时间段死亡尾数最大值,分别为 96 尾和 89 尾。W-Fc 在 72–168 h 持续保持相对较高的死亡数量,在 126 h 死亡率最先达到 100%。S-Fc 在 192–216 h 达到死亡尾数的第二高峰。

2.3 WSSV 感染后 3 组对虾累积死亡率的比较

实验开始 40 h 内, 3 组对虾累积死亡率均为 0。随着实验的进行,对虾开始逐渐死亡,其累积死亡率不断增长。W-Fc、S-Fc 和 C-Lv 对虾累积死亡率在 120 h 时分别达到 48.93%、13.62%和 35.34%; 168 h 时,分别达到 84.71%、55.53%和 76.19%; 分别在 216、288、264 h 达到 100%。

2.4 WSSV 感染后 3 组对虾肌肉病毒载量的变化

W-Fc、S-Fc 和 C-Lv 其体内肌肉组织病毒载量在 3–12 h 均保持较低水平(1.01 \times 10³–3.60 \times 10³ copies/ng DNA), 随后出现病毒增殖高峰期,并伴随死亡高峰

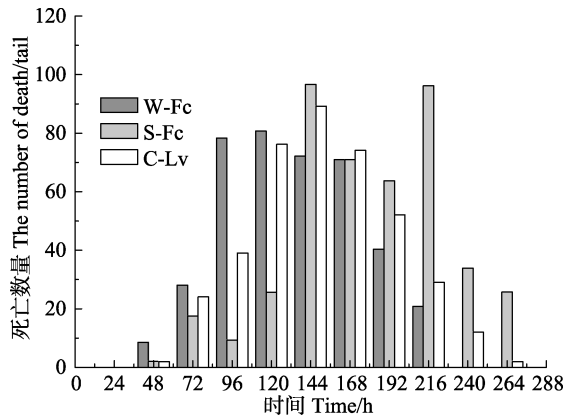


图 1 3 组对虾不同时间点的死亡数量

Fig.1 The number of death of three groups of shrimps at different time points

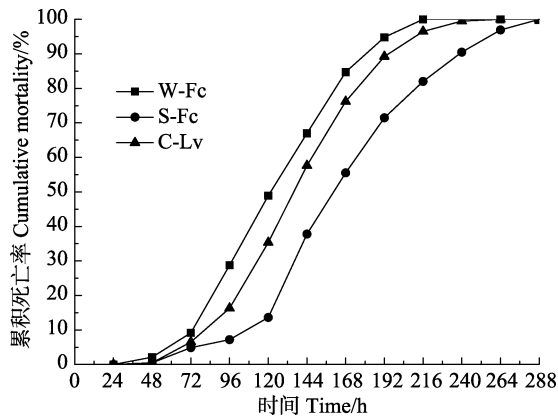


图 2 WSSV 感染后对虾的累积死亡率

Fig.2 The cumulative mortality of shrimps after the WSSV infection

期; 24–36 h, W-Fc 达到 $(2.12 \times 10^4 \pm 5.24 \times 10^3)$ copies/ng DNA, S-Fc 和 C-Lv 保持较低水平; 至 48 h, 3 组分别达到 $(1.22 \times 10^6 \pm 6.14 \times 10^5)$ 、 $(7.10 \times 10^3 \pm 7.26 \times 10^2)$ 和 $(1.50 \times 10^4 \pm 4.19 \times 10^3)$ copies/ng DNA, 3 组均有显著性差异($P < 0.05$), S-Fc 和 C-Lv 两组之间差异不显著($P >$

0.05); 至 72 h, S-Fc 达到 $(8.71 \times 10^5 \pm 4.80 \times 10^5)$ copies/ng DNA, C-Lv 保持在 $(1.90 \times 10^4 \pm 2.57 \times 10^3)$ copies/ng DNA, 两组差异显著($P < 0.05$); 当 3 组对虾体内肌肉组织病毒载量均达 10^6 copies/ng DNA 时, 其所用时间分别为 48、144 和 144 h (表 3)。

48 h 之前, 3 组对虾整体增殖趋势为 W-Fc 增长最快, C-Lv 次之, S-Fc 最慢。48–144 h 时, 其增殖趋势是 W-Fc 增长速度最快, S-Fc 增殖速度开始迅速上升, C-Lv 缓慢上升。

3 讨论

在感染对虾的众多病原中, WSSV 的危害最严重 (Bonilla *et al*, 2007)。研究同种对虾不同品种以及不同种类对虾对 WSSV 的敏感性关系, 对于虾的遗传选育有重要意义 (刘庆慧等, 2005)。现已有中国对虾和日本囊对虾 (盖春蕾等, 2013)、凡纳滨对虾和斑节对虾 (Wongtavatchai *et al*, 2007)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponensis*) 和凡纳滨对虾 (戚兰等, 2003) 以及不同家系的中国对虾 (董世瑞等, 2015) 对疾病的敏感性差异研究。

3.1 对虾自身特点

宿主对 WSSV 的敏感性和抵抗力因种而异, 如 WSSV 引起印度对虾 (*Penaeus indicus*)、斑节对虾、巨掌沼虾 (*Macrobrachium superbum*) 100% 死亡率的时间分别为感染后的 72 h、48 h、5 d 和 8 d, 而罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 在注射感染 WSSV 15 d 后没有死亡 (Sahul *et al*, 2000)。李素红等 (2007) 研究表明, 即使同一种属不同家系之间的中国对虾, 对 WSSV 的敏感性也存在较大差异。黄永春等 (2013) 对凡纳滨对虾进行 WSSV 感染实验发现, 不同家系的

表 3 3 组对虾不同时间病毒载量 (copies/ng DNA)

Tab.3 The viral loads in the three groups of shrimps at different time points (copies/ng DNA)

时间 Time (h)	W-Fc	S-Fc	C-Lv
3	$1.96 \times 10^3 \pm 5.27 \times 10^1$ ab	$1.17 \times 10^3 \pm 6.65 \times 10^2$ b	$2.33 \times 10^3 \pm 5.21 \times 10^2$ a
6	$1.01 \times 10^3 \pm 1.74 \times 10^2$ b	$2.26 \times 10^3 \pm 8.17 \times 10^2$ a	$1.20 \times 10^3 \pm 6.49 \times 10^1$ b
12	$1.55 \times 10^3 \pm 2.51 \times 10^2$ b	$3.60 \times 10^3 \pm 8.16 \times 10^2$ a	$2.04 \times 10^3 \pm 1.96 \times 10^2$ b
24	$1.82 \times 10^4 \pm 1.51 \times 10^3$ a	$9.42 \times 10^2 \pm 3.98 \times 10^2$ b	$6.55 \times 10^3 \pm 3.09 \times 10^3$ ab
36	$2.12 \times 10^4 \pm 5.24 \times 10^3$ a	$3.39 \times 10^3 \pm 2.12 \times 10^2$ b	$5.04 \times 10^3 \pm 1.79 \times 10^3$ b
48	$1.22 \times 10^6 \pm 6.14 \times 10^5$ a	$7.10 \times 10^3 \pm 7.26 \times 10^2$ b	$1.50 \times 10^4 \pm 4.19 \times 10^3$ b
72	$2.82 \times 10^6 \pm 7.93 \times 10^5$ a	$8.71 \times 10^5 \pm 4.80 \times 10^5$ b	$1.90 \times 10^4 \pm 2.57 \times 10^3$ c
144	$8.44 \times 10^6 \pm 1.25 \times 10^6$ a	$3.21 \times 10^6 \pm 8.21 \times 10^5$ a	$1.49 \times 10^6 \pm 6.59 \times 10^5$ b

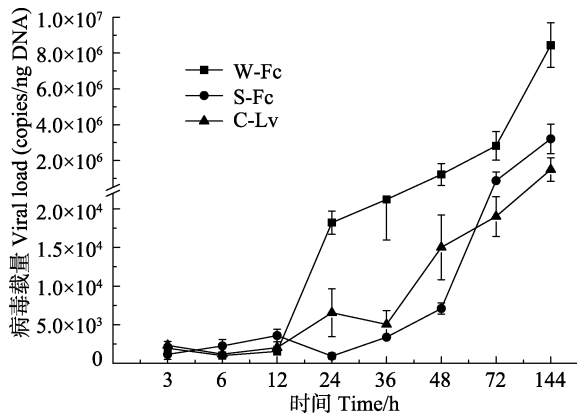


图3 WSSV感染后对虾肌肉病毒载量变化

Fig.3 Changes in the viral loads in the muscle of the three groups of shrimps after WSSV infection

对虾对 WSSV 的抗性不同。本研究比较了中国对虾和凡纳滨对虾以及中国对虾人工选育群体与野生群体之间对 WSSV 的敏感性,其在平均存活时间、累积死亡率和对虾体内病毒载量方面均存在显著差异。

3.2 抗病选育效果

20 世纪 90 年代前,我国北方对虾养殖主要品种是中国对虾。2001 年后,由于凡纳滨对虾性状优良,在我国沿海养殖规模迅速扩大,成为我国对虾养殖的绝对优势种(黄永春等, 2013)。本研究中,中国对虾野生群体与凡纳滨对虾商业苗种相比较,平均存活时间短(表 2)、各时间点累积死亡率高(图 2),并且随着实验时间的延长其体内病毒载量增殖的速度加快(图 3),从抗 WSSV 性能角度揭示了凡纳滨对虾之所以能够替代中国对虾成为绝对优势种的原因。但本研究中,凡纳滨对虾商业苗种与中国对虾‘黄海 2 号’相比,其对 WSSV 的耐受力较差,可能是由于种源受控:一代苗种泰国正大对虾、美国迈阿密 SIS 对虾等质量参差不齐,土苗冒充一代苗种等原因导致。而中国对虾‘黄海 2 号’是采用群体、家系与多性状复合育种技术,经 10 代连续培育出的中国对虾养殖新品种(品种登记号: GS01-002-2008),其表现出明显的抗病性,能有效阻止 WSSV 的感染规模以及感染进程,应用于实际生产中,能够在一定程度上缓解和控制 WSSV 疾病的发生,减少养殖户的经济损失(逢锦菲等, 2013)。中国对虾‘黄海 2 号’已在我国山东、天津、河北、江苏等沿海省市推广应用,为我国对虾养殖业带来了良好的社会效益和经济效益(孔杰等, 2012)。在等量 WSSV 感染下,中国对虾选育群体‘黄海 2 号’比中国对虾野生群体平均存活时间长,并且随着实验的进行对虾体内病毒增殖相对缓慢,在一定程度上说

明中国对虾的选育工作取得了一定的进步和成果,也符合了其具有明显抗病性的结论。通过抗病良种选育,可提高对虾的免疫机能和抗病能力,是有效预防对虾白斑病的重要措施之一(纪荣兴等, 2008)。

3.3 免疫机制

对虾属于无脊椎动物,没有后天的获得性免疫反应(Adaptive immune response),它对病原体的免疫力依赖于其先天免疫系统(Innate immune system),这个免疫系统包括一系列的体液和细胞免疫因子(Li *et al.*, 2013)。戚兰等(2003)对日本沼虾和凡纳滨对虾体液防御系统中重要免疫因子比较研究,发现凡纳滨对虾肌肉溶菌酶活性、血液中的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活性均高于日本沼虾,说明凡纳滨对虾的溶菌酶和溶酶体酶的免疫功能比日本沼虾强;日本沼虾的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性高于凡纳滨对虾,说明日本沼虾的抗氧化酶活力比凡纳滨对虾强。Jiang(2010)通过对中国对虾和日本囊对虾在感染等量 WSSV 的情况下分析其免疫因子变化,得出日本囊对虾抗 WSSV 的免疫系统强于中国对虾。这些研究表明,不同种类的对虾在免疫机制上存在差异,但关于中国对虾和凡纳滨对虾在 WSSV 感染下免疫因子变化的差异,还需要进一步研究。

本研究中国对虾选育群体‘黄海 2 号’在人工感染 WSSV 条件下表现出良好的抗病性能。表明通过抗病选育获得对虾新品种是防治 WSS 的一个有效途径,新品种的推广和应用大大缓解了 WSS 疾病的危害。

参 考 文 献

- Bonilla CME, Sanz VA, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 31(1): 1-18
- Cavalli LS, Netto SA, Abreu PC, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, southern Brazil. *Atlantica (Rio Grande)*, 2008(No.1)
- Dong SR, Lu YF. Path analysis of effects of morphometric traits on resistance to WSSV among different families in *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2015, 5(2): 15-21 [董世瑞, 吕瑜峰. 不同家系中国对虾形态性状与抗病力的关系. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(2): 15-21]
- 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

- Dutta S, Chakrabarty U, Mallik A, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) prevalence associated with disease resistance among wild populations of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research*, 2013, 46(2): 453–461
- Gai CL, Xu L, Ye HB, *et al.* The difference of sensitivity to the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science & 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]
- He JG, Zhou HM, Yao B, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) host range and transmission route. *Journal of Sun Yatsen University (Natural Science Edition)*, 1999, 38(2): 65–70 [何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(2): 65–69]
- Huang YC, Ai HS, Pan ZC, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 359–366 [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. *水产学报*, 2013, 37(3): 359–366]
- Ji RX, Zou WZ, Yan QP, *et al.* Immunogenicity and WSSV resistance of anti-WSSV *Penaeus japonicus* F3. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(1): 98–104 [纪荣兴, 邹文政, 鄢庆彬, 等. 日本对虾抗白斑病子三代的抗白斑综合征病毒感染能力及免疫特性. *水产学报*, 2008, 32(1): 98–104]
- Jiang G, Yu R, Zhou M. Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus* after white spot syndrome virus infection. *Nitric Oxide*, 2006, 14(3): 219–277
- Jiang GJ. Comparison of defence ability against the white spot syndrome virus between *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): 1322–1330
- Jiang SG, He JG, Ma ZM, *et al.* The pathogenicity of the white spot syndrome virus to *Penaeus monodon* larva. *Journal of Sun Yatsen University (Natural Science Edition)*, 2000, 39(S1): 172–176 [江世贵, 何建国, 马之明, 等. 白斑综合征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]
- 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): 1855–1862 [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): 1855–1862]
- Li FH, Xiang JH. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(1): 11–26
- Li SH, Zhang TS, Meng XH, *et al.* Analysis of the resistance of heterosis in *Fenneropenaeus chinensis* to natural infection with white spot syndrome virus. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 68–75 [李素红, 张天时, 孟宪红, 等. 中国对虾杂交优势对自然感染白斑综合征病毒的抗病力分析. *水产学报*, 2007, 31(1): 68–75]
- Liu QH, Huang J, Yang B, *et al.* Changes of immune and biochemical factors in two selected populations of prawn (*Fenneropenaeus chinensis*) infected by white spot syndrome virus. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(6): 22–27 [刘庆慧, 黄捷, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化. *海洋水产研究*, 2005, 26(6): 22–27]
- Ma XY, Li P, Yan J, *et al.* A review on shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Nanjing Normal University*. 2012, 35(4): 90–100 [马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合征病毒的概述. *南京师大学报(自然科学版)*, 2012, 35(4): 90–100]
- Pang JF, Kong J, Meng XH, *et al.* Real-time assay for quantifying WSSV load in *Fenneropenaeus chinensis* “Huang hai No.2”. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 782–787 [逢锦菲, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) “黄海 2 号”人工感染 WSSV 的荧光定量分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 782–787]
- Qi L, Ke HF, Zheng CY, *et al.* Studies on immunological factors of *Macrobrachium nipponense* and *Penaeus vannamei*. *Journal of Shaoxing University*, 2003, 23(10): 65–67 [戚兰, 柯慧芬, 郑春燕, 等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究. *绍兴文理学院学报*, 2003, 23(10): 65–67]
- Sahul Hameed AS, Xavier CM, Anilkumar M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 2000, 183(3–4): 207–213
- Sun CB, He JG, Li ZL, *et al.* Sensitivity difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Guangdong 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. *广东海洋大学学报*, 2006, 26(3): 17–20]
- Verbruggen B, Bickley L, van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, 2016, 8(1): 23
- Wei KQ, Xu ZR. Advances in research of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 41(5): 39–41 [魏克强, 许梓荣. 对虾白斑综合征病毒研究进展. *中国兽医杂志*, 2005, 41(5): 39–41]
- Wongtavatchai J, Lópezdóriga MV, Francis MJ. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2010, 308(3–4): 75–81
- Xue H, Ding ZF, Zhou G, *et al.* Survey and research of the white spot syndrome virus (WSSV) infection in several kinds of economic types of freshwater crustaceans. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(3): 294–297 [薛晖, 丁正峰,

- 周刚, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)在几种经济类淡水甲壳动物中的感染与流行调查研究. 江苏农业科学, 2010(3): 294–297]
- Yan DC. Prevention and cure of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 25(4): 202–204 [闫冬春. 防治对虾白斑综合征病毒(WSSV)的主要措施. 水产科学, 2006, 25(4): 202–204]
- Zhang TS, Kong J, Li SH, *et al.* Comparison of WSSV-resistance in artificial and natural infection experiments in *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 41(5): 763–768 [张天时, 孔杰, 李素红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)自然感染与人工感染 WSSV 抗病力的比较. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 763–768]
- Yi QL, Liu R, Sun R, *et al.* Oral administration of CpG ODNs and *Yarrowia lipolytica* harboring VP28 in farm ponds to protect shrimp from white spot syndrome virus infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 77–86 [衣启麟, 刘瑞, 孙瑞, 等. 自然养殖水体投喂 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗 WSSV 的免疫保护作用. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 77–86]

(编辑 冯小花)

The Comparison of the Sensitivity to the White Spot Syndrome Virus Between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus vannamei*

FENG Yaping^{1,2,3}, KONG Jie^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2}, CAO Baoxiang^{1,2}, LIU Ning^{1,2}, LU Xia^{1,2}, CAO Jiawang^{1,2,3}, WANG Mingzhu^{1,2,3}, WANG Jun^{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 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In the present study, we applied the quantitative feeding method to compare the sensitivity to WSSV infection of shrimp species including Wild *Fenneropenaeus chinensis* (W-Fc), Selected *Fenneropenaeus chinensis* (S-Fc) and Commercial *Litopenaeus vannamei* (C-Lv). We found that the average survival time after being fed with equal amount of WSSV-loaded baits was (124.11±39.49) h, (166.79±51.54) h and (136.90±41.99) h for W-Fc, S-Fc and C-Lv respectively, which were significantly different among the three groups ($P<0.05$). The death peak of W-Fc appeared at 96 h after infection and continued to 216 h, and the death peaks of C-Lv and S-Fc occurred at 144 h after infection. The quantity of virus in muscles of living shrimp samples was examined with absolute quantitative PCR at eight time points (3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, and 144 h). The virus loads in W-Fc, S-Fc, and C-Lv at 48 h were ($1.22\times 10^6\pm 6.14\times 10^5$), ($7.10\times 10^3\pm 7.26\times 10^2$), and ($1.50\times 10^4\pm 4.19\times 10^3$) copies/ng DNA respectively. At 144 h, the virus loads in the three groups of shrimps were ($8.44\times 10^6\pm 1.25\times 10^6$), ($3.21\times 10^6\pm 8.21\times 10^5$), and ($1.49\times 10^6\pm 6.59\times 10^5$) copies/ng DNA respectively. These results indicated that W-Fc was more sensitive to WSSV, and that S-Fc had higher resistance to WSSV. It suggested that S-Fc and C-Lv had different sensitivity to WSSV infection and thus might have distinct immune mechanisms against WSSV. S-Fc showed higher resistance to WSSV, implying that the resistance to WSSV was well improved in “Huanghai No.2” through long-term artificial selection. Therefore, an effective way to prevent and treat WSSV is selective breeding, which could greatly reduce the damage of WSSV disease.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; *Litopenaeus vannamei*; White spot syndrome virus (WSSV)

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响^{*}

李晓丽 王 玲 宋 凯 鲁康乐 张春晓^① 袁香丽



(集美大学农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室 厦门 361021)

摘要 以鱼粉水平为 30%的饲料为高鱼粉饲料对照组,以豆粕替代高鱼粉饲料中 50%鱼粉形成低鱼粉基础饲料,低鱼粉基础饲料添加 0、0.5%、1.0%、1.5%和 2.0%低分子水解鱼蛋白,配制 6 种实验饲料,对初始体重为(0.44±0.02) g 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)幼虾进行 48 d 的养殖实验。实验结束后采集样品,测定肝胰腺酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力和丙二醛(MDA)含量,并分析肠道先天免疫缺陷基因(IMD)、对虾素 3a 分子(Penaiedin 3a)、溶菌酶(LZM)和 Crustin 相关免疫基因的表达量,以探讨低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响。结果显示,在低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白能够显著提高对虾肝胰腺 T-SOD、AKP 和 ACP 的活力,降低 MDA 的含量;且 1.5%低分子水解鱼蛋白能增加 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin 基因表达量。综上,凡纳滨对虾非特异免疫力和抗氧化能力的降低可能是影响植物蛋白源替代鱼粉的关键原因之一,而在饲料中补充 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白可有效提高凡纳滨对虾抗病相关基因的表达量,增强其非特异免疫力和抗氧化能力。

关键词 凡纳滨对虾; 鱼粉替代; 水解鱼蛋白; 非特异免疫; 抗病基因

中图分类号 S963.71 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0085-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾,是目前世界养殖产量最高的三大虾种之一,具有抗逆性强、营养要求低、生长速度快、含肉量大等优点(储霞玲等,2008)。然而,在集约化养殖过程中,密度高、水交换差及环境不稳定等因素,往往引起虾体的应激反应,使其抗氧化能力受损、免疫力下降,导致疾病频发、生长缓慢。各种水产药物的广泛应用引发了社会对养殖对虾食品安全的忧虑,通过营养调控来提高凡纳滨对虾的抗氧化和免疫能力进而提高虾的产量和品质已成为研究的热点。

低分子水解鱼蛋白是一类富含低分子蛋白的寡肽,比高分子物质更易被肠道上皮细胞吸收。林启存

等(2010)研究证明,由 2–6 个氨基酸组成的小肽具有重要的生物学活性,作为促进生长、增强免疫力的营养性添加剂广泛用于畜禽养殖。研究表明,在饲料中添加水解鱼蛋白能提高鱼类的生长、免疫力和对病原的抵抗力(Liang *et al*, 2006; Tang *et al*, 2008; Khosravi *et al*, 2015; 牟玉超等,2016)。Nazeer 等(2012)也证实从红牙鱼(*Otolithes ruber*)肌肉中提取和制备的水解鱼蛋白在体内外均具有抗氧化活性。

近年来,由于海洋渔业资源的减少和水产养殖的快速发展,导致鱼粉的供应量锐减,而需求量猛增,鱼粉价格飙升,使得养殖成本明显增加,给饲料生产企业和养殖业带来了巨大压力和挑战。因此,亟需寻

^{*} 农业部公益性行业专项子项目(201303053)和福建省中青年教育科研项目(JA15284)共同资助[This work was supported by Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303053), and Young and Middle-Aged Teachers Education Scientific Research Project of Fujian Province (JA15284)]. 李晓丽, E-mail: 1529194059@qq.com

^① 通讯作者: 张春晓, 副教授, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-02, 收修改稿日期: 2016-08-03

找替代鱼粉的蛋白资源或技术方案。植物蛋白源因价格低廉且供应稳定,备受研究者关注。但目前的研究表明,饲料中含有较高的植物蛋白会导致水产动物生长缓慢、饲料利用率差、免疫力下降等(Francis *et al.*, 2001; Opstvedt *et al.*, 2003)。其原因,一方面是植物蛋白含抗营养因子、缺乏某些小分子物质,影响了鱼类健康(Rahman *et al.*, 2010; Bulbul *et al.*, 2015; Chiu *et al.*, 2016),另一个可能的重要因素是植物蛋白在消化过程中低分子肽的释放量和比例与鱼粉明显不同(Aksnes *et al.*, 2006),影响了动物对蛋白质的吸收。本研究在高豆粕饲料中添加不同水平的小分子水解鱼蛋白,研究其对凡纳滨对虾抗氧化以及相关免疫基因的影响,为对虾配合饲料替代蛋白源研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 低分子水解鱼蛋白制备

将新鲜的沙丁鱼(*Sardina melanostictus*)清洗干净,经组织捣碎机(Retsch GM200)捣碎成糜浆。将糜浆按 1:4 的比例加入双蒸水,并用 1.2 mol/L 的 NaOH 调至 pH 为 7.5。然后按糜浆重量的 0.4% 加入木瓜蛋白酶(80 万 U/g)和胰酶(4000 U/g)(江苏南宁庞博生物工程公司)(比例为 3:1),在恒温磁力搅拌水浴锅里 55℃ 水解 8 h。反应结束后,95℃ 灭活 15 min,反应液 5000 r/min 离心 40 min,酶解液经 200、1000 Da 超滤膜堆装置(世达膜-001A)进行超滤,制成小肽滤液。滤液在真空冷冻干燥机中浓缩冻干、备用。制备的低分子水解鱼蛋白产品采用高效液相色谱仪(HPLC)测得水解鱼蛋白组分(郑珂珂等, 2011)(表 1)。

1.2 实验饲料

以鱼粉和豆粕为主要蛋白源,鱼油、豆油和大豆磷脂为脂肪源,小麦面粉为主要糖源,并补充无机盐和和维生素等配制基础饲料。以 30% 鱼粉饲料为高鱼粉对照组,以植物蛋白替代高鱼粉饲料中 50% 的鱼粉蛋白配制低鱼粉基础饲料,向低鱼粉基础饲料中分别添加 0、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 低分子水解鱼蛋白,共配制 6 种实验饲料(表 2)。

各种实验饲料原料经粉碎,过 80 目筛网,按配比称量后逐级混合均匀,然后加入适量的水揉匀,经双螺杆制粒机(CD4×1TS 多功能催化剂成形机)加工

成 1.5 mm×2 mm 的颗粒状饲料,并在 60℃ 烘干至饲料水分含量约 12%,于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3 实验对虾及饲养管理

实验所用凡纳滨对虾购于福建省漳州市正大集团育苗场。养殖实验在集美大学水产实验场中进行。正式实验前,凡纳滨对虾暂养于 2 个 1000 L 的水族箱中,以实验低鱼粉基础饲料投喂 2 周,待其适应实验饲料后,禁食 24 h,然后选择健康、体重为 (0.44±0.02) g 的幼虾,随机放入 24 个实验桶(约 120 L 水体)中,每桶放养 30 尾虾。正式实验期间,每种饲料投喂 4 个养殖桶,且每天饱食投喂 3 次(08:00、14:00 和 18:00),实验持续 48 d。实验期间,每天清除残饵和粪便,记录摄食量和对虾健康状况。实验用水为经砂滤后的天然海水,盐度为 20–23,养殖全程不间断充气。实验期间水温为 25–28℃,pH 为 7.9–8.2,溶解氧约为 6 mg/L。每天排污 1 次,每次换水占总水量约 10%。

实验结束时,将实验虾禁食 24 h,以丁香油(1:10000)麻醉。分别从每桶随机抽取 10 尾实验虾,经麻醉后取肝胰腺和肠道于液氮速冻,放入 -80℃ 冰箱保存。

1.4 样品分析与测定方法

1.4.1 常规成分分析 采用凯氏定氮法测定饲料粗蛋白含量;采用索氏抽提法,以乙醚为抽提剂测定饲料粗脂肪含量;将饲料样品在烘箱里烘(105℃) 6 h 后测得样品水分含量。

1.4.2 非特异免疫和抗氧化指标测定 丙二醛(MDA)含量,总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)的酶活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

1.4.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 用全自动研磨仪将 50–100 mg 肠道组织研磨至无大血块,用 Trizol(Invitrogen, 美国)提取总 RNA。用氯仿抽提,异丙醇沉淀 RNA,再用 75% 的乙醇洗涤 2 次,最后用无菌水溶解 RNA。用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。以 Thermo Scientific Revert Aid First-Strand Synthesis System (Invitrogen, 美国)试剂盒合成 cDNA。

实时荧光定量 PCR 采用 20 μl 体系:上下游引物

表 1 低分子水解鱼蛋白的分子量分布
Tab.1 Molecular weight of low-molecular-weight fish hydrolysate

分子量 Molecular weight (Da)	<200	200–500	500–1000	1000–1500	1500–2000	>2000
含量 Content (%)	24.10	68.71	4.02	2.92	0.25	0.00

表 2 实验饲料配方及营养组成(以干物质为基础%)

Tab.2 Formulation and the proximate chemical composition of the experimental diets (Dry-matter basis %)

原料 Ingredients	HFM	LFM0	LFM0.5	LFM1.0	LFM1.5	LFM2.0
鱼粉 Fish meal	30.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
豆粕 Soybean meal	25.00	47.00	47.00	47.00	47.00	47.00
鱿鱼膏 Squid visceral paste	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
虾粉 Shrimp meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
低分子水解鱼蛋白 Low-molecular-weight fish hydrolysate	0.00	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
小麦粉 Wheat flour	31.00	22.30	21.80	21.30	20.80	20.30
鱼油 Fish oil	1.00	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20
大豆油 Soybean oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质混合物 Mineral premix ^a	0.05	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素混合物 Vitamin premix	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
维生素 C 磷酸酯 L-ascorbate-2-phosphate	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
防霉剂 Mold inhibitor	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
海藻酸钠 Sodium alginate	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氨基酸混合物 Amino acid mixture ^b	0.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
乙氧喹啉 Ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
主要成分 Proximate composition						
水分 Moisture	12.97	13.46	11.78	11.35	11.26	12.27
粗蛋白 Crude protein	44.44	44.49	43.68	45.74	45.37	45.56
粗脂肪 Crude lipid	7.59	7.56	7.55	7.55	7.54	7.54

注: a: 以占每千克饲料重为标准, 含有 Mg 233.3 mg、Zn 92.8 mg、Se 40 mg、I 20 mg、Mn 220.1 mg 和 Cu 128 mg;
b: 以占总氨基酸量的百分比为标准, 赖氨酸占 50%、蛋氨酸 30%、苏氨酸 20%。所有氨基酸为晶体氨基酸

Notes: a: Provided per kg of feed, Magnesium 233.3 mg, Zinc 92.8 mg, Selenium 40 mg, Iodine 20 mg, Manganese 220.1 mg, and Copper 128 mg; b: Provided as percentage of total amino acids, Lysine 50%, Methionine 30%, Threonine 20%. All amino acids were crystal amino acids

各 1 μ l, 稀释的 cDNA 模板溶液 9 μ l, AceQ[®] qPCR SYBR[®] Master 混合物 10 μ l。程序为 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环。基因表达结果采用相对表达量的形式, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。凡纳滨对虾免疫基因、内参基因 β -actin 引物序列参考张盛静等(2015)(表 3)。

1.4.4 统计方法 采用 SPSS 17.0 对所得数据进行方差分析, 若差异达显著性水平 $P < 0.05$, 则进行 Duncan 氏多重比较。

2 结果

2.1 饲料添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异免疫和抗氧化指标的影响

饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫和抗氧化指标的影响见表 4。由表 4 可

知, 凡纳滨对虾 T-SOD 的活力在低分子肽添加组(LFM0.5、LFM1.0、LFM1.5 和 LFM2.0)显著高于低鱼粉基础组(LFM0)($P < 0.05$), 而在低分子水解鱼蛋白添加组中, LFM1.0 组的活力最高, 显著高于其他组, 但与高鱼粉组(HFM)差异不显著($P > 0.05$)。当低分子水解鱼蛋白的添加量高于 1.0% 时, T-SOD 的活力显著降低($P < 0.05$)。对虾肝胰腺 MDA 含量在 LFM0 组最高, 但与 HFM 和 LFM0.5 组差异不显著($P > 0.05$), 当低分子肽的添加量在 1.0%–2.0% 之间时, MDA 含量显著低于其他组($P < 0.05$)。对虾肝胰腺 AKP 活力在 LFM1.0 组最高, 显著高于 HFM、LFM0 和 LFM2.0 组($P < 0.05$), 其中 HFM、LFM1.5 和 LFM2.0 组活力差异不显著。对虾肝胰腺 ACP 活力在 LFM1.0 组最高, 与 LFM0.5 组差异不显著($P > 0.05$), 但显著高于 HFM 和 LFM0 组($P < 0.05$), 当低分子水解鱼蛋白的添加量高于 1.0% 时, ACP 活力显著降低。

表 3 凡纳滨对虾非特异免疫基因引物(张盛静等, 2015)
Tab.3 Primers for genes of nonspecific immunity of *L.vannamei*(Zhang *et al*, 2015)

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
IMD	ATACATCCTGCCGTTGCCGA	CCGAGATGGGTTCCTTGTT	60
Penaiedin 3a	CACCCTTCGTGAGACCTTTG	AATATCCCTTTCCCACGTGAC	60
LZM	TGTTCCGATCTGATGTC	GCTGTTGTAAGCCACCC	60
Crustin	GAGGGTCAAGCCTACTGCTG	ACTTATCGAGGCCAGCACAC	60
β-actin	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT	CATCACCAACTGGGACGACATGGA	60

表 4 饲料添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异免疫和抗氧化指标的影响
Tab.4 Effects of dietary low-molecular-weight fish hydrolysate on nonspecific immunity and antioxidant indices of *L.vannamei* hepatopancreas

指标 Indices	HFM	LFM0	LFM0.5	LFM1.0	LFM1.5	LFM2.0
总超氧化物歧化酶 T-SOD (U/mg prot)	5.47±0.35 ^{ab}	3.19±0.09 ^d	4.51±0.00 ^c	5.93±0.13 ^a	5.12±0.15 ^b	4.47±0.31 ^c
丙二醛 MDA (nmol/mg)	1.93±0.07 ^{bc}	2.09±0.05 ^c	2.04±0.10 ^c	1.67±0.08 ^a	1.70±0.06 ^a	1.82±0.03 ^{ab}
碱性磷酸酶 AKP (U/g prot)	234.16±1.13 ^b	265.26±14.75 ^b	323.92±8.91 ^a	344.08±4.31 ^a	333.52±23.81 ^a	245.05±21.12 ^b
酸性磷酸酶 ACP (U/g prot)	348.24±30.72 ^d	406.19±3.58 ^{cd}	532.65±12.63 ^{ab}	578.35±24.23 ^a	461.94±21.16 ^{bc}	349.05±41.60 ^d

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

2.2 凡纳滨对虾肠道 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin mRNA 的相对表达量

凡纳滨对虾肠道 IMD mRNA 的相对表达量在 LFM1.5 组最高, 显著高于 LFM2.0 组的表达量($P<0.05$), 其他各组的表达量差异不显著($P>0.05$)(图 1)。对虾肠道 Penaiedin 3a mRNA 的相对表达量在 LFM1.0 组最高, 显著高于 LFM2.0 组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。对虾肠道 LZM mRNA 的相对表达量在低鱼粉基础组(LFM0)和低分子肽添加最高组(LFM2.0)最低, 但各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。LFM1.0 和 LFM1.5 组对虾肠道 Crustin mRNA 的相对表达量显著高于 LFM0 组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。

3 讨论

3.1 饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗氧化能力的影响

蛋白水解物具有抗氧化、降血压、调节脂肪代谢以及增强免疫等多种生物学功能, 这主要依赖于其所含的生物活性肽(王新星等, 2012; Bui *et al*, 2014)。通过刺激淋巴细胞的增殖、增强自然杀伤细胞的活性和调节抗体合成和细胞因子也证实水解鱼蛋白具有免疫刺激和抗菌的作用(Fitzgerald *et al*, 2006; Hartmann

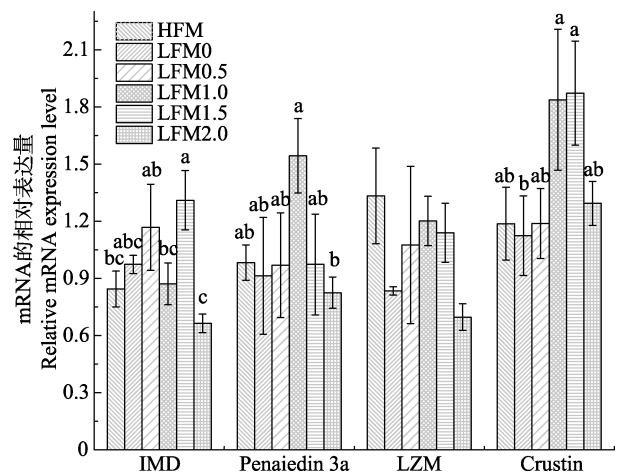


图 1 凡纳滨对虾肠道 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin mRNA 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of IMD, Penaiedin 3a, LZM and Crustin mRNA in the intestine of *L.vannamei*

不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

et al, 2007)。在饲料中添加水解鱼蛋白能够提高鱼类 SOD 等抗氧化酶的活力以及溶菌酶、呼吸爆发、血清补体、免疫球蛋白等为标志的非特异免疫力(Liang *et al*, 2006; Tang *et al*, 2008; Khosravi *et al*, 2015)。本研究发现, 在饲料中添加低分子水解鱼蛋白可显著提高凡纳滨对虾肝胰腺中 T-SOD 的活力, 并且 LFM1.0

组与 HFM 组 T-SOD 的活力差异不显著。T-SOD 是一种抗氧化酶,在清除自由基、防御机体衰老及防止生物分子损伤等方面具有极为重要的作用(张明等,2004)。Nazeer 等(2012)制备并分析了红牙鱼肌肉的水解鱼蛋白,发现体内外的抗氧化性与氨基酸序列 Lys-Thr-Phe-Cys-Gly-Arg-His (861.6 Da)有关。滕玉清等(2011)认为,水解鱼蛋白分解生成的某些游离氨基酸可能是 SOD 的催化酶,可使 SOD 酶活性升高,清除对虾体内过多的自由基,平衡代谢,提高免疫力。由于生物有机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如醛基(MDA)、酮基、羟基和羰基等,这些产物能引起细胞损伤,甚至凋亡。因而组织 MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。本研究结果显示,当低分子肽的添加水平在 1.0%–2.0%时,能显著降低对虾肝胰腺中 MDA 的含量。综上所述,在饲料中添加低分子水解鱼蛋白能清除对虾肝胰腺过多的自由基,提高抗氧化能力。

AKP 和 ACP 是巨噬细胞溶酶体的标志酶,在对虾免疫体系中是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,这两种酶能催化磷酸单脂水解,在酸性和碱性条件下水解磷酸苯二钠,释放酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢(刘树青等,1999)。低鱼粉饲料 1.0%水解物添加组(LFM1.0)中,对虾肝胰腺 AKP 和 ACP 的活力显著高于高鱼粉组(HFM)、低鱼粉基础组(LFM0)和 2.0%水解鱼蛋白添加组(LFM2.0),但与 LFM0.5、LFM1.5 组差异不显著。这表明,在饲料中添加适量的低分子水解鱼蛋白能提高 AKP 和 ACP 的活力,而高水平添加则会降低 AKP 和 ACP 的活力。滕玉清等(2011)在对中国明对虾(*Penaeus chinensis*)的研究中也发现,添加 10%水解鱼蛋白会降低 ACP 和 AKP 的活力,这说明饲料中过高的水解蛋白可能会抑制 ACP 和 AKP 的活力。

3.2 饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾免疫基因的影响

生物机体利用免疫系统来抵抗病原体的入侵。先天性免疫是无脊椎动物防御致病因子的重要防线(Iwanaga *et al.*, 2005)。一系列免疫因子,如对虾素 3a 分子(Penaiedin 3a)、溶菌酶(LZM)和甲壳素(Crustin)等在体液免疫中发挥重要作用,与凡纳滨对虾抗感染能力的强弱密切相关。在无脊椎动物中,肠道先天免疫缺陷基因 *IMD* 编码一种免疫缺陷蛋白 *IMD*,当机体受到病原菌入侵时,*IMD* 蛋白将特定异物入侵的信

号由细胞外向细胞内传递,并引起细胞产生一系列级联反应,形成免疫效应因子(如抗菌肽)(Li *et al.*, 2013)。本研究表明,在对虾饲料中添加低分子水解鱼蛋白会影响 *IMD*、Penaiedin 3a 和 *Crustin* 基因的表达量,但 *LZM* 基因表达量在各实验组间差异不显著。在低鱼粉饲料中低分子水解鱼蛋白的添加量为 1.5%时,能显著提高对虾肠道 *IMD* mRNA 的相对表达量,但添加量达到 2.0%时,*IMD* mRNA 的相对表达量却显著降低。这表明,低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白能刺激 *IMD* mRNA 的表达,添加量过高反而会抑制表达。对虾素分子只存在于对虾类中发挥抗菌功能(Li *et al.*, 2010)。本研究中,饲料中添加 1.0%的低分子水解鱼蛋白组的 *Penaiedin 3a* mRNA 相对表达量最高,而添加 2.0%的低分子水解鱼蛋白组的 *Penaiedin 3a* mRNA 相对表达量最低,这说明适宜的低分子水解鱼蛋白添加量可提高凡纳滨对虾免疫力,而高水平添加会造成免疫抑制。

溶菌酶广泛分布于对虾体内,能破坏革兰氏阳性菌细胞壁中的肽聚糖层,从而使机体能够抵御病原微生物的入侵(张士瑾等,2014)。张盛静等(2015)以副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)对凡纳滨对虾攻毒,发现饲料益生菌添加组对虾 *LZM* mRNA 的相对表达量显著高于未添加组。在本研究中,各实验组 *LZM* mRNA 的相对表达量没有显著差异,然而与低鱼粉基础组(LFM0)相比,高鱼粉组 *LZM* mRNA 的相对表达量较高,且当低分子水解鱼蛋白的添加量在 0.5%–1.5%时,对虾肠道 *LZM* mRNA 的相对表达量也有升高趋势。说明高豆粕替代鱼粉可能会造成对虾肠道溶菌酶活力降低,而添加适量的低分子水解鱼蛋白可能在一定程度上提高肠道溶菌酶活力。*Crustin* 被称为甲壳动物阳离子,富含半胱氨酸抗菌肽,具有蛋白酶抑制和抗菌活性。在低鱼粉饲料中添加 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白,能显著提高 *Crustin* mRNA 的相对表达量,并且显著高于低鱼粉组(LFM0)。这表明,在低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白可能会提高凡纳滨对虾肠道的抗菌能力。以上结果显示,在本研究饲料处理条件下,凡纳滨对虾肠道各免疫基因表达的变化趋势存在较大差异,各免疫基因对低分子水解蛋白的刺激存在不同的反应,低分子水解蛋白对凡纳滨对虾免疫力的影响可能存在多种途径。

综上所述,在饲料中添加 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白能够提高凡纳滨对虾抗氧化能力,增强其非特异性免疫能力。

参 考 文 献

- Aksnes A, Hope B, Jönsson E, *et al.* Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 305–317
- Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, *et al.* Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 2014, 418–419(1): 11–16
- Bulbul M, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Growth performance of juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) fed diets replacing fishmeal with soybean meal. *Aquaculture Research*, 2015, 46(3): 572–580
- Chiu ST, Wong SL, Shiu YL, *et al.* Using a fermented mixture of soybean meal and earthworm meal to replace fish meal in the diet of white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 2016, 47(11): 3489–3500
- Cu XL, Cao JM, Zhao HX, *et al.* Effects of dietary selenium and glutathione on growth, feed coefficient and body composition of *Penaeus vannamei*. *Feed Industry*, 2008, 29(12): 28–31 [储霞玲, 曹俊明, 赵红霞, 等. 饲料中添加硒和谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长、饲料系数和体成分的影响. *饲料工业*, 2008, 29(12): 28–31]
- Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59(2): 118–125
- 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
- Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 163–169
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 38(2): 128–150
- Khosravi S, Bui HTD, Rahimnejad S, *et al.* Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(3): 321–331
- Li CY, Song YL. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 1044–1052
- Li FH, Xian JH. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 973–980
- Liang MQ, Wang JL, Chang Q, *et al.* Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 2006, 37(1): 102–106
- Lin QC, Fang CF, Zhong GF, *et al.* Effect of dietary small peptides on growth and non-specific immunity of *Penaeus vannamei* larvae. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2010, 22(5): 590–595 [林启存, 方长富, 钟国防, 等. 小肽对凡纳滨对虾幼体生长性能及非特异性免疫能力的影响. *浙江农业学报*, 2010, 22(5): 590–595]
- Liu SQ, Jiang XL, Mou HJ, *et al.* Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis* serum. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(3): 278–83 [刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3): 278–283]
- Mu YC, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* Effects of small molecule weight fish protein hydrolysate in high plant protein diets on the expression of liver IGF-I receptor and the growth of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 49–57 [牟玉超, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 49–57]
- Nazeer RA, Kumar NSS, Ganesh RJ, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, 2012, 35(2): 261–268
- Opstvedt J, Aksnes A, Hope B, *et al.* Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 2003, 221(1–4): 365–379
- Rahman SHA, Razek FAA, Goda AS, *et al.* Partial substitution of dietary fish meal with soybean meal for speckled shrimp, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798) (Decapoda: Penaeidae) juvenile. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): e299–e306
- Tang HG, Wu TX, Zhao ZY, *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
- Teng YQ, Liang MQ, Wang ZL, *et al.* Effects of fish protein hydrolysate in the diet on the non-specific immune response of *Penaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(5): 84–91 [滕玉清, 梁萌青, 王正丽, 等. 饲料中水解鱼蛋白对中国对虾非特异免疫的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(5): 84–91]
- Wang XX, Wei YL, Liang MQ. Fish protein hydrolysates: Properties and applications. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(9): 1636–1642 [王新星, 卫培良, 梁萌青. 鱼蛋白水解物的特性及其应用. *动物营养学报*, 2012, 24(9): 1636–1642]
- Zhang M, Wang L, Guo ZY, *et al.* Effect of lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis*. *Marine Sciences*, 2004,

- 28(7): 22–25 [张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. 海洋科学, 2004, 28(7): 22–25]
- Zhang SC, Xu N. Advance in study of animal lysozymes. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(6): 46–51 [张士瑾, 许娜. 动物型溶菌酶研究新进展. 中国海洋大学学报, 2014, 44(6): 46–51]
- Zhang SJ, Song XL, Zhao XJ, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 899–907 [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响. 水产学报, 2015, 39(6): 899–907]
- Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al.* Inclusion of size-fractionated fish protein hydrolysate in high plant protein diets for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 829–834 [郑珂珂, 梁萌青, 姚宏波, 等. 在高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白对牙鲆幼鱼的影响. 水生生物学报, 2011, 35(5): 829–834]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Dietary Low-Molecular-Weight Fish Hydrolysate (LWFH) on Nonspecific Immunity and Antioxidant Capacity of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

LI Xiaoli, WANG Ling, SONG Kai, LU Kangle, ZHANG Chunxiao^①, YUAN Xiangli

(The Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract In this study we investigated effects of low-molecular-weight fish hydrolysate (LWFH) on nonspecific immune and antioxidant capacity in the hepatopancreas and the expression of some immunity-related genes in the digestive tract of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). A diet containing 30% of fishmeal was regarded as a high fishmeal diet (HFM), and a diet containing soybean meal that substitutes 50% of the fishmeal in HFM was considered as a low fishmeal basal diet (LFM). Five LFM diets were formulated by adding LWFH at incremental levels (0, 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) to LFM, which were designated as LFM0, LFM0.5, LFM1.0, LFM1.5, and LFM2.0, respectively. The experimental diets were fed to *L. vannamei* of (0.44±0.02) g in a water recirculation system for 48 days. The nonspecific immunity and antioxidant indices, and the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), total superoxide dismutase (T-SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) in the hepatopancreas were measured to determine the effects of dietary LWFH. We studied the expression of immunity-related genes including IMD, Penaeidin 3a, LZM and Crustin using qRT-PCR. The results suggested that a certain amount of LWFH could significantly improve the activities of ACP, AKP and T-SOD while reducing the content of MDA in the hepatopancreas. Moreover, the relative expression of IMD, Penaeidin 3a, LZM and Crustin were up-regulated in the LFM1.5 group. Therefore, the plant proteins may not be an ideal substitute because they may reduce the nonspecific immunity and antioxidant capacity of *L. vannamei*. Our results also suggested that 1.0%–1.5% LWFH added in LFM might increase the expression of the disease resistance related genes and enhance nonspecific immunity and antioxidant capacity.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Replacement of fishmeal; Fish hydrolysate; Nonspecific immunity; Resistance gene

① Corresponding author: ZHANG Chunxiao, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同地理群体的遗传多样性及种群结构*



刘寒苗^{1,2} 吴彪¹ 刘志鸿^{1①} 杨爱国¹ 周丽青¹ 孙秀俊¹

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

摘要 采用 PCR 技术扩增了中国山东胶南、长岛、蓬莱、荣成和韩国统营 5 个地理群体魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) 样本的 CO I、12S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 基因部分序列, 分析了魁蚶 5 个地理群体的遗传多样性和系统进化关系。经测序拼接、剪接后, 分别获得 67 条 776 bp 的 CO I 序列、72 条 443 bp 的 12S rRNA 序列、75 条 909 bp 的 18S rRNA 序列和 75 条 894 bp 的 28S rRNA 序列。序列分析结果显示, 5 个群体 75 个个体的 CO I 序列中共检测到 466 个多态位点, 32 种单倍型, 单倍型多样性指数为 0.925, 核苷酸多样性指数为 0.086; 12S rRNA 序列中共检测到 292 个多态位点, 43 种单倍型, 单倍型多样性指数是 0.928, 而核苷酸多样性为 0.0856; 在 18S rRNA 序列中, 5 个群体都表现出丰富的遗传多样性, 共有 74 种单倍型, 909 个多态位点, 单倍型多样性指数为 1.0, 核苷酸多样性指数为 0.717, 其中胶南群体变异位点最多、多样性最丰富; 通过对 28S rRNA 部分序列的分析发现, 75 个个体共检测到 27 个多态位点, 18 种单倍型, 单倍型多样性指数为 0.778, 核苷酸多样性指数为 0.289, 蓬莱群体多样性最丰富。遗传距离分析结果表明, 韩国群体与其他 4 个群体的遗传距离较大; 基于 CO I 序列的系统进化树显示有多个聚群。

关键词 魁蚶; CO I 基因; 12S rRNA 基因; 18S rRNA 基因; 28S rRNA 基因; 遗传多样性
中图分类号 Q953.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0092-08

魁蚶(*Scapharca broughtonii*), 俗称大毛蛤、赤贝、血贝, 属埋栖型冷水性贝类, 多栖息于底质为泥质粉砂和砂质粉砂的海区(张玉玺等, 1991)¹⁾。在我国黄海北部资源量丰富, 主要分布于山东、辽宁等沿海, 是我国北方重要的经济贝类之一。因魁蚶肉质鲜美、营养及药用价值高, 在中国及韩国市场深受欢迎。但捕捞过度、环

境恶化等因素导致魁蚶自然资源量不断衰减、遗传多样性水平降低。深入开展魁蚶种质资源调查, 查明不同群体间的遗传结构, 是进行种质改良的前提和基础。本课题组已经开展了一些有关魁蚶种质资源调查等方面的研究, 运用多变量形态度量学分析方法、RAPD 和 SSR 标记技术, 对韩国和我国沿海 4 个魁蚶地理群体的遗

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项项目(2016GH06)、国家科技基础条件平台建设运行项目(2060503-01)和科技基础性工作专项(2013FY110700)共同资助 [This work was supported by Chinese Academy of Fishery Sciences Basal Research Fund (2016GH06), Program of National Science Infrastructure Platform (2060503-01), and Basic Work of Science and Technology (2013FY110700)]. 刘寒苗, E-mail: liuhm911@163.com

① 通讯作者: 刘志鸿, 研究员, E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-09-06, 收修改稿日期: 2016-10-18

1) Zhang YX, Zhou XJ, Jiang HB, et al. Study on the habits and modes of life in the natural environment of *Scapharca broughtonii* (Shrenck) in Shandong offshore. Transactions of the Chinese Society of Malacology, 1991 [张玉玺, 周学家, 姜海滨, 等. 山东近海魁蚶生态习性的调查. 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会第四次代表大会暨第五次学术讨论会论文集, 1991]

传变异和遗传多样性情况进行了研究(梁超等, 2010; 吴彪等, 2012), 结果显示, 4 个群体遗传多样性丰富, 有较大的育种潜力; 对 4 个魁蚶地理群体样本的核糖体 RNA 的 2 个内转录间隔区域(ITS-1 和 ITS-2)进行扩增, 发现各群体之间存在一定的遗传差异, 综合考虑不同群体相对优良的生物学特征, 可开展选择或杂交培育良种的研究(周丽青等, 2012)。另外, An 等(2005)用 10 个多态微卫星位点对魁蚶进行了遗传多样性分析, 等位基因的数量从 11 到 23 不等, 群体遗传学分析显示, 10 个位点之间不存在连锁不平衡的现象; 孙楠等(2015)利用微卫星标记对魁蚶混交家系进行了鉴定。但利用线粒体基因和核糖体基因进行魁蚶种质资源分析的相关研究报道较少。

线粒体基因组具有突变率高、分子量小、无组织特异性的特点, 在分子系统发育中应用广泛。CO I (线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I, *coxidase I*) 基因通用性比较高, 可操作性强(侯丫等, 2016), 可以提供丰富的遗传信息, 已成功应用于遗传分析和系统进化研究中(Chen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009)。12S rRNA 基因具有高度的保守性, 在贝类的分子系统学研究中发挥着重要的作用(刘春芳, 2014¹⁾; 冯艳微, 2012²⁾)。18S rRNA 和 28S rRNA 在生物体内含量较大, 且在进化过程中具有保守性, 因此, 适合不同层次系统发育的研究, 是研究生命起源和早期生物进化、高级分类阶元系统发育关系的主要分子标记, 已广泛应用于动植物的种质鉴定和系统发育研究。薛东秀等(2012)从 GenBank 下载翼形亚纲 11 个总科 80 个种类的 28S 部分序列, 进行系统发育关系研究, 取得较好结果。

本研究对魁蚶 5 个地理群体进行 CO I、12S、18S 和 28S 序列变异分析及系统进化分析, 旨在明确魁蚶群体遗传多样性水平和不同地理群体的系统进化关系, 为魁蚶资源保护及种质改良提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的 5 个地理群体的魁蚶分别取自山东青岛胶南(J)、山东荣成(R)、山东长岛(C)、山东蓬莱

(P)、韩国统营(H), 样品均为近海野生个体, 低温运至实验室迅速解剖, 取闭壳肌, 置于 -80°C 超低温冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

每个群体随机取 15 个样品, 采用常规酚-氯仿法提取基因组 DNA, 实验用 DNA 模板稀释至 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 。运用 PCR 扩增魁蚶 CO I、12S、18S 和 28S 基因, 所用引物序列见表 1。PCR 反应体系为 $30\ \mu\text{l}$: $3\ \mu\text{l}$ PCR $10\times$ buffer, $3\ \mu\text{l}$ 高纯度的 dNTP ($2.5\ \text{mmol}/\text{L}$), $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的正反方向引物各 $1\ \mu\text{l}$, $0.5\ \mu\text{l}$ Easy *Taq* ($5\ \text{U}/\mu\text{l}$), $1\ \mu\text{l}$ DNA ($80\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $20.5\ \mu\text{l}$ 灭菌水。PCR 反应程序: 94°C 预变性 $5\ \text{min}$; 35 个循环(94°C 变性 $20\ \text{s}$, 52°C 退火 $45\ \text{s}$, 72°C 延伸 $1\ \text{min}$); 最后, 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。得到清晰、单一的目的片段, 所得 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测($1\times$ TAE, $130\ \text{V}$, $30\ \text{min}$), 然后利用凝胶成像系统进行观察拍照。切取目的条带、胶回收, 将目的片段与 T 载体连接, 转化感受态细胞, 进行单克隆, 用 M13 通用引物进行双向测序。其中, 8 个个体没有扩增出 CO I 条带, 3 个个体没有扩增出 12S 条带。

1.3 测序和数据处理

先用 Chromas 检查所得序列的测序质量, 并在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 验证其同源性。运用 BioEdit 和 ClustalX 1.8 软件进行序列比对, 利用 DnaSp 软件分析魁蚶群体单倍型数(Number of haplotype, *H*)、平均核苷酸差异(Average number of nucleotide difference, *K*)及核苷酸多样性指数(Nucleotide diversity, P_i)等遗传多样性参数, 运用 MEGA 5.0 软件对序列的碱基组成(Nucleotide composition)、多态位点数(Number of polymorphic sites, *S*)、变异位点(Variable sites)进行分析, 采用 NJ (Neighbor-joining)法构建魁蚶 5 个地理群体的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 CO I、12S、18S 和 28S 序列的碱基组成及变异分析

测序后获得的 CO I、12S、18S 和 28S 基因片段

1) Liu CF. Phylogenetic analysis of Arcoidea and genetic diversity of different populations of *Tegillarca granosa* along Chinese coasts. Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2014, 32–54 [刘春芳. 中国近海蚶总科(Arcoidea)贝类的系统发育及泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同群体遗传多样性研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2014, 32–54]

2) Feng YW. DNA barcoding and molecular phylogeny of the Pteriina and Arcoidea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012, 96–101 [冯艳微. 珍珠贝亚目和蚶目 DNA 条形码与系统发生学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 96–101]

长短不一,经序列比对去除序列两端部分碱基后,分别得到 67 条长度均为 776 bp 的 CO I 序列、72 条长度为 443 bp 的 12S 序列、75 条长度均为 909 bp 的 18S 基因片段、75 条长度均为 894 bp 的 28S 基因片段。魁蚶 5 个群体的 CO I、12S、18S 和 28S 基因部分片段的碱基组成见表 2、表 3。5 个群体的 18S 基因部分序列碱基组成比例相对稳定,CO I 基因部分序列 A+T 含量要比 12S、18S 和 28S 的 A+T 含量高,而 C 的含量最少,28S 基因部分序列中,G 的含量相对较高。

2.2 遗传多样性分析

5 个群体间的 CO I、12S、18S 和 28S 的核苷酸遗传多样性参数见表 4。从 5 个群体 67 个个体的 CO I 序列中共检测到 466 个多态位点、32 种单倍型、单倍型多样性指数为 0.925,说明 5 个群体的 CO I 基因单倍型很丰富。核苷酸多样性指数为 0.086,其中,

韩国群体的多态位点(S)和平均核苷酸差异数(K)高于其他群体。12S 序列共检测到 292 个多态位点、43 种单倍型,其中,单倍型 3 有 7 个个体,分别是荣成(R)群体 3 个、长岛(C)群体 7 个、蓬莱(P)群体 7 个。18S 序列中共检测到 909 个多态位点、74 种单倍型,单倍型多样性指数为 1.000,说明 5 个群体的 18S 单倍型比较丰富,核苷酸多样性指数也很丰富(0.717)。基于 18S 序列,胶南群体的多态位点最多,核苷酸多样性指数也最丰富,蓬莱群体的多态性最低。从 5 个群体 75 个个体的 28S 序列中共检测到 27 个多态位点、18 种单倍型,其中,单倍型 8 有 26 个个体,分别是长岛(C)群体 7 个,韩国(H)群体 5 个,蓬莱(P)群体 2 个,胶南(J)群体 5 个,荣成(R)群体 12 个,单倍型多样性指数为 0.778,核苷酸多样性指数为 0.289。其中,蓬莱群体的多态性是最高的,其次是荣成群体,韩国群体的多态性最低。

表 1 CO I、12S、18S 和 28S 引物序列

Tab.1 Primer sequences of CO I, 12S, 18S, and 28S

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	引物出处 Reference
CO I	F: ATYGGNGGNTTYGGNAAYTG R: ATNGCRAANACNGCNCCYAT	Matsumoto, 2003
12S	12S-SR-J14197: FGTACAYCTACTATGTTACGACTT 12S-SR-N14745: GTGCCAGCAGYYGCGGTTANAC	Simon <i>et al.</i> , 1994
18S	1F: TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG 5R: CTTGGCAAATGCTTTCGC	Giribet <i>et al.</i> , 1996; Okusu <i>et al.</i> , 2003
28S	3311F: GGGACTACCCCTGAATTTAAGCAT 4434R: CCAGCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Giribet <i>et al.</i> , 1996; Okusu <i>et al.</i> , 2003

表 2 魁蚶不同群体 CO I 和 12S 基因部分序列的碱基组成

Tab.2 Base compositions of partial sequences of CO I and 12S gene of five populations of *S. broughtii*

群体 Population	CO I					12S				
	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	A+T(%)	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	A+T(%)
胶南 J	39.3	14.6	23.8	22.3	63.1	26.4	28.0	27.0	18.4	53.4
长岛 C	39.2	14.6	24.0	22.2	63.2	26.3	26.9	28.0	18.8	54.3
荣成 R	39.7	14.1	23.7	22.5	63.4	27.1	25.0	28.7	19.2	55.8
蓬莱 P	36.9	15.5	24.2	22.3	63.5	26.8	25.0	28.4	19.8	55.2
韩国 H	37.0	15.6	26.4	21.2	63.4	26.6	26.7	26.8	19.8	53.4
平均值 Average	38.3	15.0	25.0	21.8	63.3	26.5	26.3	27.8	19.2	54.3

表 3 魁蚶不同群体 18S 和 28S 基因部分序列的碱基组成

Tab.3 Base compositions of partial sequences of 18S and 28S gene of five populations of *S. brouhtonii*

群体 Population	18S					28S				
	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	A+T(%)	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	A+T(%)
胶南 J	26.9	21.2	26.4	25.5	53.3	21.7	28.3	21.4	38.7	43.1
长岛 C	27.0	20.9	26.3	25.9	53.3	21.8	28.0	21.3	28.9	43.1
荣成 R	26.9	21.2	26.3	25.6	53.2	21.4	28.4	21.5	32.0	42.9
蓬莱 P	27.0	20.9	26.3	25.8	53.3	21.8	28.6	21.2	28.4	43.0
韩国 H	26.9	21.0	26.3	25.8	52.9	21.5	26.0	21.2	31.3	42.7
平均值 Average	26.9	21.0	26.3	25.7	53.2	21.6	27.8	21.3	29.2	42.9

2.3 5 个魁蚶群体分子系统树的构建和聚类分析

用 MEGA 5.0 软件计算 5 个群体内和群体间的遗传距离(表 5 和表 6), 构建 5 个群体个体间基于 CO I、12S、18S 和 28S 的 NJ 分子系统树。CO I 和 12S 分析结果显示, 群体内遗传距离大多小于群体间遗传距离, 且韩国群体与其他 4 个群体的遗传距离都较大, 其中, 12S 序列, 韩国群体与其他 4 个群

体的遗传距离较远。18S 序列的分析结果显示, 5 个群体间的遗传距离很小, 群体内遗传距离甚至高于群体间遗传距离。韩国群体与其他 4 个群体间的遗传距离相对较大。在 28S 序列中, 群体间的遗传距离均较大, 胶南群体和蓬莱群体间的遗传距离最远。CO I 的 NJ 系统进化树见图 1。虽然韩国群体遗传距离与其他 4 个群体较大, 但聚类分析显示, 韩国群体并没有形成单独一支。

表 4 魁蚶不同群体 CO I、12S、18S 和 28S 基因片段的遗传多样性指数

Tab.4 The genetic diversity indices of partial CO I, 12S, 18S, and 28S in different population of *S. broughtonii*

基因片段 Gene fragment	群体 Population	样本数目 Sample number	单倍型数 <i>H</i> Haplotypes	单倍型多样性 <i>Hd</i> Diversity	多态位点 <i>S</i> Polymorphic site	平均核苷酸差异数 <i>k</i> Average nucleotide differences	核苷酸多样性指数 <i>Pi</i> Nucleotide diversity index
CO I	胶南 J	15	12	1.000	36	16.758	0.019
	长岛 C	15	15	1.000	47	16.571	0.017
	蓬莱 P	15	9	0.096	45	18.836	0.021
	荣成 R	15	12	0.097	472	125.703	0.197
	韩国 H	15	15	1.000	505	133.057	0.155
12S	胶南 J	15	13	0.989	232	94.384	0.242
	长岛 C	15	8	0.769	311	116.080	0.287
	蓬莱 P	15	8	0.769	277	60.800	0.150
	荣成 R	15	14	0.990	322	125.700	0.353
	韩国 H	15	10	0.857	388	176.120	0.426
18S	胶南 J	15	13	0.971	488	69.724	0.080
	长岛 C	15	15	1.000	25	7.791	0.009
	蓬莱 P	15	15	1.000	24	8.333	0.009
	荣成 R	15	8	0.848	481	65.733	0.172
	韩国 H	15	15	1.000	25	7.829	0.009
28S	胶南 J	15	13	0.981	540	272.571	0.318
	长岛 C	15	10	0.857	536	276.029	0.305
	蓬莱 P	15	14	0.990	589	269.924	0.334
	荣成 R	15	13	0.971	557	275.057	0.334
	韩国 H	15	10	0.943	461	116.038	0.150

表 5 基于 CO I 和 12S 序列的 5 个魁蚶群体间和群体内的遗传距离

Tab.5 Genetic distances between and within five different populations of *S. broughtonii*

群体 Populations	CO I					12S				
	胶南 J	长岛 C	荣成 R	蓬莱 P	韩国 H	胶南 J	长岛 C	荣成 R	蓬莱 P	韩国 H
胶南 J	0.011					0.230				
长岛 C	0.001	0.002				0.335	0.260			
荣成 R	0.378	0.380	0.646			0.369	0.286	0.320		
蓬莱 P	0.038	0.039	0.351	0.002		0.381	0.206	0.236	0.127	
韩国 H	0.321	0.323	0.606	0.357	0.297	0.405	0.357	0.390	0.338	0.437

注: 加粗为群体内的遗传距离, 其他为群体间的遗传距离, 下同

Note: The numbers in bold indicated the intragroup genetic distances. Others were intergroup genetic distances. The same as below

表 6 基于 18S 和 28S 序列的 5 个魁蚶群体间和群体内的遗传距离

Tab.6 Genetic distances between and within five different populations of *S. broughtonii*

群体 Populations	18S					28S				
	胶南 J	长岛 C	荣成 R	蓬莱 P	韩国 H	胶南 J	长岛 C	荣成 R	蓬莱 P	韩国 H
胶南 J	0.176					3.333				
长岛 C	0.089	0.001				3.062	3.166			
荣成 R	0.164	0.089	0.176			3.097	3.041	3.292		
蓬莱 P	0.088	0.001	0.089	0.001		3.229	3.168	3.210	3.549	
韩国 H	0.089	0.002	0.090	0.002	0.003	2.959	2.630	2.923	3.047	1.529

3 讨论

3.1 魁蚶 5 个群体的遗传多样性

遗传多样性是指生物所携带遗传信息的总和,包括遗传变异程度及其分布格局,即群体的遗传结构,是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础,是评价群体资源状况的一个重要依据。某个种群的遗传变异越丰富,其对生存环境的适应能力就越强,进化的潜力也越大(张文静等, 2003; 马波等, 2009)。本研究中,基于 CO I 和 12S 基因的单倍型非常丰富,分别是 32 种和 43 种,尤其是韩国群体,多态位点和平均核苷酸差异数都很多。基于 18S 序列,5 个群体都表现出丰富的遗传多样性,共有 74 种单倍型,胶南群体多态位点有 488 个,平均核苷酸差异指数是 69.724,核酸多样性指数是 0.080,相比于其他群体,此群体的变异位点最多,多样性也最丰富。基于 28S 序列,75 个个体共有 18 种单倍型,蓬莱群体多样性最丰富。周丽青等(2012)对山东蓬莱、山东黄岛、江苏前三岛及韩国统营 4 个地理群体魁蚶样本的核糖体 RNA 两个内转录间隔区域(ITS-1 和 ITS-2)进行扩增,序列比对结果显示,ITS 区序列变异相对较高,4 个群体的 ITS 区序列均表现出丰富的遗传多样性,这与本研究结果一致。

遗传距离是起源于共同祖先的相同基因进化趋势的一种测度(张爱兵等, 2002)。在此假定下,遗传距离通常指由基因频率的函数表示群体间的差异(Nei, 1987),根据其大小可以确定群体间亲缘关系的远近。群体间的遗传距离越大,则基因型差异越大,表明所比较群体的亲缘关系越远,遗传相似性越小;反之亦然(田吉腾等, 2013)。本研究中,魁蚶 5 个群体间的遗传距离在 0.001–3.229 之间,韩国群体与其他 4 个群体的遗传距离相对较大。这与吴彪等(2012)、

田吉腾等(2013)的结果较一致,均表现出韩国群体与中国群体遗传距离相差较大。

3.2 基于 CO I、12S、18S 和 28S 序列特征进行群体鉴定和遗传多样性分析的可行性

DNA 碱基序列分析可以准确地检测出碱基替换、插入和缺失等变异信息,利用这些变异数据来研究个体或者群体的遗传结构,不仅可以获得丰富的遗传变异资料,而且还可以准确地揭秘种群间进化关系,甚至更准确地鉴别不同的个体(周丽青等, 2012)。线粒体 CO I 基因是 DNA 条形码技术中常用的分子标记(冯艳微, 2011¹⁾; 孟玮等, 2010; 胡玉婷等, 2016),它蕴含着丰富的遗传进化信息,可以用来进行物种鉴定和隐存种的发现(陈双雅等, 2012; 张馨月等, 2014),通过分析物种的种间和种内遗传距离,来判断亲缘关系的远近。18S 和 28S 基因都是高度保守的,适合研究较高阶元的系统发生(Hwang *et al*, 1999),也是近年来在海洋贝类分类中研究利用较多的序列之一(Carapelli *et al*, 2000)。吴文健等(2010)对 9 个群体的石磺科贝类进行外部形态特征差异分析和内部结构比较,在初步分类基础上利用 18S rRNA 基因部分序列对 9 个群体进行系统发育分析,探讨我国大陆沿海石磺科属种间的亲缘关系; 孟学平等(2011)利用 18S 来探讨双壳纲贝类的系统发生关系,发现 18S 序列有插入缺失序列,存在长度多态性; Giribet 等(2005)使用 18S rDNA、28S rDNA、CO I 基因以及形态学数据证实了蚶总科的单系性。

本研究表明,基于 CO I 和 12S 基因,5 个群体均表现出较高的遗传多样性,相比于其他 4 个群体,韩国群体的遗传多样性较丰富。18S 和 28S 序列的遗传信息并不完全一致,序列变异频率也存在差异。因此,为进一步提高遗传多样性评估的准确性,选择进化过程中变异比较大的基因序列,能够更加全面地分析物种的进化和遗传多样性。

1) Feng YW. DNA barcoding and molecular phylogeny of the Pteriina and Arcoidea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012, 96–101 [冯艳微. 珍珠贝亚目和蚶目 DNA 条形码与系统发生学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 96–101]

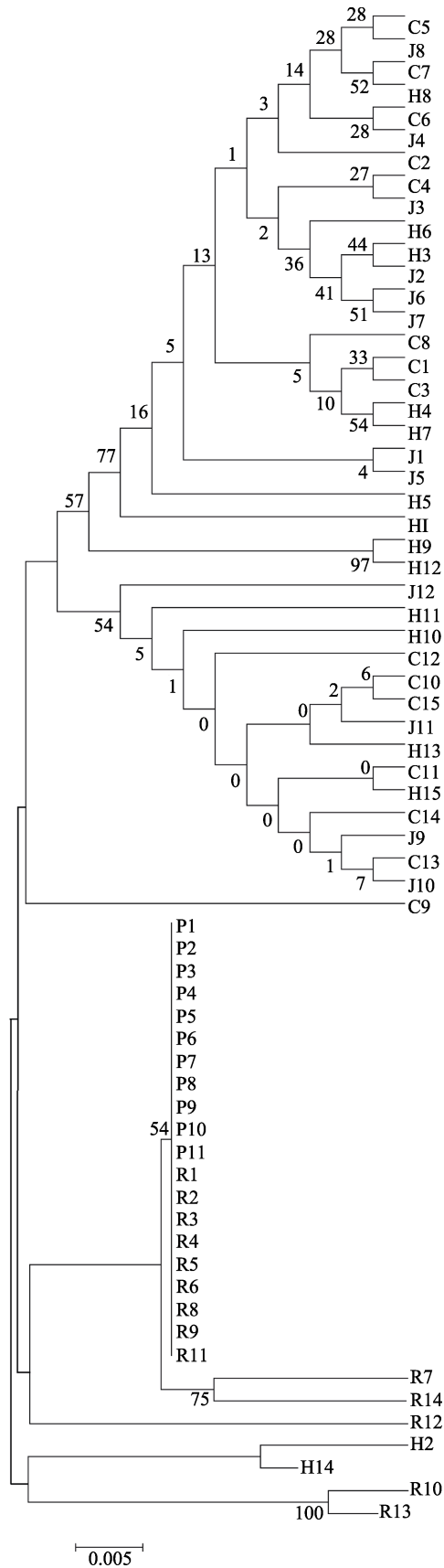


图1 基于魁蚶5个群体CO I 部分序列建立的NJ系统发育关系
 Fig.1 Phylogenetic relationships among five groups of *S. broughtonii* based on the partial sequences of CO I gene

参 考 文 献

An HS, Park JY. Ten new highly polymorphic microsatellite loci in the blood dam *Scapharca broughtonii*. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(4): 896–898

Carapelli A, Frati F, Nardi F, *et al.* Molecular phylogeny of the apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes. *Pedobiologia*, 2000, 44(3–4): 361–373

Chen AH, Li ZX, Feng GN. Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial CO I gene sequences. *Zoology Research*, 2009, 30(3): 233–239

Chen SY, Wang JH, Chen WL, *et al.* Application of 16S rRNA and CO I gene sequence analysis on grouper species identification. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 124–130 [陈双雅, 王嘉鹤, 陈伟玲, 等. 16S rRNA 基因和 CO I 基因序列分析在石斑鱼物种鉴定中的应用. *生物技术通报*, 2012(10): 124–130]

Giribet G, Wheeler W. On bivalve phylogeny: A high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology*, 2005, 121(4): 271–324

Hou Y, Tian JT, Liu ZH, *et al.* Genetic diversity of different populations of *Scapharca subcrenata* based on mitochondrial CO I gene. *Marine Sciences*, 2016, 40(1): 1–9 [侯丫, 田吉腾, 刘志鸿, 等. 基于线粒体 CO I 基因的毛蚶群体遗传多样性. *海洋科学*, 2016, 40(1): 1–9]

Hu YT, Jiang H, Pan TS, *et al.* Genetic differentiation of *Monopterus albus* populations from Anhui Province in Yangtze River basin based on mitochondrial CO I barcode sequence. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 74–80 [胡玉婷, 江河, 潘庭双, 等. 基于线粒体 CO I 序列探讨安徽长江流域黄鳝群体遗传分化. *东北农业大学学报*, 2016, 47(2): 74–80]

Hwang UW, Kim W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean Journal of Parasitology*, 1999, 37(4): 215–228

Liang C, Yang AG, Liu ZH, *et al.* RAPD analysis of genetic variations in four geographical populations of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 59–64 [梁超, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 59–64]

Ma B, Jiang ZF, Huo TB. Analysis of genetic variation and geographic divergence of *Thymallus tugarinae* by microsatellite. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(5): 678–688 [马波, 姜作发, 霍堂斌. 下游黑龙江茴鱼种群遗传变异及地理分化的微卫星分析. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 678–688]

Matsumoto M. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) from mtDNA CO I sequences.

- Molecular Phylogenetics & Evolution, 2003, 27(3): 429–440
- Meng W, Yang TY, Hai S, *et al.* Study of DNA barcoding based on the mitochondrial CO I gene sequences in salmo *Trutta fraio*. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(1): 6–10 [孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究. 水产学杂志, 2010, 23(1): 6–10]
- Meng XP, Shen X, Cheng HL, *et al.* 18S rRNA gene variation and phylogenetic analysis among 6 Orders of Bivalvia Class. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(5): 1393–1403 [孟学平, 申欣, 程汉良, 等. 双壳纲贝类 18S rRNA 基因序列变异及系统发生. 生态学报, 2011, 31(5): 1393–1403]
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, 1987, 237(4788): 599–599
- Okusu A, Schwabe E, Eernisse DJ, *et al.* Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. Organisms Diversity & Evolution, 2003, 3(4): 281–302
- Shen YB, Li JL, Feng BB. Genetic analysis of cultured and wild populations of *Mytilus coruscus* based on mitochondrial DNA. Zoology Research, 2009, 30(3): 240–246
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, *et al.* Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651–701
- Sun N, Li Q, Yu H, *et al.* Parentage determination of *Scapharca broughtonii* based on microsatellite analysis. Periodical of Ocean University of China, 2015, 46(9): 42–48 [孙楠, 李琪, 于红, 等. 利用微卫星标记的魁蚶混交家系鉴定. 中国海洋大学学报(自然科学版): 2015, 46(9): 42–48]
- Tian JT, Liu ZH, Yang AG, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in four geographic populations of *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 59–67 [田吉腾, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传多样性微卫星分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 59–67]
- Wu B, Liang C, Yang AG, *et al.* Genetic variation in different populations of *Scapharca broughtonii* Schrenck inferred from microsatellite data. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 863–869 [吴彪, 梁超, 杨爱国, 等. 基于 SSR 标记的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)不同群体遗传结构的分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 863–869]
- Wu WJ, Shen B, Chen C, *et al.* Preliminary classification and phylogenetic relationship among Onchidiidae in China inferred from 18S rRNA partial sequence. Zoological Research, 2010(4): 381–386 [吴文健, 沈斌, 陈诚, 等. 基于 18S rRNA 的中国大陆沿海石磺科贝类分类的初步分析. 动物学研究, 2010(4): 381–386]
- Xue DX, Wang HY, Zhang T, *et al.* Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) based on partial 28S rRNA sequence. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 348–356 [薛东秀, 王海艳, 张涛, 等. 基于 28S rRNA 基因片段的翼形亚纲(Bivalvia: Pteriomorpha)系统发育的初步研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 348–356]
- Zhang AB, Wang ZJ, Tan SJ, *et al.* The important concept of molecular ecology-genetic distance and its measuring. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(6): 943–949 [张爱兵, 王正军, 谭声江, 等. 分子生态学重要概念—遗传距离及其测度的理论研究概况. 生态学报, 2002, 22(6): 943–949]
- Zhang WJ, Yu YH, Shen YF. Advances on genetic analysis of microsatellite DNA in protozoology. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(2): 185–190 [张文静, 余育和, 沈韞芬. 微卫星 DNA 遗传分析在原生动物学中的研究进展. 水生生物学报, 2003, 27(2): 185–190]
- Zhang XY, Liu Y, Zhang XM, *et al.* Species identification of some commercial fishes in southwest Atlantic based on CO I barcoding. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1161–1167 [张馨月, 刘岩, 张秀梅, 等. 基于 CO I 基因的西南大西洋部分经济鱼类 DNA 条形码鉴定. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1161–1167]
- Zheng WJ, Zhu SH, Shen XQ, *et al.* Genetic differentiation of *Tegillarca granosa* based on mitochondrial CO I gene sequences. Zoology Research, 2009, 30(1): 17–23
- Zhou LQ, Yang AG, Wang QY, *et al.* ITS sequence variation and phylogenetic analysis on four geographical populations of blood clam *Scapharca broughtonii*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(5): 78–84 [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 魁蚶 4 个地理群体 ITS 序列变异及系统发生分析. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 78–84]

Genetic Diversity and Geographic Population Structures of *Scapharca broughtonii*

LIU Hanmiao^{1,2}, WU Biao¹, LIU Zhihong¹①, YANG Aiguo¹, ZHOU Liqing¹, SUN Xiujun¹

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

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

Abstract In this study we applied PCR to amplify and analyze partial sequences of mitochondrial CO I, 12S rRNA and ribosome 18S rRNA, 28S rRNA of five groups of *Scapharca broughtonii* (Jiaonan, Rongcheng, Changdao, Penglai in Shandong Province of China, and Tongyeong of Korea). In spite of the apparent genetic variation in CO I, 12S, 18S and 28S, the base compositions of these genes were stable. The genetic diversity of the five populations indicated the good condition of the germplasm resource of these species. Sixty-seven sequences of CO I, 73 sequences of 12S, 75 sequences of 18S rRNA and 75 sequences of 28S rRNA were obtained, and their lengths were 776 bp, 443 bp, 909 bp and 894 bp respectively. Sequence analysis showed that the polymorphic sites, haplotype, *Hd* diversity and nucleotide diversity index of CO I were 466, 32, 0.925 and 0.086, respectively. While that of 12S were 292, 43, 0.928, 0.0856, and 18S were 909, 74, 1.0, 0.717, and 28S were 27, 18, 0.778, 0.289. In addition, the Jiaonan population and Penglai population showed the highest diversity in 18S and 28S. Genetic distance data revealed the Korea population has bigger genetic distance with China population than that of within populations from China. Clustering analysis based on the partial sequences of CO I gene showed that the China *S. broughtonii* individuals from same population China clustered generally together, however, the Korea individuals clustered more than one group.

Key words *Scapharca broughtonii*; CO I gene; 12S rRNA gene; 18S rRNA gene; 28S rRNA gene; Genetic diversity

① Corresponding author: LIU Zhihong, E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

短蛸(*Amphioctopus fangsiao*)幼体摄食行为和不同饵料对其生长、存活的影响*

王卫军¹ 董根^{1,2} 李焕军¹ 刘兆存³
李彬¹ 冯艳微¹ 杨建敏^{1①}



(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;
2. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003; 3. 山东省华春渔业有限公司 东营 257200)

摘要 为了研究短蛸(*Amphioctopus fangsiao*)不同生长阶段的饵料需求,本研究采用刚孵化的短蛸幼体作为实验材料,首先观察不同环境条件下短蛸幼体的摄食行为,然后通过投喂不同的饵料,对短蛸幼体的生长过程进行研究。结果显示,卤虫无节幼体密度从0.1个/ml上升至1个/ml的过程中,密度在0.1个/ml时短蛸初孵幼体摄食量高;1-2 d龄幼体和2-3 d龄幼体有较为强烈的摄食行为,因此,需要从孵化第2天开始重视短蛸幼体的饵料情况。晚上是初孵幼体的摄食活跃阶段,在室内光和黑暗条件下均表现出高摄食量。投喂混合饵料时,短蛸幼体有较高的存活率和增长率;初孵幼体(0.03 g)培育过程中,卤虫无节幼体是关键饵料;当幼体开始附底(0.1 g)时,应及时进行饵料转换,虾苗和贝肉是附底幼体的重要饵料。该研究结果对短蛸规模化苗种繁育具有重要实用价值。

关键词 短蛸幼体;摄食行为;饵料结构;生长;存活

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0100-07

蛸类幼体捕捉猎物行为是一种可辨识的行为(Boletzky, 1987; Villanueva *et al.*, 1997; Hernandez-Garcia *et al.*, 2000)。蛸类幼体摄食行为的发生会受到环境条件影响,因此,本研究通过观察不同条件下的蛸类幼体摄食行为发生频率,以期获得适宜的摄食环境条件。蛸类幼体在孵化之后,初期能够利用卵黄储备度过初始的数小时或数天,之后依靠捕食外源饵料进行生长(Boletzky, 1975、1989)。外卵黄囊体积的减少或者消失被认为是一种幼体健康和活力的象征,表明这些储备被正常吸收。相反,一个大的外卵黄囊表明过早孵化(Boletzky *et al.*, 1983、1987),而且缺失或遗弃外卵黄囊会降低幼体的成活率(Okubo, 1979)。蛸类幼

体对蛋白质和不饱和脂肪酸有很高需求(Giménez *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2004; Aguila *et al.*, 2007; Domingues *et al.*, 2007; Cerezo-Valverde *et al.*, 2008),同时依赖具有丰富营养组成的活体饵料(Navarro *et al.*, 2000、2003; Iglesias *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2010; Farias *et al.*, 2011)。蛸类幼体在第1个月表现出了很高的死亡率,其原因可能是缺乏一种合适的饵料来满足其营养需求,因此,关于蛸类幼体的饵料研究引起国际上广泛关注。

目前,关于短蛸(*Amphioctopus fangsiao*, d'Orbigny, 1839-1841)幼体饵料方面的研究少有报道,本研究采用不同饵料进行生长实验,以期对短蛸幼体养殖过程中的饵料选取提供参考和数据支持。

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-47)、山东省重点研发计划项目(2015GNC110017)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2014NY010)和黄河三角洲学者共同资助 [This work was supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-47), Shandong Province Important Project of Research and Development Plan (2015GNC110017), the Outstanding Young Scientist of Shandong Province (BS2014NY010), and Scholar of Yellow River Delta]. 王卫军, E-mail: wwj2530616@163.com

① 通讯作者: 杨建敏, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2016-08-30, 收修改稿日期: 2016-09-09

1 材料与方 法

1.1 材 料

于 2012 年在山东省海洋资源与环境研究院东营养殖实验基地进行短蛸摄食观察实验, 于 2016 年在华春渔业有限公司进行短蛸生长存活实验。实验用短蛸幼体孵化于 6 月初, 选取体质强、健康的同一批个体。摄食行为观察实验容器为普通白色塑料桶, 生长实验容器为 75 cm×40 cm×25 cm 白色塑料箱, 实验用水为经砂滤池过滤的天然海水, 自然水温在 25–26℃ 之间, 盐度在 26–28 之间。饵料准备包括卤虫(*Artemia*)无节幼体、中国毛虾(*Acetes chinensis*)虾苗、桡足类、四角蛤蜊(*Maetra veneriformis*)贝肉。卤虫无节幼体由卤虫卵孵化, 并经过营养强化。桡足类(哲水蚤目)和虾苗(约 1 cm)由天然池塘通过不同孔径的滤网分离获得。贝肉为四角蛤蜊的足和闭壳肌, 去除内脏团。

1.2 幼体摄食行为观察

在桶内放入约 30 cm 高的水体, 将 15 只初孵幼体放入其中后, 1 min 为幼体适应期, 之后的 9 min 记录活跃幼体和摄食行为发生次数。活跃幼体的判定为在水中游动而非贴于桶壁之上的个体。摄食行为发生的判定为幼体突然猛的向前游动 1 次, 作为发生 1 次摄食行为。实验由 2 人观察计数, 1 人计时。

个体平均摄食次数=总摄食行为发生次数/活跃幼体数

1.2.1 不同密度卤虫无节幼体对初孵幼体摄食行为的影响 将 15 只饥饿的 1–2 d 龄幼体, 放入 3 组密度分别为 0.1、0.5、1 个/ml 的卤虫无节幼体饵料中, 观察记录 10 min 中内其活跃个体和摄食行为。观察时间默认晚上, 实验光线为室内光(30 Lux)。

1.2.2 饵料对初孵幼体的摄食行为的影响 根据饵料种类将实验分为 3 组: 卤虫无节幼体 0.1 个/ml、桡足类 0.1 个/ml、虾苗 10 只/L, 每组分别放入 15 只饥饿的 1–2 d 龄幼体, 观察记录 10 min 中内其活跃个体和摄食行为。观察时间默认晚上, 实验光线为室内光(30 Lux)。

1.2.3 不同时间段初孵幼体的摄食行为 分别在 08:00、12:00、20:00, 将 15 只饥饿的 1–2 d 龄幼体放入 0.1 个/ml 的卤虫无节幼体饵料中, 观察记录 10 min 中内其活跃个体和摄食行为。

1.2.4 不同光线条件下初孵幼体的摄食行为 分别在自然光直射(600 Lux)、室内光(30 Lux)和黑暗(0.02 Lux)条件下, 将 15 只饥饿的 2–3 d 龄幼体, 放入 0.1 个/ml 的卤虫无节幼体饵料中, 观察记录 10 min 中内幼体活跃个体和摄食行为。

1.2.5 不同日龄幼体的摄食行为 根据日龄将饥饿的幼体分为 5 组(0–1、1–2、2–3、3–4、4–5 d), 每组 15 只, 将其放入密度为 0.1 个/ml 的卤虫无节幼体饵料中, 观察记录 10 min 内幼体活跃个体和摄食行为。观察时间默认晚上, 实验光线为室内光(30 Lux)。

1.3 不同饵料下初孵和附底幼体的生长、存活

根据幼体的生长过程, 将幼体分为初孵幼体(0.03 g)和附底幼体(0.1 g) 2 个阶段。在初孵幼体阶段中, 根据饵料使用不同分为 4 组: 卤虫无节幼体组、桡足类组、虾苗组、混合组(卤虫无节幼体+桡足类+虾苗), 养殖 9 d, 观察其成活率和生长情况。在附底幼体阶段中, 单一饵料已经不能够满足, 根据饵料的大小区别, 采取 4 种饵料组合: 卤虫无节幼体+桡足类组、桡足类+虾苗组、虾苗+贝肉组、混合组, 养殖 10 d, 观察其成活率和生长情况, 计算反映短蛸幼体生长情况的 2 个指标: 增长率(Growth rate, GR)和瞬时增长率(Instantaneous growth rate, IGR)(姜作发等; 2007), 公式如下:

$$GR=(W_2-W_1)/W_1\times 100\%;$$

$$IGR=(\ln W_2-\ln W_1)/t\times 100\%;$$

W_1 、 W_2 分别代表初始体重和结束体重, t 代表实验天数。

2 结 果

2.1 幼体摄食行为

2.1.1 不同密度卤虫无节幼体对初孵幼体摄食行为的影响 从 0.1 个/ml 上升至 1 个/ml 卤虫无节幼体密度过程中, 短蛸幼体平均活跃个数、摄食行为发生次数、个体平均摄食次数均表现减少(图 1)。

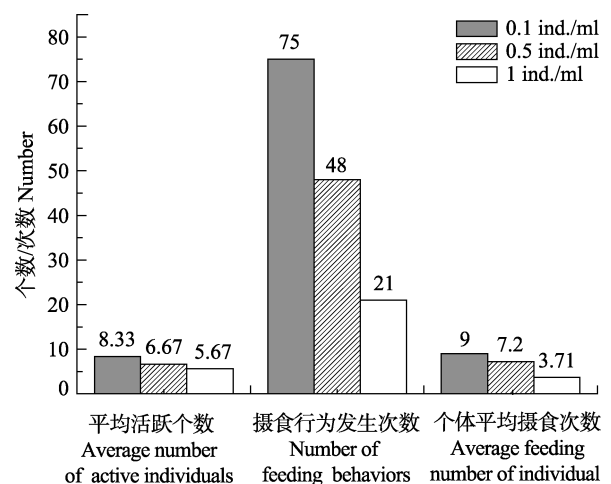


图 1 不同密度卤虫无节幼体下初孵幼体的摄食行为
Fig.1 The feeding behavior of *A. fangsiao* new hatchlings fed on *Artemia nauplii* at different densities

2.1.2 不同饵料对初孵幼体摄食行为的影响 虾苗能够极大地引起幼体的摄食兴趣, 幼体表现出明显的攻击性, 摄食行为发生次数达到 131 次, 个体平均摄食次数达到 20.68 次(图 2)。幼体对桡足类没有很强的摄食欲望, 各项指标均为最低。卤虫无节幼体摄食行为发生次数适中, 活跃幼体个数最多。

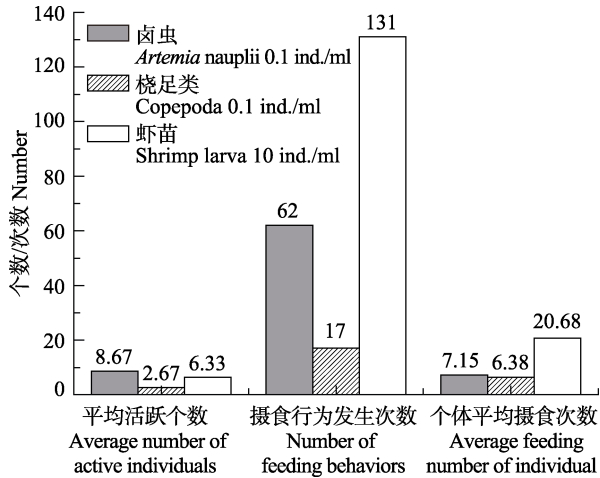


图 2 初孵幼体对不同饵料的摄食行为
Fig.2 The feeding behavior of *A. fangsiao* new hatchlings fed on different diets

2.1.3 不同时间段初孵幼体的摄食行为 如图 3 所示, 晚上是初孵幼体的摄食活跃时间段, 表现为高平均活跃个数(8.67)和高摄食行为发生次数(75)。而上午和下午, 初孵幼体摄食并不活跃, 摄食行为较少。

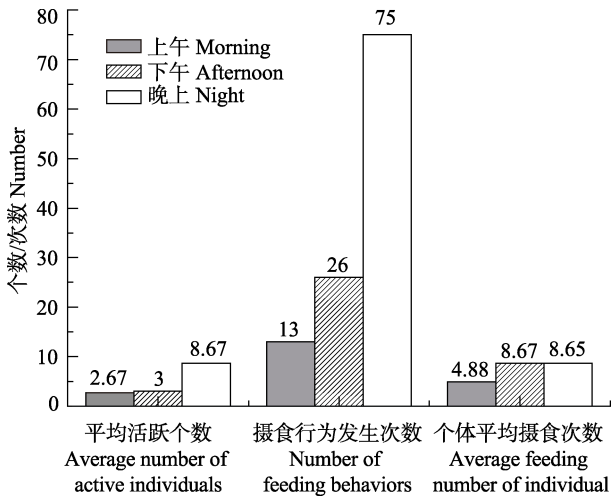


图 3 不同时间段初孵幼体的摄食行为
Fig.3 The feeding behavior of *A. fangsiao* new hatchlings at different time points

2.1.4 不同光线对初孵幼体摄食行为的影响 室内光条件下, 摄食行为发生次数出现最多, 为 76 次; 而黑暗条件下, 幼体更加活跃, 8.33 只平均活跃幼体数; 自然光直射条件下, 幼体不活跃, 摄食行为发生

也较少(图 4)。

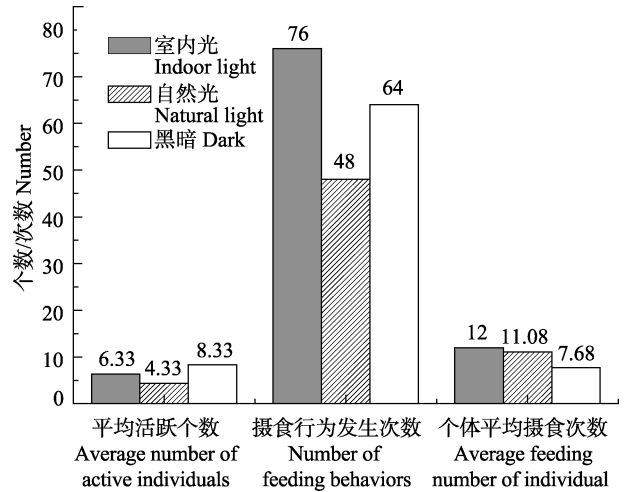


图 4 不同光线条件下初孵幼体的摄食行为
Fig.4 The feeding behavior of *A. fangsiao* new hatchlings under different light conditions

2.1.5 不同日龄幼体的摄食行为 1-2 d 龄幼体和 2-3 d 龄幼体的摄食行为较为强烈, 表现为高的摄食行为发生次数(75 和 76)和个体平均摄食次数(8.65 和 12.01); 0-1 d 龄幼体, 尽管活跃个数较高, 但摄食行为较少; 3-4 d 龄和 4-5 d 龄摄食行为逐渐衰退, 尤其 4-5 d 的个体平均摄食次数仅为 2.8 次(图 5)。

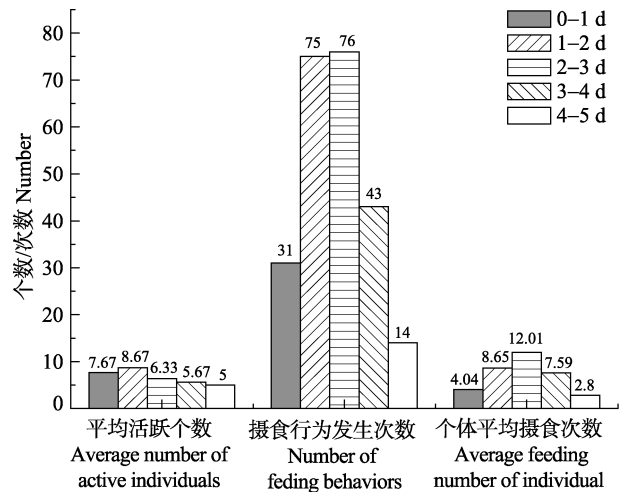


图 5 不同日龄初孵幼体的摄食行为
Fig.5 The feeding behavior of *A. fangsiao* new hatchlings at different ages

2.2 饵料对幼体生长、存活的影响

2.2.1 饵料对初孵幼体存活率的影响 总体上短蛸初孵幼体的成活率低, 其中, 采用混合饵料的存活率相对最高, 为 25%; 其次, 卤虫无节幼体、桡足类作为饵料, 存活率均为 16.67%; 虾苗条件下存活率最低, 仅为 8.33%(图 6)。

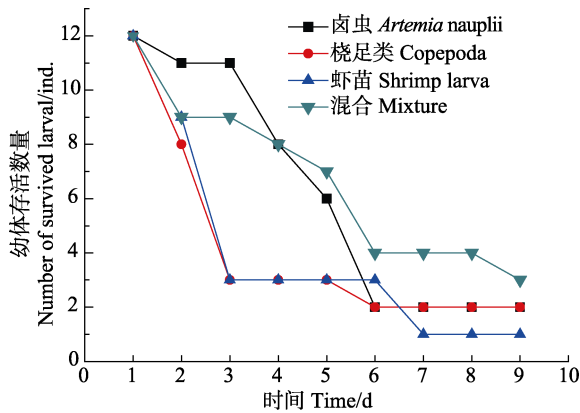


图 6 短蛸初孵幼体(0.03 g)摄食不同饵料的存活情况
Fig.6 The survival rate of *A. fangsiao* new hatchlings (0.03 g) fed on different diets

利用卤虫无节幼体、虾苗和混合饵料均能够获得较高的增长率和瞬时增长率, 分别为 433%以上和 20%左右; 而桡足类的生长效果不佳(表 1)。

2.2.2 对附底幼体存活率的影响 虾苗+贝肉饵料组合的存活率最高, 为 83.3%; 混合饵料组的成活率达到 50%; 桡足类+虾苗组的成活率约 40%; 卤虫

无节幼体和桡足类已不适于附底幼体, 仅存活 1 只, 存活率为 8.3%(图 7)。

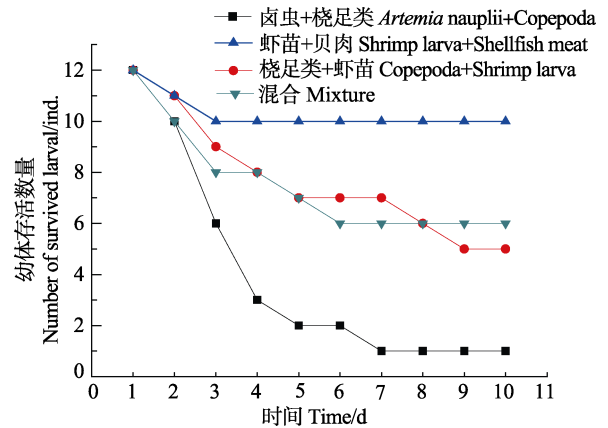


图 7 短蛸附底幼体(0.1 g)摄食不同饵料的存活情况
Fig.7 The survival rate of *A. fangsiao* benthic hatchlings (0.1 g) fed on different diets

桡足类+虾苗、虾苗+贝肉、混合饵料均能够达到约 13%的瞬时增长率, 而卤虫无节幼体+桡足类的增长率仅为 8%(表 2)。

表 1 不同饵料下短蛸初孵幼体(0.03 g)的生长情况

Tab.1 The growth of *A. fangsiao* new hatchlings (0.03 g) fed on different diets

指标 Indices	饵料 Diets			
	卤虫无节幼体 <i>Artemia nauplii</i>	桡足类 Copepoda	虾苗 Shrimp larva	混合 Mixture diet
初始重量 Initial weight (g)	0.03	0.03	0.03	0.03
实验后重量 Final weight (g)	0.16	0.11	0.16	0.18
增长率 Growth rate (%)	433	267	433	500
瞬时增长率 Instantaneous growth rate (%/d)	19	14	19	20

表 2 不同饵料下短蛸附底幼体(0.1 g)的生长情况

Tab.2 The growth of *A. fangsiao* benthic hatchlings (0.1 g) fed on different diets

指标 Indices	饵料类 Diets			
	卤虫无节幼体+桡足类 <i>Artemia nauplii</i> with Copepoda	桡足类+虾苗 Copepoda with Shrimp larva	虾苗+贝肉 Shrimp larva with shellfish meat	混合 Mixture diet
初始重量 Initial weight (g)	0.100	0.100	0.100	0.100
实验后重量 Final weight (g)	0.230	0.408	0.353	0.355
增长率 Growth rate (%)	130	308	253	255
瞬时增长率 Instantaneous growth rate (%/d)	8	14	13	13

3 讨论

3.1 影响短蛸摄食行为的主要因素

蛸类的摄食行为包括三个阶段, 第一阶段为“注意阶段”: 幼体减慢速度靠近猎物, 采取一系列不同的迂回移动包括前进、后退和侧游。第二阶段为“定

位阶段”: 胴部末端径直朝向猎物, 将腕聚集起来指向前端呈瞄准姿势, 体轴与猎物直接对齐。此时, 幼体几乎保持静止, 有时在猎物旁利用活动漏斗喷出的水流旋转调整自己的位置, 从而获得最佳攻击位置。第三阶段为“攻击阶段”: 幼体通过漏斗一次(或者两次)强力喷出的水流急速前游, 将猎物用腕全部包裹。

相较于 0.5 个/ml 和 1 个/ml 卤虫无节幼体密度,短蛸摄食行为在 0.1 个/ml 发生次数较多,这与真蛸(*Octopus vulgaris*)相似(Iglesias *et al.*, 2006),其原因可能是较低密度能够使幼体更好地锁定目标,实施更加有效的捕食行为。关于饵料密度,不同研究采用不同密度,没有明确标准,Iglesias 等(2004)使用卤虫成体(1–4 mm)的密度为 0.05–0.1 个/ml; Moxica 等(2002)使用 0.1 个/ml; Villanueva 等(2002)采用密度为 0.2、2、4、10 个/ml 卤虫无节幼体进行研究,发现最高生长率出现在高密度; Carrasco 等(2003)使用卤虫密度为 0.2–0.8 个/ml; Okumura 等(2005)使用卤虫密度为 2.0 个/ml,关于饵料的密度高低对生长和存活的影响仍需研究。饵料高密度并不一定能引起较多的摄食行为,在实际养殖过程中,为减少时间和经济成本,可以适当减少饵料投喂密度,保证其被幼体有效摄食。短蛸 0–1 d 幼体可能仍然依靠卵黄营养,对外源饵料在生理上未做好准备。Yamauchi 等(1964)记录短蛸孵化幼体的卵黄 10 h 内全部吸收,24 h 前后主动捕食并不积极,此时用镊子夹取 2 mm 饵料碎片,幼体用腕抱持,此举说明短蛸已经开始摄食外源营养。1–2 d 和 2–3 d 由于卵黄已基本吸收完成,机体处于饥饿状态,所以表现出强烈的摄食需求,其他实验同样观察到发育良好、非早产的真蛸幼体在孵化 24 h 之后便开始摄食(Villanueva *et al.*, 2002; Morote *et al.*, 2005; Iglesias *et al.*, 2006)。3–4 d 之后,可能由于饥饿时间过长,身体虚弱,达到不可逆点,摄食行为发生消极。因此,在实际养殖过程中,从孵化第 2 天开始要对短蛸幼体的饵料条件加以重视。

夜间是短蛸初孵幼体摄食行为发生的主要时间段,这可能与其喜安静和阴暗的特点相关。因此,在养殖过程中,在傍晚要投喂足够量的饵料,防止由于夜间摄食量多而导致饵料缺乏,同时,白天可适量减少饵料投喂量,以节省饵料。短蛸初孵幼体在黑暗条件下活跃,而在室内微光条件下,摄食行为发生较多。黑暗条件下活跃可能与其自身习性相关,短蛸喜在阴暗环境下生存,另一方面,摄食行为发生可能有一个视觉阈,超过一定光线照度后,幼体才进行大量摄食。上午、下午摄食行为少,说明强光照对短蛸的摄食有直接抑制作用。真蛸初孵幼体相关实验显示,微光条件下的摄食率比黑暗下提高 3 倍(Villanueva *et al.*, 2008)。Márquez 等(2007)在研究真蛸幼体摄食与光照关系时同样发现,黑暗条件下的摄食个体较少,表明光照(视觉)在捕食行为中的重要性。然而,这些作者同时认为,光照对摄食并非必要因素,因为黑暗条件下幼体的摄食率与饵料密度呈正相关。因此,在养殖

过程中,应保持较低的光照条件,避免阳光直射,傍晚可能是幼体一天中摄食的高峰期,需保证饵料充足。虾苗能够极大地引起短蛸的摄食兴趣。口的直径限制摄食饵料的大小,初孵蛸类相较于大部分肉食性幼鱼,能够利用发育良好的腕和吸盘捕获与其相同大小的猎物。短蛸在幼体阶段有极强的攻击性,喜欢攻击身体大小相似的物体,甚至水体中的相似悬浮物都会成为它进攻的目标(张学舒, 2002)。虾苗体长 1 cm,与短蛸幼体初孵幼体大小类似,符合其捕食选择。但作者在实验中同样发现,虾苗游泳速度快于短蛸幼体,短蛸幼体不易捕捉成功,造成摄食效率低。因此,初孵幼体期间,应尽可能寻找一种体型与短蛸相似,而游泳能力却低于短蛸的活体饵料。

3.2 初孵幼体和附底幼体的饵料选择

采用混合饵料投喂初孵幼体,成活率相对较高(25%),生长率也能达到 20%。剩余 3 种单一饵料作比较,卤虫无节幼体成活率和增长率均为最高,接近混合饵料,可以确定其在短蛸初孵幼体生长过程中的重要性。虾苗成活率较低原因可能是其短蛸幼体难以捕食所导致的饥饿造成。使用桡足类,幼体生长率较低,可能桡足类在营养上不能满足初孵幼体。因此,初孵幼体培育过程中,尽可能混合投喂,卤虫无节幼体是关键饵料。目前,卤虫是水产养殖最广泛应用的开口饵料之一,在蛸类养殖过程中也能够表现出较好结果,但在低温和对 n-3 不饱和脂肪酸需求较高时,不宜使用(Uriarte *et al.*, 2011)。

幼体附底以后,随着饵料体积的增大,幼体成活率增加。凡是有虾苗的饵料组合,均获得较高的存活率和生长率,没有虾苗的“卤虫无节幼体+桡足类”的组合在存活率和生长率上都不理想,表明短蛸饵料结构开始转变,虾苗是此时附底幼体的一种优良饵料。在虾苗+贝肉的饵料中,成活率超过 80%,表明贝肉有助于附底幼体的成活。短蛸的饵料大小应随着幼体的生长进行调整(Kitajima *et al.*, 1985),因此,当幼体开始附底时,要及时进行饵料转换,虾苗和贝肉是附底幼体的重要饵料。

参 考 文 献

- Aguila J, Cuzon G, Pascual C, *et al.* The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 641–655
- Boletzky SV, Boyle PR. Embryonic phase. *Cephalopod life cycles*, Vol II, London: Academic Press, 1987, 5–31

- Boletzky SV, Hanlon RT. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*, 1983, 44: 147–187
- Boletzky SV. A contribution to the study of yolk absorption in the Cephalopoda. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 1975, 80(3): 229–246
- Boletzky SV. Juvenile behaviour. In *Cephalopod life cycles. Volume II. Comparative Reviews*, Boyle PR (ed.). London: Academic Press, 1987, 45–84
- Boletzky SV. Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Advanced Marine Biology*, 1989, 25(6): 85–115
- Carrasco JF, Rodríguez C, Rodríguez M. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. Libro de Resúmenes del IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Cádiz, Spain, 2003, 255–256
- Cerezo-Valverde J, Hernández MD, Aguado-Giménez F, et al. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. *Aquaculture*, 2008, 275(1–4): 266–273
- Domingues PM, López N, Muñoz JA, et al. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(13): 273–280
- Fariás A, Navarro JC, Cerna V, et al. Effect of broodstock diet on the fecundity and biochemical composition of eggs of the Patagonian red octopus (*Enteroctopus megalocvathus* Gould 1852). *Ciencias Marinas*, 2001, 37(1): 11–21
- Giménez FA, García BG. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): Influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International*, 2002, 10(5): 361–377
- Hernández-García V, Martín AY, Castro JJ. Evidence of external digestion of crustaceans in *Octopus vulgaris* paralarvae. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 2000, 80(3): 559–560
- Iglesias J, Fuentes L, Sánchez J, et al. First feeding of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae using *Artemia*: Effect of prey size, prey density and feeding frequency. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 817–822
- Iglesias J, Otero JJ, Moxica C, et al. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: Paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 2004, 12(12): 481–487
- Iglesias J, Sánchez FJ, Bersano J, et al. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. *Aquaculture*, 2007, 266(1–4): 1–15
- Jiang ZF, Jia ZH, Bai QL, et al. Growth characters of cultured juvenile *Oncorhynchus masou masou*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(1): 160–164 [姜作发, 贾钟贺, 白庆利, 等. 人工养殖山女鳟幼鱼的生长特性. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 160–164]
- Kitajima C, Hayashida G. On the laboratory culture of *Amphioctopus fangsiao*. *Aquaculture*, 1985, 32
- Márquez L, Quintana D, Almansa E, et al. Effects of visual conditions and prey density on feeding kinetics of paralarvae of *Octopus vulgaris* from a laboratory spawning. *Journal of Molluscan Studies*, 2007, 73(2): 117–121
- Morote E, Rodríguez M, Mancera JM, et al. Las enzimas digestivas como indicadores del estado nutricional en paralarvas de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. *Boletín-Instituto Espanol de Oceanografía*, 2005, 21(1–4): 177–186
- Moxica C, Linares F, Otero JJ, et al. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. *Boletín-Instituto Espanol de Oceanografía*, 2002, 18: 31–36
- Navarro JC, Villanueva R. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture*, 2000, 183(1–2): 161–177
- Navarro JC, Villanueva R. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 2003, 219(1–4): 613–631
- Okubo S. Spawning and rearing of hatchlings of the giant pacific octopus. *Animals and Nature*, 1979, 9: 2–6
- Okumura S, Kurihara A, Iwamoto A, et al. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific sandeel, *Ammodytes personatus*: Improved survival and growth of common octopus paralarvae. *Aquaculture*, 2005, 244(1–4): 147–157
- Seixas P, Rey-Méndez M, Valente LM, et al. High DHA content in *Artemia* is ineffective to improve *Octopus vulgaris* paralarvae rearing. *Aquaculture*, 2010, 300(1–4): 156–162
- Uriarte I, Iglesias J, Domingues P, et al. Current status and bottle neck of octopod aquaculture: The case of American species. *Journal of World Aquaculture Society*, 2011, 42(6): 735–752
- Villanueva R, Koueta N, Riba J, et al. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture*, 2002, 205(3–4): 269–286
- Villanueva R, Norman MD. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 2008, 46: 105–202
- Villanueva R, Nozais C, Boletzky SV. Swimming behaviour and

- food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 208(1-2): 169-184
- Yamauchi K, Takeda F. Laboratory experiment on hatching of *Amphioctopus fangsiao*. *Aquaculture*, 1964, 12: 1-9
- Zhang XS. The breeding action and embryogenesis of *Octopus ocellatus* in the man-made environment. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2002, 21(3): 220-224 [张学舒. 人工环境中短蛸的繁殖行为和胚胎发生. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2002, 21(3): 220-224]

(编辑 冯小花)

Feeding Behavior of Larval *Amphioctopus fangsiao* and the Effect of Different Diets on Its Growth and Survival

WANG Weijun¹, DONG Gen^{1,2}, LI Huanjun¹, LIU Zhaocun³, LI Bin¹, FENG Yanwei¹, YANG Jianmin^{1①}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003; 3. Shandong Huachun Fisheries Co., LTD, Dongying 257200)

Abstract *Amphioctopus fangsiao* (d'Orbigny, 1839-1841), aka *Octopus ocellatus* (Gray, 1849), is widely distributed in coastal areas of West Pacific Ocean. *A. fangsiao* has high market value because of the delicate meat texture and enriched nutrition. Hence it has been one of the most important economic species in the north coast of China, and the development of the culture industry is promising. In this study we used new hatchlings to study the food requirement of *A. fangsiao* at different developmental stages. We first observed the feeding behavior under different conditions, and then investigated the growth process of *A. fangsiao* fed on different diets at different developmental stages. As the density of *Artemia* nauplii (the food) increased from 0.1 ind./ml to 1 ind./ml, the highest food intake rate of the hatchlings occurred when the density was 0.1 ind./ml. Because the feeding behavior of hatchlings aged Day 1-2 and Day 2-3 was highly active, the diet should be carefully prepared starting from Day 2 after hatching. The food intake of new hatchlings was usually active in the nighttime, and was especially intense in the shimmer and dark environment. A mixed diet helped improve the growth and lower the mortality rate. *Artemia* nauplii was the key diet at the para-larvae stage (0.03 g). A switch of diet was needed at the benthic stage (0.1 g), and shrimp and fresh shellfish meat was the optimal combination for the benthic hatchlings. Results of this study may provide important information for the large-scale culture of *A. fangsiao*.

Key words *Amphioctopus fangsiao* larvae; Feeding behavior; Diet structure; Growth; Survival

① Corresponding author: YANG Jianmin, E-mail: ladderup@126.com

莱州湾海域小刀蛭(*Cultellus attenuatus*) 繁殖生物学研究*

姜 绪¹ 韦秀梅¹ 冯艳微¹ 韩慧宗¹ 王 圣¹
刘相全^{1①} 童 潼²

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;
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 2013年4月–2014年3月, 采用组织学和实验生态学方法研究了山东莱州湾海域小刀蛭(*Cultellus attenuatus*)的性腺发育、生殖周期、胚胎及幼虫发育。结果显示, 在繁殖季节, 小刀蛭性别可通过性腺颜色区分, 雌性为白色, 雄性为黄色; 1个生殖周期为1年, 性腺发育经历增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期5个阶段; 莱州湾繁殖期为6月中旬–7月上旬。小刀蛭受精卵卵径为50–55 μm, 在水温26℃、盐度28的条件下, 经24 h发育至D形幼虫, 10 d后幼虫发育变态为稚贝。对莱州湾小刀蛭繁殖生物学的研究, 可为该海域小刀蛭的人工育苗和增养殖提供科学依据。

关键词 小刀蛭; 繁殖生物学; 性腺发育; 胚胎及幼虫发育

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0107-05

小刀蛭(*Cultellus attenuatus*)隶属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroida)、刀蛭科(Cultellidae)(徐凤山, 1997), 生活在数米至数十米水深的浅海中, 其底质一般为泥或泥沙, 在我国南北海区均有分布(高爱根等, 2005a、b; 吴斌等, 2014)。小刀蛭因其味道鲜美且营养价值高, 受到消费者的青睐, 具有较高的经济价值。

近年来, 受近海人类活动增加、捕捞强度过大及海洋环境恶化等因素的影响, 小刀蛭野生资源锐减且规格降低, 为有效保护小刀蛭资源, 同时满足市场消费需要, 开展其人工育苗工作势在必行。目前, 国内外已有小刀蛭相关报道, 如徐加涛等(2013)报道了小刀蛭的营养学价值; 曾国权等(2010)分析了小刀蛭群

体内同工酶的遗传变异; 陈丽梅等(2005)、孟学平等(2008)对小刀蛭部分DNA序列进行了分析; 王亚(2012)¹⁾对舟山地区小刀蛭的性腺、胚胎及幼体发育进行了研究。但关于我国北方地区小刀蛭的繁殖习性尚未见报道。本研究对我国北方莱州湾海域小刀蛭的性腺发育规律以及胚胎幼虫的发育过程进行了研究, 以期为我国小刀蛭的人工育苗提供科学依据。

1 材料与方 法

实验用小刀蛭于2013年4月–2014年3月在山东莱州湾海域采集。

性腺发育观察: 实验期间, 每月采集1次样品, 而在5、6、7月每10 d采样1次。每次采集的样品

* 山东省属科研单位专项经费项目“小刀蛭苗种规模化培育技术研究”鲁财教指[2013]96号和广西海洋生物技术重点实验室开放基金课题(GLMBT-201504)共同资助 [This work was supported by Large-Scale Rearing Techniques of *Cultellus attenuatus* breeding, and Open Research Fund Program of Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology (GLMBT-201504)].

姜 绪, E-mail: jiangjili01@163.com

① 通讯作者: 刘相全, 副研究员, E-mail: lxq6808@163.com

收稿日期: 2016-09-20, 收修改稿日期: 2016-10-26

1) Wang Y. Studies on development of gonads, embryos and youngs of *Phaxas attenuatus* (Bivalvia, Mollusca). Master's Thesis of Ningbo University, 2012 [王亚. 小刀蛭性腺、胚胎及幼体发育研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2012]

取 10 只进行解剖, 观察小刀蛭性腺发育情况; 另取 10 只样品分离其生殖腺, 波恩试液固定, 石蜡包埋, 切片厚度约为 6 μm , 经苏木精-伊红染色, 显微镜下观察并拍照。

胚胎及幼虫发育观察: 6 月初, 筛选个体完整、外壳无破损的健康小刀蛭个体作为亲本, 放入车间内暂养, 暂养期间投喂小球藻(*Chlorella* sp.)和金藻(*Chrysophyta*), 选取海泥为底质, 后采用阴干、流水和升温相结合的方式刺激亲蛭产卵。产卵后, 取样品连续观察, 记录小刀蛭胚胎及幼虫发育过程。

2 结果

2.1 小刀蛭宏观性腺发育分期

经解剖发现, 小刀蛭为雌雄异体, 性腺由滤泡、生殖管和生殖输送管三部分构成。同时, 经观察性腺颜色、形状及内脏团覆盖率等, 将小刀蛭性腺发育分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期。

增殖期: 从外观上无法分辨雌雄, 解剖后观察发现, 内脏团表面有一层很薄的性腺。

生长期: 可从外观上分辨雌雄, 雌性性腺呈白色, 雄性性腺则呈黄色, 絮状物包围内脏团, 并向足部延伸生长。

成熟期: 性腺丰满, 覆盖内脏团, 足内部厚度增加, 性腺颜色已清晰可见。

排放期: 性腺发育至全年最丰满时期, 排放前, 絮状物质延伸到足基部, 解剖后有大量白色(雌性)或黄色(雄性)液体流出; 排放后, 足部呈透明状, 无法分辨雌雄。

休止期: 个体消瘦, 已无法观察到絮状物质, 足部呈透明状, 无法分辨雌雄。

2.2 小刀蛭性腺组织学发育分期

增殖期: 小刀蛭雌雄分化开始, 滤泡开始形成, 呈狭长带状、椭圆状等不规则状, 滤泡体积较小, 滤泡间存在结缔组织。配子刚开始发育, 其中, 雌性滤泡壁上出现卵原细胞, 雄性滤泡壁上出现精原细胞, 并逐渐有精母细胞形成(图 1-a 和图 2-a)。本阶段发育时间为 3 月。

生长期: 滤泡间结缔组织逐渐减小, 滤泡数量增加, 体积增大。雌性滤泡腔内卵原细胞逐渐分化, 未成熟卵子形状不规则, 具有卵柄, 并向滤泡腔中央延伸, 已有少量脱离滤泡腔壁, 成熟卵子出现; 雄性滤泡腔内, 精原细胞不断分化, 腔内精原细胞至精子各阶段形态均能观察到, 出现少量成熟精子(图 1-b 和图 2-b)。本阶段发育时间为 4 月。

成熟期: 滤泡间的空隙基本消失, 且滤泡发育至最饱满的时期。雌性滤泡腔内充盈大量成熟卵子, 相互挤压, 卵子呈现出多种形状; 雄性滤泡腔被大量成熟的精母细胞和精子充满(图 1-c 和图 2-c)。本阶段发

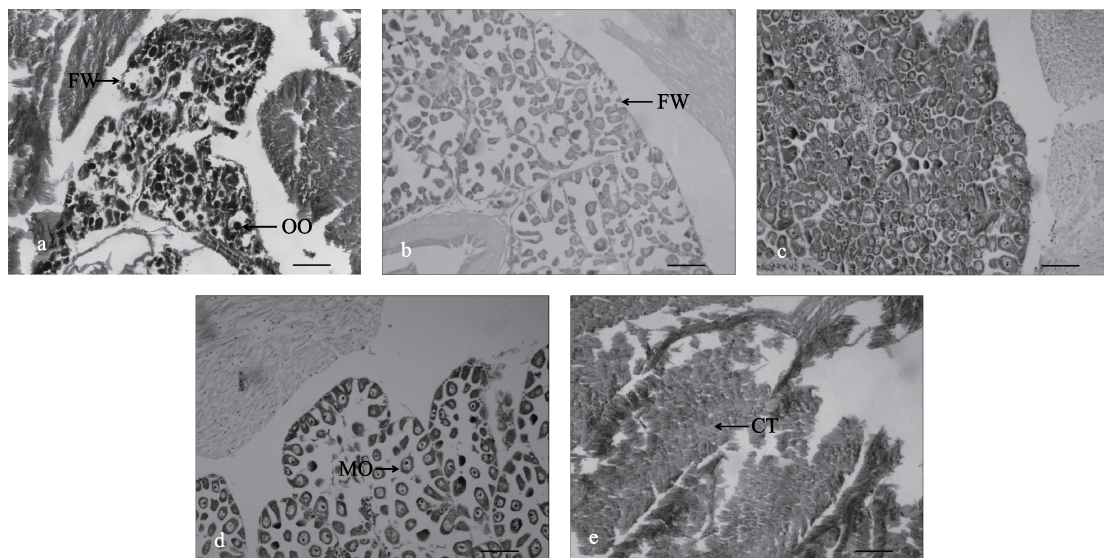


图 1 小刀蛭卵巢不同发育期的组织切片(100 \times)

Fig.1 Histological changes in the ovary of *C. attenuates* at different developmental stage (100 \times)

a: 增殖期; b: 生长期; c: 成熟期; d: 排放期; e: 休止期

CT: 结缔组织; FW: 滤泡壁; OO: 卵原细胞; MO: 成熟卵子

a: Proliferation stage; b: Increasing stage; c: Maturation stage; d: Breeding stage; e: Suspensive stage

CT: Connective tissue; FW: Follicle wall; OO: Oogonium; MO: Mature oocyte

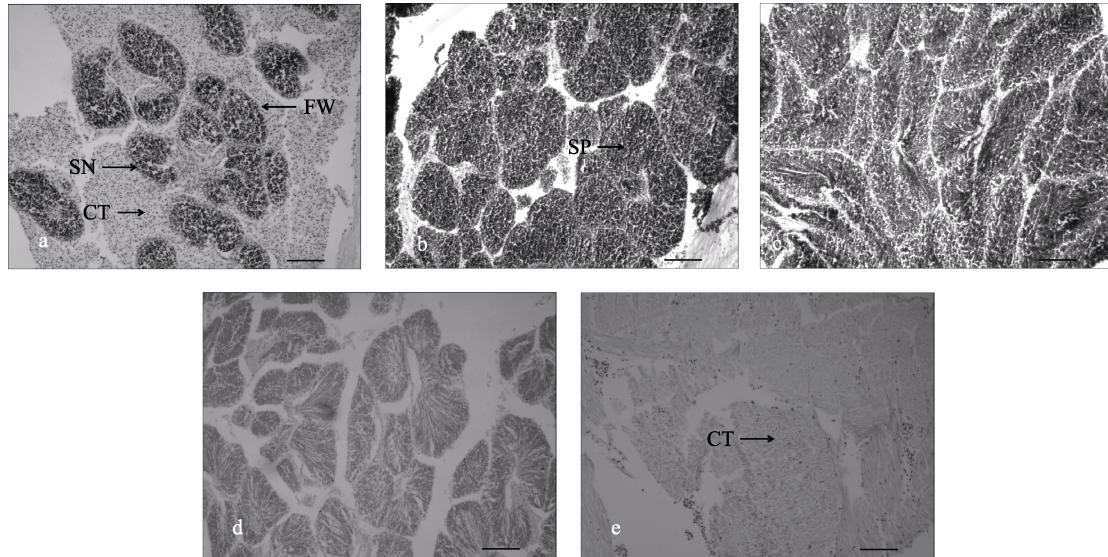


图 2 小刀蛭精巢不同发育期的组织切片(100×)

Fig.2 Histological changes in the testicle of *C. attenuates* at different developmental stage (100×)

a: 增殖期; b: 生长期; c: 成熟期; d: 排放期; e: 休止期

CT: 结缔组织; FW: 滤泡壁; SN: 精原细胞; SP: 成熟精子

a: Proliferation stage; b: Increasing stage; c: Maturation stage; d: Breeding stage; e: Suspensive stage

CT: Connective tissue; FW: Follicle wall; SN: Spermatogonia; SP: Sperm

育时间为 5 月-6 月上旬。

排放期: 由于成熟卵子和精子的大量排放, 滤泡腔内卵子和精子数量减少, 滤泡腔萎缩, 并出现大量空隙, 部分滤泡腔壁破裂。雌性滤泡腔内仍有部分卵母细胞和成熟卵子; 雄性滤泡腔内仍存在精母细胞和成熟精子(图 1-d 和图 2-d)。本阶段发育时间为 6 月中旬-7 月上旬。

休止期: 滤泡萎缩甚至消失, 结缔组织已占据整个性腺, 雌雄已无法分辨(图 1-e 和图 2-e)。本阶段发育时间为 7 月中旬-翌年 2 月。

2.3 小刀蛭胚胎及幼虫发育

小刀蛭受精卵为沉性卵, 在温度为 26℃、盐度 28 的条件下, 发育过程如表 1 所示。从表 1 可以看出, 受精卵经 3 h 45 min 进入囊胚期, 此时胚胎已可缓缓转动; 随后进入原肠期, 胚胎可小范围旋转涌动; 在 8 h 45 min 后发育至担轮幼虫; 24 h 后进入 D 形幼虫发育阶段; 2 d 后进入壳顶幼虫前期阶段; 在发育 8-9 d 后, 幼虫发育至壳顶后期。

3 讨论

小刀蛭的性腺发育周期与缢蛭(*Sinonovacula constricta*) (闫红伟等, 2009)、大竹蛭(*Solen grandis* Dunker) (肖国强等, 2009)、硬壳蛤(*Mercenaria*

表 1 小刀蛭的胚胎和幼虫发育

Tab.1 Developmental stages of embryo and larvae of *C. attenuatus*

发育时期 Developmental stages	发育时间 Developmental time
2 细胞 2-cell	40 min
4 细胞 4-cell	50 min
8 细胞 8-cell	1 h 10 min
16 细胞 16-cell	1 h 35 min
32 细胞 32-cell	1 h 55 min
桑葚期 Morula stage	2 h 50 min
囊胚期 Blastula stage	3 h 45 min
原肠期 Gastrula stage	5 h 15 min
担轮幼虫 Trochophore	8 h 45 min
D 形幼虫 D larva	24 h
壳顶前期 Pre-shell stage	2 d
壳顶后期 Post-shell stage	8-9 d

mercenaria) (林志华等, 2005)等埋栖型双壳贝类相似, 性腺的周年变化经历增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期 5 个时期。小刀蛭为雌雄异体贝类, 统计 240 只样品发现, 其雌雄比例约为 1 : 1。同时, 通过对性腺切片及形态学观察发现, 小刀蛭在莱州湾海域的繁殖时间为 6 月中旬-7 月上旬, 6 月中旬时性腺发育成熟, 滤泡腔内已充满成熟的卵子和精子, 已具备明显的排放特征; 在大潮发生后或海水环境发生

剧烈变化后(如降雨导致海水盐度降低等),小刀蛭受到刺激,大规模产卵。而在7月中旬取样后,小刀蛭足部呈透明状,切片观察仅有少量卵细胞残留,滤泡已逐步被结缔组织覆盖。王亚(2012)¹⁾对舟山地区小刀蛭性腺发育的研究中发现,舟山地区小刀蛭的繁殖季节为7-9月,且能分批排放,显示南方与北方小刀蛭繁殖习性的差异。白胡木吉力图等(2008)对青蛤(*Cyclina sinensis*)的研究中发现,青蛤在山东乳山湾的繁殖期为6-9月,而在福建漳浦县地区的繁殖期则在9-11月。不同海区,同种贝类存在不同的繁殖时间,可能是受到内源性因素(如种群基因差异)和外源性因素(如水温、饵料)等因素的共同影响。

本研究通过对小刀蛭性腺组织切片和形态学的观察,掌握了小刀蛭的繁殖规律,并初步开展了小刀蛭的人工育苗工作。6月初,采捕小刀蛭亲本进行暂养,在6月中旬时出现自然排放。观察幼虫发育过程发现,受精卵卵径为50-55 μm, D形幼虫壳长约90 μm、壳高约为60 μm,壳顶后期幼虫壳长约200 μm、壳高约170 μm。在10 d时,观察到少量幼虫面盘脱落,转入底栖生活,依靠足移动,进入匍匐幼虫阶段,之后单水管形成,进入附着稚贝时期。本研究的幼虫生长速度与王亚(2012)¹⁾的研究结果基本一致。

经过人工育苗实验,发现以下问题应予以重视:(1)小刀蛭外壳较脆弱,受到冲击或挤压易断裂而造成损伤,采集亲贝时需注意;(2)暂养过程中,应选择适宜的底质且要经常更换。本实验采用海泥作为底质,期间为避免底质板结或环境恶化,及时更换底质,小刀蛭成活率可达70%以上,效果较好;(3)采用阴干、流水和升温刺激相结合的方式,并未产生较好的催产效果。催产完成后继续培养,2 d后小刀蛭亲贝仍可继续排放。这些问题需在今后育苗工作中进一步探索。

实验观察发现,小刀蛭耐干露能力较强。在20℃室内温度条件下,干露12 h后放入水中仍可恢复活力;而在干露24 h后,其外壳张开,足伸出,刺激后仍有反应,但反应缓慢,放入水中无法恢复活力。明确小刀蛭的耐干露能力,对种贝的运输具有重要意义。

小刀蛭市场需求量不断增加,但其野生资源锐减,个体趋小。研究小刀蛭的性腺发育周期,解决苗种培育的关键问题,可为小刀蛭资源恢复和增殖奠定基础。

参 考 文 献

- Bai Hu-mu-ji-li-tu, Ma RH, Gao YM, *et al.* The gonadal development and reproductive cycle of clam *Cyclina sinensis* in coastal Dalian. *Journal of Dalian Ocean University*, 2008, 23(3): 196-199 [白胡木吉力图, 马汝河, 高悦勉, 等. 大连海区青蛤的性腺发育和生殖周期. 大连海洋大学学报, 2008, 23(3): 196-199]
- Chen LM, Kong XY, Yu ZN, *et al.* Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and COI gene fragments in three species of razor shell. *Marine Sciences*, 2005, 29(8): 27-32 [陈丽梅, 孔晓瑜, 喻子牛, 等. 3种蛭类线粒体16S rRNA和COI基因片段的序列比较及其系统学初步研究. 海洋科学, 2005, 29(8): 27-32]
- Gao AG, Chen QZ, Hu XG, *et al.* Ecological characteristics on macrobenthos of net-cage cultural areas in the Xiangshan Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005b, 4(27): 108-113 [高爱根, 陈全震, 胡锡钢, 等. 象山港网箱养鱼区大型底栖生物生态特征. 海洋学报, 2005b, 4(27): 108-113]
- Gao AG, Yang JY, Zeng JN. The shellfish distribution in Sanmen Bay, Zhejiang. *Marine Sciences*, 2005a, 29(8): 42-46 [高爱根, 杨俊毅, 曾江宁. 浙江三门湾贝类分布特征. 海洋科学, 2005a, 29(8): 42-46]
- Lin ZH, Shan LZ, Chai XL, *et al.* The reproductive biology of hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(5): 430-436 [林志华, 单乐洲, 柴雪良, 等. 硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)繁殖生物学研究. 海洋与湖沼, 2005, 36(5): 430-436]
- Meng XP, Zhang B, Mao SQ. Sequencing analysis on ITS2 Loci in five species of razor shell. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 182-185 [孟学平, 张波, 冒树泉. 五种不同蛭类ITS2核苷酸序列分析. 生物技术通报, 2008(3): 182-185]
- Wu B, Song JM, Li XG. Characteristics of benthic macroinvertebrate community structure and its coupling relationships with environment factors in Huanghe estuary. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(4): 62-72 [吴斌, 宋金明, 李学刚. 黄河口大型底栖动物群落结构特征及其与环境因子的耦合分析. 海洋学报, 2014, 36(4): 62-72]
- Xiao GQ, Chai XL, Shao YQ, *et al.* The reproductive biology of *Solen grandis* Dunker. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 21-25 [肖国强, 柴雪良, 邵艳卿, 等. 大竹蛭的繁殖生物学. 海洋科学, 2009, 33(10): 21-25]
- Xu FS. *The bivalvia mollusca in China seas*. Beijing: Science Press, 1997, 188 [徐凤山. 中国海双壳类软体动物. 北京: 科学出版社, 1997, 188]
- Xu JT, Xu GC, Xu XH, *et al.* Analysis of nutrition composition of edible parts of *Cultellus attenuatus* Dunker. *Food Science*,

1) Wang Y. Studies on development of gonads, embryos and youngs of *Phaxas attenuatus* (Bivalvia, Mollusca). Master's Thesis of Ningbo University, 2012 [王亚. 小刀蛭性腺、胚胎及幼体发育研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2012]

- 2013, 34(17): 263–267 [徐加涛, 徐国成, 许星鸿, 等. 小刀蛸软体部营养成分分析及评价. 食品科学, 2013, 34(17): 263–267]
- Yan HW, Li Q, Kong LF, *et al.* Reproductive cycle of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamark) along the coast of Shandong Province. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2009(S1): 343–346 [闫红伟, 李琪, 孔令锋, 等. 山东沿海缢蛸的繁殖生物学研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009(S1): 343–346]
- Zeng GQ, Fang J, Jia SJ, *et al.* Biochemical genetic analysis of eight isozymes in intra-populations of razor clam *Cultellus attenuates*. *Fisheries Science*, 2010, 29(11): 669–673 [曾国权, 方军, 贾守菊, 等. 小刀蛸群体内同工酶的生化遗传分析. 水产科学, 2010, 29(11): 669–673]

(编辑 冯小花)

The Reproductive Biology of *Cultellus attenuatus* in the Laizhou Bay

JIANG Xu¹, WEI Xiumei¹, FENG Yanwei¹, HAN Huizong¹,
WANG Sheng¹, LIU Xiangquan¹①, TONG Tong²

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 2. Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai 536000)

Abstract *Cultellus attenuatus* is a commercially valuable species that is widely distributed in the north and south coastal waters of China. In this study, we applied histological sectioning and experimental ecology methods to study the reproductive biology of *C. attenuatus* including the reproductive cycle, gonadal development, breeding season, embryonic development and larval development. Experimental subjects were collected from the Laizhou Bay of Shandong Province in the North China. *C. attenuatus* were sampled three times per month from May to July, and was sampled once a month in the rest months from April 2013 to March 2014. The results showed that *C. attenuatus* was dioecious, and that the sex could be identified with the colors of mature gonads that were white and yellow for the female and the male gonads respectively. The reproductive cycle of *C. attenuatus* was one year. The gonad of *C. attenuatus* was composed of the follicle, gonaduct and gonadial tube. The gonadal development could be divided into five stages, which were the proliferation stage in March, the increasing stage in April, the mature stage from May to early June, the breeding stage from mid-June to early July, and the suspension stage from mid-July to February of the next year. Its breeding season was between mid-June and early July when the water temperature was 22.0–26.6°C. The diameters of fertilized eggs were 50–55 μm. Hatching and the larval culture were conducted with aeration at a stable temperature and salinity. At 26°C and salinity 28, the D-shaped larvae were hatched in 24 hours to the size of 90 μm×60 μm. Since Day 10, the larvae began to settle down and developed into the post larvae, and metamorphosis was completed. It was found that the *C. attenuatus* had high tolerance to air exposure. No mortality occurred when the razor shells were exposed to air at 20°C for 12 h. Our study provided useful information for the artificial breeding of *C. attenuatus*.

Key words *Cultellus attenuates*; Reproductive biology; Gonadal development; Embryo and larvae development

① Corresponding author: LIU Xiangquan, E-mail: lxq6808@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20160720001

http://www.yykxjz.cn/

水流和光照条件对舌状蜈蚣藻 *Grateloupia livida* (Harv) Yamad 果孢子萌发生长的影响*

陈素文 张文文 郭永坚 朱长波 李俊伟 颌晓勇 陈利雄^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)



摘要 在不同水流和不同光照条件下, 分别对舌状蜈蚣藻 *Grateloupia livida* (Harv) Yamad 果孢子萌发情况展开研究, 以期为其苗种生产奠定基础。舌状蜈蚣藻果孢子在附着 1 d、15 d 后, 置于不同水流速度(0、1、1.5、4、7、10、14 cm/s; 1.5 cm/s 流速由充气控制, 其他流速由流水装置控制)培养 20 d; 舌状蜈蚣藻果孢子附着 1 d 后, 在不同光照周期(6L:18D、8L:16D、10L:14D、12L:12D、14L:10D、16L:8D)和不同光照强度(35、85、135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$)交叉条件下培养 70 d。结果显示, 附着 1 d 的果孢子萌发体在静止条件下的萌发生长明显优于其他水流速度下的($P<0.05$); 附着 15 d 的果孢子萌发体在 1.5 cm/s 流速下的萌发生长最好($P<0.05$), 在静止条件下的萌发生长明显慢于其他流速下的各组($P<0.05$)。光照周期和光照强度对果孢子萌发生长的影响显著($P<0.05$), 这二者对盘状体和孢苗生长的影响具有交互作用($P<0.05$), 对盘状体萌发出直立体的影响没有交互作用($P>0.05$)。光照时间为 8–10 h, 盘状体萌发直立体的百分率以及孢苗的高度明显高于其他光照时间下的各组。光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时, 盘状体萌发直立体的百分率以及孢苗的高度明显比其他光照强度下的高。研究表明, 在舌状蜈蚣藻育苗生产中, 可采取孢子刚附着时静水培养, 附苗后 15 d 充气培养, 并控制光照时间为 8–10 h 和光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 。

关键词 舌状蜈蚣藻果孢子; 萌发; 生长; 水流; 光照周期; 光照强度

中图分类号 S968.43+3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0112-07

舌状蜈蚣藻 *Grateloupia livida* (Harv) Yamad 属于红藻门(Rhodophyta)、隐丝藻目(Cryptonemiales)、海膜科(Halymeniaceae)、蜈蚣藻属(*Grateloupia* C. Agardh), 生长在高潮带附近的岩礁上或低潮带石沼中, 广泛分布于中国沿海、日本、韩国、越南和印度洋(夏邦美, 2004)。舌状蜈蚣藻在广东俗称“面条菜”, 可食用(Tseng, 1983), 具有同属其他藻类或海带(*Laminaria japonica*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)、紫菜(*Porphyra*)等海藻所无法媲美的脆韧口感, 是制作凉拌菜的绝佳食材。舌状蜈蚣藻也与同属其他藻类一样, 具有抗肿瘤、抗凝血、抗菌抗病毒、增强免疫

力等作用, 还可以作为染料和提取藻胶的工业原料(李卫东等, 2012; Jiang *et al*, 2013; Ye *et al*, 2015)。随着对舌状蜈蚣藻经济价值的深入认识, 人们对其养殖开发也越来越重视。为舌状蜈蚣藻苗种生产奠定基础, 李伟新等(1989)进行了舌状蜈蚣藻生殖器官的研究, 张丽娟(2000)进行舌状蜈蚣藻切段离体再生的研究, 宋志民等(2013)和陈伟洲等(2013)进行温度和光照强度对舌状蜈蚣藻果孢子分散与附着以及早期发育的影响研究。关于水流和光周期对舌状蜈蚣藻果孢子萌发生长的影响则未见报道。

水流直接或间接地影响大型海藻的生理、群落结

* 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2015YD03)资助[This work was supported by Basic Research Operation Fee Program of Research Institute of Chinese Commonweal Property of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (2015YD03)]. 陈素文, E-mail: chensuwen407@163.com

^① 通讯作者: 陈利雄, 副研究员, E-mail: cz_clx@163.com

收稿日期: 2016-07-20, 收修改稿日期: 2016-08-11

构, 是海藻产量的主要影响因素(Hurd, 2000)。研究表明, 海藻的光合速度和无机盐吸收速度等受水流速度的影响(Wheeler, 1980; Gerard, 1982; Gao, 1991; Hurd, 1996; 孟伟杰等, 2014), 水流对江蓠(*Gracilaria parvispora*)藻体的生长和孢子的萌发有显著影响(Ryder *et al.*, 2004)。自然海区中, 舌状蜈蚣藻多生长在海浪冲击度较强的区域, 水流对其孢子萌发生长的影响更是值得探究。

光照周期对很多种大型藻类生命周期的不同阶段和代谢过程产生影响(McKamey *et al.*, 2006; Sánchez-Romero *et al.*, 2012; Mansilla, 2014), 不同藻类在不同阶段对光照周期的要求不同, 短日照诱导巨藻(*Macrocystis pyrifera*)产生新叶, 长日照则促进叶片生长(王伟等, 1998); 较长时间的光照对褐藻(*Padina boergesenii*) (Vasuky *et al.*, 2001)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) (韦韬等, 2013)和蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*)丝状体的生长有促进作用(杨晋等, 2015)。光照周期对舌状蜈蚣藻孢子萌发会产生怎样的影响仍有待探索。

本文研究了不同水流条件、不同光照周期与光照强度交叉对舌状蜈蚣藻孢子萌发生长的影响, 为舌状蜈蚣藻苗种繁育提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验装置及材料

成熟舌状蜈蚣藻果孢子体采自广东深圳杨梅坑海域。采集的果孢子体清洗干净后放在白色水桶充气培养, 待水中果孢子达到 1000 ind./ml 以上时, 取果孢子水, 按照附着密度约 6 ind./mm² 的比例泼洒果孢子水到装有海水的方形水槽里(底部铺满载玻片作为附着器), 轻轻搅拌均匀。附着有果孢子的载玻片将用于实验。实验用水为经黑暗处理 5 d 以上的砂滤海水, 盐度为 32。

实验于 2015 年 3 月在中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地进行。用 LED 植物生长灯作为实验光源, 采用自行研制的流水装置(陈素文等, 2015b)和海藻光周期实验装置(陈素文等, 2015a)分别作为水流和光周期培养装置, 用空调控制室温为 18℃。用南京圣荣仪器设备有限公司生产的 LGY- II 型便携式流速测算仪测量水流速度。

1.2 实验设计

1.2.1 不同水流条件对果孢子萌发生长的影响 取采苗 1 d 后, 果孢子附着密度没有显著性差异的 51 张载玻片(平均附着密度为 5.35 ind./mm²)中的 45 张置于流水装置(图 1-A), 另外 6 张则分别置于

6 个 500 ml 烧杯中。流水装置设置 5 个水流速度(1、4、7、10、14 cm/s), 每一水流速度各设 3 个平行组, 每个平行组内有 3 张载玻片; 3 个烧杯进行微充气, 使底部水流速度均为 1.5 cm/s, 另外 3 个烧杯不充气(水流速度为 0)作为对照。

采苗后的载玻片培养 15 d 后(不充气、不流水), 取盘状体密度无显著性差异(盘状体平均密度为 2.62 ind./mm²)的 45 张载玻片放于流水装置中, 其余 6 张置于烧杯中, 水流速度的设置同前所述。

所有采苗载玻片的培养过程均采用光照强度为 65 μmol photons/m²·s, 光周期为 L : D = 12 : 12; 每隔 2 d 全换水 1 次。两组实验均进行 20 d 后测各组盘状体大小、萌发出直立体及存活数量并结束实验。

1.2.2 不同光照周期对果孢子萌发生长的影响 实验设置 6 个光照周期(6L : 18D、8L : 16D、10L : 14D、12L : 12D、14L : 10D、16L : 8D), 每个光照周期设置 3 个光照强度(35、85、135 μmol photons/m²·s)。

采苗 24 h 后的载玻片(孢子平均附着密度为 5.02 ind./mm²)放入 500 ml 烧杯中并置于不同光照周期和光照强度下(图 1-B)。每个光照条件下放 4 个烧杯作为平行组。培养期间, 控制水温为 18℃, 每 3 d 换水 1 次, 换水时清洗掉杂藻。实验进行 30 d 时, 测各组盘状体大小; 60 d 时, 测各组盘状体萌发出直立体的比例及存活盘状体数; 70 d 时, 测孢苗高度。

1.2.3 测定方法 在 10×10 倍显微镜下, 测盘状体大小和盘状体数, 每张载玻片随机测量 10 个盘状体的大小, 并随机统计 10 个视野中盘状体数和萌发出直立体的盘状体数。孢苗高度采用游标卡尺测量, 每张载玻片随机测量 10 株藻体的高度。

盘状体存活率 $R_t = P_0/P_t \times 100\%$;

直立体萌发率 $S_t = U_t/D_t \times 100\%$

式中, P_0 和 P_t 分别为实验开始时盘状体密度和实验进行 t 天时盘状体的密度; D_t 和 U_t 分别为实验进行 t 天所测 10 个视野中的盘状体总数和萌发出直立体的盘状体数。

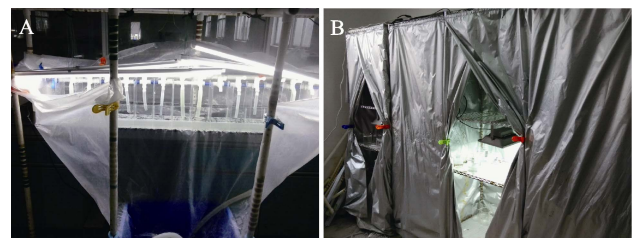


图 1 流水实验装置(A)和光周期实验装置(B)
Fig.1 The equipment for water velocity control (A) and photo period control (B)

1.3 数据处理

流水实验的数据采用软件 SPSS 21.0 中的单因素方差分析(One-way ANOVA), 用 Duncan 进行组间差异显著性($P<0.05$)的多重比较。光周期实验的数据则采用软件 SPSS 21.0 中的一般线性模型单变量进行双因素分析, 用 Student-Newman-Keuls 进行组间差异显著性($P<0.05$)多重比较。光周期实验的数据进行分析时, 一定光照周期下的 3 个不同光照强度实验组是视作该光照周期条件下的同一个组来进行比较, 一定光照强度下的 6 个不同光照周期实验组是视作该光照强度条件下的一个组来进行比较, 故光周期实验分析结果的组间差异显著性是这种含义的组间比较结果, 并非指各实验组之间的比较结果(这也是结果图中不标示各实验组之间差异显著性的原因)。所得数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

2 结果

2.1 不同水流条件对附着果孢子的影响

附着 1 d 后的果孢子在不同水流条件下培养 20 d, 对照组(水流速度为 0)的盘状体规格显著高于其他水流速度下的处理组; 充气培养水流速度为 1.5 cm/s 的处理组中, 盘状体的存活率最高; 流水装置中水流速度最大的组, 盘状体大小及存活率显著低于其他组(图 2)。

2.2 不同水流条件对盘状体的影响

孢子附着 15 d 后发育成的盘状体在不同水流条件下培养 20 d, 充气培养(水流速度为 1.5 cm/s)组中, 盘状体大小和直立体萌发率明显最大; 对照组和其他水流速度组之间, 盘状体大小没有显著性差异, 对照组的直立体萌发率明显最小; 各组之间盘状体的存活率没有显著性差异(图 3)。

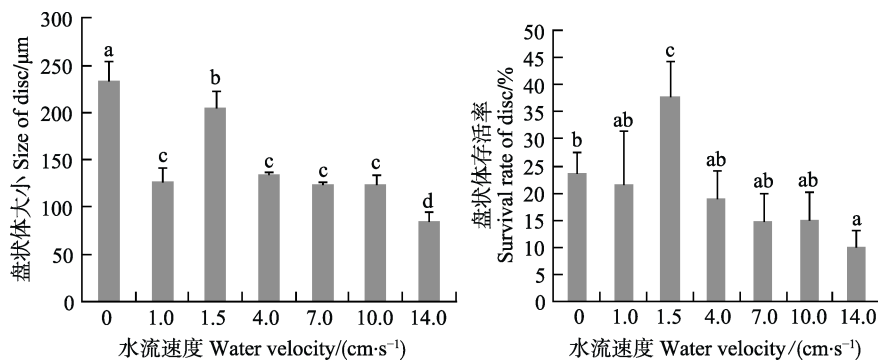


图 2 附着 1 d 的果孢子培养于不同流速下所形成盘状体的大小及存活率

Fig.2 The sizes and the survival rates of *G. livida* discs of which the carpospores were incubated under different water velocity after attaching for 1 d

不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同 Different letters indicated significant differences ($P<0.05$), the same as below

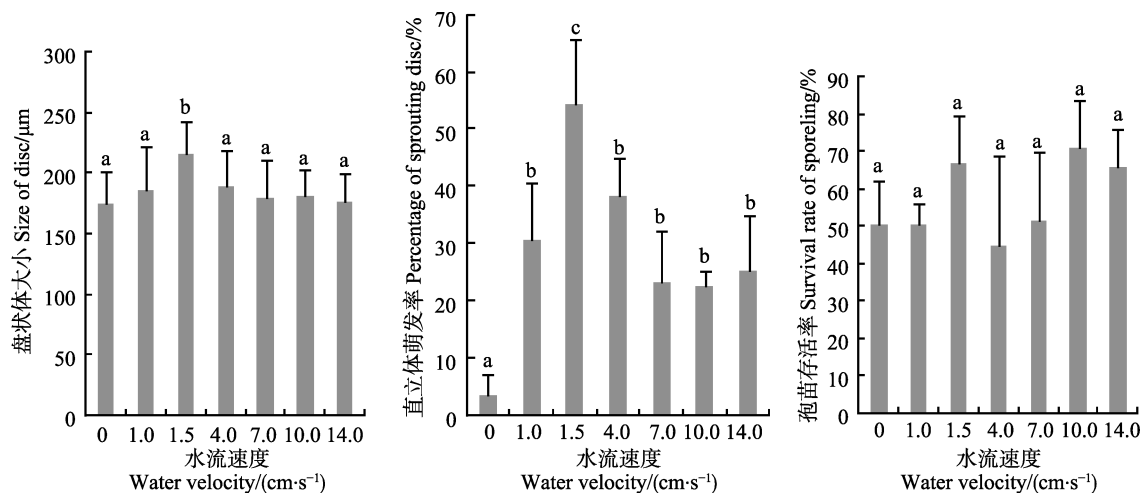


图 3 孢子附着 15 d 形成的盘状体培养于不同流速下的大小、直立体萌发率及存活率

Fig.3 The sizes and percentage of sprouting disc and the survival rates of *G. livida* discs of which the carpospores were incubated under different water velocity after attaching for 15 d

2.3 光照周期对果孢子萌发生长的影响

舌状蜈蚣藻附着果孢子在不同光照周期和光照强度下培养 30 d。结果显示,光照周期和光照强度对盘状体的生长都具有显著性影响($P < 0.05$),且二者具有交互作用($P < 0.05$)。在每天 6–10 h 的光照时长范围内,随着光照时间的增加,各光照强度下盘状体的生长都呈上升趋势,光照时间超过 10 h 时,各光照强度下盘状体的生长都呈平稳下降趋势(图 4-a)。多重比较的分析结果显示,光照时间为 10 h 的(10L:14D),盘状体明显最大;光照时间为 6 h 的处理组,盘状体明显最小,其他光照时间处理组,盘状体的大小没有显著差异;光照强度为 135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,盘状体规格显著小于光照强度为 35、85 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,后二者之间无显著性差异。

舌状蜈蚣藻附着果孢子在不同光照周期和光照强度下培养 60 d。结果显示,光照周期和光照强度对盘状体萌发出直立体的影响都具有显著性($P < 0.05$),但二者没有交互作用($P > 0.05$)。光照时间为 8–10 h,直立体萌发率没有显著性差异,这 2 个光照时间下直立体的萌发率明显比光照时间为 6、14 和 16 h 的高;光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,直立体萌发率明显比光照强度为 85、135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 的组高(图 4-b)。

舌状蜈蚣藻附着孢子在不同光照周期和光照强度下培养 60 d。结果显示,光照周期和光照强度对盘

状体存活率的都没有显著性影响($P > 0.05$),且二者没有交互作用($P > 0.05$)(图 4-c)。

舌状蜈蚣藻附着果孢子在不同光照周期和光照强度下培养 70 d。结果显示,光照周期和光照强度对直立体生长都具有显著性影响($P < 0.05$),且二者具有交互作用($P < 0.05$)。在光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,直立体高度最高值出现在光照时间为 10 h 的处理组;在光照强度为 85、135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,直立体高度最高值出现在光照时间为 8 h 的处理组(图 4-d)。多重比较的分析表明,光照时间为 8、10 h,直立体高度明显最高,而这 2 个光照时间之间的直立体高度差异不显著,其他光照时间之间的直立体高度差异不显著。在光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时,直立体高度明显比光照强度为 85、135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 条件下的高,后二者之间没有显著性差异。

3 讨论

海带配子体克隆育苗生产中,流水速度和洗刷压力是幼苗培育技术中的关键因素,采取附苗后静水 24 h 后微流水(表层流速 5 cm/s 以下)、72 h 后正常流水(张培玉等,2005)。实验表明,附着 1 d 的舌状蜈蚣藻果孢子在不同水流速度下培养 20 d,水流速度为 0 的生长最快;而对于果孢子附着 15 d 后萌发形成的盘状体来说,水流速度为 0 条件下,直立体的萌发率最低,此结果与海带配子体幼苗培育技术略有不同。

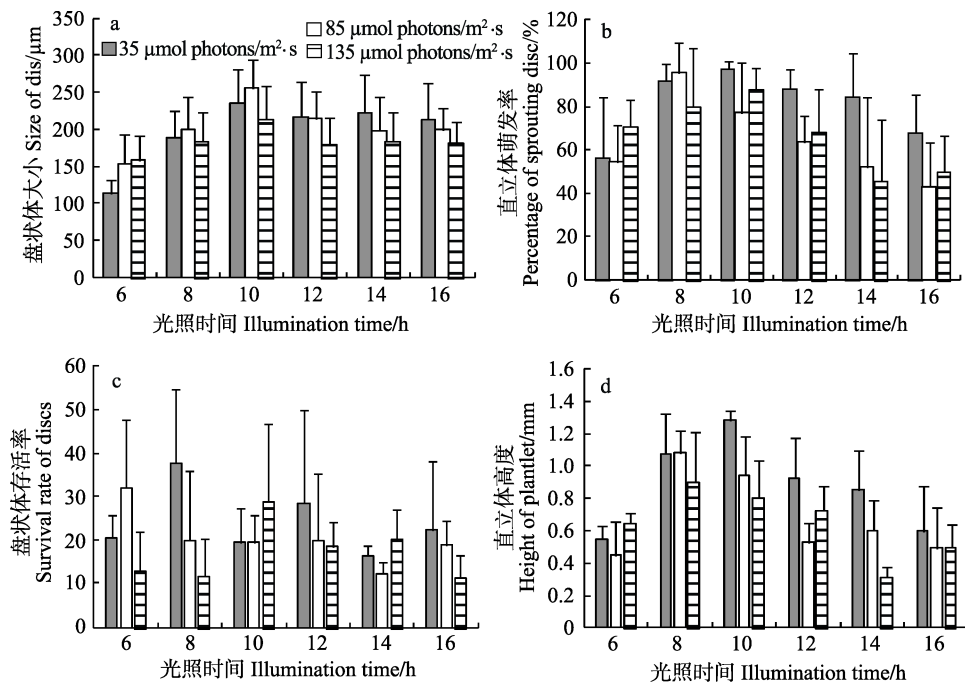


图 4 不同光照周期和光照强度下舌状蜈蚣藻盘状体的大小、直立体萌发率、盘状体存活率和直立体高度
Fig.4 The sizes of disc, the percentage of sprouting disc, the survival rates of disc and the heights of plantlet of *G. livida* carpospores incubated under different photo periods and light intensities

舌状蜈蚣藻育苗生产中,可采取附苗后静水培养,附苗后 15 d 再进行充气流水培养。

实验采用的流水装置所形成的流水方式类似于海带夏苗培育过程中的流水方式(水在阶梯式育苗池中循环),实验表明,这种方式的流水与充气方式的流水对舌状蜈蚣藻孢子萌发的影响不同,虽然没有设置完全相同的流速来证明这二者是因形成水流的方式不同而影响不同,但在流速接近时(流水装置的流速为 1 cm/s 和充气的为 1.5 cm/s),二者对孢子萌发生长的影响差异也很明显,说明形成水流的方式不同所造成的影响也不同。充气能促进藻类利用水体中主要无机碳源 HCO_3^- ,提高藻类光合作用能力(Zou, 2005; 韩婷婷等, 2013),这可能是舌状蜈蚣藻孢苗培养过程中,采用充气培养比单纯的流水培养更有利于孢子萌发生长的原因。

江蓠孢子培养于不同水流速度下(充气形成 0–6.5 cm/s 流速),水流速度为 6.5 cm/s,孢子的萌发最好(Ryder, 2004)。实验表明,舌状蜈蚣藻在充气水流速度为 1.5 cm/s 条件下的萌发状况最佳。因实验所设置的充气水流单一,故是否有更合适的充气水流速度有待于进一步研究。

大部分关于光照对海藻萌发生长影响的研究都侧重于光照强度的影响,往往把光照周期设为 12L : 12D (Chen *et al.*, 2011; 陈伟洲等, 2013、2014; 陈佩等, 2015)。而在对海萝(*Gloiopeltis*)的深入研究中发现,光周期对海萝孢子萌发的影响程度不亚于光照强度的影响(未发表)。因此,在对舌状蜈蚣藻进行研究时,也将关注点落到光周期上。实验表明,光照周期明显影响了舌状蜈蚣藻孢子的萌发和生长,最合适的光照周期为 8L : 16D 和 10L : 14D。在进行蜈蚣藻孢子育苗生产中,可通过遮光来控制光照时间。

陈伟洲等(2013)的研究表明,在舌状蜈蚣藻盘状体发育过程中,较高光强(5000–10000 lx)可以促进盘状体的生长发育;低光强(500 lx)培养条件显著抑制了盘状体的生长发育;光照强度为 2500 lx 时,盘状体的生长次于 5000 lx 和 10000 lx。本研究则表明,舌状蜈蚣藻在光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ (约 3000 lx)比在光照强度为 85 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ (约 7000 lx)和 135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时更有利于盘状体的萌发生长。这可能是由于在本研究结果的处理中,将一定光照强度下的 6 个不同光照周期实验组当成该光照强度条件下的 1 个组,来进行不同光照强度组之间的比较,而陈伟洲等的实验则是单一进行光照周期 12L : 12D 下不同光照强度之间的比较。即将光照

周期的作用考虑进去,所得出的结果就会不同。

实验结果显示,舌状蜈蚣藻附着果孢子在不同光照周期和光照强度下培养 30 d,盘状体的生长在光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时与在光照强度为 85 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时的差异不显著,而培养到 60、70 d,则在光照强度为 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时比在光照强度为 85 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 时直立体的萌发率较高,孢苗的生长更快。说明舌状蜈蚣藻盘状体后期的萌发生长更需要相对较弱的光,在育苗生产中可据此进行光照强度的调节。

参 考 文 献

- Chen P, Huang ZJ, Zhu JY, *et al.* Effect of environmental factor on conchospore releasing, attachment and germination in *Pyropia dentata*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(1): 55–61 [陈佩, 黄中坚, 朱建一, 等. 环境条件对长紫菜壳孢子放散、附着和萌发的影响. *南方水产科学*, 2015, 11(1): 55–61]
- Chen SW, Chen LX, Zhang WW, *et al.* Device for be used for experiment of marine alga photoperiod: China, ZL2015202-16205.3, 2015a [陈素文, 陈利雄, 张文文, 等. 一种用于海藻光周期实验的装置. 专利号: ZL201520216205.3, 2015a]
- Chen SW, Guo YJ, Chen LX, *et al.* Experimental facility and experimental method for researching influences of water flow to attachment, germination and growth of alga spores: China, ZL201520228848.X, 2015b [陈素文, 郭永坚, 陈利雄, 等. 用于研究水流对海藻孢子附着、萌发生长影响的实验装置. 专利号: ZL201520228848.X, 2015b]
- Chen SW, Wu JF, Chen LX, *et al.* Effects of light and temperature on the attachment and development of *Gloiopeltis tenax* and *Gloiopeltis furcata* tetraspores. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23 (6): 1045–1051
- Chen WZ, Song ZM, Huang ZJ. Effects of temperature and irradiance on early development of *Grateloupia livida*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(6): 14–19 [陈伟洲, 宋志民, 黄中坚. 温度、光照强度对舌状蜈蚣藻早期发育的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(6): 14–19]
- Chen WZ, Zhong ZH, Jin YL, *et al.* Effects of light intensity, temperature and salinity on growth and biochemical constituents of *Hypnea cervicornis*. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(2): 48–53 [陈伟洲, 钟志海, 金玉林, 等. 光照强度、温度和盐度对鹿角沙菜生长及生化组分的影响. *南方水产科学*, 2014, 10(2): 48–53]
- Gao K. Effects of seawater current speed on the photosynthetic oxygen evolution of *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta). *Japanese Journal of Phycology*, 1991, 39: 291–293 (in Japanese)
- Gerard VA. *In situ* water motion and nutrient uptake by the giant

- kelp *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology*, 1982, 69(1): 51–54
- Han TT, Fang JG, Zhang JH, *et al.* Effect of light intensity on the photosynthetic responses of *Gracilaria lemaneiformis* in non-aerated and aerated cultures. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1801–1806 [韩婷婷, 方建光, 张继红, 等. 静止和充气培养条件下光强对龙须菜光合生理效应的影响. *水产学报*, 2013, 37(12): 1801–1806]
- Hurd CL, Harrison PJ, Druehl LD. Effect of seawater velocity on inorganic nitrogen uptake by morphologically distinct forms of *Macrocystis integrifolia* from wave-sheltered and exposed sites. *Marine Biology*, 1996, 126(2): 205–214
- Hurd CL. Water motion, marine macroalgal physiology, and production. *Journal of Phycology*, 2000, 36(3): 453–472
- Jiang Z, Chen Y, Yao F, *et al.* Antioxidant, antibacterial and antischistosomal activities of extracts from *Grateloupia livida* (Harv.). *PLoS One*, 2013, 8(11): e80413
- Li WD, Wu X, Jiang D, *et al.* Prospect of application and artificial culture of *Grateloupia*. *Hebei Fisheries*, 2012(11): 48–54 [李卫东, 吴茜, 蒋丹, 等. 蜈蚣藻属海藻的应用及人工养殖前景展望. *河北渔业*, 2012(11): 48–54]
- Li WX, Ding ZF, Chen SF, *et al.* A study on the reproductive organs of *Grateloupia livida*. *Journal of Zhanjiang Fisheries College*, 1989, 9(1–2): 110–115 [李伟新, 丁镇芬, 陈少凡, 等. 舌状蜈蚣藻 *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada 生殖器官的研究. *湛江水产学院学报*, 1989, 9(1–2): 110–115]
- Mansilla A, Rosenfeld S, Rendoll J, *et al.* Tolerance response of *Lessonia flavicans* from the sub-Antarctic ecoregion of Magallanes under controlled environmental conditions. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(5): 1971–1977
- McKamey KA, Amsler CD. Effects of temperature and light on growth of the Antarctic algae *Geminocarpus geminatus* (Ectocarpales: Phaeophyceae) and *Cladophora repens* (Cladophorales: Cladophorophyceae) in culture. *Phycologia*, 2006, 45(2): 225–232
- Meng WJ, Wang P, Gui FK, *et al.* Nutrient uptakes by *Ishige foliaceoakamurai* and *Sargassum fusiforme* differ in algal section and mass, carbon concentration, and water flow. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 663–668 [孟伟杰, 王萍, 桂福坤, 等. 藻体部位、藻质量、碳源、水流对铁钉菜和羊栖菜营养盐吸收的影响. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 663–668]
- Ryder E, Nelson SG, McKeon C, *et al.* Effect of water motion on the cultivation of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) on Molokai, Hawaii. *Aquaculture*, 2004, 238(1–4): 207–219
- Sánchez-Romero A, Miranda-Baeza A, López-Elías JA, *et al.* Effect of light regime on the N-ammonium removal by the red algae *Gracilaria vermiculophylla*. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2012, 4(5): 613–618
- Song ZM, Chen WZ, Liu T. Effect of temperature, irradiance and salinity on the release and attachment of carpospore of *Grateloupia livida*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2013(1): 90–96 [宋志民, 陈伟洲, 刘涛. 温度、光强和盐度对舌状蜈蚣藻果孢子放散与附着的影响. *海洋湖沼通报*, 2013(1): 90–96]
- Tseng CK. *Common seaweeds of China*. Beijing: Science Press, 1983, 94
- Vasuky S, Ganesan M, Rao PVS. Effect of light intensity, photoperiod, ESP medium and nitrogen sources on growth of marine brown alga *Padina boergesenii* (Dictyotales, Phaeophyta). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2001, 30(4): 228–231
- Wang W, Lin JM, Jin DX. Photocontrol of development in algae. *Chinese Bulletin of Botany*, 1998, 15(5): 31–39 [王伟, 林均民, 金德祥. 藻类的光控发育. *植物学通报*, 1998, 15(5): 31–39]
- Wei T, Gu WH, Li J, *et al.* Effect of photoperiod on microalgae *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Bulletin of Botany*, 2013, 48(2): 168–173 [韦韬, 顾文辉, 李健, 等. 雨生红球藻的光周期效应. *植物学报*, 2013, 48(2): 168–173]
- Wheeler WN. Effect of boundary layer transport on the fixation of carbon by the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology*, 1980, 56(2): 103–110
- Xia BM. *Flora algarum marinarum sinicarum, Tomus II Rhodophyta, No. III*. Beijing, Science Press, 2004, 118–122 [夏邦美. *中国海藻志·第二卷·红藻门·第三册*. 北京: 科学出版社, 2004, 118–122]
- Yang J, Luo QJ, Qiu CG, *et al.* Effects of temperature, salinity and light on growth of *Grateloupia filicina* filament. *Journal of Biology*, 2015, 32(2): 65–69 [杨晋, 骆其君, 邱成功, 等. 温度、盐度、光照对蜈蚣藻丝状体生长的影响. *生物学杂志*, 2015, 32(2): 65–69]
- Ye DY, Jiang ZB, Zheng FC, *et al.* Optimized extraction of polysaccharides from *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada and biological activities. *Molecules*, 2015, 20(9): 16817–16832
- Zhang LJ. Initial study on the isolated regeneration of the fragments of *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2000, 5(3): 35–39 [张丽娟. 舌状蜈蚣藻切段离体再生的初步研究. *集美大学学报(自然科学版)*, 2000, 5(3): 35–39]
- Zhang PY, Zhang QS, Tang XX, *et al.* Seedling culture techniques for producing kelp gametophyte clone. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11(5): 545–548 [张培玉, 张全胜, 唐学玺, 等. 海带配子体克隆育苗生产中幼苗培育技术的研究. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(5): 545–548]
- Zou DH. Effects of elevated atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). *Aquaculture*, 2005, 250(3–4): 726–735

Effect of Water Velocity and Light on the Growth and Development of *Grateloupia livida* (Harv) Yamad Carpospores

CHEN Suwen, ZHANG Wenwen, GUO Yongjian, ZHU Changbo,
LI Junwei, XIE Xiaoyong, CHEN Lixiong^①

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

Abstract *Grateloupia livida* (Harv) Yamad is a red seaweed that has high economic value. In recent years, research on the seed production of *G. livida* has gained more and more attention. To further understand the progress of seed production, we studied the effects of water velocity and light on the growth and development of *G. livida* carpospores under the laboratory conditions. *G. livida* carpospores that attached for 1 d and 15 d were incubated in the water with different velocities (0, 1, 1.5, 4, 7, 10, 14 cm/s) for 20 d. The 0 cm/s group was the control group (without any water flow or under non-aerated condition). Except that the 1.5 cm/s group was controlled by aeration, all other groups were controlled by the water flow equipment. *G. livida* carpospores that attached for 1 d were incubated with different light intensity (35, 85, 135 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$) at different photo periods (6L:18D, 8L:16D, 10L:14D, 12L:12D, 14L:10D and 16L:8D) for 70 d. The results were described as follows: *G. livida* carpospores that attached for 1 d developed faster in the 0 cm/s group than in the other water velocity groups ($P<0.05$). The carpospores that attached for 15 d had grown and developed more slowly in the 0 cm/s group than in any other water velocity groups, and the optimum water velocity was 1.5 cm/s ($P<0.05$). The photo period and light intensity had a significant effect on the growth and development of *G. livida* carpospores and had interactive effects on the growth of the disc and plantlet ($P<0.05$). The optimum light condition for *G. livida* carpospores was 8L:16D and 10L:14D as the photo period and 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ as the light intensity. We recommended that the released carpospores of *G. livida* should be incubated in the still water for 15 d and then in the water with a velocity of 1.5 cm/s (by aeration) under the light intensity of 35 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ and photo period of 8L:16D or 10L:14D.

Key words *Grateloupia livida* (Harv) Yamad carpospores; Development; Growth; Water motion; Photoperiod; Light intensity

① Corresponding author: CHEN Lixiong, E-mail: cz_clx@163.com

碳氮营养和培养条件对芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) A4 生长的影响*



李莎莎¹ 曹煜成^{1,2} 李卓佳^{2,3} 胡晓娟^{2,4} 徐煜²
徐武杰² 杨铿² 苏浩昌² 文国樑^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所
广东省渔业生态环境重点实验室 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;
3. 南海生物资源开发与利用协同创新中心 广州 510275; 4. 中国水产科学研究院南海水产研
究所热带水产研究开发中心 三亚 572018)

摘要 芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) A4 是一株具有溶甲藻能力的菌株, 为探究营养条件与培养条件对 A4 生长的影响, 明确在多因素共同作用下菌株的生长特性, 先以单因素方法比较不同碳、氮营养因子对其生长的影响, 再以 Plackett-Burman 方法综合比较碳源、氮源、pH、接种菌量、温度、转速、装液量等因子对其生长的协同影响效应。结果显示, A4 菌对有机碳源玉米浆和有机氮源大豆蛋白利用效果最好, 培养 24 h 后菌量分别达到 3.58×10^8 、 3.19×10^8 CFU/ml。各因子的重要性排序依次为大豆蛋白、温度、玉米浆、转速、接种菌量、pH、装液量, 且大豆蛋白和温度对 A4 菌的生长影响显著($P < 0.05$)。研究表明, 培养条件对菌株生长调控也有重要意义, 在评估相关因素对菌株生长或生态功能的影响时, 须将营养条件和培养条件协同分析。

关键词 芽孢杆菌; 碳源; 氮源; 培养条件

中图分类号 Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0119-08

池塘中有害甲藻频繁暴发, 对养殖水产动物的健康生长造成严重威胁(周进等, 2014; 龚良玉等, 2010; 程玲等, 2016)。目前, 防控有害甲藻暴发主要通过向水体中投入 CuSO_4 、 KMnO_4 和漂白粉等化学药物抑制或杀灭有害甲藻(刘征宇等, 2016; 李京等, 2009; Kuzminov *et al.*, 2013)。该方式虽操作简单、起效快, 但易造成二次污染, 不利于水体生态环境的恢复(骆灵喜等, 2015)。随着生态系统稳定性和生物安全等问题日益受

到重视, 生态法控藻逐渐成为新趋势, 其中, 溶藻菌更是生物控藻领域的一个研究热点(王寿兵等, 2016)。

溶藻菌是指能够通过直接或间接方式抑制藻类生长或杀死藻类、溶解藻细胞的细菌(Lupette *et al.*, 2016)。已发现的溶藻菌属主要有芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)(Hou *et al.*, 2016)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)(陈庆丽等, 2015)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)(Cai *et al.*, 2011)、红细菌属(*Rhodobacte-*

* 广东省海洋渔业科技发展专项(A201401B03)、海南省自然科学基金(20163148)、现代农业(虾蟹)产业技术体系专项(CARS-48)、国家自然科学基金项目(41501529)、广东省科技计划(2014B040404056)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2015TS24)共同资助[This work was supported by Development Planning Project on Fishery Science and Technology of Guangdong Province(A201401B03), Natural Science Foundation of Hainan Province (20163148), China Agriculture Research System (CARS-48), National Natural Science Foundation of China (41501529), Science and Technology Project of Guangzhou Province (2014B040404056), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2015TS24)]. 李莎莎, E-mail: lisa99889988@163.com

① 通讯作者: 文国樑, 副研究员, E-mail: guowen66@163.com

收稿日期: 2016-09-23, 收修改稿日期: 2016-11-14

raceae sp.)(Chen *et al.*, 2014)、海杆菌属(*Marinobacter* sp.)(郗建云等, 2016)等。在自然水环境中存在可溶解有害甲藻的藻际溶藻菌,但其物种数量有限,群落结构简单,菌体生物量相对较低(Grossart *et al.*, 2005),加之当环境营养和生态条件改变时,菌-藻动态失衡,有害甲藻易在短时间内暴发成为优势种,致使菌群结构发生改变,有效溶藻菌浓度降低,其溶藻效应受到抑制(史荣君等, 2013; 李东等, 2013)。因此,设法强化溶藻菌的生态优势、提高有效溶藻菌浓度、维护菌藻间的生态平衡是有效防控甲藻暴发的重要途径之一。Yang 等(2013)和苗祯等(2015)指出,菌群结构的改变往往体现在能源物质利用效能的变化。溶藻菌的能源物质来源主要为碳、氮营养物质(张俊等, 2010)。另外,能对菌群结构产生影响的还包括温度、溶氧、pH 值等生态因素。王金霞等(2012)分析了环境因子对溶藻菌 S7 的影响,指出在不同环境因素下,菌-藻动态平衡会发生不同的变动,进而造成微藻暴发式增长或溶藻菌抑藻的不同结果。因此,科学探究营养和生态因子对溶藻菌生长的影响,对调控和促进溶藻菌生物量的增长,强化其溶藻效应具有重要意义。

目前的研究大多只是以单因素实验方法分析营养或生态因子对溶藻菌的影响(赵鹏超等, 2012; 张家顺等, 2015),该法虽然操作简单,但不能进行横向比较,无法判断出主效因素。Plackett-Burman 实验是一种能估计出各个因素的效应值并筛选出显著影响因素的实验方法。该方法不仅实验次数少、实验结果精确,而且可以横向比较各因素的效应值(Maneeboon *et al.*, 2010)。在自然生态环境中,营养和生态因素于同一时空维度对溶藻菌产生协同影响(谢风行等, 2013; 费聿涛等, 2016; 魏南等, 2016)。为此,本研究选择一株具有良好甲藻溶藻专一性的芽孢杆菌 A4,在分析不同碳源和氮源对菌株生长影响的基础上,再以 Plackett-Burman 方法综合比较碳、氮、pH、接种菌量、温度、转速、装液量等因子对菌株生长的协同影响,明确在多因素共同作用下各因素对菌株生长影响的贡献,为进一步优化芽孢杆菌 A4 的培养条件及菌剂研发与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

芽孢杆菌 A4 由中国水产科学研究院南海水产研

究所提供,该菌株从甲藻暴发海域的滩涂池塘中分离获得,具有良好的甲藻溶藻专一性,能高效溶解锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、楯形多甲藻(*Peridinium umbonatum*)等有害甲藻,而对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、条纹小环藻(*Cyclotella striata*)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)等有益微藻无不良影响(郗建云, 2016)¹⁾。

1.2 培养基

基础培养基:葡萄糖 10.00 g/L,蛋白胨 3.00 g/L, NaCl 1.00 g/L, KH₂PO₄ 0.20 g/L, MgSO₄ 0.20 g/L, MnSO₄ 0.03 g/L, CaCl₂ 0.10 g/L。参考杨莺莺等(2005)和 Rao 等(2007)的方法配制。种子培养基为营养肉汤培养基,培养平板为营养琼脂培养基。

1.3 种子液的制备

取斜面菌种,接种至种子培养基,200 r/min 30℃ 恒温摇床振荡培养 12 h。

1.4 不同碳源、氮源对菌株生长的影响

碳源分别用蔗糖(Su)、葡萄糖-蔗糖(G-Su)、可溶性淀粉(St)、糖蜜(M)、玉米浆(C)、麸皮-糖蜜(B-M)及可溶性淀粉-玉米浆(St-C)等量替代基础培养基中的葡萄糖(G),配制成不同碳源的培养基。氮源分别用酵母膏(Y)、蛋白胨-酵母膏(P-Y)、硫酸铵(A)、豆粕(Sm)、大豆蛋白(Sp)及豆粕-大豆蛋白(Sm-Sp)等量替代基础培养基中的氮源蛋白胨(P),配制成不同氮源的培养基。将 A4 菌种子液以 1% 的量分别接种至不同的培养基,30℃、200 r/min 摇床培养 24 h,以平板计数法测定菌浓度(沈萍等, 1996),分析不同碳源和氮源对 A4 菌生长的影响。

1.5 影响菌株生长的多因素分析

根据 1.4 的测定结果,参考 Venil 等(2015)的方法,以 Plackett-Burman 实验设计法,选取玉米浆、大豆蛋白、pH、接种菌量、温度、转速、装液量 7 个因子作为测试变量。各变量分别取高、低值 2 个水平,测试次数设定为 12,并增设 4 个虚拟变量以减少系统误差(表 1)。再以菌浓度作为响应值对比分析以上各因子对 A4 菌生长影响的贡献。

1.6 数据分析

以单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较各因

1) Xi JY. Algicidal effects of algicidal bacteria against dinoflagellate from shrimp ponds. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 37 [郗建云. 虾池甲藻溶藻细菌的溶藻特性分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 37]

表 1 Plackett-Burman 实验设计的因素及水平编码
Tab.1 Factors and levels designed by Plackett-Burman method

序号 Number	因素 Factors	水平 Level	
		-1	1
X ₁	玉米浆 Corn steep liquor(g/L)	10.0	20.0
X ₂	大豆蛋白 Soybean protein(g/L)	3.0	6.0
X ₃	pH 值 pH value	7.0	8.0
X ₄	温度 Temperature(°C)	15.0	30.0
X ₅	转速 Rotation speed(r/min)	150.0	225.0
X ₆	接种菌量 Inoculation amount(%)	1.0	3.0
	装液量 Liquid volume in flask(%)	40.0	60.0

素的差异性,显著性水平设定为 $P < 0.05$; 通过 Design-Expert(8.0.6.1)软件对 Plackett-Burman 实验结果进行方差分析,比较各因素贡献率。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株生长的影响

不同碳源的培养基中, A4 菌的终菌量依次为玉米浆组(C) > 麸皮-糖蜜组(B-M) > 可溶性淀粉-玉米浆组(St-C) > 糖蜜组(M) > 可溶性淀粉组(St) > 葡萄糖-蔗糖组(G-Su) > 蔗糖组(Su) > 葡萄糖组(G)。单因素方差分析结果显示,不同碳源对 A4 菌生长的影响有显著差异(图 1)。其中,玉米浆组(C)菌浓度最高(3.58×10^8 CFU/ml),与麸皮-糖蜜组(B-M)差异不显著($P > 0.05$),但显著高于其他碳源实验组($P < 0.05$)。因玉米浆(C)组的菌量最佳,将其作为培养基碳源进行后续研究。

2.2 不同氮源对菌株生长的影响

不同氮源培养基中, A4 菌的终菌量依次为大豆蛋白组(Sp) > 豆粕-大豆蛋白组(Sm-Sp) > 豆粕组(Sm) > 蛋白胨组(P) > 酵母膏组(Y) > 蛋白胨-酵母膏组(P-Y) > 硫酸铵组(A)(图 2)。单因素方差分析结果显示,不同氮源菌株的生长状况不同。其中,大豆蛋白组(Sp)和豆粕-大豆蛋白组(Sm-Sp)的菌量差异不显著($P > 0.05$),但显著高于其他实验组($P < 0.05$),分别达到 3.19×10^8 、 1.85×10^8 CFU/ml。因大豆蛋白组(Sp)的菌量最佳,将其作为培养基氮源进行后续研究。

2.3 影响菌株生长的多因素分析

根据 Plackett-Burman 实验结果建立多元拟合方程,分析各因素对 A4 菌的影响贡献,数学模型方程如下:

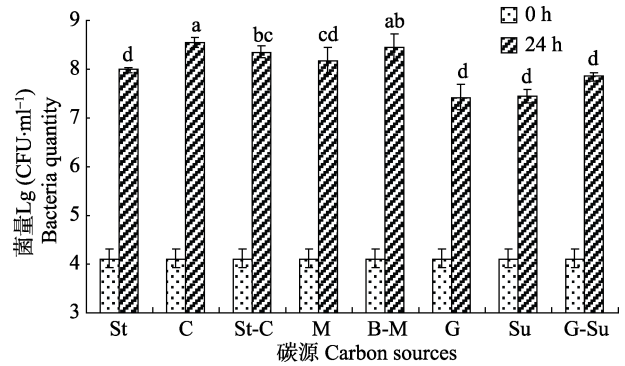


图 1 不同碳源条件下 A4 菌的菌量
Fig.1 Quantity of *Bacillus* A4 cultured with different carbon sources

字母完全相同或部分相同表示差异不显著($P > 0.05$),反之表示差异显著($P < 0.05$);后图同此。St: 可溶性淀粉; C: 玉米浆; St-C: 可溶性淀粉-玉米浆; M: 糖蜜; B-M: 麸皮-糖蜜; G: 葡萄糖; Su: 蔗糖; G-Su: 葡萄糖-蔗糖
The same letters or partially same letters indicated no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicated significant difference ($P < 0.05$); the same applied as followings. St: Starch; C: Corn steep liquor; St-C: Starch-Corn steep liquor; M: Molasses; B-M: Bran-Molasses; G: Glucose; Su: Sucrose; G-Su: Glucose-Sucrose

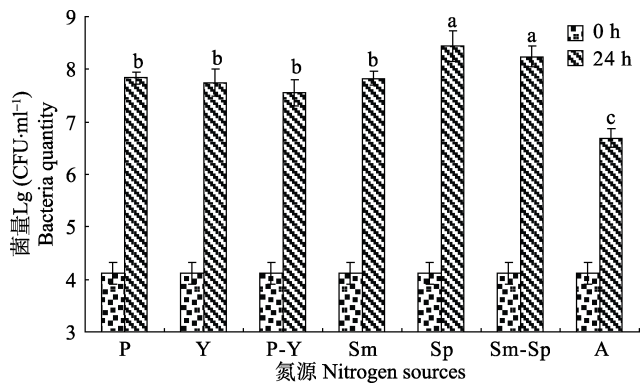


图 2 不同氮源条件下 A4 菌的菌量
Fig.2 Quantity of *Bacillus* A4 cultured with different nitrogen sources

P: 蛋白胨; Y: 酵母膏; P-Y: 蛋白胨-酵母膏; Sm: 豆粕; Sp: 大豆蛋白; Sm-Sp: 豆粕-大豆蛋白; A: 硫酸铵
P: Peptone; Y: Yeast; P-Y: Peptone-Yeast; Sm: Soybean meal; Sp: Soybean protein; Sm-Sp: Soybean meal-Soybean protein; A: Ammonium sulfate

$$Y = 0.65X_1 + 2.04X_2 + 0.27X_3 + 1.22X_4 + 0.45X_5 - 0.19X_6 - 0.37X_7 + 6.30$$

式中, Y 为菌浓度, X_1 - X_7 分别为玉米浆、大豆蛋白、pH、接种菌量、转速、温度、装液量 7 个因素的编码值。该方程决定系数为 0.9630,校正系数为 0.8982,表明该模型方程可靠性良好(表 3)。方差分析结果显示,各因素的重要性排序依次为大豆蛋白 > 温

度>玉米浆>转速>接种菌量>pH>装液量。各因素对菌株生长影响的贡献差别明显。其中,大豆蛋白、温度对菌浓度影响显著($P<0.05$)。可见,除了温度之外,碳、氮营养因素对菌株生长影响贡献明显大于其他培养条件。

3 讨论

3.1 营养因子对 A4 菌生长的影响

碳、氮是微生物生长过程中主要的营养物质。碳源作为微生物生长所需的基础营养物质,既能为菌体成分合成提供原材料,又是微生物生长的能量来源;氮源主要用于菌体细胞物质(氨基酸、蛋白质、核酸等)和含氮代谢物的合成(徐洪伟等, 2011; 朱永真等, 2011)。不同的微生物可利用不同的碳、氮源(付维来

等, 2012)。实验室及工业化生产中常用的碳、氮源主要分为有机和无机两类(王丽娜, 2014; 马勇等, 2011)。在本研究中, A4 菌对天然有机碳源玉米浆和天然有机氮源大豆蛋白利用效果最好, 培养 24 h 后菌量分别达到 3.58×10^8 、 3.19×10^8 CFU/ml。这与张文芝等(2010)的报道存在差别, 他们认为蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)AR156 的最佳碳、氮源分别为麦芽糖和黄豆粉, 培养 24 h 后菌量分别达到 4.76×10^8 、 4.56×10^8 CFU/ml。以上 2 株菌均为芽孢杆菌属, 但最佳碳、氮营养物质存在差别, 原因可能是微生物之间存在菌种和菌株的差异性, 不同种菌株所产生的酶系不同, 造成其对营养物质的利用存在差异。本研究, 对碳源、氮源的单因素实验分析表明, A4 菌对天然有机物的利用效果明显优于单一有机物和无机物。

表 2 Plackett-Burman 实验设计与结果
Tab.2 The design and results of Plackett-Burman test

序号 Number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	菌浓度 Cell concentration ($\times 10^8$ CFU/ml)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	10.31
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	7.23
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	4.92
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	8.22
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	2.67
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	4.02
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	4.27
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	7.52
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	6.92
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	9.88
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	7.80
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.87

注: +代表高水平, -代表低水平

Note: The "+" indicated high level, the "-" indicated low level

表 3 不同因素对 A4 菌生长影响的重要性
Tab.3 The effects of different factors on the growth of *Bacillus A4*

因素 Factors	相关系数 Coefficient estimate	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-Value	Pr>F	重要性排序 Importance principle order
X_1 玉米浆 Corn steep liquor (g/L)	0.65	1	5.14	6.80	0.0595	3
X_2 大豆蛋白 Soybean protein (g/L)	2.04	1	50.14	66.43	0.0012	1
X_3 pH 值 pH value	0.27	1	0.86	1.14	0.3463	6
X_4 温度 Temperature ($^{\circ}$ C)	1.22	1	17.93	17.93	0.0082	2
X_5 转速 Rotation speed(r/min)	0.45	1	2.40	2.40	0.1490	4
X_6 接种菌量 Inoculation amount (%)	-0.37	1	1.67	1.67	0.2117	5
X_7 装液量 Liquid volume in flask (%)	-0.19	1	0.44	0.44	0.4891	7

注: 决定系数 $R^2=0.9630$; 校正系数 $Adj R^2=0.8982$

Note: Coefficient of determination R^2 was 0.9630; Adjusted R^2 was 0.8982

3.2 培养条件对 A4 菌生长的影响

温度、溶氧、pH 等因子往往与营养因子协同影响微生物生长(高灯州等, 2016; 全汉锋等, 2015; 王欣等, 2014)。温度对微生物的影响主要体现在微生物体内的生化反应, 当温度适宜时, 微生物体内的酶活相对较高, 这会刺激微生物加快代谢促进生长, 不适宜的温度则会抑制体内代谢直至死亡(黄思明等, 2013)。pH 会影响微生物细胞膜电荷的变化以及代谢过程中酶的活性, 进而影响其吸收利用营养物质(李楠等, 2013)。溶氧对微生物的影响主要表现在代谢活动中, 一般好氧微生物对溶氧的需求量较大(钱骅等, 2015)。在本研究中, 溶氧含量主要通过装液量和转速来调节。装液量是通过控制气液比调节溶氧, 转速则是通过水流速度控制气液接触时间调节溶氧(冯玉枚等, 2015; 董淑浩等, 2015)。培养条件对微生物生长的影响作用体现在两个方面, 一是溶藻菌的产业化培养过程; 二是溶藻菌在池塘的应用过程(刘萍等, 2015)。本研究结果显示, 除温度外, pH、溶氧、接种菌量对 A4 菌生长的影响均不显著, 表明 A4 菌对 pH 及溶氧的波动不敏感, 生理功能相对稳定, 有利于产业化生产。在池塘应用过程中, 养殖水体理化条件会随着季节及昼夜变化处于波动状态(祁萍等, 2013)。朱浩等(2012)于 2009–2010 年对上海松江鱼塘的水质进行监测, pH 波动范围为 7.4–8.2, 溶氧波动范围为 4–14 mg/L; 李卓佳等(2010)对广东汕尾对虾养殖池塘水质进行监测, pH 波动范围为 7.21–9.37, 溶氧波动范围为 4–15 mg/L。A4 菌对溶氧及 pH 波动的耐受力较强, 可适应上述养殖水体环境, 有利于推广与应用。

3.3 多因素的协同影响

在对菌株生长条件的探索中, 目前研究多关注于营养物质中碳、氮源的筛选及优化(刘金玲等, 2016), 对营养因素和培养条件的协同效应关注不多(胡建恩等, 2012; 石飞虹等, 2009)。另外, 目前研究多限于利用单因素实验分析, 在其他因子恒定的情况下纵向比较某一因子的影响, 虽然操作简单, 但不能进行横向比较, 无法判断出主效因素(代志凯等, 2010)。Plackett-Burman 实验是一种能估计出各个因素的主效应并筛选出显著影响因素的实验方法(Maneeboon *et al.*, 2010)。因此, 本研究利用 Plackett-Burman 实验分析法, 对营养条件及培养条件的 7 个因子进行综合对比分析。研究表明, 大豆蛋白和温度对 A4 菌的生长影响最显著, 其余依次是玉米浆、转速、接种量、

pH 值、装液量。一方面, 说明 A4 菌的生长对氮源的选择性更高; 另一方面说明温度对 A4 菌生长的重要性显著高于碳源, 表明培养条件对菌株生长调控也有重要意义。因此, 在评估相关因素对菌株生长的影响时, 须将营养和培养条件共同加以考虑和对比分析。同时, 水体生态环境是复杂的, 在没有探清各因素对 A4 菌生长的综合影响时, 将其投放到不适宜生长的水体中, 可能难以达到溶藻效果。对此, 应综合考虑环境中各种生物因素和非生物因素的影响, 从多层面、多角度进行整体性研究分析, 建立有效的培养方案。

参 考 文 献

- Cai WW, Wang H, Tian Y, *et al.* Influence of a bacteriophage on the population dynamics of toxic dinoflagellates by lysis of algicidal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(21): 7837–7840
- Chen QL, Jing CM, Fu YX, *et al.* Isolation and characteristics of algicidal *Pseudomonas aeruginosa* from water body in cold region. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(3): 692–698 [陈庆丽, 景澄茗, 付韵馨, 等. 寒区水体中溶藻铜绿假单胞菌的分离和性质研究. *环境科学学报*, 2015, 35(3): 692–698]
- Chen ZR, Zhang JY, Lei XQ, *et al.* Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2014, 169(1): 784–788
- Cheng L, Wang YX, Ma YQ, *et al.* The structure of the phytoplankton community in the Laizhou Bay after the oil spills in Penglai 19-3 oilfield. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 67–73 [程玲, 王月霞, 马元庆, 等. 蓬莱 19-3 溢油后莱州湾浮游植物群落结构. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 67–73]
- Dai ZK, Zhang C, Ruan Z. The application of experimental design and optimization techniques in optimization of microbial medium. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 894–903 [代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 894–903]
- Dong SH, Zhu P, Xu XY, *et al.* Computational fluid dynamics simulation of different impeller combinations in high viscosity fermentation and its application. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(7): 1099–1107 [董淑浩, 朱萍, 徐晓滢, 等. 高粘发酵体系不同搅拌桨的 CFD 模拟及发酵验证. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1099–1107]
- Fei YT, Li QF, Zhang Y, *et al.* Environmental factors causing skin ulcer syndrome occurrence in pond-cultured *Apostichopus japonicas*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 682–692 [费聿涛, 李秋芬, 张艳, 等. 池塘养殖刺参腐皮综合征发病环境因素分析. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 682–692]

- Feng YM, Xiao LL, Guo JL, *et al.* Study on the effect of dissolved oxygen control on xylanase fermentation process. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(24): 198–201 [冯玉枚, 肖玲玲, 郭金玲, 等. 溶氧控制对木聚糖酶发酵过程影响的研究. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 198–201]
- Fu WL, Du JT, Liu P, *et al.* Optimization of culture medium and fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* M109. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 39(11): 215–219 [付维来, 杜建涛, 刘鹏, 等. 地衣芽孢杆菌 M109 高密度发酵条件的优化. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(11): 215–219]
- Gao DZ, Zhang WL, Zeng CS, *et al.* Relationship between biotic factors, abiotic factors and flood frequency in Min River estuarine wetlands. *Wetland Science*, 2016, 14(1): 27–36 [高灯州, 章文龙, 曾从盛, 等. 闽江河口湿地土壤生物和非生物因子与水淹频率的关系. *湿地科学*, 2016, 14(1): 27–36]
- Gong LY, Li YB, Zhu CJ, *et al.* Research progress on biological control of HABs. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(1): 152–158 [龚良玉, 李雁宾, 祝陈坚, 等. 生物法治理赤潮的研究进展. *海洋环境科学*, 2010, 29(1): 152–158]
- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, *et al.* Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 860–873
- Hou SL, Shu WJ, Tan S, *et al.* Exploration of the antioxidant system and photosynthetic system of a marine algicidal *Bacillus* and its effect on four harmful algal bloom species. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62(1): 49–59
- Hu JE, Cao Q, Yang F, *et al.* Optimization of fermentation conditions for high cell density cultivation and high hyperthermophilic α -amylase expression in recombinant *E. coli*. *Food Science*, 2012, 33(1): 219–225 [胡建恩, 曹茜, 杨帆, 等. 耐高温 α -淀粉酶高密度高表达发酵条件的优化. *食品科学*, 2012, 33(1): 219–225]
- Huang S M, Yin P H, Zhao L. Algae-lytic effect of a *Bacillus* sp. on *Phaeocystis globosa*. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2013, 34(3): 337–342 [黄思明, 尹平河, 赵玲. 一株芽孢杆菌对球形棕囊藻的溶藻效果. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(3): 337–342]
- Kuzminov FI, Brown CM, Fadeev VV, *et al.* Effects of metal toxicity on photosynthetic processes in coral symbionts, *Symbiodinium* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2013, 446(5): 216–227
- Li D, An XL, Fu LJ, *et al.* Isolation, identification and characterization of algicidal bacterium BS03 against *Alexandrium tamarense*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(1): 44–52 [李东, 安新丽, 傅丽君, 等. 溶藻细菌 BS03 分离、鉴定及其对塔玛亚历山大藻生长的影响. *环境科学学报*, 2013, 33(1): 44–52]
- Li J, Shi XY, Zhang CS, *et al.* Preliminary study on variation and supply of nutrients in typical sections of the East China Sea before and after *Dinoflagellate* blooms. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(2): 94–99 [李京, 石晓勇, 张传松, 等. 东海甲藻赤潮前后典型断面营养盐变化及其补充初探. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 94–99]
- Li N, Wang XH, Kang H, *et al.* Influence of pH on microbial community structure and metabolic characteristics of PAOs in biological phosphorus removal at low temperature. *Environmental Science and Technology*, 2013, 36(3): 9–11 [李楠, 王秀衡, 亢涵, 等. pH 对低温除磷微生物种群与聚磷菌代谢的影响. *环境科学与技术*, 2013, 36(3): 9–11]
- Li ZJ, Li SH, Yang YY, *et al.* Bacteria variation in *Litopenaeus vannamei* high level ponds and its relation with physical-chemical factors. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(4): 6–12 [李卓佳, 李烁寒, 杨莺莺, 等. 凡纳滨对虾高位池养殖水体细菌变动及其与理化因子的关系. *南方水产*, 2010, 6(4): 6–12]
- Liu JL, Li JW, Zhang HX, *et al.* Optimization of carbon and nitrogen sources of enrichment culture medium for *Lactobacillus reuteri*. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(5): 533–537 [刘金玲, 李嘉文, 张含雪, 等. 罗伊乳杆菌增殖培养基中碳源氮源的优化. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(5): 533–537]
- Liu P, Li JL. Study on an alkaline resistant algae-bacteria: Its environmental tolerance and lytic characteristics. *Environmental Science and Technology*, 2015, 38(12): 11–15 [刘萍, 李甲亮. 一株耐碱溶藻菌耐受力及其溶藻特性研究. *环境科学与技术*, 2015, 38(12): 11–15]
- Liu ZY, Ning XB, Li WL, *et al.* Isolation and primary study of three algicidal bacteria strains of Tai lake. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(2): 59–64 [刘征宇, 宁喜斌, 李文利, 等. 3 株太湖溶藻细菌的分离及溶藻特性的初步研究. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 59–64]
- Luo LX, Liu H, Lin QY, *et al.* Research on removal of marine red tide algae by chitosan-sepiolite composite flocculants. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(24): 49–50 [骆灵喜, 刘欢, 林秋月, 等. 壳聚糖-粘土复合絮凝剂去除海洋赤潮藻研究. *广东化工*, 2015, 42(24): 49–50]
- Lupette J, Lami R, Krasovec M, *et al.* *Marinobacter* dominates the bacterial community of the *Ostreococcus tauri* phycosphere in culture. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1414
- Ma Y, Men ZH. Selection of carbon source and nitrogen source for high-yield medium of one oleaginous yeast. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(13): 8039–8041 [马勇, 门中华. 一株产油酵母菌高产培养基的碳源和氮源选择. *安徽农业科学*, 2011, 39(13): 8039–8041]
- Maneeboon T, Vanichsriratana W, Pomchaitaward C, *et al.* Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-L airlift bioreactor using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 161(1–8): 137–146
- Miao Z, Du ZJ, Li HR, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five Arctic microalgae. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1587–1600 [苗祯, 杜宗军, 李会荣, 等. 5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性. *生态学报*, 2015, 35(5): 1587–1600]
- Qi P, Wang M, Wu NE, *et al.* Assessment of water quality in main aquaculture ponds in Ningxia. *Chinese Fishery Quality*

- and Standards, 2013, 3(3): 106–109 [祁萍, 王梅, 吴尼尔, 等. 宁夏主要养殖池塘水质评价. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(3): 106–109]
- Qian H, Wang Y, Zhou LF, *et al.* Liquid fermentation conditions and bioactivities of the strain isolated from *Shiraia bambusicola*. *China Brewing*, 2015, 34(12): 38–43 [钱骅, 王媛, 周林芳, 等. 竹黄分离菌液态发酵条件及生物学活性研究. 中国酿造, 2015, 34(12): 38–43]
- Quan HF, Shan XJ, Dai FQ. The community structure of the phytoplankton in the Funing Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 1–7 [全汉锋, 单秀娟, 戴芳群. 福宁湾浮游植物的群落结构特征. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 1–7]
- Rao YK, Tsay KJ, Wu WS, *et al.* Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2007, 42(4): 535–541
- Shen P, Fan XR, Li GW. *Microbiology experiment III*. Beijing: Higher Education Press, 1996, 90–97 [沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1996, 90–97]
- Shi FH, Zhou YC, Guo C, *et al.* Studies on medium optimization of thermostable α -amylases. *Food and Machinery*, 2009, 25(5): 54–56 [石飞虹, 周友超, 郭翠, 等. 工业生产中耐高温 α -淀粉酶发酵培养基的优化研究. 食品与机械, 2009, 25(5): 54–56]
- Shi RJ, Huang HH, Qi ZH, *et al.* Algicidal activity against red-tide algae by marine bacterial strain N3 isolated from a HABs area, southern China. *Environmental Science*, 2013, 34(5): 1922–1929 [史荣君, 黄洪辉, 齐占会, 等. 海洋细菌 N3 对几种赤潮藻的溶藻效应. 环境科学, 2013, 34(5): 1922–1929]
- Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Optimization of culture conditions for flexirubin production by *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497 using response surface methodology. *Acta Biochimica Polonica*, 2015, 62(2): 185–190
- Wang JX, Luo GY, Xu XY, *et al.* Lytic effect of environmental factors on algae-lysing bacteria strain S7 by fluorescence spectroscopy. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2012, 46(5): 780–784 [王金霞, 罗固源, 许晓毅, 等. 荧光光谱法分析环境因素对溶藻细菌 S7 溶藻作用的影响. 上海交通大学学报, 2012, 46(5): 780–784]
- Wang LN. Optimization of liquid fermentation conditions of *Bacillus natto*. *China Condiment*, 2014, 39(9): 28–30 [王丽娜. 纳豆芽孢杆菌液体发酵条件的优化. 中国调味品, 2014, 39(9): 28–30]
- Wang SB, Xu ZR, Zhang J. A review of technologies for prevention and control of cyanobacteria blooms in large-scale eutrophicated lakes and reservoirs. *Water Resources Protection*, 2016, 32(4): 88–99 [王寿兵, 徐紫然, 张洁. 大型湖库富营养化蓝藻水华防控技术发展述评. 水资源保护, 2016, 32(4): 88–99]
- Wang X, Sheng HX, Tang YL, *et al.* Relationships between the structure of phytoplankton community and environmental factors in three artificial reef areas of Laoshan Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 7–12 [王欣, 盛化香, 唐衍力, 等. 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 7–12]
- Wei N, Lu B, Yu DG, *et al.* Vertical characteristics of microbial community structures and the relationship with environmental factors in sediments of hybrid snakehead aquaculture enclosures. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(2): 207–217 [魏南, 路斌, 余德光, 等. 高密度杂交鳢养殖围隔沉积物微生物群落结构垂直变化规律及其与理化因子的关系. 水产学报, 2016, 40(2): 207–217]
- Xi JY, Cao YC, Li ZJ, *et al.* Specificity of algicidal activity against four species of microalgae by algicidal bacterium A2. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(5): 34–42 [郝建云, 曹煜成, 李卓佳, 等. 溶藻菌 A2 对 4 种微藻的溶藻效果分析. 南方水产科学, 2016, 12(5): 34–42]
- Xie FX, Zhang FF, Zhou K, *et al.* Optimization of fermentation parameters for *Bacillus amyloliquefaciens* HN with water purification. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(2): 225–230 [谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 一株水质净化解淀粉芽孢杆菌 HN 发酵参数的优化. 华北农学报, 2013, 28(2): 225–230]
- Xu HW, Ju HM, Sun Q, *et al.* Optimization of carbon sources and nitrogen sources in ferment culture medium of bacterium producing small molecular antibacterial peptides. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21(8): 1931–1932, 1935 [徐洪伟, 鞠红梅, 孙琪, 等. 小分子肽产生菌培养基碳源与氮源的优化. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1931–1932, 1935]
- Yang YF, Hu XJ, Zhang J, *et al.* Community level physiological study of algicidal bacteria in the phycospheres of *Skeletonema costatum* and *Scrippsiella trochoidea*. *Harmful Algae*, 2013, 28(3): 88–96
- Yang YY, Li ZJ, Chen YQ, *et al.* Fermentation technology of probiotic strain D-1. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(6): 44–49 [杨莺莺, 李卓佳, 陈永青, 等. 益生菌 D-1 液体发酵工艺的研究. 南方水产, 2005, 1(6): 44–49]
- Zhang JS, Su ZZ, Xue FF, *et al.* Screening and identification of two bacteria strains degrading ammonia-nitrogen and factors of degradation ammonia analysis. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1549–1557 [张家顺, 苏真真, 薛菲菲, 等. 2 株氨氮去除菌的分离鉴定及去除率影响因素分析. 水产学报, 2015, 39(10): 1549–1557]
- Zhang J, Yang YF, Gong YY, *et al.* The lytic effect of bacteria in the phycosphere of *Skeletonema costatum* and *Scrippsiella trochoidea*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(6): 1271–1279 [张俊, 杨宇峰, 龚映雪, 等. 中肋骨条藻与锥状斯氏藻际细菌溶藻效应研究. 环境科学学报, 2010, 30(6): 1271–1279]
- Zhang WZ, Wang YP, Liu HX, *et al.* Optimization of medium components and cultural conditions of *Bacillus cereus* AR156. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 803–810 [张文芝, 王云鹏, 刘红霞, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及发酵条件的优化. 微生物学通报, 2010, 37(6): 803–810]
- Zhao PC, Quan CS, Jin LM, *et al.* Effects of different nitrogen and carbon sources on the production of antifungal

- lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. China Biotechnology, 2012, 32(10): 50–56 [赵朋超, 权春善, 金黎明, 等. 氮源和碳源对解淀粉芽孢杆菌 Q-426 抗菌脂肽合成的影响. 中国生物工程杂志, 2012, 32(10): 50–56]
- Zhou J, Chen GF, Zhu XS, *et al.* A review of the relationship between algae and bacteria in harmful algal blooms. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(2): 269–281 [周进, 陈国福, 朱小山, 等. 赤潮过程中“藻-菌”关系研究进展. 生态学报, 2014, 34(2): 269–281]
- Zhu H, Liu XG, Wang J, *et al.* Study on characteristics of the vertical variation in aquaculture pond water. Fishery Modernization, 2012, 39(4): 12–15 [朱浩, 刘兴国, 王健, 等. 池塘养殖水体不同水层水质变化研究. 渔业现代化, 2012, 39(4): 12–15]
- Zhu YZ, Du ST, Che J, *et al.* Effect of different carbon sources and nitrogen sources on the growth of *Morchella esculenta* mycelia. Journal of Northwest A & F University, 2011, 39(3): 113–118 [朱永真, 杜双田, 车进, 等. 不同碳源及氮源对羊肚菌菌丝生长的影响. 西北农林科技大学学报, 2011, 39(3): 113–118]

(编辑 马瑾艳)

The Effects of Different Carbon and Nitrogen Nutrients and Culture Conditions on the Growth of *Bacillus* sp. Strain A4

LI Shasha¹, CAO Yucheng^{1,2}, LI Zhuojia^{2,3}, HU Xiaojuan^{2,4}, XU Yu², XU Wujie²,
YANG Keng², SU Haochang², WEN Guoliang^{1,2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 3. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275; 4. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018)

Abstract In this study, we explored how the nutritional and culture conditions affected the growth of a *Bacillus* sp. strain A4 and identified the growth characteristics of this strain during the multi-factor interaction. We first applied the single factor test to study the effects of different carbon and nitrogen sources, and then employed Plackett-Burman (PB) test to evaluate the effects of seven factors including carbon source, nitrogen source, pH value, inoculation amount, temperature, rotation speed and liquid volume in the flask. The results showed that the absorption efficiencies of strain A4 for different carbon and nitrogen sources were different. We found that the corn steep liquor was the best carbon source for strain A4, and that the soybean protein was the best nitrogen source. When cultured with the corn steep liquor or the soybean protein for 24 h, the amounts of bacteria reached 3.58×10^8 CFU/ml and 3.19×10^8 CFU/ml respectively. The results of Plackett-Burman (PB) test showed that the order of factors affecting the growth of strain A4 as soybean protein > temperature > corn steep liquor > rotation speed > inoculation amount > pH value > liquid volume in the flask. Moreover, the soybean protein as the nutritional factor and the temperature as the culture condition both had significant effects on the growth of strain A4 ($P < 0.05$). Temperature had a greater effect on the growth of strain A4 than the corn liquid factor. The results above indicated that the culture conditions played a vital role in the growth regulation of the bacteria. We also recommend that it should be essential to associate the nutritional factors with the culture conditions when evaluating the effects of related factors on the growth or ecological function of bacteria.

Key words *Bacillus* sp.; Carbon source; Nitrogen source; Culture conditions

① Corresponding author: WEN Guoliang, E-mail: guowen66@163.com

固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定 养殖海水中 17 种喹诺酮类药物*



董 晓^{1,2} 李兆新^{1①} 孙晓杰¹ 邢丽红¹ 彭吉星¹ 宋才湖^{1,2}

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 建立了固相萃取-液相色谱串联质谱法(SPE-LC-MS/MS)同时检测养殖海水中 17 种喹诺酮类药物残留的分析方法。海水经酸化处理后,采用 HLB 固相萃取柱富集、净化目标化合物,通过对比水样在不同上样 pH、淋洗液与洗脱液等条件下的回收率,以此对前处理方法进行优化。收集到的洗脱液经氮气吹干后用流动相定容至 1 ml,待测。色谱流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈,所有药物经梯度洗脱进行分离,在 LC-MS/MS 正离子模式的多反应监测模式下进行定性定量分析。17 种化合物可以在 10 min 中内得到较好的分离,线性范围为 1-200 ng/ml,线性相关系数均大于 0.999,检出限均在 2-10 ng/L 范围内,定量限均在 5-20 ng/L 范围内。以空白海水为基质,在 20、100、200 ng/L 三个不同添加水平下采用内标法定量的加标回收率均在 71.3%-125.0% 范围内,相对标准偏差(RSD)为 2.44%-12.27% (n=5)。采用该方法对黄海灵山湾近岸 4 个养殖场进行海水采集并检测,共检测出 4 种喹诺酮类药物,分别是恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星和环丙沙星,其中,恩诺沙星浓度最高。研究表明,该方法快速、可靠,适用于养殖海水中喹诺酮类药物的检测。

关键词 喹诺酮类药物; 固相萃取; 液相色谱-串联质谱; 养殖海水

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0127-12

喹诺酮类(Quinolones, QNs)药物为广谱抑菌药,因其具有抗菌谱广、高效、低毒、价格低廉等特点,在畜牧、水产等养殖生产中使用广泛(杨守国等, 2010)。喹诺酮类抗菌药大量用于人类和动物医疗,还添加于饲料中以提高饲料利用率和促进动物生长(顾海东等, 2013)。喹诺酮类药物作为人工合成的抗菌药在水产养殖业中发挥着巨大的作用。抗生素的使用一方面极大地促进了水产养殖业的发展,另一方面也造成了渔业养殖水环境污染和水产品中药物残留问题(张瑞杰等, 2012)。研究表明,水产用抗生素少部分进入食物链、大部分进入环境中,仅有少量抗生素被鱼体吸收(聂湘平等, 2007; 徐英江等, 2010)。尽

管很多抗生素的半衰期不长,但由于其被频繁地使用并进入环境,导致其形成“假持续”现象,进而对人体健康以及整个生态系统构成长期潜在危害(周启星等, 2007)。进入环境中的抗生素可能导致养殖环境中病菌产生耐药性,破坏水产养殖动物的微生态平衡,因此,水产养殖动物的病害防治工作愈发艰巨(胡文佳等, 2007)。目前,抗生素已经在各种环境中检出,包括废(污)水、地表水、地下水等(Watkinson *et al.*, 2009)。针对环境中特别是水产养殖环境,抗生素的环境分析方法、生态效应的报道也逐渐增多。汪昆平等(2012)研究表明,固相萃取-高效/超高效液相色谱法是当今检测环境抗生素的有效手段,高效液相色谱法(HPLC)

* 国家自然科学基金项目(21207162)资助[This work was supported by National Science Foundation of China (21207162)]

董 晓, E-mail: dongxiao90@126.com

① 通讯作者: 李兆新, 研究员, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-09-05, 收修改稿日期: 2016-10-24

具有分离速度快、效率高、应用广泛的特点。抗生素残留在色谱分析时最常用的检测方式有紫外-可见检测器(UV-VIS)、荧光检测器(FLD)等(Ho *et al.*, 2004; Göbel *et al.*, 2004; Toussaint *et al.*, 2005)。结合固相萃取(SPE)样品前处理的色谱、质谱分析技术最为普遍(杜鹃等, 2015)。目前的检测方法仍存在待测物类别少、回收率低、检出限高等问题(Reverté *et al.*, 2003; 孙广大等, 2009; 李佩佩等, 2015; 尹艳敏等, 2015)。关于养殖海水中喹诺酮类药物的检测方法并没有相应的标准规范, 因此, 对于水产养殖环境中抗菌药残留检测方法的研究具有重大意义。本研究结合固相萃取的液相色谱-质谱联用技术, 建立了养殖海水中 17 种喹诺酮类药物的检测方法。针对前处理以及检测条件进行了不同条件的优化, 结果显示, 该方法操作简单、选择性强、灵敏度高、重现性好, 可满足养殖海水中 17 种喹诺酮类药物的检测。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

TSQ QuantumTM Access 液相色谱-质谱仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); NEVAPTM12 型氮气吹扫仪(Organomation, 美国); Milli-Q 型超纯水仪(Millipore, 美国); 12 管固相萃取装置(Supelco Co, 美国); 6 ml/500 mg Oasis HLB 固相萃取柱(Waters, 美国); 棕色采集瓶。

依诺沙星(Enoxacin, ENX)、麻保沙星(Marbofloxacin, MAR)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、培氟沙星(Pefloxacin, PEF)、氟罗沙星(Fleroxacin, FLE)、诺氟沙星(Norfloxacin, NOF)、氟代诺氟沙星(D5-Norfloxacin, D5-NOF)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、奥比沙星(Orbifloxacin, ORB)、氟代环丙沙星(D8-Ciprofloxacin, D8-CIP)、萘啶酸(Nalidixic Acid, NA)、氟代恩诺沙星(D5-Enrofloxacin, D5-ENR), 以上标准品纯度均为 99.0%; 丹诺沙星(Danofloxacin, DAN, 纯度为 99.9%)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR, 纯度为 99.8%)、沙拉沙星(Sarafloxacin, SAR, 纯度为 93.5%)、司帕沙星(Sparfloxacin, SPX, 纯度为 99.6%)、氟甲喹(Flumequine, FLU, 纯度为 98.5%)、双氟沙星(Difloxacin, DIF, 纯度为 98.0%)、噁喹酸(Oxolinic Acid, OA, 纯度为 98.0%)、洛美沙星(Lomefloxacin, LOM, 纯度为 97.6%), 均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司。

甲醇、乙腈(HPLC 级, Merck 公司); 甲酸、乙酸铵(HPLC 级, Fluka 公司); 超纯水(18.2 MΩ·cm); 盐

酸; 氢氧化钠。

标准溶液配制: 分别称取 10.0 mg 上述标准品, 用甲醇溶解并定容至 10 ml, 个别不易溶解的标准品(如洛美沙星、依诺沙星等)需加入少量甲酸溶解后, 甲醇稀释并定容至 10 ml, 配制成 1.0 g/L 的标准储备液, -20℃ 保存 6 个月。实验时, 用甲醇稀释上述标准储备液, 配制成不同浓度的混合标准使用液。

1.2 海水样品

海水样品采自黄海灵山湾海区近岸的 4 个工厂化养殖场(A、B、C 和 D)。用棕色采集瓶分别从每个养殖场的进水口、出水口和不同的养殖池内进行海水采集。空白海水样品采自青岛黄海近岸海域, 经质谱检测不含待测药物。样品当天带回实验室处理。

1.3 样品检测条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 MG II (2.1 mm×150 mm, 5 μm), 柱温为 35℃, 流速为 0.20 ml/min, 进样量为 10 μl, 流动相 A 为甲酸水溶液(含 0.1% 甲酸)、B 为乙腈, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Tab.1 Mobile phase gradient elution program

时间 Time (min)	A 相 Mobile phase A (%)	B 相 Mobile phase B (%)
0.0	90	10
0.5	90	10
3.0	30	70
5.0	10	90
8.0	10	90
9.0	90	10
10.0	90	10

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 多反应监测(MRM), 喷雾电压为 4500 V, 雾化气流量为 12 L/min, 辅助气流量为 2 L/min, 离子传输管温度为 350℃, 源内碰撞诱导解离电压为 10 V, 其他参数见表 2。

1.4 水样的前处理方法

水样经 0.45 μm 水系滤膜过滤, 去除水中悬浮颗粒物。加入适量的稀盐酸调节水样 pH 为 3.00±0.05, 准确量取 500 ml 调节 pH 之后的水样, 准确加入 1 μg/ml 混合内标标准工作液 50 μl, 以约 5 ml/min 流速通过 Oasis HLB 固相萃取柱进行富集和净化。SPE 小柱上样前, 依次用 6 ml 甲醇和 6 ml 5 mmol/L 乙酸铵

表 2 喹诺酮的质谱检测参数
Tab.2 MS detection parameters of quinolones

序号 Number	化合物 Compound	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碰撞能 Collision energy (ev)
1	氟罗沙星 Fleroxacin	370	269	26
			326*	19
2	氧氟沙星 Ofloxacin	362	261	27
			318*	18
3	诺氟沙星 Norfloxacin	320	233	24
			276*	16
4	依诺沙星 Enoxacin	321	232	34
			303*	21
5	环丙沙星 Ciprofloxacin	332	245	22
			288*	17
6	恩诺沙星 Enrofloxacin	360	245	26
			316*	9
7	洛美沙星 Lomefloxacin	352	265	22
			308*	16
8	丹诺沙星 Danofloxacin	358	263	22
			340*	22
9	奥比沙星 Orbifloxacin	396	295	24
			352*	17
10	双氟沙星 Difloxacin	400	299	28
			356*	19
11	沙拉沙星 Sarafloxacin	386	299	26
			342*	18
12	司帕沙星 Sparfloxacin	393	292	25
			349*	19
13	噁喹酸 Oxloinic acid	262	216	29
			244*	18
14	氟甲喹 Flumequine	262	202	32
			244*	18
15	培氟沙星 Pefloxacin	334	290	18
			316*	20
16	麻保沙星 Marbofloxacin	363	320	23
			345*	29
17	萘啶酸 Nalidixic acid	233.3	215.2	19
			187.4*	35
18	D5-诺氟沙星 D5-Norfloxacin	325	307	22
19	D8-环丙沙星 D8-Ciprofloxacin	340	322	21
20	D5-恩诺沙星 D5-Enrofloxacin	365	321	19

*为定量离子

*Denoted quantitative ions

缓冲液(pH=3.00±0.05)进行活化平衡。水样过柱后用 10 ml 乙酸铵缓冲液淋洗, 减压抽干后用 6 ml 甲醇分 2 次进行洗脱。在 40℃下, 将洗脱液用氮气吹至近干, 用流动相(0.1%甲酸水溶液: 乙腈=9: 1)定容至 1 ml, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

利用液相色谱法或液相色谱-质谱法测定喹诺酮

类药物时,常用的液相色谱流动相有水-乙腈、水-甲醇和水-甲醇-乙腈等(王金秋等, 2014)。在流动相的水相中加入醋酸铵和甲酸等挥发性电解质,可以提高离子化效率,在保持较好分离度的前提下获得理想色谱峰形(高立红等, 2010)。为了考察加入甲酸对喹诺酮类药物峰形的调节作用,比较了当流动相中甲酸浓度分别为 0、0.1%和 0.2%时,对喹诺酮类药物峰形的影响。发现纯水(甲酸浓度为 0)和乙腈为流动相时,有多种药物不出峰(图 1-a); 0.1%的甲酸水溶液和乙腈为流动相时,峰形好且灵敏度高(图 1-b); 0.2%的甲酸水溶液和乙腈为流动相时,质谱峰灵敏度降低(图 1-c)。因此,选择 0.1%甲酸水溶液和乙腈为流动相,17 种喹诺酮类药物以及 3 种内标物标准溶液(20 ng/ml)的色谱图见图 2。

采用 0.1%甲酸水溶液(A)、甲醇(B)和乙腈(C)的三元流动相,出峰时间长(16 min)且灵敏度降低。麻保沙星出峰有小分叉,响应强度低(图 3-a)。而采用 0.1%甲酸水和乙腈两相为流动相时,麻保沙星出峰正常(图 3-b); 所有喹诺酮类分析时间短(10 min),分离度好且响应强度高。

2.2 固相萃取条件的优化

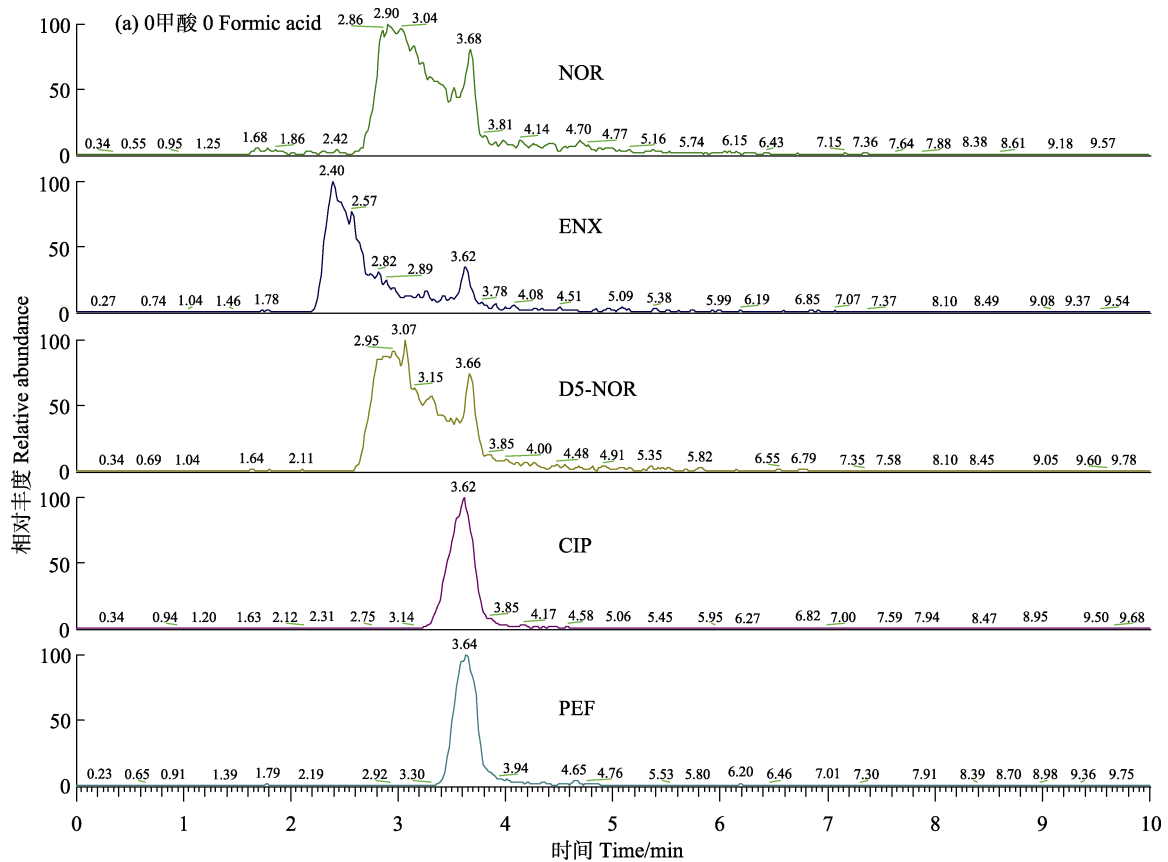
喹诺酮类药物的基本结构中既含有羧基官能团,

又含有叔胺基,属于两性、极性化合物(Ho *et al.*, 2004)。固相萃取技术使得高倍浓缩萃取水环境中的抗生素成为可能。Oasis HLB 是亲水亲脂平衡型固相萃取柱,对极性和非极性物质都有很好的富集效果。本研究选择 Oasis HLB(6 ml/500 mg)对养殖海水中喹诺酮进行富集。

天然海水的 pH 范围为 7.8-8.3,海水的 pH 可以影响抗生素与 SPE 柱的结合效率,影响到最终的萃取效果。研究证明,抗生素在酸性条件下比中性(不调节 pH)、碱性条件下与 SPE 的结合更显著(高会等, 2011; 孙广大等, 2009)。因此,本研究将过柱海水的 pH 分别调成 2.0、3.0、4.0 三种水平。按照前处理的方法通过加标回收可知,当海水用盐酸调节 pH 至 3.0 时,水样加标的回收率结果更稳定,重现性好(图 4),所以本研究在过柱前统一将海水 pH 调为 3.0,这与徐维海等(2006)和张瑞杰等(2012)的研究结果一致。

2.3 淋洗液与洗脱液的考察

经过 Oasis HLB 小柱的富集之后,需对 SPE 柱进行淋洗除去杂质,本研究选择乙酸铵水溶液作为淋洗液,分别选择 6、8、10、12 ml 不同体积进行实验,可知当淋洗液的体积为 10 ml 时,能够得到满意的除杂效果和回收率。



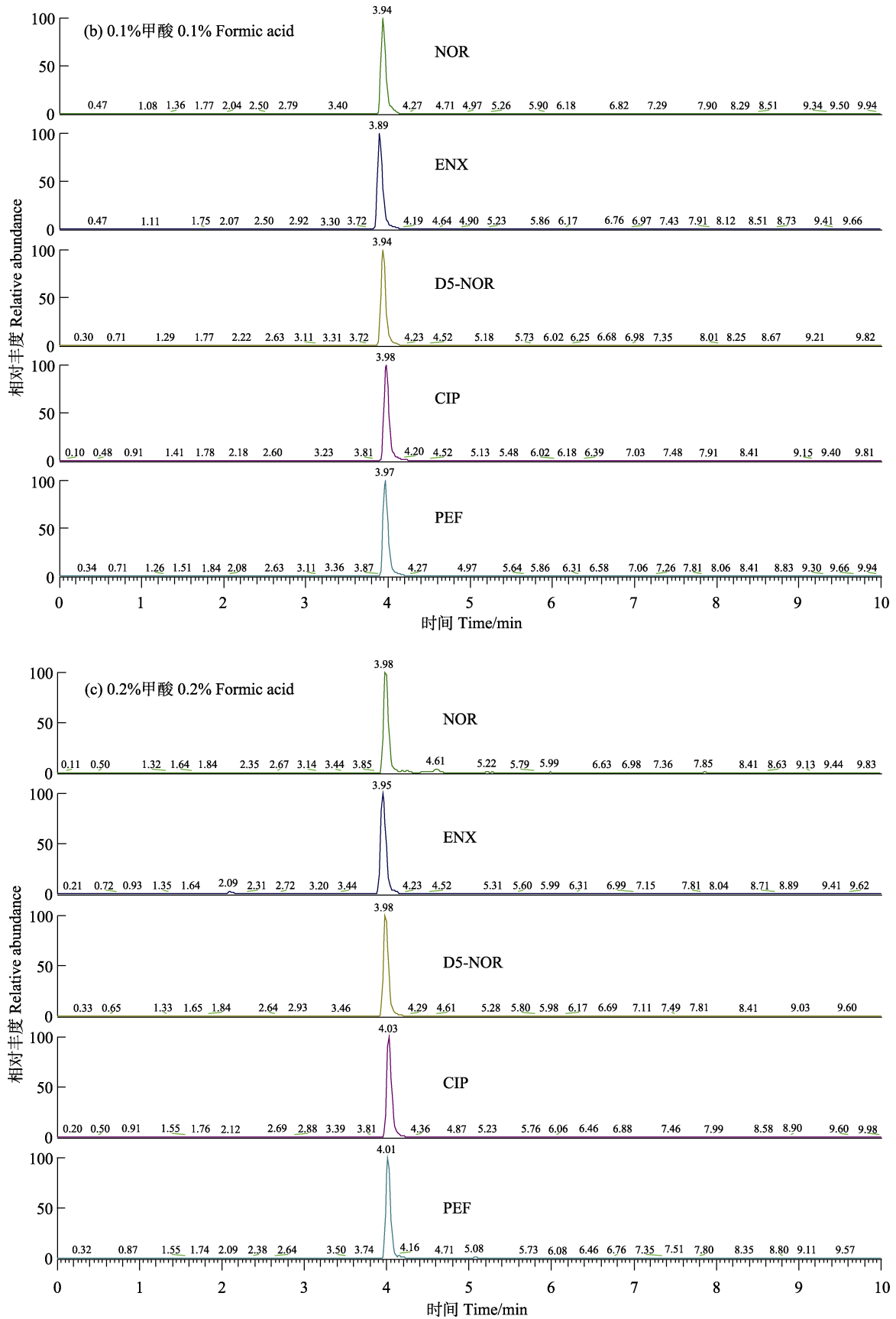
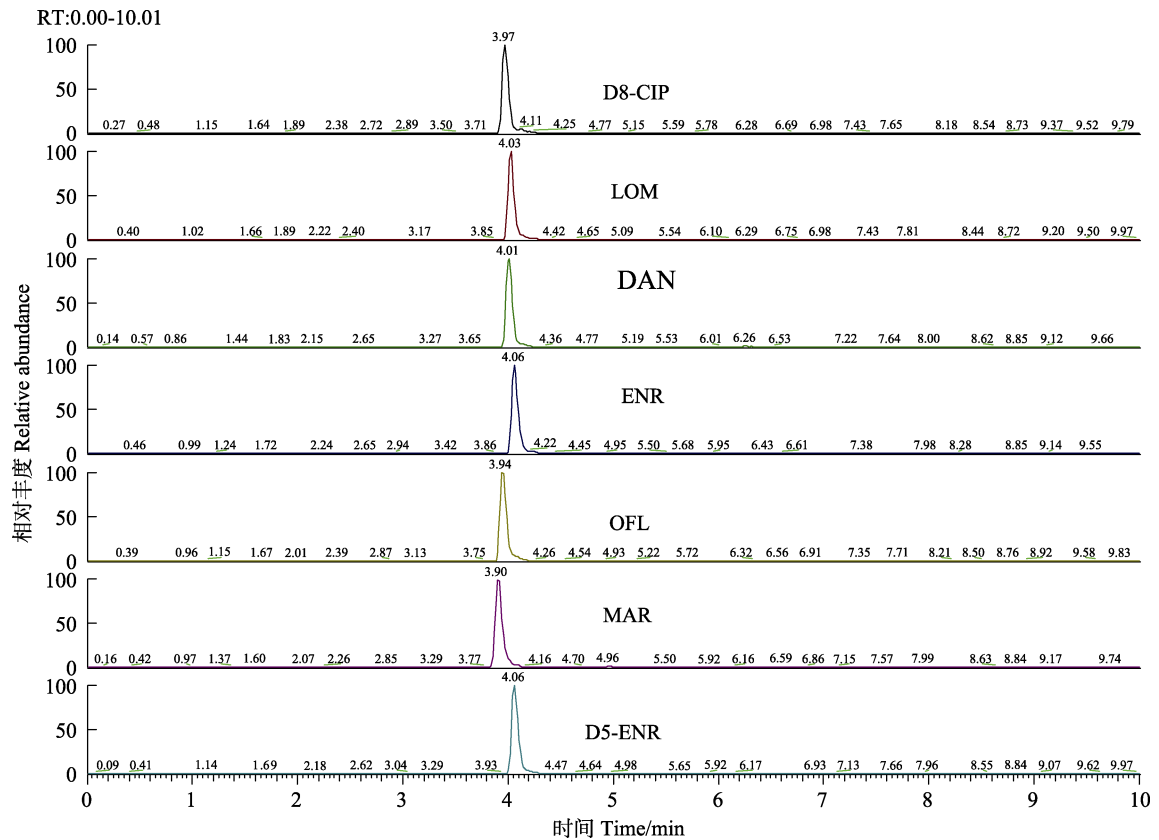
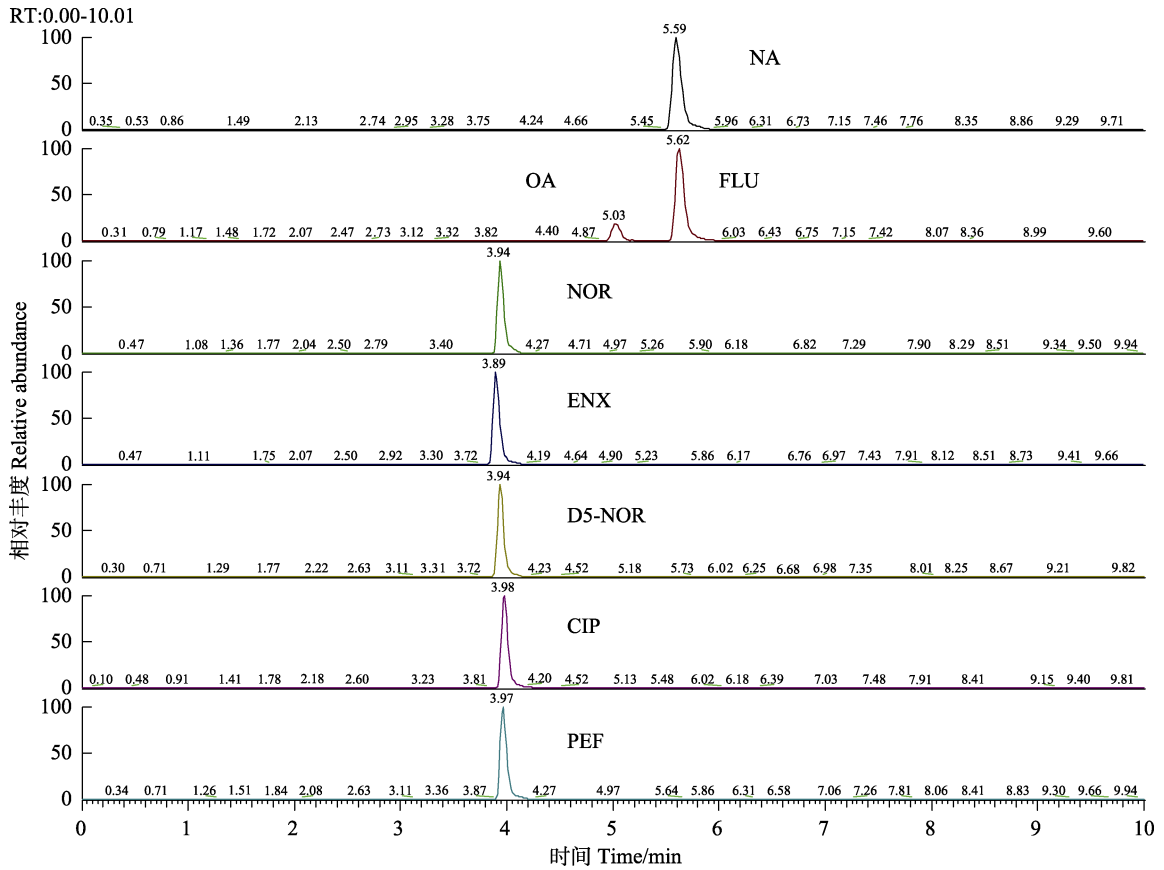


图 1 不同流动相分离的 5 种喹诺酮的色谱图
 Fig. 1 Chromatogram of 5 quinolones in different mobile phases



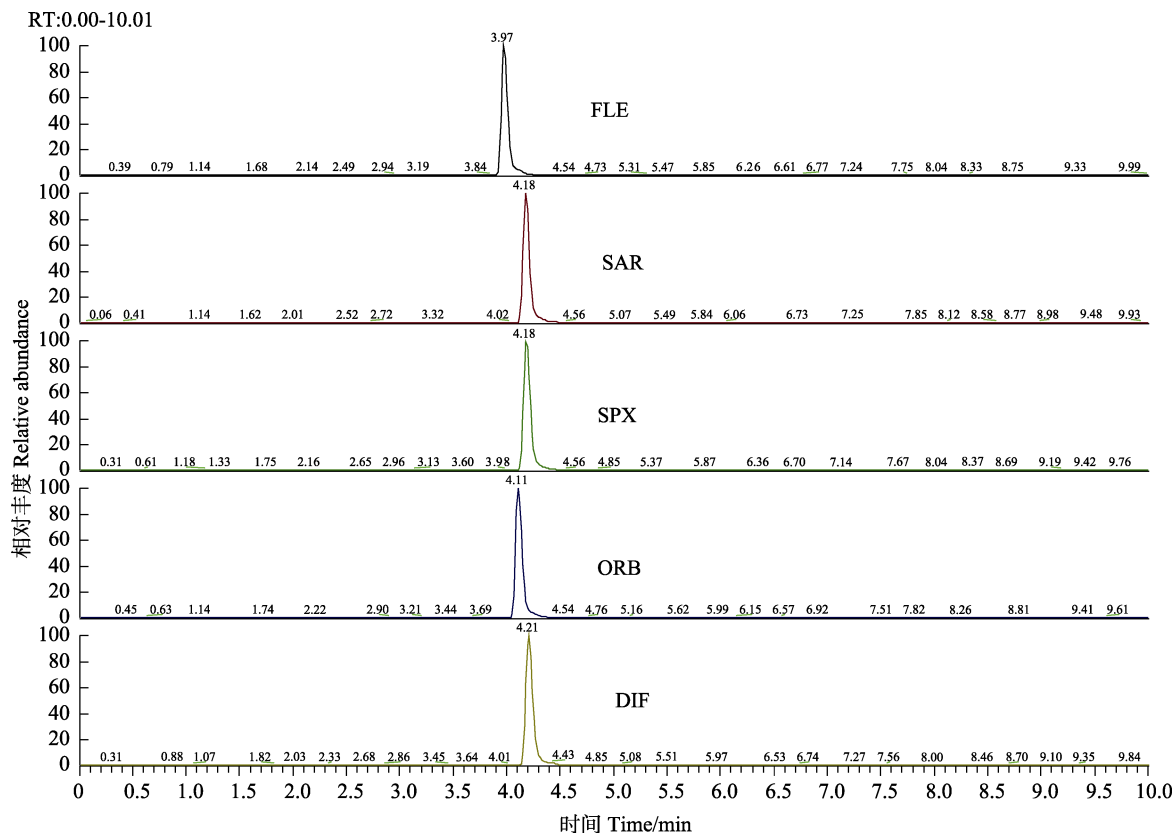


图 2 17 种喹诺酮以及 3 种内标物标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a mix solution of 17 quinolones and 3 internal standards (20 ng/ml)

SPE 柱淋洗后,对洗脱液的种类以及使用量进行考察。首先,选用乙腈和甲醇进行洗脱,经过回收数据统计可知,用甲醇洗脱后的样品回收率较稳定,经过乙腈处理的回收率偏高,且乙腈的毒性比甲醇大,所以选择甲醇为洗脱液。对甲醇的使用量进行对比,结果显示,6 ml 的甲醇分 2 次进行洗脱即可达到较高的回收率,继续增加使用量之后,效果不明显,且增加了甲醇使用量,延长了氮吹时间。

2.4 线性范围和方法检出限

在优化的色谱和质谱条件下,用流动相稀释喹诺酮的混合标准品,每个浓度梯度都准确加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合内标标准工作液 50 μl ,使混合标准工作液终浓度为 1、2、5、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。标准曲线结果显示,17 种喹诺酮的线性关系均良好, $R^2 > 0.999$,仪器测定线性范围为 1–200 $\mu\text{g}/\text{L}$,空白海水(500 ml)加标的方法得到 17 种喹诺酮的方法($S/N=3$)检出限的范围为 2–10 ng/L ,定量限($S/N=10$)的范围为 5–20 ng/L (表 3)。

2.5 方法回收率、重现性和精密度

本研究采用内标法进行定量分析,在样品中加入

回收率指示物,以此来保证整个样品前处理过程的回收率。诺氟沙星、依诺沙星、麻保沙星、氧氟沙星、培氟沙星、氟罗沙星、洛美沙星以氟代诺氟沙星为内标,环丙沙星、奥比沙星以氟代环丙沙星为内标,恩诺沙星、丹诺沙星、沙拉沙星、司帕沙星、双氟沙星、恶喹酸、氟甲喹、萘啶酸以氟代恩诺沙星为内标。采用标准添加法,选择空白海水为空白样品,海水样分别在 20、100、200 ng/L 三个添加水平下进行加标回收率和精密度($n=5$)的考察。结果显示,回收率范围 71.3%–125.0%,方法的相对标准偏差 $\leq 12.27\%$ (表 4)。由此说明,该方法灵敏度、准确性与重现性都较高,可用于水产养殖环境中海水的喹诺酮类残留检测。

2.6 实际水样分析

采用所建立的养殖海水中 17 种喹诺酮类药物的检测方法对黄海灵山湾近岸的 4 个养殖场的海水进行取样。共检测出 4 种喹诺酮类药物,分别是恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星和环丙沙星,浓度范围是 ND–6880.05 ng/L (表 5)。其中,恩诺沙星的检出率最高,在 4 家养殖场中都有检出,其他 3 种喹诺酮的检出率较低。养殖场 C 的检测结果显示,该场用药种类多且含量较高,需引起重视。在水产养殖过程中,恩

诺沙星属于允许按规范使用的抗菌药, 氧氟沙星、诺氟沙星和环丙沙星是禁止使用的抗菌药。目前, 虽然没有水体中喹诺酮类药物残留限量标准, 但检测结果显示, 水产养殖过程中喹诺酮类药物存在不同程度的滥用现象, 需要进一步加强监管。

3 结论

本研究采用 SPE 与 LC-MS/MS 联用技术, 建立

了养殖海水中 17 种喹诺酮类药物残留的分析方法。该方法可检测到的喹诺酮类药物较全面, 具有较高的灵敏度和选择性, 准确可靠, 回收率为 71.3%–125.0%。该方法适用于养殖海水中的喹诺酮类药物残留的检测。将此方法初步应用于黄海灵山湾近岸养殖区喹诺酮类药物残留的调查, 结果显示, 养殖区水体中检出喹诺酮类药物, 且浓度较高, 表明该养殖区存在较严重的超浓度使用喹诺酮类药物的现象。

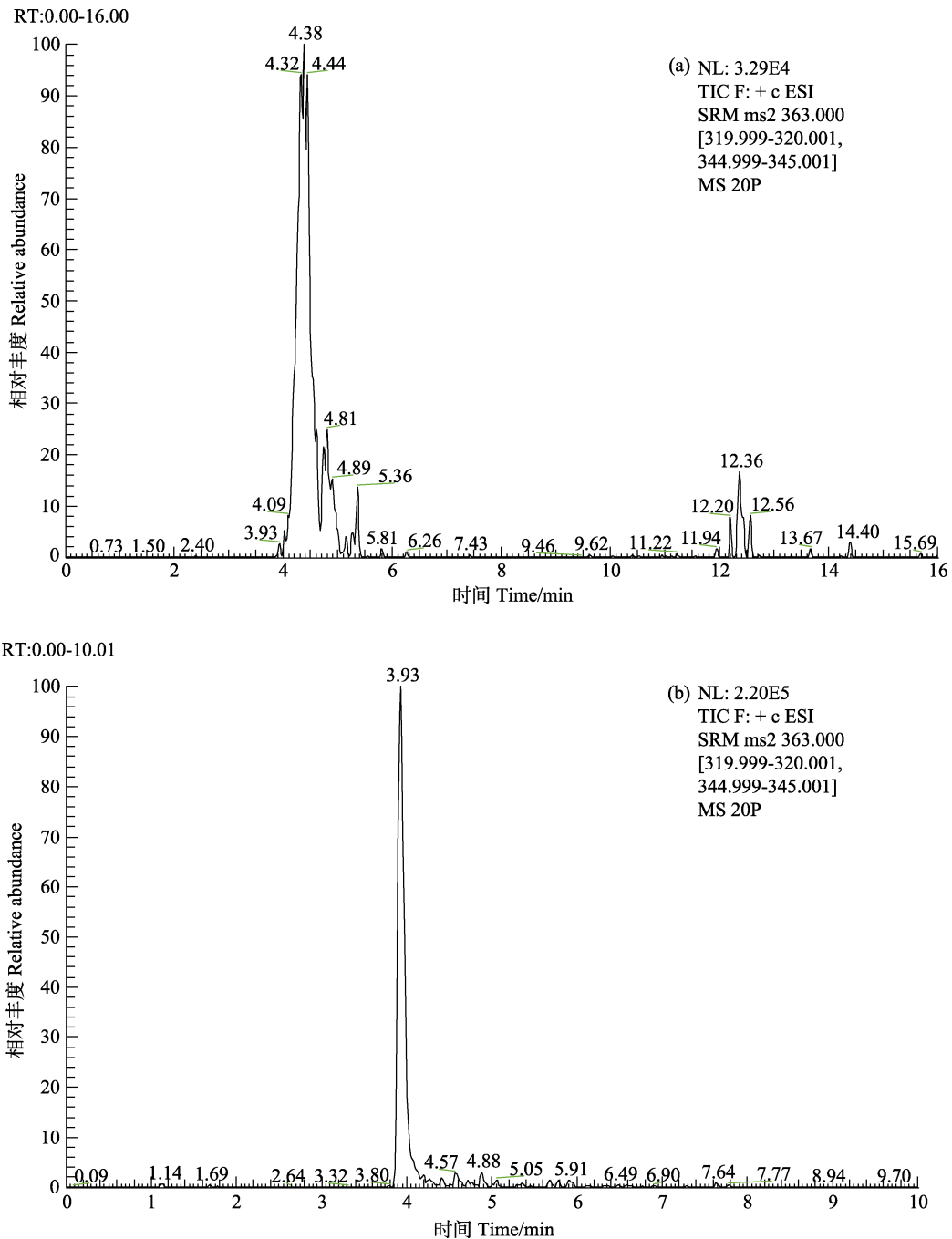


图 3 麻保沙星标准溶液在不同流动相下的色谱图

Fig.3 Chromatogram of standard marbofloxacin in different mobile phase (20 ng/ml)

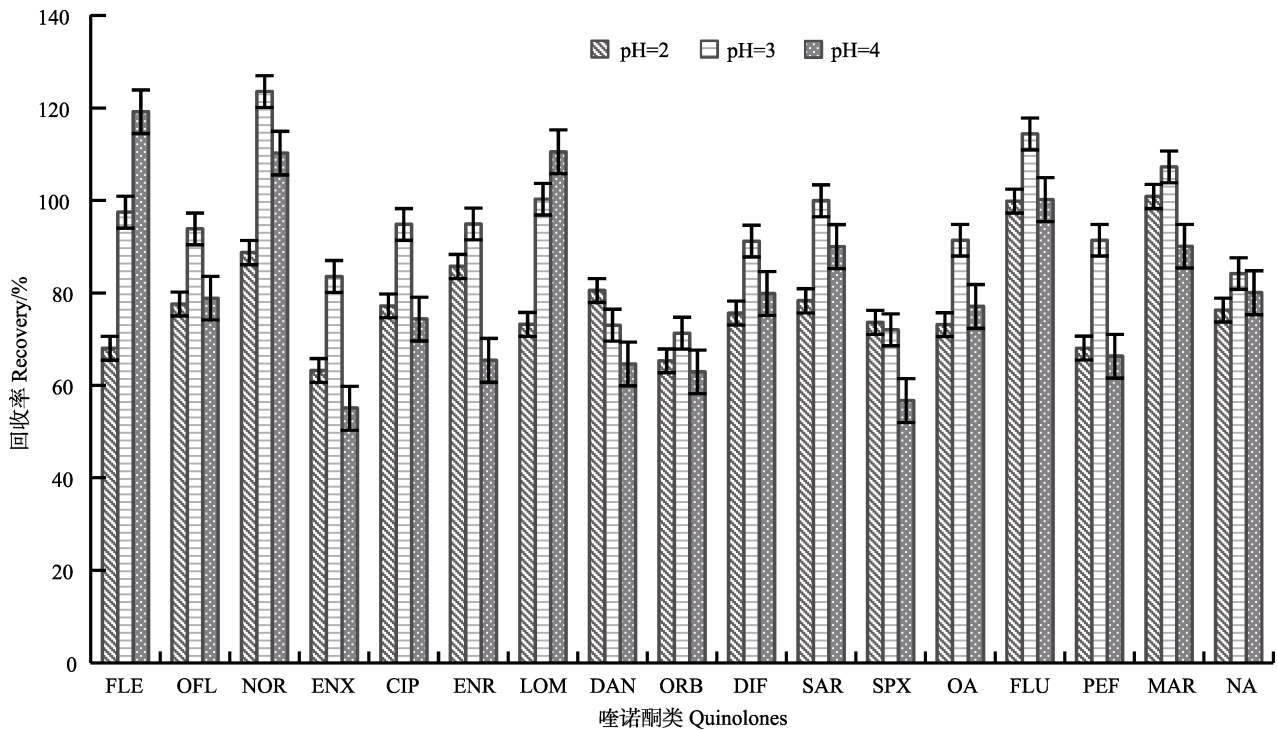


图 4 采用不同 pH 上样溶液时的 17 种喹诺酮的回收率比较
Fig.4 Comparison of 17 quinolones recoveries with loading buffers at different pH

表 3 目标物的线性方程、线性范围、相关系数、方法检出限以及方法定量限
Tab.3 Calibration equations, linear range, correlation coefficients (R^2), detection limits and quantitation limits

序号 No.	化合物 Compound	线性方程 Linear regression equation	仪器线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 R^2 Correlation coefficient	方法检出限 Detection limits (ng/L)	方法定量限 Quantitation limits (ng/L)
1	麻保沙星 Marbofloxacin	$Y=0.0066X+0.0029$	1-200	0.9999	2	5
2	氟罗沙星 Fleroxacin	$Y=0.0580X+0.0515$	1-200	0.9998	2	5
3	依诺沙星 Enoxacin	$Y=0.0438X+0.0187$	5-200	0.9999	10	20
4	氧氟沙星 Ofloxacin	$Y=0.0660X+0.0415$	1-200	0.9999	2	5
5	培氟沙星 Pefloxacin	$Y=0.0352X+0.0214$	5-200	0.9994	10	20
6	诺氟沙星 Norfloxacin	$Y=0.0202X+0.0021$	1-200	0.9992	2	5
7	环丙沙星 Ciprofloxacin	$Y=0.0229X+0.0027$	1-200	0.9997	2	5
8	丹诺沙星 Danofloxacin	$Y=0.0196X+0.0139$	5-200	0.9998	10	20
9	恩诺沙星 Enrofloxacin	$Y=0.0028X-0.0007$	1-200	0.9995	2	5
10	洛美沙星 Lomefloxacin	$Y=0.0372X-0.0394$	1-200	0.9999	2	5
11	奥比沙星 Orbifloxacin	$Y=0.1580X-0.0677$	1-200	0.9991	2	5
12	双氟沙星 Difloxacin	$Y=0.0199X-0.0086$	1-200	0.9998	2	5
13	沙拉沙星 Sarafloxacin	$Y=0.0117X-0.0069$	1-200	0.9998	2	5
14	司帕沙星 Sparfloxacin	$Y=0.0190X+0.0073$	3-200	0.9995	5	10
15	萘啶酸 Nalidixic acid	$Y=0.0208X+0.0164$	3-200	0.9999	5	10
16	噁喹酸 Oxolinic acid	$Y=0.0236X+0.0102$	1-200	0.9993	2	5
17	氟甲喹 Flumequine	$Y=0.0213X+0.0187$	1-200	0.9999	2	5

表4 目标化合物加标回收率以及相对标准偏差
Tab.4 Spiked recoveries and RSDs of the target compounds (n=5)

化合物 Compound	添加水平 Spiked level (ng/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	化合物 Compound	添加水平 Spiked level (ng/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
氟罗沙星 Fleroxacin	20	112.41	11.04	奥比沙星 Orbifloxacin	20	73.05	5.10
	100	81.59	7.26		100	84.66	8.73
	200	97.48	8.09		200	71.33	7.35
依诺沙星 Enoxacin	20	84.02	8.22	双氟沙星 Difloxacin	20	111.21	4.52
	100	80.57	11.60		100	97.01	9.97
	200	83.61	6.10		200	91.24	6.74
氧氟沙星 Ofloxacin	20	103.48	9.63	沙拉沙星 Sarafloxacin	20	110.79	8.25
	100	72.05	5.24		100	100.19	11.72
	200	93.87	10.98		200	99.98	6.76
培氟沙星 Pefloxacin	20	83.63	5.46	司帕沙星 Sparfloxacin	20	83.93	12.18
	100	81.26	7.47		100	71.98	10.16
	200	91.42	7.46		200	72.04	5.38
诺氟沙 Norfloxacin	20	125.00	7.34	萘啶酸 Nalidixic acid	20	111.09	8.42
	100	90.74	8.28		100	113.65	5.47
	200	123.59	5.21		200	84.22	8.72
环丙沙星 Ciprofloxacin	20	108.99	7.65	噁啉酸 Oxolinic acid	20	85.60	12.27
	100	78.10	4.73		100	98.23	8.72
	200	94.86	4.01		200	91.43	7.81
丹诺沙星 Danofloxacin	20	75.88	4.16	氟甲喹 Flumequine	20	86.82	11.32
	100	87.62	10.67		100	87.95	8.94
	200	73.06	10.91		200	114.41	6.67
恩诺沙星 Enrofloxacin	20	102.57	6.03	麻保沙星 Marbofloxacin	20	110.33	8.89
	100	94.76	8.60		100	101.69	9.10
	200	94.94	6.17		200	107.27	2.73
洛美沙星 Lomefloxacin	20	106.36	9.31				
	100	80.62	9.44				
	200	100.32	6.52				

表5 养殖海水中喹诺酮类药物检测结果
Tab.5 Results of quinolones detected in aquaculture seawater samples (ng/L)

取样位置 Sampling location	恩诺沙星 Enrofloxacin	氧氟沙星 Ofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin	环丙沙星 Ciprofloxacin	取样位置 Sampling location	恩诺沙星 Enrofloxacin	氧氟沙星 Ofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin	环丙沙星 Ciprofloxacin
养殖场 A 进水口 Inlet	36.98	24.28	ND	ND	养殖场 C 进水口 Inlet	34.68	ND	ND	ND
养殖场 A 养殖池 Pond	ND	ND	ND	ND	养殖场 C 养殖池 Pond	283.57	ND	60.03	30.03
养殖场 A 出水口 Outlet	87.40	35.63	ND	ND	养殖场 C 出水口 Outlet	6880.05	ND	135.31	79.03
养殖场 B 进水口 Inlet	21.94	ND	ND	ND	养殖场 D 进水口 Inlet	69.25	ND	ND	ND
养殖场 B 养殖池 Pond	ND	ND	ND	ND	养殖场 D 养殖池 Pond	ND	ND	ND	ND
养殖场 B 出水口 Outlet	48.27	ND	71.15	ND	养殖场 D 出水口 Outlet	177.07	ND	ND	34.77

ND: 未检出

ND: Not detected

参 考 文 献

- Du J, Zhao HX, Chen JW. Simultaneous determination of 23 antibiotics in mariculture water using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2015, 33(4): 348-353 [杜鹃, 赵洪霞, 陈景文. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定养殖海水中23种抗生素. 色谱, 2015, 33(4): 348-353]
- Gao LH, Shi YL, Liu JM, *et al.* Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater samples. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(5): 948-953 [高立红, 史亚利, 刘杰民, 等. 污水中氟喹诺酮类抗生素的分析方法. 环境化学, 2010, 29(5): 948-953]
- Gao H, Zu GR, Gu J, *et al.* Simultaneous determination of quinolone antibiotics and estrogens in environmental water samples using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2011, 30(12): 8-12 [高会, 祖国仁, 顾佳, 等. HPLC-MS/MS法联合分析环境水体中喹诺酮类抗生素和雌激素. 分析实验室, 2011, 30(12): 8-12]
- Göbel A, Mc Ardell CS, Suter MJF, *et al.* Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(16): 4756-4764
- Gu HD, Yin YM, Qin HB. Determination of quinolones in water samples by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2013, 25(3): 34-37 [顾海东, 尹燕敏, 秦宏兵. 超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定水中喹诺酮类抗生素. 环境监测管理与技术, 2013, 25(3): 34-37]
- Ho C, Sin DW, Tang HP, *et al.* Determination and on-line clean-up of (fluoro) quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061(2): 123-131
- Hu WJ, Yang SY, Zhu XM. The impact of mariculture on marine ecosystem and studies on bioremediation. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, 46(S1): 197-202 [胡文佳, 杨圣云, 朱小明. 海水养殖对海域生态系统的影响及其生物修复. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(S1): 197-202]
- Li PP, Zhang XJ, Mei GM, *et al.* Determination of quinolones in aquaculture waters by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2015, 42(3): 334-338 [李佩佩, 张小军, 梅光明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱检测养殖水体中喹诺酮类抗生素. 浙江大学学报(理学版), 2015, 42(3): 334-338]
- Nie XP, Wang X, Chen JF. Aquaculture and the residues of environmental xenobiotics and its impacts upon aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, 2007, 30(4): 106-110 [聂湘平, 王翔, 陈菊芳. 水产养殖与有毒有害污染物残留及其环境影响. 环境科学与技术, 2007, 30(4): 106-110]
- Reverté S, Borrull F, Pocurull E, *et al.* Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1010(2): 225-232
- Sun GD, Su ZY, Chen M, *et al.* Simultaneous determination of tetracycline and quinolone antibiotics in environmental water samples using solid phase extraction-ultra pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, 27(1): 54-58 [孙广大, 苏仲毅, 陈猛, 等. 固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱同时分析环境水样中四环素类和喹诺酮类抗生素. 色谱, 2009, 27(1): 54-58]
- Toussaint B, Chedin M, Bordin G, *et al.* Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: I. Laboratory-validated method. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1088(1-2): 32-39
- Wang JQ, Ma JM, Xia X, *et al.* Determination of 13 quinolone antibiotic residues in swine muscle by UPLC-MS/MS. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2014, 35(2): 185-192 [王金秋, 马建民, 夏曦, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肌肉中13种喹诺酮类药物残留. 质谱学报, 2014, 35(2): 185-192]
- Wang KP, Zhang QQ, Guo JS, *et al.* Review of the determination of fluoroquinolones in the environment and its removal from the sewage. *Journal of Safety and Environment*, 2012, 12(2): 104-110 [汪昆平, 章琴琴, 郭劲松, 等. 环境中氟喹诺酮类抗生素残留检测和去除研究进展. 安全与环境学报, 2012, 12(2): 104-110]
- Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, *et al.* The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(8): 2711-2723
- Xu YJ, Gong XH, Zhang XZ, *et al.* Simultaneous determination of 21 sulfonamide residues in seawater by UPLC-MS/MS. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(4): 579-581 [徐英江, 宫向红, 张秀珍, 等. UPLC MS/MS测定海水中21种磺胺类药物残留的研究. 海洋环境科学, 2010, 29(4): 579-581]
- Xu WH, Zhang G, Zou SC, *et al.* Occurrence and seasonal changes of antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China. *Environmental Science*, 2006, 27(12): 2458-2462 [徐维海, 张干, 邹世春, 等. 香港维多利亚港和珠江广州河段水体中抗生素的含量特征及其季节变化. 环境科学, 2006, 27(12): 2458-2462]
- Yang SG, Li ZX, Wang QY, *et al.* Determination of quinolones drug residues in aquacultural seawater using HPLC method. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(2): 95-101 [杨守国, 李兆新, 王清印, 等. 高效液相色谱法检测海水养殖环境中喹诺酮类药物残留. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 95-101]

- Yin YM, Shen YQ, Zhu YF, *et al.* Simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and chloramphenicols in water and sediment samples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Science*, 2015, 31(2): 228–232 [尹燕敏, 沈颖青, 朱月芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水和沉积物中磺胺类、喹诺酮类和氯霉素类抗生素残留. *分析科学学报*, 2015, 31(2): 228–232]
- Zhang RJ, Zhang G, Zheng Q, *et al.* Concentrations and spatial distributions of selected quinolones antibiotics in Laizhou Bay and main rivers flowing into the bay. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(1): 53–57 [张瑞杰, 张干, 郑芊, 等. 喹诺酮类抗生素在莱州湾及主要入海河流中的含量和分布特征. *海洋环境科学*, 2012, 31(1): 53–57]
- Zhou QX, Luo Y, Wang ME. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243–251 [周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染. *生态毒理学报*, 2007, 2(3): 243–251]

(编辑 马璀艳)

Simultaneous Determination of Seventeen Quinolones in Aquaculture Seawater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

DONG Xiao^{1,2}, LI Zhaoxin^①, SUN Xiaojie¹, XING Lihong¹, PENG Jixing¹, SONG Caihu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In this study, we developed a method to determine 17 kinds of quinolones residues in aquaculture seawater by using solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry (SPE-LC/MS/MS). The target antibiotics in water samples were enriched and cleaned-up by solid-phase extraction cartridges after the acidification with hydrochloric acid. We compared the sample recovery under different conditions to find the optimal pH of the loading buffer and the most suitable type and volume of the eluent. The elute was collected and concentrated under a gentle stream of nitrogen gas, and then dissolved into 1 ml liquid by the mobile phase. All antibiotics were separated by gradient elution with the mobile phase of 0.1% formic acid in water and acetonitrile. The targets were then analyzed by LC-MS/MS under the positive electrospray ionization condition in the multiple-reaction-monitoring (MRM) mode. Seventeen kinds of antibiotics can be separated successfully within 10 minutes. Calibration curves for antibiotics exhibited good linearity in the concentration range from 1 to 200 ng/ml and the correlation coefficients were larger than 0.999. The limits of detection (LOD) were 2–10 ng/L and the limits of quantification (LOQ) were 5–20 ng/L. The average recoveries of 17 quinolones at the spiked concentrations of 20 ng/L, 100 ng/L and 200 ng/L were 71.3% to 125.0% with a relative standard deviation (RSD, $n=5$) of 2.44% to 12.27%. This new method was applied to the analysis of four mariculture farms located in the Lingshan Bay of Qingdao in China. The results showed that four kinds of quinolones were detected including enrofloxacin, ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin, and the highest concentration was 6880.05 ng/L. These results suggested that the new method was efficient and reliable, which was suitable for the detection of quinolones in seawater samples.

Key words Quinolones; Solid-phase extraction (SPE); Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); Aquaculture seawater

① Corresponding author: LI Zhaoxin, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

溴氰菊酯对 4 种海水养殖生物的毒性及其积累*

钟硕良^{1,2①} 郑惠东^{1,2} 陈宇锋^{1,2} 许贻斌^{1,2} 姜双城^{1,2} 吴立峰^{1,2}

(1. 福建省水产研究所 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室 厦门 361013;

2. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心 厦门 361013)



摘要 以海水养殖的 2 种甲壳类动物(远海梭子蟹 *Portunus pelagicus*、日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*)和 2 种双壳类动物(文蛤 *Meretrix meretrix*、菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum*)为材料,进行了溴氰菊酯对 4 种海水养殖生物的急性毒性及其积累实验研究。结果显示,4 种海水养殖生物的死亡率与溴氰菊酯浓度及其暴露时间成显著正相关。溴氰菊酯对远海梭子蟹和日本囊对虾的 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀、96 h LC₅₀ 分别为 2.07×10⁻⁴、1.70×10⁻⁴、1.10×10⁻⁴ mg/L 和 7.32×10⁻⁴、3.90×10⁻⁴、1.43×10⁻⁴ mg/L,安全浓度分别为 3.44×10⁻⁵ mg/L 和 3.32×10⁻⁵ mg/L;溴氰菊酯对文蛤和菲律宾蛤仔的 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀、96 h LC₅₀ 分别为 1.52、0.30、0.27 mg/L 和 0.67、0.11、0.06 mg/L,安全浓度分别为 3.51×10⁻³ mg/L 和 9.50×10⁻⁴ mg/L。溴氰菊酯对远海梭子蟹、日本囊对虾的毒性明显大于文蛤和菲律宾蛤仔。文蛤和菲律宾蛤仔在溴氰菊酯平均浓度分别为 0.86–0.05 mg/L 和 0.37–0.03 mg/L 的水体中暴露 24–96 h 时,其对溴氰菊酯的积累系数分别为 2.57–12.40 和 3.03–27.85,文蛤和菲律宾蛤对溴氰菊酯的积累率与暴露时间成正相关,与暴露浓度成负相关。不同种类的海水养殖生物对溴氰菊酯的敏感性及其积累率存在显著差异。

关键词 溴氰菊酯;毒性;积累;海水养殖生物

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0139-09

溴氰菊酯(Deltamethrin, DM)又名敌杀死,是一种含有 α -氰基的 II 型拟除虫菊酯类仿生杀虫剂,以触杀、胃毒为主,杀虫谱广,对机体的神经系统功能具有损害作用。迄今已商品化的菊酯类农药有 50 多种,广泛应用于农作物病虫害防治和水产养殖清塘、毒杀滩涂贝类养殖埋地的敌害生物以及杀灭水产养殖生物寄生虫等方面。菊酯类农药残留通过地下水、陆源径流和清塘废水输入近岸海域,造成海洋与渔业环境污染,严重地危害海洋生物的生存,海洋与渔业污染事故时有发生,也带来水产品质量的安全问题(梅立永等, 2007; 赵李娜等, 2014; Thomas *et al*, 2008)。大部分的菊酯类农药属于环境激素类物质,通过食物链传递,可对人类生理生殖系统产生危害,有些类型还有

致畸、致癌、致突变的作用(郑伟华等, 2004)。

国内外关于拟除虫菊酯类农药对水生生物的急性毒性、亚急性毒性及其作用机理进行了较多的研究,但主要集中于淡水鱼类、甲壳类等方面(王瑞龙等, 2007; 魏华等, 2010; Haverinen *et al*, 2016; 丁正峰等, 2013),而拟除虫菊酯类农药对于海水养殖贝类和虾、蟹类的毒性效应研究较少。迄今为止,仅有拟除虫菊酯类农药对几种海水养殖虾类、贝类的毒性及其体内 ATPase、AChE、GST、SOD、CAT 等酶类活性变化和组织损伤的研究报道(陈碧鹃等, 1997; 谭晓珍等, 2005; 许贻斌等, 2015; 陈宇锋, 2016),但拟除虫菊酯类农药对主要海水养殖甲壳类和双壳类动物的毒性比较及其积累研究尚未见报道。

* 福建省海洋与渔业厅重点项目[闽海渔合同(2010)-02]和福建省海洋经济创新发展区域示范项目(2014FJPT01)共同资助[This work was supported by Key Project Funded by Fujian Provincial Oceanic and Fishery Department [FJOF(2010)-02] and the Regional Demonstration Project of Marine Economic Innovation and Development in Fujian Province (2014FJPT01)]

① 通讯作者: 钟硕良, 教授级高级工程师, E-mail: zsl-5388@163.com

收稿日期: 2016-07-21, 收修改稿日期: 2016-10-31

作者通过室内实验,分别研究了溴氰菊酯对甲壳类动物远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)和双壳类动物文蛤(*Meretrix meretrix*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的毒性及其积累效应,这对于掌握溴氰菊酯对海水养殖生物的毒性机理,确定其在水产养殖中安全用量;客观地评估溴氰菊酯对海水养殖环境和水产品质量安全的风险,为准确地鉴定和处理溴氰菊酯造成的海洋与渔业污染事故提供科学依据,均具有重要的应用价值和现实意义。

1 材料与方法

1.1 实验药品、仪器

溴氰菊酯标准品(99.7%),购自国家标准物质研究中心;2.5%溴氰菊酯乳油,拜耳杭州作物科学有限公司生产,使用前配成1 g/L的母液。丙酮、石油醚、乙酸乙酯、正己烷、环己烷均为色谱纯。安捷伦 6890N型气相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有电子捕获检测器,HP-5 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),R205 旋转蒸发器(上海申生科学仪器有限公司),YGC-36 氮吹仪(成都雅源科技有限公司),80-2B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂),固相萃取装置(上海安谱科学仪器有限公司)、YSI-6920 多参数水质分析仪(美国 YSI 公司)。

1.2 实验动物

远海梭子蟹购自福建漳浦县沙西海水水产养殖场,壳长为(11.90±0.60) cm,体重为(150.5±21.0) g。实验前在体积为 25 m³的室内圆形水泥池内暂养 3–5 d,暂养密度为 0.6–0.8 kg/m³,采用流水式换水。少量多次投喂新鲜的牡蛎肉,投喂量约为其体重的 8%。每天早上将暂养池中水排干,清除残饵和排泄物。

日本囊对虾购自漳浦县前亭对虾养殖场,体长为(12.00±0.90) cm,体重为(11.7±2.7) g。实验前在体积为 10 m³ (20 m²×0.5 m)的水泥池内暂养 3–5 d,暂养密度为 10–20 只/m²。并在暂养池池面遮盖一块双层黑色遮阳网,避免惊扰和阳光直射。每天换水 1 次。早、晚适量投喂 1 次海马牌 2#对虾配合饲料。

文蛤和菲律宾蛤仔均购自漳浦县佛昙海水养殖场,文蛤仔壳长为(4.89±0.30) cm,体重为(29.4±4.8) g,菲律宾蛤仔壳长为(3.75±0.20) cm,体重为(10.8±1.6) g。实验前在室外土池(面积为 1.5 hm²)挂笼暂养 1 周,水体中丰富的浮游植物供贝类摄食。实验前一天移至室内水泥池(面积为 10 m²)中无饵料暂养,暂养密度为

50–60 粒/m²。

1.3 实验用水

实验用水为砂滤、袋滤海水。海水温度范围为 24.20–26.58℃;盐度范围为 31.15–33.80; pH 值范围为 7.95–8.12,溶解氧含量范围为 5.96–6.55 mg/L。

1.4 实验方法

1.4.1 急性毒性实验 溴氰菊酯对 4 种海水养殖生物急性毒性实验按 GB/T16310.1-1996《船舶散装运输液体化学品危害性评价规范水生生物急性毒性试验方法》进行。远海梭子蟹和日本囊对虾的实验容器分别为体积 1.00 m³的室内水泥池和体积 0.08 m³的玻璃水族箱;文蛤和菲律宾蛤仔的实验容器均为体积 0.06 m³玻璃水族箱。根据溴氰菊酯对 4 种实验动物毒性预实验得出的 24 h 全部死亡和 96 h 全部存活的浓度范围,在正式实验时,在此范围内按等对数间距设置 7 个浓度组,其浓度梯度见图 1、图 2。每组设 2 个平行。挑选规格均匀、健康的 4 种海水养殖生物作为实验对象,每组放入实验动物 10 只/粒。实验期间不投饵,24 h 不间断微量充气。采用半静水式换水补药方法,每隔 24 h 换水 1 次,重新投药。实验开始后,前 8 h 内连续观察,以后定时或不定时地进行观察,并于 24 h、48 h、72 h 和 96 h 分别记录实验动物的死亡数。贝类死亡检查:将贝类与地面轻轻碰撞,活的贝类发出沉闷的声音,死亡的贝类则为空谷的声音。并用指甲轻抠其两壳缝隙,死亡贝类的双壳会有所松动,活的贝类双壳则依然紧闭。将死亡个体清除并记录死亡数。

实验期间,用 YSI-6920 多参数水质分析仪每天测定 1 次水温、盐度、pH、DO 等理化因子,4 种受试动物水体中水温范围为 24.41–27.66℃;盐度范围为 31.30–33.78; pH 值范围为 7.48–8.04,溶解氧含量范围为 4.71–6.42 mg/L。

1.4.2 实验动物溴氰菊酯的积累实验 甲壳类的实验容器为 1.0 m³的室内水泥池,双壳类的实验容器为 0.08 m³的玻璃水族箱,分别放入 20 只远海梭子蟹和 40 尾日本囊对虾、30 粒文蛤和 50 粒菲律宾蛤仔。所有实验水体中分别设置 4 个溴氰菊酯浓度梯度,实验条件与正式实验相同。在实验水体中加入溴氰菊酯使用液混匀后和实验经 24 h 换水时,分别采集 1 次水样,放入冰箱 4–5℃冷藏。采集经暴露 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后存活的 4 种实验动物样品,放于–10~–20℃冷冻保存。水样中溴氰菊酯含量分析采用《生活饮用水标准检验方法农药指标》(GB/T5750.9–2006)中的方法(中华人民共和国质量监督检验检疫总局等,2006);

受试动物样品取肌肉组织, 匀浆。肌肉中溴氰菊酯含量分析采用《动物性食品中有机氯农药和拟虫菊酯农药多组分残留量的测定》(GB/T5009.162-2008)中的方法(全国农药标准化技术委员会, 2009)。

1.5 计算方法

1.5.1 半致死浓度及安全浓度计算 采用 SPSS 18.0 软件, 计算得出受试动物死亡百分率的概率单位与实验浓度对数的回归方程, 求出半致死浓度(LC₅₀)。安全浓度(SC)采用特伦堡(Turubell)的安全浓度计算公式(陈宇锋, 2016):

$$SC = 48 \text{ h LC}_{50} \times 0.3 / (24 \text{ h LC}_{50} / 48 \text{ h LC}_{50})^2 \quad (1)$$

1.5.2 实验生物体中溴氰菊酯的积累系数计算 由于溴氰菊酯在水中较易挥发和降解, 实验过程中浓度处于持续衰减状态。故采用实验水体中溴氰菊酯的初始浓度与实验经 24 h 换水时的浓度的平均值作受试动物吸收积累过程中水体中的浓度, 其积累系数公式:

$$\overline{C_W} = (C_{w0} + C_{w1}) / 2 \quad (2)$$

$$SCF = C_A / \overline{C_W} \quad (3)$$

式(2)、式(3)中, C_A 为经过某实验时间受试动物体内溴氰菊酯的浓度; C_{w0} 为实验水体中溴氰菊酯的初始浓度; C_{w1} 为实验经 24 h 换水时水体中溴氰菊酯的浓度; $\overline{C_W}$ 为 C_{w0} 和 C_{w1} 的平均浓度; SCF 为受试动物体内溴氰菊酯的积累系数。

2 结果与分析

2.1 溴氰菊酯对甲壳类动物的毒性

如图 1 所示, 在远海梭子蟹和日本囊对虾的实

验水体中, 溴氰菊酯浓度分别在 5.00×10^{-5} – 3.15×10^{-4} mg/L 和 1.25×10^{-4} – 1.25×10^{-3} mg/L 范围内, 随着浓度的提高, 各实验组远海梭子蟹和日本囊对虾的死亡率随之上升, 二者呈显著正相关。在溴氰菊酯浓度分别为 1.50×10^{-4} – 3.15×10^{-4} mg/L 和 7.90×10^{-4} – 1.25×10^{-3} mg/L 的高浓度组, 短时间内(24 h)远海梭子蟹和日本囊对虾的死亡率分别达 40%–80%和 40%–85%; 在溴氰菊酯浓度分别为 5.00×10^{-5} – 1.05×10^{-4} mg/L 和 1.25×10^{-4} – 2.00×10^{-4} mg/L 的低浓度组, 远海梭子蟹和日本囊对虾陆续发生死亡, 96 h 内死亡率分别达 20%–40%和 50%–60%, 且远海梭子蟹和日本囊对虾的暴露时间越长, 死亡率越高, 二者呈显著正相关。

表 1 为不同时间下, 溴氰菊酯浓度对数–甲壳类死亡率概率单位的回归方程, 并进行了回归方程的相关系数 R 和回归系数的显著性检验, 据此计算出溴氰菊酯对远海梭子蟹和日本囊对虾的 24 h LC₅₀、48 h LC₅₀、72 h LC₅₀、96 h LC₅₀ 分别为 2.07×10^{-4} 、 1.70×10^{-4} 、 1.27×10^{-4} 、 1.10×10^{-4} mg/L 和 7.32×10^{-4} 、 3.90×10^{-4} 、 1.93×10^{-4} 和 1.43×10^{-4} mg/L, 并根据 Turubell 的安全浓度计算公式, 计算出溴氰菊酯对远海梭子蟹和日本囊对虾的安全浓度分别为 3.44×10^{-5} 和 3.32×10^{-5} mg/L。

甲壳类动物的溴氰菊酯中毒反应症状具有一定的共性。实验开始时, 在低浓度溴氰菊酯实验组中, 远海梭子蟹均在池底爬行, 日本囊对虾在玻璃水族箱底部水层聚集、游动、活动正常, 与对照组无明显差异。随着暴露时间的延长, 4 h 后小部分的远海梭子蟹的螯足、步足间歇性抽搐, 48 h 后出现少量死亡,

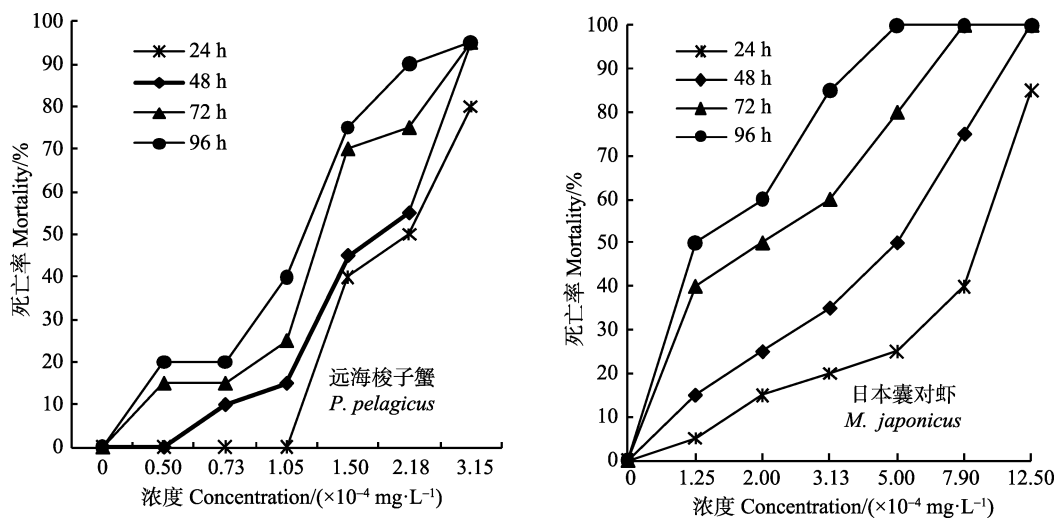


图 1 不同溴氰菊酯浓度下甲壳类动物的死亡率

Fig.1 Mortalities of the crustacean exposed to different concentrations of deltamethrin

表1 不同时间下溴氰菊酯对甲壳类动物的LC₅₀值
Tab.1 LC₅₀ values of deltamethrin to the crustacean at different exposure time

实验动物 Experimental animals	时间 Time (h)	回归方程 Regression equation	相关系数 R	半致死浓度 LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 Confidence-interval(mg/L)
远海梭子蟹 <i>P. pelagicu</i>	24	$P=5.209C+19.190$	0.9539**	2.07×10^{-4}	$1.64 \times 10^{-4} - 2.82 \times 10^{-4}$
	48	$P=4.160C+15.684$	0.9241**	1.70×10^{-4}	$1.25 \times 10^{-4} - 2.58 \times 10^{-4}$
	72	$P=3.497C+13.624$	0.9592**	1.27×10^{-4}	$9.49 \times 10^{-5} - 1.72 \times 10^{-4}$
	96	$P=3.604C+14.261$	0.9612**	1.10×10^{-4}	$7.98 \times 10^{-5} - 1.49 \times 10^{-4}$
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	24	$P=2.294C+7.192$	0.9354**	7.32×10^{-4}	$4.83 \times 10^{-4} - 1.72 \times 10^{-3}$
	48	$P=2.606C+8.885$	0.9854**	3.90×10^{-4}	$2.71 \times 10^{-4} - 5.68 \times 10^{-4}$
	72	$P=2.595C+9.639$	0.9747**	1.93×10^{-4}	$1.03 \times 10^{-5} - 2.72 \times 10^{-4}$
	96	$P=3.470C+13.342$	0.9550*	1.43×10^{-4}	$9.05 \times 10^{-5} - 1.81 \times 10^{-4}$

注: *和**分别为在0.05和0.01水平上存在显著差异。P为死亡率概率单位, C为溴氰菊酯浓度对数, 下同

Notes: * indicated significant differences ($P < 0.05$), ** indicated highly significant differences ($P < 0.01$), P: The probability unit of mortality; C: The logarithm of concentration of deltamethrin. The same as below

死亡个体的断足率很低,一般为趴在池底、步足松开。日本囊对虾则活力逐渐减弱,对外界刺激反应迟钝,躯体弓形侧倒,步足抽搐、微微颤抖,24 h后出现少量死亡。在高浓度溴氰菊酯实验组中,经1-2 h后,远海梭子蟹便出现行为异常,主要表现为急躁不安,间歇性上游,同时伴有呼吸困难,附肢间歇性抽搐,螯足、步足部分断开,断足率随着溴氰菊酯浓度的升高而增加。日本囊对虾则出现急躁不安,间歇性的急促游动,偶有跳跃撞壁,随之活力逐渐减弱,体色发红,躯体肌肉僵直,附肢抽搐、张开,短时间内(24 h)出现大量死亡。

2.2 溴氰菊酯对双壳类动物的毒性

如图2所示,在文蛤和菲律宾蛤仔养殖水体中,溴氰菊酯浓度分别为0.25-2.50 mg/L和0.05-

2.00 mg/L,随着浓度的提高,各实验组文蛤和菲律宾蛤仔的死亡率随之增加,二者呈显著正相关。在溴氰菊酯浓度分别为1.00-2.50 mg/L和0.95-2.00 mg/L的高浓度组,24 h内便发生文蛤和菲律宾蛤仔的大量死亡,死亡率分别达45%-70%和50%-75%,48 h后,文蛤和菲律宾蛤仔几乎全部死亡;在溴氰菊酯浓度分别为0.25-0.40 mg/L和0.05-0.10 mg/L的低浓度组,文蛤和菲律宾蛤仔陆续发生死亡,96 h内死亡率分别达40%-90%和45%-75%,且文蛤和菲律宾蛤仔的曝露时间越长,死亡率越高,二者呈显著正相关。

表2为不同时间下,溴氰菊酯浓度对数-双壳类死亡率概率单位的回归方程,并进行了回归方程的相关系数R和回归系数的显著性检验,据此计算出溴氰菊酯对文蛤和菲律宾蛤仔的24 h LC₅₀、48 h LC₅₀、

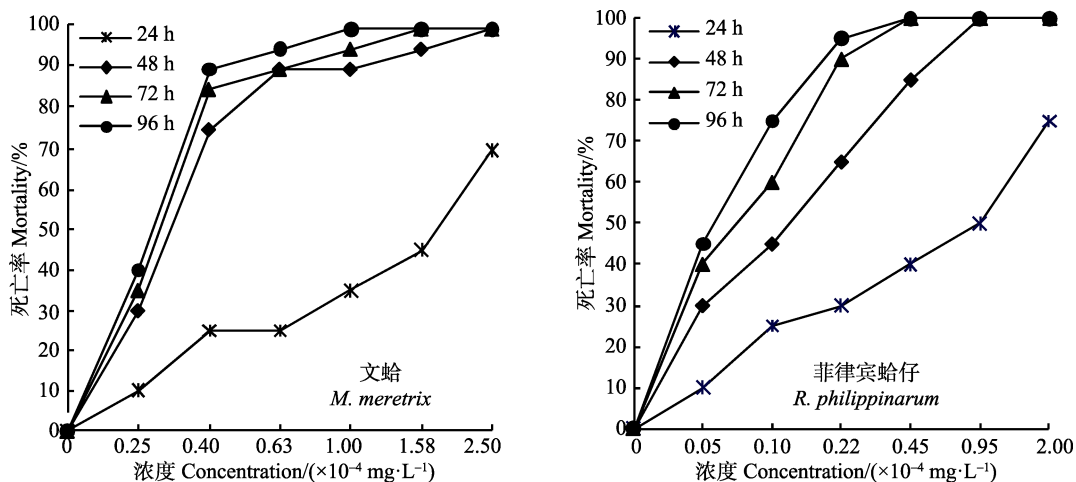


图2 不同溴氰菊酯浓度下双壳类动物的死亡率

Fig.2 Mortalities of the bivalve exposed to different concentrations of deltamethrin

表 2 不同时间下溴氰菊酯对双壳类动物的 LC₅₀ 值
Tab.2 LC₅₀ values of deltamethrin to the bivalves at different exposure time

实验动物 Experimental animals	时间 Time (h)	回归方程 Regression equation	相关系数 R	半致死浓度 LC ₅₀ (mg/L)	95%置信区间 Confidence-interval(mg/L)
文蛤 <i>M. meretrix</i>	24	$P=1.555C-0.2815$	0.9644**	1.52	1.10–2.61
	48	$P=2.865C+1.5045$	0.9149*	0.30	0.12–0.43
	72	$P=3.718C+2.0711$	0.9220*	0.28	0.15–0.37
	96	$P=5.465C+3.1318$	0.9471*	0.27	0.21–0.31
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	24	$P=1.051C+0.1865$	0.9752**	0.67	0.52–0.90
	48	$P=1.955C+1.8598$	0.9945**	0.11	0.07–0.15
	72	$P=2.666C+3.0887$	0.9879**	0.07	0.06–0.08
	96	$P=2.884C+3.5982$	0.9995*	0.06	0.05–0.07

72 h LC₅₀、96 h LC₅₀ 分别为 1.52、0.30、0.28、0.27 mg/L 和 0.67、0.11、0.07、0.06 mg/L, 并依据 Turubell 的安全浓度计算公式, 计算出溴氰菊酯对文蛤和菲律宾蛤仔的安全浓度分别为 3.51×10^{-3} mg/L 和 9.50×10^{-4} mg/L。

双壳类动物的溴氰菊酯中毒反应症状基本相似。在低浓度溴氰菊酯实验组中, 实验开始时, 水体透明, 文蛤微微张开双壳, 斧足自然伸出。菲律宾蛤仔的斧足和水管均能自然伸出, 处于正常活动状态, 与对照组无明显差异。随着暴露时间的延长, 2 种贝类逐渐呈现迷昏麻痹状态, 表现为对外物触及时不敏感, 反应迟钝, 受刺激后贝壳不能快速关闭, 经 24 h 后出现少量死亡。在高浓度溴氰菊酯实验组中, 水体呈现乳白色浑浊, 2 种贝类贝壳紧闭, 斧足和水管无伸缩能力, 过滤活动基本停止, 呈现麻痹中毒状态。在中毒后期, 双壳类闭壳肌萎缩、松弛, 水管萎缩、下垂, 外套膜极度收缩, 贝壳微微张开不能闭合, 受刺激后无闭壳反应, 短时间内(24 h)出现大量死亡。

2.3 溴氰菊酯在甲壳类和双壳类动物体内的积累

如表 3 所示, 由于远海梭子蟹、日本囊对虾实验水体中溴氰菊酯的初始浓度和实验经 24 h 换水时的浓度均低于检出限(为未检出), 故无法计算其生物积累系数(SCF)来评估其对实验水体中不同浓度溴氰菊酯的积累率。在 24–96 h 后, 文蛤暴露在平均浓度为 0.86–0.05 mg/L 溴氰菊酯水体中, 其对溴氰菊酯的 SCF 为 2.57–12.40; 菲律宾蛤仔暴露在溴氰菊酯平均浓度为 0.37–0.03 mg/L 水体中, 其对溴氰菊酯的 SCF 为 3.03–27.85。文蛤和菲律宾蛤仔暴露 48 h、72 h、96 h 时与暴露 24 h 时相比, 水体中溴氰菊酯平均浓度前者分别为后者的 63.20%、13.20%、6.08%和 17.80%、9.73%、7.30%, 其对溴氰菊酯的 SCF 前者比后者则

表 3 溴氰菊酯在甲壳类和双壳类动物体内的积累
Tab.3 The bioaccumulation of deltamethrin in the crustacean and bivalve

实验动物 Experimental animals	项目 Items	暴露时间 Exposure time(h)			
		24	48	72	96
远海梭子蟹 <i>P. pelagicus</i>	C_{w0} (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	C_{w1} (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	\overline{C}_W (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	C_A (mg/kg)	0.02	ND	0.02	ND
	SCF	—	—	—	—
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	C_{w0} (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	C_{w1} (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	\overline{C}_W (mg/L)	ND	ND	ND	ND
	C_A (mg/kg)	0.01	ND	0.03	ND
	SCF	—	—	—	—
文蛤 <i>M. meretrix</i>	C_{w0} (mg/L)	1.20	0.74	0.16	0.08
	C_{w1} (mg/L)	0.51	0.34	0.07	0.02
	\overline{C}_W (mg/L)	0.86	0.54	0.11	0.05
	C_A (mg/kg)	2.20	2.11	1.05	0.65
	SCF	2.57	3.91	9.29	12.40
菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	C_{w0} (mg/L)	0.49	0.08	0.06	0.05
	C_{w1} (mg/L)	0.25	0.05	0.01	0.01
	\overline{C}_W (mg/L)	0.37	0.07	0.04	0.03
	C_A (mg/kg)	1.12	0.59	0.95	0.75
	SCF	3.03	8.88	26.80	27.85

注: ND 为未检出; — 为无 SCF 值

Notes: ND indicated not detected; “—” indicated no SCF value

分别高 0.52、2.61、3.82 倍和 1.93、7.84、8.27 倍。由此表明, 在一定的溴氰菊酯浓度范围内, 双壳类动物对水体中溴氰菊酯的积累率随暴露时间的延长而

增大,二者成正相关;随暴露浓度的升高而减少,二者成负相关。

3 讨论

3.1 甲壳类和双壳类动物的溴氰菊酯中毒症状及其毒性机理

本研究中,甲壳类动物暴露于较高浓度的溴氰菊酯水体中,日本囊对虾表现出急躁不安,间歇性的急促游动并跳跃撞壁,随后躯体弓形侧躺,步足抽搐,僵硬张开等症状。这与多种鱼类如唐鱼(*Tanichthys albonubes*)、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)等暴露在一定浓度的菊酯类农药水体中表现出急躁、狂游、撞壁、抽搐等典型的神经性中毒症状极为相似(王瑞龙等, 2007; Rukiye *et al.*, 2003; Khalili *et al.*, 2012; 夏晓华等, 2013)。远海梭子蟹表现出呼吸困难,侧翻于池底,步足间歇性抽搐,部分或全部的鳌足和步足断开脱落等症状。这与锯缘青蟹(*Scylla serrata*)在杀灭菊酯中毒后,出现自断步足的现象(吴琴瑟等, 1993),以及河蟹(*Chinese mitten crabe*)在溴氰菊酯中毒后,四肢无力或有微微颤抖,个别出现附肢脱落的症状(耿雪冰等, 2009)一致。双壳类动物文蛤和菲律宾蛤仔的溴氰菊酯中毒症状,表现为贝壳紧闭、外套膜明显收缩,水管和斧足伸缩无力,最后闭壳肌萎缩、松弛,双壳无法闭合等症状。这与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)暴露在高浓度氰戊菊酯(0.13 mg/L)水体中时,呈现出外套膜极度收缩,鳃呈暗褐色,受刺激后仅在外套膜边缘有轻微的收缩反应,但无闭壳反应的症状(谭晓珍等, 2005)基本相似。

由于菊酯类农药属于神经毒剂,目前普遍认为,其作用机制主要是通过对受试生物体内钠泵的干扰使神经膜动作电位的去极化期延长,周围神经也出现重复电位而造成肌肉的持续收缩,抑制脑突触膜上的ATPase,使突触后膜上的乙酰胆碱酯酶(AchE)等神经递质大量聚集,从而引起脑AchE被抑制。造成机体内在的代谢和神经传导功能紊乱、蛋白失活、自由基大量爆发等一系列的机体损伤(Burridge *et al.*, 2000; 王朝晖等, 2000),从而导致受试生物大量死亡。溴氰菊酯对受试生物的毒性机理除主要表现为神经性中毒外,溴氰菊酯可以造成克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肌细胞超微结构损伤,激活细胞的厌氧呼吸,在组织中产生大量的乳酸,乳酸的蓄积会造成细胞酸化而加重对细胞的毒性,造成克氏原螯虾的死亡(吴楠等, 2015)。溴氰菊酯通过对菲律宾蛤仔

淋巴液中AchE、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 和肝脏、鳃中GST活性的抑制,导致其机体正常功能受到了严重干扰,肝脏和鳃的组织细胞受损、甚至坏死,并通过损伤菲律宾蛤仔的鳃组织和消化盲囊细胞影响菲律宾蛤仔的新陈代谢,包括细胞免疫酶的反应,进而导致菲律宾蛤仔的死亡(许贻斌等, 2015)。

3.2 溴氰菊酯对甲壳类和双壳类动物的毒性效应

溴氰菊酯对同类不同种实验动物的毒性存在明显的种间差异。从表1、表2中溴氰菊酯对远海梭子蟹、日本囊对虾和文蛤、菲律宾蛤的24 h、48 h、72 h、96 h半致死浓度及其安全浓度可看出,同为甲壳类动物,溴氰菊酯对远海梭子蟹的毒性稍高于日本囊对虾;同为双壳类动物,溴氰菊酯对菲律宾蛤仔的毒性显著高于文蛤。总体上,溴氰菊酯对甲壳类动物远海梭子蟹、日本囊对虾的毒性明显高于双壳类动物文蛤、菲律宾蛤仔。这可能是甲壳类和双壳类动物的内部生理结构和生活习性存在较大差异,导致其自身防御系统对溴氰菊酯毒害的抵御能力各不相同。在急性毒性实验水体中,双壳类动物较长时间内双壳紧闭,尽量减少呼吸与摄食以抵御溴氰菊酯的毒害,而甲壳类动物则一直保持呼吸与摄食,对于水体中溴氰菊酯的毒害基本无力回避。

目前,菊酯类农药对甲壳类动物的毒性效应研究较多,据报道,在海水甲壳类动物中,氯氰菊酯对成体龙虾(*Panulirus stimpsoni holthuis*)的96 h LC_{50} 为0.104 $\mu\text{g/L}$;溴氰菊酯对平均体重为4.6 g的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的96 h LC_{50} 为0.0714 $\mu\text{g/L}$;氰戊菊酯对日本囊对虾的96 h LC_{50} 为0.310 $\mu\text{g/L}$ (Burridge *et al.*, 2000; 冷春梅等, 2009; 陈宇锋, 2016)。氯氰菊酯对成体龙虾的毒性与本研究中溴氰菊酯对日本囊对虾的毒性(96 h LC_{50} 为0.143 $\mu\text{g/L}$)相近。在淡水甲壳类动物中,溴氰菊酯对日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)的24 h LC_{50} 为0.14 $\mu\text{g/L}$;对克氏原螯虾的24 h LC_{50} 和96 h LC_{50} 分别为0.156 $\mu\text{g/L}$ 和0.0562 $\mu\text{g/L}$;对河蟹成体的96 h LC_{50} 为0.65 $\mu\text{g/L}$;氯氰菊酯对中华米虾(*Caridina denticulata sinensis*)96 h LC_{50} 为0.077 $\mu\text{g/L}$ (龚瑞忠等, 1996, 魏华等, 2010; 王宏伟等, 2009; 耿雪冰等, 2009)。由此表明,生活在海水或淡水环境中不同种甲壳类动物对菊酯类农药的敏感性存在较大的差异,总体上,淡水虾类对菊酯类农药比海水虾类更为敏感。菊酯类农药对双壳类动物的毒性效应研究较少,据报道,氯氰菊酯和氰戊菊酯对栉孔扇贝的96 h LC_{50} 分别为0.124 mg/L和1.17 mg/L;氰戊菊酯对紫贻贝(*Mytilus edulis*)和

栉孔扇贝的96 h LC₅₀分别为1.28 mg/L和0.30 mg/L(谭晓珍等, 2005; 陈碧鹃等, 1997)。本研究得出的溴氰菊酯对文蛤的毒性(96 h LC₅₀为0.27 mg/L)与陈碧鹃等(1997)报道的氰戊菊酯对栉孔扇贝的毒性相近, 而菲律宾蛤仔对菊酯类农药与栉孔扇贝、紫贻贝和文蛤相比更敏感。上述研究结果显示, 氰戊菊酯对栉孔扇贝的毒性差异较大, 可能与实验生物的规格、暂养时间及实验水温、pH、DO等理化因子的影响有关。农药对鱼类的96 h LC₅₀<1.0 mg/L, 毒性级别为极高毒(周凤霞, 2006), 故溴氰菊酯对文蛤和菲律宾蛤仔的毒性总体为鱼类的极高毒级别, 对日本囊对虾和远海梭子蟹的毒性远高于鱼类的极高毒级别。

3.3 甲壳类和双壳类动物对溴氰菊酯的积累效应

海洋生物对有机农药的积累是一个缓慢的过程。由于溴氰菊酯在水中较易挥发和降解, 实验过程中其浓度处于持续衰减状态。用实验水体中溴氰菊酯的初始浓度与24 h后换水时浓度的平均值作受试动物吸收积累过程中实验水体中的浓度计算积累系数, 较能真实地反映受试动物对溴氰菊酯的积累能力。本研究中, 由于远海梭子蟹、日本囊对虾对溴氰菊酯极为敏感, 加入其实验水体中的溴氰菊酯浓度均低于方法检出限(1.0 μg/L), 实验水体中溴氰菊酯均未检出, 故未能计算其对溴氰菊酯的积累系数, 须待水体中溴氰菊酯检测方法改进后, 方能进行远海梭子蟹、日本囊对虾对溴氰菊酯的积累研究。文蛤、菲律宾蛤仔在溴氰菊酯平均浓度分别为0.86–0.05 mg/L和0.37–0.03 mg/L的水体中暴露24–96 h时, 其对溴氰菊酯的积累率与暴露时间成正相关, 与暴露浓度成负相关。这可能是在高浓度溴氰菊酯水体中双壳类动物急性中毒后活力骤降, 双壳紧闭, 基本停止呼吸和摄食, 短时间内发生大量死亡, 不利于其对水体中溴氰菊酯的吸收与积累, 从而造成其体内溴氰菊酯的积累率较低; 而在低浓度溴氰菊酯水体中双壳类动物逐渐适应, 尚能进行呼吸和摄食活动, 将水体中溴氰菊酯不断吸收、富集于体内, 从而导致其体内溴氰菊酯的积累率较高, 且受试动物在实验水体中暴露存活时间越长, 对水体中溴氰菊酯的吸收和积累越多, 其体内溴氰菊酯的积累率就越高。

水生生物对水体中菊酯类农药的积累研究较少, 李娟英等(2015)研究表明, 菲律宾蛤仔对沉积物间隙水中浓度为0.023–0.255 μg/L的4种菊酯类农药积累28 d后的积累系数为27.8–301。奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)对水体中浓度为2.0–10.0 μg/L的溴氰菊酯的积累15 d后, 在其肌肉和肝脏中积累含量

分别为3.70–6.57 μg/kg和3.70–7.12 μg/kg, 最大积累系数分别为1.85和2.20, 15–20 d达到累积–释放的动态平衡(吴伟等, 2006)。将白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)暴露在3 μg/L的甲氰菊酯溶液中2 h后, 鱼体肌肉内甲氰菊酯含量达0.020 μg/kg, 随后含量直线上升, 在暴露8 h后达最高值0.0412 μg/kg, 生物积累系数为411.3(王朝晖等, 2000)。由此表明, 不同种类的水生生物对水体中菊酯类农药的积累能力存在明显的种间差异。

已有研究表明, 含有α-氰基的拟除虫菊酯类农药毒性较大, 有卤原子取代则毒性更高, 且毒性随卤原子分子量的增加而增加(张征等, 2006; Ensibi *et al.*, 2014), 对甲壳类和双壳类动物的毒性为极高毒或高毒。建议在养殖区附近应慎用含有α-氰基的溴氰菊酯、氯氰菊酯等拟除虫菊酯类农药, 尽量使用甲醚菊酯、胺菊酯、二氯戊菊酯等不含α-氰基等对水生动物毒性较低的拟除虫菊酯类农药。

参 考 文 献

- Burridge LE, Haya K, Waddy SL, *et al.* The lethality of anti-sea lice formulations Salmosan (Azamethiphos) and Escis (Cypermethrin) to stage IV and adult lobsters (*Homarus americanus*) during repeated short-term exposures. *Aquaculture*, 2000, 182(1–2): 27–35
- Chen BJ, Chen MS, Wu ZK. Study on the toxicity of fenvalerate and tetramethrin to ocean algae and shellfish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1997, 4(2): 51–55 [陈碧鹃, 陈民山, 吴彰宽. 氰戊菊酯、胺菊酯对海洋藻类、贝类的毒性研究. *中国水产科学*, 1997, 4(2): 51–55]
- Chen YF. Acute toxicity of fenvalerate and ethofenprox on *Penaeus japonicus*. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(2): 126–131 [陈宇锋. 氰戊菊酯、醚菊酯对日本囊对虾的急性毒性. *渔业研究*, 2016, 38(2): 126–131]
- Ding ZF, Shi YB, Li XX, *et al.* Toxic effects of fenvalerate on *Odontobutis potamophila* juveniles. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2013, 29(3): 357–363 [丁正峰, 史阳白, 李潇轩, 等. 氰戊菊酯对河川沙塘鳢幼鱼的毒性效应. *生态与农村环境学报*, 2013, 29(3): 357–363]
- Ensibi C, Hernández-Moreno D, Santiyán MPM, *et al.* Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. *Environmental Toxicology*, 2014, 29(4): 386–393
- General Administration Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 5750. 9–2006 Standard examination methods for drinking water—Pesticides parameters. Beijing: China Standard Press, 2006 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法农药

- 指标(GB/T5750-2006). 北京: 中国标准出版社, 2006]
- Geng XB, Shen MF, Wu GH, *et al.* Acute toxicity effects of Chinese mitten crabs on deltamethrin. *Journal of Aquaculture*, 2009, 30(10): 48-50 [耿雪冰, 沈美芳, 吴光红, 等. 溴氰菊酯对河蟹的急性毒性研究. *水产养殖*, 2009, 30(10): 48-50]
- Gong RZ, Cai DJ, Zhong QY. Study on toxicity and safety evaluation of deltamethrin on fish and shrimp. *Rural Eco-Environment*, 1996, 12(12): 29-32, 50 [龚瑞忠, 蔡道基, 钟巧云. 溴氰菊酯对鱼虾的毒性与安全评价研究. *农村生态环境*, 1996, 12(1): 29-32, 50]
- Haverinen J, Vornanen M. Deltamethrin is toxic to the fish (crucian carp, *Carassius carassius*) heart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 129: 36-42
- Khalili M, Khaleghi SR, Hedayati A. Acute toxicity test of two pesticides diazinon and deltamethrin, on swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Global Veterinaria*, 2012, 8(5): 541-545
- Leng CM, Chen JZ, Gong JX, *et al.* Deltamethrin degradation in water environment and its toxicity to three aquatic animals. *Environmental Protection Science*, 2009, 35(4): 43-45, 53 [冷春梅, 陈家长, 巩俊霞, 等. 溴氰菊酯在水环境中的降解及对三种水生动物的毒性. *环境保护科学*, 2009, 35(4): 43-45, 53]
- Li JY, Li ZH, Cui Y, *et al.* Biomimetic research on bio-availability and bioaccumulation of sediment-associated pyrethroids using solid-phase microextraction. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(3): 144-152 [李娟英, 李振华, 崔昱, 等. 固相微萃取在评价沉积物中菊酯类农药生物有效性及生物累积中的仿生研究. *生态毒理学报*, 2015, 10(3): 144-152]
- Mei LY, Zhao ZJ, Yin X, *et al.* Simulating the environment behavior and fate of synthetic Pyrethroids. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2316-2322 [梅立永, 赵智杰, 尹璇, 等. 拟除虫菊酯类农药环境行为与归趋模拟. *农业环境科学学报*, 2007, 26(6): 2316-2322]
- National Pesticide Standardization Technical Committees. *Pesticide standard assembly*. Beijing: China Standard Press, 2009 [全国农药标准化技术委员会. *农药标准汇编*. 北京: 中国标准出版社, 2009]
- Rukiye V, Figen UE, Hilal P, *et al.* Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 55(1): 82-85
- Tan XZ, Wu Y, Li T, *et al.* Acute toxicity of cypermethrin and fenvalerate to scallop (*Chlamys farreri*). *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(3): 203-207 [谭晓珍, 吴垠, 李韬, 等. 氯氰菊酯和氰戊菊酯对栉孔扇贝的急性毒性试验研究. *大连水产学院学报*, 2005, 20(3): 203-207]
- Thomas CR, Hose GC, Warne MS, *et al.* Effects of river water and salinity on the toxicity of deltamethrin to freshwater shrimp, cladoceran, and fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55(4): 610-618
- Wang HW, Cai DB, Liang AM, *et al.* Effects of dietary Mn supplementation on superoxide dismutase (SOD) activity in prawn *Caridina denticulata sinensis* exposed to cypermethrin. *Fisheries Sciences*, 2009, 28(3): 139-141 [王宏伟, 蔡端波, 梁爱民, 等. 氯氰菊酯胁迫下锰对中华米虾 SOD 活性的影响. *水产科学*, 2009, 28(3): 139-141]
- Wang RL, Chen YM, Xu J, *et al.* Effects of cypermethrin on superoxide dismutase (SOD) activities in liver and gill tissues of *Tanichthys albonubes*. *Ecology and Environment*, 2007, 16(3): 790-793 [王瑞龙, 陈玉明, 徐军, 等. 氯氰菊酯对唐鱼肝和鳃组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响. *生态环境*, 2007, 16(3): 790-793]
- Wang ZH, Yin YW, Lin XT, *et al.* A review of the research on the ecological toxicology of the pesticides in water ecosystem. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2000, 21(3): 123-127 [王朝晖, 尹伊伟, 林小涛, 等. 拟除虫菊酯农药对水生态系统的生态毒理学研究综述. *暨南大学大学学报(自然科学版)*, 2000, 21(3): 123-127]
- Wei H, Wu N, Shen H, *et al.* Oxidative stress of deltamethrin to the liver of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(5): 733-739 [魏华, 吴楠, 沈竑, 等. 溴氰菊酯对克氏原螯虾的氧化胁迫效应. *水产学报*, 2010, 34(5): 733-739]
- Wu N, Wei H, Shen H, *et al.* The toxic research of deltamethrin on the muscle tissue of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1412-1421 [吴楠, 魏华, 沈竑, 等. 溴氰菊酯对克氏原螯虾肌肉组织的毒性研究. *水产学报*, 2015, 39(9): 1412-1421]
- Wu QS, Lu WP. Experiment on using fenvalerate to clean prawn culture ponds. *Marine Sciences*, 1993(1): 66-68 [吴琴瑟, 卢伟波. 杀灭菊酯在对虾养殖清池中的使用. *海洋科学*, 1993(1): 66-68]
- Wu W, Chen JZ, Ma XY, *et al.* Accumulation of deltamethrin in the tissue of tilapia and the influence on activity of glutathione-S-transferase. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2006, 25(5): 1176-1181 [吴伟, 陈家长, 马晓燕, 等. 溴氰菊酯在罗非鱼组织中的累积及对谷胱甘肽-S-转移酶的影响. *农业环境科学学报*, 2006, 25(5): 1176-1181]
- Xia XH, Zhang LX, Shi KP, *et al.* Acute toxicity and physiological toxicity of lambda-cyhalothrin on *Oriental weatherfish*. *Journal of Agricultural Sciences of Jiangsu*, 2013, 41(6): 270-272 [夏晓华, 张林霞, 司松波, 等. 高效氯氟氰菊酯对泥鳅的急性毒性及生理毒性. *江苏农业科学*, 2013, 41(6): 270-272]
- Xu YB, Zheng HD, Chen YF, *et al.* Preliminary exploration on the effects of deltamethrin on enzyme activity and organs injury in *Ruditapes philippinarum*. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(6): 206-212 [许贻斌, 郑惠东, 陈宇锋, 等. 溴氰菊酯对菲律宾蛤仔体内酶活性和组织损伤的初步探索. *生态毒理学报*, 2015, 10(6): 206-212]
- Zhang Z, Li J, Liang W, *et al.* Toxic effects of pyrethroid pesticide on water ecosystem. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2006, 15(1): 125-129 [张征, 李今,

- 梁威, 等. 拟除虫菊酯杀虫剂对水生态系统的毒性作用. 长江流域资源与环境, 2006, 15(1): 125-129]
- Zhao LN, Lai ZN, Zhang WZ, *et al.* Residual levels and health risk assessment of pyrethroid pesticides in aquatic products of the Pearl River delta. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(3): 437-444 [赵李娜, 赖子尼, 张威振, 等. 珠江河网水产品中菊酯类农药残留调查及健康风险评价. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 437-444]
- Zheng WH, Zhao JZ, Ma DY, *et al.* Development of deltamethrin toxicity and mutagenicity. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2004, 19(1): 77-80 [郑伟华, 赵建庄, 马德英, 等. 溴氰菊酯的毒性和致突变性的研究进展. 北京农学院学报, 2004, 19(1): 77-80]
- Zhou FX. *Biological monitoring*. Beijing: Chemical Industry Press, 2006, 99-112 [周凤霞. 生物监测. 北京: 化学工业出版社, 2006, 99-112]

(编辑 马瑾艳)

The Acute Toxicity and Bioaccumulation of Deltamethrin in Four Species of Mariculture Organisms

ZHONG Shuoliang^{1,2①}, ZHENG Huidong^{1,2}, CHEN Yufeng^{1,2},
XU Yibin^{1,2}, JIANG Shuangcheng^{1,2}, WU Lifeng^{1,2}

(1. Key laboratory of Cultivation and High-Value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361013;

2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361013)

Abstract The acute toxicity and bioaccumulation of deltamethrin was studied in four species of mariculture organisms including the crustaceans *Portunus pelagicus* and *Marsupenaeus japonicus*, and the bivalve *Meretrix meretrix* and *Ruditapes philippinarum*. The results indicated that there were significant positive correlations between the mortality rate of the mariculture organisms and the concentration and exposure time of deltamethrin. The LC₅₀ values at 24 h, 48 h and 96 h for the crustacean *P. pelagicus* were 2.07×10^{-4} , 1.70×10^{-4} and 1.10×10^{-4} mg/L respectively, and the values for *M. japonicas* were 7.32×10^{-4} , 3.90×10^{-4} and 1.43×10^{-4} mg/L. The safe concentrations for these two species were 3.44×10^{-5} mg/L and 3.32×10^{-5} mg/L respectively. The LC₅₀ values at the 3 time points for the bivalves *M. meretrix* were 1.52, 0.30 and 0.27 mg/L respectively, and for *R. philippinarum* they were 0.67, 0.11 and 0.06 mg/L respectively. The safe concentrations for these two species were 3.51×10^{-3} mg/L and 9.50×10^{-4} mg/L respectively. Obviously the two crustacean species were more sensitive to deltamethrin than the bivalves. Next, the bivalves *M. meretrix* and *R. philippinarum* were exposed to the seawater containing deltamethrin at average concentrations of 0.86-0.05 mg/L and 0.37-0.03 mg/L respectively for 24-96 h, and we found that the accumulation coefficients of deltamethrin in these two species were 2.57-12.40 and 3.03-27.85 respectively. The accumulation rate of deltamethrin in the two bivalve species was positively correlated with the exposure time of deltamethrin, but negatively correlated with the concentration of deltamethrin. There were significant differences in sensitivity and accumulation rate of deltamethrin between different species of marine aquaculture organisms.

Key words Deltamethrin; Toxicity; Bioaccumulation; Mariculture organisms

① Corresponding author: ZHONG Shuoliang, E-mail: zsl-5388@163.com

HMG(High-Mobility Group Box Protein)在刺参 (*Apostichopus japonicus*)肠道再生期间的 表达情况分析*



缪婷¹ 孙丽娜² 杨红生² 王芳^{1①}

(1. 教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003;

2. 海洋生态与环境科学重点实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 测定了一种核酸内非组蛋白类蛋白 HMG(High-mobility group box protein)在刺参肠道再生第 30 分钟、1、2、6 小时、1、3、7 天的 mRNA 表达情况, 结果显示, 再生第 6 小时之前, 表达量与正常刺参肠道相比无显著变化, 再生第 1-7 天, 其表达量显著高于对照组, 并于第 7 天达到最大值。采用免疫荧光技术, 分析测定了 HMG 在刺参肠道再生各时期的蛋白表达情况, 结果显示, 再生第 2、6 小时, HMG 蛋白荧光信号弱, 仅在浆膜层和黏膜层有少量分布; 再生第 1-7 天, HMG 蛋白荧光信号逐渐增强, 再生第 1 天的 HMG 荧光主要分布在浆膜层和肌肉层, 再生第 3 天和第 7 天的荧光信号最强, 各层均有分布。结合 HMG 在其他物种组织修复再生中的作用, 推测 HMG 可使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能, 调控细胞外基质(ECM)成分的降解与生成, 诱导干细胞迁移、分化, 并可能在伤口愈合阶段过后参与细胞免疫。

关键词 刺参; HMG; 肠道再生; qRT-PCR; 免疫荧光

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0148-07

再生是动物应对环境不适的一种适应能力, 且对动物存活具有重要作用, 可以认为是细胞、组织或器官的重新生长过程(Rychel *et al*, 2009; Sánchez Alvarado *et al*, 2006)。目前, 国内外有关无脊椎动物再生方面的研究多集中于腔肠动物门的水螅(*Hydra attenuate*) (Schmidt *et al*, 1986), 扁虫动物门涡虫类扁虫(*Schmidtea mediterranea*)、环节动物门寡毛类蚯蚓(*Enchytraeus japonensis*) (Agata *et al*, 1999; Alvarado *et al*, 2002; Norman *et al*, 2001; Yoshida-Noro *et al*, 2010), 棘皮动

物门海盘车(*Asterina Burtoni*; *Coscinasterias tenuispina*; *Oxycomanthus japonicus*)和海参(*Holothuria glaberrima*)等(Achituv *et al*, 1991; Alves *et al*, 2002; García-Arrarás *et al*, 1998; Rubilar *et al*, 2005; Shibata *et al*, 2010)。

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国一种经济价值极高的海珍品。组织器官损伤后, 刺参可以在短时间内完成重建。“吐脏”是刺参的一种特殊行为, 遇外界刺激或遇敌后, 其将肠道、呼吸树、生殖腺等内

* 国家自然科学基金(41406168; 41076103)资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41406168; 41076103)]. 缪婷, E-mail: daisyting629@163.com

① 通讯作者: 王芳, 教授, E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-07-11, 收修改稿日期: 2016-08-02

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 13-31[孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 13-31]

脏器官排出体外, 3 周左右再生出完整的、功能完善的内脏器官(孙丽娜, 2013)¹⁾。

目前, 海参(Echinodermata, Holothuroidea)肠道再生的研究主要集中在肠壁组织层的起源与变化(Mashanov *et al*, 2001; Rojascartagena *et al*, 2007), 细胞起源、迁移与增殖等细胞学事件的发生(San Miguel-Ruiz *et al*, 2007)。研究发现, 与海参肠道再生特异性相关的基因主要有细胞骨架基因(如 Actin)、和发育密切相关的基因(如 Wnt 和 Hox)(Sun *et al*, 2013b)、对抗炎症反应和形态发生有重要作用的血清淀粉样蛋白 A (Serum Amyloid A Protein, SAA)同源物(Santiago *et al*, 2000)、神经重塑有关的室管膜蛋白基因(Suarez-Castillo *et al*, 2004)。近年来, 人们借助 EST 库的构建、芯片技术和高通量测序等技术, 构建了 EST 文库(Ortiz-Pineda *et al*, 2009; Zheng *et al*, 2006)、再生转录组(Sun *et al*, 2013a)、基因表达谱(Sun *et al*, 2011), 以期在更高通量上对这一多基因调控过程的机制进行探索。

HMG(High-mobility group box protein)是一种多功能细胞因子, 也是一类核酸内非组蛋白类蛋白, 能与特异性的受体结合, 参与组织损伤修复、细胞迁移、再生等重要生命进程, 并应答炎症反应等, 已被证实再生行为中发挥作用(Kuehl *et al*, 1979; De Mori *et al*, 2007; Straino *et al*, 2008; Limana *et al*, 2005), 而在低等动物再生中的调控作用尚不清楚。在刺参再生转录组与表达谱研究中发现, HMG 参与了刺参肠道再生过程(Sun *et al*, 2013a), 并测定了该基因在刺参肠道再生的第 3、7、14、21 天的 mRNA 水平表达情况: 再生期间 HMG 的表达量呈先增高后降低的趋势, 再生的第 7 天, HMG 表达量达到最大值, 为对照组的 4.5 倍, 后逐渐降低, 至第 21 天表达量基本恢复到正常水平, 推测其在肠道再生过程中使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能(孙丽娜, 2013)¹⁾。而刺参肠道再生过程中的 HMG 蛋白水平的表达情况还未见报道, 再生早期阶段的 mRNA 水平的表达情况也未知。

本研究采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术测定 HMG 在刺参肠道再生第 0.5、1、2、6 小时及第 1、3、7 天 mRNA 水平的表达情况, 并通过免疫荧光实验测定了 HMG 蛋白在刺参肠道再生关键时期的空

间表达情况, 以期更深入的探明 HMG 对刺参肠道再生的调控作用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验用体重为 100–120 g 的刺参于 2015 年 11 月采集于青岛。实验前将刺参在实验室水池中暂养 7 d, 暂养水温为 15–17℃, 每日换水 1/2, 投饵 1 次。暂养结束后, 向刺参腹腔注射 0.35 mol/L KCl 溶液 1–2 ml, 诱导其吐脏, 吐脏后的刺参养于水池中, 水温为 15–17℃, 每日换水 1/2, 不投饵料。

分别在刺参吐脏后的第 0.5、1、2、6 小时, 第 1、3、7 天解剖刺参, 取出再生的肠道, 每次取样 15 只刺参。将肠道组织放入冻存管中, 经液氮速冻后保存于–80℃超低温冰箱, 用于后续 qRT-PCR 实验。用同样的方法取 15 只未刺激吐脏刺参的正常肠道作为对照组。

同时, 在吐脏后第 2、6 小时和第 1、3、7 天解剖刺参, 取出再生的肠道, 每次取样 10 只刺参。肠道置于 4%多聚甲醛固定液中浸泡过夜, 分别经过 25%、50%、75%、100%酒精梯度脱水后, 石蜡包埋, 4℃冰箱暂时保存, 用于后续免疫组化实验。以同样的方法取 15 只未刺激吐脏刺参的正常肠道作为对照组。

1.2 RNA 提取及基因表达定量

RNA 提取实验采用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction kit (TaKaRa, 日本)试剂盒, 根据说明书中的要求进行。RNA 的完整性和浓度分别通过 1%凝胶电泳与 Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)仪器测定。qRT-PCR 实验以提取的 RNA 为模板, 用 Prime-Script™ RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒 (TaKaRa)反转出第一链 cDNA 作为后续 qRT-PCR 实验的模板。每组 15 只刺参肠道样品, 5 只肠道混为 1 个样本, 每组共计 3 个样品。NADH 脱氢酶为本研究的内参基因。实验所需引物 NADH-F, NADH-R, HMG-F, HMG-R 的序列(表 1)参考孙丽娜(2013)¹⁾。实验体系及 PCR 程序参考 SYBR PrimeScrip™ RT-PCR Kit II 试剂盒(TaKaRa)说明书, 设置见表 2。qRT-PCR 程序: 95℃预变性 5 s; 95℃变性 10 s, 60℃复性 20 s, 72℃延伸 30 s, 共 40 个循环; 添加溶

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93–102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 93–102]

表1 qRT-PCR 引物序列(孙丽娜, 2013)¹⁾Tab.1 Primers sequences for qRT-PCR (Sun, 2013)¹⁾

引物 Primer	序列 Sequence
HMG-F	5'-GAGGAAAGCCAAGTATGACAGG-3'
HMG-R	5'-CGATTCTTCTTCTTCTGTGCT-3'
NADH-F	5'-GTCCTACGACCCAATCTGGA-3'
NADH-R	5'-ATGAGCCTTGTTACGTTGG-3'

解曲线, 以检测扩增产物是否单一。每个反应设置4次平行并记录好对应的 Ct 值, 用于后续基因表达量分析。

实验前以5个稀释点(10倍稀释)的cDNA为模板, 绘制HMG基因的标准反应曲线并计算PCR反应的效率(The PCR efficiency, E)和相关系数(Correlation coefficient, R^2)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法对HMG基因的相对表达量进行计算, 对照组与实验组之间的差异采用SPSS 18.0进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著差异。

表2 qRT-PCR 体系

Tab.2 Reagents for qRT-PCR

试剂 Reagents	用量 Amounts (μ l)
SYBR Green Master Mix	10
F引物(10 mmol/L)	0.4
R引物(10 mmol/L)	0.4
1:10 diluted cDNA	2.0
dH ₂ O	7.2

1.3 免疫组化

将包埋好的刺参肠道标本进行切片处理, 切好的蜡片贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 60℃烘5 h使石蜡融化。免疫组化具体实验步骤: 将石蜡切片置于二甲苯中脱蜡5 min, 重复2次; 石蜡切片分别经过100%乙醇1 min、95%乙醇1 min、75%乙醇1 min、50%乙醇1 min、25%乙醇1 min、蒸馏水2 min、PBS 2 min × 2次; 将切片置于柠檬酸钠抗原修复液中, 微波炉中火加热6 min至微沸, 重复4次; 将切片置于1%牛血清蛋白中, 室温轻摇封闭30 min; 一抗以1:1000稀释于封闭液中, 在切片上滴加稀释好

的一抗孵育液, 于湿盒中37℃孵育1 h, 实验用抗体为Anti-HMG rabbit polyclonal antibody (BBI Life Science); 用PBS充分清洗3次, 每次10 min, 用滤纸擦去标本外的PBS; 荧光二抗以1:2000稀释于PBS中, 在切片上滴加稀释好的二抗孵育液, 于湿盒中37℃避光孵育45 min, 实验用抗体为Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L); 用PBS充分清洗3次, 每次10 min, 用滤纸擦去标本外的PBS; 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下立即观察。

2 结果

2.1 刺参肠道再生初始阶段 HMG mRNA 的表达

利用qRT-PCR技术分析测定了HMG mRNA在刺参肠道再生初始阶段的表达情况(图1)。qRT-PCR最后的溶解曲线为单峰, 证明扩增的PCR产物具有特异性。

qRT-PCR结果显示, 在刺参肠道再生的较早期阶段(吐脏后第30分钟、第1、2、6小时), HMG mRNA的相对表达量与正常刺参肠道相比并无显著变化; 从再生第1天开始, 该基因的表达量显著升高, 再生第7天达到最大值(图1)。

2.2 刺参肠道再生各阶段 HMG 蛋白表达情况

利用免疫荧光技术, 用多克隆抗体分别与再生各阶段的刺参肠道组织切片中的相应蛋白进行免疫反应, 分析HMG蛋白在刺参肠道再生各阶段的空间表达情况, 免疫荧光显色结果见图2(绿色荧光为杂交信号)。对照组刺参肠道各层(从外向内分别为: 浆膜层、肌肉层、黏膜下层、黏膜层)分化明显, 黏膜下层为最厚层, 肌肉层较薄, HMG蛋白荧光信号较弱, 主要集中于黏膜下层。再生过程中, 肠道组织结构发生巨大变化, 肠壁各层组织明显变薄且较为杂乱, 分化不明显。再生第2、6小时, HMG蛋白荧光信号弱, 仅在浆膜层和黏膜层有少量分布。再生第1-7天, HMG蛋白荧光信号逐渐增强, 再生第1天, HMG荧光主要分布在浆膜层和肌肉层, 再生第3、7天, 荧光信号强, 各层均有分布。

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93-102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 93-102]

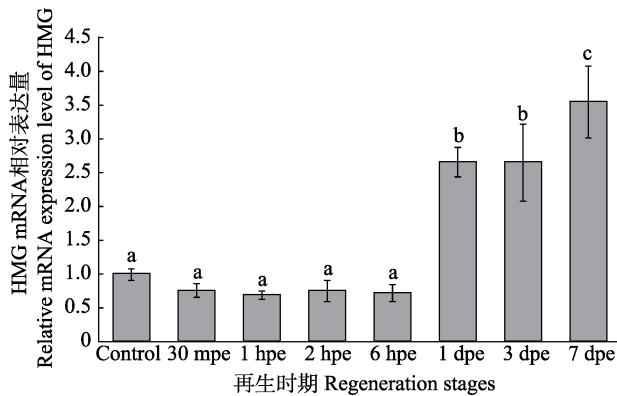


图 1 刺参肠道 HMG 基因相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of intestine HMG of *A. japonicus*

Control: 未经处理的肠道组织; 30 mpe、1 hpe、2 hpe、6 hpe、1 dpe、3 dpe 和 7 dpe 分别为刺激排脏后再生 30 min、1 h、2 h、6 h、1 d、3 d、7 d 的肠道组织; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 纵坐标值为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)

Control: Non-eviscerated sea cucumbers; 30 mpe, 1 hpe, 2 hpe, 6 hpe, 1 dpe, 3 dpe, and 7 dpe were 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours, 1 day, 3 days, and 7 days post-evisceration, respectively. Different letters indicated significant differences ($P < 0.05$). The values of ordinate were shown as Mean \pm SD ($n=3$)

3 讨论

HMG 是一种多功能的细胞因子, 对高等动物胚胎发育、血管发生、血管再生、神经突生长、干细胞迁移、肿瘤发生等多种生物学进程都有重要作用(Degryse *et al*, 2001; Kim *et al*, 2006; Palumbo *et al*, 2004)。HMG 已被证实许多再生行为中发挥重要作用, 如大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肝脏再生(Kuehl *et al*, 1979)和骨骼肌肌肉再生(De Mori *et al*, 2007)、成人人皮肤再生(Straino *et al*, 2008)以及心肌再生(Limana *et al*, 2005)等, 而 HMG 对低等动物再生的调控作用尚未知。

HMG mRNA 表达量分析显示, HMG 在刺参正常的肠道中表达, 表明其基因产物是一种维持正常生命活动的转录因子。再生第 30 分钟, 第 1、2、6 小时, HMG mRNA 的表达量与正常刺参肠道相比并无显著变化; 免疫荧光结果显示, 肠道再生第 2、6 小时与对照组 HMG 蛋白的表达情况并无明显变化, 这与 HMG mRNA 表达情况一致。结合刺参 HMG mRNA 水平和蛋白的表达情况来看, 在肠道再生第 1 天以

前, HMG 可能并不发挥调控作用。再生的第 1、3、7 天, 该基因的 mRNA 表达量显著高于正常生理状态下, 于第 7 天达到最大值, 这与孙丽娜等(2013)¹⁾测定的 HMG 在刺参肠道再生过程中的 mRNA 表达情况相一致; HMG 蛋白荧光信号也逐渐增强, 浆膜层、肌肉层、黏膜下层、黏膜层均有荧光信号分布, 到第 7 天达到荧光亮度的最大值, 表明 HMG 蛋白在这一阶段大量积累。

在动物再生的过程中, 细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)成分往往会发生剧烈变化, ECM 降解与重建可以调控细胞活性和细胞迁移与分化(Brown *et al*, 2014)。高等动物 HMG 与再生相关研究表明, HMG 在组织受损修复的过程中可以通过激活糖基化终产物受体来调控 ECM 中胶原的合成与降解(Zhang *et al*, 2012)。被破坏的或者凋亡的细胞中, HMG 产物可以“被动释放”至细胞外基质中; ECM 中的 HMG 蛋白成为被先天免疫系统识别的“损伤标记物”, 当其含量过多时证实组织受损伤, 启动修复功能(Ulloa *et al*, 2006)。从本研究中可以看出, 从刺参肠道再生第 1 天开始, HMG 表达量相比对照组增多, 很有可能作为“损伤标记物”被先天免疫系统识别, 启动肠道再生修复的功能。

研究发现, 在组织修复再生的过程中, HMG 可以激活干细胞, 通过其蛋白浓度效应诱导干细胞迁移通过内皮屏障, 进入健康正常的组织中分化成普通的细胞(Palumbo *et al*, 2004)。刺参肠道再生第 0-2 天为肠系膜伤口愈合阶段, 第 2-5 天为原基形成阶段, 一般认为, 原基的形成是刺参肠道再生真正的起点。在刺参肠道再生早期, 新生组织的细胞来源于细胞去分化和细胞迁移, 原基细胞主要来源于肠系膜的间充质干细胞(Yang *et al*, 2015)。HMG 从肠道再生第 1 天开始表达量逐渐升高, 因此推测, HMG 可能对再生早期原基形成过程中的干细胞迁移起作用。Zhang 等(2012)研究发现, 在小鼠(*Mus musculus*)上皮组织伤口愈合过程中, HMG 在多种促炎因子的作用下释放到细胞外基质中, 在伤口愈合结束后又反过来诱导受损部位的细胞分泌后续免疫反应的相关调控因子及巨噬细胞免疫蛋白, HMG 可能在伤口愈合阶段(第 0-2 天)过后也参与了细胞免疫过程。

1) Sun LN. Histocytological events and analysis of key genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013, 93-102 [孙丽娜. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析. 中国科学院研究生院 (海洋研究所) 博士学位论文, 2013, 93-102]

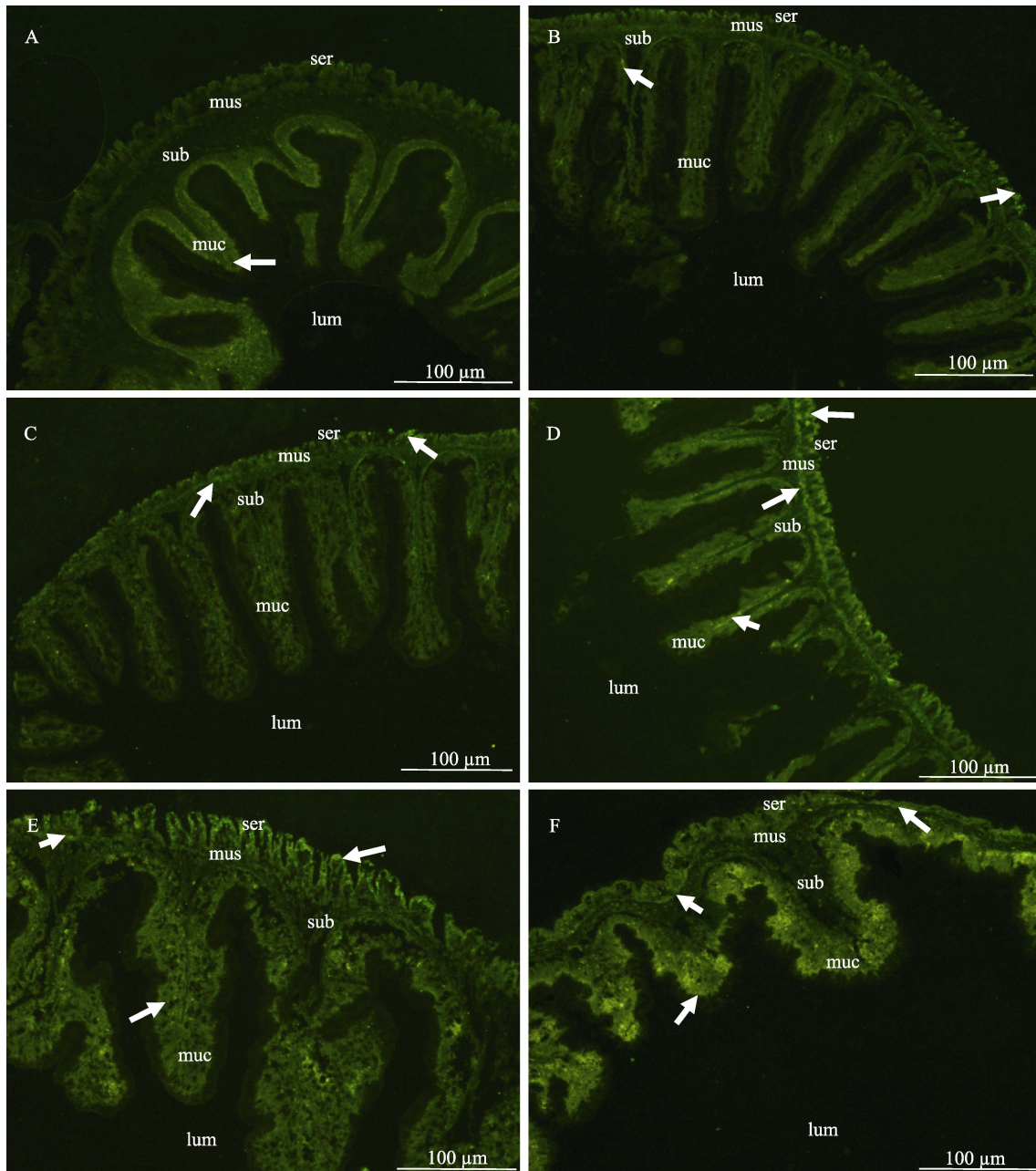


图 2 再生过程中刺参 HMG 在肠道组织的表达分布

Fig. 2 Expression of *A. japonicus* HMG protein at different regeneration stages

A: 对照组; B: 再生第 2 小时; C: 再生第 6 小时;

D: 再生第 1 天; E: 再生第 3 天; F: 再生第 7 天; 箭头表示荧光信号

A: Control; B: 2 hours post-evisceration (hpe); C: 6 hpe; D: 1 day post-evisceration (dpe); E: 3 dpe; F: 7 dpe;

Arrows indicated fluorescence signals; ser: 浆膜层 Serosa; mus: 肌肉层 Muscle;

sub: 黏膜下层 Submucosa; muc: 黏膜层 Mucosa; lum: 肠腔 Intestinal lumen

结合 HMG 在其他物种组织修复再生中的作用与其在刺参肠道再生过程中的表达变化来看, 推测 HMG 可能使免疫系统识别损伤信号, 启动修复再生功能, 调控 ECM 成分的降解与生成, 诱导干细胞迁移、分化, 并在肠道再生后期参与细胞免疫。

参 考 文 献

- Achituv Y, Sher E. Sexual reproduction and fission in the sea star *Asterina burtoni* from the Mediterranean coast of Israel. *Bulletin of Marine Science*, 1991, 48(3): 670-678
- Agata K, Watanabe K. Molecular and cellular aspects of

- planarian regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1999, 10(4): 377–383
- Alvarado AS. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development*, 2002, 129(24): 5659–5665
- Alves L, Pereira A, Ventura C. Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 2002, 140(1): 95–101
- Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*, 2014, 163(4): 268–285
- De Mori R, Straino S, Di Carlo A, *et al.* Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, 27(11): 2377–2383
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 2001, 152(6): 1197–1206
- García-Arrarás JE, Estrada-Rodgers L, Santiago R, *et al.* Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata). *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(4): 288–304
- Kim JB, Choi JS, Yu YM, *et al.* HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(24): 6413–6421
- Kuehl L. Synthesis of high mobility group proteins in regenerating rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(15): 7276–7281
- Limana F, Germani A, Zacheo A, *et al.* Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit⁺ cell proliferation and differentiation. *Circulation Research*, 2005, 97(8): e73–e83
- Mashanov VS, Dolmatov IY. Regeneration of digestive tract in the pentactulae of the far-eastern holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota). *Invertebrate Reproduction & Development*, 2001, 39(2): 143–151
- Norman MD, Finn J. Revision of the *Octopus horridus* species-group, including erection of a new subgenus and description of two member species from the Great Barrier Reef, Australia. *Invertebrate Systematics*, 2001, 15(1): 13–35
- Ortiz-Pineda PA, Ramírez-Gómez F, Pérez-Ortiz J, *et al.* Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber. *BMC Genomics*, 2009(10): 262
- Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68(6): 1165–1170
- Rojascartagena C, Ortizpineda PA, Ramirezgomez F, *et al.* Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Physiological Genomics*, 2007, 31(2): 203–215
- Rubilar T, de Ward CTP, de Vivar MED. Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*, 2005, 146(6): 1083–1090
- Rychel AL, Swalla BJ. Regeneration in hemichordates and echinoderms. *Stem Cells in Marine Organisms*, 2009, 245–265
- Sánchez Alvarado A, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(11): 873–884
- Santiago P, Roig-López JL, Santiago C, *et al.* Serum amyloid A protein in an echinoderm: Its primary structure and expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Journal of Experimental Zoology*, 2000, 288(4): 335–344
- San Miguel-Ruiz JE, García-Arrarás JE. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Developmental Biology*, 2007(7): 115
- Schmidt T, David CN. Gland cells in Hydra: Cell cycle kinetics and development. *Journal of Cell Science*, 1986, 85(1): 197–215
- Shibata TF, Oji T, Akasaka K, *et al.* Staging of regeneration process of an arm of the feather star *Oxycomanthus japonicus* focusing on the oral-aboral boundary. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(11): 2947–2961
- Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, *et al.* High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: Involvement in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, 128(6): 1545–1553
- Suárez-Castillo EC, Medina-Ortiz WE, Roig-López JL, *et al.* Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberrima*. *Gene*, 2004, 334: 133–143
- Sun L, Chen M, Yang H, *et al.* Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(2): 195–205
- Sun L, Yang H, Chen M, *et al.* RNA-Seq reveals dynamic changes of gene expression in key stages of intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *PLoS One*, 2013a, 8(8): e69441
- Sun LN, Yang HS, Chen MY, *et al.* Cloning and expression analysis of Wnt6 and Hox6 during intestinal regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Genetics Molecular Research*, 2013b, 12(4): 5321–34
- Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*,

- 2006, 17(3): 189–201
- Yang H, Hamel JF, Mercier A. The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: History, biology and aquaculture. Amsterdam: Academic Press, 2015
- Yoshida-Noro C, Tochinai S. Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Development, Growth and Differentiation*, 2010, 52(1): 43–55
- Zhang Q, O’Hearn S, Kavalukas SL, *et al.* Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 2012, 176(1): 343–347
- Zheng FX, Sun XQ, Fang BH, *et al.* Comparative analysis of genes expressed in regenerating intestine and non-eviscerated intestine of *Apostichopus japonicus* Selenka (Aspidochirotida: Stichopodidae) and cloning of ependymin gene. *Hydrobiologia*, 2006, 571(1): 109–122

(编辑 马璀璨)

Expression Analysis of HMG (High-Mobility Group Box Protein) During the Intestine Regeneration of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

MIAO Ting¹, SUN Lina², YANG Hongsheng², WANG Fang¹①

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

2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract High-mobility group box protein (HMG) is a novel cytokine that takes part in inflammation, cell migration, and tissue damage and regeneration. Regeneration usually involves the regrowth of cells, tissues and organs, and plays an essential role in the survival and adaptation of a species. Sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Echinodermata, Holothuroidea), which are phylogenetically related to invertebrates, are capable of regenerating damaged organs and body parts, such as the intestine, the respiratory tree, the gonads and the body wall. Sea cucumbers can eviscerate intestines and other organs through the cloaca in response to external stimulations. Within a few weeks after losing an organ or an appendage, the sea cucumber is able to regenerate the missing parts. These animals are thus excellent candidate models for research on organ regeneration. In this study, we analyzed the expression of mRNA and proteins of HMG during the intestine regeneration in sea cucumber using qRT-PCR and immunofluorescence techniques, respectively. The results showed that compared to the control group, there was no significant rise in the expression of either mRNA or proteins of HMG from 30-minute to 6-hour post-evisceration. HMG mRNA expression was significantly upregulated from 1-day to 7-day post-evisceration. The protein expression was higher as well compared to the control group. These results suggested that HMG was involved in the intestine regeneration of *A. japonicus* and could participate in the activation of the innate immune system in response to tissue damages, and hence was required in the processes such as repair, remodeling of extracellular matrix (ECM), and the induction of stem cell migration and differentiation.

Key words *Apostichopus japonicus*; HMG; Intestine regeneration; qRT-PCR; Immunofluorescence

① Corresponding author: WANG Fang, E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

《渔业科学进展》2017 年第 38 卷总目录

第 1 期



专辑：海水鱼类生殖与生长的生理生态学机制

- 我国鲆鲽类生殖内分泌研究进展..... 柳学周 史宝 徐永江 王滨 刘新富 孟振 (1)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)新型膜孕激素受体基因(*mPRL*)在卵母细胞成熟过程中的表达特征
..... 史宝 柳学周 徐涛 李晓妮 徐永江 张金勇 (10)
- 性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)新型膜孕激素受体(*mPRL*)的定性定量表达分析.....
..... 史宝 柳学周 徐涛 李晓妮 徐永江 张金勇 (18)
- 膜孕激素受体(*mPR α*)在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞成熟过程中的表达特征
..... 李晓妮 柳学周 史宝 徐永江 张金勇 (25)
- mPR α* 在性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)不同组织中的定性定量表达特征.....
..... 李晓妮 柳学周 史宝 徐永江 李晓晓 张金勇 (34)
- 促性腺激素调控半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞孕酮受体膜组分 1 的表达特征.....
..... 张金勇 柳学周 史宝 徐永江 (42)
- 孕酮受体膜组分 1 基因在性成熟雌性半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的组织学定位定量分析.....
..... 张金勇 史宝 柳学周 徐永江 (48)
- GnIH 多肽对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)下丘脑生殖相关基因表达的影响.....
..... 刘权 王滨 柳学周 徐永江 史宝 刘增新 (56)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) *gnrh2* 基因克隆、组织分布及卵巢成熟过程中表达分析.....
..... 王滨 柳学周 刘权 赵明 徐永江 史宝 (63)
- GH/IGF- I 轴对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢发育的调控作用.....
..... 徐永江 柳学周 石莹 王滨 史宝 张凯 蓝功岗 (73)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素富集激素基因的克隆和表达.....
..... 徐永江 朱学武 柳学周 史学营 史宝 王滨 李斌 (81)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)黑色素聚集素受体(MCHR)表达特性及其与无眼侧黑化的关系.....
..... 史学营 柳学周 石莹 徐永江 史宝 王滨 李斌 (91)
- 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理.....
..... 朱学武 徐永江 柳学周 史宝 王滨 (103)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道菌群结构比较分析.....
..... 刘增新 柳学周 史宝 徐永江 刘权 (111)
- 两株有益菌的分离、培养、鉴定及其水质调控效果评价.....
..... 李存玉 柳学周 徐永江 史宝 郑伟 史学营 (120)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)肌肉营养组成分析与评价.....
..... 柳学周 徐永江 李荣 吕永军 史宝 宁劲松 王滨 (128)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)染色体核型分析.....
..... 史宝 刘永山 柳学周 徐永江 李荣 宋雪松 周丽青 (136)
- 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)形态度量与内部结构特征..... 李荣 徐永江 柳学周 史宝 (142)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)消化道显微与超微结构..... 李斌 柳学周 徐永江 史宝 朱学武 (150)
- 太平洋鲱(*Gadus macrocephalus*)亲鱼驯化培育与早期发育特征..... 徐永江 柳学周 史宝 王滨 (159)
- 编码金属标签对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)苗种标记的效果.....
..... 徐永江 柳学周 张凯 蓝功岗 史宝 (168)

第 2 期

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)
- 星斑川鲷、石鲷及其杂交一代(星斑川鲷♀×石鲷♂)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鲷(*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)

第 3 期

研究论文

- 桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征及富营养化评价 徐东会 陈碧鹃 江 涛 朱 琳 夏 斌 韩 倩 古 彬 崔 毅 柴 超 (1)
- 运用 SS3 评估东太平洋大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)资源——复杂模型和简化模型比较 朱江峰 (12)
- 唐山附近海域春季表层沉积物重金属含量年际变化及污染评价 胡 琴 郭 静 尹晓娜 曲 亮 曹 静 (22)
- 北黄海虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)定居群体的生态适应性研究 杨 钰 倪守胜 刘 毅 柳淑芳 庄志猛 (31)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)家系生长性状遗传效应分析 李祥孔 田永胜 李 洪 宋莉妮 高 进 段会敏 戴 欢 陈张帆 陈松林 王秀利 (39)
- 基于转录组测序对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) 2 种肌球蛋白重链基因的克隆与分析 陈之航 董浚键 孙成飞 田园园 叶 星 (51)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)真、伪雄鱼群体表型和遗传性状分析 李 洪 田永胜 李祥孔 陈张帆 宋莉妮 段会敏 (62)

- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) CD59 基因的原核表达与功能探究周纳宇 曹丹丹 王志刚 张全启 齐洁 王旭波 于海洋 (70)
- 美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)消化系统胚后发育的组织学观察张廷廷 陈超 邵彦翔 陈建国 孙涛 (78)
- 饲料中不同水解蛋白对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼鱼体及组织脂肪含量的影响曹林 张婷婷 徐后国 郑珂珂 梁萌青 (86)
- 不同蛋白水解物对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)生长性能及非特异性免疫的影响张婷婷 陈效儒 梁萌青 王成强 郑珂珂 徐后国 陈齐勇 (96)
- 小麦蛋白替代鱼粉及大豆蛋白对日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响成艳波 张月星 董智勇 路冰岩 王永超 (106)
- 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼血清溶菌酶活性及组织抗氧化能力的影响张晨捷 彭士明 高权新 施兆鸿 王建钢 (115)
- 聚 β -羟基丁酸酯对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)非特异性免疫相关酶的影响张恒恒 孟宪红 孔杰 罗坤 栾生 曹宝祥 曹家旺 张莹雪 (124)
- 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)回交家系遗传变异的微卫星分析刘九美 李吉涛 刘萍 窦全伟 王佳佳 李健 (133)
- 一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖中的应用高戈 朱开玲 张庆起 王志杰 黄捷 (140)
- 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响高振锟 张继红 李敏 马莎 郭晓亮 姜妮妮 吕旭宁 (148)
- 食用海带(*Saccharina japonica*)新品系遗传多样性研究姚海芹 刘福利 王飞久 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 李晓蕾 (155)
- 豆粕的坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)发酵工艺优化及其营养成分分析孙静 宋晓玲 黄捷 (163)
- 氮胁迫对不同规格刺参(*Apostichopus japonicus*)存活及非特异性免疫酶活性的影响徐松涛 赵斌 李成林 胡炜 韩莎 李琪 (172)
- 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特性分析杜佗 李彬 王印庚 廖梅杰 王金燕 刘志轩 王诗欢 (180)
- 刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗期“肠炎病”及其治疗方法逢慧娟 廖梅杰 李彬 荣小军 王印庚 张正 孙金生 孟繁林 (188)
- 2 种新型塑胶环保型网箱养殖褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)效果的评估王腾腾 关长涛 公丕海 崔勇 李真真 (198)

第 4 期

研究论文

- 南海黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacores*)摄食习性及其随生长发育的变化陶雅晋 莫檬 何雄波 冯波 卢伙胜 颜云榕 (1)
- 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病的组织病理和超微病理分析张丹枫 安树伟 周素明 王国良 (11)
- 养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性分析王岚 王印庚 张正 陈国华 廖梅杰 陈霞 郭伟丽 (17)
- 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)ML01 株胞外产物及分泌性蛋白的分离与特性分析沈桂明 李晨 史成银 贾丹 范超 谢国骊 付泉洁 (25)
- 河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*) Mn-SOD 基因的克隆及表达分析张宏叶 于兴达 王佩佩 贾秀琪 李欣茹 曹全全 尹绍武 陈树桥 周国勤 (34)
- 牛磺酸及相关氨基酸对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼生长及组织氨基酸含量的影响柳茜 王成强 梁萌青 徐后国 (44)
- 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)呼吸代谢相关酶的影响连春盎 李健 李吉涛 冯艳艳 (53)
- 聚 β -羟基丁酸酯对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)亲虾的繁殖性能和幼体发育的影响张恒恒 孟宪红 孔杰 罗坤 栾生 曹宝祥 曹家旺 张莹雪 (61)
- 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)选育群体与杂交群体遗传多样性差异及其在低温条件下生长性能的比较李东宇 孟宪红 孔杰 栾生 曹宝祥 罗坤 (69)
- 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析王日芳 李健 李吉涛 王佳佳 刘萍 (78)
- 饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响刘文亮 许华 唐杨 宋晓玲 黄捷 (87)

检出虾肝肠胞虫(<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>)的凡纳滨对虾(<i>Litopenaeus vannamei</i>)群体的体长和体重关系刘雅梅 邱 亮 程东远 张庆利 万晓媛 黄 捷	(96)
复方磺胺嘧啶口灌给药在拟穴青蟹(<i>Scylla paramamosain</i>)体内药动学和组织分布与消除陈进军 王 元 赵 姝 沈锦玉 赵留杰 房文红	(104)
洪泽湖河蚬(<i>Corbicula fluminea</i>) 2 种表型群体的遗传变异分析李大命 张彤晴 唐晟凯 钟立强 黄越峰 穆 欢 刘燕山 刘小维	(111)
山东省主要贝类养殖区重金属环境状况及贝类安全风险分析孙 珊 赵玉庭 王立明 由丽萍 陶慧敏 谷伟丽 张秀珍	(118)
鲤疱疹病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立及比较分析赵 欣 贾 鹏 刘 莹 王津津 史秀杰 潘 广 郑晓聪 于 力 何俊强 刘 荃 吴志新	(126)
海蜇(<i>Rhopilema esculentum</i>)Notch 基因的 cDNA 克隆和表达骆晓蕊 朱 玲 周春娅 庄志猛 范艳君	(134)
“高抗 1 号”新品系刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)耐高温特性与高温期生理变化孙明超 王印庚 廖梅杰 李 彬 蔡生力 范瑞用	(146)
外源硒对仿刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)重要生理相关酶活性及体内硒含量的影响李秀梅 徐 涛 孙国华 杨建敏 李根瑞 李海州	(154)
饲料中添加甘薯(<i>Ipomoea batatas</i>)块根与茎蔓对刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)生长和非特异性免疫力的影响胡 炜 赵 斌 李成林 韩 莎 张艳萍	(164)
气相色谱-质谱法测定动物源性水产品中 16 种除草剂乔 丹 刘小静 韩典峰 黄 会 张华威 徐英江 宫向红 张秀珍	(172)
研究简报	
牡蛎壳粉缓释剂对魁蚶(<i>Scapharca broughtonii</i>)生长的影响郭晓亮 毛玉泽 李 阳 李加琦 陈琼琳 薛素燕 高振锟	(180)
研究综述	
环境内分泌干扰物对硬骨鱼类甲状腺轴的干扰作用研究进展田 华 张 旭 汝少国 张晓娜	(186)
通告	
《渔业科学进展》投稿指南	(192)

第 5 期

双齿围沙蚕(<i>Perinereis aibuhitensis</i> Grube)典型自然栖息地的沉积环境特征房景辉 王海青 方建光 蒋增杰 杜美荣 高亚平 周 凯 张丽瑶	(1)
美洲鲟(<i>Alosa sapidissima</i>)胚胎发育形态学及组织切片观察高小强 刘志峰 黄 滨 王耀辉 薛国平 秦巍仑 关长涛 洪 磊	(9)
鲈鲤(<i>Percocypris pingi</i>)染色体核型及 C-带分析黎 树 铁槐茂 段 靖 赵仲孟 杨 淞 郭秀兰 杨世勇	(19)
养殖裸盖鱼(<i>Anoplopoma fimbria</i>)疥疮病原菌的分离与鉴定王晓冉 陈四清 莫照兰 李贵阳 刘长琳 王有廷 李 杰 黄 捷	(25)
美洲黑石斑鱼(<i>Centropristis striata</i>)“突眼症”的病原菌分离鉴定陈建国 陈 超 李炎璐 孙曙光 邵彦翔 张廷廷 刘 莉 孙 涛	(32)
金乌贼(<i>Sepia esculenta</i>)早期发育阶段内壳形态学指标的主成分分析李 达 刘长琳 李 昂 杜腾飞 柳淑芳 庄志猛	(41)
黄斑篮子鱼(<i>Siganus oramin</i>)对北方养殖网箱网衣附着藻类的生物清除作用吕旭宁 蒋增杰 方建光 邹 健 房景辉 高振锟 姜妮妮 郭晓亮	(50)
不同水泥类型混凝土人工鱼礁的生物附着效果李真真 公丕海 关长涛 李 娇 王腾腾	(57)
凡纳滨对虾(<i>Litopenaeus vannamei</i>)工厂化养殖系统微藻的群落特征分析沈明明 李 健 王清印 葛红星 刘 萍 常志强	(64)
凡纳滨对虾(<i>Litopenaeus vannamei</i>)循环水养殖塘挂膜式生物滤器内微生物的多样性张健龙 江 敏 王城峰 童晓岚 金 婧 顾德平 胡伟国 于忠利 戴习林	(73)
循环水养殖欧洲鲈鱼(<i>Dicentrarchus labrax</i>)重金属污染状况与富集分布特征万慧珊 程 波 宋晓红 李 乐 宋 恽	(83)
光照对不同规格番红砗磲(<i>Tridacna crocea</i>)氧、氨氮及活性磷酸盐代谢的影响刘小霞 李 乐 郑 兴 顾志峰 刘春胜	(92)
复合益生菌制剂对大西洋鲑(<i>Salmo salar</i>)生长、消化酶和非特异性免疫指标的影响刘淑兰 陈 娟 李 杰 刘 豪 胡佳平 张黎黎 韩厚伟 孙国祥 王 纯	(100)
脱脂磷虾粉对圆斑星鲽(<i>Verasper variegatus</i>)幼鱼生长、非特异性免疫力和血清生理代谢指标的影响郑建明 严俊丽 陈四清 常 青 王贞杰 赵捷杰 刘长琳 胡建成	(107)

刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>) 9 月龄主要经济性状遗传力的估计	和 飞 王印庚 廖梅杰 李 彬 孙明超 杜 佗 张文泽 范瑞用	(114)
不同浒苔型饲料对幼刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)生长、消化及非特异性免疫的影响	李 猛 廖梅杰 常 青 王印庚 李 彬 荣小军 高 磊 范瑞用	(122)
发酵豆粕替代藻粉对刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)生长及体组成的影响	李宝山 张利民 张德瑞 孙永智 王世信 王际英	(130)
氟苯尼考对脊尾白虾(<i>Exopalaemon carinicauda</i>)免疫和抗氧化功能的影响	冯艳艳 李 健 李吉涛 许 杨 连春盎 翟倩倩	(140)
致病性粪肠球菌对脊尾白虾(<i>Exopalaemon carinicauda</i>)免疫相关基因表达的影响	段亚飞 李 健 李吉涛 张 喆 刘 萍	(148)
野生条斑紫菜(<i>Pyropia yezoensis</i>)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征	李晓蕾 汪文俊 梁洲瑞 刘福利 孙修涛 曹 原 姚海芹 王飞久	(156)
基于钨丝原子阱与直接进样技术的原子荧光光谱法快速测定贝类中的镉	徐 正 翟明丽 翟毓秀 冯 礼 刘霁欣 尚德荣 赵艳芳 宁劲松	(164)

第 6 期

研究论文

桑沟湾春季海-气界面 CO ₂ 交换通量及其与养殖活动的关系分析	刘 毅 张继红 房景辉 蔺 凡 吴文广	(1)
黄河口海域夏季大型底栖动物的生态学特征	李少文 任中华 王田田	(9)
秦皇岛近海增殖放流区牙鲆(<i>Paralichthys olivaceus</i>)回捕群体的遗传多样性分析	司 飞 孙朝徽 于姗姗 赵雅贤 宋立民 王树亮 王青林 姜秀凤 王玉芬 于青海	(18)
洪泽湖大银鱼(<i>Protosalanx hyalocranius</i>) <i>Cytb</i> 和 <i>CO I</i> 基因序列多态性分析	李大命 李 康 张彤晴 唐晟凯 刘燕山 刘小维 穆 欢 黄越峰 潘建林	(25)
大菱鲆(<i>Scophthalmus maximus</i>)PRL 基因、Na ⁺ -K ⁺ -ATPase $\alpha 1$ 基因对盐度胁迫的响应	崔文晓 马爱军 黄智慧 孙志宾 刘志峰 夏丹丹 唐启政 杨 志 曲江波	(32)
越冬对黄鳝(<i>Monopterus albus</i>)机体生化组成及部分血清生化指标的影响	李昭林 刘庄鹏 何志刚 田芊芊 张俊智 张 璐 米海峰 胡 毅	(41)
急性离水操作胁迫对四指马鲛(<i>Eleutheronema tetradactylum</i>)幼鱼组织结构和氧化应激的影响	刘奇奇 温久福 区又君 李加儿 周 慧	(48)
姜黄素对黄颡鱼(<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)生长、消化与抗氧化能力的影响	张滕闲 陈 钱 张宝龙 林城丽 朱国霞 方珍珍 白东清	(56)
银鲳(<i>Pampus argenteus</i>)染色体标本制备及其核型研究	刘 琨 周丽青 李凤辉 陈四清 葛建龙 刘长琳 施兆鸿	(64)
不同饵料及养殖环境对大黄鱼(<i>Larimichthys crocea</i>)形态差异的影响	沈伟良 吴雄飞 申屠基康 林淑琴	(70)
中国对虾(<i>Fenneropenaeus chinensis</i>)和凡纳滨对虾(<i>Litopenaeus vannamei</i>)对白斑综合征病毒的敏感性比较	冯亚萍 孔 杰 罗 坤 栾 生 曹宝祥 刘 宁 卢 霞 曹家旺 王明珠 王 军 孟宪红	(78)
低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响	李晓丽 王 玲 宋 凯 鲁康乐 张春晓 袁香丽	(85)
魁蚶(<i>Scapharca broughtonii</i>)不同地理群体的遗传多样性及种群结构	刘寒苗 吴 彪 刘志鸿 杨爱国 周丽青 孙秀俊	(92)
短蛸(<i>Amphioctopus fangsiao</i>)幼体摄食行为和不同饵料对其生长、存活的影响	王卫军 董 根 李焕军 刘兆存 李 彬 冯艳微 杨建敏	(100)
莱州湾海域小刀蛸(<i>Cultellus attenuatus</i>)繁殖生物学研究	姜 绪 韦秀梅 冯艳微 韩慧宗 王 圣 刘相全 童 潼	(107)
水流和光照条件对舌状蜈蚣藻 <i>Grateloupia livida</i> (Harv) Yamad 果孢子萌发生长的影响	陈素文 张文文 郭永坚 朱长波 李俊伟 颀晓勇 陈利雄	(112)
碳氮营养和培养条件对芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.) A4 生长的影响	李莎莎 曹煜成 李卓佳 胡晓娟 徐 煜 徐武杰 杨 铿 苏浩昌 文国樑	(119)
固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定养殖海水中 17 种喹诺酮类药物	董 晓 李兆新 孙晓杰 邢丽红 彭吉星 宋才湖	(127)
溴氰菊酯对 4 种海水养殖生物的毒性及其积累	钟硕良 郑惠东 陈宇锋 许贻斌 姜双城 吴立峰	(139)
HMG (High-Mobility Group Box Protein)在刺参(<i>Apostichopus japonicus</i>)肠道再生期间的表达情况分析	缪 婷 孙丽娜 杨红生 王 芳	(148)

Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 38, 2017

No.1

Special Issue: Physiological and Ecological Mechanisms Underlying Reproduction and Growth in Several Marine Fishes

- Research Progress of Reproductive Physiology of Flatfish in China
 LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, WANG Bin, LIU Xinfu, MENG Zhen (1)
- Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) Gene During the Oocyte Maturation of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)
 SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Tao, LI Xiaoni, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong (10)
- Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) in Sexual Maturation of Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)
 SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Tao, LI Xiaoni, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong (18)
- The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Oocytes Maturation in *Cynoglossus semilaevis*
 LI Xiaoni, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, ZHANG Jinyong (25)
- The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Sexual Maturation in Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)
 LI Xiaoni, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, LI Xiaoxiao, ZHANG Jinyong (34)
- HCG Regulation of PGRMC1 Expression in the Oocyte of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)
 ZHANG Jinyong, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang (42)
- Quantitative and Qualitative Expression Analysis of the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in the Tissues of Female Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)
 ZHANG Jinyong, SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Yongjiang (48)
- Effects of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Peptides on the Reproduction-Related Gene Expression in the Hypothalamus of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)
 LIU Quan, WANG Bin, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, LIU Zengxin (56)
- Molecular Cloning, Localization, and Expression Analysis of *gnrh2* in Different Tissues of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) During Ovarian Maturation
 WANG Bin, LIU Xuezhou, LIU Quan, ZHAO Ming, XU Yongjiang, SHI Bao (63)
- Physiological Role of GH/IGF- I Axis in Ovarian Development of *Cynoglossus semilaevis*
 XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Ying, WANG Bin, SHI Bao, ZHANG Kai, LAN Gonggang (73)
- Cloning and Expression of Melanin-Concentrating Hormone in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)
 XU Yongjiang, ZHU Xuewu, LIU Xuezhou, SHI Xueying, SHI Bao, WANG Bin, LI Bin (81)
- Molecular Characterization of *MCHR* and Its Corelation with Blind-Side Hypermelanosis in *Cynoglossus semilaevis*
 SHI Xueying, LIU Xuezhou, SHI Ying, XU Yongjiang, SHI Bao, WANG Bin, LI Bin (91)
- Physiological Mechanisms for Degeneration of Blind-Side Hypermelanosis in Pond-Cultured Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)
 ZHU Xuewu, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin (103)
- Composition of Intestinal Bacterial Community of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) During Early Life Stages
 LIU Zengxin, LIU Xuezhou, SHI Bao, XU Yongjiang, LIU Quan (111)
- Isolation, Culture, and Identification of Two Strains of Probiotics and Their Effects on Water Quality Control
 LI Cunyu, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, ZHENG Wei, SHI Xueying (120)
- Analysis and Evaluation of Nutritional Composition of the Muscle of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)
 LIU Xuezhou, XU Yongjiang, LI Rong, LÜ Yongjun, SHI Bao, NING Jinsong, WANG Bin (128)

Study on the Karyotype of Yellowtail Kingfish (<i>Seriola aureovittata</i>)	(136)
SHI Bao, LIU Yongshan, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, LI Rong, SONG Xuesong, ZHOU Liqing	
Morphometric Analysis and Internal Anatomy of Yellowtail Kingfish (<i>Seriola aureovittata</i>)	(142)
LI Rong, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao	
Structure and Ultrastructure of Alimentary Canal of <i>Cynoglossus semilaevis</i>	(150)
LI Bin, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, SHI Bao, ZHU Xuewu	
Domestication of Wild Broodstock and Early Development of Pacific Cod (<i>Gadus macrocephalus</i>)	(159)
XU Yongjiang, LIU Xuezhou, SHI Bao, WANG Bin	
Tagging Juvenile Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) with Coded Wire Tags	(168)
XU Yongjiang, LIU Xuezhou, ZHANG Kai, LAN Gonggang, SHI Bao	

No.2

Projecting Fishery Ecosystem Health Under Climate Change Scenarios: Yangtze River Estuary and Yellow River Estuary	(1)
SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, JIN Xianshi	
Assessment of Environmental Water Quality in the Central Region of the Bohai Sea in Summer	(8)
XU Yong, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo, XIA Bin	
Pollution Status and the Annual Variations of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of the Yellow River Estuary	(16)
HU Qin, LI Qiang, HUANG Bigui, QU Liang, CAO Jing	
Fishing Capacity Comparison of Different Types of Gillnet in the Liaodong Bay	(24)
XING Binbin, GUO Rui, LI Xiansen, ZHAO Xianyong, ZHANG Guosheng, XU Chuancai, SUN Shan, YOU Zongbo	
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>)	(31)
YU Mengjun, SUN Luming, CHEN Yadong, CHEN Xuejie, YANG Guang, LIU Yang, QIU Xuemei, SHA Zhenxia	
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> ♂)	(40)
LI Qing, ZHENG Fengrong, GUAN Hongbin, NI Shijun, WANG Bo	
Histological Observation of the Post-Embryonic Development of Digestive Tract of <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	(50)
XIE Mujiao, OU Youjun, LI Jiaer, WEN Jiufu, ZHOU Hui, WANG Pengfei, LIU Qiqi	
Effects of Acute Ammonia Nitrogen Stress on Histopathology of Gill and Liver and Enzyme Activities of Juvenile <i>Verasper variegatus</i>	(59)
WANG Zhenjie, CHEN Siqing, CAO Dongzheng, LU Bin, CHANG Qing, LIU Changlin, YAN Jingping	
Effects of Low Temperature Stress on Serum Biochemical Indices of the Juvenile Hybrid of <i>Epinephelus moara</i> ♀ × <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂	(70)
SHAO Yanxiang, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Mengqi, CHEN Jianguo, PANG Zunfang	
Effects of Salinity on the Survival and Feeding of <i>Centropristis striata</i> Larvae	(77)
ZHANG Chunlu, CHEN Chao, LI Yanlu, ZHANG Tingting, LIU Li, QU Jiangbo, SUN Tao	
Effects of Dietary Inclusion of Two Protein Hydrolysates on Growth Performance and Intestinal Histological Structure of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	(83)
MU Yuchao, LIU Xi, WEI Yuliang, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XU Houguo	
Dietary Glycine Improved the Capacity of Anti-Oxidation and Anti-Stress of Large Yellow Croaker (<i>Larimichthys crocea</i>)	(91)
PAN Xiaoyi, ZHANG Qin, LI Jun, LIU Dong, ZHANG Hanle, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen	
Effects of Bile Acids on Growth Performance, Muscle Composition and Digestive Enzyme Activities of <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	(99)
ZENG Benhe, LIAO Zengyan, XIANG Xiao, HE Wenxiao, CEN Min, HE Shancheng	
Oleic Acid Induced Hepatocyte Steatosis Model in Jian Carp (<i>Cyprinus carpio</i> var. Jian)	(107)
DU Jinliang, CAO Liping, JIA Rui, WANG Tao, GU Zhengyan, ZHANG Chunyun, LUO Renjun, XU Pao, YIN Guojun	

- 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, 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 *Misgurnus anguillicaudatus* YUAN Xiangyang, WANG Zhizheng, YANG Cheng, FU Yu, LI Hongpeng, BAI Xiaoqian, ZHU Weidong (121)
- Immune Priming Response Induced by Heat-Inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* 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 *Atrina pectinata* 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 (*Trachycardium flavum*) TANG Baojun, ZOU Xiong, YIN Fei (143)
- Isolation and Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from Diseased Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) WANG Gengshen, XU Wenjun, XIE Jianjun, WANG Wei, SHI Hui (151)
- Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* 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 *PtCht3* in *Portunus trituberculatus* ZHANG Feng, LÜ Jianjian, LIU Ping, GAO Baoquan, LI Jian (167)
- First Report and Microscopic Examination of Epitheliocystis in Cultured Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) in China FAN Chao, SHI Chengyin, LIU Jiangchun (177)

No.3

- Temporal and Spatial Variation Characteristics of Water Nutrients and Eutrophication Evaluation in Aquaculture Water Areas of Sanggou Bay XU Donghui, CHEN Bijuan, JIANG Tao, ZHU Lin, XIA Bin, HAN Qian, GU Bin, CUI Yi, CHAI Chao (1)
- Stock Assessment of Big-Eye Tuna *Thunnus obesus* in Eastern Pacific Ocean: A Comparative Study of the Full and the Simplified SS3 Model ZHU Jiangfeng (12)
- Inter-Annual Concentration Variations and Pollution Assessment of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of Tangshan in Spring HU Qin, GUO Jing, YIN Xiaona, QU Liang, CAO Jing (22)
- Ecological Adaptability of Different Geographical Populations of *Patinopecten yessoensis* in the Northern Yellow Sea YANG Yu, NI Shousheng, LIU Yi, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng (31)
- Genetic Effect Analysis of Growth Traits in *Paralichthys olivaceus* Families LI Xiangkong, TIAN Yongsheng, LI Hong, SONG Lini, GAO Jin, DUAN Huimin, DAI Huan, CHEN Zhangfan, CHEN Songlin, WANG Xiuli (39)
- cDNA Cloning and Analyses of Two Myosin Heavy Chain Isoforms of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*) Based on Transcriptome Sequencing CHEN Zhihang, DONG Junjian, SUN Chengfei, TIAN Yuanyuan, YE Xing (51)
- The Phenotypic and Genetic Traits Analysis of ZZ Males and ZW Males (Sex-Inverted Males) of *Cynoglossus semilaevis* LI Hong, TIAN Yongsheng, LI Xiangkong, CHEN Zhangfan, SONG Lini, DUAN Huimin (62)
- Prokaryotic Expression and Functional Analysis of *CD59* of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) ZHOU Nayu, CAO Dandan, WANG Zhigang, ZHANG Quanqi, QI Jie, WANG Xubo, YU Haiyang (70)
- Histological Observation on Post-Embryonic Development of Digestive System of *Centropristis striata* ZHANG Tingting, CHEN Chao, SHAO Yanxiang, CHEN Jianguo, SUN Tao (78)
- Effects of Different Protein Hydrolysates in High Plant Protein Diets on the Lipid Accumulation of Juvenile Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) CAO Lin, ZHANG Tingting, XU Houguo, ZHENG Keke, LIANG Mengqing (86)

Effects of Different Protein Hydrolysates on Growth Performance and Non-Specific Immunity of Japanese seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	
.....ZHANG Tingting, CHEN Xiaoru, LIANG Mengqing, WANG Chengqiang, ZHENG Keke, XU Houguo, CHEN Qiyong	(96)
Effects of Dietary Replacement of Fish Meal and Soy Protein by Wheat Gluten on Plasma Biochemical Indices and Liver Anti-Oxidative Indices of <i>Nibea japonica</i> and <i>Sparus macrocephalus</i>	
.....CHENG Yanbo, ZHANG Yuexing, DONG Zhiyong, LU Bingyan, WANG Yongchao	(106)
Effects of Dietary Substitution of Fish Oil by Soybean Oil on the Serum Lysozyme Activity and Tissue Antioxidant Capacity in Juvenile Silver Pomfret (<i>Pampus argenteus</i>)	
.....ZHANG Chenjie, PENG Shiming, GAO Quanxin, SHI Zhaohong, WANG Jianguang	(115)
The Effect of Poly- β -Hydroxybutyrate on Enzyme Activities of Nonspecific Immunity in <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	
.....ZHANG Hengheng, MENG Xianhong, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, ZHANG Yingxue	(124)
Microsatellite Marker Analysis on Genetic Variation of the Ridgetail White Prawn <i>Exopalaemon carinicauda</i> Backcross Populations	
.....LIU Jiumei, LI Jitao, LIU Ping, DOU Quanwei, WANG Jiajia, LI Jian	(133)
Simplified Fermentation of a Functional Probiotics and the Application in Prawn (<i>Litopenaeus vannamei</i>) Bio-Floc Breeding	
.....GAO Ge, ZHU Kailing, ZHANG Qingqi, WANG Zhijie, HUANG Jie	(140)
Effects of Temperature Fluctuation on Physiological and Immune Parameters of Scallop (<i>Patinopecten yessoensis</i>)	
.....GAO Zhenkun, ZHANG Jihong, LI Min, MA Sha, GUO Xiaoliang, JIANG Weiwei, LÜ Xūning	(148)
Study on Genetic Diversity of Four New <i>Saccharina japonica</i> Cultivars	
.....YAO Haiqin, LIU Fuli, WANG Feijiu, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao, LI Xiaolei	(155)
Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of the Nutrition Components of Soybean Meal Fermented with <i>Bacillus firmus</i>	
.....SUN Jing, SONG Xiaoling, HUANG Jie	(163)
Effects of Ammonia Nitrogen Stress on the Survival and Activities of Non-Specific Immune Enzymes of Different-Sized Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>)	
.....XU Songtao, ZHAO Bin, LI Chenglin, HU Wei, HAN Sha, LI Qi	(172)
Screening and Characteristic Analysis of Potential Probiotics from Large Water Ponds Used for Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>) Farming	
.....DU Tuo, LI Bin, WANG Yingeng, LIAO Meijie, WANG Jinyan, LIU Zhixuan, WANG Shihuan	(180)
Etiology and Treatment of Enteritis Disease in Cultured Junviles of <i>Apostichopus japonicus</i>	
.....PANG Huijuan, LIAO Meijie, LI Bin, RONG Xiaojun, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, SUN Jinsheng, MENG Fanlin	(188)
Assessment on the Culture Efficiency of <i>Paralichthys olivaceus</i> and <i>Scophthalmus maximus</i> in Two New Environment-Friendly Plastic Cages	
.....WANG Tengting, GUAN Changtao, GONG Pihai, CUI Yong, LI Zhenzhen	(198)

No.4

Feeding Habits and Ontogenetic Diet Shifts of Yellowfin Tuna (<i>Thunnus albacores</i>) in the South China Sea	
.....TAO Yajin, MO Meng, HE Xiongbo, FENG Bo, LU Huosheng, YAN Yunrong	(1)
Histopathology and Ultrastructure of Visceral White-Spots in <i>Pseudosciaena crocea</i>	
.....ZHANG Danfeng, AN Shuwei, ZHOU Suming, WANG Guoliang	(11)
Diversity and Drug Resistance of Bacterial Pathogens Isolated from Bacterial Ascetic Disease in Cultured Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	
.....WANG Lan, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, CHEN Guohua, LIAO Meijie, CHEN Xia, GUO Weili	(17)
Isolation and Characterization of the Extracellular Products (ECPs) and Secretory Proteins of the Pathogenic <i>Vibrio harveyi</i> Strain ML01	
.....SHEN Guiming, LI Chen, SHI Chengyin, JIA Dan, FAN Chao, XIE Guosi, FU Qianjie	(25)
Cloning and Expression Analysis of <i>Mn-SOD</i> Gene of <i>Odontobutis potamophila</i>	
.....ZHANG Hongye, YU Xingda, WANG Peipei, JIA Xiuqi, LI Xinru, CAO Quanquan, YIN Shaowu, CHEN Shuqiao, ZHOU Gouqin	(34)
Effects of Dietary Taurine and Related Amino Acids on Growth and Amino Acid Composition of Japanese Seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	
.....LIU Xi, WANG Chengqiang, LIANG Mengqing, XU Houguo	(44)

- Effects of Dry Exposure on the Respiratory Metabolism-Related Enzymes of *Exopalaemon carinicauda* LIAN Chunang, LI Jian, LI Jitao, FENG Yanyan (53)
- Effects of Poly- β -Hydroxybutyrate on the Fecundity and Larval Development of *Fenneropenaeus chinensis* ZHANG Hengheng, MENG Xianhong, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, ZHANG Yingxue (61)
- The Difference of Genetic Diversity and the Comparison of Growth Performance Between Selected Population and Hybridized Population of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Under Low Temperature Conditions LI Dongyu, MENG Xianhong, KONG Jie, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LUO Kun (69)
- Genetic Analysis of 33 Microsatellite Loci in 3 Families of *Exopalaemon carinicauda* Inbred Line WANG Rifang, LI Jian, LI Jitao, WANG Jiajia, LIU Ping (78)
- The Effect of Diet with *Bacillus cereus* Biofilm on the Growth Rate, Disease Resistance and Intestinal Microflora of *Litopenaeus vannamei* LIU Wenliang, XU Hua, TANG Yang, SONG Xiaoling, HUANG Jie (87)
- The Relationship of Body Length and Weight in the *Litopenaeus vannamei* Populations Detected *Enterocytozoon hepatopenaei* LIU Yamei, QIU Liang, CHENG Dongyuan, ZHANG Qingli, WAN Xiaoyuan, HUANG Jie (96)
- Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Elimination of Sulfadiazine and Trimethoprim in Mud Crab (*Scylla paramamosain*) After Oral Administration CHEN Jinjun, WANG Yuan, ZHAO Shu, SHEN Jinyu, ZHAO Liuji, FANG Wenhong (104)
- Genetic Variation in Two Phenotypical Populations of *Corbicula fluminea* in Hongze Lake LI Daming, ZHANG Tongqing, TANG Shengkai, ZHONG Liqiang, HUANG Yuefeng, MU Huan, LIU Yanshan, LIU Xiaowei (111)
- Status of Heavy Metal Pollution in the Shellfish Culture Area of Shangdong Province and the Risk Analysis of Heavy Metal Elements in the Shellfish SUN Shan, ZHAO Yuting, WANG Liming, YOU Liping, TAO Huimin, GU Weili, ZHANG Xiuzhen (118)
- Development and Evaluation of Droplet Digital PCR Assay for the Detection of CyHV-2 and Comparative Analysis ZHAO Xin, JIA Peng, LIU Ying, WANG Jinjin, SHI Xiujie, PAN Guang, ZHENG Xiaocong, YU Li, HE Junqiang, LIU Hong, WU Zhixin (126)
- Cloning and Expression of Notch Gene in *Rhopilema esculentum* LUO Xiaorui, ZHU Ling, ZHOU Chunya, ZHUANG Zhimeng, FAN Yanjun (134)
- The High Temperature Resistance and Physiological Changes of Selective Breeding “Gaokang No. 1” Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* During High-Temperature Phase SUN Mingchao, WANG Yingeng, LIAO Meijie, LI Bin, CAI Shengli, FAN Ruiyong (146)
- Effects of Dietary Selenium-Enriched Yeast Levels on Important Physiological Enzymes and Enrichment of Selenium in Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) LI Xiumei, XU Tao, SUN Guohua, YANG Jianmin, LI Genrui, LI Haizhou (154)
- Effects of Dietary Tuber and Stem of Sweet Potato on Growth and Non-Specific Immunity of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka HU Wei, ZHAO Bin, LI Chenglin, HAN Sha, ZHANG Yanping (164)
- Detection of Sixteen Herbicides in Animal Origin Aquatic Products Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry QIAO Dan, LIU Xiaojing, HAN Dianfeng, HUANG Hui, ZHANG Huawei, XU Yingjiang, GONG Xianghong, ZHANG Xiuzhen (172)
- The Effect of Careshell on Growth of *Scapharca broughtonii* GUO Xiaoliang, MAO Yuze, LI Yang, LI Jiaqi, CHEN Qionglin, XUE Suyan, GAO Zhenkun (180)
- Research Advancement in the Endocrine Disrupting Chemical Effects on Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis of Teleost TIAN Hua, ZHANG Xu, RU Shaoguo, ZHANG Xiaona (186)

No.5

- The Characteristics of the Sedimentary Environment in a Typical Habitat of *Pernereis aibuhitensis* Grube FANG Jinghui, WANG Haiqing, FANG Jianguang, JIANG Zengjie, DU Meirong, GAO Yaping, ZHOU Kai, ZHANG Liyao (1)

Morphological and Histological Observation of the Embryo of American Shad (<i>Alosa sapidissima</i>)	(9)
GAO Xiaoqiang, LIU Zhifeng, HUANG Bin, WANG Yaohui, XUE Guoping, QIN Weilun, GUAN Changtao, HONG Lei	
The Karyotype and C-Banding of <i>Percocypris pingi</i>	(19)
LI Shu, TIE Huaimao, DUAN Jing, ZHAO Zhongmeng, YANG Song, GUO Xiulan, YANG Shiyong	
Isolation and Identification of <i>Aeromonas salmonicida</i> Associated with Furunculosis in Cultured Sablefish (<i>Anoplopoma fimbria</i>)	(25)
WANG Xiaoran, CHEN Siqing, MO Zhaolan, LI Guiyang, LIU Changlin, WANG Youting, LI Jie, HUANG Jie	
Isolation and Classification of Exophthalmic Disease-Inducing Pathogenic Bacterium from <i>Centropristis striata</i>	(32)
CHEN Jianguo, CHEN Chao, LI Yanlu, SUN Shuguang, SHAO Yanxiang, ZHANG Tingting, LIU Li, SUN Tao	
Principal Component Analysis of the Morphometric Traits of the Cuttlebone of <i>Sepia esculenta</i> at Early Developmental Stages	(41)
LI Da, LIU Changlin, LI Ang, DU Tengfei, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng	
Biological Control of Macroalgae Fouled on the Net of Marine Cage Using <i>Siganus oramin</i> in Northern China	(50)
LÜ Xuning, JIANG Zengjie, FANG Jianguang, ZOU Jian, FANG Jinghui, GAO Zhenkun, JIANG Weiwei, GUO Xiaoliang	
Study on the Organisms Attachment of Artificial Reefs Constructed with Five Different Cements	(57)
LI Zhenzhen, GONG Pihai, GUAN Changtao, LI Jiao, WANG Tengting	
Analysis of the Microalgae Community in Industrial Aquaculture Ponds of Pacific White Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	(64)
SHEN Mingming, LI Jian, WANG Qingyin, GE Hongxing, LIU Ping, CHANG Zhiqiang	
Microbial Diversity in Bio-Filter of the Recirculating Aquaculture System for <i>Litopenaeus vannamei</i>	(73)
ZHANG Jianlong, JIANG Min, WANG Chengfeng, TONG Xiaolan, JIN Jing, GU Deping, HU Weiguo, YU Zhongli, DAI Xilin	
Contamination and Accumulation of Heavy Metals in <i>Dicentrarchus labrax</i> Cultured in Recirculating Aquatic Systems	(83)
WAN Huishan, CHENG Bo, SONG Xiaohong, LI Le, SONG Yi	
Effects of Illumination and Size on Metabolism of Oxygen Consumption, Ammonia and Active Phosphate Excretion in Giant Clam <i>Tridacna crocea</i>	(92)
LIU Xiaoxia, LI Le, ZHENG Xing, GU Zhifeng, LIU Chunsheng	
Effects of Complex-Probiotic-Preparation on the Growth, Digestive Enzymes and the Nonspecific Immune Indices of Atlantic Salmon (<i>Salmo salar</i>)	(100)
LIU Shulan, CHEN Juan, LI Jie, LIU Hao, HU Jiaping, ZHANG Lili, HAN Houwei, SUN Guoxiang, WANG Chun	
Effects of Dietary Skimmed Krill Meal on the Growth, Non-Specific Immunity and Serum Physiological Metabolism Indices of Juvenile Spotted Halibut (<i>Verasper variegatus</i>)	(107)
ZHENG Jianming, YAN Junli, CHEN Siqing, CHANG Qing, WANG Zhenjie, ZHAO Jiejie, LIU Changlin, HU Jiancheng	
Estimation of the Heritability of Three Economic Traits in 9-month-old Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i>	(114)
HE Fei, WANG Yingeng, LIAO Meijie, LI Bin, SUN Mingchao, DU Tuo, ZHANG Wenze, FAN Ruiyong	
Effects of Different Diets Containing <i>Enteromorpha prolifera</i> on Growth, Digestion and Non-Specific Immunity of Juvenile Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>)	(122)
LI Meng, LIAO Meijie, CHANG Qing, WANG Yingeng, LI Bin, RONG Xiaojun, GAO Lei, FAN Ruiyong	
Effects of the Fermented Soybean Meal as a Replacement of Algae Powder on the Growth Performance and Body Composition of Juvenile Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>)	(130)
LI Baoshan, ZHANG Limin, ZHANG Derui, SUN Yongzhi, WANG Shixin, WANG Jiying	
Effects of Florfenicol on the Immune and Antioxidant Activities of <i>Exopalaemon carinicauda</i>	(140)
FENG Yanyan, LI Jian, LI Jitao, XU Yang, LIAN Chunang, ZHAI Qianqian	
The Expression Profiles of Immunity-Related Genes After Pathogenic <i>Enterococcus faecalis</i> Challenge in <i>Exopalaemon carinicauda</i>	(148)
DUAN Yafei, LI Jian, LI Jitao, ZHANG Zhe, LIU Ping	
Antioxidant Physiological Characteristics of Wild <i>Pyropia yezoensis</i> Under Desiccation Stress	(156)
LI Xiaolei, WANG Wenjun, LIANG Zhouhui, LIU Fuli, SUN Xiutao, CAO Yuan, YAO Haiqin, WANG Feijiu	
Rapid Determination of Cadmium in Shellfish Based on Direct Sampling Electrothermal Vaporization Atomic Fluorescence Spectrometry with a Tungsten Coil Trap	(164)
XU Zheng, ZHAI Mingli, ZHAI Yuxiu, FENG Li, LIU Jixin, SHANG Derong, ZHAO Yanfang, NING Jinsong	

No.6

- Analysis of the Air-Sea Surface Carbon Dioxide Flux and Its Interaction with Aquaculture Activities in Sanggou Bay
 LIU Yi, ZHANG Jihong, FANG Jinghui, LIN Fan, WU Wenguang (1)
- Ecological Characteristics of Macrobenthos at the Yellow River Estuary in Summer
 LI Shaowen, REN Zhonghua, WANG Tiantian (9)
- Analysis of the Genetic Variability of the Captured Population of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the Coastal
 Releasing Area of Qinhuangdao SI Fei, SUN Zhaohui, YU Shanshan, ZHAO Yaxian,
 SONG Limin, WANG Shuliang, WANG Qinglin, JIANG Xiufeng, WANG Yufen, YU Qinghai (18)
- Genetic Polymorphism Analysis of *Cytb* and *CO I* Gene Sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake
 LI Daming, LI Kang, ZHANG Tongqing,
 TANG Shengkai, LIU Yanshan, LIU Xiaowei, MU Huan, HUANG Yuefeng, PAN Jianlin (25)
- Effects of Salinity Stress on the mRNA Expression of PRL and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha 1$ of Turbot (*Scophthalmus maximus*)
 CUI Wenxiao, MA Aijun, HUANG Zhihui, SUN Zhibin, LIU Zhifeng, XIA Dandan, TANG Qizheng, YANG Zhi, QU Jiangbo (32)
- Effects of Overwintering on the Body Biochemical Composition and Serum Biochemical Indices of Rice Field Eel (*Monopterus
 albus*) LI Zhaolin, LIU Zhuangpeng, HE Zhigang, TIAN Qianqian, ZHANG Junzhi, ZHANG Lu, MI Haifeng, HU Yi (41)
- The Effects of Acute Off-Water Handling Stress on the Tissue Structure and Oxidative Stress of Juvenile *Eleutheronema
 tetradactylum* LIU Qiqi, WEN Jiufu, OU Youjun, LI Jiaer, ZHOU Hui (48)
- The Effects of Curcumin on the Growth, Digestion and Antioxidant Ability of Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)
 ZHANG Tengxian, CHEN Qian, ZHANG Baolong, LIN Chengli, ZHU Guoxia, FANG Zhenzhen, BAI Dongqing (56)
- Chromosome Samples Preparation and Karyotype Analysis of Pomfret (*Pampus argenteus*)
 LIU Kun, ZHOU Liqing, LI Fenghui, CHEN Siqing, GE Jianlong, LIU Changlin, SHI Zhaohong (64)
- The Effects of Different Diets and Culture Environments on the Morphological Variations in the Large Yellow Croaker
 (*Larimichthys crocea*) SHEN Weiliang, WU Xiongfei, SHENTU Jikang, LIN Shuqin (70)
- The Comparison of the Sensitivity to the White Spot Syndrome Virus Between *Fenneropenaeus chinensis* and *Litopenaeus
 vannamei* FENG Yaping, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng,
 CAO Baoxiang, LIU Ning, LU Xia, CAO Jiawang, WANG Mingzhu, WANG Jun, MENG Xianhong (78)
- Effects of Dietary Low-Molecular-Weight Fish Hydrolysate (LWFH) on Nonspecific Immunity and Antioxidant Capacity of
 Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
 LI Xiaoli, WANG Ling, SONG Kai, LU Kangle, ZHANG Chunxiao, YUAN Xiangli (85)
- Genetic Diversity and Geographic Population Structures of *Scapharca broughtonii*
 LIU Hanmiao, WU Biao, LIU Zhihong, YANG Aiguo, ZHOU Liqing, SUN Xiujun (92)
- Feeding Behavior of Larval *Amphioctopus fangsiao* and the Effect of Different Diets on Its Growth and Survival
 WANG Weijun, DONG Gen, LI Huanjun, LIU Zhaocun, LI Bin, FENG Yanwei, YANG Jianmin (100)
- The Reproductive Biology of *Cultellus attenuatus* in the Laizhou Bay
 JIANG Xu, WEI Xiumei, FENG Yanwei, HAN Huizong, WANG Sheng, LIU Xiangquan, TONG Tong (107)
- Effect of Water Velocity and Light on the Growth and Development of *Grateloupia livida* (Harv) Yamad Carpospores
 CHEN Suwen, ZHANG Wenwen, GUO Yongjian, ZHU Changbo, LI Junwei, XIE Xiaoyong, CHEN Lixiong (112)
- The Effects of Different Carbon and Nitrogen Nutrients and Culture Conditions on the Growth of *Bacillus* sp. Strain A4
 LI Shasha, CAO Yucheng, LI Zhuojia, HU Xiaojuan, XU Yu, XU Wujie, YANG Keng, SU Haochang, WEN Guoliang (119)
- Simultaneous Determination of Seventeen Quinolones in Aquaculture Seawater Using Solid-Phase Extraction and Liquid
 Chromatography Tandem Mass Spectrometry
 DONG Xiao, LI Zhaoxin, SUN Xiaojie, XING Lihong, PENG Jixing, SONG Caihu (127)
- The Acute Toxicity and Bioaccumulation of Deltamethrin in Four Species of Mariculture Organisms
 ZHONG Shuoliang, ZHENG Huidong, CHEN Yufeng, XU Yibin, JIANG Shuangcheng, WU Lifeng (139)
- Expression Analysis of HMG (High-Mobility Group Box Protein) During the Intestine Regeneration of Sea Cucumber *Apostichopus
 japonicus* MIAO Ting, SUN Lina, YANG Hongsheng, WANG Fang (148)

《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 谧 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士瑾 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立侨 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 健 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6期 2017年12月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.38 No.6 Dec. 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.yykxjz.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 by Ministry of Agriculture, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Tang Qisheng

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch

Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986170

12>