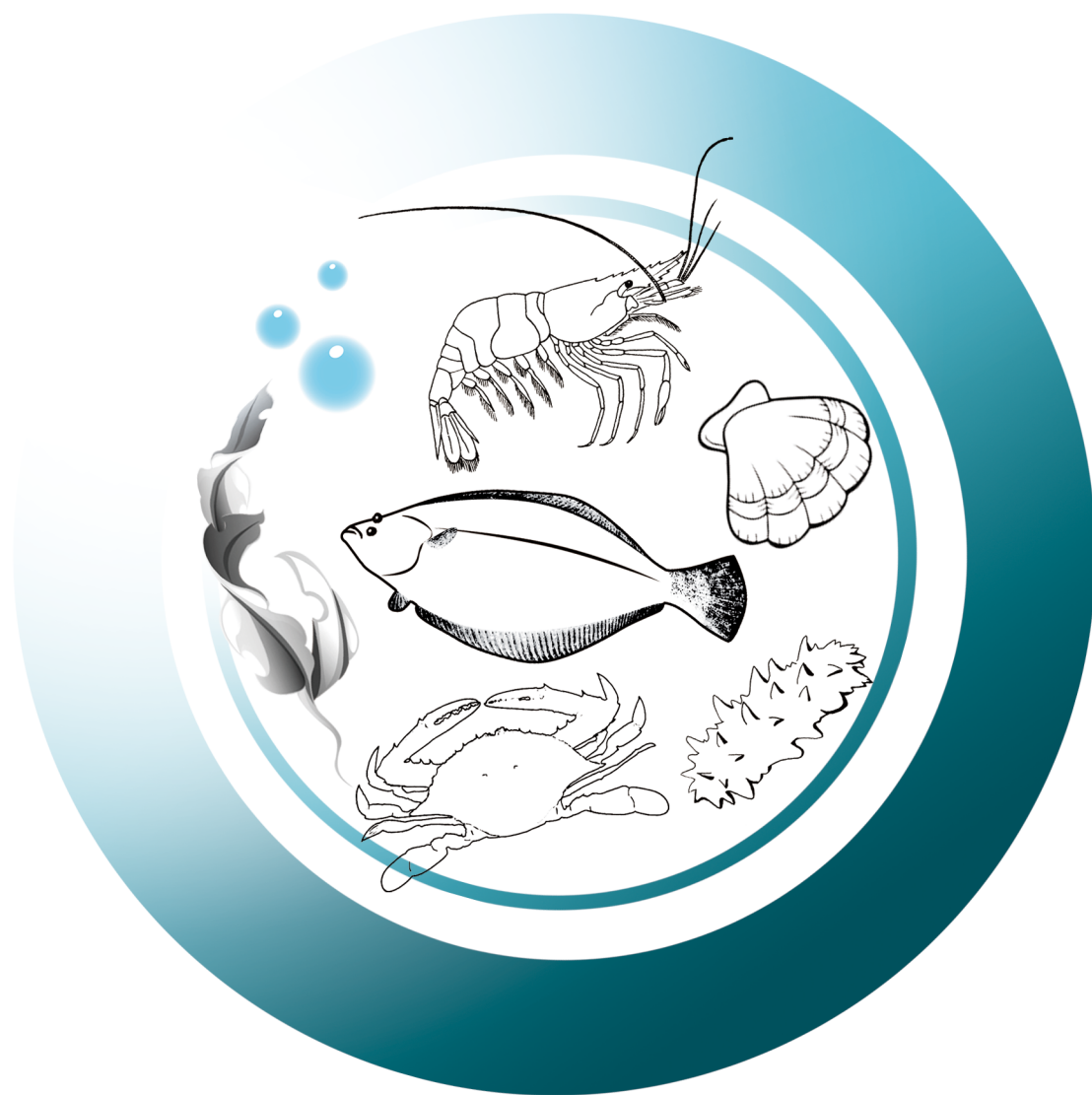


渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第41卷 VOL.41 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 41 卷 第 6 期

2020 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

- 基于不同空间插值法的黄海和东海北部游泳动物多样性空间分布研究 ·····唐 政 单秀娟 关丽莎 金显仕 胡芷君 韩青鹏 (1)
- 天津大神堂海域不同时间序列礁体附着生物群落特征变化 ·····郭 彪 陈 卫 高 燕 张博伦 王 硕 王 宇 张 雪 曾祥茜 (12)
- 秋季莱州湾弓子网网囊网目尺寸选择性研究 ·····许庆昌 李显森 孙 珊 樊钢洲 (19)
- 草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究 ·····朱亚华 姜 涛 陈修报 刘洪波 杨 健 (28)
- 许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 B₆ 需求量的研究 ·····周 莹 王际英 李宝山 王成强 王世信 孙永智 马长兴 (37)
- 塔里木裂腹鱼消化系统形态学与组织学研究 ·····任永丽 聂竹兰 杨志军 张 升 魏 杰 (49)
- 恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾的抗氧化功能的影响 ·····陈梓聪 陈丕茂 袁华荣 冯 雪 佟 飞 陈文静 龙鑫玲 张皓铭 (58)
- 不同光照周期对日本囊对虾生长、蜕皮和糖代谢的影响 ·····王 想 任宪云 绳秀珍 李翠苹 李 健 (66)
- 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾成分和糖代谢的影响 ·····肖 威 单洪伟 马 甦 李忠帅 (74)
- 不同性别口虾蛄形态性状对体重的影响分析及曲线拟合 ·····张新明 程顺峰 (82)
- 三疣梭子蟹体内 As 的蓄积特异性研究 ·····韩雅荃 陈碧鹃 张 艳 夏 斌 唐学玺 (92)
- 基于叶绿素 *a* 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估 ·····董世鹏 蔺 凡 姜妮妮 杜美荣 高亚平 李凤雪 侯 兴 蒋增杰 (100)
- 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响 ·····刘 洋 于瑞海 张 哲 田传远 钱嘉文 (108)
- 条斑紫菜丝状体不同发育时期对光照和温度的光合适应能力 ·····魏家慧 李国梁 汪文俊 梁洲瑞 鲁晓萍 刘福利 孙修涛 张朋艳 (115)
- 引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析 ·····赵 强 杨 爽 刘心田 孙国华 冯艳微 王卫军 杨建敏 (125)
- 南海鸕鹚微型群雌性个体繁殖力研究 ·····朱 凯 张立川 肖楚源 陈新军 林东明 朱俊磊 (140)
- 基于全长转录组测序的金鸕鹚微卫星位点筛选与特征分析 ·····张金勇 何暮春 项子龙 柳淑芳 庄志猛 (149)
- 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用 ·····邹 莹 郭晓萌 万晓媛 邱 亮 张庆利 (156)
- 虾肝肠胞虫全基因组分泌蛋白的预测分析 ·····宁梓健 姜宏波 刘 琦 包 杰 (165)
- 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析 ·····李翠苹 翟倩倩 王 想 李 健 (174)
- 丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏品质的影响 ·····陈小雷 胡 王 马朝彬 凌 俊 段国庆 鲍 凯 (181)
- 综述**
- 岩礁鱼类行为生态学研究进展 ·····李 娇 公丕海 常 青 孟 振 关长涛 李佳佳 (192)
- 鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望 ·····唐嘉嘉 李诗钰 李安兴 (200)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.41 No.6 December 2020

- Study of the Distribution of Nekton Diversity Base on Spatial Interpolation Methods in the Yellow Sea and North East China Sea TANG Zheng, SHAN Xiujuan, GUAN Lisha, JIN Xianshi, HU Zhijun, HAN Qingpeng (1)
- Community Characteristics of Attaching Organisms on the Artificial Reefs Built in Different Years in Dashentang, Tianjin GUO Biao, CHEN Wei, GAO Yan, ZHANG Bolun, WANG Shuo, WANG Yu, ZHANG Xue, ZENG Xiangxi (12)
- Selectivity of Codend Mesh of Beam Trawl in Laizhou Bay in Autumn XU Qingchang, LI Xiansen, SUN Shan, FAN Gangzhou (19)
- The Marking Characteristics of Otoliths of Larval Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Immersion in Alizarin Complexone ZHU Yahua, JIANG Tao, CHEN Xiubao, LIU Hongbo, YANG Jian (28)
- Dietary Vitamin B₆ Requirements of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegeli*) ZHOU Ying, WANG Jiying, LI Baoshan, WANG Chengqiang, WANG Shixin, SUN Yongzhi, MA Changxing (37)
- Morphology and Histology Studies of the Digestive System of *Schizothorax biddulphi* REN Yongli, NIE Zhulan, YANG Zhijun, ZHANG Sheng, WEI Jie (49)
- Effect of Recovery Time on Antioxidant Capacity of Juvenile *Penaeus monodon* After Exhaustive Exercise CHEN Zicong, CHEN Pimao, YUAN Huarong, FENG Xue, TONG Fei, CHEN Wenjing, LONG Xinling, ZHANG Haoming (58)
- Effects of Different Photoperiods on Growth, Molting and Glucose Metabolism of *Marsupenaeus japonicas* WANG Xiang, REN Xianyun, SHENG Xiuzhen, LI Cuiping, LI Jian (66)
- Effects of Chronic Nitrite Stress on Body Composition and Glucose Metabolism of *Litopenaeus vannamei* XIAO Wei, SHAN Hongwei, MA Shen, LI Zhongshuai (74)
- Effect and Curve Fitting of Morphological Traits to Body Weight Between Male and Female Mantis Shrimp (*Oratosquilla oratoria*) ZHANG Xinming, CHENG Shunfeng (82)
- Study on the Accumulation Specificity of Arsenic in *Portunus trituberculatus* HAN Yaquan, CHEN Bijuan, ZHANG Yan, XIA Bin, TANG Xuexi (92)
- Estimation of Carrying Capacity of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay Based on Spatial and Temporal Distribution of Chlorophyll *a* DONG Shipeng, LIN Fan, JIANG Weiwei, DU Meirong, GAO Yaping, LI Fengxue, HOU Xing, JIANG Zengjie (100)
- Effects of Different pH on Embryo Development and Larval Growth of Bay Scallop (*Argopecten irradians*) LIU Yang, YU Ruihai, ZHANG Zhe, TIAN Chuanyuan, QIAN Jiawen (108)
- Effects of Light Intensity and Temperature on Photosynthetic Adaptability of the Different Stages of *Pyropia yezoensis* Free-Living Conchocelis WEI Jiahui, LI Guoliang, WANG Wenjun, LIANG Zhourui, LU Xiaoping, LIU Fuli, SUN Xiutao, ZHANG Pengyan (115)
- Structure and Analysis of Mitochondrial Sequences of Introduced Russian Red Sea Cucumber ZHAO Qiang, YANG Shuang, LIU Xintian, SUN Guohua, FENG Yanwei, WANG Weijun, YANG Jianmin (125)
- Characterizing Fecundity of Dwarf form of Female Purple Flying Squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in the South China Sea ZHU Kai, ZHANG Lichuan, XIAO Chuyuan, CHEN Xinjun, LIN Dongming, ZHU Junlei (140)
- Microsatellite Screening and Characterization Analysis of *Sepia esculenta* Based on Full-length Transcriptome Sequencing ZHANG Jinyong, HE Muchun, XIANG Zilong, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng (149)
- Establishment and Application of the LAMP Detection Method for Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) ZOU Ying, GUO Xiaomeng, WAN Xiaoyuan, QIU Liang, ZHANG Qingli (156)
- Genome-Wide Prediction and Analysis of Secreted Proteins of *Enterocytozoon hepatopenaei* NING Zijian, JIANG Hongbo, LIU Qi, BAO Jie (165)
- Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp Culture Ponds and Analysis of its Drug Resistance and Virulence Genes LI Cuiping, ZHAI Qianqian, WANG Xiang, LI Jian (174)
- Effects of Clove Oil on Storage Quality of Crab Cream and Shrimp Sauce CHEN Xiaolei, HU Wang, MA Chaobin, LING Jun, DUAN Guoqing, BAO Kai (181)
- Research Progress on Behavioral Ecology of Reef Fish LI Jiao, GONG Pihai, CHANG Qing, MENG Zhen, GUAN Changtao, LI Jiajia (192)
- Research Progress and Prospects of Parasitic Diseases in Salmon and Trout TANG Jiajia, LI Shiyu, LI Anxing (200)

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20190715001

http://www.yykxjz.cn/

唐政, 单秀娟, 关丽莎, 金显仕, 胡芷君, 韩青鹏. 基于不同空间插值法的黄海和东海北部游泳动物多样性空间分布研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 01–11

Tang Z, Shan XJ, Guan LS, Jin XS, Hu ZJ, Han QP. Study of the distribution of nekton diversity base on spatial interpolation methods in the Yellow Sea and north East China Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 01–11

基于不同空间插值法的黄海和东海北部 游泳动物多样性空间分布研究*



唐 政^{1,3} 单秀娟^{2,3①} 关丽莎³ 金显仕^{2,3} 胡芷君^{1,3} 韩青鹏^{3,4}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071; 4. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘要 物种多样性空间分布是生态学研究的重要内容之一, 空间插值法在该领域应用广泛。本研究以 2017 年 5 月黄海和东海北部游泳动物多样性为例, 选取种类数(S)、Shannon-Weaver 多样性指数(H')、Pielou 均匀度指数(J)和 Margalef 丰富度指数(d)来衡量该海域物种多样性, 应用反距离加权法(Inverse distance weighted, IDW)、径向基函数法(Radial basis function, RBF)、局部多项式法(Local polynomial interpolation, LPI)、普通克里格法(Ordinary kriging, OK)和协同克里格法(Ordinary cokriging, COK)对上述 4 种多样性指数进行插值, 通过 jackknife 检验的方法选择适合每种多样性指数的空间插值法。结果表明, 对于 4 种多样性指数, COK 结果均最好, 而其他 4 种方法精度较低, 且差别不大。COK 预测结果表明, S 和 d 都呈现出东南部高, 北部次之, 中部最低的格局。 H' 和 J 也是中部最低, 在南部和北部海域差异不大。4 种多样性指数在 32°N 以南海域的高值区范围大致相同。COK 可以作为黄海和东海北部游泳动物多样性空间插值的方法。

关键词 游泳动物; 多样性; 空间插值; 空间分布

中图分类号 Q178.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0001-11

为了探究变量在不同空间尺度上的分布格局和变化规律, 通常要求采样信息具有空间上的连续性, 但是受成本和技术等限制, 对于高山、地层和海洋等难以到达或范围较大的研究区域, 只能获取具有一定分辨率的分散样本点数据(Li *et al.*, 2014), 空间插值法可以利用有限的的数据, 对整个研究区域的变量进行预测, 减少采样调查的费用和难度, 因此, 被广泛应

用于水文、气象、土壤、矿产、农业和生态等方面(孙铭帅等, 2017; 岳文泽等, 2005)。空间插值法可以分为非地统计法、地统计法和二者结合的方法(Li *et al.*, 2014)。受自身算法、数据本身属性以及样本点数量等多种因素的影响, 不同情况下空间插值法的精度存在一定差异(朱会义等, 2004), 例如, 孙慧等(2017)研究发现, Cubist 方法预测的土壤 Cd 含量结果精度

* 国家自然科学基金(31872692)、国家重点研发计划(2017YFE0104400)和山东省泰山学者专项共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31872692), National Key R&D Program of China (2017YFE0104400), and Taishan Scholar Project of Shandong Province]. 唐 政, E-mail: Tzheng2017@163.com

① 通讯作者: 单秀娟, 研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-07-15, 收修改稿日期: 2019-09-22

较高;Chen等(2016)发现,不同采样时间对渔业资源密度空间插值的精度存在差异;Luo等(2011)对多种方法估算的月降水量的空间分布进行比较发现,协同克里格法(Ordinary cokriging, COK)的精度要高于泰森多边形法、反距离加权法(Inverse distance weighted, IDW)和普通克里格法(Ordinary kriging, OK)。因此,在实际应用时,有必要先对不同插值方法进行比较分析,选择最优的方法。

物种多样性在不同尺度上的空间分布特征是生态学研究中的重要问题(李圣法, 2005; 马斌等, 2008)。游泳动物作为水生生物群落的重要组成部分,其多样性空间变化可以在一定程度上反映物种多样性的变动趋势。目前,只在陆地生物多样性空间分布中发现不同空间插值法的比较研究(Hernandez-Stefanoni *et al*, 2006),虽然空间插值法在海洋生物多样性空间分布中已有应用(Stelzenmüller *et al*, 2009; Tittensor *et al*, 2010; 张敏等, 2011; 吕振波等, 2012),但是尚未见不同方法优劣的判别研究。因此,本研究比较分析了5种常用的空间插值法[包括IDW、径向基函数法(Radial basis function, RBF)、局部多项式法(Local polynomial interpolation, LPI)、OK和COK]对4种多样性指数[即物种种类数(S)、Shannon-Weaver多样性指数(H')、Pielou均匀度指数(J)和Margalef丰富度指数(d)]的插值结果,选出最适合海洋游泳动物多样性插值的方法,以期海洋生态学研究提供参考。

1 数据与方法

1.1 数据来源

数据来自2017年5月黄海和东海北部渔业资源底拖网调查,调查站位见图1。调查船为中国水产科学研究院黄海水产研究所“北斗”号,平均拖速为3.0 kn,拖网时间为0.5~1 h,调查网具网目尺寸为836目×20 cm,囊网网目为2.4 cm,网具总长度为83.2 m。渔获物鉴定到种,并记录每一个种类的尾数和重量。数据分析前,将原始数据标准化为1 h的渔获尾数和渔获重量。

1.2 物种多样性指数

采用物种种类数(S)、Shannon-Weaver多样性指数(H')、Pielou均匀度指数(J)和Margalef丰富度指数(d)对游泳动物多样性进行分析,公式如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

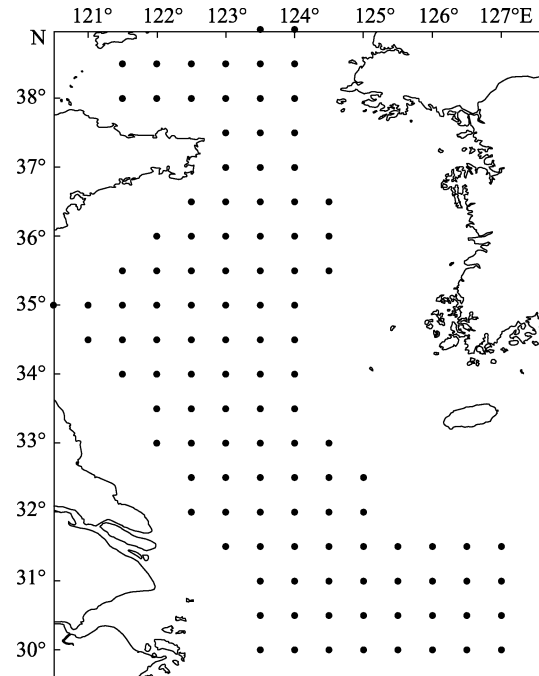


图1 黄海和东海北部调查站位图
Fig.1 Survey stations in the Yellow Sea and north East China Sea

$$J = H' / (\ln S)$$

$$d = (S-1) / \ln N$$

式中, S 为每个站位游泳动物种类数, P_i 为第*i*种游泳动物重量占总重量的比例, N 为所有游泳动物的总重。

1.3 空间插值法

1.3.1 反距离加权插值 IDW基于相近相似原理(Chaplot *et al*, 2006),假设每一个样本点的值都会对邻近区域产生影响,距离未知点越近的样本点对其影响程度越大。公式如下(Shepard, 1968):

$$Z(x_0) = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^{-w} Z(x_i)}{\sum_{i=1}^n d_i^{-w}}$$

式中, $Z(x_0)$ 为未知点 x_0 的预测值; $Z(x_i)$ 为第*i*个样本点 x_i 的观测值; d_i 为 x_0 与 x_i 之间的欧氏距离; n 为样本点的数量; w 为幂指数,控制样本点与未知点距离变化对权重的影响程度。

1.3.2 径向基函数插值 RBF是利用径向基函数逼近样本点的值,产生一个贯穿所有样本点且总曲率最小的曲面(Powell, 1981; Xie *et al*, 2011)。公式如下:

$$Z(x_0) = \sum_{i=1}^n \alpha(x_i) \phi(\|x - x_i\|)$$

式中, x 为某一样本点; $\phi(\|x-x_i\|)$ 为径向基函数, 主要包括薄板样条函数、高次曲面函数、张力样条函数、反高次曲面函数和规则样条函数; $\|x-x_i\|$ 为 x 与 x_i 之间的欧几里得距离; $\alpha(x_i)$ 为 x_i 处待定系数, 公式如下(夏茂辉等, 2006):

$$\alpha^T(x_i) = \{\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n\}$$

式中, $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ 表示第 1、2、...、 n 个样本点对应的待定系数。

1.3.3 局部多项式插值 LPI 是利用观测数据拟合出的多项式方程对未知点进行预测, 其中, 样本点的位置作为自变量, 观测值作为因变量。一阶多项式生成的预测图为平面, 二阶多项式生成的预测图有 1 个曲面, 依次类推。

1.3.4 普通克里格插值 OK 是利用样本的半变异函数模型的结构特点, 对未知点进行线性无偏最优估计的过程(Krige, 1953), 通常在期望未知的情况下使用, 并且要求数据符合正态分布。公式如下:

$$Z(x_0) = \sum_{i=1}^n \lambda(x_i) Z(x_i)$$

式中, $\lambda(x_i)$ 为样本点 x_i 处的权重, 其和为 1, 这样可以保证估算值的无偏性(于洋等, 2015)。进行插值前, 需要先确定样本空间分布的结构特征, 即样本的半方差函数, 公式如下:

$$r(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} (Z(x_i) - Z(x_i+h))^2$$

式中, $r(h)$ 为距离等于 h 时变量的半方差函数; $N(h)$ 为距离等于 h 时点对的个数; $Z(x_i+h)$ 为位置 x_i+h 处的样本值。半变异函数的参数主要包括块金值(Nugget C_0)、基台值(Sill C)和变程(荆玉平等, 2007; 刘爱利等, 2012)。空间相关性是空间插值的基础(朱会义等, 2004), C_0/C 的比值大小可用于判断区域化变量的空间相关性: $C_0/C > 0.75$, 说明区域化变量空间相关性较弱; C_0/C 在 0.25 和 0.75 之间, 说明区域化变量空间相关性中等; $C_0/C < 0.25$, 说明区域化变量有很强的空间相关性(冯永玖等, 2015)。变程是指半方差函数达到基台值所对应的距离, 反映多样性指数的空间自相关范围(郭旭东等, 2000)。

以统计学上的无偏性和最优性为条件, 结合拉格朗日原理, 可推导出权重值和半方差函数之间关系的公式(王政权, 1999)。

1.3.5 协同克里格插值 COK 是利用主变量之间的相关性及其与辅助变量的交互相关性, 优化插值的精度(姜勇等, 2006), 常用于主变量数据难以获取或直接用主变量插值的结果不准确的情况(李润林等, 2013)。公式如下(Myers, 1982):

$$Z(x_0) = \sum_{i=1}^n \lambda(x_i) Z(x_i) + \sum_{j=1}^n \lambda(x_j) Z(x_j)$$

式中, $Z(x_j)$ 和 $\lambda(x_j)$ 分别为辅助变量在样本点 x_j 处的值和权重。辅助变量的选择是 COK 的关键, 本研究根据 4 种物种多样性指数之间的相关性和 ArcGIS10.2 的“Geostatistical analyst”模块中的交叉验证结果选择辅助变量。

1.4 数据的正态分布检验和转换

进行 OK 和 COK 之前, 数据必须符合正态分布, 因此, 对上文计算的 4 种物种多样性指数数据进行 Shapiro-Wilk 检验(Chen *et al.*, 2016)。若不满足正态分布, 则进行数据转换。因为数据结构存在差异, 本研究采用 BOX-COX 和平方 2 种转换方式(于洋等, 2015; 章清等, 2016)。

1.5 效果评价

采用 jackknife 检验比较不同空间插值法的预测效果。该检验的主要步骤为: 首先, 对于已有的 n 个样本, 依次去除其中 1 个样本点, 利用剩余的 $n-1$ 个样本作为训练集对去除点进行估算, 重复 n 次, 得到所有样本点的预测值; 其次, 计算预测值与样本实际观测值的决定系数(Coefficient of determination, R^2)、平均绝对误差(Mean absolute error, MAE)和均方根误差(Root mean square error, RMSE)。 R^2 反映样本值和预测值之间的相关程度, R^2 越接近 1, 表示该空间插值法的预测值与样本值的变化趋势越相似, 反之则偏差越大; MAE 可以反映预测值可能的误差范围; MAE 和 RMSE 都可以反映插值结果的精度, 且都是越小越好(林忠辉等, 2002; 董志南等, 2015; 于洋等, 2015)。公式如下:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (Z^*(x_i) - \overline{Z^*(x_i)}) (Z(x_i) - \overline{Z(x_i)})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Z^*(x_i) - \overline{Z^*(x_i)})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Z(x_i) - \overline{Z(x_i)})^2}}$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |Z^*(x_i) - Z(x_i)|$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Z^*(x_i) - Z(x_i))^2}$$

式中, $Z^*(x_i)$ 为位置 x_i 处的预测值; $\overline{Z^*(x_i)}$ 为所有 n 个样本点预测值的均值; $\overline{Z(x_i)}$ 为所有 n 个样本点观测值的均值。

物种多样性指数计算及其描述性统计、MAE及 R^2 的计算、数据的正态分布检验和转换采用R3.5.2完成; 半方差函数的拟合采用GS+7.0软件完成, 因GS+7.0软件无法计算具有多个辅助变量条件下的半方差函数, 因此, COK的半变异函数中的 C_0 、 C 和 C_0/C 3个参数是未知的, 其变程的计算是由ArcGIS10.2完成; 4种多样性指数之间的相关性判断采用SPSS17.0完

成; 坐标转换、空间插值和交叉验证采用ArcGIS10.2完成。

2 结果

2.1 数据的统计描述

4种多样性指数的描述性统计见表1, Shpiro-Wilk正态检验发现, S 、 J 和 d 属于偏态分布($P < 0.05$)。根据数据特点, 对 S 和 d 进行BOX-COX转换, 对 J 进行平方转换, 转换前对数据进行加1处理。转换后, 数据均通过 Shpiro-Wilk 正态检验($P > 0.1$), 符合正态分布。此外, H' 符合正态分布($P > 0.05$), 不做转换。

表1 物种多样性指数描述性统计和 Shapiro-Wilk 检验的 P 值

Tab.1 Descriptive statistics of five species diversity indices and P -values of the Shapiro-Wilk test

项目 Items	最小值 Min	最大值 Max	均值 Mean	中值 Middle	变异系数 Coefficient of variation	倾斜度 Skewness	峰度 Kurtosis	Shapiro-Wilk test (P 值)	数据转换 Data transformation
S	5.00	44.00	23.00	22.00	0.41	0.33	-0.31	0.041	无
	3.47	17.75	11.00	11.00	0.31	-0.02	-0.27	0.150	BOX-COX
H'	0.39	2.75	1.72	1.75	0.31	-0.41	-0.32	0.114	无
J	0.12	0.94	0.57	0.57	0.26	-0.54	0.55	0.047	无
	1.26	3.76	2.47	2.47	0.19	-0.20	0.28	0.431	平方
d	0.44	4.55	2.33	2.20	0.37	0.46	0.02	0.034	无
	0.40	2.47	1.52	1.49	0.28	0	0.04	0.324	BOX-COX

注: S 为种类数; H' 为 Shannon-Weaver 多样性指数; J 为 Pielou 均匀度指数; d 为 Margalef 丰富度指数, 下同

Note: S denotes number of species; H' is Shannon-Weaver diversity index; J represents Pielou's evenness index; d is Margalef's richness index. The same as below

2.2 协同克里格法辅助变量的选择

表2列举了物种多样性指数之间的相关性, 其中, S 、 H' 和 d 之间具有极显著的正相关关系。 J 与 H' 呈极显著正相关关系, 与 d 呈显著正相关, 而与 S 相关性不显著。将具有极显著相关的物种多样性指数作为辅助变量, 当存在多个具有显著相关的辅助变量

表2 物种多样性指数之间的相关性

Tab.2 Correlations among the species diversity indices

	S	H'	J
S			
H'	0.54**		
J	0.03	0.83**	
d	0.98**	0.67**	0.21*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

时, 根据 ArcGIS10.2 交叉验证的结果初步进行筛选。 S 和 J 最适合的辅助变量均为 H' 和 d ; H' 最适合的辅助变量为 S 和 J ; d 最适合的辅助变量为 S 、 H' 和 J 。

2.3 克里格插值半方差函数分析

根据GS+7.0软件的拟合结果(表3), 不同物种多样性指数的半方差函数适合不同的模型。 S 的空间分布为中等空间相关性($C_0/C=0.43$), 其他3个指数均为强空间相关性($C_0/C < 0.25$), 符合空间插值的前提。不同物种多样性指数对应的变程差别较大: S 和 d 的变程较大, 说明其在大范围内的空间自相关性较强, H' 和 J 的变程都较小, 说明在小尺度范围内二者的空间自相关性较强。

2.4 不同空间插值法的比较

对于 S , 5种空间插值法按预测值与样本值的 R^2

表3 物种多样性指数的半方差函数及相关参数
Tab.3 Semivariance models and the corresponding parameters of species diversity indices

项目 Items	空间插值法 Interpolation method	模型 Model	块金值 C_0 Nugget	基台值 C Sill	块金值/基台 值 C_0/C	变程 Range (km)
S	普通克里格法 Ordinary kriging	指数模型 Exponential	3.88	9.15	0.43	175
	协同克里格法 Ordinary cokriging	球面模型 Spherical	—	—	—	142
H'	普通克里格法 Ordinary kriging	高斯模型 Gaussian	0.03	0.27	0.11	43
	协同克里格法 Ordinary cokriging	球面模型 Exponential	—	—	—	76
J	普通克里格法 Ordinary kriging	球面模型 Spherical	0.01	0.21	0.05	52
	协同克里格法 Ordinary cokriging	高斯模型 Exponential	—	—	—	73
d	普通克里格法 Ordinary kriging	球面模型 Spherical	0.01	0.16	0.09	139
	协同克里格法 Ordinary cokriging	指数模型 Exponential	—	—	—	82

注: “—”表示无法用 GS+7.0 软件计算的参数

Note: “—” indicates parameters that cannot be calculated with GS+7.0 software

大小排序为 $LPI < IDW < OK < RBF < COK$; 按 MAE 和 RMSE 大小排序的结果相同, 为 $COK < RBF < OK < IDW < LPI$ 。对于 H' , 5 种空间插值法按预测值与样本值的 R^2 大小排序为 $IDW < RBF < OK < LPI < COK$; 按 MAE 大小排序为 $COK < RBF < OK < IDW < LPI$; 按 RMSE 大小排序为 $COK < LPI < RBF < IDW < OK$ 。对于 J , 5 种空间插值法的预测值与样本值的 R^2 大小排序为 $RBF < IDW < OK < LPI < COK$; 按 MAE 大小排序为 $COK < RBF < OK < LPI < IDW$; 按 RMSE 大小排序为 $COK < OK < RBF < IDW < LPI$ 。对于 d , 5 种空间插值法按预测值与样本值的 R^2 大小排序为 $IDW < LPI < RBF < OK < COK$; MAE 大小排序和 RMSE 相同, 为 $COK < OK < RBF < IDW < LPI$ (表 4)。由此可以看出, 对于 4 种多样性指数, COK 的结果最精确, 其他 4 种方法精度差别较小且很低。

4 种多样性指数在样本点的大小分布与预测的空间分布基本一致, 在非采样区域的曲线平滑度都低于采样区域(图 2)。 S 和 d 整体的空间分布格局相似, 都呈现出明显的东南部高, 北部次之, 中部最低的格局。 H' 和 J 也是中部最低, 但是在南部和北部海域差异不明显。4 种多样性指数在 $32^\circ N$ 以南海域高值区的范围大致相同。

3 讨论与分析

3.1 黄海和东海北部海域游泳动物多样性空间分布

分析 COK 的预测图, 在大尺度上, 2017 年春季黄海和东海北部游泳动物的 S 和 d 大致呈现明显的南高北低的格局, 而 H' 和 J 的南北差异不大。与台湾海峡游泳动物多样性(宋普庆等, 2012)以及相邻海域鱼类群落多样性(程济生, 2000)相比, 除了 d 具有相同的空

间格局, 后 2 种多样性指数空间分布格局均有较大差别。在小尺度上, $34^\circ \sim 35.5^\circ N$, $121^\circ \sim 124^\circ E$ 附近海域的 S 和 d 明显比周围海域低, 而 H' 和 J 在此范围内没有明显的低值区。在 $30^\circ \sim 32^\circ N$ 范围内的海域中, 4 种多样性指数均有高值区, 而且西部海域均低于东部海域。在刘勇等(2017)的研究中, $30^\circ \sim 32^\circ N$ 海域底层渔业生物的 S 和 d 也存在高值区, 而且 S 、 H' 和 d 三者也呈现东部海域高于西部海域的格局, 但是 J 在 $124^\circ \sim 126^\circ E$ 之间海域存在大范围的低值区, 与本研究结果有较大差别。

游泳动物多样性指数空间分布变化特征可能与环境、优势种、饵料丰度及分布、栖息地状况、人为活动和鱼类洄游行为等多种因素有关(Jin *et al*, 1996; 戴芳群等, 2020; 金显仕等, 2009; 程济生等, 2004; 朱鑫华等, 1994)。从水文环境方面看, 因为多样性指数与环境因子的相关关系可以量化, 而且数据容易获取, 常受到人们关注。已有研究表明, 春季黄海中南部的 S 和 d 与海底水温显著正相关($P < 0.05$), 与深度、海表温度和盐度关系不显著($P > 0.05$)(单秀娟等, 2014), 说明物种多样性的空间分布可能受海底水温影响程度较大; 而 H' 和 J 与深度、海底和海表的水温和盐度的关系不密切(单秀娟等, 2014)。受海底地形、海流等因素影响, 在春、夏和秋季, 黄海中北部海域存在一个稳定且大范围冷水团(李洪波等, 2006; 于非等, 2006; 王家栋等, 2011)。而在 2017 年春季, $35^\circ N$, $122^\circ \sim 124^\circ E$ 附近海域的海底温度最高为 $10^\circ C$, 低于附近海域的温度(孔凡洲等, 2018)。这可能是导致 4 种多样性指数在大尺度上以及 $34^\circ \sim 35.5^\circ N$, $122^\circ \sim 124^\circ E$ 附近海域呈现独特的分布特点和差异的原因。对于 $30^\circ \sim 32^\circ N$ 范围内的东海北部海域, 多样性

表4 不同插值方法的交叉验证结果
Tab.4 Cross-validation diagnostic of different interpolation methods

项目 Items	插值方法 Interpolation method	平均绝对误差 MAE Mean absolute error	均方根误差 RMSE Root mean square error	决定系数 R^2 Coefficient of determination
S	反距离加权法 Inverse distance weighted	2.165	2.934	0.240
	径向基函数法 Radial basis function	2.071	2.861	0.282
	局部多项式法 Local polynomial interpolation	2.211	2.964	0.219
	普通克里格法 Ordinary kriging	2.104	2.881	0.266
	协克里格法 Ordinary cokriging	0.548	0.695	0.961
H'	反距离加权法 Inverse distance weighted	0.427	0.532	0.008
	径向基函数法 Radial basis function	0.425	0.529	0.012
	局部多项式法 Local polynomial interpolation	0.428	0.529	0.051
	普通克里格法 Ordinary kriging	0.426	0.536	0.021
	协克里格法 Ordinary cokriging	0.128	0.177	0.889
J	反距离加权法 Inverse distance weighted	0.365	0.468	0.012
	径向基函数法 Radial basis function	0.363	0.465	0.005
	局部多项式法 Local polynomial interpolation	0.365	0.470	0.035
	普通克里格法 Ordinary kriging	0.365	0.464	0.014
	协克里格法 Ordinary cokriging	0.105	0.149	0.894
d	反距离加权法 Inverse distance weighted	0.276	0.375	0.205
	径向基函数法 Radial basis function	0.262	0.361	0.268
	局部多项式法 Local polynomial interpolation	0.277	0.380	0.232
	普通克里格法 Ordinary kriging	0.257	0.356	0.289
	协克里格法 Ordinary cokriging	0.063	0.077	0.966

指数较低的原因可能是靠近长江口受淡水冲击导致附近海域环境条件不稳定,海水浊度较高,不利于生物生活(Whitfield, 1994; 刘淑德等, 2009, 徐勇等, 2014)。从繁殖特性方面看,春季是很多游泳动物繁殖的季节,繁殖群体会洄游到环境适宜的海域产卵。如位于32°~34°N、122.5°E以西海域的吕四渔场是银鲳(*Pampus argenteus*)、小黄鱼(*Larimichthys ployactis*)和黄鲫(*Setipinna tenuifilis*)等种类主要产卵场(陈新军, 2004; 刘勇等, 2017)。在30°~32.5°N, 123°~126°E之间的海域存在多个重要渔场,例如,舟山渔场、江外渔场和舟外渔场等,是多种重要渔业种类的产卵场(刘勇等, 2007、2014; 林龙山等, 2008)。影响游泳动物空间分布的原因复杂多变,对于其他小尺度上的多样性指数空间特征形成原因,还需要进一步研究和分析。

3.2 空间插值法分析

插值结果的精度取决于空间插值模型对变量空间变异性和相关性的解释度(朱会义等, 2004)。本研究中,4种多样性指数的COK jackknife 检验结果都比较好,解释度高于其他方法,这与很多研究结果一

致(卢月明等, 2017; 李润林等, 2013; 石朋等, 2005; 岳文泽等, 2005)。但是,在日降水量(宋丽琼等, 2008)和热带雨林植物多样性(Hernandez-Stefanoni *et al*, 2006)的空间插值法比较研究中,COK的精度要低于OK。根据王平等(2014)对不同辅助变量的COK插值结果比较,发现当主变量和辅助变量之间的相关性大于0.45时,COK精度才会明显高于OK。可见,辅助变量的选择是COK插值的关键步骤,合适的辅助变量可以优化COK。目前,最简单的方法是直接将主变量相关性较高的因子作为辅助变量。如果主变量有多个显著相关的因子,可以根据ArcGIS软件交叉验证的结果进行初步筛选。但是,当与主变量显著相关的因子数量过多时,这种筛选方式会导致工作量增加,而且单一的辅助变量可能对模型优化程度有限(章清等, 2016)。因此,基于主成分分析的COK受到广泛关注。这种方法是利用主成分分析,将多个与主变量显著相关的因子赋予不同的权重,再合并成综合指标作为辅助变量(卢月明等, 2017),在鱼类资源丰度和土壤要素的空间分布研究中都取得了较好的结果(方学燕等, 2017; 章清等, 2016)。

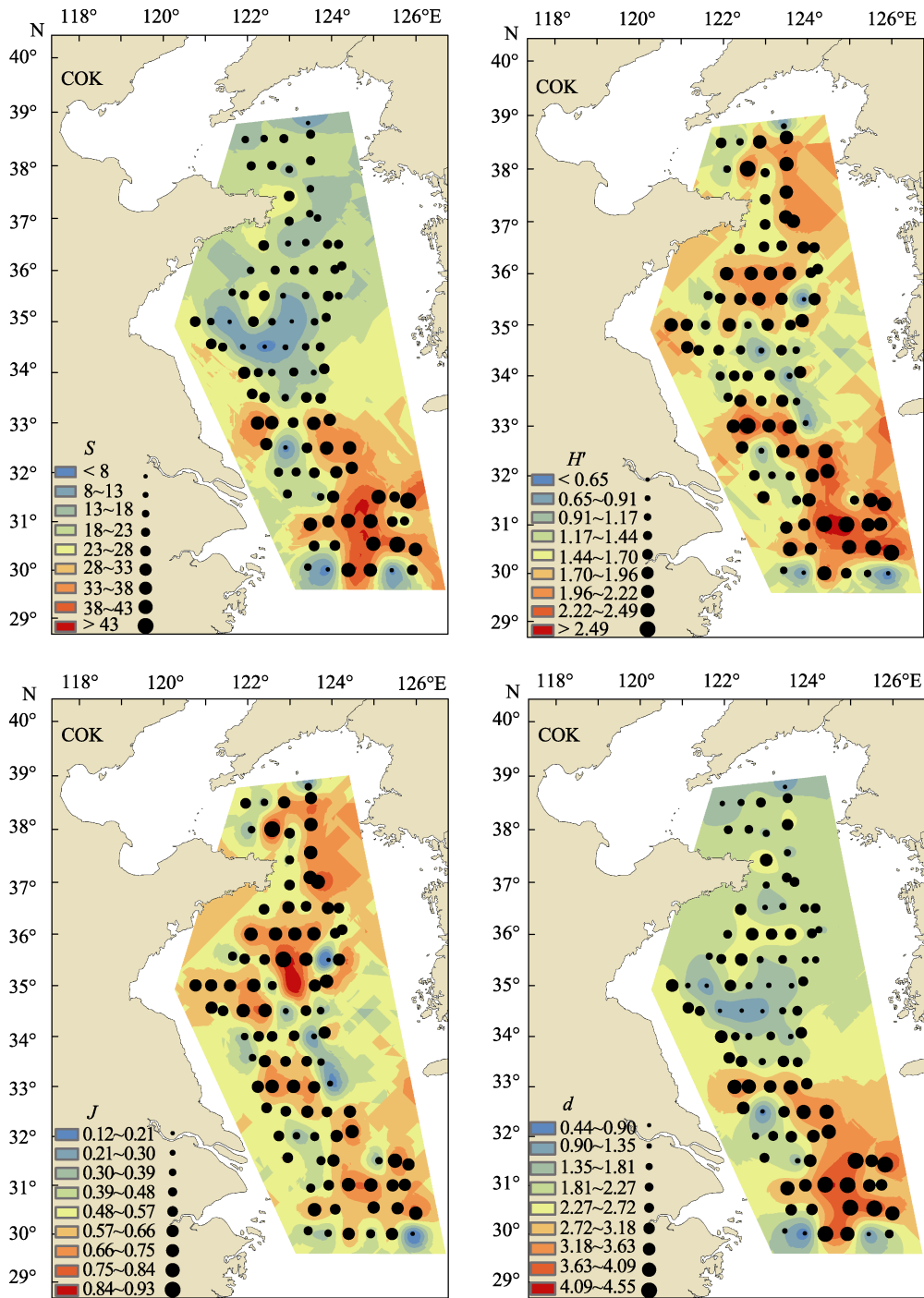


图 2 协同克里格插值(COK)预测出的物种种类数(S)、Shannon-Weaver 多样性指数(H')、Pielou 均匀度指数(J)和 Margalef 丰富度指数(d)的空间分布图

Fig.2 Spatial distribution of number of species (S), Shannon-Weaver diversity index (H'), Pielou's evenness index (J) and Margalef's richness index (d) by ordinary cokriging (COK)

3.3 展望

本研究采用了多个辅助变量,主变量与辅助变量之间的相关性很高,因此,相对于 OK, COK 的精度有了极大提高。研究表明, S 、 H' 、 J 和 d 之间存在较高的相关性,这种现象在不同季节和年份同样存在

(单秀娟等, 2014), 因此, COK 不仅可以用于分析和预测春季黄海和东海北部游泳动物多样性空间分布,还可能适用于不同时间维度。在今后的研究中,可以结合与游泳动物多样性有显著关系的环境因子,并基于主成分分析法减少辅助变量的数量,尝试进一步提高 COK 的精度。

参 考 文 献

- Chaplot V, Darboux F, Bourennane H, *et al.* Accuracy of interpolation techniques for the derivation of digital elevation models in relation to landform types and data density. *Geomorphology*, 2006, 77(1–2): 126–141
- Chen XJ. Fishery resources and fishing ground. Beijing: China Ocean Press, 2004, 266–267 [陈新军. 渔业资源与渔场学. 北京: 海洋出版社, 2004, 266–267]
- Chen Y, Shan X, Jin X, *et al.* A comparative study of spatial interpolation methods for determining fishery resources density in the Yellow Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(12): 65–72
- Cheng JS, Yu LF. The change of structure and diversity of demersal fish communities in the Yellow Sea and East China Sea in winter. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(1): 29–34 [程济生, 俞连福. 黄、东海冬季底层鱼类群落结构及多样性变化. *水产学报*, 2004, 28(1): 29–34]
- Cheng JS. The structure and diversity of demersal fish communities in winter in the East China Sea and the Yellow Sea. *Marine Fisheries Research*, 2000, 21(3): 1–8 [程济生. 东、黄海冬季底层鱼类群落结构及其多样性. *海洋水产研究*, 2000, 21(3): 1–8]
- Dong ZN, Zheng SN, Zhao HB, *et al.* Comparative analysis of methods of wind field simulation based on spatial interpolation. *Journal of Geo-Information Science*, 2015, 17(1): 37–44 [董志南, 郑拴宁, 赵会兵, 等. 基于空间插值的风场模拟方法比较分析. *地球信息科学学报*, 2015, 17(1): 37–44]
- Dai FQ, Zhu L, Chen YL. Variations of fishery resource structure in the Yellow Sea and East China Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 1–10 [戴芳群, 朱玲, 陈云龙. 黄、东海渔业资源群落结构变化研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 1–10]
- Fang XY, Chen XJ, Feng YJ, *et al.* Study of spatial distribution for *Dosidicus gigas* abundance off Peru based on a comprehensive environmental factor. *Haiyang Xuebao*, 2017, 39(2): 62–71 [方学燕, 陈新军, 冯永玖, 等. 基于综合环境因子的协同克里金法分析茎柔鱼资源丰度空间分布. *海洋学报*, 2017, 39(2): 62–71]
- Feng YJ, Fang XY, Chen XJ, *et al.* Spatial interpolation and uncertainty of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) resources in the Northwest Pacific Ocean. *Recourses Science*, 2015, 37(11): 2299–2308 [冯永玖, 方学燕, 陈新军, 等. 基于 GIS 的西北太平洋柔鱼资源空间插值及不确定性分析. *资源科学*, 2015, 37(11): 2299–2308]
- Guo XD, Fu BJ, Chen LD, *et al.* The spatio-temporal variability of soil nutrients in Zunhua Plain of Hebei Province: Semivariogram and Kriging analysis. *Acta Geographica Sinica*, 2000, 55(5): 555–566 [郭旭东, 傅伯杰, 陈利顶, 等. 河北省遵化平原土壤养分的时空变异特征—变异函数与 Kriging 插值分析. *地理学报*, 2000, 55(5): 555–566]
- Hernandez-Stefanoni JL, Ponce-Hernandez R. Mapping the spatial variability of plant diversity in a tropical forest: Comparison of spatial interpolation methods. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2006, 117(1–3): 307–334
- Jiang Y, Li Q, Zhang XK, *et al.* Kriging prediction of soil zinc in contaminated field by using an auxiliary variable. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(1): 97–101 [姜勇, 李琪, 张晓珂, 等. 利用辅助变量对污染土壤锌分布的克里格估值. *应用生态学报*, 2006, 17(1): 97–101]
- Jin XS, Tang QS. Changes in fish species diversity and dominant species composition in the Yellow Sea. *Fisheries Research*, 1996, 26(3–4): 337–352
- Jin XS, Shan XJ, Guo XW, *et al.* Community structure of fishery biology in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(9): 4761–4772 [金显仕, 单秀娟, 郭学武, 等. 长江口及其邻近海域渔业生物的群落结构特征. *生态学报*, 2009, 29(9): 4761–4772]
- Jing YP, Zhang SW, Li Y. Landscape pattern and SHDI spatial structure characteristics of rural-urban fringe: A case study in Jingyue development zone in Changchun City. *Recourses Science*, 2007, 29(5): 43–49 [荆玉平, 张树文, 李颖. 城乡交错带景观格局及多样性空间结构特征—以长春净月开发区为例. *资源科学*, 2007, 29(5): 43–49]
- Kong FZ, Jang P, Wei CJ, *et al.* Co-occurrence of green tide, golden tide and red tides along the 35°N transect in the Yellow Sea during spring and summer in 2017. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(5): 1021–1030 [孔凡洲, 姜鹏, 魏传杰, 等. 2017 年春、夏季黄海 35°N 共发的绿潮、金潮和赤潮. *海洋与湖沼*, 2018, 49(5): 1021–1030]
- Krige DG. A statistical approach to some basic mine valuation problems on the Witwatersrand. *OR*, 1953, 4(1): 18
- Li HB, Xiao T, Ding T, *et al.* The distribution of bacterioplankton in the Yellow Sea Cold Water Mass (YSCWM). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(4): 1012–1020 [李洪波, 肖天, 丁涛, 等. 浮游细菌在黄海冷水团中的分布. *生态学报*, 2006, 26(4): 1012–1020]
- Li J, Heap AD. Spatial interpolation methods applied in the environmental sciences: A review. *Environmental Modelling and Software*, 2014, 53: 173–189
- Li RL, Yao YM, Tang PQ, *et al.* Optimization of spatial interpolation and sampling size for soil zinc content in cultivated land at county scale using Cokriging method. *Chinese Journal of Soil Science*, 2013, 44(4): 830–838 [李润林, 姚艳敏, 唐鹏钦, 等. 县域耕地土壤锌含量的协同克里格插值及采样数量优化. *土壤通报*, 2013, 44(4): 830–838]
- Li SF. The ecological study of fish community in the East China Sea continental shelf: The spatial pattern and diversity.

- Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2005 [李圣法. 东海大陆架鱼类群落生态学—空间格局及其多样性. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2005]
- Lin LS, Cheng JH, Jiang YZ, *et al.* Spatial distribution and environmental characteristics of the spawning grounds of small yellow croaker in the southern Yellow Sea and the East China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8): 3485–3494 [林龙山, 程家骅, 姜亚洲, 等. 黄海南部和东海小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)产卵场分布及其环境特征. *生态学报*, 2008, 28(8): 3485–3494]
- Lin ZH, Mo XG, Li HX, *et al.* Comparison of three spatial interpolation methods for climate variables in China. *Acta Geographica Sinica*, 2002, 57(1): 47–56 [林忠辉, 莫兴国, 李宏轩, 等. 中国陆地区域气象要素的空间插值. *地理学报*, 2002, 57(1): 47–56]
- Liu AL, Wang PF, Ding YY. An introduction to geostatistics. Beijing: Science Press, 2012 [刘爱利, 王培法, 丁圆圆. 地统计学概论. 北京: 科学出版社, 2012]
- Liu SD, Xian WW. Temporal and spatial patterns of the ichthyoplankton community in the Yangtze Estuary and its adjacent waters. *Biodiversity Science*, 2009, 17(2): 151–159 [刘淑德, 线薇薇. 长江口及其邻近水域鱼类浮游生物群落的时空格局. *生物多样性*, 2009, 17(2): 151–159]
- Liu Y, Cheng JH. Temporal and spatial distribution of bottom fishery biodiversity in the middle and north of the East China Sea and the south of the Yellow Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(8): 1223–1236 [刘勇, 程家骅. 东海中、北部及黄海南部海域底层渔业生物多样性时空分布特征. *水产学报*, 2017, 41(8): 1223–1236]
- Liu Y, Cheng JH. Study on the correlation between spatial distributions of the spawning groups and the power b in length–weight relation function of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(6): 124–130 [刘勇, 程家骅. 小黄鱼 *Larimichthys polyactis* 体长–体重关系幂指数与产卵群体空间分布相关性研究. *海洋学报*, 2014, 36(6): 124–130]
- Liu Y, Yan LP, Cheng JH. Distribution of small yellow croaker's spawner stocks and its relationship with seawater temperature and salinity in the open sea of northern East China Sea and southern Yellow Sea in 2003. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(7): 89–96 [刘勇, 严利平, 程家骅. 2003年东海北部和黄海南部外海小黄鱼产卵群体的分布特征及其与水温、盐度的关系. *中国水产科学*, 2007, 14(7): 89–96]
- Lu YM, Wang L, Qiu AG, *et al.* A CoKriging interpolation method based on principal component analysis. *Bulletin of Surveying and Mapping*, 2017(11): 51–57, 63 [卢月明, 王亮, 仇阿根, 等. 一种基于主成分分析的协同克里金插值方法. *测绘通报*, 2017(11): 51–57, 63]
- Luo X, Xu Y, Shi Y. Comparison of interpolation methods for spatial precipitation under diverse orographic effects. 2011 19th International Conference on Geoinformatics. IEEE, 2011, 1–5
- Lü ZB, Li F, Xu BQ, *et al.* Fish community diversity during spring and autumn in the Yellow Sea off the coast of Shandong. *Biodiversity Science*, 2012, 20(2): 207–214 [吕振波, 李凡, 徐炳庆, 等. 黄海山东海域春、秋季鱼类群落多样性. *生物多样性*, 2012, 20(2): 207–214]
- Ma B, Zhou ZY, Zhang LL, *et al.* The spatial distribution characteristics of plant diversity in Alex Left Banner. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(12): 6099–6106 [马斌, 周志宇, 张莉丽, 等. 阿拉善左旗植物物种多样性空间分布特征. *生态学报*, 2008, 28(12): 6099–6106]
- Myers DE. Matrix formulation of co-kriging. *Journal of the International Association for Mathematical Geology*, 1982, 14(3): 249–257
- Powell MJD. Approximation theory and methods. Cambridge: Cambridge university press, 1981
- Shan XJ, Chen YL, Dai FQ, *et al.* Variations in fish community and diversity in the sections of the central and southern Yellow Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(2): 377–389 [单秀娟, 陈云龙, 戴芳群, 等. 黄海中南部不同断面鱼类群落结构及其多样性. *生态学报*, 2014, 34(2): 377–389]
- Shepard D. A two-dimensional interpolation function for irregularly-spaced data. Proceedings of the 1968 23rd ACM national conference. ACM New York, 1968, 517–524
- Shi P, Rui XF. Comparison and improvement of spatial rainfall interpolation methods. *Journal of Hohai University (Natural Sciences)*, 2005, 33(4): 361–365 [石朋, 芮孝芳. 降雨空间插值方法的比较与改进. *河海大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(4): 361–365]
- Song LQ, Tian Y, Wu L, *et al.* On comparison of spatial interpolation methods of daily rainfall data: A case study of Shenzhen. *Geo-Information Science*, 2008, 10(5): 566–572 [宋丽琼, 田原, 邬伦, 等. 日降水量的空间插值方法与应用对比分析—以深圳市为例. *地球信息科学*, 2008, 10(5): 566–572]
- Song PQ, Zhang J, Lin LS, *et al.* Nekton species composition and biodiversity in Taiwan Strait. *Biodiversity Science*, 2012, 20(1): 32–40 [宋普庆, 张静, 林龙山, 等. 台湾海峡游泳动物种类组成及其多样性. *生物多样性*, 2012, 20(1): 32–40]
- Stelzenmüller V, Maynou F, Martín P. Patterns of species and functional diversity around a coastal marine reserve: A fisheries perspective. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2009, 19(5): 554–565
- Sun H, Guo ZX, Guo Y, *et al.* Prediction of distribution of soil

- Cd concentrations in Guangdong Province, China. *Environmental Science*, 2017, 38(5): 2111–2124 [孙慧, 郭治兴, 郭颖, 等. 广东省土壤Cd含量空间分布预测. *环境科学*, 2017, 38(5): 2111–2124]
- Sun MS, Chen ZZ, Cai YC, *et al.* Application of a spatial interpolation method for the assessment of fishery resources in the Beibu Gulf. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 853–861 [孙铭帅, 陈作志, 蔡研聪, 等. 空间插值法在北部湾渔业资源密度评估中的应用. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 853–861]
- Tittensor DP, Mora C, Jetz W, *et al.* Global patterns and predictors of marine biodiversity across taxa. *Nature*, 2010, 466(7310): 1098–1101
- Wang JD, Lei YL, Xu KD, *et al.* An investigation on the biomass, abundance and distribution of meiofauna under the cold water mass and its surrounding areas of the Yellow Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(3): 359–366 [王家栋, 类彦立, 徐奎栋, 等. 黄海冷水团及周边海域夏初小型底栖动物现存量及空间分布研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(3): 359–366]
- Wang P, Li H, Chen S, *et al.* Interpolation of permanent gully density based on slope steepness in black soil area. *Research of Soil and Water Conservation*, 2014, 21(6): 312–317 [王平, 李浩, 陈帅, 等. 基于坡度的黑土区切沟密度协同克里格插值方法研究. *水土保持研究*, 2014, 21(6): 312–317]
- Wang ZQ. Application of geostatistics on ecology. Beijing: Science Press, 1999 [王政权. *地统计学及在生态学中的应用*. 北京: 科学出版社, 1999]
- Whitfield AK. An estuary-association classification for the fishes of southern Africa. *South African Journal of Science*, 1994, 90(7): 411–417
- Xia MH, Jia Y, Liu C. A meshless method with radial point interpolation method (RPIM). *Journal of Yanshan University*, 2006, 30(2): 112–117 [夏茂辉, 贾延, 刘才. 基于径向基函数的点插值(RPIM)无网格法. *燕山大学学报*, 2006, 30(2): 112–117]
- Xie Y, Chen T, Lei M, *et al.* Spatial distribution of soil heavy metal pollution estimated by different interpolation methods: Accuracy and uncertainty analysis. *Chemosphere*, 2011, 82(3): 468–476
- Xu Y, Xian WW, Li WL. Spatial and temporal variations of invertebrate community in the Yangtze River Estuary and its adjacent waters. *Biodiversity Science*, 2014, 22(3): 311–319 [徐勇, 线微微, 李文龙. 长江口及其邻近海域春季无脊椎动物群落时空变化. *生物多样性*, 2014, 22(3): 311–319]
- Yu F, Zhang ZX, Diao XY, *et al.* Analysis of evolution of the Huanghai Sea Cold Water Mass and its relationship with adjacent water masses. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28(5): 26–34 [于非, 张志欣, 刁新源, 等. 黄海冷水团演变过程及其与邻近水团关系的分析. *海洋学报(中文版)*, 2006, 28(5): 26–34]
- Yu Y, Wei W, Chen LD, *et al.* Comparison on the methods for spatial interpolation of the annual average precipitation in the Loess Plateau region. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(4): 999–1006 [于洋, 卫伟, 陈利顶, 等. 黄土高原年均降水量空间插值及其方法比较. *应用生态学报*, 2015, 26(4): 999–1006]
- Yue WZ, Xu JH, Xu LH. A study on spatial interpolation methods for climate variables based on geostatistics. *Plateau Meteorology*, 2005, 24(6): 974–980 [岳文泽, 徐建华, 徐丽华. 基于地统计方法的气候要素空间插值研究. *高原气象*, 2005, 24(6): 974–980]
- Zhang M, Cai QH, Tang T, *et al.* Macrobenthos community structure and its spatial distribution in Erhai watershed lakes. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(8): 1696–1702 [张敏, 蔡庆华, 唐涛, 等. 洱海流域湖泊大型底栖动物群落结构及空间分布. *生态学杂志*, 2011, 30(8): 1696–1702]
- Zhang Q, Zhang HT, Guo L, *et al.* Spatial distribution of soil heavy metal Cu content using Cokriging interpolation model combined with principal component analysis. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016(1): 60–68 [章清, 张海涛, 郭龙, 等. 基于主成分分析的协同克里格插值模型对土壤铜含量的空间分布预测. *华中农业大学学报*, 2016(1): 60–68]
- Zhu HY, Liu SL, Jia SF. Problems of the spatial interpolation of physical geographical elements. *Geographical Research*, 2004, 23(4): 425–432 [朱会义, 刘述林, 贾绍凤. 自然地理要素空间插值的几个问题. *地理研究*, 2004, 23(4): 425–432]
- Zhu XH, Wu HZ, Xu FS, *et al.* Study on the diversity and its relational factor of the nekton community in the Yellow Sea and Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 1994, 16(3): 102–112 [朱鑫华, 吴鹤洲, 徐凤山, 等. 黄渤海沿岸水域游泳动物群落多样性及其相关因素的研究. *海洋学报*, 1994, 16(3): 102–112]

Study of the Distribution of Nekton Diversity Base on Spatial Interpolation Methods in the Yellow Sea and North East China Sea

TANG Zheng^{1,3}, SHAN Xiujuan^{2,3①}, GUAN Lisha³, JIN Xianshi^{2,3}, HU Zhijun^{1,3}, HAN Qingpeng^{3,4}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract The distribution of species diversity is one of the important issues in ecological research. Although spatial interpolation has been widely used in this research. Taking the diversity of nekton in the Yellow Sea and north East China Sea in May 2017 as an example, the species number (S), Shannon-Weaver diversity index (H'), Pielou evenness index (J), and Margalef richness index (d) were selected to evaluate the distribution of species diversity in the sea area. We applied inverse distance weighted (IDW), radial basis function (RBF), local polynomial interpolation (LPI), ordinary kriging (OK), and ordinary cokriging (COK) methods to the above four species diversity indices, and we selected the spatial interpolation method suitable for each species diversity index by the jackknife method. The results showed that COK had the best results for the four species diversity indices with the highest accuracy. The accuracy of the other four methods had little difference and was low. The COK prediction results revealed that both S and d showed an obviously high pattern in the southeast, followed by the north; the lowest pattern was observed in the middle. H' and J were also lowest in the middle, but the difference between the southern and northern sea was negligible in both these indices, and the reasons need to be further explored. The four diversity indices were roughly the same in the high value area of the south of 32°N. The results showed that COK can be used as a spatial interpolation method for nekton diversity in the Yellow Sea and northern East China Sea.

Key words Nekton; Diversity; Spatial interpolation; Spatial distribution

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190918002

http://www.yykxjz.cn/

郭彪, 陈卫, 高燕, 张博伦, 王硕, 王宇, 张雪, 曾祥茜. 天津大神堂海域不同时间序列礁体附着生物群落特征变化. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 12-18

Guo B, Chen W, Gao Y, Zhang BL, Wang S, Wang Y, Zhang X, Zeng XX. Community characteristics of attaching organisms on the artificial reefs built in different years in Dashentang, Tianjin. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 12-18

天津大神堂海域不同时间序列 礁体附着生物群落特征变化*



郭 彪^① 陈 卫 高 燕 张博伦
王 硕 王 宇 张 雪 曾祥茜

(天津渤海水产研究所渔业资源与生态环境室 天津市海洋牧场技术工程中心 天津 300457)

摘要 本研究于 2018 年 9 月通过打捞鱼礁的方式调查了 2010、2012、2014、2016 和 2018 年投放礁区礁体附着生物情况。结果显示, 虽然不同年份投礁区礁体附着生物的种类和数量有所差异, 但长牡蛎(*Crassostrea gigas*)均占绝对优势。2018 年投礁区由于礁体投放时间较短, 尚未形成稳定的附着生物群落, 其礁体附着生物的种类数、附着生物数量和重量、生物多样性指数和物种均匀度指数均显著低于其他年份。2010 年投礁区域礁体附着生物种类和数量均显著高于其他年份, 但在附着生物重量上无显著差异。研究表明, 人工鱼礁附着生物优势种类组成受到其所处海域地理位置的影响很大, 时间序列对人工鱼礁附着生物的影响在投放前期较为明显, 当生物量达到一定数值后, 其影响明显减弱, 但其生物生态环境仍在缓慢改善, 生物多样性逐步增加。

关键词 人工鱼礁; 时间序列; 附着生物; 群落特征

中图分类号 S953.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0012-07

天津市大神堂海域国家级海洋牧场示范区位于渤海湾西部, 紧邻天津大神堂牡蛎礁国家级海洋特别保护区。随着环渤海经济的快速发展, 天津海岸带大规模的围填海工程建设、海洋捕捞业和矿产开采程度增强, 天然牡蛎礁海域海洋生态系统受到的压力逐年增加。为保护牡蛎礁区的生物资源和生态环境, 天津市在大神堂海域开展了一系列海洋生态修复行动, 包括人工鱼礁建设。2009 年天津市开始在该海域试验性投放钢筋混凝土礁体, 截止到 2018 年年底, 已投放钢筋混凝土礁体 29308 块, 共计 10.87 万空方, 建成礁区面积约 8.465 km²。

人工鱼礁投放后, 礁体表面通常会着生生物, 海

洋附着生物群落的种类组成、附着数量及附着生物量变化受到海域水温、水深、盐度、海流、气候特征等环境因子及投放时间、礁体材料等因素的影响(Kress *et al*, 2002; 张伟等, 2008; 公丕海等, 2014; 李娇等, 2016)。同一海域投放的鱼礁礁体, 由于海域的环境因子条件基本上是一致的, 其附着生物主要受到礁体材料和投放时间的影响。关于不同礁体材料之间的附着生物差别, 学者们更多地采取在海区挂板的方式进行对比实验(王震等, 2019; 李真真等, 2017; Oyamada *et al*, 2008), 或采用附着生物潜水原位采样(张伟等, 2015)。关于礁体投放时间的影响, 日本学者通过潜水、水下录像或将单个鱼礁捞上来的方法观测人工鱼

* 国内渔业捕捞和养殖业油价补贴项目(2016 年)和天津市渔业发展服务中心青年科技创新项目(J2018-13 青)共同资助 [This work was supported by Projects of Government Subsidy for Oil Price to Fishing and Aquaculture (2016), and Projects of Youth Science and Technology Innovation of Tianjin Fishery Development Service Center (J2018-13Qing)].

① 通讯作者: 郭 彪, 高级工程师, E-mail: oucguobiao@163.com

收稿日期: 2019-09-18, 收修改稿日期: 2019-10-31

礁投放后礁体附着生物的变化情况(1963~1983 年)(林小涛, 2001), 国内关于礁体投放时间对附着生物的影响还没有定性、定量的系统性研究。

天津海域水质透明度低, 潜水定点取样和 underwater 录像工作存在较大的困难。故本研究采用将单个鱼礁重新打捞上来的方式, 观测 2010~2018 年投放的人工鱼礁礁体附着生物状况, 以期从时间序列上探讨天津大神堂海域礁体附着生物的群落特征变化, 为天津大神堂海域人工鱼礁的建设和管理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 采样站位设置

根据 2010、2012、2014、2016 和 2018 年投礁区

坐标范围和 2017 年年底完成的礁区礁体空间分布位置侧扫结果, 在 2010、2012、2014、2016 和 2018 年投放礁区各选一个点进行鱼礁的打捞。鱼礁打捞位置示意图和具体坐标见图 1 和表 1。本次选取的礁体礁型为大窗型鱼礁, 其具体结构和尺寸见图 2。

表 1 吊礁位置具体坐标
Tab.1 Specific coordinates of reefs salvaged

投礁年份 Year of reef built	经度 Longitude	纬度 Latitude
2010	117°59'273" E	39°7'228" N
2012	117°58'264" E	39°7'160" N
2014	117°58'127" E	39°6'251" N
2016	117°58'909" E	39°6'125" N
2018	117°58'723" E	39°6'410" N

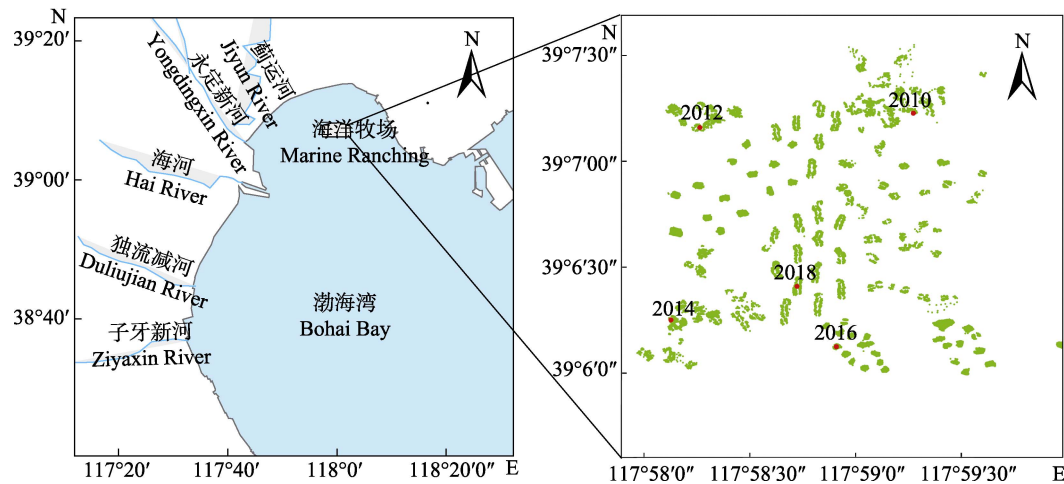


图 1 鱼礁打捞位置示意

Fig.1 The stations of reefs salvaged

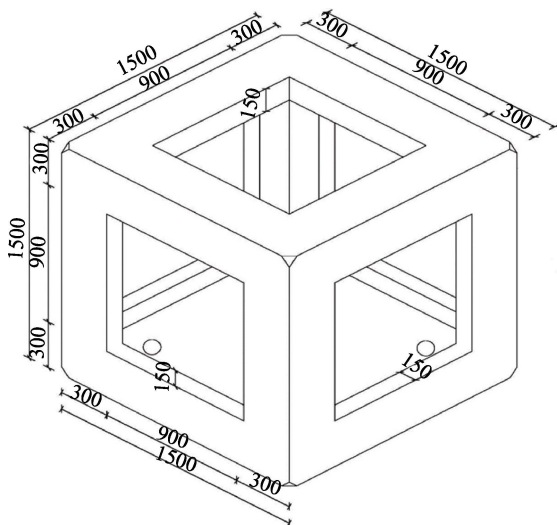


图 2 大窗箱型鱼礁

Fig.2 Artificial reefs of big windows(mm)

1.2 鱼礁打捞时间及打捞方法

2018 年 9 月 19~20 日进行鱼礁打捞。在鱼礁打捞前, 租用渔船和雇佣潜水员进行鱼礁定位工作。潜水员根据设置的点位潜到水下, 探寻鱼礁的位置, 并在探寻到的鱼礁上系一个浮球作为标记, 每个点位探寻 3 块鱼礁作为重复。每块鱼礁的坐标位置与设置点位位置不能超过 25 m, 以确保每块打捞的鱼礁均为目标投礁年份的鱼礁。

鱼礁打捞时, 将具有大型起吊设备的工程船行驶到标记鱼礁附近, 潜水员将吊礁所用的钢缆绳穿过鱼礁, 吊机吊起鱼礁到船甲板上, 采样人员采样后, 将鱼礁吊起并尽量投放到海中原坐标位置。

1.3 附着生物的采集和处理

在每块鱼礁外表面和内表面各取样 1 个, 合并为

1个混合样品,作为礁体附着生物定量样品,每个样品采样面积为25 cm×25 cm。同时,尽可能收集礁体上不同位置附着的各类型生物,作为礁体附着生物定性样品。取得的样品使用聚乙烯瓶装,加入5%的福尔马林溶液固定,带回实验室分析鉴定。

1.4 数据分析

附着生物量计算公式:

$$P_W = W / S$$

式中, P_W 为附着生物量(g/m²), W 为附着生物样品重量(g), S 为取样面积(m²)。

附着生物数量计算公式:

$$P_N = N / S$$

式中, P_N 为附着生物数量(ind./m²), N 为附着生物样品数量(ind.), S 为取样面积(m²)。

采用 Margalef 种类丰富度指数, Shannon-Wiener 多样性指数, Pielou 均匀度指数, Pinkas 相对重要性指数等参数对获得的数据进行解析,并采用 SPSS19.0 软件进行统计处理。各个调查区域的指数平均值采用单因子方差(One-way ANOVA)检验,显著性水平为 0.05。各指数公式如下:

Margalef 种类丰富度指数(D)公式:

$$D = (S - 1) / \ln N$$

Shannon-Wiener 多样性指数(H')公式:

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{N_i}{N} \ln \frac{N_i}{N}$$

Pielou 均匀度指数(J)公式:

$$J = H' / H_{\text{Max}} = H' / \ln S$$

Pinkas 相对重要性指数(IRI)公式:

$$\text{IRI} = \left(\frac{N_i}{N} \times 100 + \frac{W_i}{W} \times 100 \right) \times F \times 100$$

式中, S 为种类数, N 为尾数, W 为生物量, N_i 和 W_i 为 i 种的尾数和生物量, F 为出现频率。

2 结果

2.1 附着生物种类组成

本次调查中,5个年份投礁区域的15块人工鱼礁共鉴定礁体附着生物7大类37种。其中,节肢动物13种、环节动物4种、软体动物13种、扁形动物1种、棘皮动物2种、星虫动物1种、脊索动物3种。从表2可以看出,不同年份投礁区生物种类数有所差异,2010年投礁区最高,鉴定出生物27种;2016年投礁区最低,鉴定出生物14种。

2.2 附着生物数量和生物量

从图3可以看出,2010年投礁区礁体附着生物数量显著高于其他年投礁区($P < 0.05$);2018年投礁区礁体附着生物数量显著低于其他年投礁区($P < 0.05$);2012、2014和2016年投礁区礁体附着生物数量无显著差异($P > 0.05$)。从图4可以看出,2018年投礁区礁体附着生物量显著低于其他年投礁区($P < 0.05$),其他年投礁区礁体附着生物量无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 附着生物优势种

本研究采用相对重要性指数(IRI)作为判断优势种的标准,为更清晰地表示优势种的情况,规定 $\text{IRI} > 1000$ 为优势种(表3)。长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在各年投礁区中均为优势种,其中,2012、2014和2018年投礁区中长牡蛎是唯一的优势种。疣荔枝螺(*Thais clavigera*)和锯额豆瓷蟹(*Pisidia serratifrons*)、脉红螺(*Rapana venosa*)和鞭腕虾(*Hippolytina vittata*)分别为2010年和2016年投礁区中除长牡蛎外的优势种,但其IRI与长牡蛎相比,数值较低且相差10倍以上。

2.4 不同年份礁体生物种群特征指数

从表4可以看出,生物多样性指数最高值出现在2010年投礁区礁体,显著高于其他年($P < 0.05$);最低值出现在2018年投礁区礁体,显著低于其他年($P < 0.05$);2012、2014和2016年投礁区礁体附着生物的生物多样性指数无显著差异($P > 0.05$)。

2010年投礁区礁体生物的物种均匀度指数最高,显著高于2012年和2018年($P < 0.05$),但与2014年和2016年相比无显著差异($P > 0.05$)。2018年投礁区礁体生物的物种均匀度指数最低,显著低于其他投礁区($P < 0.05$)。

2010年投礁区礁体生物的物种丰富度指数最高,显著高于其他投礁区($P < 0.05$)。2016年投礁区礁体生物的物种丰富度指数最低,显著低于其他投礁区($P < 0.05$)。2018年礁区礁体生物的物种丰富度指数显著低于2012年和2014年($P < 0.05$)。

3 讨论

人工鱼礁会产生饵料效应、流场效应、庇护场效应、环境变化效应、阴影效应和音响效应等多种效应,这些效应在不同程度上有利于鱼群的聚集,导致礁区周围海域生物量的增加(章守宇等,2006,周艳波等,2010,郭彪等,2015)。其中,饵料效应主要表现在附着生物、底栖生物和浮游生物的种类、丰度和生物量

表 2 礁体附着生物种类
Tab.2 Species of attaching organisms on the artificial reefs

种类 Species	2010 年	2012 年	2014 年	2016 年	2018 年
节肢动物 Arthropoda					
鞭腕虾 <i>H. vittata</i>	√	√	√	√	√
大螯蛄虾 <i>Upogebia major</i>		√			
葛氏长臂虾 <i>Palaemon gravieri</i>	√			√	√
日本鼓虾 <i>Alpheus japonicus</i>	√				
刺螯鼓虾 <i>Alpheus hoplocheles</i>	√	√	√	√	√
锯额豆瓷蟹 <i>P. serratifrons</i>	√		√	√	√
蓝氏三强蟹 <i>Tritodynamia rathbunae</i>		√			
隆线强蟹 <i>Eucrate crenata</i>				√	
日本蛄 <i>Charybdis japonica</i>	√			√	√
绒毛近方蟹 <i>Hemigrapsus penicillatus</i>	√			√	√
特异大权蟹 <i>Macromedaeus distinguendus</i>	√	√	√	√	√
寄居蟹 <i>Paguridae</i> sp.	√				
白脊管藤壶 <i>Fistulobalanus albicostatus</i>		√			
环节动物 Annelida					
梳鳃虫 <i>Terebellides stroemii</i>	√	√	√		√
岩虫 <i>Marphysa sanguinea</i>	√	√	√	√	√
有齿背鳞虫 <i>Lepidonotus dentatus</i>	√		√		√
双齿围沙蚕 <i>Nereis succinea</i>	√				
软体动物 Mollusca					
圆蛤 <i>Cycladicama</i> sp.	√		√		√
毛蚶 <i>Anadara kagoshimensis</i>		√	√		√
布氏蚶 <i>Arca boucardi</i>	√	√	√		√
长牡蛎 <i>C. gigas</i>	√	√	√	√	√
密鳞牡蛎 <i>Ostrea denselamellosa</i>			√		
甲虫螺 <i>Cantharus cecillei</i>	√		√		√
丽小笔螺 <i>Mitrella bella</i>	√	√	√	√	√
脉红螺 <i>R. venosa</i>	√	√	√	√	√
疣荔枝螺 <i>T. clavigera</i>	√	√			√
虾夷盘扇贝 <i>Patinopecten yessoensis</i>			√		
菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	√				
薄片镜蛤 <i>Dosinia corrugata</i>	√				
纹斑棱蛤 <i>Trapezium liratum</i>			√		
扁形动物 Platyhelminthes					
涡虫 <i>Turbellaria</i> sp.	√				
棘皮动物 Echinodermata					
近辐蛇尾 <i>Ophiactis affinis</i>					√
马粪海胆 <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>		√	√		
星虫动物 Sipuncula					
革囊星虫 <i>Phascolosoma</i> sp.	√		√		√
脊索动物 Chordata					
孔鰕虎鱼 <i>Ctenotrypauchen</i> sp.	√				√
纹缟鰕虎鱼 <i>Tridentiger trigonocephalus</i>	√	√	√	√	√
髯缟鰕虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>	√	√	√	√	√

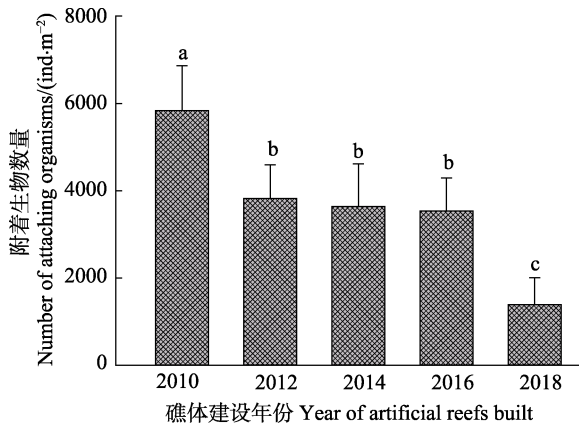


图3 不同建设年份礁体附着生物数量

Fig.3 Number of attaching organisms on the artificial reefs built in different years

不同字母表示不同年份投礁区礁体附着生物数量存在显著差异($P<0.05$), 下同

Different letters indicate significant differences among numbers of attaching organisms on the artificial reefs built in different years ($P<0.05$), the same as below

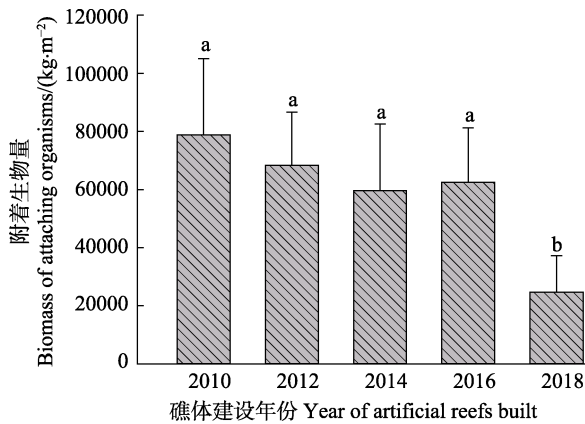


图4 不同建设年份礁体附着生物量

Fig.4 Biomass of attaching organisms on the artificial reefs built in different years

的增加(刘同渝, 2003; 张虎等, 2008; 戴媛媛等, 2018), 而附着生物是饵料效应最主要的因素(刘同渝, 2003)。因此, 附着生物种类的组成、数量变化直接影响人工鱼礁的生态效应(张伟等, 2008)。人工鱼礁附着生物的种类, 尤其是优势种组成受到其所处空间地理位置的影响很大。在山东青岛石雀滩海域, 普通硅酸盐水泥挂板附着生物绝对优势种在7月, 为麦秆虫(*Caprella* sp.), 而在9、11月和次年1月均为褶牡蛎(*Ostrea plicatula*) (王震等, 2019); 在大亚湾海域, 三角藤壶(*Balanus trigonus*) 在4个季节混凝土礁体附着生物中, 始终占据绝对优势地位(张伟等, 2015)。本研究中, 虽然不同年份投礁区礁体附着生物的种类和数量有所差异, 但长牡蛎均占绝对优势。这可能与天津大神堂海域的生物组成特征有关。本研究中, 人工鱼礁区与天津大神堂牡蛎礁国家级海洋特别保护区毗邻, 该区域长牡蛎资源丰富, 是长牡蛎成为绝对优势种的主要因素。

李传燕等(1990)对山东烟台港附着生物进行为期1年的调查发现, 实验挂板从6月开始形成附着生物群落, 经历夏季和冬季群落的生长和演替, 在1年后附着生物种类和数量已接近峰值。本研究中, 2018年投礁区的礁体实际投放时长约为120 d (2018年5月礁体投放), 由于其尚未形成稳定的附着生物群落, 故附着生物数量、重量、生物多样性指数和物种均匀度指数均显著低于其他年份。而2012、2014和2016年投礁区礁体附着生物的数量和重量相比无显著差异, 这说明礁体附着生物在其数量和重量, 尤其是附着生物重量达到一定数值后, 其受到时间序列的影响减弱。林小涛(2001)研究表明, 鱼礁投入海中2年, 藤壶和巨蚬等附着生物增多; 4年后, 由于这几类生物的大量生长繁殖, 导致鱼礁表面凹凸不平, 浮泥淤积, 属于

表3 各年份礁区礁体生物优势种

Tab.3 Dominant species of attaching organisms on the artificial reefs built in different years

区域 Areas	种类 Species	相对重要性指数 IRI
2010年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2010	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	13473.89
	疣荔枝螺 <i>T. clavigera</i>	1135.42
	锯额豆瓷蟹 <i>P. serratifrons</i>	1326.24
2012年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2012	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	16001.30
2014年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2014	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	15845.07
2016年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2016	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	15838.89
	脉红螺 <i>R. venosa</i>	1078.59
	鞭腕虾 <i>H. vittata</i>	1373.56

表 4 各年份礁区礁体生物种群特征指数(平均值±标准差)

Tab. 4 Index value of community diversity of attaching organisms on the artificial reefs built in different years (Mean±SD)

区域 Areas	生物多样性指数 H' Shannon-Wiener diversity index	物种均匀度指数 J Pielou evenness index	物种丰富度指数 D Margalef index
2010 年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2010	1.962±0.035 ^a	0.644±0.012 ^a	2.307±0.008 ^a
2012 年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2012	1.321±0.181 ^b	0.476±0.065 ^b	1.827±0.042 ^b
2014 年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2014	1.509±0.118 ^b	0.544±0.043 ^{ab}	1.830±0.025 ^b
2016 年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2014	1.237±0.099 ^b	0.563±0.045 ^{ab}	0.980±0.015 ^c
2018 年投礁区礁体 Artificial reefs built in 2014	0.711±0.220 ^c	0.324±0.100 ^c	1.115±0.062 ^d

注: 同一列数值上标的不同字母表示经单因素方差分析有显著性差异($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences among community diversity values of attaching organisms on the artificial reefs built in different years ($P<0.05$)

游在目的环形动物也多起来,这与本研究的结果相类似。2010 年投礁区域礁体附着生物种类和数量均显著高于其他年,但在附着生物重量上无显著差异,增加的生物主要是一些小型的饵料生物。这些研究表明,附着数量和重量达到一定数值后,其受到时间序列的影响减弱,但其生物生态环境仍在缓慢改善,生物多样性逐步增加。

总之,时间序列对人工鱼礁附着生物的影响在投放前期较为明显,当生物量达到一定数值后,其影响明显减弱,但其生物生态环境仍在缓慢改善,生物多样性逐步增加。人工鱼礁附着生物优势种类组成对其所处海域地理位置的影响很大,因此,在人工鱼礁建设过程中,礁区选址和礁型设计必须要充分了解选址海区的生物现状,以便更好地实现其养护生物资源的建设目的。

参 考 文 献

- Dai YY, Hou CQ, Yang S, *et al.* Community structure of zooplankton in artificial reef area of Tianjin seashore and its relationship with environment factor. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(5):163–170 [戴媛媛, 侯纯强, 杨森, 等. 天津海域人工鱼礁区浮游动物群落结构及其与环境因子的相关性研究. 海洋湖沼通报, 2018(5): 163–170]
- Gong PH, Li J, Guan CT, *et al.* Estimation and experiment of carbon sequestration by oysters attached to the enhancement artificial reefs in Laizhou Bay, Shandong, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(10): 3032–3038 [公丕海, 李娇, 关长涛, 等. 莱州湾增殖礁附着牡蛎的固碳量试验与估算. 应用生态学报, 2014, 25(10): 3032–3038]
- Guo B, Yu Y, Zhang BL, *et al.* Changes of nekton community characteristics in artificial reef area, Dashentang, Tianjin. *Marine Fisheries*, 2015, 37(5): 409–418 [郭彪, 于莹, 张博伦, 等. 天津大神堂海域人工鱼礁区游泳动物群落特征变化. 海洋渔业, 2015, 37(5): 409–418]
- Kress N, Tom M, Spanier E. The use of coal fly ash in concrete for marine artificial reefs in the southeastern Mediterranean: Compressive strength, sessile biota, and chemical composition. *ICES Journal of Marine Science*, 2002, 59(s1): 231–237
- Li CY, Huang ZG, Wang JJ, *et al.* Ecological study of attached organisms in Yantai harbor. *Acta Oceanologica Sinica*, 1990, 12(1): 107–114 [李传燕, 黄宗国, 王建军, 等. 烟台港附着生物生态研究. 海洋学报, 1990, 12(1): 107–114]
- Li J, Gong PH, Guan CT, *et al.* Carbon sequestration of additives of artificial reefs and its effect on carbon fixation of *Ostrea plicatula* gmelin. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 100–104 [李娇, 公丕海, 关长涛, 等. 人工鱼礁材料添加物碳封存能力及其对褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)固碳量的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 100–104]
- Li ZZ, Gong PH, Guan CT, *et al.* Study on the organisms attachment of artificial reefs constructed with five different cements. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 57–63 [李真真, 公丕海, 关长涛, 等. 不同水泥类型混凝土人工鱼礁的生物附着效果. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 57–63]
- Lin XT. Biology of artificial reefs. *Fisheries Science and Technology*, 2001, 93(3): 42–44 [林小涛. 人工鱼礁的生物学机能. 水产科技, 2001, 93(3): 42–44]
- Liu TY. Bait effect of artificial reef (I). *Fisheries Science & Technology*, 2003, 106(4): 37–38 [刘同渝. 人工鱼礁的饵料效应(一). 水产科技, 2003, 106(4): 37–38]
- Oyamada K, Tsukidate M, Watanabe K, *et al.* A field test of porous carbonated blocks used as artificial reef in seaweed beds of *Ecklonia cava*. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 413–418
- Wang Z, Gong PH, Guan CT, *et al.* Effect of different artificial reefs on the community structure of organisms in Shique Beach of Qingdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2019,

- 40(4): 163–171 [王震, 公丕海, 关长涛,等. 青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 163–171]
- Zhang H, Liu PT, Tang JH, *et al.* Investigation on the macrobenthos of artificial reefs area in the Haizhou gulf. *Marine Fisheries*, 2008, 30(2): 97–104 [张虎, 刘培延, 汤建华, 等. 海州湾人工鱼礁大型底栖生物调查, 海洋渔业, 2008, 30(2): 97–104]
- Zhang SY, Zhang HJ, Jiao JP, *et al.* Change of ecological environment of artificial reef waters in Haizhou Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(4): 475–480 [章守宇, 张焕君, 焦俊鹏, 等. 海州湾人工鱼礁海域生态环境的变化. 水产学报, 2006, 30(4): 475–480]
- Zhang W, Li CH, Jia XP, *et al.* A review on influential factors of fouling organisms on artificial reef. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(1): 64–68 [张伟, 李纯厚, 贾晓平, 等. 人工鱼礁附着生物影响因素研究进展. 南方水产, 2008, 4(1): 64–68]
- Zhang W, Li CH, Jia XP, *et al.* Seasonal variation of biofouling communities on concrete and steel reefs in Daya Bay. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(1): 9–17 [张伟, 李纯厚, 贾晓平, 等. 大亚湾混凝土鱼礁和铁质鱼礁附着生物群落结构的季节变化. 南方水产, 2015, 11(1): 9–17]
- Zhou YB, Cai WG, Chen HG, *et al.* The mechanism and research progress on fish attraction technique for artificial reefs. *Marine Fisheries*, 2010, 32(2): 225–230 [周艳波, 蔡文贵, 陈海刚, 等. 人工鱼礁生态诱集技术的机理及研究进展. 海洋渔业, 2010, 32(2): 225–230]

(编辑 陈 严)

Community Characteristics of Attaching Organisms on the Artificial Reefs Built in Different Years in Dashentang, Tianjin

GUO Biao^①, CHEN Wei, GAO Yan, ZHANG Bolun,
WANG Shuo, WANG Yu, ZHANG Xue, ZENG Xiangxi

(Department of Fisheries Resources and Ecologic Environment, Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute,
Center for Marine Ranching Engineering Science Research of Tianjin, Tianjin 300457)

Abstract To collect reference material for the construction and management of artificial reefs in Dashentang, community characteristics of attaching organisms on the artificial reefs built in different years were evaluated. Three artificial reefs were lifted in September 2018 from reef areas built in 2010, 2012, 2014, 2016, and 2018. The attaching organisms were collected for analysis. The species and number of attaching organisms were different for artificial reefs built in different years. Nonetheless, *Crassostrea gigas* was a dominant species of attaching organism on all artificial reefs, and in some years it was the only dominant species. These results might be related to the biological environment in the area of sea where the artificial reefs were built. The artificial reef area in our study was adjacent to a natural oyster reef area in Tianjin where the resources for *C. gigas* were very rich. This was likely the main factor resulting in *C. gigas* being the absolute dominant species. Because of the short intervals between the time of the survey and when reefs were built, the biological community of attaching organisms had not yet fully formed. Thus, species number, organism number, biomass, Shannon-Wiener diversity index, and Pielou's evenness index for attaching organisms on reefs built in 2018 were significantly lower than those in earlier years. The species number and organism number of the attaching organisms on reefs built in 2010 were significantly higher than those in other years, but no significant difference in biomass was observed between the parameters for attaching organisms on reefs built in 2010, 2012, 2014, and 2016. The results suggested that species of attached organisms on artificial reefs are greatly affected by the environment in which the reefs were built. The effect of time on the attached organisms was more obvious in the early stages after the reefs were built. When the biomass of attached organisms reached a certain value, the effect was significantly reduced. However, its biological environment continued to slowly improve and its biodiversity gradually increased.

Key words Artificial reefs; Time series of reefs built; Attaching organisms; Community characteristics

① Corresponding author: GUO Biao, E-mail: oucguobiao@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190801001

http://www.yykxjz.cn/

许庆昌, 李显森, 孙珊, 樊钢洲. 秋季莱州湾弓子网网囊网目尺寸选择性研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 19–27
Xu QC, Li XS, Sun S, Fan GZ. Selectivity of codend mesh of beam trawl in Laizhou Bay in autumn. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 19–27

秋季莱州湾弓子网网囊网目尺寸选择性研究*

许庆昌 李显森^① 孙珊 樊钢洲

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
农业农村部极地渔业开发重点实验室 青岛 266071)

摘要 单船框架拖网(俗称弓子网)是渤海海区常见的作业渔具,对底栖渔业生物选择性差,作业过程中产生大量副渔获物。为改善网囊网目的选择性,2017年9月在莱州湾海域采用“套网法”对网囊网目尺寸分别为15、25、35、45和55 mm的5种网囊进行了选择性实验。结果显示,弓子网对渔获物种类的选择能力较差,具有捕获栖息于作业海域绝大多数底栖种类的能力。随网囊网目尺寸的增加,渔获物质量、尾数逃逸率和产值损失率逐渐增大,短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)和日本鼓虾(*Alpheus japonicas*)的选择性参数($L_{0.5}$ 、SR)呈线性增加。口虾蛄和鹰爪虾的50%选择体长($L_{0.5}$)与网目尺寸(m)的线性回归方程分别为 $L_{0.5}=1.472m+12.63(R^2=0.934)$ 和 $L_{0.5}=1.394m+0.724(R^2=0.920)$ 。在目前的渔业资源状况下,为保护口虾蛄和鹰爪虾等经济渔获物资源,兼顾生产效益和幼鱼资源保护,建议将弓子网最小网目尺寸放大至45 mm。

关键词 弓子网; 莱州湾; 逃逸率; 选择性; 网囊网目尺寸

中图分类号 S972.13 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0019-09

弓子网属于单船框架拖网(00·kj·T; GB/T 5147-2003),作业于沿岸水域,是渤海沿岸地区具有代表性的框架型拖网渔具(李显森等,2017)。弓子网渔具规格小、操作简单、成本低,广泛应用于小型群众渔业(李凡等,2013),主要捕捞虾蟹类、贝类、海螺类以及活动较差的底层鱼类(孙中之等,2011),由于其网囊网目尺寸较小(23~26 mm),选择性较差,其渔获物组成中幼鱼比例高,高龄鱼较少,兼捕问题严重,对近海底栖渔业生物资源造成较严重的影响(张海鹏等,2018; 张旭等,2009、2010)。为加强捕捞渔具管理,保护近海渔业资源,农业农村部先后颁布了《农业部关于实施海洋捕捞准用渔具和过渡渔具最小网目尺寸制度的通告》(农业部通告[2013] 1号)和《农业部

关于禁止使用双船单片多囊拖网等十三种渔具的通告》(农业部通告[2013] 2号),将单船框架拖网列为海洋捕捞过渡渔具,并以虾类为目标鱼种将其过渡期内最小网目尺寸暂定为25 mm。

改善网具对捕捞对象尺寸的选择性、实现渔业资源的选择性捕捞是减轻渔业兼捕和丢弃问题、保护渔业资源的主要手段之一(Armstrong *et al*, 1990; MacLennan, 1992)。近年来,国内外学者针对张网(张健等,2017; 黄六一等,2016、2018)、桁杆拖网(邢彬彬等,2015; 杨炳忠等,2018、2019)等网具选择性进行了大量的研究,且相关研究表明,方形网目网囊可有效改善网具选择性(Madsen, 2007; Catchpole *et al*, 2008)。而关于弓子网的文献报道多集中于渔具

* 农业农村部财政专项(2018)资助 [This work was supported by Financial Special Fund of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2018)]. 许庆昌, E-mail: xuqc@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2019-08-01, 收修改稿日期: 2019-10-31

渔法分析(孙中之等, 2011)、捕捞现状调查(张海鹏等, 2018)以及渔获物组成及其季节变化(张旭等, 2009、2010)等方面的研究, 针对弓子网网囊网目尺寸选择性研究鲜见报道。

本研究采用套网法(孙满昌, 2004)研究弓子网网目选择性, 依据莱州湾海区作业环境和资源状况, 于秋季开展网具选择性实验。参照《农业部关于实施海洋捕捞准用渔具和过渡渔具最小网目尺寸制度的通告》(农业部通告[2013] 1号)弓子网最小网目尺寸为25 mm的规定, 实验网囊网目尺寸分别设置为15、25、35、45和55 mm。通过渔获物组成、逃逸率、渔获性能及主要渔获物选择性分析, 更好的掌握弓子网网目选择性, 为莱州湾弓子网渔具管理及渔业资源保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验渔船与网具

实验渔船为“鲁莱州渔 66225”, 渔船主机功率为300 kW, 船舶全长为31.0 m, 型宽为5.2 m。船身两侧各伸出1个10.0 m的支杆, 每个支杆拖曳4顶弓子网渔具, 其作业示意图见图1。

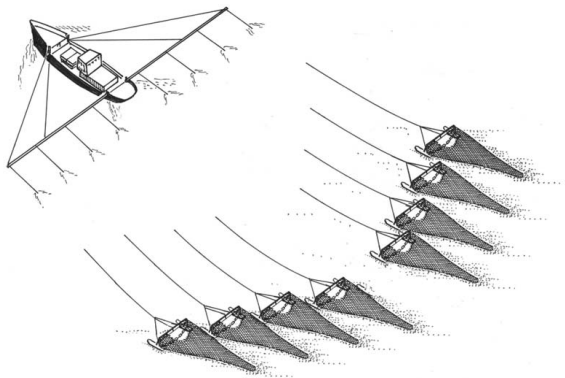


图1 弓子网作业示意(李显森等, 2017)
Fig.1 Schematic diagram of beam trawl

实验网具为弓子网(单船框架拖网; 00·kj·T; GB/T 5147-2003)生产用网具, 网具主尺度为12.33 m×6.06 m(2.20 m), 网口网目尺寸为67 mm, 网囊最小网目尺寸为25 mm; 框架宽2.20 m, 高0.45 m, 左、右翘板宽各100 mm, 长为0.45 m; 弓子横梁、左右弓子材料为钢管, 左、右翘板材料为钢板(图2)。实验网除网囊外, 其他配置均与生产网保持一致。根据《农业部关于实施海洋捕捞准用渔具和过渡渔具最小网目尺寸制度的通告》(农业部通告[2013] 1号), 以网目尺寸为25 mm的网囊为基础, 将实验网囊网目内径分别设计为15、25、35、45和55 mm (GB/T 6964-2010), 套网网目内径设计为10 mm, 由于网具生产加工误差, 其实际网目尺寸如表1所示。

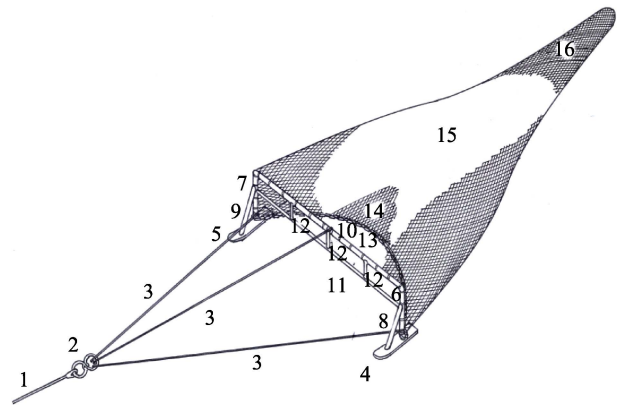


图2 单船框架拖网(弓子网)结构示意图
Fig.2 Schematic diagram of the structure of single beam trawl

- 1: 拽纲; 2: 转环; 3: 叉子纲; 4: 左翘板; 5: 右翘板;
6: 左立柱; 7: 右立柱; 8: 左支撑柱; 9: 右支撑柱;
10: 上梁; 11: 加强梁; 12: 加强支撑; 13: 下纲
配重铁链; 14: 腹网; 15: 背网; 16: 网囊
1: Warp; 2: Swivel; 3: Cross rope; 4: Left wane;
5: Right wane; 6: Left column; 7: Right column;
8: Left shore; 9: Right shore; 10: Top bar;
11: Stiffening beam; 12: Support beam; 13: Foot line;
14: Net abdomen; 15: Upper blade; 16: Cod end

表1 不同网囊实测网目内径及有效网次

Tab.1 Measured mesh size and effective hauls of different cod ends

网囊网目尺寸 Codend mesh size (mm)		套网尺寸 Cover net mesh size (mm)		实验网次 Experiment haul	有效网次 Effective haul
设计值 Design value	实测值 Measure value	设计值 Design value	实测值 Measure value		
15	15.8±0.7	10	11.8±0.6	10	6
25	25.0±0.8	10	11.8±0.6	10	10
35	33.0±0.8	10	11.8±0.6	10	8
45	45.1±0.8	10	11.8±0.6	10	8
55	55.7±1.0	10	11.8±0.6	10	8

1.2 实验海域与时间

选择性实验于 2017 年 9 月 2~16 日开展, 为期 15 d。实验渔船在渤海莱州湾海域 (37°20'~35°56'N、119°17'~119°42'E 附近) 进行拖网作业, 作业海域潮流为半日潮, 作业水深为 12~17 m, 作业海区底质为泥底(图 3)。

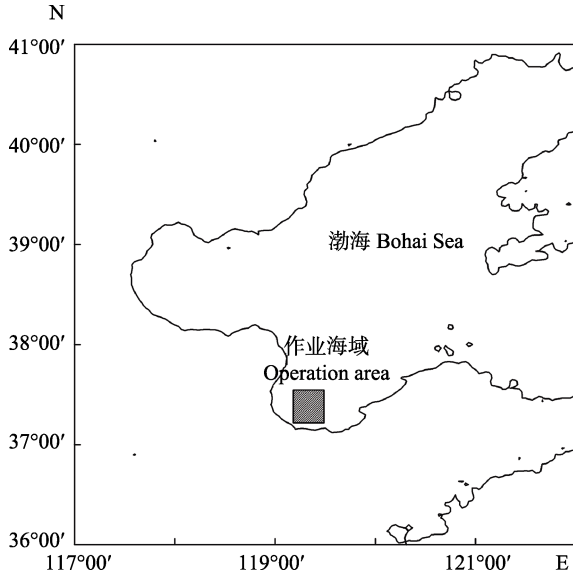


图 3 选择性实验作业海域

Fig.3 Operation sea area during the selective experiment

1.3 实验方法

实验采用套网法, 每种规格网囊分别进行 10 网次实验, 每网次拖曳 2~3 h, 拖速为 3~4 节。起网后, 将网囊及其对应套网的渔获物分开单独放置, 称重后取样, 记录主要渔获物卸港价格, 并对渔获物进行分类鉴定, 统计不同渔获物的数量和质量。分别测量渔获物体长、体重等数据, 个体数量不足 50 尾的种类全部测量, 超过 50 尾的种类测量 50 尾。

为降低套网“覆盖效应”, 设计套网内径及拉直长度均比网囊大 20%, 并在套网内侧安装 2 个直径为 12 mm 的铁质圆环用于实现套网的周向扩张, 降低套网对网具选择性的影响, 圆环的直径为 0.8 m, 两圆环间距为 2.0 m。

1.4 数据处理

1.4.1 逃逸率 通过对各实验网囊渔获物逃逸率计算, 分析其对主要经济鱼种的释放效果, 渔获物逃逸率计算公式为:

$$E_N = \frac{N_c}{N_c + N_n} \times 100\% \quad (1)$$

$$E_W = \frac{W_c}{W_c + W_n} \times 100\% \quad (2)$$

$$E_V = \frac{V_c}{V_c + V_n} \times 100\% \quad (3)$$

式中, E_N 、 E_W 、 E_V 分别为渔获物尾数、质量逃逸率和产值损失率; N_c 和 N_n 分别为套网和网囊内渔获物尾数(ind.); W_c 和 W_n 分别为套网和网囊内渔获物质量(kg); V_c 和 V_n 分别为套网和网囊内渔获物经济价值。

1.4.2 CPUE 的计算 本研究以实验网囊内单位时间渔获量表征其捕捞性能, 其计算公式为:

$$CPUE = \frac{\sum_{i=1}^j C_i}{\sum_{i=1}^j E_i} \quad (4)$$

式中, j 为总实验网次数, i 为第 i 网次; C_i 为第 i 网次渔获量(kg); E_i 为第 i 网次作业时间; CPUE(Catch per unit effort)(kg/h)为实验网囊单位时间渔获量。然后, 根据以下公式计算获得各实验网囊单位时间渔获价值 VPUE(Value per unit effort)(Whitmarsh et al, 2008; 唐衍力等, 2017), 用以表征各网囊渔获物经济效益:

$$VPUE = \sum_{k=1}^n CPUE_k \times P_k \quad (5)$$

式中, n 为总渔获种类数, k 为第 k 种渔获物, $CPUE_k$ 为第 k 种渔获物的 CPUE, P_k 为第 k 种渔获物的价格。

1.4.3 Logistic 选择性模型 本研究选取 Logistic 选择性模型分析实验网对渔获物的选择性, 其选择性曲线函数式如下:

$$S_l = \frac{\exp(a + bl)}{1 + \exp(a + bl)} \quad (6)$$

式中, S_l 为网目对体长组 l 的选择率; l 为体长组的特征体长; a 、 b 为选择性参数。根据公式(6)可推算出各选择性指标的参数表达式:

$$L_{0.5} = -\frac{a}{b}; SR = \frac{2 \ln 3}{b}; SF = \frac{L_{0.5}}{m} \quad (7)$$

式中, $L_{0.5}$ 表示选择率为 50%时对应的体长, 即 50%选择体长; SR 为选择范围; SF 为选择性因素; m 为网目尺寸。

2 结果与分析

2.1 主要渔获物组成

实验期间共进行 50 网次弓子网选择性实验, 其中, 有效网次为 40 次(表 1), 共捕获渔获物 1942.03 kg,

有效网次渔获物1594.56 kg。对实验渔获物进行分类鉴定发现,共捕渔获物59种,其中,鱼类26种、虾类10种、蟹类7种、头足类3种、贝类11种、其他2种,分别占总渔获质量的41.72%、33.29%、15.52%、7.10%、2.00%和0.37%,占总渔获尾数的33.07%、52.79%、2.90%、2.71%、8.48%和0.04%(图4)。

实验主要渔获种类及其尾数、质量和经济价值百分比见表2。秋季弓子网主要渔获物为短吻红舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)、鲷(*Platycephalus indicus*)、六丝钝尾虾虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本蛸(*Charybdis japonica*)、短蛸(*Octopus ochellatus*)、鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)和日本鼓虾(*Alpheus japonicus*)，主要经济渔获物为鲷、三疣梭子蟹、日本蛸、短蛸、鹰爪虾和口虾蛄,分别占渔获总质量的19.76%、4.84%、7.82%、

6.37%、8.34%和22.23%，占渔获总尾数的2.09%、0.37%、0.94%、1.29%、21.71%和12.35%，占渔获总价值的11.20%、5.49%、16.25%、4.81%、12.60%和42.00%；其他渔获物质量、尾数和经济价值百分比分别为30.64%、61.25%和7.65%。

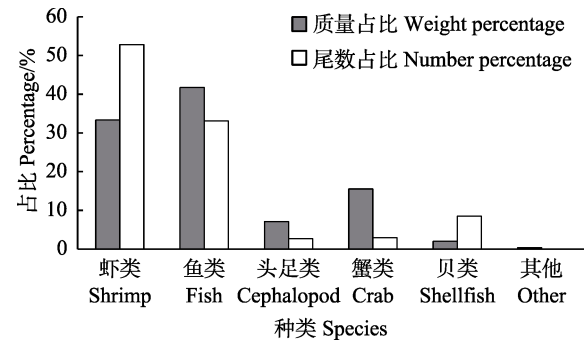


图4 渔获物质量及尾数占比

Fig.4 Percentage of the catch in weight and number

表2 秋季弓子网主要渔获物种类组成

Tab.2 Composition of the main catch species of beam trawl in autumn

种类 Species	W%	N%	V%	种类 Species	W%	N%	V%
短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	6.48	3.96	2.20	日本蛸 <i>C. japonica</i>	7.82	0.94	16.25
鲷 <i>P. indicus</i>	19.76	2.09	11.20	隆线强蟹 <i>E. crenata</i>	2.76	1.41	0.21
矛尾虾虎鱼 <i>C. stigmatias</i>	1.21	0.35	0.09	短蛸 <i>O. ochellatus</i>	6.37	1.29	4.81
六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>	10.95	21.89	0.83	日本枪乌贼 <i>L. japonica</i>	0.70	1.41	0.26
皮式叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>	0.86	0.30	0.29	鹰爪虾 <i>T. curvirostris</i>	8.34	21.71	12.60
中华栉孔虾虎鱼 <i>C. chinensis</i>	0.60	1.65	0.05	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	22.23	12.35	42.00
黄鲫 <i>S. tenuifilis</i>	0.56	0.54	0.08	日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>	2.38	17.31	0.54
赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	0.36	1.72	0.03	鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>	0.18	0.34	0.04
青鳞鱼 <i>H. zunasi</i>	0.17	0.34	0.07	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	0.11	1.01	0.03
银鲳 <i>P. argenteus</i>	0.17	0.34	0.06	织纹螺 <i>Nassariidae</i>	1.43	7.63	1.08
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	4.84	0.37	5.49	其他 Else	1.73	1.36	1.79

注: W%、N%和 V%分别表示实验网囊不同种类渔获物质量、尾数和经济价值占其总量的百分比。下同

Note: W%, N% and V% represent the percentage of catch in weight, number and value, respectively. The same as below

2.2 主要渔获物及逃逸率

各实验网囊主要渔获物种类及其逃逸率见表3。由表3中可知,不同网目尺寸实验网囊内渔获物组成差异较大。渔获物中口虾蛄和鲷的质量占比在各实验网囊中均超过15%,口虾蛄、六丝钝尾虾虎鱼、日本鼓虾和鹰爪虾的尾数占比在各实验网囊中均接近甚至超过10%。随网目尺寸的增加,各类渔获物的质量和尾数逃逸率均呈逐渐增加的趋势。当网目尺寸增大到55 mm时,短吻红舌鲷、六丝钝尾虾虎鱼、日本鼓虾、日本枪乌贼(*Loligo japonica*)和鹰爪虾等渔获物的质量和尾数逃逸率均超过65%。然而,主要渔获物中日本蛸和三疣梭子蟹的逃逸率偏低,即使网目尺寸达55 mm,其质量逃逸率依然低于10%。

2.3 渔获性能

根据实验数据分析网囊网目尺寸对弓子网渔获性能的影响,结果如表4所示。弓子网渔获效率及渔获价值均较高,生产渔船单网CPUE约为16.20 kg/h,产值达421.01元/h。随着网囊网目尺寸的增加,弓子网CPUE以及VPUE均逐渐降低,而其质量、尾数逃逸率和产值损失率均逐渐增加。当网目尺寸达到45 mm时,弓子网可释放40%以上的小型鱼、虾类,而其质量逃逸率仅为20%,产值损失率低于18%;随网囊网目尺寸进一步增大至55 mm时,其渔获物逃逸率迅速增大,质量、尾数逃逸率和产值损失率分别达到48.21%、75.91%和44.43%。

表 3 实验网囊主要渔获物及其逃逸率
Tab.3 Main catch and its escape ratio in experimental cod ends (%)

渔获种类 Fish species	15 mm 网囊 Cod end			25 mm 网囊 Cod end			35 mm 网囊 Cod end			45 mm 网囊 Cod end			55 mm 网囊 Cod end						
	W%	N%	E _W	W%	N%	E _W	E _N	E _W	N%	E _N	E _W	N%	E _N	W%	N%	E _W	E _N		
短蛸	7.45	2.16	0.72	1.40	1.18	19.39	23.18	5.81	1.34	24.97	29.54	5.79	1.30	32.94	37.17	4.89	1.18	56.26	66.36
<i>O. ochellatus</i>																			
短吻红舌鲷	8.92	7.72	0.16	0.53	4.58	16.19	24.46	5.43	3.46	30.02	35.37	4.49	3.21	25.86	28.17	2.68	2.82	67.03	69.53
<i>C. joyneri</i>																			
皮式叫姑鱼	0.77	0.29	0.10	1.75	1.28	0.41	1.71	17.39	0.96	1.54	19.64	0.93	0.34	14.52	43.70	0.54	0.24	42.28	62.00
<i>J. belangerii</i>																			
口虾蛄	17.46	13.54	0.07	0.64	18.51	11.72	4.68	13.78	23.05	14.82	6.71	17.81	29.24	20.97	27.31	17.33	14.62	46.56	56.78
<i>O. oratoria</i>																			
隆线强蟹	1.43	0.68	0.04	1.11	1.87	0.96	0.56	5.28	2.46	4.93	29.00	5.65	3.35	13.10	27.52	6.31	4.41	24.08	42.15
<i>E. crenata</i>																			
六丝钝尾虾虎鱼	9.81	21.28	2.01	5.36	8.92	20.49	21.64	35.21	11.30	24.52	31.96	43.99	9.63	35.60	46.34	5.92	17.91	73.09	79.49
<i>A. hexanema</i>																			
日本鼓虾	1.01	8.34	12.77	17.64	1.25	11.90	42.60	48.16	1.92	15.82	42.67	45.34	1.91	50.90	54.78	1.11	12.21	85.17	87.89
<i>A. japonicus</i>																			
日本枪乌贼	0.53	1.27	1.83	2.55	0.69	0.99	13.01	33.78	0.40	0.70	21.85	40.29	0.60	39.06	45.89	0.34	1.48	83.68	84.29
<i>L. japonica</i>																			
日本鲟	9.82	1.42	—	—	9.32	1.39	0.67	10.67	6.40	1.03	17.86	9.52	1.16	2.88	25.66	8.48	1.91	7.56	23.71
<i>C. japonica</i>																			
三疣梭子蟹	5.68	0.33	—	—	6.71	0.58	0.11	1.14	5.70	0.89	5.17	3.96	0.48	4.88	27.41	4.13	0.32	9.52	39.02
<i>P. trituberculatus</i>																			
鹰爪虾	6.64	23.38	0.46	1.20	8.86	30.80	10.56	20.86	9.26	25.18	14.46	26.72	7.91	20.63	28.90	7.54	24.25	65.61	73.28
<i>T. curvirostris</i>																			
鲷 <i>P. indicus</i>	25.26	3.55	—	—	25.70	3.50	0.14	2.15	21.05	2.33	0.86	10.99	15.32	8.12	12.26	33.46	4.85	30.03	38.13
贝类 Shellfish	1.50	11.93	9.02	10.67	0.69	5.12	72.02	71.13	1.09	4.21	57.30	44.72	1.05	51.39	53.49	1.07	7.39	80.03	72.86
其他 Other	3.73	4.14	2.86	11.96	5.19	6.37	19.42	43.92	5.18	4.95	20.65	47.00	4.00	28.84	50.85	6.20	6.40	47.04	81.12

注: E_W 和 E_N 分别表示实验网囊不同渔获质量和尾数的逃逸率
Note: E_W and E_N represent the escape rate of catch in weight and number, respectively

表4 不同网囊弓子网渔获性能比较

Tab.4 Catch efficiency of beam trawls in different cod ends

网目尺寸 Mesh size (mm)	网囊渔获量 Catch in cod-end (kg)	单位时间渔获量 CPUE (kg/h)	网囊尾数 Number of fish (ind.)	单位时间 渔获价值 VPUE (CNY/h)	质量逃逸率 E_w (%)	尾数逃逸率 E_N (%)	产值损失率 E_V (%)
15	265.33	19.53	39202	495.23	0.70	5.17	0.30
25	377.86	16.20	60017	421.01	10.34	34.48	6.99
35	268.36	13.88	47200	357.90	14.80	36.03	9.31
45	254.31	12.93	38871	367.85	20.41	41.34	17.58
55	140.57	7.21	15517	177.02	48.21	75.91	44.43

2.4 渔具选择性分析

根据弓子网主要渔获物逃逸情况,对主要渔获物中短吻红舌鳎、口虾蛄、鹰爪虾和日本鼓虾进行选择分析,其主要选择性参数如表5,选择性曲线如图5。随网囊网目尺寸的增加,短吻红舌鳎、口虾蛄、鹰爪虾和日本鼓虾的 $L_{0.5}$ 均逐渐增大,且其选择范围(SR值)呈逐渐增大的趋势。网囊网目尺寸为15~45 mm时,SR值较小,此时,选择性曲线较陡,选择性尖锐;而网囊网目尺寸为55 mm时,弓子网对上述主要渔获物的选择范围均较大,即此时选择性曲线较为平坦,选择性不强。

将网囊网目尺寸与其对应的短吻红舌鳎、口虾蛄、鹰爪虾和日本鼓虾的 $L_{0.5}$ 进行线性回归,获得网囊网目尺寸与 $L_{0.5}$ 的关系式,结果见表6。参照《渤海生物资源养护规定》口虾蛄最小可捕体长为110 mm;黄海海区渔业资源调查显示,鹰爪虾雌性第1次性成熟体长为56 mm,作为最小可捕体长(农业部水产局,1990)。经计算,针对口虾蛄,弓子网网囊最适网目尺寸为 $m=66.1$ mm,此时,弓子网对体长为110 mm口虾蛄的选择率为50%;针对鹰爪虾网囊最适网目尺寸为 $m=39.6$ mm,此时,弓子网对体长为56 mm鹰爪虾的选择率为50%。

表5 各实验网对主要渔获物的选择性参数和指标

Tab.5 Selective parameters of the main catch species for the experimental cod ends

种类 Species	网目尺寸 Mesh size (mm)	选择性参数 Selective parameters				
		a	b	$L_{0.5}$ (cm)	SR (cm)	SF
短吻红舌鳎 <i>C. joyneri</i>	15	-5.36	0.74	7.21	2.96	4.80
	25	-4.96	0.60	8.22	3.64	3.29
	35	-3.71	0.44	8.46	5.01	1.88
	45	-3.78	0.38	9.98	5.79	2.85
	55	-3.69	0.24	15.22	9.05	2.77
口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	15	-4.50	1.45	3.11	1.52	2.07
	25	-4.78	0.85	5.64	2.59	2.26
	35	-4.44	0.68	6.52	3.22	1.86
	45	-3.99	0.57	7.04	3.87	1.56
	55	-2.69	0.28	9.77	7.98	1.78
鹰爪虾 <i>T. curvirostris</i>	15	-4.52	1.84	2.46	1.19	1.64
	25	-4.93	1.30	3.79	1.69	1.52
	35	-4.98	1.13	4.41	1.95	1.26
	45	-3.00	0.54	5.57	4.08	1.24
	55	-3.27	0.38	8.54	5.73	1.55
日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>	15	-4.14	1.88	2.20	1.17	1.47
	25	-3.13	1.53	2.39	1.44	0.68
	35	-3.66	1.18	2.66	1.87	1.06
	45	-3.01	0.75	3.99	2.91	0.89
	55	-3.46	0.47	7.32	4.65	1.33

注: a 和 b 为选择性参数; $L_{0.5}$ 为 50% 选择体长; SR 和 SF 分别为选择范围和选择系数

Note: a , b represent selective parameters; $L_{0.5}$ represents 50% selected length; SR, SF represent select range and selective coefficient

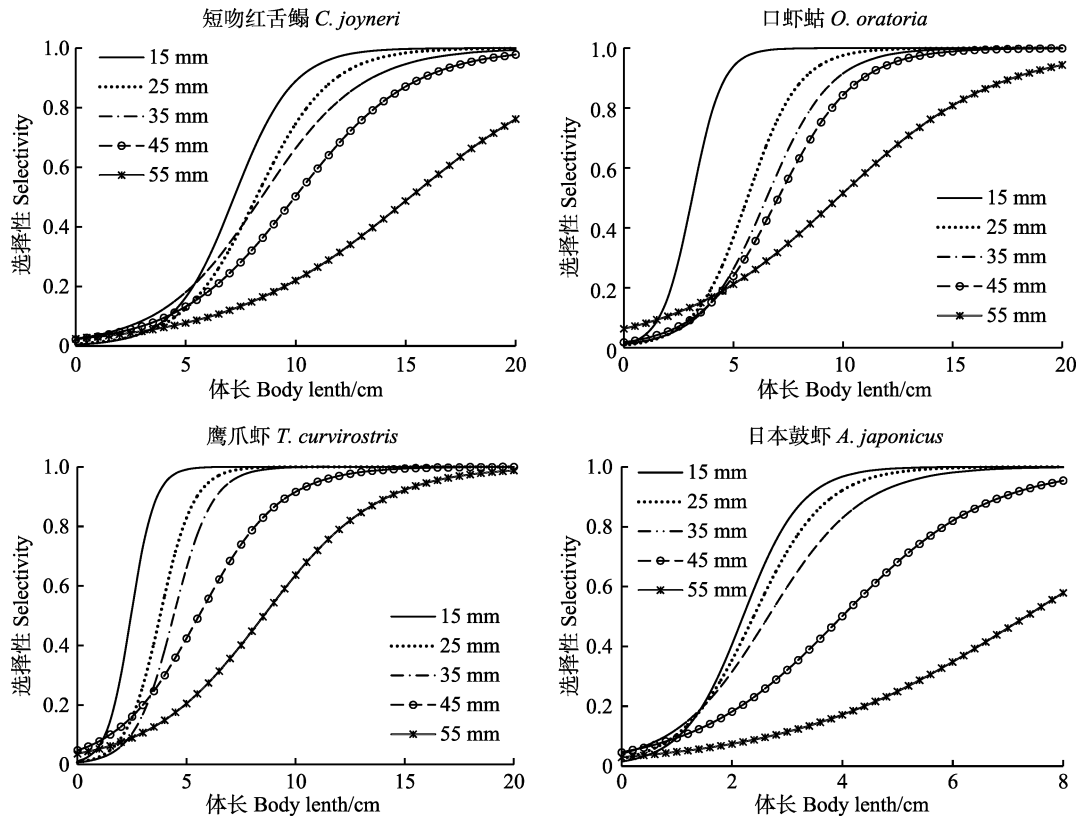


图 5 弓子网对主要渔获物的选择性曲线
Fig.5 Selective curves of the main species for beam trawl

表 6 50%选择体长($L_{0.5}$)与网囊网目尺寸(m)关系
Tab.6 Relationship between 50% selective body length ($L_{0.5}$) and cod end mesh size (m)

种类 Species	$L_{0.5}$ 与 m 关系 Relationship between $L_{0.5}$ and m	可捕尺寸 Allowable size (mm)	最适网目尺寸 Optimum mesh size (mm)
短吻红舌鲷 <i>C. joyneri</i>	$L_{0.5}=1.777m+35.92$ ($R^2=0.782$)	—	—
口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	$L_{0.5}=1.472m+12.63$ ($R^2=0.934$)	110	66.1
鹰爪虾 <i>T. curvirostris</i>	$L_{0.5}=1.394m+0.724$ ($R^2=0.920$)	56	39.6
日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>	$L_{0.5}=1.184m-4.305$ ($R^2=0.768$)	—	—

3 讨论

3.1 作业性能及产值分析

弓子网属于主动型过滤渔具(孙满昌, 2004), 渔船多为主机功率300马力以上的大型船只, 作业时拖曳6~10顶网具(张海鹏等, 2018), 在拖曳过程中, 迫使渔具经过水域中的鱼、虾、蟹、头足类、贝类等捕捞对象进入网内, 达到捕捞目的(黄锡昌, 1990)。弓子网捕捞效率较高, 张旭等(2010)研究显示, 弓子网单位功率渔获量为1.73 kg/kW, 高于拖网捕捞效率(0.78 kg/kW)。本研究显示, 网囊网目尺寸为25 mm的生产渔船单船CPUE达130 kg/h, 由于其主要渔获物中口虾蛄和日本鲷等经济价值较高, 分别占总产值的34.7%和18.5%, 实验渔船单船作业产值达3368元/h。

综上所述, 弓子网捕捞效率高, 生产效益好。

3.2 渔具选择性分析

弓子网渔获效率高, 渔获种类多, 调查共获得59种渔获物, 多为底层鱼、虾、蟹、贝和软体动物等, 其对捕捞对象种间选择性差。弓子网生产网($m=25$ mm)渔获物中幼鱼比例较高, 口虾蛄和鹰爪虾幼体比例分别为81.58%和56.83%, 而鲷鱼基本全为幼鱼, 且主要经济渔获物中口虾蛄、鲷和日本鲷等逃逸率非常低, 说明25 mm网目尺寸弓子网对莱州湾底层幼鱼资源造成较大的压力。Logistic选择性曲线结果显示, 网目尺寸为45 mm时, 鹰爪虾的 $L_{0.5}$ 为55.7 mm, 达到相关资料所述的初次性成熟体长标准(农业部水产局, 1990), 如以鹰爪虾等小型虾类为目标种类,

45 mm 网囊网目尺寸可满足要求。而针对弓子网主要经济渔获物口虾蛄,网目尺寸为 55 mm 时,其 $L_{0.5}$ 为 97.7 mm,参照口虾蛄 110 mm 可捕标准,55 mm 网囊网目尺寸捕捞口虾蛄依然偏小,根据选择性实验结果拟合曲线,捕捞口虾蛄最适网目尺寸为 66 mm。

3.3 渔具管理

目前,弓子网生产网网目尺寸为23~26 mm(张海鹏等,2018),网目尺寸偏小、选择性较差,因此,迫切需要改善该类网具选择性,提高幼鱼释放效果,保护近海渔业资源。根据《农业农村部关于实施海洋捕捞准用渔具和过渡渔具最小网目尺寸》的公告,弓子网在渤海属于过渡渔具,参照虾拖网将其最小网目尺寸暂定为25 mm。然而,本研究结果显示,25 mm网目尺寸弓子网选择性较差,仅对日本鼓虾和六丝钝尾虾虎鱼具有较好的释放效果,其他主要渔获物鲷、口虾蛄、日本蛸和鹰爪虾等逃逸率非常低,均低于10%。依据实验结果,如果将 $L_{0.5}$ 作为开捕体长,45 mm网囊网目尺寸可满足释放大部分渔获物幼鱼(虾)的要求,其逃逸率均超过30%,然而鲷和口虾蛄等渔获物依然未达到可捕标准,其逃逸率为20%~30%。根据本文选择性研究结果,综合考虑渔获物质量、尾数逃逸率以及产值损失率,兼顾生产效益和渔业资源保护,建议将渤海区弓子网网目尺寸放大至45 mm,此时,渔获物质量、尾数逃逸率和产值损失率分别为20.41%、41.34%和17.58%。同时,鹰爪虾和日本鼓虾等渔获物均达到可捕尺寸。

参照《渤海生物资源养护规定》,渤海禁止使用底拖网、浮拖网及变水层拖网作业,但网口网衣拉直周长小于 30 m 的桁杆、框架型拖网类渔具除外。本研究结果显示,弓子网渔获物为底层鱼、虾、蟹和贝类等,参考杨尧尧等(2016)对莱州湾底拖网调查,弓子网主要渔获物(除贝类外)与底拖网渔获物相似,在捕获口虾蛄和鹰爪虾的同时,捕获大量短吻红舌鲷、鲷、短蛸、日本蛸、六丝钝尾虾虎鱼等,这与农业农村部相关公告中(农业部通告[2013] 1 号)弓子网目标渔获为虾类相悖。此外,弓子网在作业过程中利用铁链替代沉子,拖曳过程中会破坏海底甚至在海底犁出深沟,严重破坏海底生境(孙中之等,2011;张海鹏等,2018)。从保护海底生态环境及底栖渔业生物资源角度出发,建议渤海区弓子网参照底拖网管理,禁止使用弓子网作业。

综上所述,本研究针对弓子网渔具过渡期后的管理,形成如下建议:(1)从渔民经济效益出发,建议将弓子网过渡期后转为准用渔具,但网囊最小网目尺寸

应放大至 45 mm;(2)从保护近海渔业资源角度出发,建议将弓子网参照底拖网管理,弓子网过渡期后执行 54 mm 最小网目尺寸标准,渤海区禁止弓子网作业。

参 考 文 献

- Armstrong DW, Ferro RST, MacLennan DN, *et al.* Gear selectivity and the conservation of fish. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37(sA): 261-262
- Catchpole TL, Revill AS. Gear technology in *Nephrops* trawl fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2008, 18(1): 17-31
- Department of Fisheries, Ministry of Agriculture. Fishery resources investigation and regionalization in Bohai Sea and Yellow Sea. Beijing: China Ocean Press, 1990, 121-123 [农业部水产局. 黄渤海区渔业资源调查与区划. 北京: 海洋出版社, 1990, 121-123]
- Huang LY, Chen Y, Gao HL, *et al.* Study on selectivity of square mesh escape window of Tanzi net. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(9): 15-23 [黄六一, 陈燕, 高慧良, 等. 坛子网方形网目逃逸窗选择性研究. 中国海洋大学学报, 2018, 48(9): 15-23]
- Huang LY, Gao HL, Tang YL, *et al.* A study on the selectivity of codend mesh size of Tanzi net in Haizhou Bay. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(11): 143-150 [黄六一, 高慧良, 唐衍力, 等. 海州湾坛子网网囊网目尺寸选择性研究. 中国海洋大学学报, 2016, 46(11): 143-150]
- Huang XC. Marine fishing manual. Beijing: China Agriculture Press, 1990 [黄锡昌. 海洋捕捞手册. 北京: 中国农业出版社, 1990]
- Li F, Lü ZB, Wei ZH, *et al.* Seasonal changes in the community structure of the demersal fishery in Laizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 137-147 [李凡, 吕振波, 魏振华, 等. 2010 年莱州湾底层渔业生物群落结构及季节变化. 中国水产科学, 2013, 20(1): 137-147]
- Li XS, Xu CC, Sun ZZ, *et al.* Fishing gears and methods in the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: China Ocean Press, 2017, 184-205 [李显森, 许传才, 孙中之, 等. 黄渤海区渔具渔法. 北京: 海洋出版社, 2017, 184-205]
- MacLennan DN. Fishing gear selectivity. *Fisheries Research*, 1992, 13(3): 201-204
- Madsen N. Selectivity of fishing gears used in the Baltic Sea cod fishery. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2007, 17(4): 517-544
- Sun MC. Selectivity of fishing gear and fishing method. Beijing: China Agriculture Press, 2004, 53-70 [孙满昌. 渔具渔法选择性. 北京: 中国农业出版社, 2004, 53-70]
- Sun ZZ, Zhou J, Xu YP, *et al.* Analysis on fishing gear and fishing method of bow beam trawl. *Journal of Modern Fisheries Information*, 2011, 26(7): 10-12 [孙中之, 周军, 许玉甫, 等. 弓子网渔具渔法的分析研究. 现代渔业信息, 2011, 26(7): 10-12]
- Tang YL, Cheng WZ, Sun P, *et al.* Analysis of value per unite effort of three artificial reefs of Shandong coast. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(3): 43-50 [唐衍力, 程文志, 孙鹏, 等. 山东近岸 3 处人工鱼礁区 VPUE 的分析研究. 中国海洋大学学报, 2017, 47(3): 43-50]
- Whitmarsh D, Santos MN, Ramos J, *et al.* Marine habitat

- modification through artificial reefs off the Algarve (Southern Portugal): An economic analysis of the fisheries and the prospects for management. *Ocean and Coastal Management*, 2008, 51(6): 463–468
- Xing BB, Qi YK, Ma DY, *et al.* Study on cod-end mesh selectivity of beam shrimp trawl in Panjin sea area. *Fishery Modernization*, 2015, 42(1): 57–60, 15 [邢彬彬, 齐雨琨, 马丁一, 等. 盘锦海域桁杆虾拖网网囊网目选择性研究. *渔业现代化*, 2015, 42(1): 57–60, 15]
- Yang BZ, Yang L, Tan YG, *et al.* Size selectivity of codend mesh size of shrimp beam trawl for *Metapenaeus* in South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(2): 1–11 [杨炳忠, 杨吝, 谭永光, 等. 南海区虾拖网网囊对刀额新对虾的选择性研究. *南方水产科学*, 2019, 15(2): 1–11]
- Yang BZ, Yang L, Tan YG, *et al.* Size selectivity of combined square mesh and diamond mesh codends of shrimp beam trawl in South China Sea. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(1): 105–113 [杨炳忠, 杨吝, 谭永光, 等. 南海区桁杆虾拖网方目与菱目混合网囊网目选择性研究. *南方水产科学*, 2018, 14(1): 105–113]
- Yang YY, Li ZY, Wu Q, *et al.* Interannual variations in community structure and species diversity of fishery resources in the Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 22–29 [杨尧尧, 李忠义, 吴强, 等. 莱州湾渔业资源群落结构和多样性的年际变化. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 22–29]
- Zhang HP, Li YQ, Xu YF, *et al.* Survey of fishing situation of beam trawls in Hebei Province. *Hebei Fisheries*, 2018(4): 29–32 [张海鹏, 李怡群, 许玉甫, 等. 河北省框架拖网和桁杆拖网捕捞现状调查. *河北渔业*, 2018(4): 29–32]
- Zhang J, Jiang R, Fang YH, *et al.* Study on the fish size selectivity of codends of canvas stow net in the East China Sea. *Marine Fisheries*, 2017, 39(3): 340–350 [张健, 蒋瑞, 方远浩, 等. 东海张纲张网网囊网目选择性研究. *海洋渔业*, 2017, 39(3): 340–350]
- Zhang X, Zhang XM, Gao TX. Comparative analysis on catch composition with two fishing gears at Yellow River estuary in spring. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(1): 59–67 [张旭, 张秀梅, 高天翔. 春季黄河口海域 2 种网渔具渔获物组成的比较分析. *南方水产*, 2010, 6(1): 59–67]
- Zhang X, Zhang XM, Gao TX, *et al.* Composition of catches by beam trawl and its seasonal variations in Yellow River estuary. *Progress in Fishery Science*, 2009, 30(6): 118–124 [张旭, 张秀梅, 高天翔, 等. 黄河口海域弓子网渔获组成及其季节变化. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 118–124]

(编辑 马瑾艳)

Selectivity of Codend Mesh of Beam Trawl in Laizhou Bay in Autumn

XU Qingchang, LI Xiansen^①, SUN Shan, FAN Gangzhou

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

Abstract The beam trawl is a common fishing gear in the Bohai Sea area and is associated with significant by-catch rates because of its poor selectivity. To improve the selectivity of codend mesh, the authors conducted selective experiments on the codend mesh of beam trawls in the Laizhou Bay during September 2017. A cover net method was used and five kinds of codends (mesh sizes of 15, 25, 35, 45, and 55 mm) were studied. Results show that beam trawls had a poor selectivity for catch species, capturing most of the benefic species in the operating area. Escape rates of the catch in weight, number, and value increased with codend mesh size. The 50% selectivity body length ($L_{0.5}$) and selection range of *Cynoglossus joyneri*, *Oratosquilla oratoria*, *Trachypenaeus curvirostris*, and *Alpheus japonicas* linearly with mesh size. The $L_{0.5}$ of *O. oratoria* and *T. curvirostris* appeared to exhibit a linear relationship with codend mesh size (m). Linear regression equations of $L_{0.5}=1.472m+12.63$ ($R^2=0.934$) and $L_{0.5}=1.394m+0.724$ ($R^2=0.920$), were derived for the respective species. To protect economically valuable species such as *O. oratoria*, *T. curvirostris*, the authors suggest enlarging the minimum mesh size for beam trawls to 45 mm, which would maintain production efficiency and protect juvenile fish resources.

Key words Beam trawl; Laizhou Bay; Escape ratio; Selectivity; Codend mesh size

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190926002

http://www.yykxjz.cn/

朱亚华, 姜涛, 陈修报, 刘洪波, 杨健. 草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 28–36
Zhu YH, Jiang T, Chen XB, Liu HB, Yang J. The marking characteristics of otoliths of larval grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by immersion in alizarin complexone. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 28–36

草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究*



朱亚华¹ 姜涛² 陈修报² 刘洪波² 杨健^{1,2①}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院长江中下游渔业生态环境评价与资源养护重点实验室 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081)

摘要 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国主要增殖放流经济鱼种之一,探索有效的标志方法对其增殖放流的技术保障和效果评价无疑至关重要。本研究对草鱼仔鱼耳石进行了 1 d 茜素络合物(ALC)荧光标记,以确认该方法的可行性及适宜条件。结果显示,微耳石、矢耳石和星耳石均能被标记。标记环在可见光及荧光下均能被观察到。其中,后者使用蓝色激发光(WBS)观察效果最佳。总体上,微耳石的标记效果最好,矢耳石次之。ALC 浸泡对鱼体的生存及生长无显著影响,耳石上荧光信号出现和消失与鱼体开始浸泡和结束均存在约 12 h 的时滞。浸泡标记过的实验鱼在经过长达 60 d 的恢复续养后,标记环仍清晰可见,表明 ALC 标记效果明显且可长期存在。该方法对草鱼仔鱼的增殖放流标记具有较强的可行性。

关键词 草鱼; 仔鱼; 耳石; 茜素络合物; 荧光标记

中图分类号 Q958 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0028-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是“四大家鱼”之一,在我国淡水渔业经济中占据着举足轻重的地位。近年来,由于生境破坏、水利设施的修建、过捕等因素,其天然资源急剧下降(沈玉帮等,2011)。为达到渔民增收、资源恢复等目标,国家实施了大规模增殖放流的政策,草鱼属农业部《关于“十三五”水生生物增殖放流工作指导意见》中的主要品种。值得注意的是,一些传统标记方法受到很多限制,如切鳍法只适用于短期标志;挂牌法主要适用于大型鱼类(罗新等,2011);分子标记成本高且检测相对复杂(李树华等,2014)等。因此,探索适合草鱼(特别是鱼苗)增殖放流标记和评价方法刻不容缓。

耳石存在于大多数硬骨鱼类的内耳的膜迷路内,有矢耳石、微耳石和星耳石 3 种类型,对鱼类的听觉

和身体的平衡有重要的作用(Campana, 1999)。耳石标记常用的荧光物质包括盐酸四环素(Tetracycline hydrochloride, TCH)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、钙黄绿素(Celcein, CAL)、茜素红 S(Alizarin red S)和茜素络合物(Alizarin complexone, ALC),其中,ALC 使用最广且效果较好(宋昭彬等,1999;付自东等,2005)。此前,草鱼耳石的研究多集中在形态比较及类群判别(宋昭彬等,2003a、b;曾祥波等,2012)、年龄鉴定及与生长的关系(宋昭彬等,2001b;李建军等,2010)、孵化期推算(管兴华等,2007;张国等,2013)等方面,尚未见有相关化学标记研究。本研究利用 ALC 对草鱼仔鱼的耳石进行标记,探讨此方法对该鱼种的适用性,为今后草鱼相关的大规模标记提供理论依据和技术支撑。

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019JBFM06)和农业财政专项(CJDC-2017-22)共同资助 [This work was supported by China Central Governmental Research Institutional Basic Special Research Project from Public Welfare Fund (2019JBFM06), and Agricultural Financial Special Support Fund (CJDC-2017-22)]. 朱亚华, E-mail: 756620220@qq.com

① 通讯作者: 杨健, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2019-09-26, 收修改稿日期: 2019-11-07

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南区实验基地开展。实验所用的仔鱼苗由基地于 2019 年 5 月 19 日采购(3 日龄)。根据陈真然(1963)的划分标准,将其归为仔鱼(图 1)。鱼苗采购后,置于装有经 48 h 曝气自来水的玻璃缸(长×宽×高为 100 cm×45 cm×50 cm)中暂养。暂养过程中投喂蛋黄水,每日投喂 2 次,每日清理鱼体排泄物及换水 1 次,换水量为养殖水体的 1/4。随机选取规格基本一致[平均全长为(8.31±1.21) mm,平均体重为(0.06±0.02) g]的草鱼仔鱼,放入桶中作为供试鱼,于 2019 年 5 月 25 日开始茜素络合物(ALC)标记实验,标记期间不喂食,浸泡标记 24 h 后,移到恢复养殖缸(长×宽×高为 50 cm×50 cm×40 cm)中进行养殖,在恢复养殖期间,前期继续投喂蛋黄水,待草鱼达到 30 日龄后开始投喂粉状普通配合饲料,每日投喂 2 次,每日清理鱼体排泄物及换水 1 次,换水量占养殖水体的 1/4。在暂养及整个实验期间均正常充气增氧,水温在 23~32℃之间,自然光照,不控光周期。

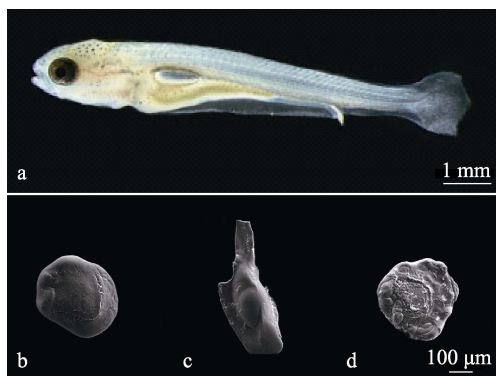


图 1 本研究所用草鱼仔鱼及其 3 类耳石

Fig.1 The larval *Ctenopharyngodon idellus* and its three types of otoliths

a: 实验鱼; b: 微耳石; c: 矢耳石; d: 星耳石
a: Experimental fish; b: Lapillus; c: Sagitta; d: Asteriscus

1.2 实验方法

本研究的茜素络合物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,包装规格为 1 g/瓶。实验分为 2 个阶段,第 1 个阶段为浸泡标记阶段。参考邱晨等(2018)的方法,使用茜素络合物对鲤(*Cyprinus carpio*)仔鱼的浸泡浓度,实验设置对照组及标记组(100 mg/L),各组随机选择 100 尾鱼进行 24 h 浸泡实验。浸泡标记期间,统计 12、24 h 对照组及标记组的个体急性死亡

情况。第 2 个阶段为恢复养殖阶段。浸泡标记结束后,将标记组实验鱼移出,放到恢复养殖缸中继续养殖。本研究样本采集分为 2 个阶段,在恢复养殖的 0~40 d 中,标记组和对照组每 5 d 定期取样,每次取样 5 尾,以设置样本重复。取至第 40 天后,每 10 d 取样 1 次,同样每次取样 5 尾,以确保样本重复,直至取样到第 60 天结束。取样之后,利用电子天平测量其体重,电子游标卡尺测量其全长(数据分别精确至 0.001 g 和 0.01 mm)。0~20 d 的样品先保存在 100%无水乙醇中,然后置于 4℃的冰箱中冷藏,25~60 d 的样品直接放入自封袋中,于-20℃冰箱中冷冻。在恢复养殖期间,统计标记组和对照组死亡数,并及时移出死鱼。

1.3 耳石样品的摘取、制备及检测方法

将样本鱼置于载玻片上,放于解剖镜下,用解剖针将耳石从听囊中快速取出。先用去离子水清洗去除耳石表面的杂质及黏液,然后用无水乙醇脱水、干燥,使用电子探针微区分析仪(JXA-8100,日本电子株式会社)对 3 类耳石形态进行扫描拍照(图 1)。参考邱晨等(2018)对鲤仔鱼荧光标记的处理措施,使用无色透明指甲油将耳石包埋固定在载玻片上(无需打磨),待指甲油凝固后,避光保存(Stöter *et al.*, 2019)。在 OLYMPUS BX51 型显微镜(日本)的可见光、蓝色激发光(WBS)和绿色激发光(WGS)下对其进行观察,比较最适光源,并利用显微镜自带的 Stream start 软件进行图谱拍照和图像处理。在进行耳石浸泡标记的时滞观察时,先将耳石打磨至露出核心,再在其表面用无色透明指甲油二次固定。使用 OLYMPUS BX51 型显微镜对耳石日轮数目进行计数。耳石标记效果参照欧阳斌等(1999)的方法按无(-)、微弱(+),较明显(++),明显(+++)和非常明显(++++) 5 个等级进行记录。

1.4 数据分析

利用 Excel 2010 对数据进行统计分析和制图。同时,利用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),对实验鱼生长差异进行显著性分析,设定差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 ALC 标记对草鱼仔鱼生存及生长的影响

在 24 h 的 ALC 浸泡过程中,实验组和对照组均未出现死亡,存活率为 100%。在浸泡过程中,标记组仔鱼的游泳能力正常,没有表现出任何异常行为,说明 100 mg/L 的 ALC 标记对草仔鱼产生的影响较小或者未产生影响。浸泡标记 24 h 后,移到恢复养殖

缸中继续养殖。在恢复养殖的 0~60 d 内, 统计标记组和对照组的死亡数, 截止第 60 天取样, 标记组死亡 2 尾, 对照组死亡 9 尾, 样本数统计不包括死亡数。

随着恢复养殖天数的增加, 鱼体发生明显变化, 各个器官逐渐发育完全, 接近成鱼。观察发现, 标记组和对照组在鱼体发育的成熟度上没有明显差异, 其摄食和游泳能力均正常。对样本的平均体重及平均全长计算可以看出(图 2), 草鱼仔鱼的体重及全长随恢复养殖天数增加而逐渐增加。同时, 0~10、20~40 d 标记组与对照组的平均体重存在显著差异($P<0.05$), 15、50、60 d 标记组样本鱼的平均体重与对照组差异不显著($P>0.05$)。5~10、20~35 d 标记组与对照组的平均全长差异显著($P<0.05$), 0、15、40~60 d 标记组样本鱼的平均全长与对照组差异不显著($P>0.05$)。综合来看, 标记组和对照组的平均体重及平均全长的差异性呈无规律性。

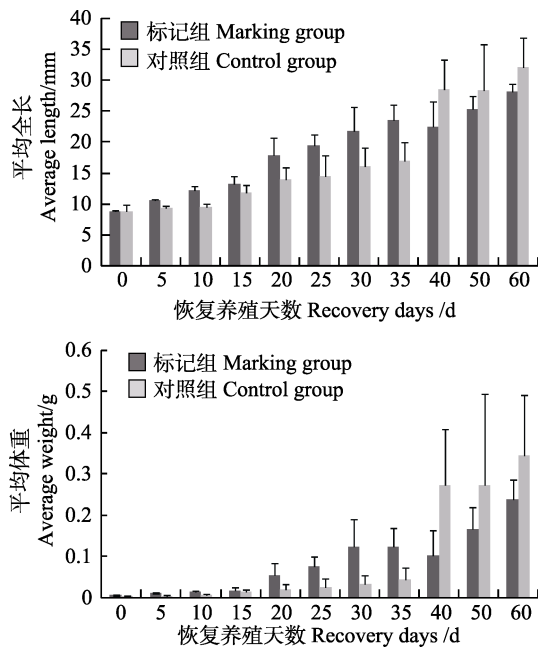


图 2 不同取样天数标记组和对照组

草鱼仔鱼的平均体重和平均全长变化($n=5$)

Fig.2 Changes of average body weight and average total length of larval *Ctenopharyngodon idellus* of the marking group and control group at different sampling day ($n=5$)

2.2 茜素络合物浸泡标记草鱼仔鱼耳石效果检测

2.2.1 草鱼仔鱼 3 类耳石的 ALC 浸泡标记效果

在荧光显微镜的可见光及 2 种激发光源下观察草鱼仔鱼矢耳石、微耳石和星耳石的标记效果, 发现草鱼仔鱼微耳石的标记效果最好, 矢耳石次之(图 3)。微耳石的形状为椭圆形, 经过 ALC 浸泡标记过的耳石在其上面形成了一个明显的橘红色标记环, 且微耳石的

日轮轮纹清晰, 在显微镜的可见光下, 能清楚地计数日轮数目。同样, 矢耳石的标记环也清晰可见, 形状为箭矢形, 具有中间厚两端薄的特点, 随着生长天数的增加, 观察到的标记环逐渐模糊。在本实验中, 星耳石的荧光标记结果有 2 种, 一种是耳石的标记部分表现为一个小点或一个小环, 另一种是观察不到任何标记现象。因此, 草仔鱼微耳石的荧光标记效果最佳, 是观察草鱼仔鱼标记效果的理想选择。以下内容以微耳石为依据进行比较。

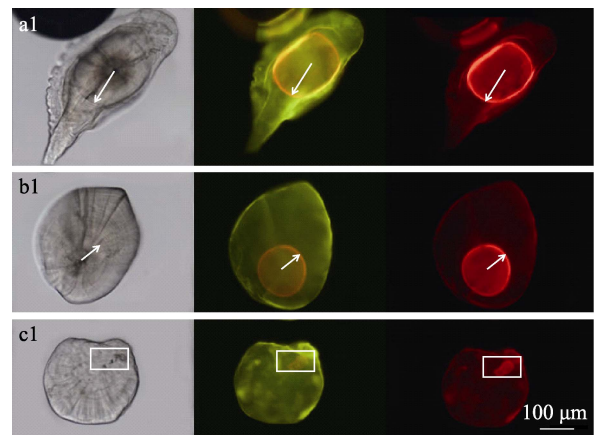


图 3 恢复养殖第 20 天时草鱼仔鱼矢耳石、微耳石和星耳石分别在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下的标记效果
Fig.3 The marking effect of sagitta, lapillus and asteriscus of larval *Ctenopharyngodon idellus* under visible, blue excitation and green excitation lights at the 20th day of recovery culture after ALC immersion

a1: 矢耳石; b1: 微耳石; c1: 星耳石

图中白色箭头由矢耳石、微耳石核心指向荧光标记轮边缘,

白色指示框内为星耳石荧光标记环

a1: Sagitta; b1: Lapillus; c1: Asteriscus

The white arrow points from the core of sagitta and lapillus to the edge of the fluorescent marker wheel, and the white indicator box is the fluorescent marker ring of asteriscus

2.2.2 微耳石经 ALC 浸泡标记后在 3 种光源下的信号检测效果

在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下, 对微耳石进行拍照观察, 发现标记强度明显不同(表 1)。所有微耳石在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下, 均能看到 1 个明显的标记环, 但三者对标记产生的颜色反应不同(图 3)。在可见光下, ALC 浸泡过后在耳石上看到一个深红色的标记环, 但随着恢复养殖天数的增加, 深红色标记环的颜色逐渐变淡, 甚至完全观察不到。在蓝色激发光下, 微耳石上形成一个橘红色的标记环, 与没有标记的绿色部分形成强烈反差, 颜色鲜艳, 容易观察。在绿色激发光下, ALC 浸泡过后, 耳石上形成一个深红色的标记环, 没有被标记部分呈淡橘红色, 二者颜色相近, 容易造成混淆,

且标记环与未标记部分界线不容易区分,对于识别准确的标记日轮产生一定的干扰。因此,对于草鱼仔鱼荧光标记来说,蓝色激发光为较理想的观察光源。

2.2.3 不同恢复养殖天数草鱼仔鱼微耳石在蓝色激发光下的 ALC 标记检测效果 观察不同恢复养殖

天数下的微耳石(图 4)可以看到,荧光标记信号强度呈先增强后减弱的趋势。在第 0 天取样时,即浸泡完成当天取样,就能在耳石上观察到一个明显的标记环,且标记环清晰,说明 ALC 在浸泡当日就在耳石上积累形成了标记。第 5 天时,已能看到耳石标记环

表 1 草鱼仔鱼微耳石在 3 种不同光源下的检测效果

Tab.1 Detection effect of lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* under three different light sources

标记日龄 Age of marking(d)	标记时间 Marking duration(h)	恢复天数 Days of recovery culture(d)	取样日龄 Age of samples(d)	标记强度 Marking intensity		
				可见光 Visible light	蓝色激发光 Blue excitation light	绿色激发光 Green excitation light
9	24	0	10	+	++	++
9	24	5	15	++	+++	++
9	24	10	20	++	++++	+++
9	24	15	25	++	++++	+++
9	24	20	30	++	++++	+++
9	24	25	35	++	++++	+++
9	24	30	40	++	++++	+++
9	24	35	45	++	++++	+++
9	24	40	50	+	++++	+++
9	24	50	60	+	+++	++
9	24	60	70	+	+++	++

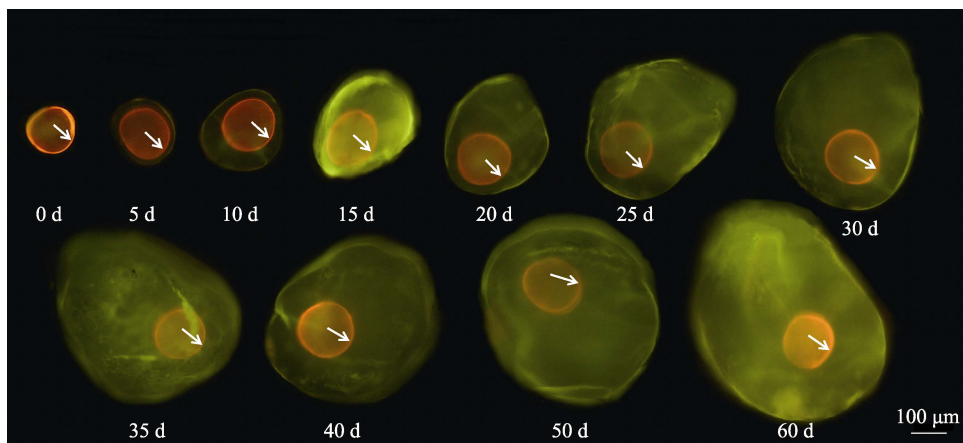


图 4 不同恢复养殖天数下草鱼仔鱼微耳石在蓝色激发光下 ALC 标记效果比较

Fig.4 Comparison of ALC marking effect on lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* at different day of recovery culture

白色箭头由耳石核心指向荧光标记轮边缘

The white arrow points from the core of otolith to the edge of the fluorescent marker circle

外面的新区域,与标记环里的区域形成强烈反差,标记环观察更为清晰。第 10~40 天的耳石标记环强度基本没有发生变化,荧光信号强度稳定,为最佳观察时间段。但从第 50 天和第 60 天的耳石标记强度来看,荧光信号强度有下降趋势,标记环略模糊,但仍然具有很强的可见性。

2.3 草鱼仔鱼经 ALC 浸泡后耳石标记出现和消失的时滞

以浸泡标记第 5 天的微耳石为例(图 5),在显微镜下,3 种可见光下的耳石相同位置上能观察到颜色不同的标记环。在可见光下对耳石的部分进行放大,观察日轮并计算耳石荧光信号标记出现和消失的时

滞。由于草鱼仔鱼的日龄为生长轮数目加 1(宋昭彬等, 2001), 因此, 具有第一日轮的草鱼为 2 日龄, 完整的日轮由明带和暗带共同组成。草鱼仔鱼浸泡当日为 9 日龄, 开始浸泡标记时间为 17:00, 此时, 第 8 日轮的明带已经形成, 暗带开始形成; 而浸泡结束时草鱼仔鱼为 10 日龄, 此时, 第 9 日轮的明带已经形成, 暗带尚未形成。从耳石的荧光标记环来看, 耳石的荧光标记信号在第 9 日轮的明带和暗带上, 在第 9 日轮

前后都无荧光信号出现。即在浸泡当晚, 耳石第 8 日轮暗带形成的过程中, 荧光物质并没有随着碳酸钙进入耳石, 即为浸泡开始与标记出现的时滞, 约 12 h。当浸泡完成后, 第 9 日轮的暗带开始形成, 此时, 仔鱼已经不处于荧光物质溶液中, 其上面存在的荧光标记信号即为浸泡结束与标记消失的时滞, 约 12 h。因此, 荧光标记环的产生和消失与浸泡的开始和结束均存在约 12 h 的时滞。

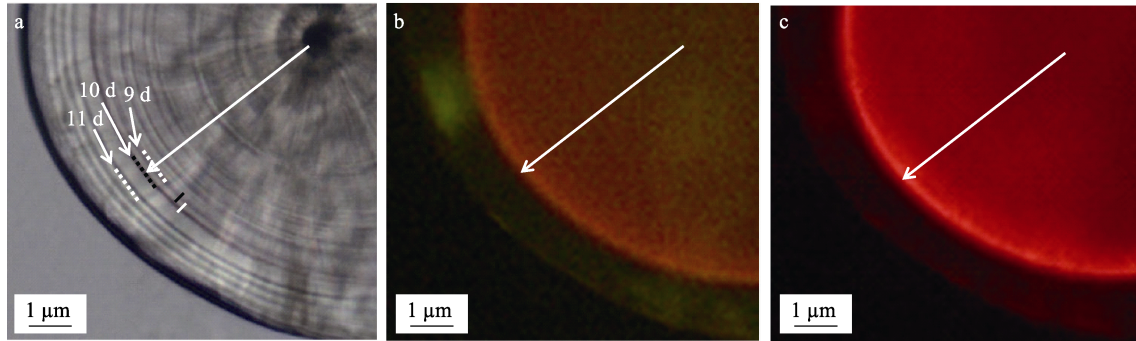


图 5 恢复养殖第 5 天时草鱼仔鱼微耳石标记环出现和消失时滞推算

Fig.5 The time lag for the appearance and disappearance of ALC marker ring in the lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* at the 5 d recovery culture

a、b、c 为恢复养殖 5 d 时微耳石分别在可见光、蓝色激发光、绿色激发光下标记效果图, a 图中白色箭头由耳石核心指向荧光标记轮边缘; 黑色实线代表浸泡时生长的日轮, 白色实线代表具有荧光标记信号的日轮; 9 d、10 d、11 d 分别表示第 9、10、11 日龄

a, b and c are the mark rings in lapillus under visible light, blue excitation light and green excitation light respectively when the fish had cultured for 5 d after ALC immersion. In the figure a, the white arrow points from the core of otolith to the edge of the fluorescent marker circle. The solid black lines represent the rings that grew during immersion, and the solid white lines represent the rings that had a fluorescent signature; 9 d, 10 d and 11 d represent the 9th, 10th and 11th day of age respectively

3 讨论

3.1 草鱼仔鱼 3 对耳石标记差异性特征

曾祥波等(2012)研究发现, 草鱼的矢耳石和微耳石在鱼体孵化时便已存在, 而鱼体的星耳石则在第 12 天出现, 相对较晚, 此现象在各种不同种类鱼体存在(付自东等, 2005; 赵亚鹏等, 2013)。由于 3 对耳石在生长阶段变化的差异性, 先前的研究对象主要集中在微耳石和矢耳石上(宋昭彬等, 2003a、b; 徐永江等, 2016; 付自东等, 2005), 星耳石的研究较少。草鱼仔鱼的矢耳石在刚孵化的时候为圆形, 随着日龄的增加, 逐渐向两端生长, 变成两端薄中间厚的箭矢形; 微耳石最初的形状为圆形, 此外, 还观察到部分微耳石的 2 个核心紧紧相邻, 其日轮清晰, 便于观察, 随着日龄的增加, 耳石逐渐生长为椭圆形。在本研究中, 浸泡当日仔鱼为 9 日龄, 浸泡 24 h 之后为 10 日龄, 故仔鱼的星耳石尚未发育出来, 在观察中看不到荧光物质留下的标记环, 但部分个体的星耳石上又能观察

到一个微弱的橘红色标记环, 说明在浸泡当日有部分个体已经发育出了星耳石, 发育之后星耳石为一豆形, 其核心十分模糊, 不具有一个明显的原基, 但随着日龄的增加, 星耳石逐渐发育完全, 形状逐渐规则, 向圆形过渡, 轮纹清晰。本研究中所有样本鱼理论上处于同一发育日龄, 由于鱼体新陈代谢的差异, 不能完全保证所有鱼体具有完全一致的胚胎孵化周期(Stöter *et al*, 2019), 因此, 不同的鱼苗日龄之间存在偏差, 故能在极个别的样本鱼的星耳石上看到微弱的标记环。还有一种可能是星耳石的发育存在个体差异, 受外界环境的影响, 比如水温、营养、压力等, 部分个体加快了其形成时间。

ALC 标记环能够长期存在于耳石上, 但随着时间的增加, 标记环会逐渐模糊(王正鲲鹏等, 2015), 特别是在可见光下看到的深红色标记环(邱晨等, 2019)。何春林等(2008)在对重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)进行 ALC 标记时, 在可见光下观察到的标记环也较微弱。在本研究 50 d 和 60 d 的样本中, 在可见光下

几乎看不到此标记环,而在蓝色激发光和绿色激发光下依然能够清晰地看到,但没有前期的标记环清晰。这可能是由于恢复养殖时间过长,新的日轮在不断形成,耳石在不断变大,厚度增加而减弱了荧光的穿透性(Iglesias *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 2013)。另外,进行浸泡标记时,鱼体年龄很小,标记日轮靠近中心,之前经过标记的日轮与后面长出来的新的日轮形成对比,长出的区域越多,显得标记环越小,也增加了标记检测的难度。司飞等(2019)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)进行镉标记时发现,随着标记部分所占比重的减少,某种程度可能会影响耳石上镉标记的检出效果。

3.2 草鱼仔鱼耳石 ALC 标记环出现和消失的时滞特征

ALC 对多种鱼类均有较好的标记效果(Vigliola, 1997; Skov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; 赵亚鹏等, 2013; Lü *et al.*, 2014)。但关于浸泡开始和结束与荧光标记信号的产生和消失是否存在时间差的研究却很缺乏。邱晨等(2018)通过对鲤仔鱼的观察发现,其荧光标记信号的产生和消失与浸泡开始和结束的时间均有 1 d 的时滞。在本研究中,荧光标记环的产生和消失与浸泡的开始和结束均存在约 12 h 的时滞。这可能与不同种类的鱼具有不同的代谢速率有关。荧光标记在鱼类耳石中沉积的原理是鱼的新陈代谢促使荧光物质随着碳酸钙进入耳石,参加下一轮的碳酸钙沉积,随着时间的增加,带有荧光物质的碳酸钙积累越来越多,逐渐形成一个荧光标记环(徐永江等, 2016)。鱼苗的日龄越低,其新陈代谢速率越快,仔鱼的代谢速率要高于稚鱼和成鱼。本研究浸泡当日的鱼苗为 9 日龄,正处于代谢旺盛的时期,对荧光物质具有较好的吸收,荧光物质随着碳酸钙一起沉积在耳石上,形成了肉眼可见的标记环。在进行时滞观察时,由于日轮中还存在部分亚日轮,会影响日轮的正确计数,在进行时滞观察前,需要先将耳石进行打磨,直至暴露出核心为止。姜涛等(2016)在对刀鲚(*Coilia nasus*)耳石几种前处理方法所得年轮的观察中发现,横截面法比矢状面法更有优势。在本研究中,打磨后的耳石矢状面已经能直接清晰地看到日轮,并且无需酸蚀。打磨之后进行抛光,再用无色透明指甲油进行二次包埋,增加耳石的透光性,即可得到较为准确的日轮数目。

3.3 草鱼仔鱼耳石 ALC 标记实验条件的特征

对于本研究中的草鱼仔鱼来说,在 100 mg/L 的

ALC 溶液中浸泡标记 24 h,经无色透明指甲油包埋的耳石(无需打磨)可以明显观察到荧光标记,能取得理想的效果。对比可见光 and 不同荧光下不同耳石的标记效果,发现微耳石是检测荧光标记最适宜的耳石类型,且在蓝色荧光下观察效果最佳。邱晨等(2018)对鲤仔鱼的浸泡时间选为 48 h,在本研究中对浸泡时长进行了优化,选择 24 h 作为草鱼仔鱼的浸泡时长,以期能在较短时间下获得理想的荧光标记效果,减少荧光物质浸泡对鱼苗的伤害,节约成本。同时,在经过长达 60 d 的恢复养殖后,仍能取得不错的荧光标记效果。荧光标记一般用来标记仔鱼(Yang *et al.*, 2016),考虑到鱼体生理胁迫的耐受力及鱼体发育的差异性,不同种类、不同规格鱼体的最佳浸泡浓度和浸泡时间也不一样,而浸泡浓度的多少和浸泡时间的长短对标记效果有着决定性的作用(王正鲲鹏等, 2015; 何春林等, 2008; 赵亚鹏等, 2013)。本研究中,由于草鱼仔鱼刚孵化时,星耳石尚未发育(曾祥波等, 2012),即使发育之后星耳石的核心也十分模糊。标记初期如果正好在星耳石产生之时,则标记环相对模糊,但邱晨等(2018)研究表明,星耳石是鲤仔鱼荧光标记的最佳选择,从极个别草鱼仔鱼已经发育出来的星耳石上的标记环也可以看出,一旦星耳石发育形成,ALC 标记同样对星耳石具有很好的适用性,能够在其上形成标记环。如果使用星耳石来观察荧光标记,研究星耳石从何时开始生长且到何时开始长出清晰且有规律的生长是重要环节。在进行荧光标记实验的过程中,不仅仅是区分到仔稚鱼,根据耳石形成的特点具体到某日龄的鱼进行标记能够得到更好的效果。因此,在下一步工作中,作者将进行不同日龄的草鱼在不同浓度茜素络合物和不同浸泡时间下的比较研究,以便确定最适的浸泡规格、浸泡时间及浸泡浓度,同时,标记之后将进行更长期的养殖观察以确定其持久性。

4 结论

本研究首次通过 100 mg/L 的茜素络合物对草鱼仔鱼进行 1 d 浸泡实验,获得了理想的标记结果。在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下,在 3 种耳石上均能观察到明显的标记环,其中,微耳石的标记效果最好,矢耳石次之;蓝色激发光的检测效果最佳,绿色激发光次之;在可见光下,耳石日轮数目的观察清晰度最高。鱼体浸泡开始和结束的时间与荧光标记环出现和消失的时间均存在约 12 h 的时间差,同时,在长达 60 d 恢复养殖的情况下,仍然能在耳石上检测到明显的标记环。相关结果能够对今后草鱼仔鱼的

增殖放流工作效果的有效评估提供理论参考、技术支持以及条件优化的思路。

参 考 文 献

- Campana SE. Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 188(1): 263–297
- Chen ZR. Morphological and ecological characteristics of the development of larval and juvenile grass carp. *Chinese Journal of Zoology*, 1963(1): 23–29 [陈真然. 草鱼(鲢)仔、稚鱼期发育的形态生态特征. *动物学杂志*, 1963(1): 23–29]
- Fu ZD, Li J, Yue BS, *et al.* Otolith marking of larval and juvenile Chinese sucker with fluorescent substances. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(4): 60–65 [付自东, 李静, 岳碧松, 等. 用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石. *动物学杂志*, 2005, 40(4): 60–65]
- Guan XH, Cao WX. Study on the hatch date and growth of juvenile grass carp from middle reaches of the Yangtze River using daily increment technology. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 18–23 [管兴华, 曹文宣. 利用耳石日轮技术研究长江中游草鱼幼鱼的孵化期及生长. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 18–23]
- He CL, Fu ZD, Yan TM, *et al.* Otolith marking of Larval *Schizothorax davidi* with fluorescent substances. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(3): 331–334 [何春林, 付自东, 严太明, 等. 用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石. *四川动物*, 2008, 27(3): 331–334]
- Iglesias J, Rodríguez-Ojea G. The use of alizarin complexone for immersion marking of the otoliths of embryos and larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Dosage and treatment time. *Fisheries Management and Ecology*, 1997, 4(5): 405–417
- Jiang T, Liu HB, Lu MJ, *et al.* The comparison of different pre-treatment methods for acquiring otolith annuli of *Coilia nasus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 62–67 [姜涛, 刘洪波, 卢明杰, 等. 几种前处理方法所获刀鲚 (*Coilia nasus*)耳石年轮的效果比较. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 62–67]
- Li JJ, Wu ZQ, Hu ML. Study on otolith and growth in juvenile of the four domestic fishes from Hukou section of the Yangtze River. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(6): 56–61 [李建军, 吴志强, 胡茂林. 长江湖口水域四大家鱼幼鱼的耳石与生长研究. *水生态学杂志*, 2010, 3(6): 56–61]
- Li SH, Chen DQ, Duan XB, *et al.* Genetic effects of released mature *Ctenopharyngodon idellus* on natural populations based on the mitochondrial DNA markers in the middle reaches of the Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3): 45–50 [李树华, 陈大庆, 段辛斌, 等. 基于线粒体 DNA 标记的长江中游草鱼亲本增殖放流的遗传效果评估. *淡水渔业*, 2014, 44(3): 45–50]
- Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, *et al.* The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.). *Fisheries Research*, 2009, 98(1): 67–74
- Lü HJ, Zhang XM, FM, *et al.* Use of tetracycline hydrochloride and alizarin complexone for immersion marking black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(4): 810–820
- Luo X, Zhang QZ, Cui M. Tagging techniques applied to *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(6): 135–140 [罗新, 张其中, 崔森. 草鱼标志技术的初步研究. *水生态学杂志*, 2011, 32(6): 135–140]
- Noda T, Nagakura Y, Ohta K, *et al.* Validation of transgenerational otolith marking using alizarin complexone for embryos in black rockfish *Sebastes schlegelii* ovaries. *Aquaculture*, 2013, 61(2): 207–209
- Ouyang B, Chang JB. Using fluorescent substance to mark larvae and juvenile of *Gobiocypris rarus* and *Carassius auratus pengze* Var. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(4): 324–329 [欧阳斌, 常剑波. 荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼. *水生生物学报*, 1999, 23(4): 324–329]
- Qiu C, Jiang T, Chen XB, *et al.* Effect of alizarin complexone marking for otolith of juvenile crucian carp *Carassius auratus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2019, 54(5): 678–686 [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 鲫幼鱼耳石荧光标记效果. *动物学杂志*, 2019, 54(5): 678–686]
- Qiu C, Jiang T, Chen XB, *et al.* Study on otolith marking of larval common carp *Cyprinus carpio* by immersion in alizarin complexone. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1754–1765 [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 茜素络合物对鲤仔鱼耳石标记特征研究. *水产学报*, 2018, 42(11): 1754–1765]
- Shen YB, Zhang JB, Li JL. Advances in studies on genetic resources of grass carp. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(7): 369–373 [沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 369–373]
- Si F, Wang QL, Yu QH, *et al.* Use of strontium chloride in otolith marking of Japanese flounder. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 65–72 [司飞, 王青林, 于清海, 等. 基于投喂法的牙鲆耳石锶标记. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 65–72]
- Skov C, Grnkjr P, Nielsen C. Marking pike fry otoliths with alizarin complexone and strontium: An evaluation of methods. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59(3): 745–750
- Song ZB, Cao WX. Dimensions of otolith primordia and nuclei in larval grass carp and silver carp. *Journal of Sichuan University (Natural Science)*, 2003a, 40(4): 774–777 [宋昭彬, 曹文宣. 草鱼和鲢仔鱼耳石原基和中心核特征的研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 2003a, 40(4): 774–777]
- Song ZB, Cao WX. Otolith marking and daily increment

- validating in larval and juvenile yellowcheek carp, *Elopichthys bambusa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 677–682 [宋昭彬, 曹文宣. 鳊鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 677–682]
- Song ZB, Cao WX. Study on the growth of juvenile grass carps in Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2001a, 31(5): 45–48 [宋昭彬, 曹文宣. 长江草鱼幼鱼的生长研究. *淡水渔业*, 2001a, 31(5): 45–48]
- Song ZB, Chang JB, Cao WX, *et al.* Otolith microstructure of hatchery-reared and wild juveniles of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003b, 27(1): 7–12 [宋昭彬, 常剑波, 曹文宣, 等. 人工饲养和野生草鱼幼鱼耳石微结构的比较研究. *水生生物学报*, 2003b, 27(1): 7–12]
- Song ZB, Chang JB, Cao WX. Daily age and growth of larval grass carp from the middle reaches of the Yangtze River. *Journal of Fisheries of China*, 2001b, 25(6): 500–506 [宋昭彬, 常剑波, 曹文宣. 长江中游草鱼仔鱼的日龄和生长研究. *水产学报*, 2001b, 25(6): 500–506]
- Stöter S, Degen-Smyrek AK, Krumme U, *et al.* Marking otoliths of Baltic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) with tetracycline and strontium chloride. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, 35(2): 427–435
- Vigliola L. Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean Sea. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51(2): 349–360
- Wang ZK, Zhao T, Lin XT, *et al.* Effects of alizarin complexone (ALC) on otolith marking, growth, and survival of *Tanichthys albonubes*. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(1): 189–194 [王正鲲, 赵天, 林小涛, 等. 茜素络合物对唐鱼耳石标记效果以及生长和存活率的影响. *生态学杂志*, 2015, 34(1): 189–194]
- Xu YJ, Liu XZ, Shi B, *et al.* Alizarin complexone marking of otoliths of juvenile *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 11–18 [徐永江, 柳学周, 史宝, 等. 茜素络合物对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 苗种耳石的染色标记效果. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 11–18]
- Yang K, Zeng RK, Gan WX, *et al.* Otolith fluorescent and thermal marking of elongate loach (*Leptobotia elongata*) at early life stages. *Environmental Biology of Fishes*, 2016, 99(8–9): 687–695
- Zeng XB, Zhang GH. Species identification at the larval and juvenile stages for several Chinese domestic fishes by elliptical Fourier analysis of otolith form. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 970–977 [曾祥波, 张国华. 基于傅立叶耳石形态分析法对几种家鱼仔稚鱼的种类判别分析. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 970–977]
- Zhang G, Wu L, Duan M, *et al.* Hatch dates and early growth for juveniles of the four major carps from different sections of the middle Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 306–313 [张国, 吴朗, 段明, 等. 长江中游不同江段四大家鱼幼鱼孵化日期和早期生长的比较研究. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 306–313]
- Zhao YP, Pan XF, Yang JX, *et al.* Use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking *Sinocyclocheilus grahami*. *Zoological Research*, 2013, 34(5): 499–503 [赵亚鹏, 潘晓赋, 杨君兴, 等. 滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)耳石的茜素红及茜素络合物标志. *动物学研究*, 2013, 34(5): 499–503]

(编辑 冯小花)

The Marking Characteristics of Otoliths of Larval Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Immersion in Alizarin Complexone

ZHU Yahua¹, JIANG Tao², CHEN Xiubao², LIU Hongbo², YANG Jian^{1,2}①

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Research Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract The grass carp *Ctenopharyngodon idellus* is one of the main economic fish species for release and resource enhancement in China. In this study, the otoliths of larval grass carps were marked for 1 d by alizarin complexone (ALC) to confirm the feasibility and appropriate conditions for the method. The results showed that lapillus, sagitta, and asteriscus could be successfully marked. The marking rings were observed under both visible light and fluorescence, the latter of which was most obviously observed using blue excitation light. Overall, lapillus had the best marking effect, followed by sagitta. ALC immersion had no significant effect on fish survival and growth. The appearance and disappearance of fluorescent signals on the otolith, the beginning and end of immersion of the fish had a time lag of about 12 h. At 60 d of recovery of the culture after immersion, the ALC mark ring was still visible, indicating that the ALC-marked effect was evident and could exist for quite a long time. This method has a strong feasibility for marking and effect assessment of the larval grass carp for future resource enhancement and release.

Key words Grass carp *Ctenopharyngodon idellus*; Larvae; Otolith; Alizarin complexone; Fluorescent marking

① Corresponding author: YANG Jian, E-mail: jiany@ffrc.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191012001

http://www.yykxjz.cn/

周莹, 王际英, 李宝山, 王成强, 王世信, 孙永智, 马长兴. 许氏平鲷幼鱼对饲料中维生素 B₆ 需求量的研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 37–48

Zhou Y, Wang JY, Li BS, Wang CQ, Wang SX, Sun YZ, Ma CX. Dietary vitamin B₆ requirements of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 37–48

许氏平鲷幼鱼对饲料中维生素 B₆ 需求量的研究*



周莹^{1,2} 王际英^{2①} 李宝山² 王成强² 王世信² 孙永智² 马长兴^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心

水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306;

2. 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)

摘要 本实验旨在研究饲料中维生素 B₆ 含量对许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)幼鱼生长、体成分、肝脏酶活和转氨酶基因表达的影响,以确定其对维生素 B₆ 的需求量。配制 6 组维生素 B₆ 实际含量分别为 2.08(对照组)、3.25、4.16、6.32、10.17 和 31.14 mg/kg 的实验饲料,饲喂初始体重为(36.35±0.06) g 的许氏平鲷幼鱼 63 d。结果显示,随着维生素 B₆ 含量的增加,实验鱼的增重率(WGR)和特定生长率(SGR)均呈先升高后降低的趋势,4.16 mg/kg 组达到最高。4.16 mg/kg 组脏体比(VSI)显著高于对照组($P<0.05$),3.25~10.17 mg/kg 组的肝体比(HSI)和肠体比(ISI)显著高于对照组($P<0.05$)。3.25~31.14 mg/kg 组的肌肉水分含量显著低于对照组($P<0.05$),全鱼和肌肉的粗蛋白和粗脂肪均呈先升后降的趋势。肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活力先升高后降低,4.16~10.17 mg/kg 组显著高于对照组($P<0.05$);丙二醛含量(MDA)先降低后升高,3.25~31.14 mg/kg 组显著低于对照组($P<0.05$);肝脏维生素 B₆ 含量先升高后平稳;3.25~31.14 mg/kg 组谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)活力显著高于对照组($P<0.05$)。谷草转氨酶(GOT1 和 GOT2)基因相对表达量先升后降,3.25~31.14 mg/kg 组显著高于对照组($P<0.05$);谷丙转氨酶(GPT1 和 GPT2)基因相对表达量先升后降,均在 6.32 mg/kg 组达到最大值;酪氨酸转氨酶(TAT)基因相对表达量先升后降,4.16~10.17 mg/kg 组显著高于其他组($P<0.05$);丝氨酸转氨酶(SerC)基因相对表达量呈下降趋势,4.16~31.14 mg/kg 组显著低于对照组和 3.25 mg/kg 组($P<0.05$)。以 WGR、肝脏维生素 B₆ 含量和 GPT 为评价指标,经折线回归分析表明,体重 36 g 的许氏平鲷幼鱼维生素 B₆ 的需求量为 3.53~6.32 mg/kg 饲料。

关键词 许氏平鲷; 维生素 B₆; 需求; 转氨酶

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0037-12

维生素 B₆ 是一种水溶性维生素,以吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺 3 种形式存在(Halsted, 2003)。维生素 B₆ 与生物体内营养物质的代谢密切相关。首先,维生素 B₆ 作为生物体内转氨酶和脱羧酶的辅酶,参与催化氨基

酸转氨、脱羧、消旋、脱硫和裂解等反应,在氨基酸代谢中起重要作用(Shiau *et al*, 2003);其次,作为糖原磷酸化酶的辅酶参与碳水化合物代谢,为糖异生提供碳架,维持血糖浓度;同时,其与必需脂肪酸的代

* 烟台市科技计划(2017ZH068)资助 [This work was supported by Science and Technology Development Plan of Yantai (2017ZH068)]. 周莹, E-mail: zhouying7910@163.com

① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2019-10-12, 收修改稿日期: 2019-11-12

谢、mRNA的合成,糖皮质激素及白蛋白的基因表达有关(Zehra *et al*, 2018; Natori *et al*, 1997);此外,它还参与神经物质如 γ -氨基丁酸(GABA)、多巴胺、组胺、5-羟色胺(5-HT)等的生物合成,从而影响神经系统的发育和功能(Huang *et al*, 2005; Akhtar *et al*, 2010)。水产动物缺乏维生素B₆会产生相应的缺乏症,但维生素B₆过量并不会对水产动物产生明显的毒副作用。通过生长指标、肝脏维生素B₆的含量、转氨酶活性等评价指标,确定了水产动物维生素B₆的需求量约为1~12 mg/kg(He *et al*, 2009; Zehra *et al*, 2018; Hosokawa *et al*, 1992),其中,斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)维生素B₆需求量为1.75~2.22 mg/kg(Huang *et al*, 2005),缺乏时表现为厌食,生长不良,惊厥,螺旋状游泳等;大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)维生素B₆需求量为1~2.5 mg/kg(Adron *et al*, 1978),缺乏时表现为生长不良,厌食,运动失调,水肿,神经紊乱等;金头鲷(*Spatrus aurata*)维生素B₆需求量为1.97 mg/kg(Kissil *et al*, 1981),缺乏时表现为生长迟缓,死亡率高,游泳行为不稳定和周围神经退行性改变等。

许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*),隶属于鲷形目(Scorpaeniformes)、鲷科(Scorpaenidae)、平鲷属(*Sebastes*),又称黑鲷、黑头等,是一种冷温性卵胎生的鱼类,分布于我国黄海、渤海和东海,国外分布于朝鲜、日本和鄂霍次克海南部(刘蝉馨, 1988; 朱龙等, 1999)。许氏平鲷肉质鲜美,在沿海有黑石斑的美誉,是人工鱼礁资源增殖和网箱养殖的理想种类(冒树泉等, 2014)。目前,关于许氏平鲷营养需求研究主要涉及蛋白质、脂肪、糖类、矿物质及饲料添加剂等方面(Lee *et al*, 2002、2009; Cho *et al*, 2015; Katya *et al*, 2017),维生素营养需求的报道仅见维生素C(Lee *et al*, 1998)和维生素E(Bai *et al*, 1998),B族维生素研究方面尚处于空白。本研究通过在饲料中添加不同梯度的维生素B₆,研究其对生长、肝脏酶活和转氨酶基因表达等指标的影响,确定许氏平鲷幼鱼对维生素B₆的最适需求量,为其配合饲料的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、酪蛋白为主要蛋白源,鱼油为主要脂肪源,设计粗蛋白约为49.56%、粗脂肪约为9.12%的基础饲料配方。在基础饲料中分别添加0、1、2、4、8和32 mg/kg的盐酸吡哆醇(纯度为98.6%,购自上海麦克林生化科技有限公司),配制维生素B₆实际含量为2.08、3.25、4.16、6.32、10.17和31.14 mg/kg

6组等氮等能的实验饲料,命名为D1、D2、D3、D4、D5和D6组,其中,D1为对照组。表1为实验饲料的配方及营养组成。

各原料经粉碎过80目标准筛,按配比称重后,逐级扩大法混合均匀,添加鱼油和适宜的蒸馏水,再次混合混匀,用小型饲料挤压机制成粒径为2和4 mm的颗粒饲料,60℃烘干,用塑料袋密封后于-20℃冰箱保存备用。

1.2 实验用鱼及饲养管理

实验所用许氏平鲷幼鱼购自山东日照传真养殖场,养殖实验在山东日照片联绿色养殖示范基地的水泥养殖池内挂网箱(60 cm×60 cm×50 cm)中进行。正式实验前采用对照组饲料驯化,14 d后挑选体质健壮、大小均一、初始体重为(36.35±0.06) g的实验鱼540尾。实验随机分为6个组,每组3个重复,每个网箱30尾鱼,共18个网箱。养殖期间持续充气,养殖用水为深井海水,采用流水养殖。水温为16℃~18℃,溶解氧(DO)>5.0 mg/L, pH为7.0左右,氨氮和亚硝态氮<0.05 mg/L。每天08:00和16:00投喂2次,初始投喂量为鱼体重的1%,并按其摄食情况调整,每日记录死鱼数量和重量。实验进行63 d。

1.3 样品采集及分析

养殖实验结束后,禁食24 h,记录每个网箱鱼的数量并称重,每个网箱随机取4尾鱼,用于鱼体常规成分测定,另取8尾鱼测量体重及体长后,尾静脉取血,解剖分离内脏,分别称量内脏团、肝脏脏、肠道的重量。全鱼、背肌、肝脏样品置于-80℃条件下保存,待测。每桶中随机取2尾鱼,无菌环境下解剖,取肝尖置于无RNase离心管中并迅速置于液氮中速冻,后于-80℃超低温冰箱中保存,用于组织中相关基因表达量的分析。

实验饲料及样品中水分采用105℃恒重法测定(GB/T6435-2014),粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB/T6432-2018),粗脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T6433-2006),粗灰分采用550℃失重法测定(GB/T6438-2007),能量采用燃烧法测定(IKA, C6000, 德国)。

肝脏中维生素B₆的含量采用上海酶联生物科技有限公司试剂盒测定。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase, GOT)和谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase, GPT)均采用南京建成生物工程的试剂盒进行测定,肝脏组织蛋白含量采用考马斯亮兰法测定,酶活力单位定义参照试剂盒说明书。

表 1 饲料配方及营养组成(%干物质)
Tab.1 Formulation and nutrient composition of the experimental diets(% dry matter)

项目 Items	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
原料 Ingredients						
鱼粉 Fish meal	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
酪蛋白 Casein	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
α-淀粉 α-starch	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
鱼油 Fish oil	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混料 Mineral premix ^a	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质预混料 Vitamin premix ^b	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
甜菜碱 Betaine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
抗氧化剂 Antioxidant	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
羧甲基纤维素钠 CMC	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
盐酸吡哆醇 Pyridoxine Hydrochloride (mg/kg)	0	1.00	2.00	4.00	8.00	32.00
营养组成(%干物质)Nutrient composition (% dry matter)						
粗蛋白 Crude protein	49.73	49.79	49.55	49.41	49.71	49.18
粗脂肪 Crude lipid	8.93	8.99	9.37	9.17	9.23	9.00
粗灰分 Crude ash	12.09	11.78	12.01	11.79	11.83	12.07
能量 Energy (KJ/g)	20.77	20.81	20.81	20.77	20.81	20.72
维生素 B ₆ Vitamin B ₆ (mg/kg)	2.08	3.25	4.16	6.32	10.17	31.14

注:a: 维生素预混料(g/kg 饲料): 维生素 C 121.2 g; 维生素 E 18.8 g; 维生素 B₁ 2.7 g; 维生素 B₂ 9.1 g; 烟酸 27.8 g; 泛酸钙 12.7 g; 肌醇 181.8 g; 生物素 0.27 g; 叶酸 0.68 g; 维生素 K 1.8 g; 维生素 A 0.73 g; 维生素 D 0.003 g; 维生素 B₁₂ 0.003 g

b: 矿物质预混料(g/kg 饲料): 硫酸镁 80 g; 磷酸二氢钠 370 g; 氯化钾 130 g; 柠檬酸铁 40 g; 硫酸锌 20 g; 氯化亚铜 0.2 g; 氯化铝 0.15 g; 碘化钾 0.15 g; 亚硒酸钠 0.01 g; 蛋氨酸锰 2.0 g; 氯化钴 1.0 g

Note: a: vitamin premix (g/kg diet): vitamin C 121.2 g; vitamin E 18.8 g; vitamin B₁ 2.7 g; vitamin B₂ 9.1 g; niacin 27.8 g; calcium pantothenate 12.7 g; inositol 181.8 g; biotin 0.27 g; folic acid 0.68 g; vitamin K 1.8 g; vitamin A 0.73 g; vitamin D 0.003 g; vitamin B₁₂ 0.003 g

b: Mineral premix (g/kg diet): magnesium sulfate 80 g; sodium dihydrogen phosphate 370.0 g; potassium chloride 130 g; ferric citrate 40 g; zinc sulfate 20.0 g; cuprous chloride 0.2 g; aluminum chloride 0.15 g; potassium iodide 0.15 g; sodium selenite 0.01 g; manganese methionine 2.0 g; cobalt chloride 1.0 g

使用 Trizol 法提取总 RNA, 提取完成后使用核酸蛋白仪(Nanoprop 2000, 美国)检验 RNA 的浓度, 并使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(Takara, 日本)去除基因组 DNA 并反转录成 cDNA 后于-80℃保存待用。根据本实验室所得的许氏平鲉转录组数据, 找到谷草转氨酶(GOT1 和 GOT2)、谷丙转氨酶(GPT1 和 GPT2)、酪氨酸转氨酶(TAT)、丝氨酸转氨酶(SerC)的基因序列, NCBI Nucleotide BLAST 进行同源性比对分析, 确定同源性较高的基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 选

用核糖体蛋白 L17(RPL17)作为内参基因(Ma *et al*, 2013), 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列如表 2 所示。实时荧光定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 的 TB GreenTMPremix Ex TaqTMII (TliRNaseH Plus)。PCR 程序: 95℃预变性 30 s, 1 个循环; 95℃变性 5 s, 相应基因退火温度下退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 共 40 个循环后增长至 95℃。通过荧光定量 PCR 仪得出目的基因及内参基因的 C_t 值, 按照 2^{-ΔΔC_t} 计算目的基因的相对表达量。本研究中, RPL17、GOT1、GOT2、GPT1、GPT2、TAT 和 SerC 的扩增效率分别为 0.992、0.962、0.979、0.965、0.989、1.055 和 1.027。

表2 基因表达的引物序列
Tab.2 Primer sequences for gene expression

引物名称 Primers	核苷酸序列(5'~3') Sequence(5'~3')
RPL17	Forward: AGGCGACGCACCTACCG Reverse: CCTCTGGTTTGGGGACGA
GOT1	Forward: GCGTTGTTGCCATAACTCTT Reverse: CTGCTCTGTGATGTGGTCCC
GOT2	Forward: TGTAACGACGCAGAGGAGGCA Reverse: TTGGTGGGTTGGAGTAAATGG
GPT1	Forward: CTGGTGTTCGGTGCCTCTGT Reverse: CTGCCGCTTTGCCTTGT
GPT2	Forward: TGGACAGGCTCTAATGGACC Reverse: TTTTCAGGGATGCTTATGCG
TAT	Forward: GGCTGGATGATGCGTGGACAAC Reverse: CACTGCTTGCCCTCGCTGAC
SerC	Forward: TTGCTGCCTTTGCCGACCAC Reverse: GACAGTTCAGCGGCGTTCCTC

1.4 指标计算及数据统计

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(鱼体末重-鱼体初重)/鱼体初重×100;

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(ln 鱼体末重-ln 鱼体初重)/养殖周期×100;

摄食率(Feed intake, FI, %/d)=摄食饲料量/(鱼体初重+鱼体末重)/2×养殖天数×100;

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=摄食饲料量/(鱼体末重-鱼体初重);

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER, %)=(鱼

体末重-鱼体初重)/(摄食饲料量×饲料中粗蛋白的含量)×100;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=内脏团重/鱼体末重×100;

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %)=肝脏重/鱼体末重×100;

肠体比(Intestine-somatic index, ISI, %)=肠道重/鱼体末重×100;

肥满度(Condition factor, CF)=鱼体末重/体长³×100;

存活率(Survival rate, SR, %)=终末鱼尾数/初始鱼尾数×100。

数据统计使用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。每组数据采用平均值±标准误(Mean±SE)表示,差异显著($P<0.05$)时用 Duncan's 检验进行多重比较分析。采用折线模型拟合数据,确定许氏平鲈维生素 B₆ 的最适需求量。

2 结果

2.1 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼生长和形体指标的影响

由表 3 可知,随着维生素 B₆ 含量的升高,实验鱼增重率和特定生长率呈先上升后下降的趋势, D3 组显著高于对照组($P<0.05$)。D2~D6 组的摄食率无显著差异($P>0.05$),均显著高于对照组($P<0.05$)。D3 组饲料系数最低, D3~D6 组显著低于对照组($P<0.05$)。蛋白质效率呈现先上升后下降的趋势, D3 组最高。

表3 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼生长和形体指标的影响
Tab.3 Effects of dietary vitamin B₆ on growth performance and body indices of juvenile *S. schlegelii*

生长性能 Growth performances	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初始体质量 IBW (g)	36.36±0.04	36.31±0.03	36.41±0.08	36.33±0.04	36.34±0.06	36.34±0.01
终末体质量 FBW (g)	67.46±0.40 ^a	75.25±0.33 ^b	78.57±0.94 ^c	76.78±1.85 ^{bc}	74.99±0.18 ^b	74.97±0.90 ^b
增重率 WGR (%)	85.57±1.27 ^a	107.24±0.75 ^b	115.78±2.25 ^c	111.32±4.93 ^{bc}	106.33±0.51 ^b	105.02±2.68 ^b
特定生长率 SGR (%/d)	1.00±0.01 ^a	1.18±0.01 ^b	1.24±0.02 ^c	1.21±0.04 ^{bc}	1.17±0.01 ^b	1.16±0.02 ^b
摄食率 FI (%/d)	1.05±0.02 ^a	1.19±0.01 ^b	1.21±0.01 ^b	1.21±0.03 ^b	1.19±0.00 ^b	1.18±0.00 ^b
饲料系数 FCR	1.14±0.03 ^c	1.10±0.03 ^{bc}	1.02±0.01 ^a	1.07±0.03 ^{ab}	1.07±0.01 ^{ab}	1.07±0.01 ^{ab}
蛋白质效率 PER (%)	1.77±0.04 ^a	1.83±0.05 ^{ab}	1.98±0.02 ^c	1.88±0.04 ^{bc}	1.89±0.01 ^{bc}	1.88±0.01 ^{bc}
脏体比 VSI (%)	9.03±0.08 ^a	9.27±0.10 ^{ab}	9.35±0.11 ^b	9.32±0.05 ^{ab}	9.24±0.12 ^{ab}	9.27±0.08 ^{ab}
肝体比 HSI (%)	2.30±0.03 ^a	2.47±0.01 ^b	2.49±0.06 ^b	2.46±0.02 ^b	2.46±0.05 ^b	2.42±0.07 ^{ab}
肠体比 ISI (%)	1.57±0.02 ^a	1.64±0.04 ^b	1.76±0.01 ^d	1.72±0.01 ^{cd}	1.69±0.01 ^{bc}	1.68±0.01 ^{bc}
肥满度 CF	2.75±0.02	2.73±0.02	2.72±0.01	2.74±0.01	2.72±0.01	2.76±0.02
存活率 SR (%)	95.56±2.94	96.67±1.93	98.89±1.11	96.67±0.00	100±0.00	97.78±1.11

注:同一行的不同上标字母代表差异显著($P<0.05$),下同

Note: Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$), the same as below

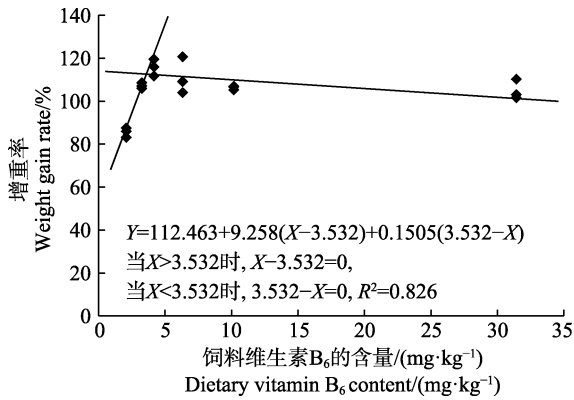


图 1 许氏平鲈幼鱼增重率与饲料中维生素 B₆ 含量的折线回归关系

Fig.1 The broken-line regression analysis based on weight gain rate and dietary vitamin B₆ of juvenile *S. schlegeli*

D3 组的脏器比显著高于对照组($P<0.05$); D2~D5 组的肝体比显著高于对照组($P<0.05$); D2~D6 组的肠体比显著高于对照组($P<0.05$), 呈先升后降的趋势, 在 D3 组达到最高值; 各组间的肥满度和存活率无显著

差异($P>0.05$)。

以增重率为评价指标, 经折线模型拟合后得许氏平鲈幼鱼对饲料维生素 B₆ 的需求量为 3.53 mg/kg(图 1)。

2.2 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼鱼体常规成分的影响

由表 4 可知, 维生素 B₆ 含量对许氏平鲈幼鱼全鱼水分和粗灰分含量无显著影响($P>0.05$), 全鱼粗蛋白呈先上升后下降的趋势, D3~D6 组的全鱼粗蛋白显著高于对照组($P<0.05$), 且在 D4 组达到最高值; 全鱼粗脂肪呈先上升后下降的趋势, 对照组有最低值, D5 组有最高值, D3~D6 组之间无显著差异($P>0.05$)。

许氏平鲈幼鱼 D3~D6 组肌肉水分含量显著低于对照组($P<0.05$); 肌肉粗蛋白随着维生素 B₆ 含量的增加呈先上升后下降的趋势, 对照组含量最低, D3~D6 组无显著差异($P>0.05$); 对照组肌肉粗脂肪呈先上升后下降的趋势, D4 组最高; 肌肉粗灰分含量无显著变化($P>0.05$)。

表 4 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼鱼体常规成分的影响(%湿重)

Tab.4 Effects of dietary vitamin B₆ on proximate composition of juvenile *S. schlegeli* (% wet weight)

体组成 Body composition	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
全鱼 Whole body						
水分 Moisture	72.27±0.22	70.04±1.52	70.42±0.06	70.01±0.47	70.39±0.79	70.99±0.65
粗蛋白 Crude protein	15.91±0.08 ^a	16.14±0.20 ^{ab}	16.50±0.08 ^{bc}	16.74±0.15 ^c	16.45±0.01 ^{bc}	16.36±0.03 ^b
粗脂肪 Crude lipid	6.31±0.03 ^a	7.07±0.14 ^b	8.17±0.07 ^c	8.23±0.03 ^c	8.31±0.10 ^c	8.16±0.25 ^c
粗灰分 Crude ash	4.61±0.02	4.58±0.05	4.44±0.03	4.49±0.08	4.53±0.03	4.58±0.08
肌肉 Muscle						
水分 Moisture	76.68±0.39 ^b	74.76±0.08 ^a	75.08±0.35 ^a	74.84±0.13 ^a	74.83±0.15 ^a	75.17±0.39 ^a
粗蛋白 Crude protein	19.89±0.08 ^a	20.30±0.06 ^b	20.96±0.03 ^c	20.68±0.03 ^c	20.68±0.05 ^c	20.68±0.18 ^c
粗脂肪 Crude lipid	2.79±0.03 ^a	3.54±0.05 ^{bc}	3.57±0.05 ^{bc}	3.67±0.06 ^c	3.38±0.13 ^b	3.4±0.11 ^b
粗灰分 Crude ash	1.31±0.01	1.29±0.01	1.30±0.01	1.29±0.01	1.31±0.02	1.31±0.01

2.3 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼肝脏酶活及维生素 B₆ 含量的影响

由表 5 可知, 随着维生素 B₆ 含量的增加, 肝脏超氧化物歧化酶活力呈先上升后下降的趋势, D3~D5 组显著高于对照组($P<0.05$), D3 组最高。丙二醛含量呈现先下降后上升的趋势, D2~D6 组显著低于对照组($P<0.05$), D3 组最低。D2~D6 组的肝脏谷草转氨酶活力显著高于对照组($P<0.05$), D4~D6 组之间无显著差异($P>0.05$)。肝脏谷丙转氨酶活力呈先上升后下降的趋势, D3~D6 组显著高于对照组($P<0.05$)。肝脏维生素 B₆ 含量随着饲料维生素 B₆ 含量的增加, 呈先升高后平稳的趋势, D2~D6 组显著高于对照组

($P<0.05$), D3~D6 组间无显著差异($P>0.05$)。

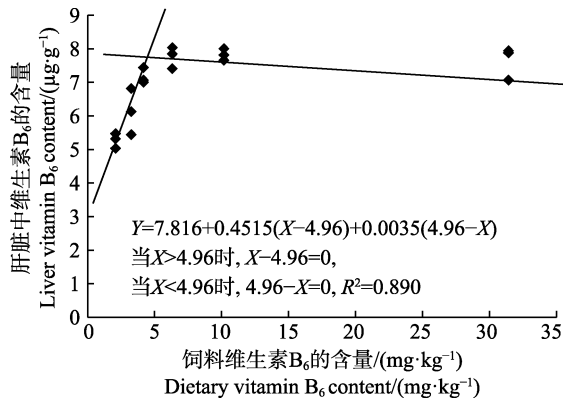
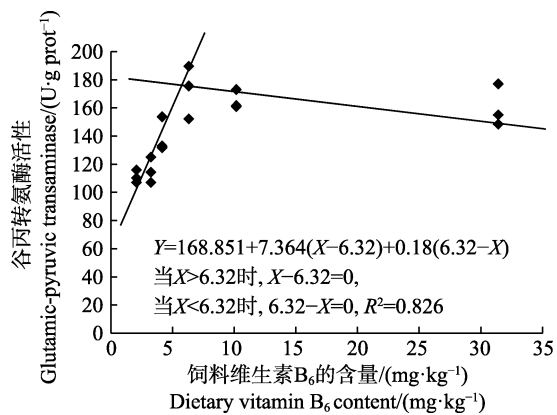
以肝脏维生素 B₆ 含量为评价指标, 经折线模型拟合后得许氏平鲈幼鱼对饲料维生素 B₆ 的需求量为 4.96 mg/kg(图 2); 以肝脏谷丙转氨酶活力为评价指标, 经折线模型拟合后得许氏平鲈对饲料维生素 B₆ 的需求量为 6.32 mg/kg(图 3)。

2.4 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼转氨酶基因表达量的影响

随着维生素 B₆ 含量的增加, 谷草转氨酶 1(GOT1) 基因相对表达量呈先上升后下降的趋势, D4 组显著高于对照组($P<0.05$), D3~D6 组之间无显著差异($P>0.05$)(图 4); D2~D6 组谷草转氨酶 2(GOT2)基因相

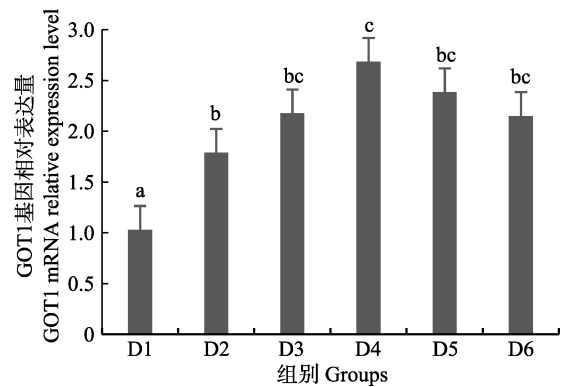
表5 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼肝脏酶活及维生素 B₆ 含量的影响Tab.5 Effects of dietary vitamin B₆ on liver enzyme activities and vitamin B₆ content of juvenile *S. schlegeli*

肝脏酶活力 Liver enzyme activities	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
超氧化物歧化酶 SOD(U/mg prot)	1382.95±24.77 ^a	1494.70±16.83 ^{ab}	1659.47±28.28 ^c	1536.36±20.49 ^b	1529.73±55.12 ^b	1502.27±64.03 ^{ab}
丙二醛 MDA(nmol/mg prot)	0.92±0.01 ^c	0.74±0.02 ^b	0.54±0.03 ^a	0.68±0.03 ^b	0.68±0.02 ^b	0.72±0.01 ^b
谷草转氨酶 GOT (U/g prot)	18.67±2.35 ^a	29.61±1.88 ^b	32.82±1.82 ^{bc}	40.72±4.56 ^{cd}	40.42±2.30 ^{cd}	48.56±3.22 ^d
谷丙转氨酶 GPT (U/g prot)	111.05±2.62 ^a	115.43±5.24 ^a	139.42±7.14 ^b	172.42±10.91 ^c	165.16±3.92 ^c	160.11±8.67 ^{bc}
维生素 B ₆ 含量 Vitamin B ₆ content (μg/g)	5.28±0.13 ^a	6.13±0.40 ^b	7.17±0.14 ^c	7.77±0.19 ^c	7.83±0.10 ^c	7.63±0.28 ^c

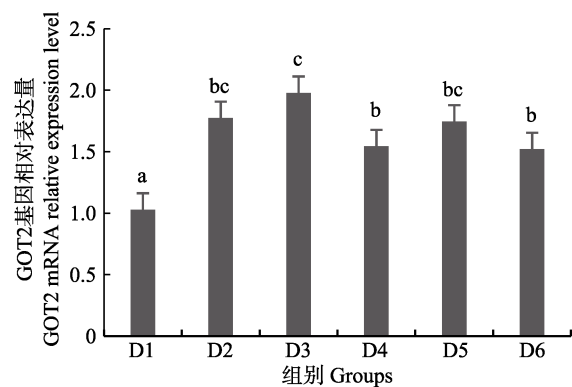
图2 许氏平鲈幼鱼肝脏维生素 B₆ 含量与饲料中维生素 B₆ 含量的折线回归关系Fig.2 The broken-line regression analysis based on liver vitamin B₆ content and dietary vitamin B₆ content of juvenile *S. schlegeli*图3 许氏平鲈幼鱼肝脏谷丙转氨酶活性与饲料中维生素 B₆ 含量的折线回归关系Fig.3 The broken-line regression analysis based on liver glutamic-pyruvic transaminase and dietary vitamin B₆ content of juvenile *S. schlegeli*

对表达量显著高于对照组($P>0.05$), D3组为最大值, D4~D6组间差异不显著($P>0.05$)(图5); 谷丙转氨酶1(GPT1)和谷丙转氨酶2(GPT2)基因相对表达量呈先上升后下降的趋势, 均在D4组有最大值, 且显著高于对照组和D2组($P<0.05$), D3~D6组差异不显著($P>0.05$)(图6和图7); 酪氨酸转氨酶(TAT)呈先上升后下降的趋势, D4组有最大值, D3~D5组显著高于其

他组($P<0.05$)(图8); 丝氨酸转氨酶(SerC)呈下降趋势, D3~D6组显著低于对照组和D2组($P<0.05$), D6组为最低值(图9)。

图4 肝脏谷草转氨酶1(GOT1)基因相对表达量
Fig.4 The relative expression level of the glutamic oxalacetic transaminase1(GOT1) mRNA in liver

不同小写字母代表组间差异显著($P<0.05$), 下同
Columns with different letters indicate significantly different between groups ($P<0.05$), the same as the following

图5 肝脏谷草转氨酶2(GOT2)基因相对表达量
Fig.5 The relative expression level of the glutamic oxalacetic transaminase2(GOT2) mRNA in liver

3 讨论

3.1 饲料中维生素 B₆ 含量对许氏平鲈幼鱼生长的影响

实验结束后, 对照组的增重率和特定生长率均显

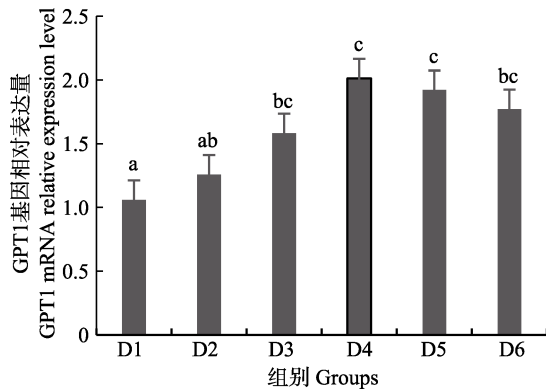


图 6 肝脏谷丙转氨酶 1(GPT1)基因相对表达量

Fig.6 The relative expression level of the glutamic-pyruvic transaminase 1(GPT1) mRNA in liver

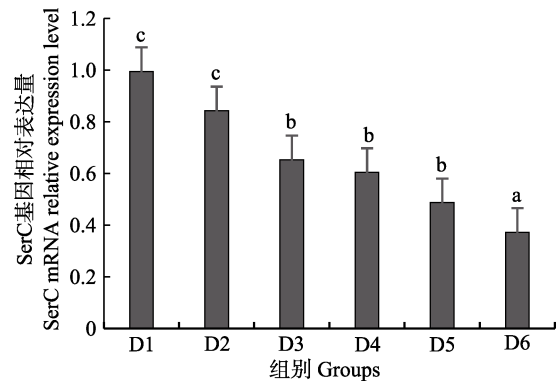


图 9 肝脏丝氨酸转氨酶(SerC)基因相对表达量

Fig.9 The relative expression level of the serine aminotransferase (SerC) mRNA in liver

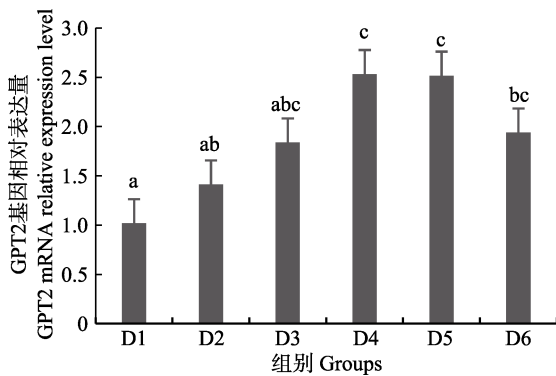


图 7 肝脏谷丙转氨酶 2(GPT2)基因相对表达量

Fig.7 The relative expression level of the glutamic-pyruvic transaminase 2(GPT2) mRNA in liver

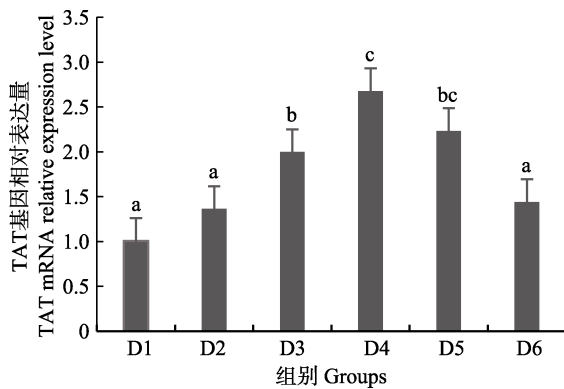


图 8 肝脏酪氨酸转氨酶(TAT)基因相对表达量

Fig.8 The relative expression level of the tyrosine aminotransferase (TAT) mRNA in liver

著低于其他组,且随着维生素 B₆ 含量的增加呈先上升后下降的趋势,说明维生素 B₆ 是维持许氏平鲈正常生长发育所必需的营养物质。维生素 B₆ 在多种代谢过程中起作用,它的缺乏可导致细胞蛋白质合成和转化反应的错位,在饲料中添加适量的维生素 B₆ 会提高蛋白质的利用率(Baker *et al*, 1995)。本研究中,添加维生素 B₆ 组的蛋白质效率显著高于对照组,饲料

系数呈先降后升的趋势,饲料利用率有所提高。水产动物缺乏维生素 B₆ 会出现相应的症状,如黄尾鲈(*Seriolalalandi*)出现厌食,生长不良,贫血,神经紊乱和高死亡率的缺乏症(Hosokawa *et al*, 1992);条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)的缺乏症是生长缓慢,厌食,神经失调,游泳异常,高死亡率和贫血(Ishibashi *et al*, 2002)。实验中对对照组未出现常见的维生素 B₆ 缺乏症,有可能因为实验开始前,许氏平鲈幼鱼体内积累了一部分维生素 B₆;养殖实验在水泥池挂网箱中进行,水体中也有部分维生素 B₆ 的存在,而不能及时排出;摄食饲料中也添加了鱼粉(含有一些维生素 B₆),因此,对照组缺乏症不明显,只出现了摄食不积极的症状,但存活率较其他组无显著差异,说明 2.08 mg/kg 的维生素 B₆ 可以防止许氏平鲈幼鱼出现严重的缺乏症。

本实验以增重率、肝脏维生素 B₆ 含量和谷丙转氨酶为评价指标,得出许氏平鲈幼鱼维生素 B₆ 的需求量为 3.53~6.32 mg/kg,与印度鲈(*Heteropneustes fossilis*) 3.21 mg/kg(Mohamed, 2001)、红罗非鱼(*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) 3 mg/kg(Lim *et al*, 1995)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 4.49~4.61 mg/kg(张春晓, 2006)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*) 4.38~4.53 mg/kg(张春晓, 2006)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) 4.17~5.02 mg/kg(王莹等, 2013)的需求量类似;高于大菱鲆 1~2.5 mg/kg(Adron *et al*, 1978)、斜带石斑鱼 1.75~2.22 mg/kg(Huang *et al*, 2005)的需求量;低于翠鲢(*Channa punctatus*) 7.6~10.4 mg/kg(Zehra *et al*, 2018)、黄尾鲈 2.2~11.7 mg/kg(Hosokawa *et al*, 1992)、吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 9.22~10.11 mg/kg(吴凡等, 2018)的需求量。不同实验鱼有不同需求量,原因可能与实验鱼的种类、大小、实验环境、实验饲料、饲喂频率和方式、实验方法和评估标准的有关。

鱼体营养状态可以通过形体指标来反映,如脏体比、肝体比和肠体比。研究表明,未添加维生素 B₆ 时,吉富罗非鱼和异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)肝体比显著低于其他组(吴凡等, 2018; 王锦林等, 2011); 大西洋鲑(*Salmo salar*)10 mg/kg 组的肝体比显著高于其他组(Albrektsen *et al*, 1994); 建鲤(*Cyprinus carpio*)对照组的肠体比为最低值(He *et al*, 2009), 本实验的脏体比、肝体比和肠体比均呈先上升后下降的趋势, 对照组最低, 说明维生素 B₆ 不足可能会影响许氏平鲈幼鱼的器官发育能力。

3.2 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼鱼体常规成分的影响

随维生素 B₆ 的增加, 许氏平鲈幼鱼全鱼粗蛋白、全鱼和肌肉的粗脂肪呈先上升后下降的趋势, 肌肉粗蛋白含量先上升后趋于平稳, 对照组肌肉水分显著低于其他各组, 这与吉富罗非鱼(吴凡等, 2018)、异育银鲫(王锦林等, 2011)的研究结果类似。维生素 B₆ 以 5'-磷酸吡哆醛的形式作为转氨酶的辅酶, 参与氨基酸分解代谢的第一步去除 α -氨基, 使氨基酸转化为相应的酮酸。维生素 B₆ 含量的增加会提高鱼体蛋白利用率, 增加机体蛋白的含量, 促进蛋白的合成(Baker *et al*, 1995; Giri *et al*, 1997); 因此, 全鱼和肌肉的粗蛋白含量会随维生素 B₆ 含量的增加而有所提高。此外, 维生素 B₆ 在乙酰辅酶 A 和脂肪酸利用等方面的脂质代谢中起重要作用。在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中发现添加维生素 B₆ 可以调节和平衡多不饱和脂肪酸的代谢, 有助于脂蛋白酯酶等的合成与释放, 促进了脂肪的运输和利用, 避免了脂质的沉积(冯秀妮, 2005; 黄世蕉等, 1992)。本研究中, 对照组全鱼和肌肉的粗脂肪含量显著低于其他各组, 随着维生素 B₆ 的增加, D5、D6 组肌肉的粗脂肪和 D6 组全鱼的粗脂肪出现了下降, 在印度鲮(*Cirrhinus mrigala*)的研究上也有类似结果(Zehra *et al*, 2017)。大西洋鲑未添加维生素 B₆ 组的全鱼和肝脏脂质含量最低(Albrektsen *et al*, 1994)。以上结果说明, 添加适量的维生素 B₆, 能促进机体蛋白质的合成和脂质代谢反应的正常进行。

3.3 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼肝脏维生素 B₆ 含量和抗氧化酶的影响

维生素 B₆ 在氨基酸代谢和含氮化合物的反应中充当氨基转移酶和脱羧酶的辅酶, 参与非必需氨基酸的合成(Baker *et al*, 1995)。鱼类肝脏是维生素代谢和蓄积的重要器官, 肠道吸收的水溶性维生素被运送到

肝脏, 以满足新陈代谢的需要, 肝脏中维生素 B₆ 的含量常作为特征性的评价指标(Zehra *et al*, 2017)。因此, 测定肝脏中维生素 B₆ 的含量能更好的确定维生素 B₆ 的需求量。通过折线回归模型, 以肝脏维生素 B₆ 含量为评价指标, 许氏平鲈幼鱼维生素 B₆ 需求量为 4.96 mg/kg。

维生素 B₆ 具有间接的抗氧化作用, 可以清除机体超氧化物自由基并进一步预防氧化应激, 而缺乏维生素 B₆ 会增加自由基的生成、降低抗氧化酶活性(Kumar *et al*, 2017)。抗氧化酶作为鱼体抗氧化防御的重要组成部分, 其中, SOD 是一类抗氧化酶, 从细胞环境中清除具有破坏性的活性氧(ROS), 具有清除体内自由基的能力, 抑制超氧化物的生成, 在机体的防御系统和免疫系统中发挥着重要的作用(胡凯, 2008; Cui *et al*, 2016)。MDA 是脂质过氧化的终产物, 含量可反映机体细胞受自由基攻击的严重程度(Mccord, 1969)。在斜带石斑鱼、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究中发现, 维生素 B₆ 缺乏组 SOD 活性显著降低(Huang *et al*, 2005; 黄晓玲, 2014), 与本实验结果相似, 随着饲料维生素 B₆ 含量的增加, SOD 活性呈先上升后下降的趋势, MDA 呈先下降后上升的趋势, 均在 D3 组出现极值, 这表明添加适当含量的维生素 B₆ 可以提高机体的抗氧化能力。

3.4 饲料中维生素 B₆ 对许氏平鲈幼鱼肝脏转氨酶活力及其基因表达量的影响

维生素 B₆ 以 5'-磷酸吡哆醛的形式, 作为转氨酶参与氨基酸代谢的标志辅酶(Zehra *et al*, 2018), 肝脏作为氨基酸代谢的主要场所, 肝脏的谷草转氨酶和谷丙转氨酶常被用作评价鱼体营养状况的敏感指标, 其活力间接反映蛋白质合成效率, 同时, 也是反映肝功能是否正常的重要指标(陈壮等, 2014; 马俊等, 2016; Smith *et al*, 1974)。故测定肝脏中谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活力可以更准确得出维生素 B₆ 的需求量。本研究表明, 对照组肝脏维生素 B₆ 含量和转氨酶活力均显著低于其他组, 随着维生素 B₆ 含量的增加, 肝脏维生素 B₆ 含量呈先上升后平稳的趋势; 谷草转氨酶呈上升的趋势, 但在 D3~D6 组无显著差异; 谷丙转氨酶呈先上升后下降的趋势。这与吉富罗非鱼、异育银鲫和印度鲮的研究结果类似(Mohamed, 2001; 吴凡等, 2018; 王锦林等, 2011), 说明添加维生素 B₆ 可以提高转氨酶的活力, 保证鱼体蛋白质代谢的正常进行。通过折线回归模型, 以谷丙转氨酶为评价指标, 许氏平鲈幼鱼维生素 B₆ 需求量为 6.32 mg/kg。

GOT 在真核细胞中存在 2 种遗传上不同的同工

酶, 细胞质和线粒体蛋白分别由 GOT1 和 GOT2 基因编码(Jiang *et al.*, 2015); GPT 基因也常分为 2 个亚型, 即肝细胞质中的谷丙转氨酶 1(GPT1)和位于肝线粒体中的谷丙转氨酶 2(GPT2)(荆晓丽, 2010)。目前, 在水产动物上尚无关于维生素 B₆ 对转氨酶基因表达水平影响的报道, 但研究发现, 维生素 B₆ 缺乏的大鼠(*Rattus norvegicus*)肝脏细胞质的谷草转氨酶 mRNA 水平比对照组高 7 倍, 施用皮质醇可以诱导肝谷草转氨酶 mRNA 的表达, 而给予维生素 B₆ 会抑制由皮质醇诱导的谷草转氨酶的合成; 缺乏维生素 B₆ 会增强糖皮质激素受体的 DNA 结合活性, 提高谷草转氨酶的基因表达(Kondo *et al.*, 1985; Oka *et al.*, 1995)。研究表明, 维生素 B₆ 缺乏不但降低了肝脏丙氨酸-乙醛酸转氨酶活性, 而且还下调了肝细胞丙氨酸-乙醛酸转氨酶的基因表达(Nishijima *et al.*, 2003)。给大鼠喂食缺乏维生素 B₆ 的饲料后, 丙氨酸-乙醛酸转氨酶 1 活性的降低比丙氨酸-乙醛酸转氨酶 2 活性(在 14 d 内降低 33%相比 86%)更快速和显著(Takada *et al.*, 1984)。5'-磷酸吡哆醛(PLP)作为糖皮质激素受体的体内调节剂, PLP 水平变化会影响糖皮质激素受体的 DNA 结合位点, 并最终影响酪氨酸转氨酶(TAT)的活性(Disorbo *et al.*, 1981)。丝氨酸转氨酶(SerC)参与氨基酸合成通路的表达, 使谷氨酸转氨基生成 3-磷酸丝氨酸, SerC 基因作为调控和关键酶参与 L-丝氨酸的合成(刘浩等, 2015), 维生素 B₆ 作为所有转氨酶的辅酶, 也会影响丝氨酸转氨酶基因的表达水平。

本研究中, 随着饲料中维生素 B₆ 含量的升高, GOT1 的 mRNA 基因表达呈先上升后下降的趋势, 对照组的基因表达量显著低于其他各组, D3~D6 组间没有显著差异; GOT2 的对照组基因表达水平最低, D3 组高表达, 以上结果表明, 添加维生素 B₆ 会提高谷草转氨酶的基因表达。GPT1 和 GPT2 的 mRNA 基因表达水平呈相似的趋势, 均是先升高后降低, 且在 D4 组表达量最高, 对照组表达量最低, 由此可见, 维生素 B₆ 缺乏会降低谷丙转氨酶的基因表达, 适宜的维生素 B₆ 添加会使其高表达。同时, TAT 的基因表达水平也是对照组最低, 在 D3~D5 组表达量显著高于对照组、D2 和 D6 组。SerC 基因表达水平呈下降趋势, 对照组和 D2 组表达量显著高于 D3~D6 组。本研究结果与以上结论有差异的原因可能是物种、实验条件和方法、实验形式等所致。

随着维生素 B₆ 的添加, 谷草转氨酶活力呈上升趋势, 谷丙转氨酶活力先升后降, 这与 mRNA 表达水平趋势类似, 说明适宜含量的维生素 B₆ 能促进谷草转氨酶和谷丙转氨酶基因的转录, 提高谷草转氨酶

和谷丙转氨酶的活力, 促进鱼体蛋白质合成效率和利用率, 更好的调控许氏平鲈幼鱼的蛋白质代谢。此外, 添加维生素 B₆ 会上调酪氨酸转氨酶基因的表达量, 下调丝氨酸转氨酶基因的表达量, 具体作用机制需要进一步的实验来证实。

4 结论

综上, 维生素 B₆ 是许氏平鲈幼鱼生长发育和维持正常生理功能的必需营养物质。适宜含量的维生素 B₆ 可以提高许氏平鲈幼鱼抗氧化能力和代谢酶活性, 提高谷草转氨酶、谷丙转氨酶和酪氨酸的基因表达水平, 降低丝氨酸转氨酶的基因表达水平。以增重率、肝脏维生素 B₆ 含量和谷丙转氨酶为评价指标, 36 g 的许氏平鲈幼鱼维生素 B₆ 的需求量为 3.53~6.32 mg/kg 饲料。

参 考 文 献

- Adron JW, Knox D, Cowey CB, *et al.* Studies on the nutrition of marine flatfish. The pyridoxine requirement of turbot (*Scophthalmus maximus*). *British Journal of Nutrition*, 1978, 40(2): 261-268
- Akhtar MS, Pal AK, Sahu NP, *et al.* Stress mitigating and immunomodulatory effect of dietary pyridoxine in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 2010, 41(7): 991-1002
- Albrektsen S, Hagve TA, Lie Ø. The effect of dietary on vitamin B₆ on tissue fat contents and lipid composition in livers and gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1994, 109(2): 403-411
- Bai SC, Lee KJ. Different levels of dietary DL- α -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 1998, 161(1): 405-414
- Baker RTM, Davies SJ. The effect of pyridoxine supplementation on dietary protein utilization in gilthead seabream fry. *Animal Science*, 1995, 60(1): 157-162
- Chen Z, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* Impact of dietary protein level on growth performance, body composition and protease activity of juvenile *Lateolabrax japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 51-59 [陈壮, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料蛋白水平对鲈鱼生长、体组成及蛋白酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 51-59]
- Cho SH, Kim HS, Myung SH, *et al.* Optimum dietary protein and lipid levels for juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*, Hilgendorf 1880). *Aquaculture Research*, 2015, 46(12): 2954-2961
- Cui P, Zhou QC, Huang XL, *et al.* Effect of dietary vitamin B₆ on growth, feed utilization, health and non-specific immune of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(5): 1143-1151

- Disorbo DM, Litwack G. Changes in the intracellular levels of pyridoxal 5'-phosphate affect the induction of tyrosine aminotransferase by glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981, 99(4): 1203–1208
- Feng XN. Effects of dietary vitamin C and vitamin B₆ on the metaboloam responses and shell biomineralization of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. Master's Thesis of Ocean University of China, 2005 [冯秀妮. 维生素 C 和 B₆ 对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)代谢反应和贝壳生物矿化影响的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2005]
- Giri INA, Teshima SI, Kanazawa A, *et al.* Effects of dietary pyridoxine and protein levels on growth, vitamin B₆ content, and free amino acid profile of juvenile *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 1997, 157(3–4): 263–275
- Halsted CH. Absorption of water-soluble vitamins. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2003, 19(2): 113–117
- Hang SJ, Shen Z. The effect of vitamin B₆ on the lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(4): 313–321 [黄世蕉, 沈竑. 维生素 B₆ 对草鱼脂肪代谢的影响. *水生生物学报*, 1992, 16(4): 313–321]
- He W, Zhou XQ, Feng L, *et al.* Dietary pyridoxine requirement of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 2009, 15: 402–408
- Hosokawa H, Teraoka R, Saito Y, *et al.* Dietary pyridoxine requirement of fingerling yellowtail. *Aquaculture Science*, 1992, 40(2): 215–220
- Hu K. Effects of pyridoxine on the mechanism of antioxidative in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian), and pathology of the pyridoxine deficiency syndrome in juvenile Jian carp. Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2008 [胡凯. 吡哆醇对幼建鲤抗氧化能力的影响及其缺乏症研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Huang JW, Tian LX, Du ZY, *et al.* Pyridoxine deficiency of grouper, *Epinephelus coioides*: Physiological and biochemical alteration. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2005, 31(4): 331–337
- Huang XL. Study on the requirements of thiamin, pantothenic acid, vitamin B₆ and inositol for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ningbo University, 2014 [黄晓玲. 凡纳滨对虾幼虾对硫胺素、泛酸、维生素 B₆ 和肌醇需要量的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Ishibashi Y, Kato K, Ikeda S, *et al.* Dietary pyridoxine requirement of juvenile Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. *Suisanzoshoku*, 2002, 50(3): 347–353
- Jiang XP, Chang HY, Zhou Y. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of human glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1). *Protein Expression and Purification*, 2015, 113: 102–106
- Jing XL. Cloning, expression and functional analysis of amphialt in amphioxus *Branchiostoma japonicus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2010 [荆晓丽. 青岛文昌鱼谷丙转氨酶基因克隆、表达和功能研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Katya K, Lee SH, Bharadwaj AS, *et al.* Effects of inorganic and chelated trace mineral (Cu, Zn, Mn and Fe) premixes in marine rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf), fed diets containing phytic acid. *Aquaculture Research*, 2017, 48: 4165–4173
- Kissil GW, Cowey CB, Adron JW, *et al.* Pyridoxine requirements of the gilthead bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 1981, 23(1–4): 243–255
- Kondo T, Okada M. Effect of pyridoxine administration on the induction of cytosolic aspartate aminotransferase in the liver of rats treated with hydrocortisone. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1985, 31(5): 509–517
- Kumar N, Ambasankar K, Krishnani KK, *et al.* Dietary pyridoxine promotes growth and cellular metabolic plasticity of *Chanos chanos* fingerlings exposed to endosulfan induced stress. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2074–2087
- Lee KJ, Kim KW, Bai SC. Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 1998, 29(4): 237–244
- Lee SM, Jeon IG, Lee JY. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 2002, 211(1–4): 227–239
- Lee SM, Kim KD. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth and body composition of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture Research*, 2009, 40(16): 1830–1837
- Lim C, Leamaster BR, Brock JA. Pyridoxine requirement of fingerling red hybrid tilapia grown in seawater. *Journal of Applied Aquaculture*, 1995, 5(2): 49–60
- Liu CX. Artificial breeding of *Sebastes schlegeli*. *Aquatic Science*, 1988, 17(1): 22–23 [刘蝉馨. 黑鲷的人工育苗. *水产科学*, 1988, 17(1): 22–23]
- Liu H, Huang W. Identification and characterization of a phosphoserine aminotransferase 1 cDNA in *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2015, 34(3): 209–215 [刘浩, 黄伟. 大黄鱼 SerC 基因的克隆、鉴定以及信息学分析. *浙江海洋学院学报 (自然科学版)*, 2015, 34(3): 209–215]
- Ma J, Wei ZH, Xing SJ, *et al.* Effects of dietary oligomethionine on the growth performance, feed utilization and protein metabolism responses of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Progress in Fishery Sciences*,

- 2016, 37(3): 126–133 [马俊, 魏泽宏, 邢淑娟, 等. 饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 126–133]
- Ma LM, Wang WJ, Liu CH, *et al.* Selection of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Marine Genomics*, 2013, 11: 67–73
- Mao SQ, Zou MY, Wang CS, *et al.* Optimal feeding frequency for *Sebastes schlegeli* juveniles. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2379–2385 [冒树泉, 邹明好, 王春生, 等. 许氏平鲈幼鱼适宜投喂频率的研究. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2379–2385]
- Mccord JM. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte protein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049–6055
- Mohamed JS. Dietary pyridoxine requirement of the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture*, 2001, 194(3–4): 327–335
- Natori Y, Oka T. Vitamin B₆ modulation of gene expression. *Nutrition Research*, 1997, 17(7): 1199–1207
- Nishijima S, Sugaya K, Morozumi M, *et al.* Hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase activity and oxalate metabolism in vitamin B₆ deficient rats. *Journal of Urology*, 2003, 169(2): 683–686
- Oka T, Komori N, Kuwahata M, *et al.* Pyridoxal 5'-phosphate modulates expression of cytosolic aspartate aminotransferase gene by inactivation of glucocorticoid receptor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1995, 41(3): 363–375
- Shiau SY, Wu MH. Dietary vitamin B₆ requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2003, 225(1–4): 397–404
- Smith CE, Brin M, Halver JE. Biochemical, physiological, and pathological changes in pyridoxine-deficient rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1974, 31(12): 1893–1898
- Takada Y, Mori T, Noguchi T. The effect of vitamin B₆ deficiency on alanine: Glyoxylate aminotransferase isoenzymes in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1984, 229(1): 1–6
- Wang JL, Zhu XM, Lei W, *et al.* Dietary vitamin B₆ requirement of juvenile gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(1): 98–104 [王锦林, 朱晓鸣, 雷武, 等. 异育银鲫幼鱼对饲料中维生素 B₆需求量的研究. 水生生物学报, 2011, 35(1): 98–104]
- Wang Y, Li XF, Zhang WW, *et al.* Optimal dietary pyridoxine requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 632–639 [王莹, 李向飞, 张微微, 等. 团头鲂幼鱼吡哆醇适宜需求量的研究. 水生生物学报, 2013, 37(4): 632–639]
- Wu F, Ren C, Wen H, *et al.* Dietary vitamin B₆ requirement of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(5): 1781–1788 [吴凡, 任春, 文华, 等. 吉富罗非鱼对饲料中维生素 B₆的需要量. 动物营养学报, 2018, 30(5): 1781–1788]
- Zehra S, Khan MA. Dietary pyridoxine requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth performance, liver pyridoxine concentration, and carcass composition. *Journal of Applied Aquaculture*, 2018, 30(3): 238–255
- Zehra S, Khan MA. Dietary thiamin and pyridoxine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Research*, 2017, 1–13
- Zhang CX. Studies on nutritional physiology of major B vitamins and mineral-phosphorus for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. and Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2006 [张春晓. 大黄鱼、鲈鱼主要 B 族维生素和矿物质-磷的营养生理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006]
- Zhu L, Sui FM. Biology and artificial culture of *Sebastes schlegeli* Hilgendorf. *Modern Fisheries Information*, 1999, 14(4): 21–25 [朱龙, 隋风美. 许氏平鲈的生物学特征及其人工养殖. 现代渔业信息, 1999, 14(4): 21–25]

(编辑 陈 辉)

Dietary Vitamin B₆ Requirements of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegeli*)

ZHOU Ying^{1,2}, WANG Jiyong^{2①}, LI Baoshan², WANG Chengqiang²,
WANG Shixin², SUN Yongzhi², MA Changxing^{1,2}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

Abstract This experiment investigated the effects of dietary vitamin B₆ content on growth performance, body composition, liver enzyme activities, and transaminase gene expression in juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). Six experimental diets were formulated with different levels of vitamin B₆: 2.08 (control group), 3.25, 4.16, 6.32, 10.17, 31.14 mg/kg. The juvenile rockfish average initial body weight was (36.35±0.06) g. After 9 weeks of treatment, the results showed that, with an increase in dietary vitamin B₆ content, the weight gain rate and specific growth rate of the experimental fish initially increased and then decreased, with the largest changes seen in the 4.16 mg/kg group. The viscerosomatic index of the 4.16 mg/kg group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). The hepatosomatic and intestine-somatic indexes of the 3.25 to 10.17 mg/kg groups were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). Muscle moisture content in the 3.25 to 31.14 mg/kg groups was significantly lower than in the control group ($P<0.05$). Crude protein and crude lipids of the whole fish and muscle showed increasing trends and then decreases. The activity of superoxide dismutase in livers increased at first and then decreased, with the 4.16 to 10.17 mg/kg groups showing significantly higher activity than the control group ($P<0.05$). Malondialdehyde content also decreased and then increased, with the 3.25 to 31.14 mg/kg group showing significantly lower content than the control group ($P<0.05$). Liver vitamin B₆ content increased at first and then stabilized. The activities of glutamic oxalacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase in the 3.25 to 31.14 mg/kg groups were significantly higher than in the control group ($P<0.05$). The relative expression level of GOT1 and GOT2 genes increased at first and then decreased, with the 3.25 to 31.14 mg/kg groups showing significantly lower expression levels than the control group ($P<0.05$). Relative expression level of GPT1 and GPT2 genes increased at first and then decreased, reaching a maximum in 6.32 mg/kg group. Relative expression of the tyrosine aminotransferase gene increased at first and then decreased, with the 4.16 to 10.17 mg/kg groups showing significantly higher expression levels than the other groups ($P<0.05$). Relative expression of the serine transaminase gene decreased, with expression levels in the 4.16 to 31.14 mg/kg groups significantly lower than in the control and the 3.25 mg/kg groups ($P<0.05$). A broken-line regression analysis of the WGR, liver vitamin B₆ content, and GPT parameters showed that the dietary vitamin B₆ requirement of juvenile rockfish with a body weight of 36 g was 3.52 to 6.32 mg/kg.

Key words Rockfish; Vitamin B₆; Requirement; Transaminase

① Corresponding author: WANG Jiyong, E-mail: ytwjy@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191225001

http://www.yykxjz.cn/

任永丽, 聂竹兰, 杨志军, 张升, 魏杰. 塔里木裂腹鱼消化系统形态学与组织学研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 49-57
Ren YL, Nie ZL, Yang ZJ, Zhang S, Wei J. Morphology and histology studies of the digestive system of *Schizothorax biddulphi*.
Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 49-57

塔里木裂腹鱼消化系统形态学与组织学研究*

任永丽^{1,2} 聂竹兰^{1,2①} 杨志军^{1,2} 张升^{1,2} 魏杰^{1,2}

(1. 塔里木大学动物科学学院 阿拉尔 843300;
2. 新疆建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室 阿拉尔 843300)

摘要 利用传统石蜡切片、HE染色等方法对塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)消化系统形态学和组织学特征进行研究。结果显示,塔里木裂腹鱼消化系统由消化管和消化腺组成,消化管包括口咽腔、食道和肠(前肠、中肠、后肠和直肠)。口咽腔内具有发达的咽齿。无胃,肠与食道紧接,前肠膨大。消化道由腔面向外依次为黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层,但口咽腔只有黏膜层、黏膜下层和肌层,未发现有浆膜层。消化道4层中,黏膜层差异最大:口咽腔黏膜层为复层扁平上皮,其间分布有味蕾和大量黏液细胞;食道粗而短,黏膜层为复层扁平上皮,黏膜褶两侧分布大量黏液细胞,且固有膜血管丰富;肠道上皮细胞为单层柱状上皮,上皮间分布有杯状细胞,其数量由前向后逐渐增加,而黏膜褶高度逐渐降低。消化腺由肝脏和胰脏组成,肝脏的肝小叶不明显,但明显可见肝血窦及中央静脉分布,肝门管区不典型。胰脏仅在肠系膜中出现,而未在其他组织中发现,胰小叶间中央静脉明显,中央静脉中可见大量椭圆形有核的红细胞。本研究对塔里木裂腹鱼消化系统形态学和组织学特征与其食性的关系进行了探讨,旨在丰富塔里木裂腹鱼的生物学研究内容,可为其食性分析及饵料开发提供理论依据。

关键词 塔里木裂腹鱼; 消化系统; 形态学; 组织学

中图分类号 Q952 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0049-09

裂腹鱼类属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothpracinae),是仅生活在亚洲高原地区的特有经济鱼类。裂腹鱼亚科共有15个属约100个种和亚种,中国约有11属76个种和亚

种(郭焱, 2012)。塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)是仅分布在新疆塔里木河水系的土著鱼类,20世纪70年代以前,种群数量较大,占博斯腾湖渔获物组成的80%左右(郭焱等, 2005)。由于受到性成熟晚、繁殖力低、生长缓慢以及对生活环境要求较高等自身因素制

* 国家自然科学基金(31560721; 31860729)、新疆生产建设兵团中青年科技创新领军人才计划项目(2018CB033)、华中农业大学塔里木大学科研合作联合基金项目(TDHNLH201702; 2662017PY118)和兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(HS201712Z)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31560721; 31860729), Scientific and Technological Innovation Commanding Troops Talented Person Project financially supported by Xinjiang Production and Construction Corps for Young and Middle-Aged (2018CB033), Research Cooperation Joint Fund Project by Huazhong Agricultural University and Tarim University (TDHNLH201702; 2662017PY118), and Open Research Fund from Key Laboratory of Animal Science and Technology of Xinjiang Production and Construction Corps (HS201712Z)].

任永丽, E-mail: renyongli2017@163.com

① 通讯作者: 聂竹兰, 教授, E-mail: niezh2004@163.com

收稿日期: 2019-12-25, 收修改稿日期: 2020-01-10

约,加之近年来生态环境破坏和人为干扰等原因,导致塔里木裂腹鱼栖息范围不断缩小、种群数量急剧下降。目前,仅在塔里木河水系的阿克苏河、渭干河、叶尔羌河、和田河等有一定数量的分布(郭焱, 2012; 郭焱等, 2005; 张人铭等, 2007; 马燕武等, 2009)。塔里木裂腹鱼于1998年被《中国濒危动物红皮书》(鱼类卷)收录(乐佩琦等, 1998)。2004年又被列入新疆维吾尔自治区重点保护水生野生动物名录[新政发(2004) 67号], 成为塔里木河水系的濒危保护鱼类之一。

鱼类的消化道为食物消化吸收的主要场所,直接关系到鱼类的生长、发育和繁殖等重要生命过程(楼允东, 1996)。因摄取食物种类的不同,不同鱼类消化道的形态、组织结构和机能也会有显著差异。近年来,国内外有关鱼类消化系统组织学的研究报道较多,如刘亚秋等(2019)、曹潇等(2018)、杨元昊等(2017)、赵子明等(2016)、赵向炯等(2017)、Shan等(2016)和Bočina等(2017)分别对斑鳊(*Mystus guttatus*)、黑鲃(*Girella leonine*)、兰州鲇(*Silurus lanzhouensis*)、中华刺鲃(*Sinobdella sinensis bleeker*)、花鲈(*Lateolabrax japonicas*)、鮠鱼(*Miichthys miiuy*)和颌针鱼(*Belone belone*)等消化系统组织进行了研究,均表明,鱼类消化道的结构与功能相适应。因此,研究鱼类消化道的形态和组织结构特征可以进一步认识和探讨其摄食、消化和吸收机制(徐革锋等, 2009)。目前,有关塔里木裂腹鱼消化系统的研究在国内外均未见报道。本研究对塔里木裂腹鱼消化道的外部形态及组织结构进行观察,旨在阐明该鱼消化系统的基本特征,进一步丰富塔里木裂腹鱼的生物学研究内容,为其食性分析及饵料开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018年7月采用拖网与刺网相结合的方法,于新疆维吾尔自治区若羌县车尔臣河共捕捞塔里木裂腹鱼16尾,全长为(269.0±36.8) mm,体质量为(110.0±48.3) g,暂养于实验室水族箱中,暂养期间饥饿以排空肠胃。

1.2 实验方法

塔里木裂腹鱼暂养36 h,待其消化道内食物及粪便排空后,随机选取10尾进行解剖,实验鱼解剖前均呈健康活泼的状态。打开体腔后,对消化道和消化腺的形态结构进行观察并拍照;依次取出口咽腔、食道、肠(肠的前、中、后分界根据粗细和盘曲程度来分,

直肠取自泄殖腔前)以及肝脏、胰脏等;常温固定于波恩氏液36 h后,保存于70%酒精中;按照常规组织学实验方法制作石蜡切片,切片厚度为4~7 μm, HE染色,中性树胶封片,最后,在莱卡显微镜明美拍照系统下观察并拍照。

1.3 数据处理

消化道组织学测定包括黏膜层褶皱高度、黏膜层褶皱宽度、黏膜下层厚、环肌层厚、纵肌层厚、浆膜层厚以及杯状细胞的相对密度。测定方法参照陈国华等(2010),使用Image J对图片进行处理,并采用Excel和SPSS 22软件进行数据统计与分析。

2 结果

2.1 消化系统的形态特点

塔里木裂腹鱼消化系统由消化道与消化腺组成。消化道包括口咽腔、食道、前肠、中肠、后肠和直肠;消化腺主要为肝脏和胰脏(图 1.1)。

塔里木裂腹鱼属下位口,呈马蹄形,唇光滑。口裂较宽。鳃耙较短且间距较大,能够起到聚集和吞咽食物的作用。口内不具颌齿、口腔齿和游离的舌头,但口咽腔内具咽齿,其齿式为 2.3.5/5.3.2,咽齿呈柱状,顶端较尖,且具钩(图 1.2)。口腔上壁有较平缓的纵褶。食道较短,位于口咽腔与肠之间,管壁由大量的横纹肌组成,具有较好的弹性。食道内表面有许多纵行排列的黏膜褶,当吞咽食物时可借助黏膜褶扩大或缩小食道的孔径。塔里木裂腹鱼无胃,肠与食道紧接,盘曲在腹腔内,肠道回折处较其他部位细,故将其肠道分为前肠、中肠、后肠和直肠4部分(图 1.3)。由食道后缘至肠道第1回折之间为前肠,第1回折至第2回折之间为中肠,中肠下行为后肠,相对前肠短而细,无盘曲,连接肛门与外界相通的部分为直肠。肠道通过发达的肠系膜与腹腔壁相连,肠系膜上有大量的脂肪包裹肠壁,腹膜为黑色。塔里木裂腹鱼肝脏与胰脏是分离的,肝脏呈粉色,侧面观为近似三角形的分叶实体器官,表面覆盖浆膜,结缔组织较少,有丰富的血管分布。胰脏紧贴肠系膜且其颜色比肝脏稍深一些。胆囊椭圆形,体积较大。

2.2 消化道组织形态指数

塔里木裂腹鱼消化道不同部分的组织形态指数见表1。前肠的黏膜褶皱高度最大,为(636.74±200.65) μm,直肠最小,为(244.95±85.16) μm。后肠的黏膜褶皱宽度最大,为(163.58±65.85) μm;直肠的黏膜褶皱宽度

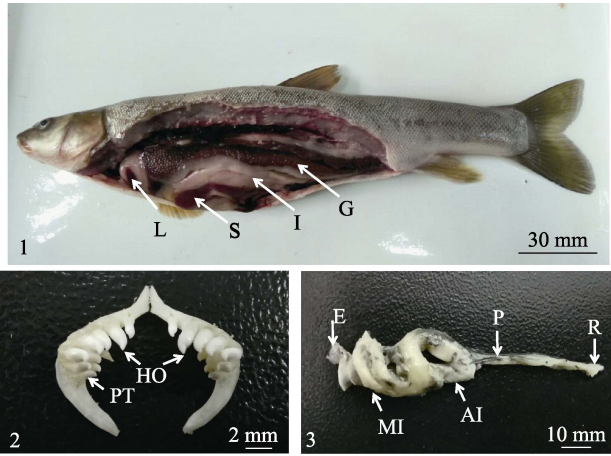


图 1 塔里木裂腹鱼消化系统的解剖观察
Fig.1 Anatomical observation of digestive system of *S. biddulphi*

1: 消化系统解剖图; 2: 咽齿; 3: 消化道
AI: 前肠; E: 食道; G: 性腺; HO: 弯钩; I: 肠; L: 肝脏; MI: 中肠; S: 脾脏; PI: 后肠; PT: 咽齿; R: 直肠
1: Dissection of digestive system;
2: Pharyngeal tooth; 3: Alimentary canal
AI: Anterior intestine; E: Esophagus; G: Gonad; HO: Hook;
I: Intestines; L: Liver; MI: Middle intestine; S: Spleen;
PI: Posterior intestine; PT: Pharyngeal tooth; R: Rectum

最小, 为(74.91±10.29) μm。食道的黏膜下层厚度最大, 为(444.60±66.63) μm; 前肠的黏膜下层厚度最小,

为(32.50±9.73) μm。食道的环肌层和纵肌层厚度最大, 分别为(676.25±118.10) μm 和(195.56±27.31) μm; 直肠处最小, 分别为(36.82±9.90) μm 和(25.90±5.60) μm。后肠浆膜层厚度最大, 为(49.05±4.95) μm, 前肠浆膜层厚度最小, 为(10.20±2.59) μm。消化道内食道的杯状细胞数量最多, 为(12.50±0.85)/100 μm; 而肠道中杯状细胞的密度由前肠至直肠依次增大, 最小为(5.00±1.70)/100 μm, 最大为(10.20±3.91)/100 μm。前肠与直肠相比, 黏膜褶皱更高, 纵肌层和浆膜层更厚, 差异极显著; 直肠与消化道其他部位相比, 黏膜褶皱宽度更小, 环肌层更薄, 差异显著; 食道的黏膜下层最厚, 为(444.60±66.63) μm, 与前肠、中肠和直肠差异极显著; 食道的杯状细胞数量最多, 与前肠差异极显著。

2.3 消化道的组织结构

消化道的一般组织结构为 4 层, 即黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层, 但口咽腔的组织结构仅分为 3 层, 即黏膜层、黏膜下层和肌肉层。黏膜层由黏膜上皮和固有膜构成, 缺少黏膜肌, 因而固有膜与黏膜下层间区别不显著。黏膜下层由疏松结缔组织构成, 其下则为肌肉层。浆膜层比较薄, 主要由结缔组织和单层扁平上皮构成。各部分消化道的差异主要表现在褶皱高度、褶皱宽度、黏膜上皮细胞的

表 1 塔里木裂腹鱼消化道组织形态指数(μm, Mean±SD)
Tab.1 Features of tissue on digestive tract of *S. biddulphi* (μm, Mean±SD)

	食道 Esophagus	前肠 Anterior intestine	中肠 Middle intestine	后肠 Posterior intestine	直肠 Rectum
黏膜褶皱高 Plicamucosa height	465.15±157.32 ^b	636.74±200.65 ^a	545.15±206.21 ^b	371.95±124.60 ^c	244.95±85.16 ^d
黏膜褶皱宽 Plicamucosa breadth	131.73±28.02 ^a	134.88±27.47 ^a	135.18±29.65 ^a	163.58±65.85 ^a	74.91±10.29 ^b
黏膜下层厚 Sub mucosa thick	444.60±66.63 ^a	32.50±9.73 ^c	53.92±15.70 ^c	152.18±32.84 ^b	49.82±20.18 ^c
环肌层厚 Thickness of circular muscle	676.25±118.10 ^a	80.95±19.16 ^b	55.04±13.70 ^{bc}	51.48±6.49 ^{bc}	36.82±9.90 ^c
纵肌层厚 Thickness of longitudinal muscle	195.56±27.31 ^a	60.64±40.36 ^b	30.76±4.50 ^{bc}	33.14±11.85 ^{cd}	25.90±5.60 ^d
浆膜层厚 Serosa thickness	27.80±4.37 ^c	10.20±2.59 ^d	35.24±12.94 ^b	49.05±4.95 ^a	34.05±6.00 ^b
杯状细胞 Goblet cell (Cell number/100μm)	12.50±0.85 ^a	5.00±1.70 ^c	7.50±3.14 ^{bc}	8.20±3.77 ^b	10.20±3.91 ^{ab}

注: 同行相同字母者表示组间差异不显著(P>0.05); 字母相邻者表示差异显著(P<0.05); 字母相隔者表示差异极显著(P<0.01)
Note: The same superscript in the same row indicates no significant difference (P>0.05). Values with neighboring superscripts in the same row indicate significant difference (P<0.05). Values with apart superscripts in the same row indicate highly significant difference (P<0.01)

类型、杯状细胞的数量、肌层的构造和肌肉组织的厚度等方面，具体如下：

口咽腔位于消化道的最前端，口咽腔壁的组织结构主要由黏膜层、黏膜下层和肌肉层组成。口腔黏膜有较为平缓的褶皱。黏膜层由黏膜上皮和固有膜构成，缺少黏膜肌层。复层扁平上皮组成的黏膜上皮中

含有大量黏液细胞及少量杯状细胞，黏液细胞的形态多样，有圆形、椭圆形、梭形等(图2.1)。黏膜上皮的

下层为致密结缔组织形成的固有膜，其向上隆起形成乳头状支撑味蕾，味蕾呈壶状贯穿于整个黏膜上皮(图2.2)。黏膜层之下为横纹肌，排列松散而不规则。

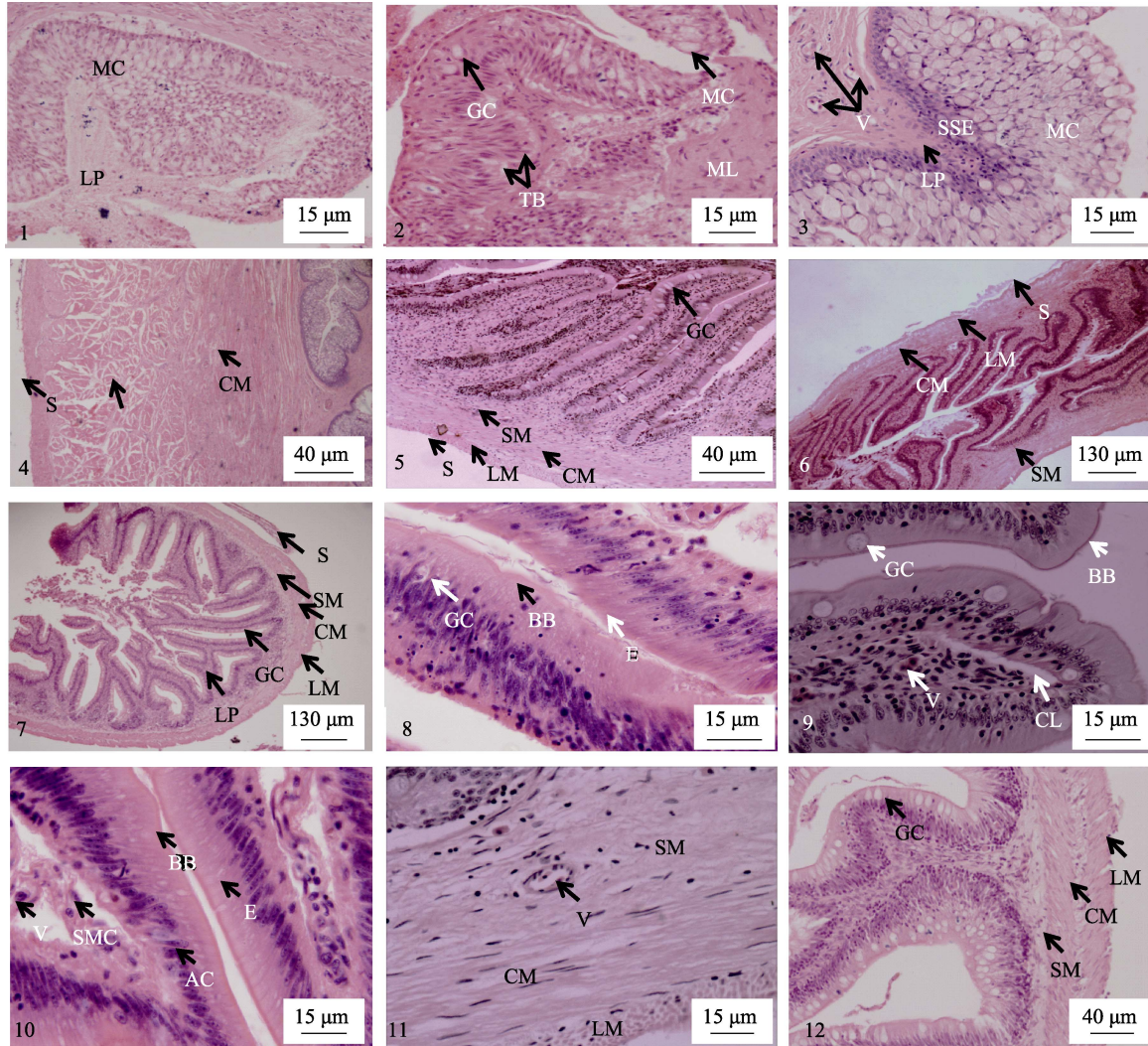


图2 塔里木裂腹鱼消化管组织结构

Fig.2 Tissue structure of digestive tract in *S. biddulphi*

- 1: 口咽腔黏液细胞; 2: 口咽腔; 3: 食道复层扁平上皮; 4: 食道肌肉层; 5: 前肠横切; 6: 中肠横切;
7: 直肠横切; 8: 前肠上皮组织; 9: 中肠上皮组织; 10: 后肠上皮组织; 11: 前肠黏膜下层; 12: 直肠肌肉层
AC: 吸收细胞; BB: 纹状缘; CL: 中央乳糜管; CM: 环肌; E: 上皮; GC: 杯状细胞;
LM: 纵肌; LP: 固有层; MC: 黏液细胞; ML: 肌层; S: 浆膜; SM: 黏膜下层;
SMC: 平滑肌细胞; SSE: 复层扁平上皮; TB: 味蕾; V: 血管
1: Mucous cell of oropharyngeal cavity; 2: Oropharyngeal cavity; 3: Stratified squamous epithelium of esophagus;
4: Muscular of esophagus; 5: Cross-section of anterior intestine; 6: Cross-section of middle intestine;
7: Cross-section of rectum; 8: Epithelium of anterior intestine; 9: Epithelium of middle intestine;
10: Epithelium of posterior intestine; 11: Sub mucosa of anterior intestine; 12: Muscular of rectum
AC: Absorptive cell; BB: Brush border; CL: Central lacteal; CM: Circular muscle; E: Epithelium; GC: Goblet cell;
LM: Longitudinal muscle; LP: Lamina propria; MC: Mucous cell; ML: Muscular layer; S: Serosa; SM: Sub mucosa;
SMC: Smooth muscle cell; SSE: Stratified sequanmous epithelium; TB: Taste bud; V: Vascular

面为复层扁平上皮, 大量黏液细胞分布于黏膜褶两侧, 固有膜是一层薄的致密结缔组织, 纤维纤细且紧密, 其间毛细血管丰富(图 2.3)。黏膜下层为疏松结缔组织, 连接黏膜与肌层。肌层为围绕管壁呈连续性排列的横纹肌, 且环肌层比纵肌层发达, 两肌层间可见肌间神经丛(图 2.4)。浆膜层由薄的结缔组织及其外面的间皮组成。

前肠的黏膜层向肠腔突起, 形成大量细长而密集的肠绒毛, 数量为 14~20 个(图 2.5)。中肠可见分支的次级黏膜褶皱, 肠绒毛为 14~18 个(图 2.6)。后肠、直肠黏膜褶皱高度逐渐降低, 出现弯曲, 形态近似三角形, 并呈现较多的次级黏膜褶(图 2.7)。黏膜上皮主要由单层柱状上皮细胞构成, 细胞核位于基部, 细胞质被染成红色; 游离端纹状缘明显, 由前肠至直肠排列逐渐稀疏(图 2.8)。杯状细胞散在单层柱状上皮细胞间, 细胞核位于杯底(图 2.9), 由前肠至直肠密度逐渐增大。固有膜为致密结缔组织, 可见丰富的血管和平滑肌细胞(图 2.10), 未发现肠腺。肠道的黏膜下层由疏松结缔组织构成, 其间有血管分布(图 2.11), 其中, 后肠黏膜下层的厚度远远高于肠道其他部位。肠道的肌层由 2 层平滑肌组成, 内层为环肌, 外层为纵肌,

两肌层间含有少量疏松结缔组织, 其间可见神经丛(图 2.12), 其厚度由前肠至直肠逐渐减少。肠的最外层为浆膜层。

2.4 消化腺的组织结构

肝脏分为实质和间质。间质部分为结缔组织, 深入实质, 将实质分成一个个小叶, 称为肝小叶。实质部分主要为肝细胞, 肝细胞近似卵圆形, 排列紧密, 圆形或卵圆形的单个细胞核位于细胞中央, 每个核有 1~2 个核仁。由于深入实质的结缔组织较少, 故肝小叶不明显。肝小叶中的中央静脉形状不规则, 但较为清晰, 肝细胞排列紧密, 基本以中央静脉为中心呈放射状分布, 此即肝细胞索(图 3.1); 相邻肝细胞索之间为肝血窦, 相互吻合连成网状管道, 其窦壁主要由内皮细胞组成; 血窦间有少量形状不规则的肝巨噬细胞和红细胞; 血窦内皮与肝细胞之间围成狭小的窦周隙也称为狄氏间隙(图 3.2)。肝门管区不典型, 但可见伴行的小叶间胆管和小叶间静脉, 小叶间胆管由单层立方上皮细胞组成, 核大且位于细胞中央; 小叶间静脉管壁薄, 管腔较大, 呈圆形或椭圆形(图 3.3)。

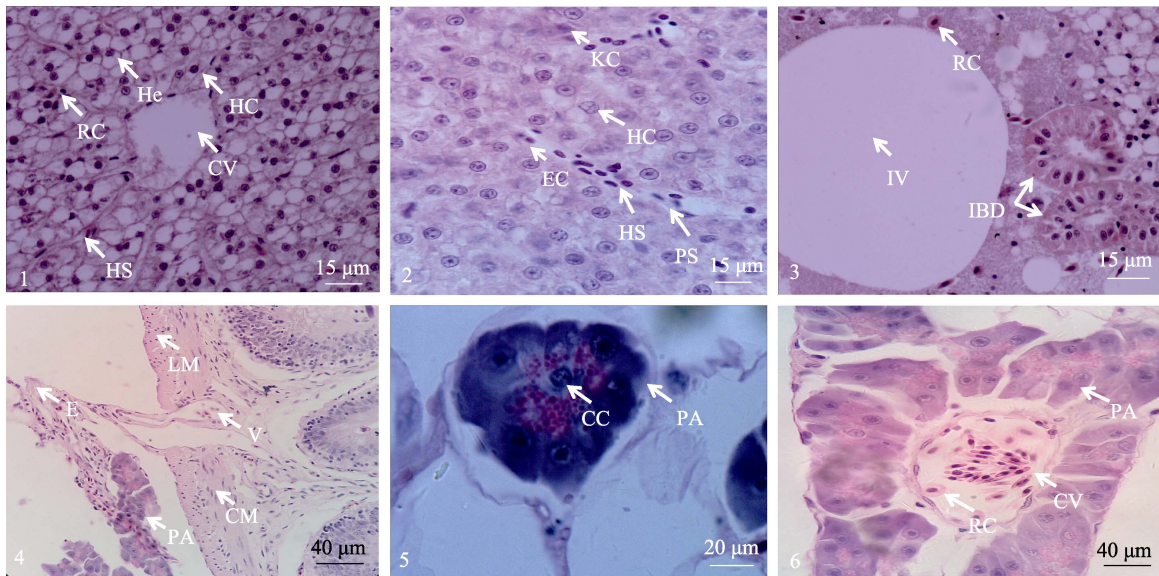


图 3 塔里木裂腹鱼消化腺组织结构

Fig.3 Tissue structure of digestive gland in *S. biddulphi*

1: 肝门管; 2: 肝小叶; 3: 窦周隙; 4: 肠系膜连接的胰脏; 5: 胰腺泡; 6: 胰小叶间静脉

CC: 泡心细胞; CM: 环肌; CV: 中央静脉; E: 上皮; EC: 内皮细胞; HC: 肝细胞索; He: 肝细胞; HS: 肝血窦; IBD: 小叶间胆管; IV: 小叶间静脉; KC: 枯否氏细胞; LM: 纵肌; PA: 胰腺; PS: 窦周隙; RC: 红细胞; V: 血管

1: Portal canal of liver; 2: Hepatic lobules; 3: Perisinusoidal space; 4: The connection of pancreas through mesentery; 5: Pancreatic acini; 6: Interlobular vein of pancreatic

CC: Centroacinar cell; CM: Circular muscle; CV: Central vein; E: Epithelium; EC: Endothelial cell; HC: Hepatic cord; He: Hepatocyte; HS: Hepatic sinusoid; IBD: Interlobular bile duct; IV: Interlobular vein; KC: Kupffer's cells;

LM: Longitudinal muscle; PA: Pancreatic acinus; PS: Perisinusoidal space; RC: Red cell; V: Vascular

塔里木裂腹鱼的胰脏并没有像其他鲤科鱼类一样嵌在肝脏内,而是独立的结构,除了在肠系膜中出现以外,并没有在其他组织中发现(图 3.4)。结缔组织伸入胰脏实质,将腺体分成若干小叶。塔里木裂腹鱼的胰腺呈滤泡状,胰腺细胞呈锥形或低柱状,细胞核圆形且较大,细胞质中含有大量紫红色颗粒物质;泡心细胞相对较小,且染色较浅(图 3.5)。胰小叶间中央静脉明显,且静脉中可见大量椭圆形有核的红细胞(图 3.6),未见胰岛。

3 分析与讨论

3.1 塔里木裂腹鱼消化系统形态结构与食性的关系

塔里木裂腹鱼为淡水底栖鱼类,其食物组成以丝状藻类和有机碎屑等为主,偶见水生昆虫、底栖无脊椎动物和小杂鱼类,为杂食性偏植食性鱼类(聂竹兰等, 2010)。由于鱼类消化道的形态结构随种属、食性、生活环境的不同而存在差异(赵彦花等, 2019),为与其食性相适应,塔里木裂腹鱼消化系统有其明显特征:塔里木裂腹鱼为下位口,并具有发达的吻须和颌须,便于摄食底栖藻类以及寻找食物;其口内不具颌齿、口腔齿和游离舌,但有较为发达的咽齿,其顶端较尖且呈钩状,咀嚼面宽,与其摄食藻类兼食无脊椎动物相适应,同季强(2008)对拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis younghusbandi*)以及方静等(1994)对齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)的研究结果一致,这也进一步证实塔里木裂腹鱼为杂食偏植食性鱼类。食道粗而短,管壁厚,弹性好,起到输送食物的作用。塔里木裂腹鱼为无胃鱼,其肠起始于食道后方,终止于肛门。关于无胃鱼肠道的分段,不同学者有不同的观点,McVay等(1940)将肠道分为肠球和肠本部2部分;林浩然(1962)则认为食道之后即为肠,无分段必要;而倪达书等(1963)将肠管分为前、中、后3部分。本研究参照倪氏分段法以及根据塔里木裂腹鱼自身肠道弯曲,将肠管分为前肠、中肠、后肠和直肠4段。根据显微测量结果以及统计学分析,发现各肠段的黏膜褶皱高度、黏膜褶皱宽度、黏膜下层厚度、环肌层高度、纵肌层高度、浆膜层厚度以及杯状细胞的分布密度,均存在较为明显的差异,故本研究结果支持该分段方法。塔里木裂腹鱼肠较细长,前肠膨大,复杂弯曲,这与杂食性和植食性的无胃鱼通过增加肠道的长度进而增加吸收面积相适应(陈国华等, 2010)。肝胰脏是鱼类的主要消化腺以及重要的代谢器官,而塔里木裂腹鱼的肝脏和胰脏是分开的,这与其他鲤科鱼类胰脏弥散分布于肝脏的结构有很大的区别(谢从新, 2010)。肝脏

和胰脏结构的独立性和完善性在一定程度上体现了动物由低等向高等进化的趋势(庹云等, 2019)。正如海萨·艾也力汗等(2014)在研究新疆裂腹鱼的系统分化关系中得出的结论那样,扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*)并未形成独立分支,而是与塔里木裂腹鱼、厚唇裂腹鱼(*Schizothorax irregularis*)、齐口裂腹鱼、澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)以及扁嘴裂腹鱼(*Schizothorax esocinus*)聚在一起,主要区别在于须的对数,并推测扁吻鱼可能是裂腹鱼属的特化物种,故推知塔里木裂腹鱼消化腺的结构也可能是相对于其他裂腹鱼属鱼类进化产生的结果。肝脏分泌的胆汁储存在胆囊中,通过胆管输入前肠,塔里木裂腹鱼的胆囊较大,能够分泌大量胆汁,推测该鱼具有较强的摄食能力。

3.2 塔里木裂腹鱼消化系统组织结构与功能的关系

塔里木裂腹鱼口咽腔黏膜上层细胞中不仅含有味蕾和少量杯状细胞,还具有大量的黏液细胞,进食时能够分泌黏液,起到润滑食物便于吞咽的作用。食道内具有许多黏膜褶,吞咽食物时可通过黏膜褶的扩大或者缩小来调整食道大小,使其免受损伤;黏膜上皮间有大量黏液细胞分布,黏液细胞较大,而且散布较为密集,可知进食时会分泌大量黏液,与食道内的食物混合成食糜团,便于吞咽;食道肌层环形肌的厚度高于纵行肌,在环肌波动收缩的推动下,食物能够快速通过食道。塔里木裂腹鱼肠腔内分布有大量的肠绒毛以及后肠、直肠出现的大量次级肠绒毛,极大地增加了肠道的消化吸收面积,同时,能够将食糜在肠道内的时间延长,增大对食物的吸收效率。肠绒毛的高度自前肠至直肠逐渐降低,说明肠道从前往后对食物的消化吸收能力逐渐减弱,这一特点与黄自豪等(2015)对大鳍异鲃(*Creteuchiloglanis macropterus*)的消化系统的研究结果一致。塔里木裂腹鱼肠道黏膜上皮细胞的游离面具有较为明显的纹状缘,其有增加表面吸收面积的作用。整个肠道的上皮细胞中还分布有大量的杯状细胞,能够分泌黏液,起到润滑、保护以及吸收和转运大分子等的作用(Arellano *et al*, 2002; McGuckin *et al*, 2011)。杯状细胞的数量由前肠至后肠逐渐增多,与齐口裂腹鱼、重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)(方静等, 1994)、大鳍异鲃(黄自豪等, 2015)、稀有鮰鲫(*Gobiocypris rarus*)(王永明等, 2013)、大眼鲈(*Siniperca kneri*)(蒲德永等, 2013)等一致,前肠和中肠的杯状细胞数量相对于后肠较少,可减缓食物向后运动,使之能够被慢慢吸收;后肠和直肠的杯状细胞密度较高,可分泌大量的黏液,利于排便。肠道固有膜

中分布的大量血管能够迅速运输营养成分至全身, 而其分布的少量平滑肌细胞通过引起绒毛的收缩运动, 更加有利于营养物质的吸收和运输。前肠的肌层相对于肠道其他部位较厚, 有助于加强肠道蠕动, 利于食物与黏液的充分接触; 后肠和直肠的肌层则有助于食物残渣的排出, 而肌层间分布的神经丛也具有调节肌层运动的功能。

由于塔里木裂腹鱼肝脏的间质伸入到实质的结缔组织较少, 以及中央静脉与肝细胞板不整齐的排列方式等原因, 致使肝脏小叶构造不明显, 且肝门管区不典型, 与海鳗(*Muraenesox cinereus*)(谢嘉华等, 2007)和斑鳅(*Siniperca scherzeri*)(熊洪林等, 2009)等相似。肝脏内部结缔组织间毛细血管丰富, 与黑鲃(*Girella leonina*)(曹潇等, 2018)、青弹涂鱼(*Scartelaos viridis*)(曹伏君等, 2013)等一致。胰腺细胞体积较大, 且核仁大而明显, 说明细胞功能比较活跃; 细胞质中大量的深色颗粒物质与波纹唇鱼(*Cheilinus undulates*)(陈国华等, 2010)和翘嘴鲌(*Culter alburnus*)(熊洪林, 2006)胰腺的组织特点一致, 故推测其可能是酶原颗粒, 说明胰腺细胞具有旺盛的分泌功能, 能更好地分解蛋白质、脂肪和碳水化合物, 胰小叶中大量的静脉血管也从侧面表明胰腺具有较强的分泌和运输功能。

综上所述, 塔里木裂腹鱼消化系统所具有的这些特征, 与其杂食性偏植食性的食性特征相适应。

参 考 文 献

- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18 (3): 154–158
- Bočina I, Šantić Ž, Restović I, *et al.* Histology of the digestive system of the garfish *Belone belone* (Teleostei: Belonidae). *European Zoological Journal*, 2017, 84(1): 89–95
- Cao FJ, Ye N, Luo J, *et al.* Histological observation of digestive system in blue mudhopper *Scartelaos vividis*. *Fisheries Science*, 2013, 32(2): 63–67 [曹伏君, 叶宁, 罗杰, 等. 青弹涂鱼消化系统形态学及组织学研究. *水产科学*, 2013, 32(2): 63–67]
- Cao X, Sun M, Zhu LH, *et al.* Morphology and histology of the digestive system in *Girella leonine*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2018, 37(1): 20–26 [曹潇, 孙敏, 朱亮华, 等. 黑鲃消化系统的形态学及组织学研究. *热带海洋学报*, 2018, 37(1): 20–26]
- Chen GH, Wang YB, Wang J, *et al.* Histology of the digestive system in *Cheilinus undulates rüppell*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(4): 685–693 [陈国华, 王永波, 王珺, 等. 波纹唇鱼消化系统的组织学. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 685–693]
- Fang J, Zhou Y. Morphological and histological studies on the digestive tracts of *Schizothorax prenaanti* and *Schizothorax davidi*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1995, 13(1): 101–106 [方静, 周毅. 齐口裂腹鱼和重口裂腹鱼消化道形态和组织结构的观察. *四川农业大学学报*, 1995, 13(1): 101–106]
- Guo Y, Zhang RM, Cai LG, *et al.* Fishery resources and fisheries of the Bosten Lake. Xinjiang: Xinjiang Science and Technology Press, 2005, 117–120 [郭焱, 张人铭, 蔡林刚, 等. 博斯腾湖鱼类资源及渔业. 新疆: 新疆科学技术出版社, 2005, 117–120]
- Guo Y. Fishes of Xinjiang. Xinjiang: Xinjiang Science and Technology Press, 2012, 34–35 [郭焱. 新疆鱼类志. 新疆: 新疆科学技术出版社, 2012, 34–35]
- Haysa A, Gou Y, Meng W, *et al.* Phylogeny and divergence time estimation of Schizothoracinae fishes in Xinjiang. *Hereditas*, 2014, 36(10): 1013–1020 [海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 新疆裂腹鱼类的系统发生关系及物种分化时间. *遗传*, 2014, 36(10): 1013–1020]
- Huang ZH, Yi JH, Chen DM, *et al.* Morphological and histological observations of digestive system in *Creteuchiloglanis macropterus*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(2): 8–14 [黄自豪, 易建华, 陈冬明, 等. 大鳍异鲃消化系统形态学和组织学观察. *淡水渔业*, 2015, 45(2): 8–14]
- Ji Q. The study on morphology of feeding organs and the feeding habits of six Schizothorax fishes. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2008, 15–19 [季强. 六种裂腹鱼类摄食消化器官形态学与食性的研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2008, 15–19]
- Lin HR. Digestive tract of five different feeding habits carp Branch fish. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1962(3): 65–78, 93–95 [林浩然. 五种不同食性鲤科鱼的消化道. *中山大学学报(自然科学版)*, 1962(3): 65–78, 93–95]
- Liu YQ, Li XH, Li YF, *et al.* Study on tissue structure and adaptability characteristic for digestive system of *Mystus guttatus*. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(2): 14–19 [刘亚秋, 李新辉, 李跃飞, 等. 斑鲌消化系统组织结构及适应性特征研究. *淡水渔业*, 2019, 49(2): 14–19]
- Lou YD. Histology and embryology (2nd). Beijing: China Agricultural Press, 1996, 95–114 [楼允东. 组织胚胎学(第2版). 北京: 中国农业出版社, 1996, 95–114]
- Ma YW, Guo Y, Zhang RM, *et al.* Fauna composition and distribution of aboriginal fish in the Tarim River of Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(6): 949–956 [马燕武, 郭焱, 张人铭, 等. 新疆塔里木河水系土著鱼类区系组成与分布. *水产学报*, 2009, 33(6): 949–956]
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(4): 265–278
- McVay JA, Kaan HW. The digestive tract of *Carassius auratus*. *Biological Bulletin*, 1940, 78(1): 53–67

- Ni DS, Hong XF. The histology of the digestive tract of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1963(3): 1–25 [倪达书, 洪雪峯. 草鱼消化道组织学的研究. *水生生物学集刊*, 1963(3): 1–25]
- Nie ZL, Wei J, Cheng Y. The study on *Schizothorax biddulphi* Günther in biology. *Journal of Tarim University*, 2010, 22(3): 113–116 [聂竹兰, 魏杰, 程勇. 塔里木裂腹鱼生物学研究初探. *塔里木大学学报*, 2010, 22(3): 113–116]
- Pu DY, Huang XQ, Wei G. Histological studies and comparison on the digestive tract in *Siniperca kneri* and *Siniperca scherzeri*. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(2): 26–31 [蒲德永, 黄小琪, 魏刚. 大眼鲈和斑鲈消化道组织结构的比较研究. *淡水渔业*, 2013, 43(2): 26–31]
- Shan XJ, Quan HF, Dou SZ. Morphological and histological changes in digestive tract development during starvation in the miiuy croaker. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(2): 529–546
- Tuo Y, Xiao TY, Li WC. Morphological and histological characteristics of the digestive system in *Spinibarbus caldwelli*. *Journal of Hydroecology*, 2019, 40(4): 83–92 [庾云, 肖调义, 李伟臣. 刺鲃幼鱼消化系统形态学和组织学研究. *水生态学杂志*, 2019, 40(4): 83–92]
- Wang YM, Shi JR, Zhang YG, *et al.* Histological study on the digestive tract of cultivated *Gobiocypris rarus*. *Sichuan Journal of Zoology*, 2013, 32(3): 410–414 [王永明, 史晋绒, 张耀光, 等. 人工养殖稀有鮡鲫消化道组织学观察. *四川动物*, 2013, 32(3): 410–414]
- Xie CX. *Ichthyology*. Beijing: China Agricultural Press, 2010, 90–91 [谢从新. 鱼类学. 北京: 中国农业出版社, 2010, 90–91]
- Xie JH, Chen ZY, Huang GB, *et al.* Microstructure of liver, gallbladder and pancreas of Pike eel *Muraenesox cinereus*. *Marine Science Bulletin*, 2007, 26(3): 61–65, 86 [谢嘉华, 陈朝阳, 黄国宝, 等. 海鳗肝脏、胆囊及胰腺的显微结构. *海洋通报*, 2007, 26(3): 61–65, 86]
- Xiong HL, Wang ZJ. Histology and ultrastructure of the liver of *Siniperca scherzeri*. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)*, 2009, 34(2): 43–48 [熊洪林, 王志坚. 斑鲈肝脏的组织学及超微结构. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 34(2): 43–48]
- Xiong HL. Morphological studies on livers and pancreases of *Culter alburnus*, *Mystus macropterus* and *Siniperca scherzeri*. Master's Thesis of Southwest University, 2006, 6–31 [熊洪林. 翘嘴鲌、大鳍鲮和斑鲈肝脏胰脏的形态学研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2006, 6–31]
- Xu GF, Chen XJ, Du J, *et al.* Fish digestive system: It's structure, function and the distributions and characteristics of digestive enzymes. *Chinese Journal Fisheries*, 2009, 22(4): 49–55 [徐革锋, 陈侠君, 杜佳, 等. 鱼类消化系统的结构、功能及消化酶的分布与特性. *水产学杂志*, 2009, 22(4): 49–55]
- Yang YH, Wang LX, Li XZ, *et al.* Comparative study on morphology and histology of digestive system of *Silurus lanzhouensis* and catfish (*Silurus asotus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 174–181 [杨元昊, 王立新, 李学智, 等. 兰州鲇与鲇消化系统的形态学及组织学比较研究. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 174–181]
- Yue PQ, Chen YY. *China red data book of endangered animals (fishes)*. Beijing: Science Press, 1998, 147–148 [乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书(鱼类). 北京: 科学出版社, 1998, 147–148]
- Zhang RM, Guo Y, Ma YW, *et al.* A survey on the resource and distribution of *Schizothorax biddulphi* Günther. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(6): 76–78 [张人铭, 郭焱, 马燕武, 等. 塔里木裂腹鱼资源与分布的调查研究. *淡水渔业*, 2007, 37(6): 76–78]
- Zhao XJ, Zhang LY, Zhu AY. Chemical and histochemistry study on the digestive system of *Lateolabrax japonicas*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(30): 111–116, 198 [赵向炯, 章利勇, 朱爱意. 花鲈消化系统组织学与组织化学研究. *安徽农业科学*, 2017, 45(30): 111–116, 198]
- Zhao YH, Ou YJ, Li JE, *et al.* Histology and distribution of mucous cells in digestive system of *Bahaba flavolabiata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 80–86 [赵彦花, 区义君, 李加儿, 等. 黄唇鱼消化系统组织结构及黏液细胞分布特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 80–86]
- Zhao ZM, Zhao YL, Liu MJ, *et al.* Morphological and histological characterization of the digestive system of *Sinobdella sinensis* Bleeker, 1870. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(6): 1201–1207 [赵子明, 赵媛莉, 刘美剑, 等. 中华刺鲃消化系统形态与组织学研究. *水生生物学报*, 2016, 40(6): 1201–1207]

(编辑 马瑾艳)

Morphology and Histology Studies of the Digestive System of *Schizothorax biddulphi*

REN Yongli^{1,2}, NIE Zhulan^{1,2}①, YANG Zhijun^{1,2}, ZHANG Sheng^{1,2}, WEI Jie^{1,2}

(1. College of Animal Science, Tarim University, Alar 843300; 2. Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production & Construction, Alar 843300)

Abstract This study aimed to investigate the morphological and histological features of the digestive system of *Schizothorax biddulphi* using conventional HE-stained paraffin sections. The digestive system of *S. biddulphi* consisted of a digestive tract and a digestive gland. The digestive tract comprised the oropharynx, esophagus, and intestine (anterior intestine, middle intestine, posterior intestine, and rectum). A pharyngeal tooth had developed in the oropharynx, but no stomach was present; the intestine adjoined the esophagus and the anterior intestine was inflated. The general structure of the digestive tract consisted of the mucosa, submucosa, muscular layer and serous membrane; however, the oropharyngeal cavity only had the mucosa and muscular layer. The mucosal layer showed the greatest difference, mainly in the following aspects. First, the tunica mucosa of the oropharynx was made of a stratified squamous epithelium with taste buds and numerous mucous cells. Second, the esophagus was thick and short, and the mucosa consisted of a stratified squamous epithelium. Third, there was a large number of blood vessels in the lamina propria. Last, the intestinal epithelial cells were single columnar epithelial cells, and the number of goblet cells increased gradually from the anterior intestine to the rectum, while the mucosal fold height gradually decreased. The digestive gland of *S. biddulphi* is composed of a liver and pancreas. The hepatic lobule of the liver was not obvious, but the distribution of hepatic sinuses and central veins was regular, however, the portal area of the liver was not typical. The pancreas was an independent structure, separated from the liver, and not found in any tissue other than the mesentery. The veins were more obvious in the pancreatic lobule, and there were numerous nucleated red blood cells in the vascular system. The relationship between morphological and histological features of the digestive system and feeding behavior of *S. biddulphi* was discussed, in order to enrich the biological research of *S. biddulphi* and to provide a theoretical basis for the analysis of its trophic behavior and development of its bait.

Key words *Schizothorax biddulphi*; Digestive system; Morphology; Histology

① Corresponding author: NIE Zhulan, E-mail: niezhl2004@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190910003

http://www.yykxjz.cn/

陈梓聪, 陈丕茂, 袁华荣, 冯雪, 佟飞, 陈文静, 龙鑫玲, 张皓铭. 恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾的抗氧化功能的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 58–65
Chen ZC, Chen PM, Yuan HR, Feng X, Tong F, Chen WJ, Long XL, Zhang HM. Effect of recovery time on antioxidant capacity of juvenile *Penaeus monodon* after exhaustive exercise. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 58–65

恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾 的抗氧化功能的影响*



陈梓聪^{1,2} 陈丕茂^{1,2}① 袁华荣¹ 冯雪¹
佟飞¹ 陈文静¹ 龙鑫玲^{1,2} 张皓铭^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源环境科学观测实验站
中国水产科学研究院海洋牧场技术重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室 广东省海洋
休闲渔业工程技术研究中心 广州 510300; 2. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 力竭运动常出现于虾类养殖过程和野生环境中,斑节对虾(*Penaeus monodon*)是中国沿海重要养殖和增殖放流品种,但尚无关于斑节对虾力竭运动后生理恢复过程报道。该研究以斑节对虾幼虾为实验对象,在室内水槽使用抄网追逐斑节对虾幼虾,模拟迫使其进行力竭运动实验,探究其力竭运动后抗氧化能力恢复过程。结果显示,力竭运动后 0 h,幼虾体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)含量,均与对照组无显著差异;1~12 h, SOD、CAT、POD 活性、MDA 含量和 T-AOC 持续下降, GSH-Px 活性无显著变化;24 h, SOD、CAT 和 POD 活性显著降低, GSH-Px 活性、MDA 含量和 T-AOC 显著升高;72 h, SOD 和 CAT 活性仍显著低于对照组, GSH-Px、POD 活性和 MDA 含量恢复至对照组, T-AOC 显著高于对照组。在力竭运动过程中,幼虾的酶促抗氧化系统未被激活;幼虾的抗氧化能力在力竭运动后的 24 h 内较低,不宜再次受刺激;幼虾的抗氧化能力在力竭后 24 h 后显著上升,并保持较长时间。

关键词 斑节对虾; 抗氧化能力; 力竭运动; 恢复过程

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0058-08

力竭运动作为体现游泳能力的标志和特殊的游泳状态,常见于野生水生动物在进行捕食、逃避敌害攻击、穿越激流等场景中。在养殖环境下,常见于水

生动物在抢食、逃避捕捞、高密度暂养运输等环境中(Kieffer, 2000、2010)。对虾类运动能力较强,受到攻击或刺激时强烈收缩腹部肌肉,尾扇张开拨水,迅速

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016HY-ZD01)和 2019 年农业资源及生态保护资金补助资金(增殖放流)项目(粤农农计[2019]3 号)共同资助 [This work was supported by Special Project of Basic Scientific Research Operating Expenses of Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD01), and 2019 Agricultural Resources and Ecological Protection Fund Subsidies (Proliferation and Release) Project (Guangdong Nongnongji [2019] No.3)]. 陈梓聪, E-mail: 462290205@qq.com

① 通讯作者: 陈丕茂, 研究员, E-mail: chenpm@scafsri.ac.cn

收稿日期: 2019-09-10, 收修改稿日期: 2019-10-11

后跳, 逃离危险水域(Dall *et al.*, 1990; 张沛东, 2006)。研究表明, 对鱼虾进行适量运动训练可使其抗氧化能力提升, 但过度运动会削弱机体的抗氧化能力, 原因是在力竭运动后一段时间内, 有氧呼吸强度显著升高, 力竭运动积累的乳酸和有氧代谢产生的自由基等对组织器官形成胁迫, 导致机体免疫力下降, 体内抗氧化平衡被破坏(McKenzie *et al.*, 2012; 虞顺年等, 2018; 张海恩等, 2019)。大西洋鲑(*Salmo salar*)遭遇拥挤胁迫时, 肌肉中的乳酸含量显著上升, 糖原含量显著降低, 皮质醇含量上升, 出现机体呼吸代谢增强、细胞受损的迹象(Skjervold *et al.*, 2001); 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)在高密度运输过程中, 呼吸代谢水平和 SOD 活性均显著上升(李丹丹等, 2018a)。高密度养殖的斑节对虾(*Penaeus monodon*)与较低密度养殖组相比, 出现耗氧率升高、生长性能低下的现象(Anand *et al.*, 2019)。对虾类属于较为低等的无脊椎动物, 进入力竭状态后相较于脊椎动物, 需要消耗更多能量以调整紊乱的生理代谢状态, 且需要更长时间恢复到生理平衡状态(Berry *et al.*, 2019; 段妍, 2012; 于晓明, 2009)。

斑节对虾是中国沿海重要养殖虾类和增殖放流品种(吴琴瑟, 2010; 邢诒炫等, 2014)。斑节对虾体内缺少特异性免疫应答反应, 在陷入生理紊乱状态时, 非特异性免疫能力下降, 突然死亡率和疾病感染率升高, 影响养殖或增殖放流的效果(Ratanapo *et al.*, 1992; 陈国福等, 2004)。因此, 研究斑节对虾幼虾在力竭运动后的抗氧化能力恢复过程, 对避免幼虾进入力竭状态和在幼虾进入力竭状态时的处理方法有重要指导意义, 但目前尚未见相关的报道。本研究模拟斑节对虾在生活水体中避敌、抢食等力竭运动情况, 探究其在力竭运动后, 体内相关抗氧化能力指标随恢复时间延长的变动与恢复过程, 以期对斑节对虾养殖生产及增殖放流活动期间幼虾的管护提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的斑节对虾幼苗为中国水产科学研究院南海水产研究所深圳基地自行繁育的养殖虾苗, 标粗后, 挑选约1000尾规格相近、体长为(3.0±0.4) cm、体重为(0.20±0.07) g的幼虾进行力竭运动胁迫实验。恢复实验期间, 前24 h禁食, 之后每日分3次(08:00、16:00和23:00)投喂虾苗总体重的3%的零号料

(约2.25 g)。力竭运动实验装置为自行设计的环形水道(外径为1004 mm, 内置隔离装置直径为604 mm, 高为395 mm, 容量为200 L)。

1.2 实验方法

力竭实验前, 从未进行力竭运动胁迫的养殖幼虾中随机挑选 12 尾作为空白组, 将其余幼虾分为 7 组, 每组 3 个平行, 分别放入环形水道中进行力竭运动胁迫。胁迫实验期间, 水道中流速保持在 0.25 m/s, 用小抄网从幼虾游泳方向前方惊吓幼虾, 使幼虾持续进行跳跃逃避运动, 当幼虾对刺激无法进行逃避、游泳足摆动频率下降、无法再逆水流游泳的时候即进入力竭状态。此时, 将全部存活幼虾放入室内的暂养池的网箱中恢复, 同时, 挑选 12 尾力竭状态的幼虾, 置于冰冷的取样盘中取样, 并且在未进行捕捞刺激的幼虾中取样作为对照组样品, 经液氮急冻后保存于-80℃环境中, 此为力竭运动后 0 h 的样品。之后在放入恢复水体后开始计时, 在 1、4、8、12、24、48 和 72 h 以同样方法取 12 尾幼虾, 并在取样前观察幼虾的行为。

在所有样品采集完成后, 测定整尾幼虾的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)含量, 以上指标的测定均使用南京建成生物工程研究所的试剂盒。

1.3 数据处理

实验数据经 Excel 2016 处理后, 使用 SPSS 21 软件进行分析, 以力竭运动后的恢复时间为自变量, 对各生理指标按取样时间进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 若组间出现极显著($P < 0.01$)或显著差异($P < 0.05$), 则用 Duncan 法进行组间差异显著性检验, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果

2.1 斑节对虾幼虾力竭运动后不同恢复时间的体内抗氧化相关指标变化

如表 1 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后, 随恢复时间的延长, 总抗氧化能力、SOD、CAT 和 POD 活性均有显著差异($P < 0.05$); MDA 含量存在差异, 但差异不显著($0.05 < P < 0.1$); GSH-Px 活性不存在差异。

表1 斑节对虾幼虾在力竭运动后各恢复时间点的抗氧化指标单因素分析结果

Tab.1 Analysis of oxidation resistance in juvenile *P. monodon* after exhaustive exercise by one-way ANOVA

因变量 Dependent variable	自由度 df	均方 Mean square	F	P
SOD 活性 SOD activity	8	0.621	42.130	0
CAT 活性 CAT activity	8	4.926×10^{-9}	9.171	0
POD 活性 POD activity	8	0.007	2.508	0.047
GSH-Px 活性 GSH-Px activity	8	10.788	0.824	0.592
总抗氧化能力 Total antioxidant capacity	8	0.002	4.749	0.003
MDA 含量 MDA content	8	0.001	2.334	0.065

2.2 斑节对虾幼虾在力竭运动后行为学的变化

在力竭运动后恢复的0~4 h期间,斑节对虾幼虾无附壁、游动等行为,基本保持在放入网箱时所处位置,对捕捞刺激无躲避行为;8 h后,幼虾开始躲藏在网箱角落等位置,并有少量附壁行为,并能对捕捞作出反应;12 h后,附壁的幼虾数量增多;24~72 h期间,附壁、游动和爬行的幼虾数量持续增加。

2.3 斑节对虾幼虾力竭运动后抗氧化酶活性的变化

2.3.1 超氧化物歧化酶活性的变化 如图1A所示,斑节对虾幼虾在力竭运动后的0~1 h内,SOD活性并没有显著变化;4 h时,下降至显著低于对照组的水平($P<0.05$);此后,SOD活性持续保持在较低水平,72 h后,SOD活性仍未恢复至对照组水平($P<0.05$)。

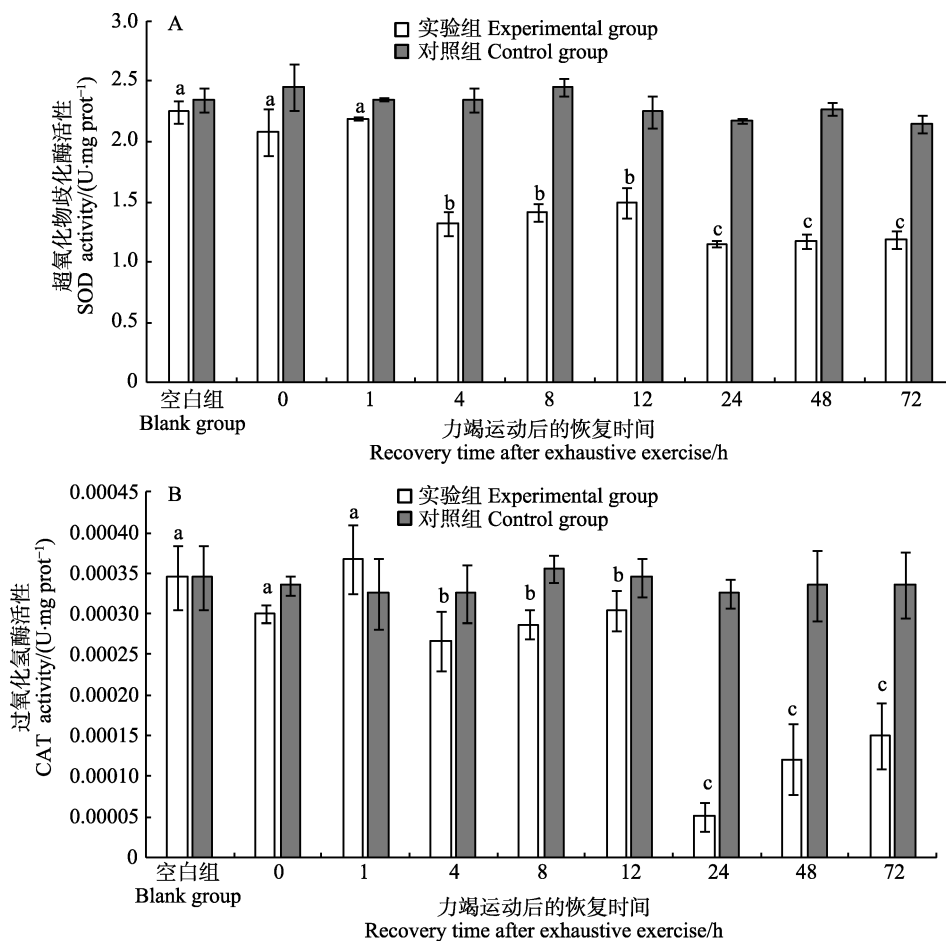


图1 斑节对虾幼虾力竭运动后体内的SOD(A)和CAT(B)活性的变化

Fig.1 SOD (A) and CAT (B) activities in juvenile *P. monodon* after exhaustive exercise

不同字母代表各相邻恢复时间点的实验组间存在显著差异($P<0.05$)。下同
There were significant differences among the index groups with different letters representing different recovery time points ($P<0.05$). The same as below

2.3.2 过氧化氢酶活性的变化 如图 1B 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后的 0~12 h 内, CAT 活性并无显著变化; 但 CAT 活性在 12~24 h 内降低至显著低于对照组的水平($P<0.05$), 在 72 h 后开始缓慢恢复。

2.3.3 过氧化物酶活性的变化 如图 2A 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后的 0~1 h 内, POD 活性与对照组水平并无显著差异; 但 POD 活性从 1 h 后开始下降, 并在 8 h 下降至最低点($P<0.05$); POD 活性在第 8 h 后开始缓慢恢复, 在 48 h 后恢复至比对照组的略高的水平($P<0.05$)。

2.3.4 谷胱甘肽过氧化物酶活性的变化 如图 2B 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后的 0~1 h 内, GSH-Px 活性上升至显著高于对照组的水平($P<0.05$); 之后在 1~24 h 内波动上升, 在 24 h, 活性上升至显著高于对照组的水平($P<0.05$); 在 24 h 后, GSH-Px

活性开始下降, 并在 72 h 恢复至对照组水平。

2.4 斑节对虾幼虾力竭运动后总抗氧化能力的变化

如图 3A 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后, 体内的总抗氧化能力上升, 但与对照组相比并无显著差异; 在 1 h 后, 总抗氧化能力持续降低, 在 12 h 至最低水平, 显著低于 1 h; 而后, 总抗氧化能力在 24 h 达到最高点并高于对照组($P<0.05$), 并在 72 h 后仍保持较高水平。

2.5 斑节对虾幼虾力竭运动后 MDA 含量的变化

如图 3B 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动后 1 h 内, 体内的 MDA 含量上升, 显著高于对照组; 而后在 1~12 h 内持续显著下降, 低于对照组水平($P<0.05$), 之后, 12~24 h 内 MDA 含量显著升高($P<0.05$), 然后又逐渐回落至对照组水平。

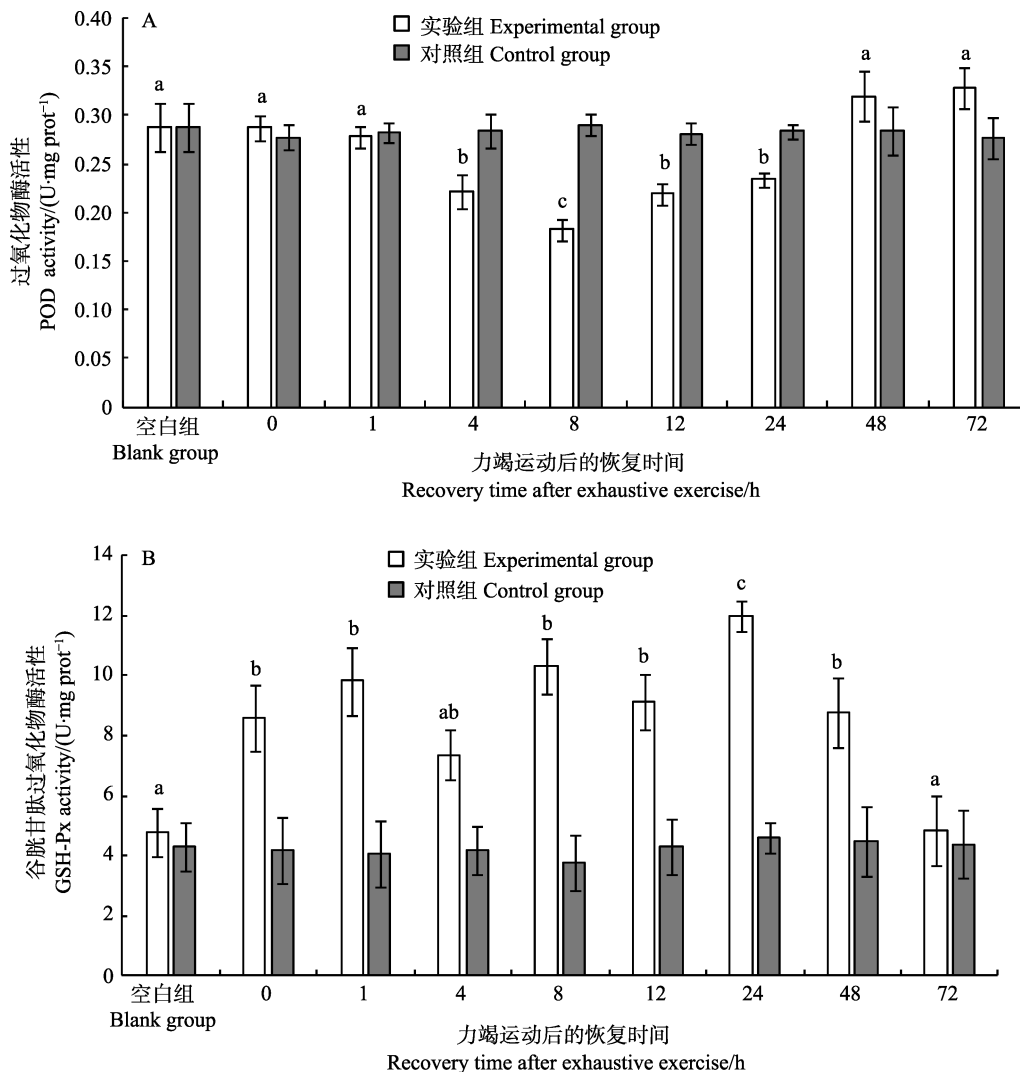


图 2 斑节对虾幼虾力竭运动后体内的 POD (A) 和 GSH-Px (B) 的变化

Fig.2 POD (A) and GSH-Px (B) activities in juvenile *P. monodon* after exhaustive exercise

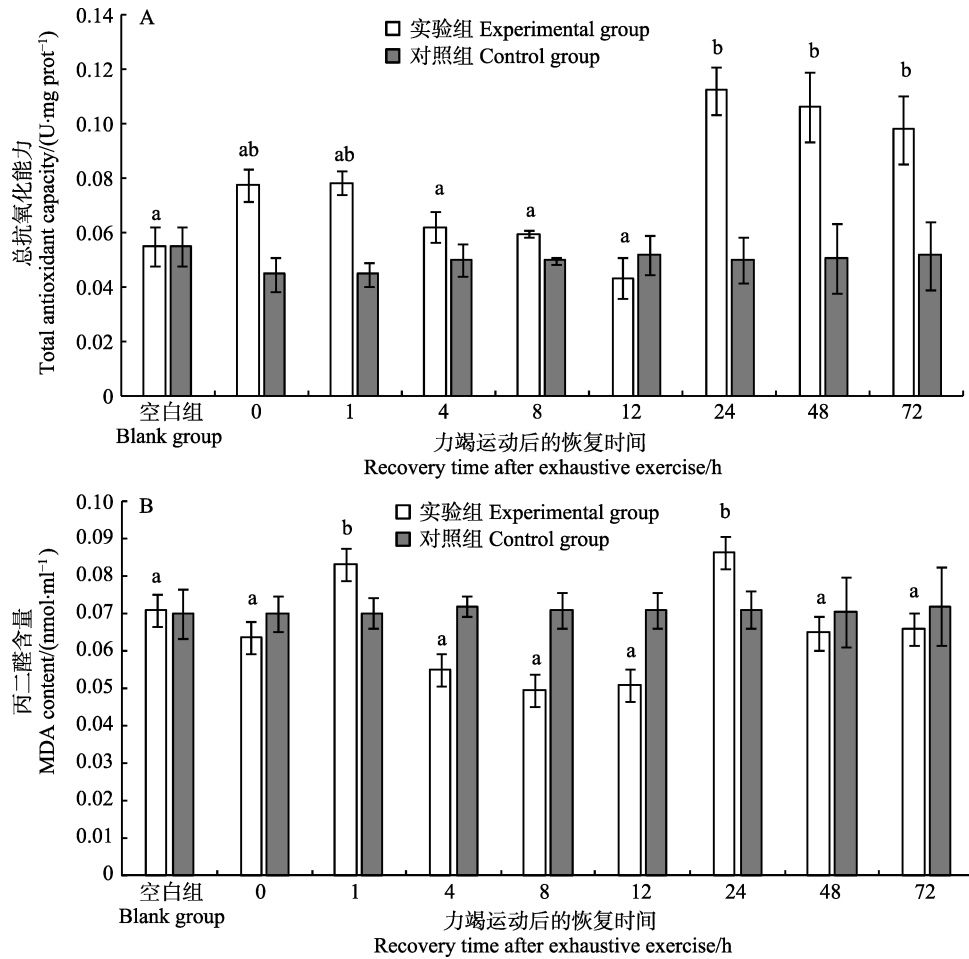


图3 斑节对虾幼虾力竭运动后体内的T-AOC能力(A)和MDA含量(B)的变化

Fig.3 Total antioxidant capacity (A) and MDA content (B) in juvenile *P. monodon* after exhaustive exercise

3 讨论

3.1 力竭运动后斑节对虾幼虾体内抗氧化酶活性的变化

抗氧化酶分布于机体各个组织,可高效清除细胞内自由基,保护细胞和脂质免于自由基的伤害(陈建波等,1999)。幼虾的能量物质储存量少,相较于成熟个体,免疫力和维稳力更低(陈勇,2016;张海恩等,2019)。超氧化物歧化酶(SOD)通过将生物体内超氧根阴离子(O_2^-)转化成 H_2O_2 以清除超氧根阴离子(董亮等,2013),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)通常协同工作,将生物体内的 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 。GSH-Px除能清除 H_2O_2 外,亦有清除能使脂类过氧化的物质($\cdot OH$)的功能(刘冰等,2005;任海等,2014;田清涿等,1992)。因此,抗氧化酶活性高低是反映动物机体的抵御氧化应激能力高低的生理指标。有氧代谢强度升高会对机体的抗氧化平衡造成冲击并影响机体健康,中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)在力竭训练后肌肉

组织中的SOD活性显著上升(于丽娟,2014);力竭运动会致欧鲢(*Leuciscus cephalus*)的体内出现氧化应激的迹象,但SOD、GSH-Px活性并无显著变化,说明抗氧化系统并没有因运动刺激而激活(Aniagu *et al*, 2006);拥挤使南美白对虾(*Penaeus vannamei*)肌肉中的SOD、GSH-Px活性显著降低(王彦波等,2013)。

本研究中,如图1、图2所示,力竭运动后0~1 h内,SOD、CAT和POD活性无显著变化,说明力竭运动过程中,幼虾机体酶促抗应激体系并未激活;但在4 h后,SOD、CAT和POD活性持续下降,其中,POD活性在8 h后逐渐恢复,并在48 h恢复至对照组水平,SOD、CAT活性72 h后仍显著低于对照组水平,说明机体在力竭运动后的4 h后,幼虾机体开始出现氧化应激迹象,并消耗机体中常驻的SOD、CAT和POD进行调节;GSH-Px活性在力竭运动后前24 h内显著上升,与总抗氧化能力的变化趋势接近,说明GSH-Px在幼虾的抗氧化体系中占据主要地位。通过观察对虾恢复期间的行为学变化后发现,幼虾在力竭运动后前4 h内基本不进行运动,推测此时

机体的主要工作为清除机体中积累 O_2^- 和 H_2O_2 。产生氧化应激反应的原因可能是力竭运动后的爆发性有氧代谢(李丹丹等, 2018b), 并且 GSH-Px 活性比其他 3 种抗氧化酶的活性高出几个数量级, 说明在力竭运动恢复过程中的氧化应激反应中, GSH-Px 扮演比其他抗氧化酶更重要的角色; 在 48 h 时, 各抗氧化酶活性恢复到对照组水平, 说明幼虾在力竭运动后的 48 h 后的抗氧化能力足以消除体内的氧化压力, 但机体需要到 72 h 才能使体内的抗氧化能力恢复至新的平衡状态。

3.2 斑节对虾幼虾力竭运动后体内总抗氧化能力与 MDA 含量的变化

总抗氧化能力反映了机体清除氧化性物质的能力和免疫与保护能力的高低(郑洁等, 2017)。组成机体总抗氧化能力的 2 个体系为酶促反应体系和非酶促反应体系, 酶促反应为抗氧化酶催化的氧化还原反应链; 非酶促反应包括各类生物还原性物质(陈建波等, 1999; 韩星星等, 2018; 张涛等, 2018)。谢剑华(2008)在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)日粮中额外添加虾青素, 显著提升了其养殖成活率和抗应激能力。在运动训练后, 黑鲷与中华倒刺鲃组织中的总抗氧化能力均有显著提升(于丽娟, 2014; 虞顺年等, 2018)。

丙二醛作为生物体内脂类过氧化反应的最终产物, 而脂类是生物体内构成膜系统主要的物质和储能物质, 丙二醛含量被认为是反映生物机体受损伤程度的关键指标(宋志明等, 2015; 王彦波等, 2013)。日本沼虾在面对低氧胁迫时, 肝胰腺与肌肉中的 MDA 含量在 0~12 h 内呈逐渐上升的趋势(管越强等, 2010)。养殖密度较高组的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)幼虾体内的 MDA 含量比密度较低组更高(张海恩等, 2019)。MDA 含量是反映机体受损伤程度、对胁迫敏感度和反应烈度的直接指标(杨玉皎等, 2006)。

如图 3 所示, 斑节对虾幼虾在力竭运动结束后的 72 h 内, 体内的 MDA 含量的变化呈双峰形状, 第 1 个峰值出现在 1 h 处, 第 2 个峰值出现在 24 h 处。幼虾力竭运动前后 MDA 水平并无显著差异, 说明力竭运动过程并没有对幼虾机体造成伤害, 但总抗氧化能力已出现上升趋势, 说明机体的非酶抗氧化体系已经激活。如上文所述, 力竭运动前后各抗氧化酶活性与对照组水平无显著差异, 说明在力竭运动后恢复的 1 h 内, 机体中的非酶还原物质提供了一定的抗氧化能力。1 h 时, 幼虾的体内 MDA 含量出现较明显的升高, 总抗氧化能力与 MDA 含量同步上升, 说明在短时间内

幼虾的抗氧化系统感受到体内出现氧化应激并作出响应, 但 MDA 含量的上升反映了机体的非酶体系无法在短时间内消除氧化物质对机体的损伤; 在 1~12 h 期间, 幼虾体内的 MDA 含量和总抗氧化能力逐渐降至最低点, 均显著低于最高点的 1 h 的水平, 说明幼虾通过消耗体内的抗氧化物质, 合成和消耗相关抗氧化酶维持了体内的抗氧化平衡, 并且幼虾在 12 h 后恢复了常见的附壁和游泳等行为; 12~24 h 期间, 由于凌晨时幼虾开始恢复游泳摄食行为, 呼吸代谢活动增强, 抗氧化平衡再次波动, MDA 含量显著升高, 抗氧化体系被持续激活, 机体通过合成 GSH-Px 等抗氧化酶提升机体总抗氧化能力; 24~72 h, 幼虾体内的 MDA 含量恢复到对照组水平, 总抗氧化能力仍高于对照组水平, 说明幼虾机体的抗氧化能力恢复过程存在过量补充的“矫枉过正”现象, 使机体存在消除此前的氧化应激并应对潜在氧化应激的可能。

4 小结

斑节对虾幼虾在力竭运动过程中, 体内不会产生氧化应激反应, 但在力竭运动后恢复过程中, 由于有氧代谢补偿性增强, 导致机体氧化压力升高, 首先激活了幼虾的非酶氧化应激反应, 在非酶抗氧化体系无法消除氧化压力后, 激活酶促抗氧化应激体系。而后, 较长时间内幼虾体内的抗氧化能力显著高于对照组水平, 之后缓慢下降, 抗氧化应激体系在 48 h 时以足以消除因力竭运动而影响的内环境失衡产生的氧化应激, 但幼虾保持体内的高抗氧化能力至 72 h, 以应对具有潜在可能的下一次氧化应激。

在实际的斑节对虾养殖和增殖放流过程中, 应避免频繁捕捞和持续高密度暂养。在捕捞或运输之前, 增加日粮中的维生素 D、类胡萝卜素、虾青素等非酶抗氧化添加剂, 铜、锌和硒等合成抗氧化酶的元素含量, 在暂养和运输水体中添加抗应激剂。在对虾类放流苗种育苗过程中尝试进行运动训练, 增强幼虾的抗氧化能力, 保障增殖放流效果和养殖效益。

参 考 文 献

- Anand SPS, Balasubramanian CP, Christina L, et al. Substrate based black tiger shrimp, *Penaeus monodon* culture: Stocking density, aeration and their effect on growth performance, water quality and periphyton development. *Aquaculture*, 2019, 507: 411–418
- Aniagu SO, Day N, Chipman JK, et al. Does exhaustive exercise result in oxidative stress and associated DNA damage in the chub (*Leuciscus cephalus*)? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2006, 47(8): 616–623

- Berry SE, Simon CJ, Foote AR, *et al.* Evaluation of baseline haemolymph biochemistry, volume and total body energetics to determine an accurate condition index in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 228: 1–9
- Chen GF, Huang J, Song XL. General situation of the immunological capability of shrimp. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(2): 209–215 [陈国福, 黄健, 宋晓玲. 对虾免疫机能研究概况. *水产学报*, 2004, 28(2): 209–215]
- Chen JB, Xia CG, Yu CL, *et al.* Advances in research on mechanism and kinetics of peroxidase catalysis. *Journal of Molecular Catalysis(China)*, 1999, 13(4): 312–320 [陈建波, 夏春谷, 尉迟力, 等. 过氧化物酶催化反应机理和动力学研究进展. *分子催化*, 1999, 13(4): 312–320]
- Chen Y. Effect of stocking density on survival rate and immune enzyme in liver of *Procambarus clarkii*. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 16(55): 4237–4240 [陈勇. 饲养密度对克氏原螯虾成活率和肝胰腺三种免疫酶的影响. *湖北农业科学*, 2016, 16(55): 4237–4240]
- Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, *et al.* The biology of the *Penaeidae*. *Advances in Marine Biology*, 1990, 27(6): 1–461
- Dong L, He YZ, Wang YL, *et al.* Research progress on application of superoxide dismutase (SOD). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(5): 53–58 [董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 53–58]
- Duan Y. Experimental studies on the swimming performance and physio-ecology of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [段妍. 凡纳滨对虾游泳行为为生理生态学实验研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- Guan YQ, Li L, Wang HC, *et al.* Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Hebei University (Natural Science)*, 2010, 30(3): 301–306 [管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响. *河北大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(3): 301–306]
- Han XX, Wang QR, Ye K, *et al.* Effect of xanthophylls and astaxanthin on the skin color and antioxidant capacity of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries Research*, 2018, 40(2): 104–110 [韩星星, 王秋荣, 叶坤, 等. 叶黄素和虾青素对大黄鱼体色及抗氧化能力的影响. *渔业研究*, 2018, 40(2): 104–110]
- Kieffer JD. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2000, 126(2): 161–179
- Kieffer JD. Perspective—Exercise in fish: 50+years and going strong. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 156(2): 163–168
- Li DD, Chen PM, Zhu AY, *et al.* Impacts of transport densities stress on survival rate and immune enzyme activities of black seabream. *Journal of Southern Agriculture*, 2018a, 49(7): 1439–1446 [李丹丹, 陈丕茂, 朱爱意, 等. 密度胁迫对黑鲷运输存活率及免疫酶活性的影响. *南方农业学报*, 2018a, 49(7): 1439–1446]
- Li DD, Chen PM, Zhu AY, *et al.* Recovery level of metabolic enzymes in juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*) after exhaustive exercise. *South China Fisheries Science*, 2018b, 14(6): 59–65 [李丹丹, 陈丕茂, 朱爱意, 等. 黑鲷幼鱼力竭运动后代谢酶活性的恢复水平. *南方水产科学*, 2018b, 14(6): 59–65]
- Liu B, Liang CJ. Recent advances of catalase in organism. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(5): 223 [刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 223]
- McKenzie DJ, Höglund E, Dupont-Prinet A, *et al.* Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture*, 2012, 338–341: 216–222
- Ratanapo S, Chulavatnatol M. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, 102(4): 855–859
- Ren H, Li J, Li JT, *et al.* Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4): 647–655 [任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响. *农业环境科学学报*, 2014, 33(4): 647–655]
- Skjervold PO, Fjæra SO, Østby PB, *et al.* Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2001, 192(2–4): 265–280
- Song ZM, Liu JY, Zhuang P, *et al.* Influence of low-temperature stress on the antioxidant enzymes activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Siganus guttatus*. *Marina Fisheries*, 2015, 37(2): 142–150 [宋志明, 刘鉴毅, 庄平, 等. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 142–150]
- Tian QL, Yin Y, Li YL. Study on the relationship between glutathione peroxidase and animal aging. *Chinese Journal of Gerontology*, 1992, 12(1): 50–52 [田清涑, 殷莹, 李云兰. 谷胱甘肽过氧化物酶和动物衰老关系的研究. *老年学杂志*, 1992, 12(1): 50–52]
- Wang YB, Li HJ, Wang TZ, *et al.* Changes in the muscle quality and enzyme activity of white shrimp, *Penaeus vannamei*, induced by crowding. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(4): 138–142 [王彦波, 李宏吉, 王特樟, 等. 拥挤应激对南美白对虾肌肉品质和酶的影响. *中国食品学报*, 2013, 13(4): 138–142]
- Wu QS. Discussion on remediation and protection of large prawn population resources in the South China Sea. *Fisheries Science and Technology*, 2010(1): 25–28 [吴琴瑟. 南海大型对虾种群资源修复与保护的探讨. *水产科技*, 2010(1): 25–28]
- Xie JH. The effect of astaxanthin on the physiological and biochemical characters in *Macrobrachium nipponense*. Master's Thesis of Hebei University, 2008 [谢剑华. 虾青素对日本沼虾生理生化特征的影响. 河北大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Xing YX, Zhang YX, Fu ZD, *et al.* Study on breeding techniques of large-scale seedlings for proliferation and release of *Penaeus monodon*. *Hebei Fisheries*, 2014(6): 44–45, 51 [邢治炫, 张羽翔, 符致德, 等. 斑节对虾增殖放流大规模苗种培育技术研究. *河北渔业*, 2014(6): 44–45, 51]
- Yang YJ, Wang GL, Jin S, *et al.* The effect of environmental stress on shrimp immune system. *Fisheries Science*, 2006, 25(12): 652–655 [杨玉姣, 王国良, 金珊, 等. 环境胁迫对对虾免疫系统的影响研究. *水产科学*, 2006, 25(12): 652–655]
- Yu LJ. The effects of exercise training on growth, antioxidative ability and immune function in juvenile *Spinibarbus sinensis*. Master's Thesis of Southwest University, 2014 [于丽娟. 运动训练对中华倒刺鲃幼鱼生长、抗氧化及免疫机

- 能的影响. 西南大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Yu SN, Wei XL, Wei FS, *et al.* Wei FS, *et al.* Effects of different exercise intensity on growth and serum and liver antioxidant indices of *Sparus macrocephalus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 255–263 [虞顺年, 魏小岚, 韦芳三, 等. 不同运动强度对黑鲷生长、血清和肝脏抗氧化指标的影响. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 255–263]
- Yu XM. Comparative study of swimming ability and swimming physiology of three penaeid shrimp. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [于晓明. 三种对虾游泳能力及其游泳生理的比较实验研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Zhang HE, He YY, Li J, *et al.* Effects of stocking density on growth, water quality, and antioxidant system of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 140–149 [张海恩, 何玉英, 李健, 等. 密度胁迫对中国对虾幼虾生长、抗氧化系统功能及水质指标的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 140–149]
- Zhang PD. Experimental studies on the behavior and physiology of penaeid shrimps. Master's Thesis of Ocean University of China, 2006 [张沛东. 对虾行为生理生态学的实验研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Zhang T, Zhao JH, Cao JM, *et al.* Effect of astaxanthin on free radicals in kidney of aging rats. *Science and Technology Information*, 2018(17): 214–215 [张涛, 赵佳晖, 曹建民, 等. 虾青素对衰老大鼠肾脏自由基的影响. *科技资讯*, 2018(17): 214–215]
- Zheng J, Meng YT, Liu GJ. Advances in bacterial Mn(II) oxidation by animal haem peroxidases. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(7): 969–977 [郑洁, 孟佑婷, 刘桂君. 动物血红素过氧化物酶参与细菌氧化 Mn(II) 的研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(7): 969–977]

(编辑 陈 辉)

Effect of Recovery Time on Antioxidant Capacity of Juvenile *Penaeus monodon* After Exhaustive Exercise

CHEN Zicong^{1,2}, CHEN Pimao^{1,2}①, YUAN Huarong¹, FENG Xue¹, TONG Fei¹,
CHEN Wenjing¹, LONG Xinling^{1,2}, ZHANG Haoming^{1,2}

(1. Scientific Observing and Experimental Station of South China Sea Fishery Resources and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Marine Ranching Technology, Chinese Academy of Fishery Sciences; Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment; Guangdong Engineering Technology Research Center of Marine Recreational Fishery; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 2. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Exhaustive exercise often occurs in shrimp farming and in the wild. Giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) is an important species in aquaculture and proliferation in China's coastal areas. The study used dip nets to chase juvenile *P. monodon* in the indoor sink, simulated the exhaustive exercise experiment, and explored the recovery process of antioxidant capacity after exhaustive exercise; however, there was no report on the physiological recovery process after the exhaustive exercise of *P. monodon*. The results showed the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant capacity (T-AOC), and malondialdehyde (MDA) content in juvenile *P. monodon* at 0 h after exhaustive exercise. No significant difference from the control group was observed. At 1–12 h, the activities of SOD, CAT, POD, MDA content, and T-AOC continued to decrease, whereas the activity of GSH-Px did not change significantly. At 24 h, the activities of SOD, CAT, and POD were significantly lower than those of the control group, and the activity of GSH-Px, MDA content, and T-AOC were significantly higher than those of the control group. At 72 h, the activities of SOD and CAT were still significantly lower than those in the control group. The activities of GSH-Px, POD, and MDA content were restored in the control group, and T-AOC activity was still significantly higher compared to that in the control group. This indicated that the enzymatic antioxidant system of *P. monodon* was not activated during exhaustive exercise. At 24 h after exhaustive exercise, the antioxidant capacity at 72 h was still at a high level. It was observed that the enzymatic antioxidant system was not activated in juvenile *P. monodon* during exhaustive exercise. The antioxidant capacity of juvenile *P. monodon* is lower within 24 h after exhaustive exercise, then increases significantly after 24 h of exhaustion and remained at that level for a long time. Within 24 h after exercise, further stimulation of juvenile *P. monodon* should be avoided.

Key words Giant tiger prawn (*Penaeus monodon*); Oxidation resistance; Exhaustive exercise; Recovery process

① Corresponding author: CHEN Pimao, E-mail: chenpm@scsfri.ac.cn

DOI:10.19663/j.issn2095-9869.20190902001

http://www.yykxjz.cn/

王想, 任宪云, 绳秀珍, 李翠苹, 李健. 不同光照周期对日本囊对虾生长、蜕皮和糖代谢的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 66-73

Wang X, Ren XY, Sheng XZ, Li CP, Li J. Effects of different photoperiods on growth, molting and glucose metabolism of *Marsupenaeus japonicas*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 66-73

不同光照周期对日本囊对虾生长、 蜕皮和糖代谢的影响*



王 想^{1,2} 任宪云^{2,3} 绳秀珍¹ 李翠苹^{2,4} 李 健^{2,3}①

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究比较分析了不同光照周期(全黑暗 D、光照:黑暗 10L:14D、光照:黑暗 14L:10D、全光照 L)对日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)生长、蜕皮和糖代谢的影响。结果显示,随着光照时间的延长,日本囊对虾的存活率(SR)、特定生长率(SGR)和蜕皮率(MF)逐渐降低,到第 49 天时, L 组日本囊对虾死亡率达 100%。实验结束时, D 组 SR、SGR 和 MF 显著高于 10L:14D 组和 14L:10D 组($P<0.05$),分别为(60.000±2.722)%、(6.966±0.686)%/d 和(4.667±0.363)%/d,但 10L:14D 组和 14L:10D 组间的 SR、SGR 和 MF 差异不显著。不同光照周期对日本囊对虾体内蜕皮抑制激素(MIH)和蜕皮激素(EH)浓度有显著影响。第 30 天时, D 组 MIH 浓度显著低于 10L:14D、14L:10D 和 L 组($P<0.05$), 10L:14D 和 14L:10D 组 MIH 浓度显著低于 L 组($P<0.05$), 10L:14D 和 14L:10D 组间差异不显著;第 60 天时, D 组 MIH 浓度显著低于 10L:14D 和 14L:10D 组($P<0.05$),但 2 组间差异不显著;随着光照时间的延长,日本囊对虾体内 EH 浓度不断降低,第 30 天时, D 组 EH 浓度显著高于 10L:14D、14L:10D 和 L 组($P<0.05$), 10L:14D、14L:10D 和 L 组相比差异不显著;第 60 天时, D 组 EH 浓度显著高于 10L:14D 和 14L:10D 组($P<0.05$),但 2 组间差异不显著。不同光照周期显著影响日本囊对虾的糖代谢,不同处理组血清中的 5-羟色胺(5-HT)、高血糖激素(CHH)和肝胰腺中的糖原磷酸化酶(GP)的变化趋势与上述 MIH 浓度变化趋势一致,而肝胰腺中糖原合酶(GS)的变化趋势与 MIH 浓度变化趋势相反。研究表明,日本囊对虾最适宜生长的环境为全黑暗状态。

关键词 日本囊对虾;光照周期;生长;蜕皮;糖代谢

中图分类号 S966.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0066-08

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicas*)原称日本对虾,其肉质鲜嫩,具有耐低温、耐干燥、生长速度

* 山东省农业良种工程重大课题“优质高抗对虾突破性新品种选育”(2019LZGC014)、农业农村部农业国际合作交流项目——“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作和现代农业产业技术体系(CARS-48)共同资助 [This work was supported by A Major Project of Agricultural Improved Variety Project in Shandong Province-Breeding of Breakthrough New Prawn Varieties with High Quality and Resistance (2019LZGC014), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China-Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries along the Belt and Road, and China Agriculture Research System (CARS-48)].

王 想, E-mail: wangxiang6652@stu.ouc.edu.cn

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-09-02, 收修改稿日期: 2019-09-24

快、价格远高于其他经济虾类等优点, 现已成为许多沿海地区的重要养殖品种(王克行, 1997)。目前, 日本囊对虾主要以池塘养殖为主, 养殖密度偏低, 同时, 又受底质选择(徐涵等, 2015)、病害频发(韩琳等, 2018)、同类相残(陈学雷等, 2003)等因素的影响, 养殖难度加大。日本囊对虾近 2~3 年总体产量不断增加(袁晓初等, 2016; 徐乐俊等, 2018), 但仍然满足不了当前市场的需求, 供需矛盾上升, 急需探寻一种新的养殖模式来解决此问题。对虾工厂化养殖始于 20 世纪末, 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖中应用较为成熟, 但因日本囊对虾有底质选择、同类相残、昼伏夜出的生物学特性, 难以直接借鉴凡纳滨对虾工厂化养殖的经验(李玉全等, 2013)。

光作为重要环境因子, 直接或间接影响水生动物的生长、摄食、存活和繁殖等(周显青等, 2000)。周期性的光强变化和光色波动都会影响凡纳滨对虾的生长(Guo *et al.*, 2012、2013), 不同的光照周期也会影响刺龙虾(*Sagmariasus verreauxi*)的幼体变态发育(Fitzgibbon *et al.*, 2012); 在室内条件下, LED 灯作为光源可以提高凡纳滨对虾的成活率和产量(Fleckenstein *et al.*, 2019); 王馨等(2014)研究不同光照强度对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)呼吸代谢的影响, 表明三疣梭子蟹工厂化养殖的适宜光照强度为 1500 lx; 刘伟等(2011)研究表明, 不同光色对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)稚虾耗氧昼夜变化节律影响显著, 蓝色光下, 中国明对虾代谢耗能较高、存活率较低; 同时, 光也会通过光照强度和光照周期的变化影响甲壳动物的蜕皮抑制激素(MIH)的分泌, 进而影响其蜕皮过程(李旭光等, 2014)。在大多数有眼柄的甲壳动物中存在 X-器窦腺复合体, 该器官合成和分泌高血糖激素家族, 包括高血糖激素(CHH)、MIH、性腺抑制激素(GIH)和大鄂器抑制激素(MOIH)。它们协同调控甲壳动物的生长、繁殖、蜕壳等生理生化过程, 其中, 蜕皮主要受眼柄中 MIH 和 Y 器中蜕皮激素(EH)的调控(杨济芬等, 2009; 亓一舟等, 2010)。当甲壳动物受到外界压力时, 多种神经递质[5-羟色胺(5-HT)]等会促进 X-器窦腺复合体中的高血糖激素家族分泌, MIH 阻碍 EH 的分泌, 高血糖激素也参与蜕皮的调控, 在这个过程中起抑制作用, 同时, 高血糖激素调节血糖水平(de Kleijn *et al.*, 1995; Fanjul-Moles, 2006), 调控肝胰腺中的糖原代谢, 维持各个组织与器官的能量供应; 而在糖原代谢过程中, 存在关键性的酶来调控此反应的进行, 糖原磷酸化酶(GP)是糖原分解中重要的限速酶, 糖原合酶(GS)控制着糖原生成的速度(Nagai *et al.*, 2011)。日本囊对

虾有昼伏夜出的生活习性, 所以, 对光照周期也有一定的要求, 此前关于光照对日本囊对虾生长的研究已有报道, 但仅停留在存活率、生长等表观指标 方面(周志华等, 1999), 罕见其有关生理影响机制方面的报道。本研究以日本囊对虾为对象, 在室内条件下, 探究不同光照时间对日本囊对虾生长、蜕皮和糖代谢的影响, 以期日本囊对虾工厂化养殖提供参考数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验于 2018 年 7 月 7 日~9 月 5 日在山东潍坊海丰水产养殖有限责任公司进行, 历时 60 d。日本囊对虾苗购于山东日照海辰水产有限公司, 经过约 15 d 的暂养后用于实验。暂养期间, 水体溶解氧(DO)> 5 mg/L, 日换水量为总水量的 20%~30%, 每日投喂 4 次(07:00、12:00、17:00、22:00)冰鲜大卤虫(*Artemia salina*)。白天和晚上投喂比例为 4 : 6; 投喂量占虾总体重的 15%~20%。实验用沙购于市场, 经筛网筛选后, 得到粒径不超过 0.5 mm 的细沙, 并经 ClO₂ 溶液消毒处理, 清水冲洗, 晾干后备用。实验对象初始体长为(1.930±0.217) cm, 初始体重为(0.064±0.020) g。

1.2 实验设计

本实验设置全黑暗(D), 光照:黑暗=10L:14D, 光照:黑暗=14L:10D, 全光照(L) 4 个不同的实验组, 所有实验组均设置 3 个平行, 所用光源为白炽灯, 光照强度为 200 lx。在体积为 200 L 的白色 PVC 桶中进行实验, 内铺设厚度为 10 cm 的细沙, 注水 140 L, 每桶放 30 尾日本囊对虾, 在桶的最上层固定网目为 10 目的纱网, 以防止日本囊对虾跳出。

1.3 实验管理

实验期间, 日投饵量约为日本囊对虾体重的 10%~15%, 分别于 08:00、17:00 进行投喂, 上午:傍晚投喂比例为 3 : 7; 每日 07:00 用虹吸管换底层水 20%~30%, 所用海水为自然海水, 水温为 26.1℃~31.5℃, 盐度为 30.69~33.46, pH 为 7.94~8.22。实验期间, 保持连续充气, 使水体 DO 含量 ≥ 5mg/L, 发现死虾及时捞出。

1.4 样品收集和指标测定

实验前随机取 30 尾日本囊对虾测量体重。实验期间, 每隔 30 d 从各实验组随机选取 6 尾日本囊对虾(蜕壳间期), 分别取血清、肝胰腺, 所有操作均在冰上进行。测血清中 5-HT、CHH、MIH、EH 的浓度;

测肝胰腺中 GS、GP 的酶活,上述指标均由上海酶联生物科技有限公司提供的试剂盒测定,所有操作按说明书上的步骤进行。血清是经血液与抗凝剂(柠檬酸钠 7.49 g/L、NaCl 19.6 g/L、葡萄糖 22.8 g/L、乙二胺四乙酸二钠 3.3 g/L、pH 为 7.5)体积 1:1 混合后,4℃,3500 r/min 离心 10 min 获得。每日统计不同光照周期组的日本囊对虾蜕壳数;实验结束后,统计各组存活个数,并测量其体重。

1.5 数据计算与统计分析

实验结束后,日本囊对虾的成活率(Survival rate, SR,%),体重特定生长率(Specific growth rate, SGR,%/d)和蜕壳率(Molting frequency rate, MF,%/d)分别按下列公式计算:

$$SR(\%)=(N_1-N_2)/N_1 \times 100$$

$$SGR(\%/d)=(\ln W_2-\ln W_1)/T \times 100$$

$$MF(\%/d)=(N_m/N_s)/T$$

式中, N_1 和 N_2 为实验开始时日本囊对虾个数和结束时死亡对虾的个数, W_2 和 W_1 为结束和初始时对虾的湿重(g); T 为实验持续的时间(d); N_m 为实验期间蜕壳次数; N_s 为每桶养虾数。

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,利用单因素方差(One-way ANOVA)和多重比较检验分析不同光照组日本囊对虾生长、神经递质 5-HT、各激素浓度和糖代谢酶活性的差异, $P<0.05$ 为显著水平。采用 Origin 2018 软件绘制图表。

2 结果

2.1 光照周期对日本囊对虾存活、生长、蜕皮的影响

不同光照周期对日本囊对虾存活、生长、蜕皮的影响见表 1。从表 1 可以看出,经过不同的光照时间,日本囊对虾的存活情况受到不同程度的影响。实验进行到 49 d 时,L 组日本囊对虾已全部死亡;实验结束时,D 组 SR 最高,为(60.000±2.722)%,14L:10D 组和 10L:14D 组 SR 差异不显著($P>0.05$),但随着光照时间的增加,SR 显著下降($P<0.05$)。

光照周期显著影响日本囊对虾的生长(表 1)。L 组实验结束时,日本囊对虾全部死亡,其 SGR 没有数据。D 组的 SGR 最高,为(6.966±0.686)%/d,显著高于 14L:10D 和 10L:14D 组,10L:14D 和 14L:10D 组相比差异不显著($P>0.05$)。

不同光照周期对日本囊对虾 MF 有显著影响。D 组的 MF 显著高于 14L:10D 和 10L:14D 组,为(4.667±0.363)%/d ($P<0.05$),10L:14D 和 14L:10D 组相比差异

表 1 不同光照周期对日本囊对虾存活、生长、蜕皮的影响
Tab.1 Effects of different photoperiod on survival, growth and molting of *M. japonicas*

处理组 Treatment	成活率 SR(%)	特定生长率 SGR(%/d)	蜕壳率 MF(%/d)
全黑暗 D	60.000± 2.722 ^a	6.966± 0.686 ^a	4.667± 0.363 ^a
光照:黑暗 L:D=10:14	41.111± 4.157 ^b	6.418± 0.933 ^b	2.944± 0.318 ^b
光照:黑暗 L:D=14:10	35.556± 1.571 ^b	6.429± 0.656 ^b	2.611± 0.272 ^b
全光照 L	—	—	—

注:同一列不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Note: Means with different letters within the same column are significantly different at the 0.05 probability level

不显著($P>0.05$)。

2.2 光照周期对日本囊对虾 5-HT、CHH、MIN 和 EH 浓度的影响

实验结束时,L 组日本囊对虾已全部死亡,无法取样,相关指标无法检测,因此,60 d 时只能进行前 3 个实验组的比较。

不同光照周期对日本囊对虾 5-HT 浓度的影响见图 1。从图 1 可以看出,30 d 时,随着光照时间的延长,对虾血清中的 5-HT 浓度不断提高,D 组的 5-HT 浓度显著低于其他 3 个实验组($P<0.05$),为(0.086±0.030) ng/ml;10L:14D 和 14L:10D 组的 5-HT 浓度显著低于 L 组($P<0.05$),但 10L:14D 和 14L:10D 组间相

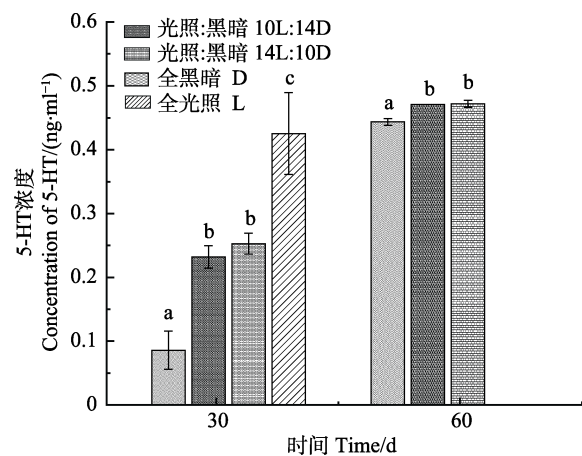


图 1 不同光照周期对日本囊对虾 5-HT 浓度的影响

Fig.1 Effects of different photoperiod on the concentrations of 5-HT in *M. japonicas*

同一时间不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同
Different letters indicate significant differences at the same time, the same as below

比差异不显著($P > 0.05$)。随着实验的进行, 各个实验组的 5-HT 浓度均有不同程度的增加; 60 d 时, D 组的 5-HT 浓度显著低于 10L:14D 和 14L:10D 组, 为 (0.444 ± 0.005) ng/ml ($P < 0.05$); 但 10L:14D 和 14L:10D 组间相比差异不显著($P > 0.05$)。

不同光照周期对 CHH 浓度的影响见图 2。从图 2 可以看出, 随着实验的进行, 不同处理组的 CHH 浓度不断提高。30 d 时, 随着光照时间的延长, 各实验组的 CHH 浓度不断升高, D 组的 CHH 浓度显著低于 10L:14D、14L:10D 和 L 组 ($P < 0.05$), 为 (0.007 ± 0.001) ng/ml; 10L:14D 和 14L:10D 组显著低于 L 组 ($P < 0.05$), 但 10L:14D 和 14L:10D 组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。60 d 时, D 组的 CHH 浓度显著低于 10L:14D 和 14L:10D 组 ($P < 0.05$), 为 (0.041 ± 0.002) ng/ml, 10L:14D 和 14L:10D 组相比无显著差异。

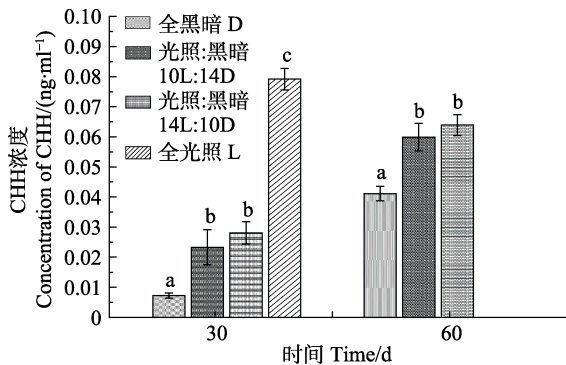


图 2 不同光照周期对日本囊对虾 CHH 浓度的影响
Fig.2 Effects of different photoperiod on the concentrations of CHH in *M. japonicas*

不同光照周期对 MIH 浓度的影响见图 3。从图 3 可以看出, 实验进行 30、60 d 时, 随着光照周期的增强, 日本囊对虾血清中的 MIH 浓度不断升高。30 d 时, D 组的 MIH 浓度显著低于其余 3 个实验组 ($P < 0.05$), 为 (0.055 ± 0.002) ng/ml, 10L:14D 和 14L:10D 组间无显著差异 ($P > 0.05$), 但这 2 个实验组显著低于 L 组 ($P < 0.05$)。60 d 时, D 组显著低于 10L:14D 组和 14L:10D 组, 为 (0.066 ± 0.002) ng/ml; 10L:14D 和 14L:10D 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

不同光照周期对 EH 浓度的影响见图 4。从图 4 可以看出, 30、60 d 时, 随着光照时间的延长, 日本囊对虾血清中的 EH 浓度不断降低。其中, 30 d 时, D 组的 EH 浓度显著高于其余 3 个实验组 ($P < 0.05$), 为 (0.070 ± 0.012) ng/ml, 剩余 3 个实验组间无显著差异, 但 L 组的 EH 浓度是 4 个实验组中最低的。60 d 时, D 组的 EH 浓度显著高于 10L:14D 和 14L:10D 组 ($P < 0.05$), 为 (0.146 ± 0.015) ng/ml; 10L:14D 和 14L:10D

组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 光照周期日本囊对虾 GP 和 GS 活性的影响

不同光照周期对 GP 活性的影响见图 5。从图 5 可以看出, 实验进行 30、60 d 时, 随着光照时间的延长, 对虾肝胰腺中的 GP 活性不断升高。30 d 时, D 组 GP 活性显著低于其余 3 个实验组 ($P < 0.05$), 为

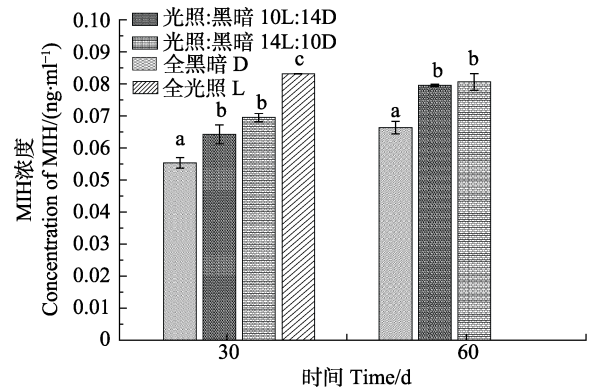


图 3 不同光照周期对日本囊对虾 MIH 浓度的影响
Fig.3 Effects of different photoperiod on the concentrations of MIH in *M. japonicas*

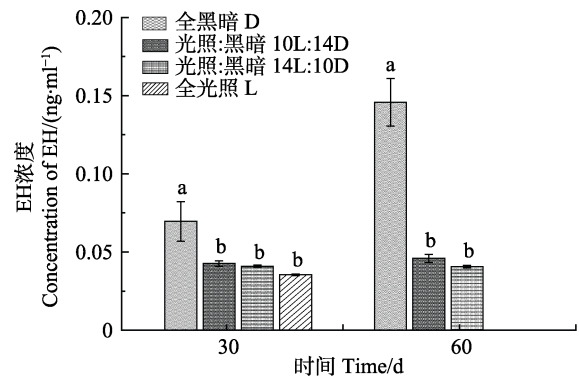


图 4 不同光照周期对日本囊对虾 EH 浓度的影响
Fig.4 Effects of different photoperiod on the concentrations of EH in *M. japonicas*

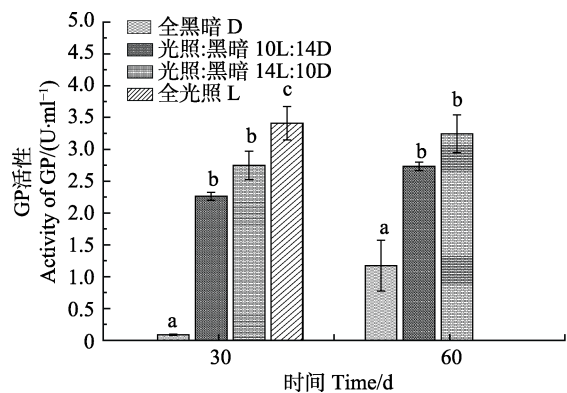


图 5 不同光照周期对日本囊对虾 GP 活性的影响
Fig.5 Effects of different photoperiod on the activity of GP in *M. japonicas*

(0.088 ± 0.009) U/ml, 10L:14D 和 14L:10D 组相比无显著差异, 但这 2 个组显著低于 L 组($P < 0.05$)。60 d 时, D 组显著低于 10L:14D 和 14L:10D 组, 为(1.173 ± 0.400) U/ml; 10L:14D 和 14L:10D 组相比差异不显著($P > 0.05$)。

不同光照周期对 GS 活性的影响见图 6。从图 6 可以看出, 30、60 d 时, 随着光照时间的延长, 日本囊对虾肝胰腺中的 GS 活性不断降低。其中, 30 d 时, D 组的 GP 显著高于其余 3 个组($P < 0.05$), 为(43.155 ± 2.844) U/ml, 10L:14D 和 14L:10D 组相比无显著差异, 但这 2 个实验组显著高于 L 组($P < 0.05$)。60 d 时, D 组的 GP 显著高于 10L:14D 和 14L:10D 组, 为(41.997 ± 2.942) U/ml; 10L:14D 组和 14L:10D 组相比差异不显著($P > 0.05$)。

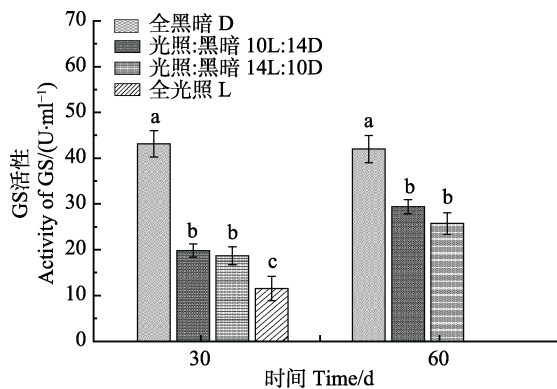


图 6 不同光照周期对日本囊对虾 GS 活性的影响

Fig.6 Effects of different photoperiod on the activity of GS in *M. japonicas*

3 讨论

3.1 不同光照周期对甲壳动物存活和生长的影响

许多研究表明, 光照周期对甲壳动物的存活和生长有影响, 但因种而异(王芳等, 2004; Baloi *et al.*, 2013; Pati *et al.*, 2015; 俞震颀等, 2016)。王芳等(2005)研究表明, 14L:10D 和 18L:6D 光周期不影响中国对虾的生长; 周志华等(1999)研究表明, 全黑暗状态下, 日本囊对虾的存活率和生长率最高; Pati 等(2015)研究表明, 黑暗状态下, 斑节对虾(*Penaeus monodon*)的生长速度最快; Andrés 等(2010)研究认为, 远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)最适宜生长的光周期为 18L:6D。本研究结果显示, 全黑暗状态下, 日本囊对虾的 SR、SGR、MF 最高, 10L:14D 和 14L:10D 组相比差异不显著; 与周志华等(1999)、Pati 等(2015)的研究结果基本一致, 与 Andrés 等(2010)的研究结果有所不同。可见, 不同物种间最适宜生长的光照

周期是有所差异的。

3.2 不同光照周期对甲壳动物蜕皮的影响

甲壳动物的生长与蜕皮主要受不同神经激素的调控(Chen *et al.*, 2003), 而生物胺主要调节这些激素的合成和释放(Richardson *et al.*, 1991)。5-HT 作为生物胺的一种, 是存在甲壳动物神经系统中的一种重要神经递质, 间接调节各种生理过程, 包括新陈代谢、繁殖和甲壳动物的蜕皮等(Fingerman *et al.*, 1994)。当受到外界环境胁迫时, 甲壳动物会释放神经递质(5-HT 等)促进 MIH 的释放, 从而对蜕皮进行调控, 同时, 甲壳动物蜕皮也受 Y 器官分泌 EH 的调节, 这 2 种激素有拮抗的作用(de Kleijn *et al.*, 1995; Fanjul-Moles, 2006)。Aiken(1969)研究表明, 长时间光照会抑制甲壳动物的 MIH 合成与释放, 从而缩短蜕皮周期时间, 短时间光照则效果相反。而徐建荣等(2006)则认为, 光照对甲壳动物蜕皮的影响因其不同发育阶段的变化而变化, 长时间光照会影响中华绒毛蟹(*Eriocheir sinensis*) I~IV 期幼蟹的蜕壳生长, 而当大眼幼体变态发育到 I 期仔蟹后, 对光照的适应性也由趋光性转为避光性, 主动选择水草以及掩蔽物等弱光区域进行蜕皮。本研究表明, 随着光照时间的延长, 日本囊对虾体内的 5-HT 浓度不断升高, MIH 浓度也随光照时间的增加而不断升高, EH 浓度有下降的趋势, 最终不同组的 MF 也呈显著下降的趋势。D 组的 5-HT、MIH 浓度显著低于有光照组($P < 0.05$), EH 浓度显著高于有光照组, 但有光照组间差异不显著; D 组的 MF 显著高于 10L:14D 和 14L:10D 组($P < 0.05$), 10L:14D 和 14L:10D 组之间差异不显著。这表明在黑暗状态下, 日本囊对虾受到的胁迫程度最小, 最适宜生存, 而全光照下, 日本囊对虾受到的胁迫程度最大, 最不适宜其生存。本研究中, EH 浓度的变化趋势与 MF 有所不同, 推测光照时间达到一定时长后, 可能不会对蜕皮激素的分泌产生促进作用, 但同时对其产生作用的光照时长范围还未确定, 有待进一步研究。

3.3 不同光照周期对甲壳动物糖代谢的影响

当受到外界环境胁迫时, 甲壳动物会释放神经递质(5-HT 等)促进 CHH 的释放, CHH 作用于肝胰腺, 参与糖原代谢, 从而调节血糖水平(杨济芬等, 2009; Nagai *et al.*, 2011; Fossat *et al.*, 2014)。在糖原代谢过程中, 存在 2 种调节糖原的合成和分解至关重要的酶, 分别为 GS 和 GP。本研究中, 随着光照时间的延长, 5-HT 浓度不断提高, CHH 激素也不断增加, GP 活性不断上升, 而 GS 活性不断降低。第 30 天时, D

组的 5-HT、CHH 浓度和 GP 活性显著低于光照组 ($P<0.05$), 10L:14D 和 14L:10D 组间差异不显著, 但是低于 L 组 ($P<0.05$); D 组 GS 活性显著高于光照组 ($P<0.05$), 10L:14D 和 14L:10D 组间差异不显著, 但显著高于 L 组 ($P<0.05$)。第 60 天时, 日本囊对虾 5-HT、CHH、GP、GS 含量呈现与第 30 天相同的趋势。这表明在全黑暗状态下, 糖原分解代谢水平最低, 有利于糖原积累, 进而促进对虾的生长。有研究表明, 在凡纳滨对虾体内注射多巴胺(DA)、5-HT 后, 血淋巴酚氧化酶活力明显升高, 溶菌和抗菌活力显著下降, 而且 DA 比 5-HT 对免疫指标的影响更显著(胡发文等, 2007)。生物胺作为一种神经内分泌信号, 引发甲壳动物产生不同的免疫应激适应过程, 导致机体免疫防御能力下降。本研究结果表明, 5-HT 浓度随光照时间的延长而增加, 从侧面也说明, 光照时间越长, 日本囊对虾机体免疫能力越低, 其 SR 也越低。综上所述, 日本囊对虾最适宜生长的环境为黑暗状态。

参 考 文 献

- Aiken DE. Photoperiod, endocrinology and the crustacean moult cycle. *Science*, 1969, 164: 149–155
- Andrés M, Rotllant G, Zeng CS. Survival, development and growth of larvae of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, cultured under different photoperiod conditions. *Aquaculture*, 2010, 300(1–4): 218–222
- Baloi M, Arantes R, Schweitzer R, *et al.* Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacultural Engineering*, 2013, 52: 39–44
- Chen XL, Lin QW, Li SJ, *et al.* Observations and studies on the cannibalism among post larvae of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2003, 42(3): 358–362 [陈学雷, 林琼武, 李少菁, 等. 日本对虾仔虾相残的实验研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(3): 358–362]
- Chen YN, Fan HF, Hsieh SL, *et al.* Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2003, 228(1): 383–395
- de Kleijn DP, van Herp F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 112(4): 573–579
- Fanjul-Moles ML. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2006, 142(3–4): 390–400
- Fingerman M, Nagabhusanam R, Rachakonda S, *et al.* Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *Journal of Crustacean Biology*, 1994, 14(3): 413–437
- Fitzgibbon QP, Battaglione SC. Effect of photoperiod on the culture of early-stage phyllosoma and metamorphosis of spiny lobster (*Sagmariasus verreauxi*). *Aquaculture*, 2012, 368–369: 48–54
- Fleckenstein LJ, Tierney TW, Fisk JC, *et al.* Effects of supplemental LED lighting on water quality and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) performance in intensive recirculating systems. *Aquaculture*, 2019, 504: 219–226
- Fossat P, Bacque-Cazenave J, De Deurwaerdere P, *et al.* Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science*, 2014, 344(6189): 1293–1297
- Guo B, Wang F, Li Y, *et al.* Effect of periodic light intensity change on the molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2013, 396–399: 66–70
- Guo B, Mu YC, Wang F, *et al.* Effect of periodic light color change on the molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2012, 362–363: 67–71
- Han L, Wang XH, Yang B, *et al.* Analysis of pathogen in an outbreak death of *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 431–441 [韩琳, 王秀华, 杨冰, 等. 一例日本囊对虾暴发性死亡的病原分析. 水产学报, 2018, 42(3): 431–441]
- Hu FW, Pan LQ, Yang HZ. Effects of injecting biogenic amines on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *热带海洋学报*, 2007, 26(5): 64–68 [胡发文, 潘鲁青, 杨慧赞. 注射生物胺对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 64–68]
- Li XG, Zhou G, Gu XH. Review of aquatic crustaceans molting and its influencing factors. *Chinese Journal of Zoology*, 2014, 49(2): 294–302 [李旭光, 周刚, 谷孝鸿. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展. 动物学杂志, 2014, 49(2): 294–302]
- Li YQ, Wang RJ, Jiang LX. Effects of density-stress on water quality and growth of *Marsupenaeus japonicus*. *Marine Sciences*, 2013, 37(10): 53–57 [李玉全, 王仁杰, 姜令绪. 密度胁迫对日本囊对虾生长和水环境的影响. 海洋科学, 2013, 37(10): 53–57]
- Liu W, Wang F, Zhong DS, *et al.* The effect of light colour on the diel rhythm of oxygen consumption rate in juvenile Chinese shrimp, *Fenneropenaeus Chinensis*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2011(3): 27–31 [刘伟, 王芳, 钟大森, 等. 光色对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)稚虾耗氧率昼夜变化节律的影响. 海洋湖沼通报, 2011(3): 27–31]
- Nagai C, Nagata S, Nagasawa H. Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(2): 293–304

- Pati S, Chatterji A, BP D. A study on the growth of juveniles of tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius) under different photoperiods. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 2015, 6(12): 385
- Qi YZ, Zhu DF, Yang JF, *et al.* Cellular mechanism of molt-inhibiting hormone action in the crustacean. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 165–170 [齐一舟, 朱冬发, 杨济芬, 等. 甲壳动物蜕皮抑制激素调控机制的研究进展. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 165–170]
- Richardson HG, Deccaraman M, Fingerman M. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, C99: 53–56
- Wang F, Dong SL, Dong SS, *et al.* Effects of photoperiod on the molting and growth of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(4): 354–359 [王芳, 董双林, 董少帅, 等. 光照周期对中国对虾稚虾蜕皮和生长的影响. *中国水产科学*, 2004, 11 (4): 354–359]
- Wang F, Zhang JD, Dong SL, *et al.* The effects of light intensity and photoperiod on the growth of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*. *Periodical of Ocean University of China(Natural Science)*, 2005, 35(5): 768–772 [王芳, 张建东, 董双林, 等. 光照强度和光照周期对中国明对虾稚虾生长的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2005, 35 (5): 768–772]
- Wang KX. *Shrimp and crab aquaculture*. Beijing:China Agriculture Press, 1997, 218–219 [王克行. 虾蟹类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 1997, 218–219]
- Wang X, Wang F, Lu YL, *et al.* Effects of light intensity on the respiratory metabolism of swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 237–243 [王馨, 王芳, 路允良, 等. 光照强度对三疣梭子蟹呼吸代谢的影响. *水产学报*, 2014, 38(2): 237–243]
- Xu H, Xiong DL, Wu YL, *et al.* Effects of breeding density and substratum types on growth and survival of *Marsupenaeus japonicus*. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(4): 923–925 [徐涵, 熊慧, 吴亚林, 等. 养殖密度、底质类型对日本囊对虾生长、存活的影响. *湖北农业科学*, 2015, 54(4): 923–925]
- Xu JR, Shen SD, Zhang JM, *et al.* Influence of environment on molting and growth of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) Megalopa. *Fisheries Science*, 2006(10): 505–508 [徐建荣, 沈颂东, 张加梅, 等. 环境条件对中华绒螯蟹大眼幼体蜕壳生长的影响. *水产科学*, 2006(10): 505–508]
- Xu LJ, Lü YH. *China fishery statistical yearbook of 2018*. Beijing:China Agriculture Press, 2018, 145 [徐乐俊, 吕永辉. 2018 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018, 145]
- Yang JF, Zhu DF, Shen JM, *et al.* Physiological significance of crustacean hyperglycemic hormone family. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(1): 151–158 [杨济芬, 朱冬发, 沈建明, 等. 甲壳动物高血糖激素家族生理功能研究进展. *动物学杂志*, 2009, 44(1): 151–158]
- Yu ZJ, Zhang WB, Liu QG. Impact of culture pattern and light intensity on growth in pacific white leg shrimp and on water quality. *Fisheries Science*, 2016, 35(4): 321–326 [俞震颀, 张文博, 刘其根. 不同养殖模式及光照对凡纳滨对虾生长和水质的影响. *水产科学*, 2016, 35(4): 321–326]
- Yuan XC, Zhao WX. *China fishery statistical yearbook of 2016*. Beijing: China Agriculture Press, 2016, 28 [袁晓初, 赵文武. 2016 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016, 28]
- Zhou XQ, Niu CJ, Li QF. Effects of light on feeding behavior growth and survival of aquatic animals. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000(2): 178–181 [周显青, 牛翠娟, 李庆芬. 光照对水生动物摄食、生长和存活的影响. *水生生物学报*, 2000(2): 178–181]
- Zhou ZH, Fu WQ, Zhang WH. The effect of lights on the growth of *Penaeus japonicus* in laboratorial raising. *Fujian Animal Husbandry and Veterinary*, 1999(2): 6–7 [周志华, 傅文庆, 张文焕. 光线对实验室桶养日本对虾生长影响的研究. *福建畜牧兽医*, 1999(2): 6–7]

(编辑 陈 严)

Effects of Different Photoperiods on Growth, Molting and Glucose Metabolism of *Marsupenaes japonicas*

WANG Xiang^{1,2}, REN Xianyun^{2,3}, SHENG Xiuzhen¹, LI Cuiping^{2,4}, LI Jian^{2,3①}

- (1. Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;
4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract This study compared the effects of different photoperiods (D, 10L:14D, 14L:10D, L) on the growth, molting and glucose metabolism of *Marsupenaes japonicus*. The results showed that different photoperiods had significant effects on the growth, molting, and glucose metabolism of *M. japonicus*. With the extension of illumination time, the survival rate (SR), specific growth rate (SGR), and molting rate (MF) of these shrimps decreased gradually. By day 49, the mortality of the shrimps in the group L reached 100%. At the end of the experiment, SR, SGR, and MF were significantly higher in the group D ($60.000\pm 2.722\%$) than in the 10L:14D ($6.966\pm 0.686\%/d$) and 14L:10D ($4.667\pm 0.363\%/d$) groups ($P<0.05$). However, the differences in SR, SGR, and MF between the 10L:14D and 14L:10D groups were not significant. Different photoperiods significantly affected the concentration of molting inhibitory hormone (MIH) and ecdysone hormone (EH) in Japanese prawns. On day 30, the concentration of MIH was significantly lower in the group D than in the 10L:14D, 14L:10D, and L groups ($P<0.05$), and the concentrations of MIH were significantly lower in the 10L:14D and 14L:10D groups than in the group L ($P<0.05$); the differences in the 10L:14D and 14L:10D groups were not significant. On day 60, the concentration of MIH was significantly lower in the group D than in the 10L:14D and 14L:10D groups ($P<0.05$), but the differences between the two groups were not significant. The concentration of EH in the shrimps decreased continuously with the extension of the illumination time. On day 30, the concentration of EH was significantly higher in the group D than in the 10L:14D, 14L:10D, and L groups ($P<0.05$); however, there were no significant differences between these three groups. On day 60, the concentration of EH was significantly higher in the group D than in the 10L:14D and 14L:10D groups ($P<0.05$), but the differences between the two groups were not significant. Different photoperiods significantly affected the glucose metabolism of shrimps, and the changes in serotonin (5-HT), crustacean hyperglycemic hormone, and glycogen phosphorylase levels in the hepatopancreas of different treatment groups showed the same trend as the concentration of MIH mentioned above, whereas the changes in glutamine synthetase levels in the hepatopancreas exhibited an exactly opposite trend. Taken together, these findings indicate that a dark state is the most suitable environment for optimum growth of the Japanese prawn.

Key words *Marsupenaes japonicus*; Photoperiod; Growth; Molting; Glucose metabolism

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191024001

http://www.yykxjz.cn/

肖威, 单洪伟, 马甦, 李忠帅. 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 74-81
Xiao W, Shan HW, Ma S, Li ZS. Effects of chronic nitrite stress on body composition and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 74-81

亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾 体成分和糖代谢的影响*



肖 威 单洪伟 马 甦^① 李忠帅

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 为研究亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)慢性胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)[(2.03±0.33) g]生长、摄食、体成分和糖代谢的影响, 实验设置 0 (对照组)、8 (N8 组)、15 (N15 组)和 30 mg/L (N30 组) $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度组, 进行 36 d 的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫实验。结果显示, 随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度升高, 对虾的终末体重、特定生长率、增重率和日摄食率均呈显著下降趋势。N8 组和 N15 组对虾的血糖和肝胰腺中糖原含量在实验中期高于对照组, 但最终均低于对照组, 而肌肉中糖原含量在实验期间始终低于对照组。胁迫组凡纳滨对虾肌肉中的己糖激酶活力低于对照组; 而肝胰腺己糖激酶活力和丙酮酸激酶活力均高于对照组, 同时, 肝胰腺乳酸含量与乳酸脱氢酶活力呈先上升后下降的趋势, 最终与对照组相比无显著差异。终末体成分中, N30 组的粗脂肪含量显著低于对照组。结果表明, $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会降低对虾食欲, 减缓凡纳滨对虾的生长, 机体糖代谢调节可作为对虾应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫的短期响应, 对虾对脂质的利用在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫过程中起重要作用。

关键词 凡纳滨对虾; 亚硝态氮胁迫; 体成分; 糖代谢

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0074-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国主要甲壳动物养殖品种之一。2018 年, 全国养殖产量为 176 万 t, 为国内甲壳动物养殖总量的 34.2% (国家统计局, 2019)。凡纳滨对虾高密度养殖期间, 大量饲料的投入和粪便的排出, 使水体中含氮废物含量不断提高(寇红岩等, 2014; Wang *et al*, 2019), 其在亚硝化细菌的作用下很快转化成亚硝态氮, 但能将亚硝态氮降解的硝化细菌却生长速度缓慢, 最终导致水体中的亚硝态氮大量积累(姚艳玲等, 2018), 在养殖后期, 水中的亚硝态氮含量达到 20 mg/L (Tseng *et al*, 2004)。水体中高浓度的 NO_2 会与 Cl^- 以及其他阴离子争夺对虾鳃上的吸收位点(寇红岩等, 2014; Wang *et al*, 2016),

通过血液运输在对虾体内各部分不断积累, 一部分 NO_2 还会在对虾体内转化成 NO_3^- 、尿素和谷氨酸(Tsng *et al*, 2004)。

亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)胁迫会降低虾类血蓝蛋白载氧能力, 是高浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 对虾类产生毒性的主要原因(寇红岩等, 2014)。急性 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫会降低虾类的存活率(Lin *et al*, 2003; 寇红岩等, 2014), 破坏虾类血细胞(郭慧等, 2015)、肝胰腺和鳃等组织结构(吕晓燕等, 2010), 降低虾类机体免疫力(Wang *et al*, 2004), 增加虾类对病菌的易感性(黄翔鸽等, 2006; 葛红星等, 2014), 破坏虾类的正常代谢(Jiang *et al*, 2014)。研究表明, 虾类长期生活在低浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 环境中, 有利

* 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题(KLM2018010)资助 [This work was supported by the Open Fund of the Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China (KLM2018010)]. 肖 威, E-mail: 576670096@qq.com

① 通讯作者: 马 甦, 教授, E-mail: mashen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-10-24, 收修改稿日期: 2019-11-27

于摄食能转化为生长能(朱其建等, 2014), 并且在一定范围内, 盐度越高, 虾类对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 耐受能力提高(Sowers *et al.*, 2004; Furtado *et al.*, 2016)。规格为 10 cm 的凡纳滨对虾在盐度 17 和 31 的海水中, $\text{NO}_2\text{-N}$ 安全浓度分别为 4.0 和 8.9 mg/L(黄翔鹤等, 2006)。但目前关于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对虾类影响的资料较少。

Ulaje 等(2019)研究表明, 凡纳滨对虾应对环境胁迫会加快糖类的动员和储存。本研究关注凡纳滨对虾在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下的存活率、生长情况、体成分、糖酵解和无氧代谢途径的变化, 以期对凡纳滨对虾健康养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验用虾

实验所用的凡纳滨对虾购自山东省威海文登泰裕水产良种繁育有限公司。凡纳滨对虾初始体长为 (5.71 ± 0.38) cm, 初始体重为 (2.03 ± 0.33) g, 购回后驯养 7 d。驯养期间, 水温为 26°C , 盐度为 29。每天定时投喂 3 次人工配合饲料(主要成分: 水分 8.31%、粗蛋白 43.50%、粗脂肪 6.94%、灰分 12.19%)。

1.2 实验设计与管理

通过预实验得知凡纳滨对虾 96 h 半致死浓度(96 h- LC_{50})为 150 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$, 以该浓度的 20% 为慢性胁迫实验最高浓度组, 等比例设计 4 个浓度组: $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别为 0 (对照组)、8 mg/L(N8 组)、15 mg/L(N15 组)和 30 mg/L(N30 组), 进行持续 36 d 的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫实验。每个处理设 6 个平行, 其中, 3 个平行用于取样, 3 个平行用于记录摄食量和存活率。

实验在 $50\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 35\text{ cm}$ 的玻璃水缸中进行, 水体积为 50 L, 每个水缸(20 尾虾)为 1 个平行实验。实验持续 36 d, 每天换水 1/2~2/3, 通过添加 10 g/L $\text{NO}_2\text{-N}$ 母液保持各组胁迫浓度。实验期间, 各组实测 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别为 0~0.15(对照组)、7.31~8.12(N8 组)、14.13~15.45(N15 组)和 28.92~32.23 mg/L(N30 组)。

实验期间, 温度为 26°C ~ 27°C , pH 7.1~7.5, 盐度为 29, 总氨氮 ≤ 0.70 mg/L, 非离子氨 ≤ 0.03 mg/L, 溶解氧 ≥ 5.95 mg/L。每天 07:00、14:00 和 22:00 投喂人工配合饲料, 饱食投喂。

在投喂饲料前 10 min, 虹吸去除各组水体中的粪便, 投喂 1 h 后, 虹吸收集各组剩余饲料于 250 目筛绢中, 用 0.5 mol/L 的甲酸铵冲洗, 再放入 70°C 烘箱中烘干至恒重。通过预实验测量出该饲料的含水量和

在水中 1 h 的溶失率, 残饵量由饲料的溶失率和含水量校正得到(林继辉等, 2004)。每尾虾单日摄食量为投饵量和残饵量之差除以缸中生存对虾数量得出。

1.3 生长相关指标计算

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

摄食率(Feeding rate, FR_d , %) = $100F/[T \times (W_t + W_0)/2]$

相对增重率(Weight gain rate, WGR, %) = $[(W_t - W_0)/W_0] \times 100$

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d) = $[(\ln W_t - \ln W_0)/T] \times 100$

饲料转化率(Feed conversion rate, FCR, %) = $100 \times (W_t - W_0)/F$

式中, W_0 为凡纳滨对虾初始体重(g); W_t 为凡纳滨对虾终末体重(g); T 为实验时间(d); N_0 为凡纳滨对虾的放养数量; N_t 为凡纳滨对虾终末数量; F 为每只虾 36 d 的总摄食量(g)。

1.4 对虾样品采集与分析

第 1、3、6、12、24 和 36 天随机从各组取 6 尾凡纳滨对虾, 用一次性注射器从凡纳滨对虾腹血窦处按血淋巴与抗凝剂(450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3)体积比为 1 : 3 的比例抽血(Vargas-Albores *et al.*, 1993), 抽出的血淋巴立即离心(4000 r/min, 10 min), 取上清液, 经液氮快速冷却后, 放入 -80°C 超低温冰箱保存待测。取对虾肝胰腺和肌肉, 同样经液氮快速冷却后放入 -80°C 超低温冰箱保存待测。第 36 天, 随机从各组取 3 尾对虾, 测量对虾全虾体成分。

凡纳滨对虾血糖、肝糖原、肌糖原含量; 肝胰腺与肌肉中己糖激酶(HK)活性和丙酮酸激酶(PK)活性; 肝胰腺中的乳酸含量和乳酸脱氢酶(LDH)活性测定均使用南京建成公司试剂盒, 操作按照说明书进行。

全虾样品在 105°C 烘干至恒重来测定水分, 粗蛋白采用凯氏定氮法测量, 粗脂肪采用氯仿-甲醇抽提法测量, 灰分采用 550°C 马弗炉灰化法测量。

1.5 数据处理

实验数据均采用平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。分析之前测试数据的正态性(Shapiro-Wilk test)和方差齐性(Levene's test), 若数据不具有方差齐性, 则对数据进行 lg 转化并进一步测试。采用 Tukey 多重比较检验对符合正态分布和方差齐性的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。对于不符合正态分布及 lg 转化后仍不具有方差齐性的数据采用非参数检验, 并通过 Kruskal-Wallis 测试进行显著性差异分

析。 $P<0.05$ 表示各组数据差异显著。

2 结果

2.1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾生长和成活率的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾存活率、生长和摄食的影响见表 1。从表 1 可以看出, 凡纳滨对虾的存活率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度升高而降低, 且 N30 组显著低于对照组($P<0.05$)。各组的终末体重、特定生长率和相对增重率均随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降($P<0.05$), 其中, N15 组和 N30 组之间没有显著差异

($P>0.05$), N30 组的特定生长率和相对增重率分别仅为对照组的 48.55%和 29.68%。日摄食率和饲料转化率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而下降, 其中, N30 组的日摄食率是对照组日摄食率的 66.20%。

2.2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响见表 2。从表 2 可以看出, 凡纳滨对虾的水分和对虾干重的粗蛋白含量随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而上升, 但各组之间没有显著差异($P>0.05$); N30 组的粗脂肪含量显著低于对照组($P<0.05$); 各胁迫组灰分均与对照组无显著差异($P>0.05$)。

表 1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾的生长、摄食和成活率的影响

Tab.1 Effects of chronic nitrite nitrogen stress on the life, feeding and survival rate of *L. vannamei*

项目 Items	组别 Group			
	对照 Control	N8	N15	N30
存活率 Survival rate (%)	78.33±2.89 ^a	56.67±2.89 ^{ab}	55.00±10.00 ^{ab}	40.00±5.00 ^b
摄食率 Feeding rate (%)	3.55±0.46 ^a	3.44±0.68 ^a	3.18±0.74 ^a	2.35±0.25 ^b
终末体重 Final body weight (g)	10.26±1.55 ^a	8.47±1.87 ^b	6.14±1.79 ^c	4.47±0.71 ^c
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	4.47±0.43 ^a	3.89±0.67 ^b	2.95±0.86 ^c	2.17±0.44 ^c
相对增重率 Weight gain rate (%)	405.65±76.57 ^a	316.42±95.33 ^b	202.71±88.12 ^c	120.42±35.09 ^c
饲料转化率 Feed conversion rate (%)	106.53±20.11	102.77±18.43	92.70±26.16	87.14±19.80

注: 同行数据上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Different superscripts in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$). The same as below

表 2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体组分的影响

Tab.2 Effects of chronic nitrite nitrogen stress on body composition of *L. vannamei*

项目 Items	组别 Group			
	对照 Control	N8	N15	N30
水分 Moisture (%)	74.47±1.12	74.59±1.49	75.95±1.45	77.23±1.53
粗蛋白 Crude protein (%)	73.05±0.25	72.60±1.69	73.65±0.52	74.67±0.75
粗脂肪 Crude lipid (%)	9.35±1.44 ^a	7.85±0.58 ^{ab}	8.56±0.77 ^a	5.37±1.56 ^b
灰分 Ash (%)	12.55±0.20 ^{ab}	14.65±0.14 ^a	11.90±0.41 ^b	12.96±0.15 ^{ab}

注: 除水分数据为湿重测量外, 其他均为干重测量

Note: Except that the moisture data is wet-weight measurement, the others are all dry-weight measurement

2.3 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾的糖代谢途径关键酶活力和物质含量的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾血糖影响见图 1。从图 1 可以看出, 第 1 天, 胁迫组的血糖浓度出现了下降的趋势; 第 12 天, N15 组的血糖浓度显著高于对照组($P<0.05$); 第 24 天, N8 组的血糖浓度显著高于对照组($P<0.05$), 说明 N8 和 N15 组血糖浓度在胁迫期间呈先下降再上升的趋势, 但最终在 36 d 再次下降至显著低于对照组($P<0.05$)。而在胁迫期间, N30 组的血糖浓度一直显著低于对照组($P<0.05$)。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺和肌肉

中糖原含量的影响见图 2 和图 3。第 1 天, 各组间的肝胰腺中糖原含量保持相对稳定, 各组之间没有显著差异($P>0.05$); 第 3 天, N8 组肝胰腺中糖原含量显著高于对照组($P<0.05$); 第 6 天, N15 与 N30 组的肝胰腺中糖原含量显著高于对照组($P<0.05$); 第 36 天时, 胁迫组的肝胰腺中糖原含量显著低于对照组($P<0.05$), 说明胁迫组肝胰腺中糖原含量的变化趋势与 N8 组和 N15 组的血糖含量变化趋势相同。而在实验期间, 胁迫组对虾肌肉中糖原含量始终显著低于对照组($P<0.05$)。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺己糖激酶活力影响见图 4。第 6 天后, N8 组和 N15 组的己

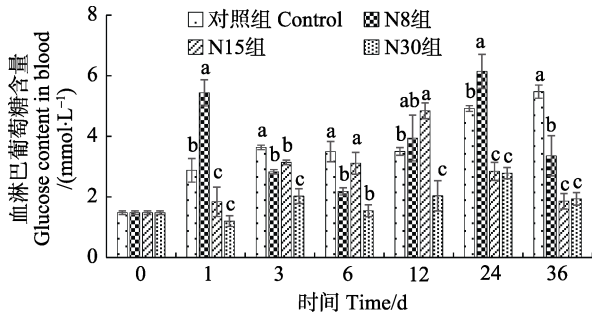


图 1 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾血糖浓度的变化
Fig.1 Changes of blood glucose concentration of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

同组数据上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同
Different letter superscripts in the same group indicate significant differences between groups ($P<0.05$). Same as below

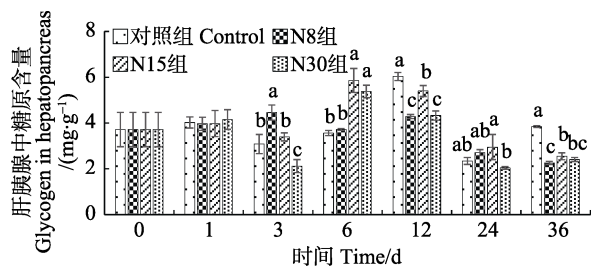


图 2 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺中糖原含量的变化
Fig.2 Changes of glycogen in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

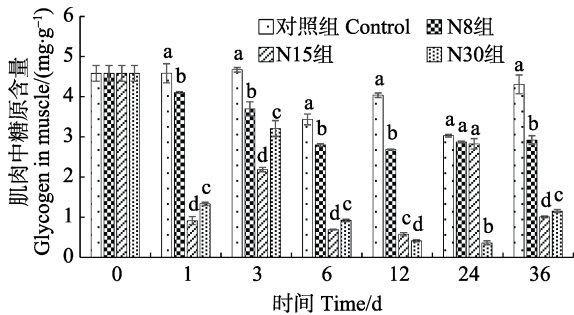


图 3 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉中糖原含量的变化
Fig.3 Changes of glycogen in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

糖激酶活力与对照组相比无显著差异($P>0.05$), 但 N30 组的己糖激酶活力一直高于对照组, 且其肝胰腺中的己糖激酶活力在第 36 天时显著高于对照组 ($P<0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺丙酮酸激酶活力影响见图 5。从图 5 可以看出, 第 1 天, 胁迫组肝胰腺丙酮酸激酶活力显著高于对照组 ($P<0.05$); 第 6 天后, 其活力随 NO₂-N 浓度升高而升高, 且 N30 组的丙酮酸激酶活力始终显著高于对照

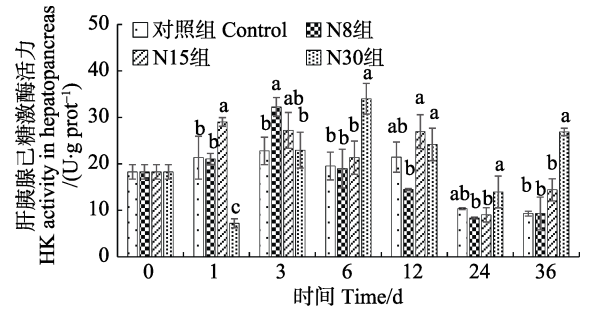


图 4 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺己糖激酶活力的变化
Fig.4 Changes of HK activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

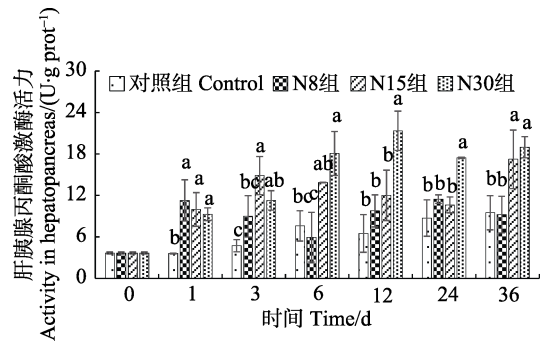


图 5 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺丙酮酸激酶活力的变化
Fig.5 Changes of PK activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

组($P<0.05$)。

NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肌肉己糖激酶活力影响见图 6。胁迫组肌肉中的己糖激酶活力先升高后降低, 但除了胁迫开始的第 1 天, 胁迫组的己糖激酶活力均低于对照组, 且在实验期间各组之间无显著差异($P>0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肌肉丙酮酸激酶活力影响见图 7。NO₂-N 胁迫使肌肉中的丙酮酸激酶活力提高, 最终在第 36 天胁迫组都高于对照组。

NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺乳酸脱氢酶活力影响见图 8。从图 8 可以看出, 肝胰腺乳酸脱氢酶活力呈先上升后下降的趋势。第 1 天, 各组肝胰腺中乳酸脱氢酶活力无显著差异($P>0.05$), 随着时间的延长, 胁迫组肝胰腺的乳酸脱氢酶活力提高, 且 N30 组的乳酸脱氢酶活力显著高于对照组($P<0.05$)。第 24 天后, 胁迫组肝胰腺的乳酸脱氢酶活力下降, 且在 36 d 时, 各组无显著差异($P>0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺中乳酸含量影响见图 9。NO₂-N 胁迫会提高凡纳滨对虾肝胰腺中的乳酸含量, N30 组肝胰腺中乳酸含量显著高于对照组($P<0.05$), 但在 36 d 时, 各组的乳酸含量无显著差异($P>0.05$)。

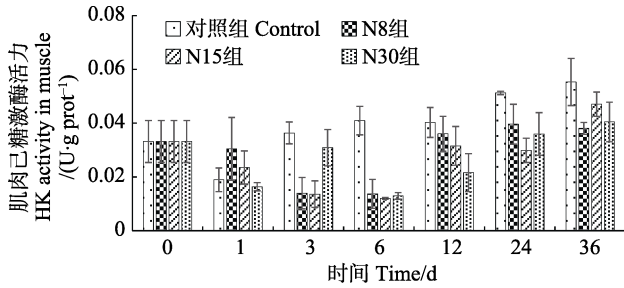


图6 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉己糖激酶活力的变化

Fig.6 Changes of HK activity in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

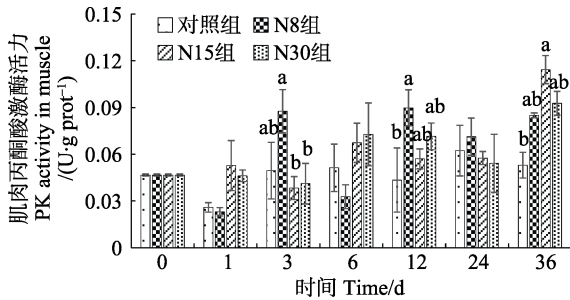


图7 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉丙酮酸激酶活力的变化

Fig.7 Changes of PK activity in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

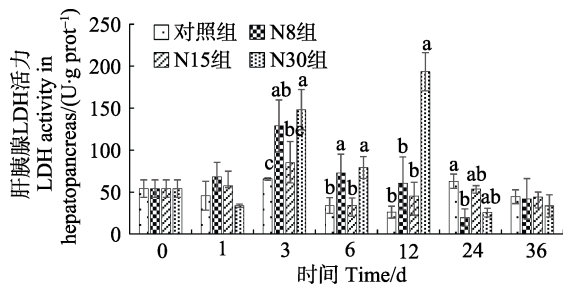


图8 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺乳酸脱氢酶活力的变化

Fig.8 Changes of LDH activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

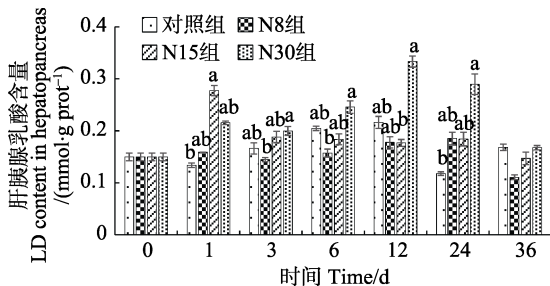


图9 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺乳酸含量的变化

Fig.9 Changes of lactic acid content in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

3 讨论

3.1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾存活和生长的影响

水体中 $\text{NO}_2\text{-N}$ 通过鳃丝进入对虾体内,且随着时间的延长在机体内各部位积累,影响对虾的代谢,最终降低对虾的存活率(Li *et al.*, 2019)。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫期间,凡纳滨对虾活动减少,摄食率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降,在 36 d 后,对虾的生长指标和存活率均随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降。提示 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会显著降低对虾的存活率和生长速度,且降低程度与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 水平呈正相关。

3.2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响

在环境胁迫下,虾类体内代谢加强,某些营养物质会耗竭或者合成受阻(于赫男, 2007; 鞠波, 2014)。为了满足 $\text{NO}_2\text{-N}$ 急性胁迫引起的虾类对能量需求的增长,日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)对氨基酸的利用可能比体内的脂质代谢起到更重要的作用(Jiang *et al.*, 2014);同时,凡纳滨对虾在慢性氮氮胁迫中,粗脂肪含量随着胁迫浓度升高而下降,但粗蛋白含量却随着胁迫浓度升高而升高(曾庆婷等, 2016)。本研究发现,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下,随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫浓度增大,凡纳滨对虾粗蛋白含量几乎没有发生变化,但对虾的粗脂肪含量显著下降,提示凡纳滨对虾对脂质的利用在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中起重要作用。

3.3 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾糖代谢的影响

在适宜的生长环境中,动物的血糖浓度处于相对稳定的状态,而当动物遭遇环境胁迫时,机体会迅速将糖原分解为葡萄糖以满足其对营养物质和能量需求(李莉, 2011)。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫前期,胁迫组的凡纳滨对虾肌肉中糖原迅速降低以支持体内的代谢需求,而在中期,胁迫组的血糖和肝胰腺中糖原含量却存在提高的现象。研究发现,处于长期饥饿中的日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)(Hong *et al.*, 2009)和处于被农药敌百虫污染环境中的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)(Chang *et al.*, 2006)的血糖与肝胰腺中的糖原含量也出现上升的情况,且最终含量低于对照组,本研究存在相似现象。推测是因为对虾肌肉中糖原的分解转运和体内糖原衍生途径的增强,使血糖和肝糖原在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中保持稳定与提高。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 急性胁迫下,甲壳动物的血糖含量在实验期间始终高于对照组(Hong *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019)。但本研究发现,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中,

凡纳滨对虾体内的血糖和糖原含量最终均低于对照组, 提示在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下, 虾类体内的糖原含量和血糖含量持续被消耗, 最终已经不能满足体内对能量增长的需求。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 会使凡纳滨对虾的血蓝蛋白转变为脱氧血蓝蛋白和变性血蓝蛋白, 导致凡纳滨对虾血淋巴载氧能力下降, 使对虾处于缺氧的状态(寇红岩等, 2014; Wang *et al.*, 2019), 而当对虾处于缺氧状态和抵抗环境胁迫时, 就会增强细胞质中的糖酵解途径得到丙酮酸, 最终获得更多能量来满足机体需求(郭彪等, 2008; 李英等, 2012; 贾旭颖等, 2014; Wang *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2019)。己糖激酶和丙酮酸激酶都是糖酵解反应中重要的限制酶, 而肌肉和肝胰腺是甲壳动物进行糖酵解的主要场所(郭彪等, 2008; 戴超等, 2014)。本研究表明, 在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下, 凡纳滨对虾肝胰腺中的糖酵解途径增强, 而肌肉中的糖酵解途径因为己糖激酶活力的降低而被抑制。在非离子氨慢性胁迫中, 凡纳滨对虾肌肉中的己糖激酶和丙酮酸激酶也出现下降的现象(贾旭颖等, 2014), 提示在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中, 凡纳滨对虾可能通过加强肝胰腺中的糖酵解途径来获得更多的能量, 而肌肉并不作为主要的糖代谢场所。但在慢性胁迫的后期, 血糖和肝胰腺中糖原的含量已经消耗殆尽, 肝胰腺中的糖酵解途径无法产生足够的能量与物质来满足凡纳滨对虾体内代谢, 此时, 源于脂类代谢供能则可能起到一定作用。

乳酸脱氢酶是生物体内的无氧代谢标志酶, 乳酸脱氢酶能将丙酮酸反应成乳酸, 并获得少量的能量(贾旭颖等, 2014; 连春盎等, 2017)。在亚硝态急性氮胁迫下, 甲壳动物体内的乳酸脱氢酶活力和乳酸含量在胁迫期间始终显著高于对照组(Hong *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014)。本研究中, 胁迫组的乳酸脱氢酶先上升后下降, 最终在养殖实验 36 d 结束时, 各组的乳酸脱氢酶活力没有显著性差别, 同时, 各组肝胰腺中的乳酸含量有相同的趋势, 表明 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫会在短期内加强凡纳滨对虾的无氧呼吸, 但随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫时间的延长, 肝胰腺中的乳酸脱氢酶活力受到抑制, 无氧呼吸减弱, 产生的乳酸减少。以上研究结果表明, 在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫前期, 对虾通过加强体内无氧代谢途径以应对胁迫效应; 而在胁迫后期, 对虾无氧代谢供能减弱, 其应对胁迫效应的供能途径可能发生改变。关于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对对虾能量代谢途径的影响及其机制, 还需进一步研究。

4 结论

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会降低凡纳滨对虾的生长率和

存活率。为了应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫, 凡纳滨对虾会加强体内糖的无氧代谢途径来获取能量, 应对胁迫效应。然而, 在长期 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫下, 对虾体内的血糖含量和糖原含量均被消耗殆尽, 糖代谢已经不能为对虾应对胁迫效应提供充足的能量, 同时, 根据粗脂肪含量变化, 表明凡纳滨对虾通过脂类代谢供能在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫过程中起到重要作用。

参 考 文 献

- Chang CC, Lee PP, Hsu JP, *et al.* Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. *Aquaculture*, 2006, 253(1–4): 653–666
- Dai C, Wang F, Fang ZH, *et al.* Effects of temperature on the respiratory metabolism and activities of related enzymes of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 90–96 [戴超, 王芳, 房子恒, 等. 温度对三疣梭子蟹呼吸代谢及其相关酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 90–96]
- Furtado PS, Valenzuela MAJ, Rodriguez-Fuentes G, *et al.* Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2016, 49(3): 201–211
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* Susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus*: The influence of environmental nitrite nitrogen. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 629–636 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 亚硝酸盐氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 629–636]
- Guo B, Wang F, Hou CQ, *et al.* Effects of acute temperature fluctuation on HK and PK activity, HSP70 relative content in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 885–889 [郭彪, 王芳, 侯纯强, 等. 温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及热休克蛋白表达的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 885–889]
- Guo H, Xian JA, Wang AL. Effects of nitrite stress on haemocyte toxicity and p53 gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(2): 61–67 [郭慧, 洗健安, 王安利. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响. *水生态学杂志*, 2015, 36(2): 61–67]
- Hong ML, Chen LQ, Qin JG, *et al.* Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 149(3): 419–426
- Huang XH, Li CL, Zheng L, *et al.* The toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ on *Litopenaeus vannamei* and effects of $\text{NO}_2\text{-N}$ on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiologica*

- Sinica, 2006, 30(4): 466–471 [黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响. 水生生物学报, 2006, 30(4): 466–471]
- Jia XY, Guo XT, Wang F, *et al.* Comparison of the effect of nonionic ammonia stress on respiratory metabolic enzyme of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1837–1846 [贾旭颖, 国先涛, 王芳, 等. 非离子氨胁迫对淡水和海水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力影响的比较. 水产学报, 2014, 38(11): 1837–1846]
- Jiang QC, Dilixiati A, Zhang WY, *et al.* Effect of nitrite exposure on metabolic response in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Central European Journal of Biology*, 2014, 9(1): 86–91
- Ju B. The effects of regulating-controlling water quality by constructed wetlands and the daily feeding rhythm of *Macrobrachium rosenbergii*, and the impacts of $\text{NO}_2\text{-N}$ on its energy metabolism. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [鞠波. 人工湿地调控罗氏沼虾塘水质效果与罗氏沼虾摄食节律及 $\text{NO}_2\text{-N}$ 对其能量代谢影响的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Kou HY, Xian JA, Guo H, *et al.* Research progress of toxic effects of nitrite on shrimp. *Marine Sciences*, 2014, 38(2): 107–115 [寇红岩, 洗健安, 郭慧, 等. 亚硝酸盐对虾类毒性影响的研究进展. 海洋科学, 2014, 38(2): 107–115]
- Li L. Study on crustacean hyperglycemia hormone (CHH) modulates the osmoregulation and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [李莉. 高血糖激素(CHH)在对虾渗透调节和血糖代谢中调控机制的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Li Y, Wang F, Zhao ZY, *et al.* Effects of salinity fluctuations on hemocyanins and glycolysis of *Litopenaeus vannamei*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2012, 42(9): 28–34 [李英, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾渗透调节中血蓝蛋白和糖酵解影响的初步研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(9): 28–34]
- Li ZS, Ma S, Shan HW, *et al.* Responses of hemocyanin and energy metabolism to acute nitrite stress in juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 186: 109753
- Lian CA, Li J, Li JT, *et al.* Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 53–60 [连春盎, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)呼吸代谢相关酶的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 53–60]
- Lin JH, Li SQ, Lin XT, *et al.* Study on ingestion and growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Sciences*, 2004, 28(8): 43–46 [林继辉, 李松青, 林小涛, 等. 凡纳滨对虾摄食与生长的实验研究. 海洋科学, 2004, 28(8): 43–46]
- Lin YC, Chen JC. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 2003, 224(1–4): 193–201
- Liu L, Wu LX, Zhang WG, *et al.* Effects of starvation and re-feeding on carbohydrate metabolism of *Marsupenaeus japonicus*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(3): 697–700 [刘璐, 吴立新, 张伟光, 等. 饥饿及再投喂对日本囊对虾糖代谢的影响. 应用生态学报, 2007, 18(3): 697–700]
- Lü XY, Li JY, Fang Y, *et al.* Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12): 1812–1820 [吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响. 水产学报, 2010, 34(12): 1812–1820]
- National Bureau of Statistics. *China fisheries statistical yearbook*. Beijing: China Statistics Press, 2019 [国家统计局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国统计出版社, 2019]
- Shan HW, Wang T, Dong Y, *et al.* Effects of dietary *Ampithoe* sp. supplementation on the growth, energy status, antioxidant capacity, and ammonia-N tolerance of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Continuous versus interval feeding. *Aquaculture*, 2019, 509: 32–39
- Sowers A, Young SP, Isely JJ, *et al.* Nitrite toxicity to *Litopenaeus vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2004, 35(4): 445–451
- Tseng IT, Chen JC. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(4): 325–333
- Ulaje SA, Rojo-Arreola L, Lluch-Cota SE, *et al.* Gene expression and energetic metabolism changes in the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquaculture Research*, 2019, 50(4): 994–1004
- Vargas-Albores F, Guzmán MA, Ochoa JL. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1993, 106(2): 299–303
- Wang WN, Wang AL, Zhang YJ, *et al.* Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 2004, 232(1–4): 679–686
- Wang X, Li E, Chen L. A review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans. *North American Journal of Aquaculture*, 2016, 78(2): 178–187
- Wang XD, Shen ZH, Wang CL, *et al.* Dietary supplementation of selenium yeast enhances the antioxidant capacity and immune response of juvenile *Eriocheir sinensis* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 87: 22–31
- Wang YB, Zhang WJ, Li WF, *et al.* Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2006,

- 32(1): 49–54
- Yao YL, Yuan CY, Cui QM, *et al.* Isolation, identification and characterization of a bacterium with highly efficient removal of nitrite nitrogen. *Fisheries Science*, 2018, 37(5): 689–693 [姚艳玲, 袁春营, 崔青曼, 等. 一株去除亚硝态氮细菌分离鉴定及特性研究. *水产科学*, 2018, 37(5): 689–693]
- Yu HN. Effect of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2007 [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士研究生学位论文, 2007]
- Zeng QT, Yu HN, Li XT, *et al.* Effects of ammonia-nitrogen on locomotor performance and the energy budget of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 198–206 [曾庆婷, 于赫男, 林小涛, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾运动行为与能量分配模式变化. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 198–206]
- Zhu QJ, Ju B, Dai XL. Effects of nitrite nitrogen on survival rate, growth and energy metabolism of *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2019, 46(1): 14–18 [朱其建, 鞠波, 戴习林. 亚硝态氮对罗氏沼虾存活率、生长及能量代谢的影响. *水产科技情报*, 2019, 46(1): 14–18]

(编辑 冯小花)

Effects of Chronic Nitrite Stress on Body Composition and Glucose Metabolism of *Litopenaeus vannamei*

XIAO Wei, SHAN Hongwei, MA Shen^①, LI Zhongshuai

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

Abstract In this study, we examined the effects of chronic nitrite stress on the growth, feeding, body composition, and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei* [(2.03±0.33) g]. The experiment lasted for 36 days, and there were control group, N8, N15, and N30 (stress groups) with concentrations of 0, 8, 15, and 30 mg/L NO₂⁻-N. With increasing NO₂⁻-N concentrations, the final body weight, specific growth rate, weight gain rate, and feeding rate of the shrimp showed a significant decline. At day 18, the blood glucose and glycogen in the hepatopancreas in the N8 and N15 groups were higher than those in the control group; however, they were lower than the control group by the end of the experiment. The muscle glycogen in the stress group was always lower than the control group during the experiment. In addition, the activity of hexokinase in the muscle of the stress group was lower than that of the control group, whereas the activity of hexokinase and pyruvate kinase in the hepatopancreas of the stress group was significantly higher than that of the control group. Further, the activity of lactate dehydrogenase in the hepatopancreas first increased and then decreased, but there was no significant difference compared with the control group. In the final body composition, there was almost no change in the water and crude protein of each group, but the crude lipid content of the N30 group was significantly lower than that of the control group. The above results indicated that chronic stress of nitrite can reduce the appetite and slow down the growth in shrimps. The glucose metabolism in shrimp is only a short-term response model to cope with the chronic stress of nitrite. At the same time, according to the change of crude lipid, it is speculated that the lipid metabolism of *L. vannamei* played an important role in the chronic nitrite stress for the shrimps.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Nitrite stress; Body composition; Glucose metabolism

① Corresponding author: MA Shen, E-mail: mashen@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190828001

http://www.yykxjz.cn/

张新明, 程顺峰. 不同性别口虾蛄形态性状对体重的影响分析及曲线拟合. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 82-91
Zhang XM, Cheng SF. Effect and curve fitting of morphological traits to body weight between male and female mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 82-91

不同性别口虾蛄形态性状 对体重的影响分析及曲线拟合*



张新明^{1①} 程顺峰²

(1. 日照职业技术学院海洋工程学院 日照市海洋生物工程技術研究中心 日照 276826;

2. 青岛农业大学生命科學學院 青島 266109)

摘要 为研究不同性别口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)生物学性状的相互关系,测量了其全长(TL)、体长(BL)、头胸甲长(CL)、尾扇长(FL)、腹部长(AL)、腹部宽(AW)、大螯长(LL)和体重(Y)共 8 个生物学指标,通过相关分析、通径分析等方法研究其形态性状对体重的影响,利用逐步回归法建立形态性状对体重的回归方程,拟合 7 个形态性状与体重的曲线模型。结果显示,口虾蛄体重的变异系数大于形态性状,雌性、雄性群体尾扇长、腹部宽、大螯长和体重等数量性状的差异极显著($P<0.01$),雌性、雄性和混合群体各数量性状的相关性达到极显著水平($P<0.01$)。在形态性状的相互关系中,对雌性、雄性和混合群体而言,全长和体长的相关系数最大,分别为 0.984、0.993 和 0.988;形态性状和体重的关系中,雌性的全长与体重的相关系数最大(0.973),雄性的体长与体重的相关系数最大(0.974),混合群体的腹部宽与体重的相关系数最大(0.969)。雌性和混合群体对体重直接作用最大形态性状均为腹部宽(通径系数分别为 0.418 和 0.508),雄性的体长对体重的直接作用最大(通径系数为 0.613)。雌性、混合群体的腹部宽对体重的直接决定系数最大(0.175 和 0.258),雄性的体长对体重的直接决定系数最大(0.376)。雌性群体选育时主要考虑全长、腹部宽和头胸甲长,雄性群体主要考虑体长和腹部宽,混合群体主要考虑腹部宽和全长。以形态性状为自变量,体重为因变量建立的雌性、雄性群体和混合群体回归方程分别为 $Y_1 = -48.499 + 0.315X_{TL} + 1.159X_{AW} + 0.186X_{CL}$ ($R^2 = 0.978$)、 $Y_2 = -55.987 + 0.453X_{BL} + 1.152X_{AW}$ ($R^2 = 0.959$) 和 $Y_3 = -51.651 + 1.738X_{AW} + 0.274X_{TL}$ ($R^2 = 0.960$)。研究表明,口虾蛄形态性状与体重之间的最优拟合模型有线性模型、幂函数模型、指数函数模型等,雌性、雄性口虾蛄除全长、腹部长与体重的最优拟合模型类型相同外,其他均不同。

关键词 口虾蛄; 形态性状; 体重; 通径分析; 回归分析; 曲线拟合

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0082-10

口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)是我国重要的海洋捕捞产品,其肉味鲜美、营养丰富,2017 年我国口虾

蛄捕捞量为 21.91 万 t,比 2016 年减少 7.46%(农业农村部渔业渔政管理局等,2018)。口虾蛄研究主要集中

* 国家星火计划项目(2015GA740101)、水产养殖技术专业国家教学资源库项目(教职成司函[2019]26号,编号:2018-01)和首批山东省职业教育名师工作室项目(鲁教师函[2018]1号,编号15)共同资助 [This work was supported by the National Starfire Plan (2015GA740101), National Teaching Resource Base for Aquaculture Technology Specialty ([2019]26-2018-01), and the First Batch of Shandong Provincial Vocational Education Masters Studio Project ([2018]1-15)].

① 通讯作者:张新明,副教授, E-mail: zxm9706@163.com

收稿日期: 2019-08-28, 收修稿日期: 2019-10-21

在生物学(张年国等, 2018a、b)、遗传多样性(隋宥珍等, 2016、2019)等方面。

在开展动物遗传育种工作之前, 对其经济性状间的相互关系进行研究是十分必要的(冷晓飞等, 2016)。在水产动物中, 相关分析、通径分析和多元回归分析对相关生物育种工作提供了重要参考。马晓等(2015)采用相关分析、通径分析研究了中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)背甲长、背甲宽、腹甲长、体高和体重的表型相关及不同性状对体重的影响程度。谷伟等(2013)研究了不同性别虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体长、体高等形态性状对体重的影响。冷晓飞等(2016)分析了不同性别马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)壳形态性状与体重的相关关系。结果表明, 雌性、雄性马粪海胆在壳性状、体重等经济性状和高径比等生物学性状上差异不显著。肖露阳等(2012)研究发现, 雌性中国蛤蜊(*Macra chinensis*)壳高对软体重的直接作用最大, 雄性蛤蜊的壳高对软体重的直接作用大于活体重对软体重的直接作用。田莹等(2018)研究了布氏蚶(*Arca boucardi*)壳尺寸对体重的影响, 发现壳长对软体重直接作用最大, 壳宽对活体重直接作用最大。全长是影响大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼体重的主要因素(王新安等, 2008)。体高是影响许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)体重的主要形态性状(刘阳等, 2019)。马庆华等(2018)研究表明, 雷氏七鳃鳗(*Lampetra reissneri*)雄性群体全长和泄殖孔长与体重呈极显著差异, 雌性群体全长和头长与体重呈极显著差异。董浚键等(2018)研究表明, 翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)全长和体高对体重的直接作用最大, 单独决定程度最高。形态性状对体重的影响还与生长阶段和体色有关(边力等, 2018; 陈红林等, 2019)。

目前, 对口虾蛄形态性状和体重的相关性研究较少, 已有文献仅研究了体重与头胸甲长、体长、全长、尾扇长、腹宽等 2 个单一性状之间的关系(徐善良等, 1996; 林月娇等, 2008; 蒋霞敏等, 2000; 徐海龙等, 2010; 盛福利, 2009)。而对口虾蛄形态性状和体重之间的多元分析还未见报道。本研究对口虾蛄全长、体长、头胸甲长、尾扇长、腹部长、腹部宽、大螯长和体重之间的相关性进行通径分析, 建立回归方程, 并且建立口虾蛄单一性状和体重的最优模型, 以期对口虾蛄的种质选育工作提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

口虾蛄采捕于山东省日照海域, 从供选样本中筛

选体重较大的样本 104 尾开展实验(雄性 54 尾, 雌性 50 尾), 样本平均体重为(26.49±8.15) g, 平均体长(118.86±11.39) mm。

1.2 方法

用游标卡尺(测量精度为 0.02 mm)分别测量每尾口虾蛄的全长(TL)、体长(BL)、头胸甲长(CL)、尾扇长(FL)、腹部长(AL)、腹部宽(AW)、大螯长(LL)等指标。利用电子天平(称量精度为 0.01g)分别称量每尾口虾蛄的体重(Y)。

各生物学指标界定, 参考盛福利(2009)的测度标准。全长: 从头胸甲额剑前端至身体末端的直线长度; 体长: 从眼柄基部至尾节 V 字形凹陷处的长度; 头胸甲长: 从眼柄基部至头胸节末端的长度; 腹部宽: 第 4 腹节的宽度; 腹部长: 腹部第一节至最后一节的长度; 尾扇长: 从尾扇基部至尾扇末端的长度; 大螯长: 第二颚足上螯的长度; 体重: 吸去体表水分后的湿重。

1.3 数据处理

使用 SPSS 17.0 软件进行形态性状和体重之间的相关性分析和多元回归分析, 计算通径系数, 将研究样本分为混合、雄性和雌性群体, 计算各群体的平均数, 进行雌性、雄性差异显著性检验和数据的多态性检验; 从供选样本中另外随机选取 50 尾口虾蛄, 利用回归方程进行雌性和雄性结果检验; 使用 Excel 电子表格计算变异系数, 进行通径分析和决定系数分析。

2 结果与分析

2.1 口虾蛄各样本的数据

分别测量每尾口虾蛄全长、体长、头胸甲长、尾扇长、腹部长、腹部宽、大螯长和体重, 测量结果见表 1 和表 2。从表 1 可以看出, 混合群体口虾蛄各测量值无显著差异($P>0.05$), 经过 K-S 正态性检验, 数据呈正态分布。体重的变异系数在 30%左右, 而形态性状的变异系数在 10%左右, 说明口虾蛄体重的选择潜力较大。各形态参数的数据大小趋势为全长>体长>腹部长>头胸甲长>腹部宽>尾扇长>大螯长。从表 2 可以看出, 总体上雌性群体口虾蛄各平均数小于雄性群体(腹部长除外), 统计分析结果显示, 雌性、雄性群体头胸甲长、尾扇长、腹部宽、大螯长和体重等性状达到差异显著或极显著水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而全长、体长和腹部长等差异并不显著($P>0.05$)。

表1 口虾蛄数据测量结果
Tab.1 Quantitative traits of *Oratosquilla oratoria*

性状参数 Trait parameters	全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	体重 Y
平均值 Mean (mm)	123.12	118.86	31.18	23.38	51.01	25.55	20.34	26.49
标准差 Standard deviation	11.89	11.39	3.05	2.76	5.90	2.79	2.21	8.15
变异系数 Coefficient of variation (%)	9.66	9.58	9.77	11.80	11.57	10.94	10.88	30.77
正态性检验 Normal test	K-S	0.72	0.77	1.02	0.59	0.59	0.78	1.00
	Sig.	0.68	0.60	0.25	0.88	0.88	0.58	0.27

表2 口虾蛄雌性和雄性群体的性状参数
Tab.2 Traits of parameters of male and female *Oratosquilla oratoria*

性别 Sex	性状参数 Trait parameters	全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	体重 Y
雌性 Female	平均值 Mean (mm)	121.20	117.46	30.36	22.31	51.48	24.50	19.60	23.73
	标准差 Standard deviation	11.27	11.11	2.78	2.62	5.88	2.46	2.02	6.78
	变异系数 Coefficient of variation (%)	9.30	9.46	9.16	11.74	11.43	10.04	10.28	28.59
雄性 Male	平均值 Mean (mm)	124.90	120.17	31.93	24.38	50.57	26.52	21.03	29.06
	标准差 Standard deviation	12.28	11.59	3.11	2.52	5.94	2.75	2.18	8.53
	变异系数 Coefficient of variation (%)	9.83	9.64	9.74	10.34	11.74	10.37	10.38	29.35
	<i>t</i>	-2.02	-1.64	-2.93	-4.36	0.24	-4.37	-4.45	-3.74
	显著性 Significance	0.05	0.11	0.01	0.00	0.81	0.00	0.00	0.00

2.2 口虾蛄各性状间的相关系数分析

口虾蛄各性状之间极显著相关($P < 0.01$) (表3)。从形态性状的相关性来看, 雌性、雄性、混合群体全长和体长的相关系数均为最大, 分别为 0.984、0.993 和 0.988; 雌性群体头胸甲长和腹部长之间的相关系数最小(0.660); 对雄性和混合群体而言, 大螯长和腹部

长之间的相关系数最小, 分别为 0.737 和 0.706。从形态性状和体重的相关性来看, 对雌性群体而言, 全长和体重的相关性最大(0.973), 头胸甲长与体重的相关性数最小(0.797); 对雄性群体而言, 体长和体重的相关性最大(0.974), 大螯长与体重的相关性最小(0.804); 对混合群体而言, 腹部宽和体重的相关性最大(0.969), 腹部长与体重的相关性最小(0.827)。

表3 口虾蛄各性状的相关系数
Tab.3 Correlation coefficient of quantitative traits in *Oratosquilla oratoria*

性别 Sex	性状 Traits	全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	体重 Y
雌性 Female	全长 TL	1	0.984**	0.740**	0.928**	0.921**	0.935**	0.853**	0.973**
	体长 BL		1	0.669**	0.909**	0.901**	0.902**	0.816**	0.951**
	头胸甲长 CL			1	0.774**	0.660**	0.793**	0.745**	0.797**
	尾扇长 FL				1	0.850**	0.958**	0.868**	0.951**
	腹部长 AL					1	0.856**	0.821**	0.900**
	腹部宽 AW						1	0.859**	0.970**
	大螯长 LL							1	0.875**
	体重 Y								1
雄性 Male	全长 TL	1	0.993**	0.940**	0.941**	0.945**	0.968**	0.834**	0.972**
	体长 BL		1	0.950**	0.942**	0.939**	0.964**	0.803**	0.974**
	头胸甲长 CL			1	0.901**	0.911**	0.921**	0.743**	0.923**

续表 3

性别 Sex	性状 Traits	全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	体重 Y
雄性 Male	尾扇长 FL				1	0.879**	0.960**	0.803**	0.940**
	腹部长 AL					1	0.919**	0.737**	0.917**
	腹部宽 AW						1	0.830**	0.966**
	大螯长 LL							1	0.804**
	体重 Y								1
混合群体 Mixed	全长 TL	1	0.988**	0.855**	0.913**	0.907**	0.934**	0.838**	0.956**
	体长 BL		1	0.822**	0.896**	0.902**	0.909**	0.798**	0.940**
	头胸甲长 CL			1	0.849**	0.747**	0.874**	0.764**	0.880**
	尾扇长 FL				1	0.769**	0.962**	0.851**	0.943**
	腹部长 AL					1	0.797**	0.706**	0.827**
	腹部宽 AW						1	0.860**	0.969**
	大螯长 LL							1	0.848**
体重 Y								1	

**：在 0.01 水平上显著相关

**：Indicates significant correlation at 0.01 level

2.3 口虾蛄各形态性状对体重的通径分析

从表 4 可以看出, 雌性和混合群体对体重直接作用最大的形态性状均为腹部宽, 通径系数分别为 0.418 和 0.508, 体长对雄性群体体重的直接作用最大, 通径系数为 0.613。从间接作用总和来看, 尾扇长对雌性和混合群体的间接作用均最大, 作用系数总和分别为 0.952 和 0.917, 头胸甲长对雄性群体的间接

作用最大, 作用系数总和为 0.969。在两两作用中, 雌性和混合群体尾扇长通过腹部宽对体重的间接作用均最大(作用系数分别为 0.400 和 0.489), 雄性全长通过体长对体重的间接作用最大(作用系数为 0.609)。

2.4 口虾蛄各形态性状对体重的决定系数

从表 5 可以看出, 雌性和混合群体腹部宽对体重的直接决定系数均最大(分别为 0.175 和 0.258), 雄性

表 4 形态性状对体重的通径分析
Tab.4 Path analysis of morphological traits to body weight

性别 Sex	形态性状 Morphological traits	相关系数 Correlation coefficient	直接作用 Direct effect	间接作用 Indirect effect							总计 Total
				全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	
雌性 Female	全长 TL	0.973**	0.157		0.261	0.078	-0.002	0.052	0.391	0.035	0.815
	体长 BL	0.951**	0.265	0.154		0.070	-0.002	0.051	0.377	0.033	0.685
	头胸甲长 CL	0.797**	0.105	0.116	0.177		-0.002	0.038	0.331	0.031	0.692
	尾扇长 FL	0.951**	-0.002	0.146	0.241	0.081		0.048	0.400	0.036	0.952
	腹部长 AL	0.900**	0.057	0.145	0.239	0.069	-0.002		0.358	0.034	0.842
	腹部宽 AW	0.970**	0.418	0.147	0.239	0.083	-0.002	0.049		0.035	0.551
	大螯长 LL	0.875**	0.041	0.134	0.216	0.078	-0.002	0.047	0.359		0.833
雄性 Male	全长 TL	0.972**	0.055		0.609	-0.043	0.036	-0.015	0.336	-0.005	0.917
	体长 BL	0.974**	0.613	0.055		-0.044	0.036	-0.015	0.335	-0.005	0.361
	头胸甲长 CL	0.923**	-0.046	0.052	0.582		0.034	-0.015	0.320	-0.004	0.969
	尾扇长 FL	0.940**	0.038	0.052	0.577	-0.041		-0.014	0.333	-0.005	0.902
	腹部长 AL	0.917**	-0.016	0.052	0.576	-0.042	0.033		0.319	-0.004	0.934
	腹部宽 AW	0.966**	0.347	0.053	0.591	-0.042	0.036	-0.015		-0.005	0.619
	大螯长 LL	0.804**	-0.006	0.046	0.492	-0.034	0.031	-0.012	0.288		0.811

续表 4

性别 Sex	形态性状 Morphological traits	相关系数 Correlation coefficient	直接作用 Direct effect	间接作用 Indirect effect							
				全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL	总计 Total
混合群体 Mixed	全长 TL	0.956**	0.208		0.218	0.080	0.025	-0.060	0.474	0.012	0.749
	体长 BL	0.940**	0.221	0.206		0.076	0.024	-0.060	0.462	0.011	0.720
	头胸甲长 CL	0.880**	0.093	0.178	0.182		0.023	-0.049	0.444	0.011	0.788
	尾扇长 FL	0.943**	0.027	0.190	0.198	0.079		-0.051	0.489	0.012	0.917
	腹部长 AL	0.827**	-0.066	0.189	0.199	0.069	0.021		0.405	0.010	0.893
	腹部宽 AW	0.969**	0.508	0.194	0.201	0.081	0.026	-0.053		0.012	0.462
	大螯长 LL	0.848**	0.014	0.174	0.176	0.071	0.023	-0.047	0.437		0.835

表 5 形态性状对体重的决定系数

Tab.5 Determination coefficient of morphological traits to body weight

性别 Sex	性状 Traits	全长 TL	体长 BL	头胸甲长 CL	尾扇长 FL	腹部长 AL	腹部宽 AW	大螯长 LL
雌性 Female	全长 TL	0.025	0.082	0.024	-0.001	0.016	0.123	0.011
	体长 BL		0.070	0.037	-0.001	0.027	0.200	0.018
	头胸甲长 CL			0.011	0.000	0.008	0.070	0.006
	尾扇长 FL				0.000	0.000	-0.002	0.000
	腹部长 AL					0.003	0.041	0.004
	腹部宽 AW						0.175	0.029
	大螯长 LL							0.002
雄性 Male	全长 TL	0.003	0.067	-0.005	0.004	-0.002	0.037	-0.001
	体长 BL		0.376	-0.054	0.044	-0.018	0.410	-0.006
	头胸甲长 CL			0.002	-0.003	0.001	-0.029	0.000
	尾扇长 FL				0.001	-0.001	0.025	0.000
	腹部长 AL					0.000	-0.010	0.000
	腹部宽 AW						0.120	-0.003
	大螯长 LL							0.000
混合群体 Mixed	全长 TL	0.043	0.091	0.033	0.010	-0.025	0.197	0.005
	体长 BL		0.049	0.034	0.011	-0.026	0.204	0.005
	头胸甲长 CL			0.009	0.004	-0.009	0.083	0.002
	尾扇长 FL				0.001	-0.003	0.026	0.001
	腹部长 AL					0.004	-0.053	-0.001
	腹部宽 AW						0.258	0.012
	大螯长 LL							0.000

体长对体重的直接决定系数最大(0.376)。体长和腹部宽对雌性、雄性和混合群体的共同决定系数均为最大(分别为 0.200、0.410 和 0.204)。

2.5 形态性状对体重的最优化方程及结果验证

利用逐步回归方法建立以形态性状为自变量,体重为因变量的回归方程:

$$Y_1 = -48.499 + 0.315X_{TL} + 1.159X_{AW} + 0.186X_{CL} \quad (R^2=0.978)$$

$$Y_2 = -55.987 + 0.453X_{BL} + 1.152X_{AW} \quad (R^2=0.959)$$

$$Y_3 = -51.651 + 1.738X_{AW} + 0.274X_{TL} \quad (R^2=0.960)$$

式中, Y_1 、 Y_2 和 Y_3 分别代表雌性、雄性和混合群体体重, X_{TL} 、 X_{AW} 、 X_{CL} 、 X_{BL} 分别代表全长、腹部宽、头胸甲长和体长。

经统计分析,雌性、雄性和混合群体回归方程的 F 值分别为 673.208、594.129 和 1199.067, 显著性检验呈极显著差异($P < 0.01$)。雌性、雄性和混合群体方程的回归截距均达到显著水平($P < 0.01$), 除雄性头胸甲长偏回归系数为显著水平($P < 0.05$)外, 3 个群体的

偏回归系数均达极显著水平($P < 0.01$)。全长和腹部宽对雌性群体体重的决定作用较大, 其次是头胸甲长; 体长和腹部宽对雄性体重的决定作用较大; 腹部宽和全长对混合群体的决定作用较大。

采用雌性、雄性回归方程分别对 50 只口虾蛄验证表明, 36 只性别判别正确, 判别准确率达 72%。

2.6 口虾蛄形态性状与体重的曲线模型拟合结果

分别以口虾蛄全长、体长、头胸甲长、尾扇长、腹部长、腹部宽和大螯长 7 个形态性状为自变量, 以体重为因变量, 进行曲线模型拟合, 结果见图 1~图 7。从图 1~图 7 可以看出, 雌性、雄性和混合群体口虾蛄拟合模型不完全相同。雌性群体口虾蛄全长、尾扇长与体重的最优拟合模型为幂函数, 头胸甲长、大螯长、腹部宽与体重的最优拟合模型为线性, 体长、腹部长与体重的最优拟合模型为指数函数; 雄性群体口虾蛄全长、体长、头胸甲长、大螯长与体重的最优拟合模型为幂函数, 尾扇长、腹部长、腹部宽与体重的最优拟合模型为指数函数; 混合群体口虾蛄全长、腹部宽与体重的最优拟合模型为幂函数, 头胸甲长、大

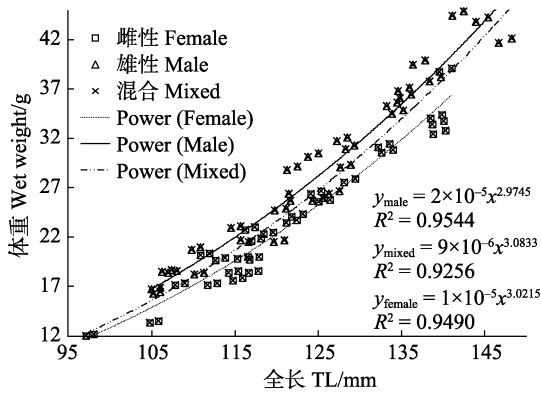


图 1 全长和体重的关系

Fig.1 Relationship of total length (x) and wet weight (y)

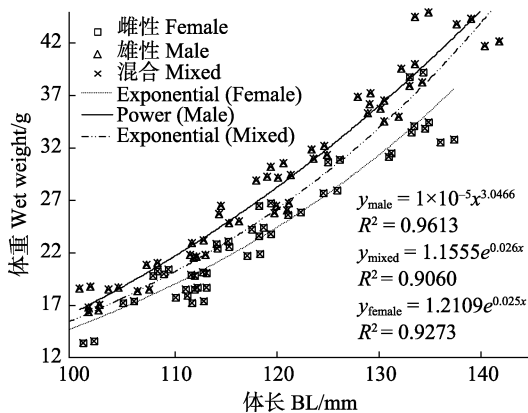


图 2 体长和体重的关系

Fig.2 Relationship of body length (x) and wet weight (y)

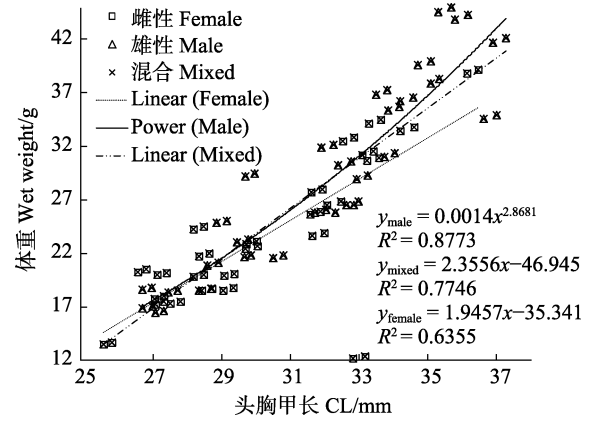


图 3 头胸甲长和体重的关系

Fig.3 Relationship of carapace length (x) and wet weight (y)

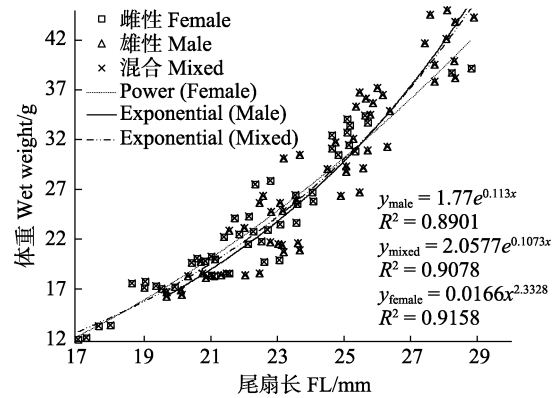


图 4 尾扇长和体重的关系

Fig.4 Relationship of tail fan length (x) and wet weight (y)

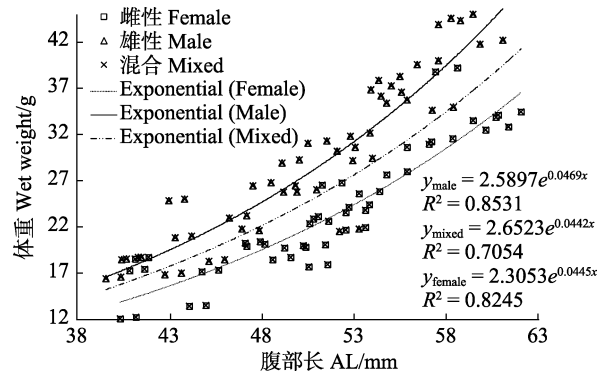


图 5 腹部长和体重的关系

Fig.5 Relationship of abdominal length (x) and wet weight (y)

螯长与体重的最优拟合模型为线性, 体长、尾扇长、腹部长与体重的最优拟合模型为指数函数。

3 讨论

3.1 口虾蛄雌性和雄性群体的生物学差异

自然界中, 许多水产动物如鱼类、龟鳖类和虾蟹

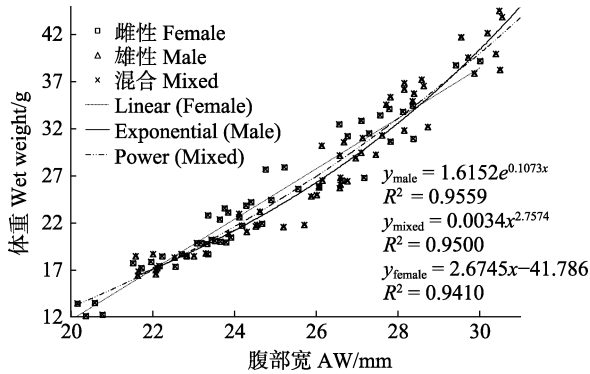


图6 腹部宽和体重的关系

Fig.6 Relationship of abdominal width (x) and wet weight (y)

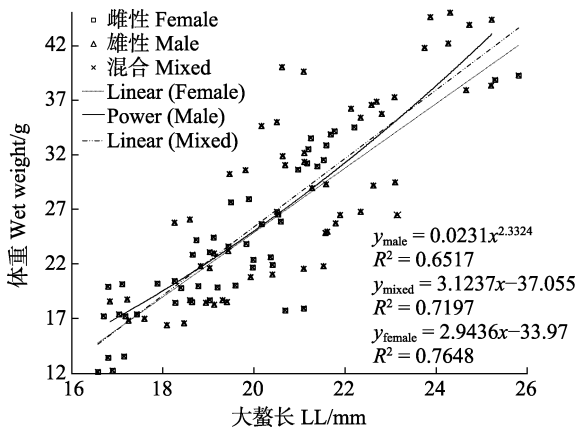


图7 大鳌长和体重的关系

Fig.7 Relationship of large pincers length (x) and wet weight (y)

类等水产动物生长性别差异明显(罗志嘉等, 2017), 水产动物性别间的外形特征对开展养殖及育种工作有重要意义(王冲, 2013)。本研究中, 口虾蛄雌性群体全长、体长、头胸甲长、尾扇长、腹部宽、大鳌长和体重等7个性状指标的平均值小于雄性群体, 而腹部长度的平均值则大于雄性群体。统计分析结果表明, 雌性和雄性群体头胸甲长、尾扇长、腹部宽、大鳌长和体重等数量性状差异极显著($P < 0.01$), 其他指标则差异不显著, 说明口虾蛄在某些性状上对于开展性别控制育种可能具有潜在价值。徐海龙等(2010)研究表明, 当体长 > 7.66 cm时, 雄性口虾蛄的体重超过雌性, 与本研究结果相一致。

3.2 口虾蛄形态性状对体重的影响

在选育工作中, 根据性别进行形态性状对体重影响分析, 可以更准确地指导选育工作(马晓等, 2015)。本研究结果显示, 口虾蛄各形态性状与体重之间存在极显著的表型相关($P < 0.01$)。对雌性群体而言, 全长和体重的相关系数最大(0.973); 对雄性群体而言, 体

长和体重的相关系数最大(0.974), 对混合群体而言, 腹部宽和体重的相关系数最大(0.969)。性状间的关系包括直接关系和间接关系, 仅通过各性状表型相关分析, 不能判定各自变量对因变量的影响, 因此, 有必要对性状进行通径分析, 通径分析可以将相关系数分为直接作用和间接作用, 获得对体重有较显著直接作用的形态性状(马晓等, 2015; 谷伟等, 2013; 王新安等, 2008)。

通径分析表明, 对雌性和混合群体而言, 腹部宽对体重的直接作用均为最大, 其次是体长和全长; 尾扇长对体重的间接作用均为最大。对雄性群体而言, 体长对体重的直接作用最大, 其次是腹部宽; 头胸甲长对体重的间接作用最大。

从决定系数的结果来看, 雌性和混合群体腹部宽对体重的直接决定系数均为最大, 其次是体长和全长; 雄性体长对体重的直接决定系数最大, 其次是腹部宽。3个群体的体长和腹部宽共同决定系数均为最大。

上述分析表明, 口虾蛄不同性别群体以及混合群体的形态性状对体重的影响有所差异。雄性群体体长对体重的直接影响大于雌性群体、混合群体, 雄性群体腹部宽对体重的直接影响则小于雌性群体和混合群体。对马粪海胆的研究结果也表明, 雌性马粪海胆壳径对体重的直接影响高于雄性, 而雌性马粪海胆壳高对体重的直接影响小于雄性。因此, 对某些物种进行选择育种时, 要考虑性别带来的影响(冷晓飞等, 2016)。

3.3 影响口虾蛄体重的决定性性状

回归分析表明, 雌性、雄性和混合群体回归方程达到显著或极显著水平, 相关指数分别达到 0.978、0.959 和 0.960, 说明其他性状的影响作用很小, 影响体重的决定性性状已经找到。决定3个群体的共同形态性状是腹部宽, 除此之外, 全长、头胸甲长对雌性体重的决定作用较大, 体长对雄性体重的决定作用较大, 全长对混合群体体重的决定作用较大。分别建立雌性、雄性和混合群体回归方程, 在生产实践中具有重要的指导价值。在研究中还发现, 尽管通径分析和决定系数分析对雌性群体和混合群体而言, 体长的直接影响大于全长, 但未能进入回归方程, 原因是全长和体长之间存在着很强的共线性。

3.4 单一形态性状与体重的拟合模型

曲线拟合模型可以准确反映形态性状与体重之间的关系(刘峰等, 2015; 陈红林等, 2016)。刘峰等(2015)研究 12 月龄半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)

结果表明, 雌性和雄性群体全长、体高和体厚与体重的最优拟合模型都为幂函数。

本研究中, 形态性状与体重的各拟合模型均差异极显著($P < 0.01$), 说明拟合结果均有意义。形态性状与体重之间的最优拟合模型有线性模型、幂函数模型、指数函数模型等, 口虾蛄雌性、雄性以及混合群体除全长、腹部长与体重的最优拟合模型类型相同外, 其他均不相同, 说明性别不同, 适用的模型也存在差异。对大连近海和青岛近海口虾蛄的研究表明, 雌性和雄性口虾蛄的体重与头胸甲长、体长、全长、腹宽、尾扇长均呈幂函数关系(林月娇等, 2008; 盛福利, 2009)。对黑斑口虾蛄(*Oratosquilla kempii*) (蒋霞敏等, 2000)和黄海北部口虾蛄(徐海龙等, 2010)的研究结果表明, 体长与体重呈幂函数关系, 与本研究结果不同, 可能是由于采样群体的地理差异、规格大小或研究方法差异造成的。陈红林等(2016)研究表明, 8 月龄和 14 月龄牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 3 个形态性状与体重最优拟合模型分别为线性模型和幂函数模型, 说明生长阶段不同, 拟合模型会有所差异。

模型拟合优度越大, 自变量对因变量的解释程度越高(陈红林等, 2016)。本研究中, 口虾蛄雌性和混合群体的头胸甲长、腹部长、大螯长和雄性大螯长与体重的拟合模型 R^2 均 < 0.85 , 表明这几个性状单独作为自变量不能很好反映体重的变化, 对牙鲆的研究也得出了相似的结果(陈红林等, 2016)。

本研究通过相关系数分析、通径分析及多元回归法分析研究了口虾蛄 3 个群体的形态性状与体重的相互关系, 结果表明, 在选择雌性口虾蛄时, 主要考虑全长、腹部宽和头胸甲长; 在选择雄性口虾蛄时, 主要考虑体长和腹部宽, 混合群体选择时主要考虑腹部宽和全长。

参 考 文 献

- Bian L, Liu G, Zhang QW, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric traits on body weight for *Thamnaconus septentrionalis* at different size. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 50–57 [边力, 刘刚, 张庆文, 等. 不同规格绿鳍马面鲀形态性状对体重影响的通径分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 50–57]
- Chen HL, Si ZX, Du JX, *et al.* Correlation and path coefficient analysis of the morphometric traits and body weight for the four color patterns of Oujiang color common carp. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 110–116 [陈红林, 司周旋, 杜金星, 等. 四种体色瓯江彩鲤形态性状与体质量的相关性与通径分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 110–116]
- Chen HL, Tian YS, Liu F, *et al.* Path analysis and curve estimates of morphometric traits and body weight of *Paralichthys olivaceus* at different growth stages. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 64–76 [陈红林, 田永胜, 刘峰, 等. 不同时期牙鲆形态性状对体重影响的通径分析及曲线拟合研究. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 64–76]
- Dong JJ, Sun CF, Tian YY, *et al.* Correlation analysis of the main morphological traits and body weight of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and morphological traits between males and females. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 76–84 [董浚键, 孙成飞, 田园园, 等. 翘嘴鲈主要形态性状与体重的相关性及雌雄形态性状差异分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 76–84]
- Gu W, Hu G, Xu GF, *et al.* Mathematical analysis of morphometric attribute effects on body weight for both genders of two-year-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(3): 108–113 [谷伟, 户国, 徐革锋, 等. 不同性别虹鳟形态性状对体重的影响效果分析. *东北农业大学学报*, 2013, 44(3): 108–113]
- Jiang XM, Zhao QS, Wang CL. Analysis on morphological parameters of *Oratosquilla kempii*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science)*, 2000, 39(z1): 268–270 [蒋霞敏, 赵青松, 王春琳. 黑斑口虾蛄的形态参数关系的分析. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(z1): 268–270]
- Leng XF, Zhang Y, Zhang WJ, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight for sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Fisheries Science*, 2016, 35(4): 359–363 [冷晓飞, 张艳, 张伟杰, 等. 不同性别马粪海胆壳形态性状对体质量的影响效果分析. *水产科学*, 2016, 35(4): 359–363]
- Lin YJ, Liu HY, Xu HL, *et al.* Morphometry of mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in Dalian coast. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(3): 215–217 [林月娇, 刘海映, 徐海龙, 等. 大连近海口虾蛄形态参数关系的研究. *大连水产学院学报*, 2008, 23(3): 215–217]
- Liu F, Chen SL, Liu XF, *et al.* Correlation and path coefficient analysis for body mass and three morphometric traits in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2015, 37(4): 94–102 [刘峰, 陈松林, 刘肖峰, 等. 半滑舌鳎 3 个形态性状与体质量的相关及通径分析. *海洋学报*, 2015, 37(4): 94–102]
- Liu Y, Han HZ, Wang TT, *et al.* Phenotypic analysis of the main morphological traits and body weight of black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 117–125 [刘阳, 韩慧宗, 王腾腾, 等. 许氏平鲉体质量与形态性状的表型特征分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 117–125]
- Luo ZJ, Wang P, Peng N, *et al.* Progress in growth sexual dimorphism of animals in aquaculture. *Chinese Journal of Fisheries*, 2017, 30(6): 56–60 [罗志嘉, 王佩, 彭娜, 等. 水产动物生长性别差异研究进展. *水产学杂志*, 2017,

- 30(6): 56–60]
- Ma QH, Li J, Xu L, *et al.* Mathematical analysis of effects of morphometric attributes on body weight of Asiatic brook lamprey *Lampetra reissneri* and gender distinguish. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(5): 19–28 [马庆华, 李军, 徐磊, 等. 嫩江雷氏七鳃鳗的形态性状对体质量的相关性及雌雄形态性状差异分析. *水产学杂志*, 2018, 31(5): 19–28]
- Ma X, Wang XQ, Xiong G, *et al.* Effect of morphological traits on body weight of female and male *Pelodiscus sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 93–97 [马晓, 王晓清, 熊钢, 等. 不同日龄池塘养殖中华鳖形态性状对体重的影响. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 93–97]
- Ministry of Agriculture and Rural Fisheries and Fisheries Administration, National Aquatic Technology Extension Station, China Fisheries Society, 2018 *China Fisheries Statistical Yearbook*. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2018 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- Sheng FL. Study on the fishery biology of *Oratosquilla oratoria* in the coastal waters of Qingdao. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [盛福利. 青岛近海口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 渔业生物学的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Sui YZ, Liu LW, Xu KD, *et al.* Population genetic structure of mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* based on the partial mitochondrial DNA cytochrome *b* gene. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2019, 34(3): 355–361 [隋宥珍, 刘连为, 徐开达, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的口虾蛄种群遗传结构研究. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(3): 355–361]
- Sui YZ, Zhou YD, Lu ZH, *et al.* Genetic diversity of mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*) populations in the East China Sea. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(2): 291–300 [隋宥珍, 周永东, 卢占晖, 等. 东海海域口虾蛄种群遗传多样性. *动物学杂志*, 2016, 51(2): 291–300]
- Tian Y, Hao SK, Wang YF, *et al.* Morphometric correlation and regression of shell size and body weight of *Arca boucardi* Reeve. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(6): 18–22 [田莹, 郝寿康, 王艺霏, 等. 布氏蚶 (*Arca boucardi*) 壳尺寸和体质量性状的相关性与回归分析. *水产学杂志*, 2018, 31(6): 18–22]
- Wang C. Comparison and path analysis of important economic traits between genders of scallop *Chlamys farreri*. *Fisheries Science*, 2013, 32(8): 441–446 [王冲. 栉孔扇贝不同性别间重要经济性状比较及通径分析. *水产科学*, 2013, 32(8): 441–446]
- Wang XA, Ma AJ, Xu K, *et al.* Relationship between morphometric attributes and body weight of juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(3): 540–545 [王新安, 马爱军, 许可, 等. 大菱鲆幼鱼表型形态性状与体重之间的关系. *动物学报*, 2008, 54(3): 540–545]
- Xiao LY, Ma GF, Guo WX, *et al.* Correlation and path analysis to quantitative traits of *Mactra chinensis* in different sexes. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(29): 115–119 [肖露阳, 马贵范, 郭文学, 等. 不同性别中国蛤蜊数量性状的相关与通径分析. *中国农学通报*, 2012, 28(29): 115–119]
- Xu HL, Zhang GF, Qiao XT, *et al.* Relationship between body length and body weight in mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in Northern Yellow Sea. *Fisheries Science*, 2010, 29(8): 451–454 [徐海龙, 张桂芬, 乔秀亭, 等. 黄海北部口虾蛄体长及体质量关系研究. *水产科学*, 2010, 29(8): 451–454]
- Xu SL, Wang CL, Mei WX, *et al.* The relations of the morphological parameter of *Oratosquilla Oratoria*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 1996, 15(1): 15–20 [徐善良, 王春琳, 梅文囊, 等. 口虾蛄形态参数关系的研究. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 1996, 15(1): 15–20]
- Zhang NG, Pan GP, Zhou WY, *et al.* A preliminary study on first feeding and early growth of larval *Oratosquilla oratoria*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018a, 38(5): 76–82 [张年国, 潘桂平, 周文玉, 等. 口虾蛄幼体开口饵料及早期生长的初步研究. *广东海洋大学学报*, 2018a, 38(5): 76–82]
- Zhang NG, Pan GP, Zhou WY. Reproductive characteristics and early development of *Oratosquilla oratoria*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018b, 34(36): 133–139 [张年国, 潘桂平, 周文玉. 口虾蛄的繁殖特性及早期发育研究. *中国农学通报*, 2018b, 34(36): 133–139]

(编辑 冯小花)

Effect and Curve Fitting of Morphological Traits to Body Weight Between Male and Female Mantis Shrimp (*Oratosquilla oratoria*)

ZHANG Xinming¹①, CHENG Shunfeng²

(1. Department of Marine Engineering, Rizhao Polytechnic, Rizhao Marine Biological Engineering Technology Research Center, Rizhao 276826; 2. College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract To study the correlation of biological traits between male and female mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*), eight biological indicators, total length (TL), body length (BL), carapace length (CL), tail fan length (FL), abdominal length (AL), abdominal width (AW), large pincers length (LL), and wet weight (Y) were measured. The influence of morphological traits on body weight was studied using correlation analysis and path analysis. The regression equations representing the effect of morphological traits on body weight were established using the stepwise regression method, and the curve models of seven shape traits and body weight were fitted. The results showed that the variation coefficient of body weight was greater than that of the morphological traits, and quantitative traits such as FL, AW, LL, and Y were significantly different between male and female *O. oratoria* ($P < 0.01$). The correlation of the quantitative traits reached a very significant level ($P < 0.01$) among the female, male, and mixed populations. In the relationship of morphological traits, the correlation coefficients of TL to BL were largest in the female group, the male group, and the mixed group (0.984, 0.993, and 0.988, respectively); regarding the relationship of morphological traits to body weight, the correlation coefficient of TL to body weight was highest in the female group (0.973), the correlation coefficient of BL to body weight was largest in the male group (0.974), and the correlation coefficient of AW to body weight was largest in the mixed population group (0.969). The greatest direct effect on body weight in females and mixed populations was AW (diameter coefficients of 0.418 and 0.508, respectively), and the direct effect on body weight was the greatest in male BL (diameter coefficient, 0.613). The direct determination coefficient of AW to body weight was the highest in the female group and the mixed population group (0.175 and 0.258, respectively), and the direct determination coefficient of BL to body weight was the highest in the male group (0.376). TL, AW, and CL are mainly considered for the female population, BL and AW are mainly considered for the male population, whereas AW and TL are mainly considered for the mixed population. The regression equations of female, male, and mixed populations with morphological traits as independent variables and body weight as dependent variables are: $Y_1 = -48.499 + 0.315X_{TL} + 1.159X_{AW} + 0.186X_{CL}$ ($R^2 = 0.978$), $Y_2 = -55.987 + 0.453X_{BL} + 1.152X_{AW}$ ($R^2 = 0.959$), and $Y_3 = -51.651 + 1.738X_{AW} + 0.274X_{TL}$ ($R^2 = 0.960$). The optimal fitting models of morphological traits to body weight of *O. oratoria* include the linear model, power function model, and exponential function model. The same types of optimal fitting models are used except for TL, AL between male and female *O. oratoria*; in addition, nothing else is the same. This study can provide a theoretical basis for the selection of *O. oratoria*.

Key words *Oratosquilla oratoria*; Morphological trait; Body weight; Path analysis; Regression analysis; Curve fitting

① Corresponding author: ZHANG Xinming, E-mail: zxm9706@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190730001

http://www.yykxjz.cn/

韩雅荃, 陈碧鹃, 张艳, 夏斌, 唐学玺. 三疣梭子蟹体内 As 的蓄积特异性研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 92-99
Han YQ, Chen BJ, Zhang Y, Xia B, Tang XX. Study on the accumulation specificity of arsenic in *Portunus trituberculatus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 92-99

三疣梭子蟹体内 As 的蓄积特异性研究*

韩雅荃^{1,2} 陈碧鹃² 张艳^{2①} 夏斌² 唐学玺¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘要 本研究以三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)为实验生物,应用半静态双箱模型的方法在室内模拟了三疣梭子蟹对砷(As)生物富集过程,As 暴露浓度梯度分别为 5、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 。通过对三疣梭子蟹体内总砷含量变化进行非线性拟合,得到其对总砷的生物富集系数(BCF)、生物富集动力学参数。结果显示,三疣梭子蟹肝胰腺组织对总砷的 BCF 明显高于肌肉组织。到富集实验结束时,三疣梭子蟹肝胰腺组织中由低到高浓度组对总砷的 BCF 分别为 21.21、15.07 和 10.31,吸收速率常数(k_1)及 BCF 均随水体中 As 浓度的增加而减少;肌肉组织中,由低到高浓度组对总砷的 BCF 分别为 5.17、3.74 和 5.83,5、100 $\mu\text{g/L}$ 实验组各动力学参数较为接近,但 20 $\mu\text{g/L}$ 实验组的富集速率常数 k_1 最小,释放速率常数(k_2)最大。研究表明,三疣梭子蟹 BCF 和生物学半衰期 $B_{1/2}$ 最小。

关键词 三疣梭子蟹; 总砷; 生物富集; 双箱动力学模型

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0092-08

中国是世界上唯一一个水产养殖产量超过捕捞产量的国家,水产养殖总产量约占世界水产养殖总产量的 70% (陈雨生等, 2012)。水产养殖产业不仅是我国主要的食物来源之一,也是农产品出口贸易的重要组成部分。

随着沿海工业化的发展,海洋重金属污染已成为十分突出的环境问题。已有研究表明,在渤海中部、山东半岛南部近海、深圳湾海域、珠江口海域、江苏近海、广西廉州湾、南海等近海海水中诸多重金属离子如铜(Cu^{2+})、铅(Pb^{2+})、砷(As^{3+} , As^{5+})、汞(Hg^{2+})和镉(Cd^{2+})的浓度逐年升高,已经超过第一类海水水质标准(徐勇等, 2017; 李月等, 2010; 彭鹏飞等, 2017; 时运红等, 2017; 顾莉等, 2012; 崔振昂, 2018; 王璐等, 2017)。虽然,大部分水体中重金属浓度均控制在

轻度或无污染程度,但是由于 Cu、Pb 和 As 等重金属具有较高的富集因子(孙玲玲等, 2018),会在生物体内慢慢蓄积并沿食物链逐级放大,这不仅对水产养殖动物的生长和繁殖造成直接影响,食用这些受污染的生物会严重威胁人类的健康(Rastegar *et al*, 2014; Ekino *et al*, 2007; Mukherjee *et al*, 2006; Nawrot *et al*, 2010)。

As 是一种具有类似于重金属元素毒性的非金属元素,以有机砷(Org-As)和无机砷(In-As)的形式广泛存在于自然界中(Braman *et al*, 1973)。本研究中,所提到总砷即为这二者的总和。通常来说,无机砷比有机砷具有更高的生物毒性。其中,无机砷主要以亚砷酸盐(As^{3+})和砷酸盐(As^{5+})形式存在,而 As^{3+} 的毒性更高,为 As^{5+} 的 11 倍(赵凤, 2012; 陈丽竹等, 2017)。有

* 中国水产科学研究院院级基本科研业务费(2018HY-ZD0601)资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2018HY-ZD0601)]. 韩雅荃, E-mail: 448136652@qq.com

① 通讯作者: 张艳, E-mail: yanzhang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-07-30, 收修改稿日期: 2019-08-22

机砷的种类相对无机砷要复杂得多, 主要以甲基砷 (Monomethylarsonate, MMA)、二甲基砷酸 (Dimethylarsinate, DMA)、三甲基砷 (Trimethylarsine, TMA)、砷-谷胱甘肽等形式存在 (杜森等, 2019)。生物体会将一部分的无机砷通过生成甲基化砷和砷-谷胱甘肽等毒性较低的有机化合物来降低砷的毒害 (赵凤, 2012), 此外, As 被生物体吸收后易在体内蓄积, 长期过量会对生物体造成严重危害 (Grund *et al*, 1987; Casarett *et al*, 2001; 刘静等, 2018)。美国疾病控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 和国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 将 As 确定为第一类致癌物质 (赵素莲等, 2002)。诸多研究表明, 在青梭子蟹 (*Portunus segnis*)、截形斧蛤 (*Donax trunculus*)、红鲷鱼 (*Mullus barbatus*) 等海产品中都检测出不同程度的 As (Ghaeni *et al*, 2015; Ferrante *et al*, 2019; Copat *et al*, 2018; Filippini *et al*, 2018), 而这些含 As 的海产品是人类摄入 As 的主要途径之一 (Jia *et al*, 2018)。

虾、蟹等甲壳类水产生物是人们所喜爱的食品, 同时, 也是 As 富集因子较高的水产生物之一 (程家丽等, 2017; 蒋玉艳等, 2017; 胡立成等, 2017)。虽然国内外学者对甲壳类重金属污染特征和蓄积特异性进行了大量的研究 (Hosseini *et al*, 2014; Ip *et al*, 2005; Protasowicki *et al*, 2008; Flores *et al*, 2014), 但目前大部分研究集中于 As 在甲壳类体内的生物富集情况进行了研究 (Ghaeni *et al*, 2015; Bakker *et al*, 2017; Liu *et al*, 2017), 结果发现, 各个器官中, 污染物浓度在肝胰腺中最高, 肌肉中最低。而关于甲壳类总砷的蓄积特异性研究则尚未见报道。

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 具有经济价值高、生长快、繁殖技术成熟等特点, 是我国北部产量最高的海产食用蟹类之一 (戴爱云等, 1997)。关于三疣梭子蟹 As 的蓄积特异性研究尚未报道。本研究通过分析三疣梭子蟹不同组织中总砷的含量, 运用双箱动力学模型研究三疣梭子体内 As 的富集动力学过程, 阐明三疣梭子蟹中 As 的蓄积特异性, 以期为未来的防控技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验生物

实验选用规格相近、活力旺盛的健康三疣梭子蟹 240 只, 平均壳长为 (70.32±2.46) mm, 平均壳宽为 (140.23±2.66) mm, 平均体重为 (139.86±5.22) g, 于 2018 年 9 月购自山东日照市某养殖场, 该海域 As 的

环境背景值为 0.91 μg/L。

1.2 试剂与仪器

实验用硫脲、NaOH、硼氢化钾均为上海国药试剂厂的分析纯试剂; 实验所用 As 的标准溶液为中国计量科学研究院 1000 mg/ml 五价砷的标准溶液; 分析用水为 Millipore-F2BN 43517C 型超纯水装置制备的超纯水; 所用水箱为聚乙烯塑料水箱 (规格为 106 cm×64 cm×20 cm)。实验所有玻璃器皿均以硝酸溶液 (1+4) 浸泡 24 h, 用自来水反复冲洗后, 再用去离子水冲洗 3 遍。消化仪器为 X42A 铝模块自动消化装置, 分析仪器为 AFS-933 原子荧光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 三疣梭子蟹的暂养 将三疣梭子蟹暂养于聚乙烯塑料水箱中。暂养期间, 连续充氧, 每天于 18:00 投喂 1 次 (投喂量为三疣梭子蟹体重的 10%, 根据饵料食用情况增减)。投喂 2 h 后, 完全换水 1 次, 所用海水盐度为 30.4~30.7, 水温为 22℃~25℃, pH 为 8.0~8.3, 溶解氧 (DO) > 6.5 mg/L。

1.3.2 暴露实验 实验分为富集和释放 2 个阶段, 均进行 15 d。实验暴露浓度以渔业水质标准为中间值, 选择低于 5 倍和高于 10 倍, 同时, 又根据实际情况进行调整, 最终将实验浓度梯度设为 4 组, 其中, 3 组为实验组, 1 组为海水对照组, 每组设 3 个平行。实验组的暴露浓度分别为 5、20、100 μg/L。

富集过程采用半静态法进行暴露实验。充氧, 使海水中 DO > 6.5 mg/L, 每 24 h 换水 1 次, 换水量为 100%。实验开始加 As 前, 采集三疣梭子蟹样品, 以测量总砷的本底值。定期查看三疣梭子蟹健康状况, 及时将行为异常或者死亡的三疣梭子蟹捞出。实验期间, 三疣梭子蟹饵料为鲜活饲料 [菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)], 投喂情况与暂养期间一致。分别于第 0、3、5、10、15 天采集三疣梭子蟹样品, 取生物体肌肉、肝胰腺组织, 匀浆, 迅速冷冻, 以备分析。同时, 采集水体样品, 存放于 -20℃ 冰箱备用。

蓄积实验结束后, 将余下的三疣梭子蟹移入盛有天然海水的水箱内进行体内总砷的释放实验。每天定时、定量喂食和换水 (与蓄积实验相同), 分别于第 18、20、25、30 天采集三疣梭子蟹样品, 取生物体肌肉、肝胰腺组织, 匀浆, 迅速冷冻, 以备分析。同时, 采集水体样品, 存放于 -20℃ 冰箱备用。

1.3.3 样品前处理 参照《食品中总砷及无机砷的测定中的方法》(GB 5009.11-2014), 采用湿法消解法对所取样品进行消解, 准确称取 1~2 g (精确至 0.01 g)

样品放入消化管,向消化管中分别加入 8 ml 浓硝酸和 2 ml 高氯酸,静置过夜使样品组织初步消解。后经 X42A 铝模块自动消化装置高温加热消解至管内有大量白烟冒出,管底约剩 1 ml 澄清透明溶液后,将得到的内溶物移入 100 ml 容量瓶使用蒸馏水定容,采用原子荧光光度计进行检测,检测的同时进行试剂空白实验。

1.4 数据处理与实验应用模型

1.4.1 数据处理 采用 Excel 2003 软件对数据进行计算和非线性拟合;采用 SPSS13.0 软件进行显著性差异分析;使用 Origin 7.5 软件绘图。

1.4.2 实验应用模型 在重金属的富集研究过程中,双箱动力学模型能较好地描述水体与生物体之间的作用过程(Kahle *et al.*, 2002),通常假设污染物在生物体内的生物富集,可以近似看作是污染物在水体和生物体之间的两相分配过程,因此,其吸附、解吸过程可用一级动力学过程进行描述。目前,许多应用研究都运用了该模型(王亚炜等, 2008; 张聪等, 2012; Martins *et al.*, 2012; 苑旭洲等, 2012),其主要描述见图 1。

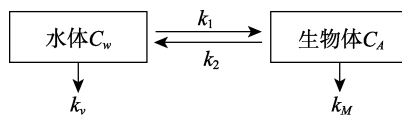


图 1 生物富集双箱动力学模型

Fig. 1 Model of two-compartment bioconcentration

从图 1 可以看出, k_1 为生物富集速率常数, k_2 为生物排出速率常数, k_v 为水体的挥发常数, k_M 为生物的代谢速率常数, C_w 为水体重金属浓度(mg/L), C_A 为生物体内重金属浓度(mg/kg)。

水相(含有重金属污染物的水体)公式:

$$\frac{dC_w}{dt} = 0 \quad (1)$$

生物体相公式:

$$\frac{dC_A}{dt} = k_1 C_w - (k_2 + k_M) C_A \quad (2)$$

因实验周期较短,故忽略水体中污染物的自然挥发及生物体的代谢。由方程(1)和方程(2)可得:

$$C_A = C_0 + C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{富集过程}(0 < t < t^*) \quad (3)$$

$$C_A = C_0 + C_w \frac{k_1}{k_2} [e^{-k_2 (t-t^*)} e^{-k_2 t}] \quad \text{释放过程}(t > t^*) \quad (4)$$

式中, t 为实验进行的时间(d), t^* 为富集阶段结束的时间(d), C_0 为实验开始前生物体内金属的浓度(mg/kg)。由方程(3)和方程(4)对富集和释放进行非线性拟合即可得到 k_1 和 k_2 。

理论上,在平衡状态下,生物富集系数(BCF)和生物学半衰期 $B_{1/2}$ 分别使用以下公式得到:

$$BCF = \frac{k_1}{k_2} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{C_A}{C_w} \quad (5)$$

$$B_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad (6)$$

双箱动力学模型可用来计算即使没有达到浓度平衡情况下,理论平衡状态下的动力学参数。

2 结果

2.1 水体中总砷的浓度

从表 1 可以看出,对照组第 30 天水体中的总砷浓度低于对照组其他天数的取样点,原因可能是海水批次不同。在富集阶段,各实验组水体中总砷浓度比实验设置的浓度稍微偏低,可能是随着三疣梭子蟹的滤食等行为,有少量的 As 被摄入,导致实际测得的浓度低于实验设置的浓度。而在释放阶段,实验组与对照组相比,实验组水体中总砷浓度高于对照组,且高浓度组水体中总砷的浓度比低浓度组稍高,且随着时间的推移,总砷浓度有所降低,但总体下降幅度较小,表明在释放阶段三疣梭子蟹体内的 As 随着代谢有一定程度的释放,且随着时间的推移,释放明显

表 1 水体中总砷的浓度($\mu\text{g/L}$)
Tab.1 The concentration of total arsenic in water ($\mu\text{g/L}$)

实验分组 Experimental groups ($\mu\text{g/L}$)	时间 Time (d)								
	0	3	5	10	15	18	20	25	30
对照组 Control	0.46±0.09	0.46±0.15	0.40±0.16	0.45±0.09	0.44±0.21	0.41±0.16	0.43±0.13	0.30±0.16	0.12±0.08
5	0.46±0.09	4.61±0.28	4.61±0.31	4.59±0.48	4.53±0.34	0.90±0.08	0.67±0.10	0.46±0.22	0.41±0.06
20	0.46±0.09	18.68±1.11	18.74±0.60	18.45±1.38	18.30±3.10	0.92±0.11	0.68±0.02	0.46±0.15	0.45±0.05
100	0.46±0.09	93.85±2.61	93.37±1.87	96.04±1.76	99.81±8.26	1.03±0.04	0.89±0.14	0.57±0.12	0.57±0.11

减弱或者基本无明显释放。同时, 实验组中三疣梭子蟹身体表面富集的 As 也会在释放过程中重新释放到水体中, 这也可能导致实验组水体中总砷浓度高于对照组。

2.2 三疣梭子蟹肝胰腺中总砷的生物富集及释放结果

在富集实验阶段, 与对照组取样点相比, 5、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组中, 每个对应的取样点肝胰腺总砷浓度均有显著升高($P<0.05$)。除 20 $\mu\text{g/L}$ 组第 5 天与

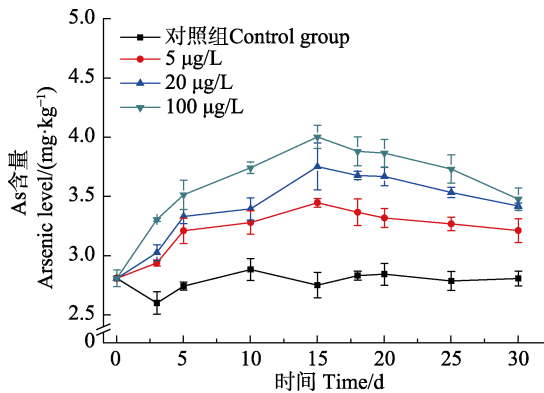


图 2 肝胰腺中总砷的浓度

Fig.2 The concentration of total arsenic in hepatopancreas

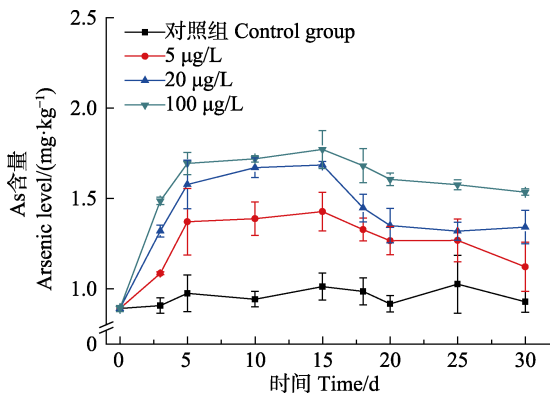


图 3 肌肉中总砷的浓度

Fig.3 The concentration of total arsenic in muscle

第 10 天总砷浓度无显著差异外, 其他各实验组中, 三疣梭子蟹肝胰腺总砷浓度均随着暴露时间的增加而显著增加($P<0.05$), 且前 5 d 增长速度较快, 5 d 以后增长速度减缓, 在富集实验结束(15 d)时, 总砷浓度达到最大值, 5、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组的总砷浓度依次为 3.447、3.754 和 4.004 mg/kg (湿重)。在释放实验阶段, 高浓度组三疣梭子蟹肝胰腺中总砷的释放比低浓度组快, 到释放实验结束(30 d)时, 各实验组中的总砷浓度仍显著高于空白组($P<0.05$) (图 2)。

2.3 三疣梭子蟹肌肉中总砷的生物富集及释放结果

在富集实验阶段, 三疣梭子蟹肌肉中总砷浓度的增长趋势同肝胰腺类似, 均随着时间的增加而增加, 在 0~5 d 中, 总砷浓度显著增加($P<0.05$), 5~15 d 上升趋势不变, 但相较 0~5 d 的快速上升, 其总砷浓度进入平稳期, 在富集实验结束(15 d)时, 总砷浓度达到最大值, 5、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组的总砷浓度分别为 1.426、1.684 和 1.770 mg/kg (湿重); 在释放实验 15~20 d 时, 肌肉中的总砷有较为明显的排出, 其中, 20 $\mu\text{g/L}$ 实验组肌肉中总砷浓度降低较快, 20 d 以后, 20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度组肌肉中总砷浓度基本趋于不变。与肝胰腺中相同, 到释放实验结束(30 d)时, 各实验组中的总砷含量仍显著高于对照组($P<0.05$) (图 3)。

2.4 三疣梭子蟹对总砷的生物富集动力学参数

根据双箱动力学模型对实验得到的数据进行计算, 然后再根据公式(3)~公式(6), 分别得到三疣梭子蟹对总砷生物富集的其他动力学参数 k_1 、 k_2 、BCF、 $B_{1/2}$ 。三疣梭子蟹对总砷的生物富集动力学参数见表 2。

从表 2 可以看出, 5、20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组中肝胰腺的 BCF 分别为 21.21、15.07 和 10.31, $B_{1/2}$ 分别为 5.92、4.36 和 3.00。因此, 三疣梭子蟹肝胰腺对总砷的富集能力由低到高浓度逐渐降低, 代谢能力逐渐

表 2 三疣梭子蟹对不同浓度下总砷的各生物富集动力学参数

Tab.2 The kinetic parameters of bioconcentration of total arsenic by *P. trituberculatus* in the different concentration

污染物 Contaminant	组织部位 Tissues	暴露浓度 Exposure concentration ($\mu\text{g/L}$)	生物富集 速率常数 k_1	生物排出 速率常数 k_2	生物富集 系数 BCF	生物学半衰期 $B_{1/2}/\text{d}$
砷 As	肝胰腺 Hepatopancreas	5	2.48	0.12	21.21	5.92
		20	2.40	0.16	15.07	4.36
		100	2.38	0.23	10.31	3.00
	肌肉 Muscle	5	0.69	0.13	5.17	5.17
		20	0.68	0.18	3.74	3.79
		100	0.72	0.12	5.83	5.64

增强。其中, k_1 随水体中 As 暴露浓度的增加而减小, k_2 随水体中 As 浓度的增加而增加。肌肉中, 5 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组各动力学参数较为接近, 但 20 $\mu\text{g/L}$ 实验组的 k_1 最小, k_2 最大, 因此, 其 BCF 和生物学半衰期最小。

3 讨论与结论

在本研究中, 三疣梭子蟹肝胰腺组织对总砷的富集能力比肌肉组织高。肝胰腺中, 总砷的浓度在富集实验结束(15 d)时显著高于肌肉, 并且与 Perry 等(2015)、Ghaeni 等(2015)、Cheng 等(2018)大部分研究的结果相一致。

总体上来看, 不同浓度实验组中, 肝胰腺的总砷浓度随着水体中 As 的浓度增加而增加, 并且差异较为明显; 而不同浓度实验组中, 肌肉的总砷浓度随着水体中 As 浓度的增加而增加, 但 20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 实验组的结果相比无明显差异。Yilmaz 等(2007)研究表明, 重金属离子在螃蟹体内器官的累积程度取决于器官的生理作用, 肝胰腺作为螃蟹体内的代谢解毒器官被认为是金属蓄积的靶器官, 这也是肝胰腺对总砷的富集能力高于肌肉的主要原因。

总砷在三疣梭子蟹肝胰腺和肌肉中富集和释放都是前期(0~5 和 15~20 d)增加或降低迅速, 后期(5~15 和 20~30 d)增加或降低趋于缓慢, 这与许高鹏等(2014)对苯并[a]芘在三疣梭子蟹体内的富集动力学研究结果相一致。在富集阶段, 总砷富集的动力主要是 As 从高浓度的水相向低浓度的生物相扩散的渗透势能, 随着暴露时间的增加, 生物相中富集总砷不断增加, 生物相-水相之间的渗透势能也不断降低, 从而导致实验中富集速率随着时间推移不断降低。而在释放阶段前期, 总砷释放的动力同样是高浓度的生物相向低浓度的水相扩散的渗透势能; 在释放阶段后期, 渗透势能作用不断降低, 同时, 部分 As 和生物相中如谷胱甘肽、S-腺苷甲硫氨酸、巯基组氨酸三甲基内盐、金属硫蛋白以及其他生物大分子相结合(赵凤, 2012; 薛启祥等, 2016; 李晓等, 2016), 从而导致实验组生物相所含有的总砷高于对照组, 并且这种趋势随着实验组浓度增加而加重。

参 考 文 献

Bakker AK, Dutton J, Sclafani M, *et al.* Accumulation of nonessential trace elements (Ag, As, Cd, Cr, Hg and Pb) in Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) early life stages. *Science of the Total Environment*, 2017, 596-597: 69-78

Braman RS, Foreback CC. Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, 1973, 182(4118): 1247-1249

Casarett LJ, Doull J, Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology. *Ulster Medical Journal*, 2001, 50(1): 73

Chen YS, Fang RJ, Qiao J. Research on the development of marine aquaculture in China. *Issues in Agricultural Economy*, 2012(6): 72-77 [陈雨生, 房瑞景, 乔娟. 中国海水养殖业发展研究. *农业经济问题*, 2012(6): 72-77]

Chen LZ, Wang D, Cao RW, *et al.* Bioaccumulation and biotransformation of inorganic arsenic in *Ruditapes philippinarum*. *Marine Science Bulletin*, 2017, 36(3): 326-332 [陈丽竹, 王丹, 曹瑞文, 等. 菲律宾蛤仔对三价和五价无机砷的富集转化规律. *海洋通报*, 2017, 36(3): 326-332]

Cheng JL, Ma YN, Liu TT, *et al.* Accumulation and health risks of heavy metals in the seafood from China. *Journal of Hygiene Research*, 2017, 46(1): 148-154 [程家丽, 马彦宁, 刘婷婷, 等. 中国部分海产品重金属污染特征及健康风险评估. *卫生研究*, 2017, 46(1): 148-154]

Cheng L, Zhou JL, Cheng J. Bioaccumulation, tissue distribution and joint toxicity of erythromycin and cadmium in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Chemosphere*, 2018, 210: 267-278

Copat C, Grasso A, Fiore M, *et al.* Trace elements in seafood from the Mediterranean Sea: An exposure risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 115: 13-19

Cui ZA, Teng DQ, Zhang L, *et al.* Comprehensive monitoring of seawater environmental quality in Lianzhou Bay of Guangxi. *Geological Survey of China*, 2018, 5(5): 76-86 [崔振昂, 滕德强, 张亮, 等. 广西廉州湾海水环境质量综合监测. *中国地质调查*, 2018, 5(5): 76-86]

Dai AY, Feng ZQ, Song YZ, *et al.* Preliminary investigation on fishery biology of *Portunus trituberculatus*. *Chinese Journal of Zoology*, 1977(2): 36-39 [戴爱云, 冯钟琪, 宋玉枝, 等. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查. *动物学杂志*, 1977(2): 36-39]

Du S, Zhang L. Biomagnification potential and the mechanisms of arsenic in marine food chains. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(1): 54-66 [杜森, 张黎. 砷在海洋食物链中的生物放大潜力及发生机制探讨. *生态毒理学报*, 2019, 14(1): 54-66]

Kahle J, Zauke GP. Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 2002, 59(1-2): 115-135

Editorial Office of Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture. 2017 China fisheries statistical yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2017 [农业部渔业渔政管理局编. 2017 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]

Ekino S, Susa M, Ninomiya T, *et al.* Minamata disease revisited:

- an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences*, 2007, 262(1–2): 131–144
- Ferrante M, Napolis S, Grasso A, *et al.* Systematic review of arsenic in fresh seafood from the Mediterranean Sea and European Atlantic coasts: A health risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 126: 322–331
- Filippini T, Malavolti M, Cilloni S, *et al.* Intake of arsenic and mercury in a northern Italy community from fish and seafood. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 116: 20–26
- Flores IO, Meyerwillerer AO, Olivosortiz A, *et al.* Lead in shrimp *Litopenaeus vannamei* boone in sublethal concentrations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2014, 77(18): 1084–1090
- Ghaeni M, Pour NA, Hosseini M. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyl (PCB), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), mercury, methyl mercury, and arsenic in blue crab *Portunus segnis* from Persian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2015, 187(5): 253
- Grund SC, Kunibert H, Uwe WH. Arsenic and arsenic compounds. *Iarc Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Man*, 1987, 7: 39
- Gu L, Hua ZL, Shu J, *et al.* Assessment of water quality in coastal water areas of Jiangsu Province. *Journal of Hehai University (Natural Science)*, 2012(5): 498–502 [顾莉, 华祖林, 树锦, 等. 江苏近海水域水环境质量现状评价. *河海大学学报(自然科学版)*, 2012(5): 498–502]
- Hu LC, Zhang JH. Investigation of heavy metal and arsenic pollution in aquatic products in Yueqing. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2017(13): 123–125 [胡立成, 张金怀. 乐清市水产品中的重金属及砷污染状况调查. *中国卫生检验杂志*, 2017(13): 123–125]
- Hosseini M, Nabavi SMB, Parsa Y, *et al.* Mercury accumulation in selected tissues of shrimp *Penaeus merguensis* from Musa estuary, Persian Gulf: Variations related to sex, size, and season. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, 186(9): 5439–5446
- Ip CCM, Li XD, Zhang G, *et al.* Heavy metal and Pb isotopic compositions of aquatic organisms in the Pearl River Estuary, South China. *Environmental Pollution*, 2005, 138(3): 494–504
- Jia Y, Wang L, Ma L, *et al.* Speciation analysis of six arsenic species in marketed shellfish: Extraction optimization and health risk assessment. *Food Chemistry*, 2018, 244: 311–316
- Jiang YY, Meng HY, Chen H, *et al.* Risk assessment on the dietary exposure of arsenic in Guangxi residents. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(6): 745–749 [蒋玉艳, 蒙浩洋, 陈晖, 等. 广西主要食品中砷污染及居民膳食暴露风险评估. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(6): 745–749]
- Li X, Wang Y, Wu ZH, *et al.* Safety levels of three heavy metals in clam *Scapharca broughtonii* culturing water. *Fisheries Science*. 2016, 35(5): 578–582 [李晓, 王颖, 吴志宏, 等. 魁蚶对 3 种重金属生物富集动力学研究. *水产科学*, 2016, 35(5): 578–582]
- Li Y, Tan LJ, Wang JT. The temporal and spatial distribution of cadmium, plumbum, mercury, arsenic of Shandong Southern coastal surface seawater. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2010(S1): 179–184 [李月, 谭丽菊, 王江涛. 山东半岛南部近海表层海水中镉、铅、汞、砷的时空变化. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010(S1): 179–184]
- Liu J, Li SX, Zhu J, *et al.* Discussion on the harm to human body by several kinds of heavy metal elements and preventive measures. *China Resources Comprehensive Utilization*, 2018, 36(3): 182–184 [刘静, 李树先, 朱江, 等. 浅谈几种重金属元素对人体的危害及其预防措施. *中国资源综合利用*, 2018, 36(3): 182–184]
- Liu Y, Liu G, Yuan Z, *et al.* Presence of arsenic, mercury and vanadium in aquatic organisms of Laizhou Bay and their potential health risk. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 125(1–2): 334–340
- Martins RJE, Freitas OMM, Vilar JPV, *et al.* Accumulation and release of Pb(II) in aqueous solution by aquatic mosses (*Fontinalis antipyretica*). *International Journal of Environment and Waste Management*, 2012, 9(3–4): 270–283
- Mukherjee A, Sengupta MK, Hossain MA, *et al.* Arsenic contamination in groundwater: A global perspective with emphasis on the Asian scenario. *Journal of Health Population and Nutrition*, 2006, 24(2): 142–163
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, *et al.* Cadmium exposure in the population: From health risks to strategies of prevention. *Biometals*, 2010, 23(5): 769–782
- Peng PF, Li XL, Yang Q, *et al.* Distribution and evaluation of heavy metals in surface seawaters and sediments in Huangmao Sea of the Pearl River Estuary. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2017, 29(4): 28–32 [彭鹏飞, 李绪录, 杨琴, 等. 珠江口黄茅海表层海水和沉积物中重金属的分布及评价. *环境监测管理与技术*, 2017, 29(4): 28–32]
- Perry H, Isphording W, Trigg C, *et al.* Heavy metals in red crabs, *Chaceon quinque-dens*, from the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 101(2): 845–851
- Protasowicki M, Dural M, Jaremek J. Trace metals in the shells of blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Poland coast of Baltic Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2008, 139(1–3): 329–337
- Rastegar SO, Mousavi SM, Shojaosadati SA. Cr and Ni recovery during bioleaching of dewatered metal-plating sludge using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 61–68

- Shi YH, Li MY, Li B, *et al.* Spatial and temporal distribution of heavy metals in the sediment of Shenzhen bay. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(2): 186–191 [时运红, 李明远, 李波, 等. 深圳湾沉积物重金属污染时空分布特征. *海洋环境科学*, 2017, 36(2): 186–191]
- Sun LL, Song JM, Yu Y, *et al.* Preliminary evaluation of heavy metal levels and food risks in 14 marine economic organisms in Rongcheng Bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 52–61 [孙玲玲, 宋金明, 于颖, 等. 荣成湾 14 种海洋经济生物体中的重金属水平与食用风险初步评价. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 52–61]
- Wang L, Yu KF, Wang YH, *et al.* Distribution characteristic of heavy metals in coral reefs located in the Zhongsha Islands and Xisha Islands of South China Sea. *Tropical Geography*, 2017, 37(5): 718–727 [王璐, 余克服, 王英辉, 等. 南海中沙群岛、西沙群岛珊瑚岛礁区海水重金属的分布特征. *热带地理*, 2017, 37(5): 718–727]
- Wang YW, Wei YS, Liu JX. Heavy metal bioaccumulation model of aquatic organisms: An overview. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(1): 12–20 [王亚炜, 魏源送, 刘俊新. 水生生物重金属富集模型研究进展. *环境科学学报*, 2008, 28(1): 12–20]
- Xu GP. Kinetics of benzo[a]pyrene bioconcentration in *Portunus trituberculatus*. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 357–363 [许高鹏. 三疣梭子蟹体内苯并[a]芘的富集动力学. *海洋渔业*, 2014, 36(4): 357–363]
- Xu Y, Qu KM, Zhao J, *et al.* Assessment of environmental water quality in the central region of the Bohai Sea in summer. *Progress in Fishery Science*, 2017, 38(2): 8–15 [徐勇, 曲克明, 赵俊, 等. 渤海中部海区水域夏季环境质量综合评价. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 8–15]
- Xue QX, Shen X, Tian T, *et al.* Metallothionein decreases the expression of GRP78 and CHOP proteins followed by apoptosis of liver cells in arsenic poisoning rats. *Basic and Clinical Medicine*. 2015, 35(6): 739–743 [薛启祥, 沈雪, 田甜, 等. 金属硫蛋白降低 GRP78 和 CHOP 蛋白表达减轻大鼠砷中毒肝细胞凋亡. *基础医学与临床*, 2015, 35(6): 739–743]
- Yuan XZ, Cui Y, Chen BJ, *et al.* Kinetic study on the bioconcentration of six heavy metals in *Ruditapes philippinarum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 49–56 [苑旭洲, 崔毅, 陈碧鹃, 等. 菲律宾蛤仔对 6 种重金属的生物富集动力学. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 49–56]
- Yilmaz AB, Yilmaz L. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus de Hann*, 1844). *Food Chemistry*, 2007, 101: 1664–1669
- Zhang C, Chen JF, Ma SS, *et al.* Kinetic study on the bioconcentration and elimination of heavy metals Cu and Cd in *Crassostrea plicatula*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 64–72 [张聪, 陈聚法, 马绍赛, 等. 褶牡蛎对水体中重金属铜和镉的富集动力学特性. *渔业科学进展* 2012, 33(5): 64–72]
- Zhao F. Study on the degradation of arsenic-glutathione and the influence of arsenicals for free radical scavenging by glutathione. Master's Thesis of Tianjin University, 2012 [赵凤. 砷-谷胱甘肽复合物的降解及含砷化合物对谷胱甘肽清除自由基的影响. 天津大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Zhao SL, Wang LF, Liang JH. Harm of arsenic in drinking water and measures to remove arsenic. *Modern Preventive Medicine*, 2002, 29(5): 651–652 [赵素莲, 王玲芬, 梁京辉. 饮用水中砷的危害及除砷措施. *现代预防医学*, 2002, 29(5): 651–652]

(编辑 陈 严)

Study on the Accumulation Specificity of Arsenic in *Portunus trituberculatus*

HAN Yaquan^{1,2}, CHEN Bijuan², ZHANG Yan^{2①}, XIA Bin², TANG Xuexi¹

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003;

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

Abstract Heavy metal pollution in marine environments has become a prominent environmental problem. Many domestic and overseas scholars have conducted a great deal of research on the heavy metal pollution characteristics and accumulation specificity in crustaceans. Economically important crustaceans in aquaculture such as the Whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*), Summer flounder (*Paralichthys dentatus*), yellow croaker (*Larimichthys crocea*), Chesapeake blue crab (*Callinectes sapidus*), and Japanese blue crab (*Portunus trituberculatus*) are very popular foods but also have a high arsenic-enrichment factor. One of the most economically important marine aquaculture crabs in China, *P. trituberculatus*, has recently increased in popularity due to its high nutritional value and desirable flavor. The bioaccumulation of arsenic in the Gazami crab (*Portunus trituberculatus*) has not been reported. Exploring the accumulation specificity of arsenic in *P. trituberculatus* provides the scientific data necessary to determine safe thresholds and arsenic limit in marine aquaculture. In our study, bioaccumulation of arsenic was studied in *P. trituberculatus* and simulated using the two-compartment model. The exposure concentration gradients of arsenic were 5, 20, and 100 $\mu\text{g/L}$. We analyzed data with non-linear curve fitting, obtaining the kinetic parameters such as bioconcentration factor (BCF), uptake rate constant (k_1), elimination rate constant (k_2), and biological half-life ($B_{1/2}$). The results showed that the BCF of arsenic in the hepatopancreas was significantly higher than muscle. At the end of the enrichment experiment, the BCFs of arsenic in the hepatopancreas tissues of *P. trituberculatus* from low to high concentration groups were 21.21, 15.07, and 10.31, respectively. The uptake rate constant k_1 and the BCF decreased with the increase of the aquatic arsenic concentration. The BCFs of arsenic in the muscle from low to high concentration groups were 5.17, 3.74, and 5.83, respectively. The kinetic parameters of the 5 $\mu\text{g/L}$ and 100 $\mu\text{g/L}$ experimental groups were similar. However, the uptake rate constant k_1 was the smallest. The elimination rate constant k_2 was the largest in the 20 $\mu\text{g/L}$ experimental group, while the BCF and $B_{1/2}$ were the smallest.

Key words *Portunus trituberculatus*; Total arsenic; Bioconcentration; Two-compartment model

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190820002

http://www.yykyxjz.cn/

董世鹏, 蔺凡, 姜妮妮, 杜美荣, 高亚平, 李凤雪, 侯兴, 蒋增杰. 基于叶绿素 *a* 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 100–107

Dong SP, Lin F, Jiang WW, Du MR, Gao YP, Li FX, Hou X, Jiang ZJ. Estimation of carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay based on spatial and temporal distribution of chlorophyll *a*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 100–107

基于叶绿素 *a* 时空分布的胶州湾 菲律宾蛤仔养殖容量评估*



董世鹏^{1,2} 蔺凡¹ 姜妮妮¹ 杜美荣¹ 高亚平¹
李凤雪¹ 侯兴^{1,2} 蒋增杰^{1,3①}

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

摘要 2017年7月~2019年4月期间,本研究采用大面观测、现场模拟实验与生长情况跟踪相结合的手段,基于 Dame 指标和 Herman 模型估算了胶州湾菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的养殖容量。结果显示,调查期间,胶州湾水体的叶绿素 *a* 浓度为 2.09~4.28 mg/m³, 均值为 3.07 mg/m³; 不同规格(壳长 2.29~3.59 cm)的菲律宾蛤仔单位个体的平均滤水率为 0.45 L/(h·ind.), 单位重量菲律宾蛤仔的平均滤水率为 2.52 L/(g·h); 菲律宾蛤仔 1 龄、2 龄和 3 龄的平均干重分别为 0.18、0.30 和 0.42 g; 胶州湾的水团停留时间为 52 d, 初级生产时间为 1.58 d, 贝类滤水时间为 2.09 d; 1 龄、2 龄和 3 龄蛤仔的养殖容量分别为 637、378 和 272 ind./m²。目前,菲律宾蛤仔养殖量已超过养殖容量,建议若以 2 龄蛤为采捕对象,适宜的播苗密度为 582 ind./m²; 若以 3 龄蛤为采捕对象,适宜的播苗密度为 789 ind./m²。本研究结果可为保障胶州湾菲律宾蛤仔养殖产业的绿色高质量发展提供理论依据和数据支撑。

关键词 菲律宾蛤仔; Dame 指标; Herman 模型; 养殖容量; 胶州湾

中图分类号 S932.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0100-08

我国是海水养殖大国,海水养殖产量世界第一,类是我国海水养殖的主要种类,占海水养殖总产量的
据统计,2018年海水养殖产量达到 2031.22 万 t,贝 70%以上,其中,滤食性贝类产量占贝类产量的 90%

* 科技部政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE0118300)、国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(41761134052)、山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0502)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T13)和国家贝类产业技术体系养殖容量评估与管理岗位(CARS-49)共同资助 [This work was supported by Key Program for International Cooperation on Scientific and Technological Innovation, Ministry of Science and Technology (2017YFE0118300), International Cooperation and Exchange of the National Natural Science Foundation of China (41761134052), Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0502), Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018-MFS-T13), and Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49)]. 董世鹏, E-mail: 742119697@qq.com

① 通讯作者: 蒋增杰, 研究员, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-08-20, 收修改稿日期: 2019-09-16

以上(中国渔业统计年鉴, 2019)。滤食性贝类通过滤水、摄食等一系列的生命活动, 在提高水体透明度(Ismail *et al*, 2015)、减缓水体富营养化(Officer *et al*, 1982)、积极应对 CO₂ 升高导致的气候变化(邵桂兰等, 2019)、调节营养盐循环(Gergs *et al*, 2009)等方面发挥了非常重要的生态服务功能, 但一些区域高密度、无序、粗放式的养殖活动对生态系统也造成一些负面影响(Dame *et al*, 1985; Hatcher *et al*, 1994; 印丽云等, 2012)。

为了推进水产养殖业绿色发展, 农业农村部、生态环境部等 10 部门联合印发了《关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见》。养殖容量是有效保障水产养殖业绿色可持续发展的重要依据。我国养殖容量的研究可以追溯到 20 世纪 90 年代, 目前, 已经开展了包括桑沟湾(威海)、同安湾(厦门)、象山港(宁波)、乳山湾(烟台)和胶州湾(青岛)等 20 余个海湾的养殖容量评估工作(方建光等, 1996; 杜琦等, 2000; 蔡惠文等, 2004; 尹晖等, 2007; 刘学海等, 2015)。养殖容量的研究方法主要分为 2 种: 一种是静态方法, 主要考虑几个关键性的生理生态参数, 数据来源多为月际尺度、季节性尺度或年际尺度等, 忽略生态系统内部过程的动态变化及级联响应, 主要包括经验研究法、瞬时生长率法、能量收支法、营养动力学方法等; 另一种是动态方法, 基于生态系统动力学方法动态研究和模拟重要生源要素的关键生物地球化学过程。通过改变参数的计算方法, 静态和动态方法可以相互转化。静态方法具有操作简单、所需数据易获取、普适性好等优点, 但评估结果存在一定的误差; 动态方法是目前国际上广泛采用的主流方法, 虽然能够动态地模拟和预测生态系统的响应情况, 准确性较高, 但涉及到的参数非常多, 对使用者的数理知识、专业知识等学术理论层面的要求较高, 普适性相对较差。Dame 指标法是 Dame 等(1998)根据食物限制要素建立的养殖容量评估的静态方法, 虽然对生态系统过程的刻画线条较粗, 但考虑的关键参数比较全面, 具有一定的准确性, 应用范围较广(Gibbs, 2007; 张继红等, 2008)。

胶州湾是规模化养殖菲律宾蛤仔的重要海湾, 蛤仔年产量高达 32.5 万 t, 占胶州湾海水养殖总产量的 90%以上(张明亮, 2008)。胶州湾的菲律宾蛤仔播种规格为 2000~3000 粒/kg, 播种密度为 750~1000 kg/亩, 播苗时间为每年的 4~5 月, 经 7~8 个月养殖, 陆续开始采收, 繁殖期每年 2 次, 分别为 5 月中下旬与 9 月中旬至 10 月上旬。近些年来, 菲律宾蛤仔养殖产业发展迅速, 但存在无序放苗、超容量养殖、养殖结构不合理等问题。在“绿水青山就是金山银山”绿色发展理念的引领下, 亟需以养殖容量理论来指导产业发

展。目前, 已有学者通过能量收支法、三维浮游生态动力学模型法及依据饵料收支平衡的生态模型法等方法评估了胶州湾菲律宾蛤仔的养殖容量(陈丽梅, 2007; 张明亮, 2008; 刘学海等, 2015), 但现有的评估方法或侧重于静态方法, 考虑的核心参数不够全面, 或侧重于动态方法, 学术性较强, 难以供管理者和养殖业主使用。

本研究根据 2017 年 7 月~2019 年 4 月的大面观测、现场实验、生长跟踪等数据, 采用 Dame 指标与 Herman 模型相结合的方法, 聚焦水团停留时间、初级生产时间和贝类滤水时间 3 个关键指标, 进行胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估, 为养殖业主和管理者等提供决策支持, 为生态系统水平的海水养殖管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 Dame 指标法

Dame 指标法是用来检验贝类养殖是否会对生态系统构成压力的评估方法, 主要包含水团停留时间、初级生产时间和贝类滤水时间 3 个指标(Dame *et al*, 1998)。海域中浮游植物的供给是限制贝类生长和养殖容量的主要因素(Carver *et al*, 1990), 其主要补充和消耗有 3 个, 一是海域内浮游植物通过光合作用而生长繁殖的增加量, 用初级生产时间表征; 二是通过与外部海域的水交换导致养殖区域的浮游植物增加量或减少量, 用水团停留时间表征; 三是养殖贝类对浮游植物的消耗量, 用贝类滤水时间表征。Dame 指标已被证明可以有效评估环境功能、行为以及养殖的发展潜力(Dame *et al*, 1998; Callens *et al*, 1999; 张继红等, 2008)。

1.1.1 水团停留时间 水团停留时间(Water mass residence time, RT)是指该海域内所有水体的体积或质量被海域外的水体替换所需要的理论时间, 可以通过经验计算(例如潮汐)或者通过构建该海域的水动力模型得到。本研究采用刘哲(2004)构建的胶州湾水动力模型所得到的水团停留时间。

1.1.2 初级生产时间 初级生产时间(Primary production time, PPT)是指海域内浮游植物初级生产取代海域内浮游植物常规生物量所需要的时间, 其值是海域浮游植物生物总量(*B*)与海域浮游植物年初级生产力(*P*)的比值。

1.1.3 贝类滤水时间 贝类滤水时间(Bivalve clearance time, CT)是指贝类将海域内所有水体过滤一遍所需要的时间, 其值为海域的海水总体积与贝类

群体滤水能力的比值。

1.2 Herman 模型

Herman(1993)模型是通过模拟物理环境、初级生产和贝类摄食之间的关系,对滤食性贝类养殖容量进行估算。Herman 模型中计算每立方米浮游植物变化率的公式为:

$$\frac{dP}{dt} = P(\mu - m) - P(Cl_{ff})(B_{ff}) - \frac{P}{RT} + \frac{P_c}{RT}$$

式中, P 为海域内浮游植物量(g/m^3); μ 为海域内浮游植物的生长速率(d^{-1}); m 为海域内浮游植物的死亡率(除了贝类摄食的原因外的死亡率); Cl_{ff} 为贝类的滤水率[$m^3/(g \cdot d)$]; B_{ff} 为贝类养殖量(g/m^3); RT 为水停留时间; P_c 为海域水交换中浮游植物的量(g/m^3)。

模型公式可以转换为:

$$B_{ff} = \frac{(\mu - m)}{Cl_{ff}} + \frac{P_c - P}{P \times Cl_{ff}} \times \frac{1}{RT}$$

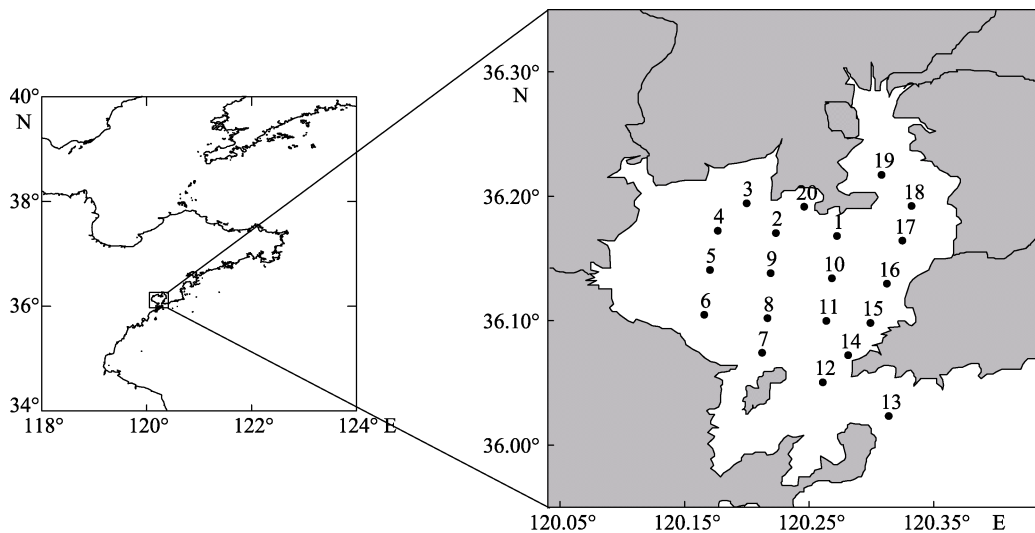


图1 胶州湾海域调查站位
Fig.1 Investigation stations in Jiaozhou Bay

其中, P_s 根据表层水中叶绿素 a 的含量计算:

$$P_s = C_a \cdot Q$$

式中, C_a 为表层叶绿素 a 含量(mg/m^3), Q 为同化系数[$mg/(mg \cdot h)$]。真光层 E 的深度取透明度的3倍,同化系数采用3.7(王俊等, 2002)。

浮游植物生物量用过 $C : Chl-a$ 得到。浮游植物的生物总量=叶绿素 a 的年平均值×海域总体积×($C : Chl-a$), 胶州湾以硅藻为优势藻种, $C : Chl-a$ 取值33(张武昌等, 2001)。

1.3.3 模拟现场流水法测定不同温度下不同规格菲律宾蛤仔的滤水率 流水系统装置和流水槽参照

在特定海域内, μ 、 m 为常量或变化不大, 则贝类养殖容量由海域初级生产力、水团停留时间以及养殖贝类的滤水率来决定。

1.3 参数的调查和检测

1.3.1 叶绿素 a 于2017年7月、11月和2018年1月、4月开展了20个站位4个航次的胶州湾海域大面调查(图1)。每个站位准确量取水样800 ml, 0.45 μm 的醋酸纤维膜过滤, 用于测定各站位浮游植物 $Chl-a$ 浓度。 $Chl-a$ 浓度采用分光光度法测定, 具体操作参照《海洋调查规范》(GB17378.7-2007)。

1.3.2 初级生产力和浮游植物生物总量 初级生产力通过叶绿素 a 法测定。按照 Cadée(1975)提出的简化公式计算:

$$C_{chla} = P_s \cdot E \cdot D / 2$$

式中, C_{chla} 为初级生产力[$mg/(m^2 \cdot d)$], P_s 为表层水中浮游植物的潜在生产力[$mg/(m^3 \cdot d)$], E 为真光层的深度(m), D 为白昼时间的长短(h)。

文献(Jiang *et al*, 2017)进行设计。用水泵将海水(离岸50 m左右)抽取到缓冲槽内(80 cm×60 cm×50 cm), 再通过分流软管分别流入流水槽(20 cm×9 cm×10 cm)。每个分流软管的头部安装一个水阀, 用于控制流水槽流速。流水槽进水孔位于槽底上方4 cm处, 出水孔位于另一端的槽顶下方4 cm处。

挑选大(壳长为3.5~3.7 cm)、中(壳长为2.9~3.1 cm)、小(壳长为2.3~2.5 cm)3种规格菲律宾蛤仔, 暂养于室内流水系统7 d后开始实验。将暂养的3种规格蛤仔各取出9个放入流水槽(长×宽×高=20 cm×6 cm×11 cm)内作为实验组, 另设3个没有蛤

仔的流水槽作为对照组。调整流水槽水流速度为 150 ml/min 左右, 驯化 1 h。驯化结束后, 每隔 1 h 测定各个流水槽流速, 并用聚乙烯小瓶取 100 ml 的海水样品, 使用便携式颗粒计数器 PAMAS(型号 S4031GO, 德国)测定水样瓶中颗粒物数量(测定粒径范围为 2~50 μm), 共进行 3 次重复取样, PAMAS 测定的样品连续测量 3 次。滤水率的计算公式(Hildreth *et al.*, 1976)如下:

$$\text{CR} = V \times (C_0 - C_1) / C_0$$

式中, V 为流水槽的流速(L/h); C_0 和 C_1 分别为空白组和实验组颗粒物数量(ind./L)。

1.3.4 菲律宾蛤仔个体生长数据调查 于 2018 年 4 月~2019 年 4 月逐月在规模化养殖区定点(36°11'14.0"N, 120°15'2.9"E)采集 1 龄、2 龄和 3 龄的菲律宾蛤仔各 50 个, 用游标卡尺测定壳长、壳宽和壳高(精确到 0.01 cm), 分离软组织, 用电子天平测量软组织湿重、

软组织干重(60°C 烘干至恒重, 精确到 0.01 g)。

2 结果

2.1 胶州湾水体叶绿素 *a* 的时空分布特征

调查海域表层叶绿素 *a* 的时空分布特征见图 3。从季节变化来看, 胶州湾海域表、底层叶绿素 *a* 浓度的年变化范围分别为 2.09~4.28 和 2.10~4.02 mg/m^3 , 均值分别为 3.33 和 2.81 mg/m^3 , 总叶绿素 *a* 的均值为 3.07 mg/m^3 , 季节差异极显著($P < 0.01$)。从平面分布来看, 春季浮游植物主要分布于胶州湾北部近岸; 夏季高值区在胶州湾核心区域, 海湾南部浓度较低; 秋季高值区出现在胶州湾东部偏南海域; 冬季高值区在胶州湾西部和北部偏东近岸。从垂直分布来看, 冬季表层浮游植物浓度高于底层, 差异显著($P < 0.05$); 春季、夏季和秋季表、底层 Chl-*a* 浓度相近。

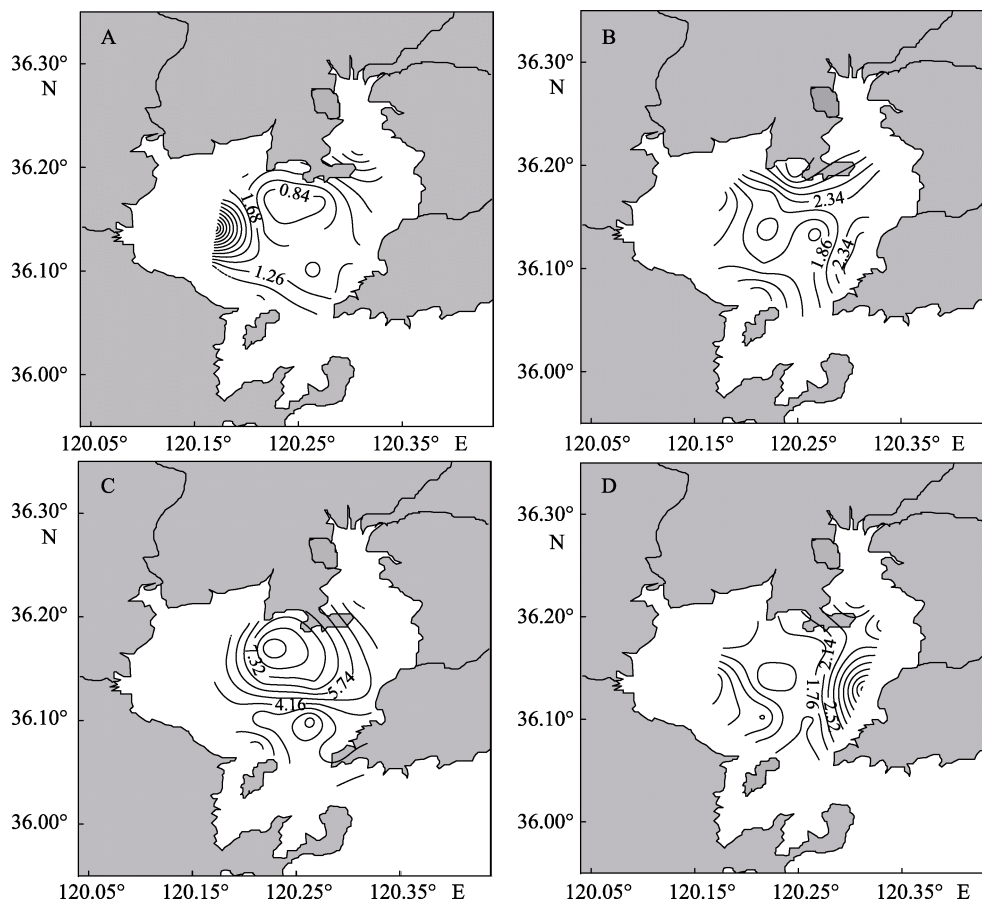


图 2 胶州湾海域表层浮游植物 Chl-*a* 的时空分布特征

Fig.2 Seasonal and spatial variations of phytoplankton Chl-*a* in the surface layer of Jiaozhou Bay

A: 春季; B: 夏季; C: 秋季; D: 冬季

A: Spring; B: Summer; C: Autumn; D: Winter

根据叶绿素 *a* 浓度估算的不同季节初级生产力和浮游植物生物量见表 1, 胶州湾海域年平均初级生

产力为 450.28 $\text{mg C}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 海域浮游植物生物总量为 $2.48 \times 10^9 \text{ g C}$ 。

表1 胶州湾海域各季节的叶绿素 *a* 含量和初级生产力
Tab.1 Seasonal variation of chlorophyll *a* and primary production in Jiaozhou Bay

月份 Month	湾内叶绿素 <i>a</i> (表层) Chl- <i>a</i> inside the Bay (surface) (mg/m ³)	湾内叶绿素 <i>a</i> (底层) Chl- <i>a</i> inside the Bay (bottom) (mg/m ³)	湾外 叶绿素 <i>a</i> Chl- <i>a</i> outside the Bay (mg/m ³)	初级生产力 Primary production [mg C/(m ² ·d)]
	1	4.28	2.99	0.99
4	2.09	2.13	1.21	510.84
7	4.72	4.02	2.41	364.65
11	2.23	2.10	1.13	403.97

2.2 菲律宾蛤仔滤水率

通过现场流水模拟实验测定 3 种规格菲律宾蛤

表2 菲律宾蛤仔生物学参数及滤水率
Tab.2 Biological parameters and clearance rate of *R. philippinarum*

规格 Size	壳长 Shell length (cm)	壳宽 Shell width (cm)	壳高 Shell height (cm)	软体部湿重 Tissue wet weight (g)	软体部干重 Tissue dry weight (g)	滤水率 Clearance rate [L/(h·ind.)]	滤水率 Clearance rate [L/(g·h)]
小 Large	2.29±0.04	1.66±0.05	1.08±0.13	0.69±0.13	0.10±0.02	0.36±0.08	3.60±0.82
中 Medium	2.97±0.04	2.07±0.1	1.53±0.08	1.46±0.13	0.19±0.03	0.42±0.12	2.19±0.61
大 Small	3.59±0.15	2.53±0.06	1.75±0.06	2.75±0.44	0.34±0.06	0.57±0.15	1.77±0.45

表3 胶州湾海域 Dame 指标的估算结果
Tab.3 Evaluation results of Dame indicators for Jiaozhou Bay

指标 Indicator	数值 Value
水团停留时间 RT(d)	52
初级生产时间 PPT(d)	1.58
贝类滤水时间 CT(d)	2.09

2.4 Herman 模型估算胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量

胶州湾大面调查结果显示,胶州湾湾内年浮游植物量 P 为 3.07 mg/m^3 ,湾口交换处年浮游植物量 P_e 为 1.44 mg/m^3 。现场流水实验法测得菲律宾蛤仔的平均滤水率为 $0.06 \text{ m}^3/\text{g}$ 。浮游植物生长率 μ 取 0.99 d^{-1} ,死亡率 m 取 0.001 d^{-1} (谭书杰, 2009)。根据以上数据和 Herman 模型,得到菲律宾蛤仔养殖容量 B_{H} 为 16.31 g/m^3 。菲律宾蛤仔个体生长逐月调查数据显示,1龄、2龄和3龄的蛤仔平均软体干重分别为 0.18、0.30 和 0.42 g,得到1龄、2龄和3龄的平均养殖容量分别为 637、378 和 272 ind./m²。

3 分析与讨论

叶绿素 *a* 是浮游植物光合作用最主要的色素,其

仔的滤水率(表2),菲律宾蛤仔个体滤水率为大规格>中规格>小规格,单位重量滤水率为大规格<中规格<小规格。3种规格的菲律宾蛤仔个体平均滤水率为 $0.45 \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{ind.})$,单位重量平均滤水率为 $2.52 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

2.3 Dame 指标法评估胶州湾菲律宾蛤仔养殖情况

胶州湾菲律宾蛤仔年产量高达 32.5 万 t(张明亮, 2008),商品蛤(壳长>3.0 cm)的平均体重为 6 g,则年收获 5.42×10^{10} 粒,养殖周期 2 年,推算胶州湾菲律宾蛤仔现存量为 1.08×10^{11} 粒。胶州湾面积为 349 km^2 ,平均水深为 7 m,体积为 $2.44 \times 10^9 \text{ m}^3$ (张志恒, 2009)。更新该海域水团停留时间(RT)为 52 d(刘哲, 2004)。根据以上文献数据和调查结果得到 Dame 指标的结果见表 3。

分布是浮游植物生物量重要的指标(Culver *et al.*, 1989),是评估胶州湾养殖容量的关键因子。潘友联等(1995)的调查显示,1983~1985年胶州湾表层海水叶绿素 *a* 的含量为 $1.02 \sim 15.62 \text{ mg/m}^3$,平均含量为 3.05 mg/m^3 ;吴玉霖等(2004)研究得出,1991年5月~2002年11月胶州湾叶绿素 *a* 的含量为 $2.09 \sim 5.70 \text{ mg/m}^3$,平均为 3.47 mg/m^3 ;王玉珏等(2015)研究表明,2010年6月~2011年5月的叶绿素 *a* 含量为 $1.02 \sim 3.88 \text{ mg/m}^3$,平均为 2.85 mg/m^3 ,不同年份之间存在一定的波动范围。本研究结果表明,叶绿素 *a* 含量在 $2.09 \sim 4.28 \text{ mg/m}^3$ 之间,均值为 3.07 mg/m^3 ,从年际变化来看,胶州湾叶绿素 *a* 浓度变化不明显,没有出现显著上升或者下降的趋势。

滤水率表示单位时间内滤食性贝类所滤过水体的体积,是评估养殖容量的核心指标之一。本研究测定菲律宾蛤仔滤水率采用现场模拟流水法,相对于传统的静水法,此方法更能真实反映蛤仔在自然海区中的生活状态,其测定值更加可靠。测定滤食性贝类滤水率的方法通常有抽膜法(林少君等, 2005)和颗粒计数器测定法(杜美荣等, 2012),传统的抽膜法易受过滤水的体积定量、滤膜破碎等人为影响,工作强度很大,但获得的数据数量及质量均存在局限性;台式颗

粒计数器(如库尔特等), 较适宜室内实验, 但受仪器价格昂贵、运输不便、对运行条件要求严格等因素制约, 难以在野外实验中广泛使用; 本研究采用的基于便携式颗粒计数器的滤水率测定方法是近些年来国际上普遍认可的滤食性贝类摄食生理研究方法, 该方法具有可严格按照既定程序连续运行、不受人为影响、操作简单和同一样品可多次重复测定等优点, 可以有效保证数据质量。本研究建立的模拟现场流水实验法与便携式颗粒计数器测定技术的联合运用, 将有效提升滤食性贝类滤水率测定方法的客观性和准确性, 进而保障基于滤水率估算的养殖容量评估结果的准确性。

本研究尝试将 Dame 指标法和 Herman 模型结合起来评估胶州湾菲律宾蛤仔的养殖容量, Herman 模型包括了水团停留时间、初级生产时间和贝类滤水时间 3 个主要周转时间要素, 是适合估算贝类养殖容量的生态系统模型(Dame *et al.*, 1998)。在特定的海域内, μ 、 m 和 Cl_{ff} 为常量或变化不大, 初级生产力和水团交换时间决定贝类生物量(李长松等, 2007)。Dame 等(1998)指出, 水团停留时间相对较短(<40 d)和初级生产时间短(<4 d)的海域, 可以维持较高的双壳贝类生物量。胶州湾菲律宾蛤仔滤水时间为 2.09 d, 初级生产时间为 1.58 d, 而水团停留时间为 52 d。可见, 较高水平的初级生产力维持着该海域的蛤仔养殖。

在进行胶州湾菲律宾蛤仔生长状况跟踪时发现, 近年来, 胶州湾的菲律宾蛤仔出现死贝多、肥满度降低、蛤仔偏瘦、生长周期延长等现象。除了受天气等环境影响外, 最主要原因是胶州湾现有的菲律宾蛤仔养殖密度已超过其养殖容量。有数据表明, 胶州湾蛤仔的平均播种密度约为 2500 ind./m², 平均存活密度约为 450 ind./m²(张明亮, 2008), 2 龄和 3 龄的养殖容量分别为 378 和 272 ind./m², 实际养殖密度高于养殖容量, 这是造成菲律宾蛤仔质量下降的重要原因之一。利用 Dame 指标和 Herman 模型评估养殖容量时主要考虑食物限制下的养殖容量, 而养殖容量要受多种因素影响, 以本评估为例, 菲律宾蛤仔排泄活动会改变海域底质环境, 降低水中溶氧, 较长的水团停留时间(52 d)使水体不能及时更新, 不利于蛤仔的生存, 养殖容量减小。在估算胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量时, 与菲律宾蛤仔有相同食物来源的野生滤食性种群被忽略, 对估算结果造成一定的误差。为提高蛤仔品质和产量, 生产过程中需有效控制养殖密度。胶州湾菲律宾蛤仔 1~2 龄和 2~3 龄的自然死亡率分别为 35% 和 47%(任一平等, 2006), 结合养殖容量, 若以 2 龄蛤为采捕对象, 则适宜的播种密度为 582 ind./m²; 若以 3 龄蛤为采捕对象, 则 789 ind./m² 为适宜。本研究

中, 养殖容量的估算模型通过较少的参数就可以满足要求, 后期将对这一模型进行优化, 充分考虑浮游植物的动态变化、滤水率的动态变化以及水团停留时间的空间异质性等, 将复杂的计算过程进行后台计算, 尝试开发人机交互的软件, 提升养殖容量评估方法的准确性和普适性。

参 考 文 献

- Cadée GC. Primary production off the Guyana coast. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1975, 9(1): 128-143
- Cai HW, Sun YL, Zhang XQ. Environmental impact of cage aquaculture and the aquaculture environmental capacity in Xiangshan Harbor. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2006, 7(11): 71-76 [蔡惠文, 孙英兰, 张学庆. 象山港网箱养殖对海域环境的影响及其养殖环境容量研究. *环境污染治理技术与设备*, 2006, 7(11): 71-76]
- Callens I, Tyteca D. Towards indicators of sustainable development for firms: A productive efficiency perspective. *Ecological Economics*, 1999, 28(1): 41-53
- Carver CEA, Mallet AL. Estimating the carrying capacity of a coastal inlet for mussel culture. *Aquaculture*, 1990, 88(1): 39-53
- Chen LM. The clearance rate and carrying capacity of transplant enhanced Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [陈丽梅. 胶州湾移植底播菲律宾蛤仔滤水率及养殖容量的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Culver ME, Smith WO. Effects of environmental variation on sinking rates of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 1989, 25(2): 262-270
- Dame RF, Prins TC. Bivalve carrying capacity in coastal ecosystems. *Aquatic Ecology*, 1998, 31(4): 409-421
- Dame RF, Wolaver TG, Libes SM. The summer uptake and release of nitrogen by an intertidal oyster reef. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1985, 19(3-4): 265-268
- Bureau of Fishery and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. 2019 China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- Du MR, Fang JG, Mao YZ, *et al.* Diurnal rhythm of filtration rate of Zhikong scallop *Chlamys farreri* veliger and spat. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 73-77 [杜美荣, 方建光, 毛玉泽, 等. 栉孔扇贝面盘幼虫和稚贝的滤水率昼夜节律. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 73-77]
- Du Q, Lu ZB, Dai QS, *et al.* The carrying capacity of Tong'an

- Bay for the culture of shellfish. Journal of Shanghai Fisheries University, 2000, 9(1): 21–26 [杜琦, 卢振彬, 戴泉水, 等. 同安湾贝类的养殖容量. 上海水产大学学报, 2000, 9(1): 21–26]
- Fang JG, Kuang SH, Sun HL, *et al.* Study on the carrying capacity of Sanggou Bay for the culture of scallop. Marine Fisheries Research, 1996, 17(2): 18–31 [方建光, 匡世煥, 孙慧玲, 等. 桑沟湾栉孔扇贝养殖容量的研究. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 18–31]
- Gergs R, Rinke K, Rothhaupt KO. Zebra mussels mediate benthic-pelagic coupling by biodeposition and changing detrital stoichiometry. Freshwater Biology, 2009, 54(7): 1379–1391
- Gibbs MT. Sustainability performance indicators for suspended bivalve aquaculture activities. Ecological Indicators, 2007, 7(1): 94–107
- Hatcher A, Grant J, Schofield B. Effects of suspended mussel culture (*Mytilus* spp.) on sedimentation, benthic respiration and sediment nutrient dynamics in a coastal bay. Marine Ecology Progress, 1994, 115(3): 219–235
- Herman PMJ. A set of models to investigate the role of benthic suspension feeders in estuarine ecosystems. Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1993
- Hildreth, Crisp DIDJ. A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experimental flowing system. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1976, 56(1): 111–120
- Ismail NS, Dodd H, Sassoubre LM, *et al.* Improvement of urban lake water quality by removal of *Escherichia coli* through the action of the bivalve *Anodonta californiensis*. Environmental Science and Technology, 2015, 49(3): 1664–1672
- Jiang ZJ, Du MR, Fang JG, *et al.* Size fraction of phytoplankton and the contribution of natural plankton to the carbon source of Zhikong scallop *Chlamys farreri* in mariculture ecosystem of the Sanggou Bay. Acta Oceanologica Sinica, 2017, 36(10): 97–105
- Li CS, Fang B, Wang H, *et al.* Review of carrying capacity of shellfish aquaculture. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(5): 478–482 [李长松, 房斌, 王慧, 等. 贝类养殖容量研究进展. 上海水产大学学报, 2007, 16(5): 478–482]
- Lin SJ, He LJ, Huang PS, *et al.* Comparison and improvement on the extraction method for chlorophyll *a* in phytoplankton. Ecologic Science, 2005, 24(1): 9–11 [林少君, 贺立静, 黄沛生, 等. 浮游植物中叶绿素 *a* 提取方法的比较与改进. 生态科学, 2005, 24(1): 9–11]
- Liu XH, Wang ZL, Zhang ML, *et al.* Carrying capacity of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Jiaozhou Bay estimated by an ecosystem model. Fisheries Science, 2015, 34(12): 733–740 [刘学海, 王宗灵, 张明亮, 等. 基于生态模型估算胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量. 水产科学, 2015, 34(12): 733–740]
- Liu Z. Research on modelling water exchange and nutrient budget in Jiaozhou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2004 [刘哲. 胶州湾水体交换与营养盐收支过程数值模型研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]
- Officer CB, Smayda TJ, Mann R. Benthic filter feeding: A natural eutrophication control. Marine Ecology Progress Series, 1982, 9(2): 203–210
- Pan YL, Guo YJ, Zeng CK. Vertical and seasonal variations of chlorophyll concentrations in the inlet of Jiaozhou Bay. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(1): 21–27 [潘友联, 郭玉洁, 曾呈奎. 胶州湾口内海水中叶绿素 *a* 浓度的周年变化和垂直分布. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 21–27]
- Ren YP, Xu BD, Guo YL, *et al.* Growth and mortality of the transplant enhanced Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Jiaozhou Bay. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 642–649 [任一平, 徐宾铎, 郭永禄, 等. 胶州湾移植底播菲律宾蛤仔的生长和死亡特性. 中国水产科学, 2006, 13(4): 642–649]
- Shao GL, Liu B, Li C. Evaluation of carbon dioxide capacity and the effects of decomposition and spatiotemporal differentiation of seawater in China's main sea area based on panel data from 9 coastal provinces in China. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(7): 2614–2625 [邵桂兰, 刘冰, 李晨. 我国主要海域海水养殖碳汇能力评估及其影响效应——基于我国 9 个沿海省份面板数据. 生态学报, 2019, 39(7): 2614–2625]
- Tan SJ. Preliminary studies on cascade grazing of mesozooplankton on phytoplankton and microzooplankton community in the Jiaozhou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [谭书杰. 胶州湾中型浮游动物对浮游植物和微型浮游动物级联式摄食的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Wang J, Li HZ. Study on chlorophyll and primary production in inshore waters of the Bohai Sea. Marine Fisheries Research, 2002, 23(1): 23–28 [王俊, 李洪志. 渤海近岸叶绿素和初级生产力研究. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 23–28]
- Wang YJ, Liu Z, Zhang Y, *et al.* Temporal and spatial variations of chlorophyll *a* and environmental factors in Jiaozhou Bay in 2010–2011. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 37(4): 103–116 [王玉珏, 刘哲, 张永, 等. 2010–2011 年胶州湾叶绿素 *a* 与环境因子的时空变化特征. 海洋学报, 2015, 37(4): 103–116]
- Wu YL, Sun S, Zhang YS, *et al.* Quantitative study on long-term variation of phytoplankton in Jiaozhou Bay. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2004, 35(6): 518–523 [吴玉霖, 孙松, 张永山, 等. 胶州湾浮游植物数量长期动态变化的研究. 海洋与湖沼, 2004, 35(6): 518–523]
- Yin H, Sun Y, Xu LM, *et al.* Estimation of carrying capacity for shellfish in Rushan Bay. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 669–674 [尹晖, 孙耀, 徐林梅, 等. 乳山湾滩涂贝类养殖容量的估算. 水产学报, 2007, 31(5): 669–674]

- Yin LY, Yang ZC, Yu ZN, *et al.* Shellfish aquaculture problems and countermeasures. *Fisheries Science*, 2012, 31(5): 302–305 [印丽云, 杨振才, 喻子牛, 等. 海水贝类养殖中的问题及对策. *水产科学*, 2012, 31(5): 302–305]
- Zhang JH, Fang JG, Wang SH. Carrying capacity for *Patinopecten yessoensis* in Zhangzidao Island, China. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 236–241 [张继红, 方建光, 王诗欢. 大连獐子岛海域虾夷扇贝养殖容量. *水产学报*, 2008, 32(2): 236–241]
- Zhang ML. Study and analysis of shellfish carrying capacity in Jiaozhou Bay. Master's Thesis of the First Institute of Oceanography, SOA, 2008 [张明亮. 胶州湾贝类养殖容量研究与分析. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2008]
- Zhang WC, Zhang F, Wang K. The ratio of the phytoplankton carbon and chlorophyll in the sea. *Marine Sciences*, 2001, 25(3): 28–29 [张武昌, 张芳, 王克. 自然海水中浮游植物生物量和叶绿素的比值. *海洋科学*, 2001, 25(3): 28–29]
- Zhang ZH. Utilization status and assessment of coastal zone in Jiaozhou Bay. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [张志恒. 胶州湾海岸带利用现状与评价. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]

(编辑 冯小花)

Estimation of Carrying Capacity of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay Based on Spatial and Temporal Distribution of Chlorophyll *a*

DONG Shipeng^{1,2}, LIN Fan¹, JIANG Weiwei¹, DU Meirong¹, GAO Yaping¹,
LI Fengxue¹, HOU Xing^{1,2}, JIANG Zengjie^{1,3①}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract Based on Dame indices and Herman model, the carrying capacity of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay is estimated with the comprehensive fishery survey data, field simulation experiment, and growth tracking data between July 2017 and April 2019. The results showed that the average chlorophyll *a* concentration was in the range of 2.09~4.28 mg/m³, with an average value of 3.07 mg/m³. The average clearance rate was 0.45 L/(h·ind.) and converted to a unit-mass based value was 2.52 L/(g·h). The average dry weight of Manila clams at 1, 2, and 3 ages were 0.18, 0.30, and 0.42 g, respectively. The water mass residence time was 52 days, the primary production time was 1.58 days, and the bivalve clearance time was 2.09 days in Jiaozhou Bay. The corresponding carrying capacity of Manila clam were estimated to be 637, 378, and 272 ind./m² for 1-year, 2-year and 3-year old clams, respectively. Currently, the cultured quantity of Manila clams has exceeded the carrying capacity. It is recommended that the stocking density to be 582 ind./m² if 2-year clams are considered as the target object, and the stocking density to be 789 ind./m² if 3-year clams are considered as the target object. The results provide theoretical basis and necessary data for the development of the clam aquaculture in Jiaozhou Bay.

Key words *Ruditapes philippinarum*; Dame indices; Herman model; Carrying capacity; Jiaozhou Bay

① Corresponding author: JIANG Zengjie, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190921001

http://www.yykxjz.cn/

刘洋, 于瑞海, 张哲, 田传远, 钱嘉文. 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 108–114

Liu Y, Yu RH, Zhang Z, Tian CY, Qian JW. Effects of different pH on embryo development and larval growth of bay scallop (*Argopecten irradians*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 108–114

不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育 及幼虫生长发育的影响*



刘 洋 于瑞海^① 张 哲 田传远 钱嘉文

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 为探究 pH 对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)胚胎发育及幼虫生长发育的影响, 本研究以 pH 8.0~8.2 为对照组, 分析不同 pH (分别为 7.6~7.7、7.3~7.4、7.0~7.1 和 6.7~6.8)对海湾扇贝胚胎及幼虫的影响。结果显示, 随着 pH 的降低, 各实验组孵化率降低, 畸形率增高, 孵化时间延长, 且幼虫个体明显小于对照组($P<0.05$)。D 形幼虫期与壳顶幼虫期幼虫存活率与生长速率均显著低于对照组($P<0.05$)。幼虫发育至第 8 天时, pH 7.0~7.1 与 pH 6.7~6.8 实验组的存活率分别为 6.1%和 5.6%, 而对照组为 75.2%, 除 pH 7.6~7.7 组外, 各实验组生长速率均在 3.4 $\mu\text{m}/\text{d}$ 及以下, 基本呈现生长停滞状态。眼点幼虫附着率与对照组差异显著($P<0.05$), 第 7 天时, pH 6.7~6.8 实验组附着率仅为 31.7%。研究表明, 海水 pH 变化对海湾扇贝早期胚胎及幼虫生长发育具有显著影响, 该研究为评估 pH 变化对海湾扇贝等经济贝类资源和养殖产业的影响提供了参考资料。

关键词 海湾扇贝; pH; 胚胎发育; 幼虫

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0108-07

近年来, 化石燃料的大量使用, 导致 CO_2 过度排放, 气温升高、全球变暖、海洋酸化等问题随之出现。海水酸化最终会引起海洋系统内一系列化学变化, 从而影响到大多数海洋生物的生理、生长、繁殖、代谢和生存(Haugan *et al*, 1996)。研究表明, 在 pH 较低的海水中, 贝类、甲壳类和棘皮动物等钙质生物外壳增厚, 其作为饵料的价值也随之下落(Caldeira *et al*, 2005)。最新研究表明, 地球正在经历近 3 亿年来最大规模的 CO_2 排放, 海洋生物与海洋生态系统将面临日益加剧的海洋酸化威胁(Ove *et al*, 2010)。

我国是世界上最大的水产养殖国, 双壳贝类作为海水养殖重要经济种类之一, 同样面临 pH 下降带来的威胁(何盛毅等, 2010)。目前, 对厚壳贻贝(*Mytilus crassitesta lischlk*)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)及青蛤(*Cyclina sinensis*)的研究表明, 酸化海水导致双壳贝类胚胎发育滞缓及幼虫生长缓慢等(Zheng *et al*, 2014; 刘文广等, 2012; 秦艳杰等, 2013)。另外, 王晓琴等(2019)研究发现, pH 变化会对贻贝的矿化、生长和生理过程造成不同程度的影响。海水 pH 变化对海湾扇贝

* 海洋经济创新发展区域示范专项(12PYY001SF08-ZGHYDH-1)和青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山科技创新计划项目(201ASKJ02-0)共同资助 [This work was supported by Marine Economy Innovation and Development Regional Demonstration Project (12PYY001SF08- ZGHYDH-1), and Aoshan Science and Technology Innovation Project of Pilot National Laboratory of Marine Science and Technology (Qingdao) (201ASKJ02-0)]. 刘 洋, E-mail: 1447863885@qq.com

① 通讯作者: 于瑞海, 教授级高级工程师, E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-09-21, 收修改稿日期: 2019-10-22

(*Argopecten irradians*) 幼贝的研究表明, 偏酸环境和偏碱环境均会使幼贝附着力下降, 触手不伸出, 两壳紧闭, 甚至错壳(张明亮等, 2011)。

海湾扇贝原产于美国东海岸, 引进我国已 30 多年, 主要在我国北方沿海养殖, 已成为我国主要扇贝养殖品种之一。本研究以海湾扇贝为对象, 分析探讨 pH 下降对海湾扇贝早期胚胎发育及幼虫生长发育的影响, 评估 pH 下降对贝类养殖业的影响, 旨在为贝类养殖产业在未来应对海洋酸化威胁提供科学数据, 为中国海洋环境保护相关措施的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲贝采集及幼虫孵化

海湾扇贝亲贝于 2018 年 3 月 26 日取自山东省莱州市长渔水产有限公司。亲贝在室内人工促熟, 海水温度为 22℃~23℃, 采用阴干升温流水刺激法催产。待卵子排放后, 洗卵并开始用于 pH 影响实验。

1.2 实验设计

本实验以正常海水(pH 8.0~8.2)作为对照组, 设置 4 个 pH 梯度(分别为 7.6~7.7、7.3~7.4、7.0~7.1 和 6.7~6.8), 每组设 3 个重复。

实验期间, 受精完成后, 按上述 pH 梯度转移至 10 L 水体的塑料桶内进行充气培养, 水温为 22℃~23℃, 日常管理与亲贝促熟期间一致; 期间投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*); 为避免充气影响各组的 pH 值, 实时监测和调节 pH 值, 以减少实验误差。

1.3 pH 对海湾扇贝胚胎发育的影响

将受精卵迅速均分至预先设置的各实验组 10 L 小桶中, 密度为 8 ind./ml (取 50 ml 定量海水于显微镜下观察, 多次测量的平均值作为受精卵密度); 受精卵发育到 D 形幼虫时, 从各实验组取 10 ml 样品, 滴加碘液固定, 在显微镜下测量壳高、壳长, 观察并计算畸形率、孵化率等指标。

1.4 pH 对海湾扇贝幼虫生长发育的影响

取育苗场中发育至 30 h 的 D 形幼虫, 均分至预先设置的各实验组 10 L 小桶中, 密度为 3 ind./ml, 测量各实验组初始平均壳高。实验第 1~8 天, 分别取样测量幼虫的壳高, 通过与初始值对比, 计算生长速率, 每组测量重复 3 次。测量各实验组密度, 计算各实验组的存活率。

1.5 pH 对海湾扇贝眼点幼虫附着的影响

取育苗场中海湾扇贝眼点幼虫, 均分至预先设置

的各实验组 10 L 小桶中, 密度为 3 ind./ml, 当眼点幼虫比例>50%时, 投放附着基(聚乙烯网片), 分别于 3、5、7 d 后, 测量各实验组眼点幼虫附着变态率。

1.6 数据统计分析

海湾扇贝胚胎发育和幼虫生长各阶段胚胎畸形率(Deformity rate, DR, %)、孵化率(Hatching rate, HR, %)、存活率(Survival rate, SR, %)和综合评价指数(Comprehensive evaluation index, CEI)的计算公式:

$$DR(\%)=100 \times D_t / S_t$$

$$HR(\%)=100 \times S_t / F$$

$$SR(\%)=100 \times L_t / L_o$$

$$CEI=-(H_e-H_c) \times (T_e-T_c) \times (D_e-D_c)$$

式中, D_t 为实验结束时畸形 D 形幼虫密度; S_t 为实验结束时 D 形幼虫总密度; F 为实验起始时受精卵密度; L_o 为实验起始时幼虫密度; L_t 为实验结束时幼虫密度; H_e 、 H_c 分别为实验组和对照组的孵化率; T_e 、 T_c 分别为实验组和对照组的孵化时间; D_e 、 D_c 分别为实验组和对照组的畸形率。

采用 SPSS 19.0 软件对各组幼虫的生长指标进行单因素方差(One-way ANOVA)分析, 显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育的影响

在不同 pH 条件下, 海湾扇贝胚胎孵化率、D 形幼虫畸形率以及生长情况见表 1、图 1 和图 2。

从表 1 和图 1 可以看出, 不同 pH 对海湾扇贝孵化率、畸形率以及孵化时间均有显著影响($P<0.05$)。在孵化率方面, 实验组与对照组均差异显著($P<0.05$), pH 7.6~7.7 时, 孵化率为 43.75%, 仅为对照组的一半; 在畸形率方面, 实验组与对照组同样差异显著($P<0.05$), pH 6.7~6.8 时高达 48.39%, 而对照组仅为 4.76%, 相差近 10 倍, 并且随着 pH 的降低, 畸形率不断升高; 孵化时间方面, 孵化时间随着 pH 的下降呈现递增趋势, 当 pH 下降至 6.7~6.8 时, 孵化时间相比对照组延长了 8 h。

为评估 pH 对海湾扇贝胚胎发育的综合影响, 引入综合评价指数。从表 1 可以看出, 酸化程度越大, 对海湾扇贝胚胎发育的影响越大。从图 2 可以看出, 对照组壳长、壳高明显高于各实验组, 差异显著($P<0.05$); 且各实验组壳长与壳高随着 pH 的降低明显下降, pH 7.0~7.1 实验组与对照组相差近 12 μm 。

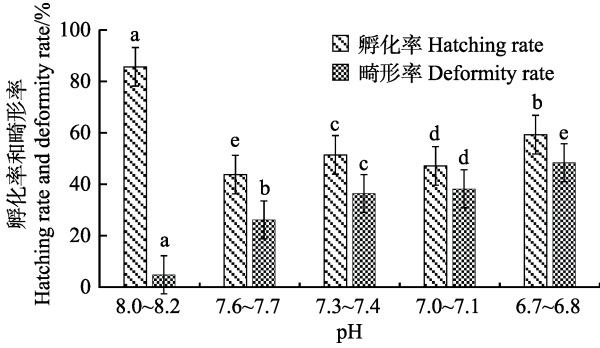


图 1 不同酸化程度下 30 h 时孵化率和畸形率
Fig.1 Hatching rate and deformity rate at different acidification level for 30 h

不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同
Different superscript means significant difference ($P<0.05$).
The same as below

2.2 不同 pH 对海湾扇贝 D 形幼虫生长发育的影响

不同 pH 条件下, 海湾扇贝 D 形幼虫生长发育见图 3 和图 4。从图 3 可以看出, 不同 pH 条件下, D 形

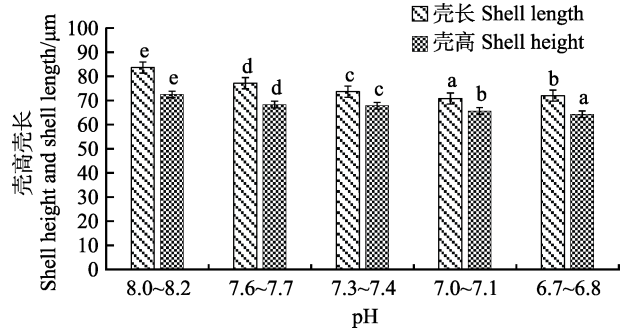


图 2 不同酸化程度下 30 h 时各组 D 形幼虫的壳长和壳高
Fig.2 Shell length and shell height of D larvae in each group at different acidification level for 30 h

幼虫对照组存活率均高于实验组, 且差异显著($P<0.05$)。4 d 内, pH 7.6~7.7 实验组存活率下降幅度较小, 而 pH 7.3~7.4、pH 7.0~7.1、pH 6.7~6.8 实验组下降幅度较大, 但各组内仍差异显著($P<0.05$), 仅在第 4 天时, pH 7.3~7.4 与 pH 7.0~7.1 两组差异不显著($P>0.05$); 第 4 天时, pH 6.7~6.8 实验组存活率达到最低, 为 39.1%。

表 1 不同酸化程度下孵化时间、畸形率和孵化率差异

Tab.1 Differences in hatching time, deformity rate and hatching rate under different acidification level

实验组 Experimental group	酸化组 Acidified group				对照组 Control group pH 8.0~8.2
	pH 6.7~6.8	pH 7.0~7.1	pH 7.3~7.4	pH 7.6~7.7	
孵化时间 Hatching time (h)	29	27	26	23	21
畸形率 Deformity rate (%)	48.39	38.18	36.36	26.09	4.76
孵化率 Hatching rate (%)	59.28	47.15	51.43	43.75	95.65
综合评价指数 Comprehensive evaluation index	1.59	0.94	0.74	0.22	

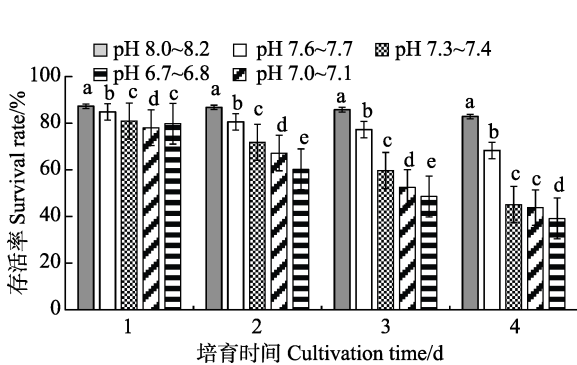


图 3 不同酸化程度下 D 形幼虫存活率
Fig.3 Survival rate of D-larvae at different acidification level

从图 4 可以看出, 不同 pH 条件下, D 形幼虫期间对照组生长速率均显著高于实验组($P<0.05$)。4 d 内, pH 7.6~7.7 组生长速率均显著高于其他实验组($P<0.05$); 第 1 天, 除 pH 7.0~7.1 与 pH 6.7~6.8 两组间差异不显著($P>0.05$)外, 其余各组间均差异显著; 第 2 天, pH 7.3~7.4、pH 7.0~7.1 两组间差

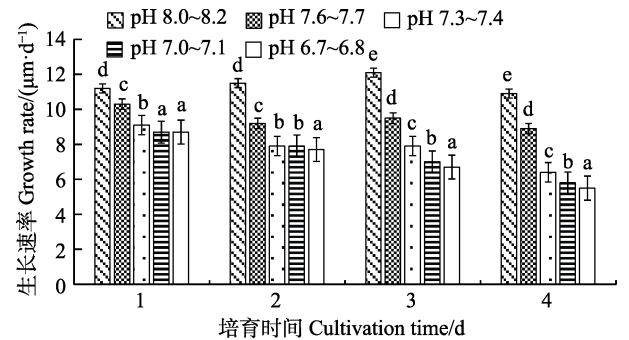


图 4 不同酸化程度下 D 形幼虫的生长速率比较
Fig.4 Growth rate of D-larvae at different acidification level

异不显著($P>0.05$), 其余各组间均差异显著; 第 4 天时, 实验组 pH 6.7~6.8 生长速率最慢, 仅为 5.5 $\mu\text{m}/\text{d}$, 而对对照组生长速率均保持在 10 $\mu\text{m}/\text{d}$ 以上。

2.3 不同 pH 对海湾扇贝壳顶幼虫生长发育的影响

从图 5 可以看出, 不同 pH 条件下, 壳顶幼虫期

对照组存活率与实验组差异显著($P<0.05$)。幼虫发育至第 7 天, pH 下降 0.7~0.8 及更多时, 存活率下降幅度较大, 存活率均在 20% 以下; 幼虫发育至第 8 天, 实验组 pH 7.0~7.1 和 pH 6.7~6.8 的存活率分别为 6.1% 和 5.6%。实验组 pH 7.6~7.7 与其他实验组相比, 虽保持较高存活率, 但幼虫发育至第 8 天时, 存活率仅为 38.7%, 而对照组存活率仍保持较高水平, 为 75.2%。从图 6 可以看出, 壳顶幼虫期各组生长速率均差异显著($P<0.05$), 壳顶幼虫发育期内, 生长速率均随 pH 下降而降低。发育至第 8 天时, pH 7.3~7.4 组及以下的生长速率极低, 基本呈生长停滞状态。

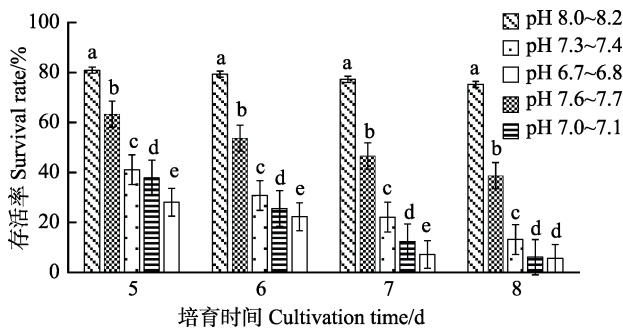


图 5 不同酸化程度下壳顶幼虫存活率比较
Fig.5 Survival rate of umbo larvae at different acidification level

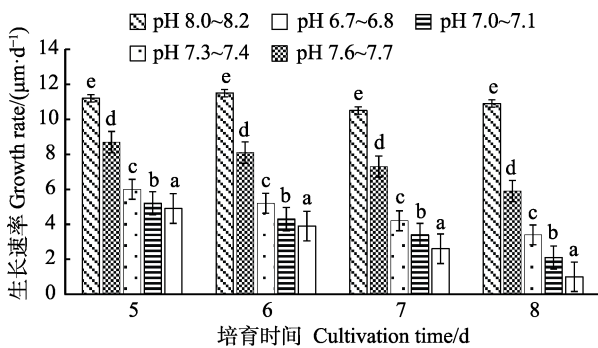


图 6 不同酸化程度下壳顶幼虫生长速率
Fig.6 Growth rate of umbo larvae at different acidification level

2.4 不同 pH 对海湾扇贝眼点幼虫附着的影响

不同 pH 条件下, 各组海湾扇贝眼点幼虫附着率情况见图 7。从图 7 可以看出, 除第 7 天, pH 7.0~7.1 组比 pH 7.3~7.4 组附着率高, 二者差异不显著 ($P>0.05$), 在第 3 天和第 5 天时, 幼虫附着率均随 pH 的下降而降低, 且对照组与各实验组间差异显著 ($P<0.05$)。第 7 天时, 对照组附着率最高达到 88.7%, 而 pH 6.7~6.8 实验组附着率仅为 31.7%。

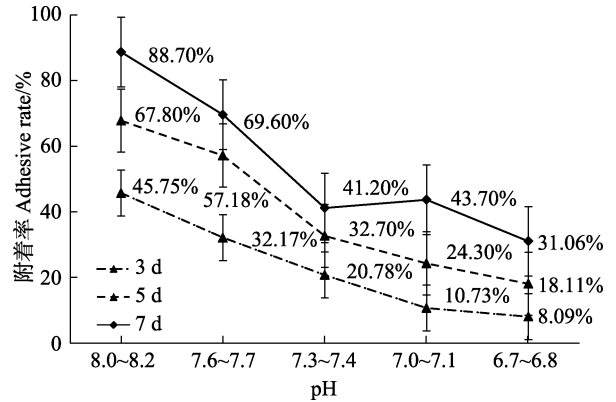


图 7 不同酸化程度下各组海湾扇贝眼点幼虫附着率
Fig.7 Larval adhesive rate of gulf scallop larvae at different acidification level

3 讨论

目前, 全球海洋酸化正以前所未有的速度快速发展, 据统计, 海洋酸化已达到 1400 万年来未见的水平。环境的恶化对经济贝类的早期生长发育影响巨大, 且直接关乎人工育苗的成败, 环境的改变能够很大程度上影响幼虫的孵化以及生长存活 (Gouletquer *et al*, 2002; Simon *et al*, 2006; Gazeau *et al*, 2011)。海水 pH 作为重要的环境因子之一, 国内外对此研究较少, 而主要集中于海水盐度、饵料、温度以及重金属方面 (刘文广等, 2014; James *et al*, 2005)。

3.1 pH 对海湾扇贝胚胎发育的影响

研究表明, pH 对海湾扇贝胚胎发育的孵化率、畸形率及孵化时间均有显著影响。在孵化率方面, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), 且随着 pH 的降低, 孵化率反而有上升趋势, pH 6.7~6.8 实验组的孵化率达到 60.0%, 比 pH 7.6~7.7 实验组高出 17.0%, 这种情况可能是因为胚胎发育早期仅依靠自身卵黄发育, 外界环境对其影响较小所致 (刘文广等, 2012; 尼贝肯, 1991)。何盛毅等 (2011) 对马氏珠母贝的研究显示, pH=7.7 时, D 形幼虫孵化率 [(16.6±12.0)%] 显著低于对照组 [(44.8±7.4)%], 且畸形率 [(48.2±9.1)%] 比对照组高 3 倍; 蔡娟等 (2016) 对青蛤的研究显示, 低 pH 值和高 pH 时, 胚胎发育没有明显滞后, 但 pH 7.4 组与 pH 9.0 组的原肠期胚体转动速度较对照组慢; 另外, Kurihara 等 (2008) 研究 pH 7.4 的酸化海水对太平洋牡蛎和紫贻贝 (*M. edulis*) 胚胎发育的影响, 表明胚胎发育基本不受酸化海水的影响; Gazeau 等 (2010) 通过研究紫贻贝发现, pH 为 7.6 条件下, 其 D 形幼虫孵化率 [(24.0±4.0)%], 比对照组 (pH=8.1) 条件下低

[(12.7±0.9)%], 这些结果与本研究结果基本一致, 说明 pH 的降低对海湾扇贝胚胎孵化具有较大影响。

在畸形率方面, D 形幼虫畸形率在紫贻贝(Gazeau *et al.*, 2010)、太平洋牡蛎(Kurihara *et al.*, 2008)及中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) (秦艳杰等, 2013)中都出现过。本研究发现, 畸形率随 pH 的下降呈现上升趋势, 最高达到 48.4%。Kurihara 等(2008)研究发现, 太平洋牡蛎幼虫也会出现明显的畸形, pH 为 7.4 时, 畸形率高达 80%, 这比海湾扇贝幼虫表现的更为明显。秦艳杰等(2013)对中间球海胆的研究显示, 实验组长腕幼虫畸形均不同程度地表现为腕短小、萎缩、腕骨针折断、骨针弯曲变形等。这些研究结果均表明, D 形幼虫的正常生长对外界酸性条件非常敏感, 如果海洋酸化持续加剧, 海湾扇贝幼虫将面临巨大的威胁(王有基等, 2014; Victoria *et al.*, 2008)。

胚胎发育过程中, pH 下降对其孵化时间也有显著影响。结果显示, 在 pH 为 6.7~6.8 时, 发育至 D 形幼虫的时间为 29 h, 而对照组仅为 21 h。蔡娟等(2016)对青蛤(*Cyclina sinensis*)的研究报道了相似的结果, 实验组与对照组相比, pH 7.4 组匍匐期发育时间延迟约 48 h, 单水管期发育时间延迟约 68 h, 囊胚期纤毛轮转动慢于对照组, 且一直延续至担轮幼虫。这可能是因为胚胎期完全暴露于酸化环境中, 使幼虫改变了摄食渠道, 从外界获取食物、环境适应能力差异导致(刘文广等, 2012; 尼贝肯, 1991)。相反, Kurihara 等(2009)研究发现, 地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)胚胎发育过程基本不受酸化海水的影响, 同样, 可能是胚胎发育早期仅依靠于自身的卵黄发育, 外界环境对其影响较小所致(刘文广等, 2012; 尼贝肯, 1991)。

3.2 pH 对海湾扇贝幼虫生长发育的影响

存活率是反映贝类幼虫对环境耐受性的重要指标(尼贝肯, 1991)。当环境条件不适应时, 可能会抑制贝类幼虫的钙化过程, 导致其生长缓慢, 甚至死亡(Kurihara *et al.*, 2009)。结果显示, 随着 pH 的降低, 存活率也同时下降。Dove 等(2007)对岩牡蛎(*Saccostrea glomerata*)的研究发现, 被酸化的河口地区牡蛎死亡率高且生长速度慢。Watson 等(2009)对岩牡蛎的研究中也发现同样的结果, 在 pH 下降 0.3 的情况下, 存活率下降了 43.0%; 在 pH 下降 0.5 的情况下, 存活率下降了 72.0%, 这与本实验结果相近。

影响幼虫生长发育的因素包括环境因素、自身发

育阶段因素以及幼虫的耐受性等(Gatos *et al.*, 1998)。海水 pH 作为重要的环境因子之一, 加之海洋酸化的加速, 对于幼虫的生长发育是一个巨大的挑战。海洋酸化由于 CO₂ 的过度溶解, 会打破海水中碳酸钙溶解平衡, 而碳酸钙作为形成贝类贝壳及海洋生物骨骼的重要物质, pH 下降会阻碍某些生物形成碳酸钙的能力, 进而影响该生物的生长、繁育(Gatos *et al.*, 1998)。对于双壳贝类, Green 等(2004)研究发现, 在 pH 为 7.4 的条件下, 太平洋牡蛎幼虫发育缓慢, 钙化程度降低, 并且个体多数出现少壳缺壳现象; Gazeau 等(2010)在紫贻贝的研究中发现, 当 pH 下降 0.25~0.34 时, 在 2 d 和 13 d 时的壳高分别下降了 4.5%和 6.0%; 当 pH 下降 0.5 时, 15 d 时的壳厚下降了 12.0%。本研究结果与前述研究结果基本相同, 这说明酸化海水对于幼虫的影响仍然存在, 并且幼虫的耐受性相比之前大幅下降。同样, 在对马氏珠母贝(何盛毅等, 2011)的研究中发现, D 型幼虫生长缓慢, 且畸形率远远高于对照组; 在 Green 等(2004)对幼年硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)研究发现, 在文石不饱和和水体中死亡率显著增加, 外壳在 2 周内全部溶解。研究表明, 导致海洋生物生长发育缓慢可能是由于其细胞渗透压发生改变, 为了维持体内的酸碱平衡, 必然会转移部分用于其他生理过程的能量进行反馈补偿性代谢, 影响了生物其他的正常生理活动, 导致生长发育变慢(湛垚垚等, 2013)。这些研究结果均表明, 酸化海水对贝类的生长发育影响巨大。Cooley 等(2009)预测, 到 2060 年, 海洋酸化将会给美国贝类产业带来严重影响, 将造成 14 亿美元的经济损失。

3.3 pH 对海湾扇贝眼点幼虫附着的影响

当眼点幼虫比例>50%时, 需要投放附着基, 此时是贝类由浮游幼虫向稚贝转变的重要发育阶段。当环境发生变化时, 幼虫会出现附着延长或者不附着等, 甚至死亡(张涛等, 2001)。本研究结果显示, 随着 pH 的降低, 附着率降低, 第 7 天时, 对照组附着率最高达到 88.7%, 而 pH 6.7~6.8 实验组附着率仅为 31.7%。Welladsen 等(2010)对合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)研究显示, pH 7.8 和 7.6 酸性条件下, 足丝的生产数量和总长度与对照组相比, 没有明显差异, 但在 pH 7.6 条件下, 珠母贝足丝明显比对照组细。另外, Donnell 等(2013)研究发现, 高浓度 CO₂ 条件下, 贻贝足丝韧性下降, 与对照组相差 40.0%。结果表明, pH 下降会削弱双壳贝类的附着能力。

4 结语

通过研究不同 pH 条件下海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长情况, 证明 pH 下降对双壳贝类的影响巨大, 说明海水酸化的不断加剧, 将严重影响海洋中的生物, 尤其是甲壳类、无脊椎生物的生存。总之, pH 下降问题涉及各海域海洋生物及生态系统, 尤其是近岸海域。需开展进一步研究, 寻找不同贝类在遗传及生理等水平上对酸化海水的响应及适应情况, 积极采取应对措施, 构筑海洋生态屏障。

参 考 文 献

- Cooley SR, Doney SC. Anticipating ocean acidification's economic consequences for commercial fisheries. *Environmental Research Letters*, 2009, 4: 024007
- Caldeira K, Wickett ME. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2005, 110(C9): S04
- Cai J. Effects of pH on embryo development, larva growth and related enzyme activity of Green clam. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [蔡娟. pH 对青蛤胚胎发育、幼虫生长及相关酶活性的影响, 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Donnell O, Michael J, Matthew N, *et al.* Mussel byssus attachment weakened by ocean acidification. *Nature Climate Change*, 2013, 3(6): 586–589
- Dove MC, Sammut J. Histological and feeding response of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*, to acid sulfate soil outflows. *Shellfish Research*, 2007, 26(2): 509–518
- Gazeau F, Gattuso JP, Mervyn G, *et al.* Effect of carbonate chemistry alteration on the early embryonic development of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Research Article*, 2011, 6(8): 0023010
- Gazeau F, Gattuso JP, Dawber C, *et al.* Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*, 2010, 7(7): 2051–2060
- Gatos JP. Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification. *Global and Planetary Change*, 1998, 18(1–2): 37–46
- Green MA, Jones ME, Boudreau CL, *et al.* Dissolution mortality of juvenile bivalves in coastal marine deposits. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(3): 727–734
- Welladsen HM, Southgate PC, Heimann K, *et al.* The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on shell characteristics of *Pinctada fucata*. *Molluscan Research*, 2010, 26(1): 246–250
- Haugan PM, Drange H. Effects of CO₂ on the ocean environment. *Energy Conversation Management*, 1996, 37(6–8): 1019–1022
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 2010, 328(5985): 1523–1528
- He SY, Lin CX, He MX, *et al.* Effects of ocean acidification on the development of embryo and early larva of *Fritillaria martensis*. *Journal of Ecology*, 2011, 30(4): 748–750 [何盛毅, 林传旭, 何毛贤, 等. 海洋酸化对马氏珠母贝胚胎和早期幼虫发育的影响. *生态学杂志*, 2011, 30(4): 748–750]
- James CO, Victoria J, Fabry AY. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 2005, 437(7059): 681–686
- Kurihara H, Asai T, Kato S. Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Biology*, 2008, 4: 225–233
- Liu WG, Lin JS. Effects of ocean acidification on fertilization and early development of *Musculus maximus*. *Marine Sciences*, 2012, 36: 19–23 [刘文广, 林坚士. 海洋酸化对马氏珠母贝受精及早期发育的影响. *海洋科学*, 2012, 36(4): 19–23]
- MS D, Southgate PC. The influence of algal ration and larval density on growth and survival of blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* larvae. *Aquaculture Research*, 2000, 31(8–9): 621–626
- Nybakken JW (translated by Lin GH, and Li HP). *Marine biology, Ecological exploration*. Beijing: Ocean Press, 1991 [尼贝肯(林光恒, 李和平译). *海洋生物学: 生态学探讨*. 北京: 海洋出版社, 1991]
- Qin YJ, Song XN, Li X, *et al.* Effects of ocean acidification and warming on larva development and growth of *Middle bulb* sea urchins. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(5): 450–455 [秦艳杰, 宋晓楠, 李霞, 等. 海洋酸化和升温对中间球海胆幼虫发育和生长的影响. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(5): 450–455]
- Simon M, Cra G. Development, physiology, behaviour and ecology of scallop larvae. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2006, 35: 45–122
- Victoria JF, Brad AS, Richard AF, *et al.* Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 2008, 28(3): 414–432
- Watson SA, Southgate PC, Tyler PA. Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO₂-driven ocean acidification. *Journal of Shellfish Research*, 2009, 28(3): 431–437
- Wang YJ, Li LS, Li QZ, *et al.* Research progress of ocean acidification and global warming on the physiological ecology of shellfish. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(13): 3501–3502 [王有基, 李丽莎, 李琼珍, 等. 海洋酸化和全球变暖对贝类生理生态的影响研究进展. *生态学报*, 2014, 34(13): 3501–3502]
- Zhang T, Que HY. Effects of delayed metamorphosis on growth and development of marine invertebrates. *Marine Sciences*, 2001, 25(6): 28–30 [张涛, 阙华勇. 延迟变态对海洋无脊

- 椎动物生长发育的影响. 海洋科学, 2001, 25(6): 28–30]
- Wang XQ, Rastrick SPS, Wu YL, *et al.* Impact of seawater acidification on the energy budget of *Mytilus galloprovincialis*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 21–30 [王晓芹, Rastrick SPS, 吴亚林, 等. 海水酸化胁迫对紫贻贝能量分配的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 21–30]
- Zhang ML, Zou J, Fang JG, *et al.* Effects of ocean acidification on calcification, respiration and energy metabolism of scallop *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(4): 48–54 [张明亮, 邹健, 方建光, 等. 海洋酸化对栉孔扇贝钙化、呼吸以及能量代谢的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 48–54]
- Zhan YY, Huang XY, Duan LZ, *et al.* Effects of ocean acidification on offshore marine life. Journal of Dalian University, 2013, 34(3): 79–84 [湛垚垚, 黄显雅, 段立柱, 等. 海洋酸化对近岸海洋生物的影响. 大连大学学报, 2013, 34(3): 79–84]
- Zhen XS, Liang MH, Yan Y, *et al.* The effect of different substrates on pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker) larvae settlement. Aquaculture, 2007, 271(1–4): 377–383

(编辑 冯小花)

Effects of Different pH on Embryo Development and Larval Growth of Bay Scallop (*Argopecten irradians*)

LIU Yang, YU Ruihai^①, ZHANG Zhe, TIAN Chuanyuan, QIAN Jiawen

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

Abstract To explore the influence of pH on embryo development and larval growth of bay scallop (*Argopecten irradians*), pH 8.0~8.2 was set as the control group to analyze the influence of different pH (7.6~7.7, 7.3~7.4, 7.0~7.1, and 6.7~6.8) on the development of embryos and larva of bay scallop. The results showed that with decrease in pH, the hatching rate of embryos in each experimental group decreased, the deformity rate increased, hatching time was prolonged, and the larva were significantly smaller than those in the control group ($P<0.05$). The survival rate and growth rate of D-larvae and top umbo larvae were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). The survival rates of the pH 7.0~7.1 and pH 6.7~6.8 experimental groups were 6.1% and 5.6%, respectively, and 75.2% in the control group on the 8th day of larva development. The growth rates of each experimental group were 3.4 $\mu\text{m}/\text{d}$ and below, except for the pH 7.6~7.7 group, which basically showed a state of growth stagnation. There was a significant difference in the adhesive rate between the experimental group and the control group ($P<0.05$). On the 7th day, the adhesive rate of the pH 6.7~6.8 experimental group was only 31.7%. The results showed that the change in seawater pH had a significant effect on early embryo and larva development in bay scallop, which provides a reference for the evaluation of the effects of pH change on economic shellfish resources, such as bay scallop and others in the aquaculture industry.

Key words Bay scallop; pH; Embryonic development; Larvae

① Corresponding author: YU Ruihai, E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190906001

http://www.yykxjz.cn/

魏家慧, 李国梁, 汪文俊, 梁洲瑞, 鲁晓萍, 刘福利, 孙修涛, 张朋艳. 条斑紫菜丝状体不同发育时期对光照和温度的光合适应能力. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 115–124

Wei JH, Li GL, Wang WJ, Liang ZR, Lu XP, Liu FL, Sun XT, Zhang PY. Effects of light intensity and temperature on photosynthetic adaptability of the different stages of *Pyropia yezoensis* free-living conchocelis. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 115–124

条斑紫菜丝状体不同发育时期 对光照和温度的光合适应能力*



魏家慧^{1,2} 李国梁^{1,2} 汪文俊^{1,3①} 梁洲瑞^{1,3} 鲁晓萍^{1,3}
刘福利^{1,3} 孙修涛^{1,3} 张朋艳^{1,3}

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

摘要 以条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)丝状体为材料, 研究温度(15℃、25℃和 35℃)与光强[40、100 和 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]对营养藻丝和孢子囊枝光合生理的影响。结果显示, 15℃和 25℃实验组中, 营养藻丝和孢子囊枝的 PS II 原初光能转化效率(F_v/F_m)、总光合速率(P_g)和净光合速率(P_n)均随光强升高而降低。在 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下, 营养藻丝的 F_v/F_m 和 P_g 趋于零, P_n 为负值。在 25℃、40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下, 营养藻丝的呼吸耗氧速率(R_d)在实验周期内一直显著高于孢子囊枝; 其他组则随胁迫时间延长, 二者间 R_d 差距逐渐缩小。总体上, 在相同条件下, 所测孢子囊枝 F_v/F_m 、 P_g 和 P_n 均显著高于营养藻丝, 而 R_d 与营养藻丝相当。35℃实验组在 6 h 时, 孢子囊枝的 F_v/F_m 显著高于营养藻丝, 但随光强升高直线下降($P<0.05$), 其他组 F_v/F_m 均趋于 0。在 40、100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下, 6 h 时, 孢子囊枝 P_g 和 R_d 高于营养藻丝或二者相当; 在 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下, 后期营养藻丝 P_n 和 R_d 高于孢子囊枝, 但在整个实验周期, 二者的 P_n 均为负值。总体上, 营养藻丝和孢子囊枝的 F_v/F_m 、 P_g 和 P_n 均显著低于(多数趋于 0 或负值)15℃和 25℃, 而 35℃的 R_d 高于 15℃和 25℃; 后期, 2 种藻丝均出现发绿变白, 甚至死亡现象。研究表明, 在条斑紫菜营养藻丝的光合作用被严重抑制的光强、温度条件下, 孢子囊枝仍具备相对高的光合活力, 说明在温度和光强升高到不利于营养藻丝生长的情况下, 刺激藻丝转向了孢子囊枝发育阶段, 后者具备适应更高温度和光照的能力。

关键词 紫菜; 营养藻丝; 孢子囊枝; 光合作用; 高温; 高光

中图分类号 S968.43 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0115-10

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)是一种较为原始的 大型红藻, 主要分布在我国浙江舟山群岛以北的东海

* 国家重点研发计划(2018YFD0901500)、山东省农业良种工程(南种北繁)项目(2017LZN013)和山东省级重点实验室专项建设计划(SDKL2017009-02)开放课题共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901500), Shandong Agricultural Good Seed (South to North) Project (2017LZN013), and Open Project of Special Construction Plan of Shandong Provincial Key Laboratory (SDKL2017009-02)]. 魏家慧, E-mail: 997427166@qq.com

① 通讯作者: 汪文俊, 研究员, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-09-06, 收修改稿日期: 2019-10-30

和黄、渤海沿岸及朝鲜半岛和日本沿海等地(许璞等, 2013)。条斑紫菜具有很高的营养、经济和生态价值, 是我国重要的大型栽培海藻(李晓蕾等, 2017)。条斑紫菜生活史包括宏观配子体(叶状体)和微观孢子体(丝状体) 2 个异形世代(马家海等, 1996)。丝状体分为丝状藻丝(营养藻丝)、孢子囊枝、壳孢子形成(张学成等, 2005) 3 个阶段。环境适宜时, 成熟的孢子囊枝放散壳孢子, 继而发育生成新的叶状体。条斑紫菜叶状体生长于潮间带, 藻体每天随潮汐的变化, 经受温度、光照、盐度及水分等环境因子的胁迫(Davison *et al.*, 2010), 是研究植物抗逆性及其机理的良好实验材料。

目前, 有关条斑紫菜的研究主要集中在适宜丝状体生长发育的环境生态条件(郭文竹, 2012; 张美如等, 2009)、叶状体抗逆性及机制(侯和胜等, 2008; 周向红等, 2013)与分子生物学等(贺剑云等, 2010; Yang *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2018)。丝状体是紫菜生活史的重要阶段, 作为种质资源保存形式, 调控其生长发育对生产和科研十分重要。孢子囊枝和营养藻丝是紫菜丝状体发育最典型的 2 个阶段, 受环境因子影响显著(Green *et al.*, 2015)。高温促进丝状体由营养藻丝发育为孢子囊枝。研究表明, 温度达到 12.5℃ 以上, 才能形成孢子囊枝(任国忠等, 1979); 15℃~25℃ 之间, 壳孢子囊枝的增长率与温度成正比(陈翠芬等, 2008)。光是植物进行光合作用的能量来源, 对植物体生长、发育具有重要影响(卢晓等, 2014; 夏云捷等, 2016)。光强过高或过低均不利于紫菜丝状体的生长和发育。骆其君等(1999)研究表明, 15℃、60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 是条斑紫菜丝状体适宜的温度和光照。陈翠芬等(2008)研究发现, 8 L : 16 D 的短日照光周期、57 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下, 壳孢子囊枝形成率最高。Zhong 等(2016)对长紫菜(*Pyropia dentata*)丝状体发育研究表明, 较高温度有利于孢子囊枝的形成; 在不高于 12 h 日照情况下, 孢子囊枝形成率随日照时间的延长而增加; 在一定的光照范围内, 孢子囊枝的形成随光强的增加而增加。

紫菜发育和有性生殖的调控与环境紧密关联, 而这个过程藻体光合作用也会发生相应变化(Katz *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2013)。紫菜丝状体发育阶段, 营养藻丝和孢子囊枝在形态上存在巨大差异(Shen *et al.*, 2000; Varela-Alvarez *et al.*, 2004; 周文君等, 2006), 对环境因子需求也有所不同, 但二者在不同环境条件下的光合生理差异尚未明确。本研究通过叶绿素荧光技术和液相氧电极技术, 对条斑紫菜自由丝状体营养藻丝与孢子囊枝阶段在不同温度与光强下的光合生理进行比较研究, 以比较二者光温适应能力, 尤其是对高温和高光胁迫的光合耐受性, 旨在为揭示条斑紫菜

丝状体发育光温调控机制、建立苗种繁育精准调控技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用课题组培育的条斑紫菜“黄优 1 号”品系为实验材料。营养藻丝和孢子囊枝暂养条件: 20℃, 光强 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期 12 L : 12 D, 灭菌海水中添加营养盐(5 mg/L NO_3^- -N, 1 mg/L PO_4^{3-} -P)为培养液。培养适应 3 d 后进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 温度和光强对丝状体 F_v/F_m 的影响 实验于 DGXM-508B 光照培养箱中进行, 称取等量营养藻丝和孢子囊枝分别放于培养皿中。设置 3 个温度(15℃、25℃ 和 35℃)和 3 个光强[40、100 和 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]。分别测定不同光温组合培养 6 h、1 d、2 d 和 3 d 的 F_v/F_m 。 F_v/F_m 测定采用叶绿素荧光仪(Imaging-Pam, WALZ, 德国), 方法: 取少量藻体于暗盒中, 分别进行 20 min 暗适应, 每个样品取 6 个平行, 测定其 F_v/F_m 。

1.2.2 温度和光强对丝状体 P_g 、 R_d 和 P_n 的影响

实验设置同 1.2.1, 采用液相氧电极(Hansatech Oxygraph, 英国)测定, 反应介质为灭菌海水, 光源为 500 W 碘钨灯, 通过控制灯的远近, 将光强控制在 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。每个条件下反应稳定 5 min, 测试时间控制在 10 min 内, 取较为平滑曲线计算。由氧电极自带软件得出数据, 每个处理组设置 3 个平行。

1.3 数据处理

采用 Excel 分析数据并绘图, 采用 SPSS 18 软件对各组数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA)及 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 温度和光强对营养藻丝和孢子囊枝 F_v/F_m 的影响

15℃ 时, 除 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组, 其他实验组孢子囊枝的 F_v/F_m 均显著高于营养藻丝($P < 0.05$), 此现象随光强增加而越明显, 且二者 F_v/F_m 均随光强增加而下降。光强为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 6 h~2 d 内, 孢子囊枝与营养藻丝的 F_v/F_m 均呈上升趋势, 3 d 时显著下降($P < 0.05$), 2 种藻丝的 F_v/F_m 在最优时相当。100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照下, 孢子囊枝的 F_v/F_m 呈线性下

降趋势; 当光强达到 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 第 3 天时, 孢子囊枝的 F_v/F_m 显著降低 ($P < 0.05$); 在光强为 $100 \sim 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 营养藻丝的 F_v/F_m 一直处在非常低的水平 ($P < 0.01$)。

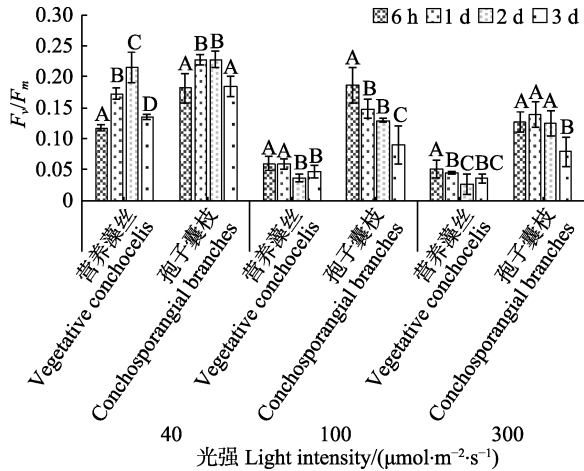


图 1 15°C 下, 不同光强对条斑紫菜丝状体 F_v/F_m 的影响
Fig.1 F_v/F_m of *P. yezoensis* under different light intensities at 15°C

同组不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同
Different letters in the same group represent significant differences ($P < 0.05$). The same as below

温度为 25°C 时, 孢子囊枝的 F_v/F_m 均显著高于营养藻丝 ($P < 0.05$), 但不同光强下情况不同: 光强为 40 与 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组情况相同, 营养藻丝 F_v/F_m 变化不大, 孢子囊枝的 F_v/F_m 先下降 ($P < 0.05$), 后有所恢复。当光强达到 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 营养藻丝 F_v/F_m 趋近于零, 藻体发绿变白, 接近死亡; 孢子囊枝 F_v/F_m 先上升后有所下降 ($P < 0.05$); 但二者 F_v/F_m 均显著低于 $40 \sim 100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组 ($P < 0.05$)。

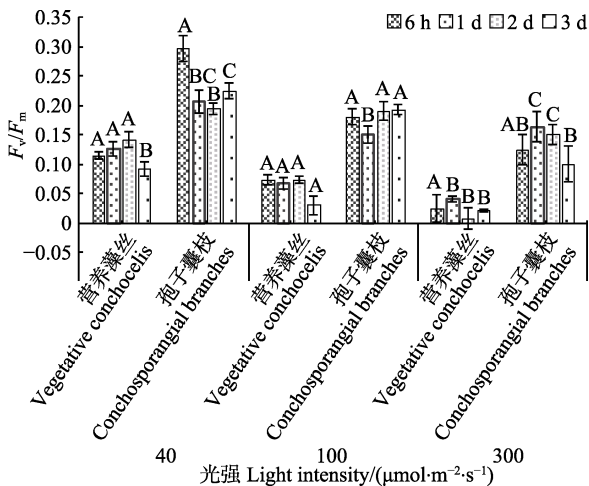


图 2 25°C 不同光强对条斑紫菜丝状体 F_v/F_m 的影响
Fig.2 F_v/F_m of *P. yezoensis* under different light intensities at 25°C

35°C 时, 营养藻丝与孢子囊枝的 F_v/F_m 显著低于 15°C 和 25°C 组。不同光强下, 营养藻丝的 F_v/F_m 几乎检测不到 ($P > 0.05$)。40~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强下, 孢子囊枝在培养初期 (6 h), F_v/F_m 随光强增加而急剧下降; 当光强为 $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 孢子囊枝在 6 h 的 F_v/F_m 几乎为 0。营养藻丝在 6 h 时, 藻体变绿发白, 孢子囊枝在 1~2 d 后, 藻体也变绿发白、死亡。

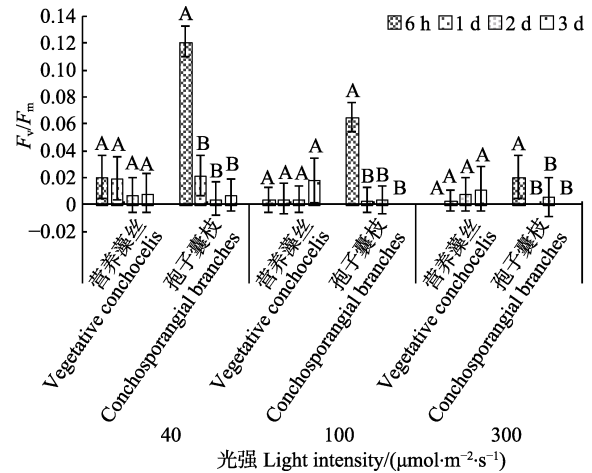


图 3 35°C 不同光强对条斑紫菜丝状体 F_v/F_m 的影响
Fig.3 F_v/F_m of *P. yezoensis* under different light intensities at 35°C

2.2 温度和光强对丝状体总光合速率的影响

15°C 时, 孢子囊枝的总光合速率均显著高于营养藻丝 ($P < 0.05$)。随光强的增加, 二者 P_g 逐渐降低。40 和 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下, 孢子囊枝 P_g 呈递增趋势, 营养藻丝则呈先上升后下降的趋势 ($P < 0.05$)。300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 第 2 天, 营养藻丝出现显著上升后又急剧下降, 其余各组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

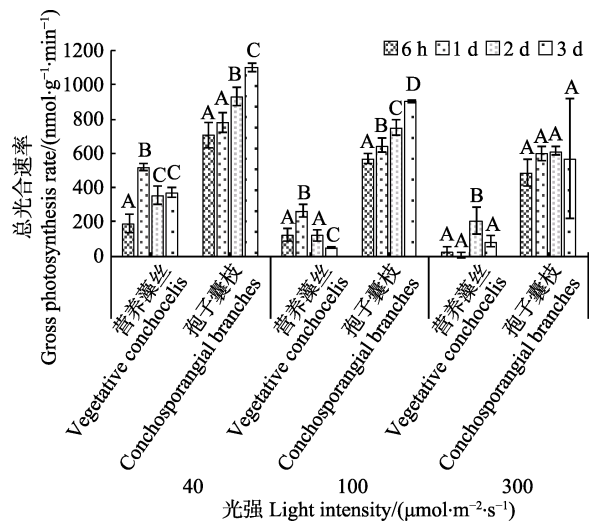


图 4 15°C 不同光强对条斑紫菜丝状体总光合速率的影响
Fig.4 Gross photosynthesis rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 15°C

当温度为 25℃、光强为 40 μmol/(m²·s)时, 孢子囊枝 P_g 随培养时间延长而线性上升($P<0.05$), 营养藻丝各组间无显著差异。3 个组变化情况与 15℃大体一致, 且孢子囊枝 P_g 显著高于营养藻丝($P<0.05$)。

当温度为 35℃、光强为 40 μmol/(m²·s)时, 培养 1 d 孢子囊枝的 P_g 上升显著($P<0.05$); 第 2 天, 营养藻丝 P_g 降为负值($P<0.05$), 孢子囊枝 P_g 几乎为 0 ($P<0.05$); 第 3 天, 营养藻丝恢复到 6 h 水平。光强为 100 μmol/(m²·s)时, 2 种藻丝的总体变化趋势和

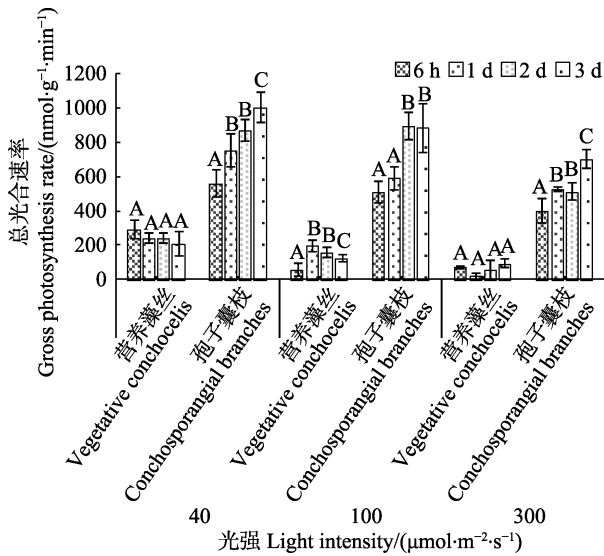


图 5 25℃不同光强对条斑紫菜丝状体总光合速率(P_g)的影响

Fig.5 Gross photosynthesis rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 25℃

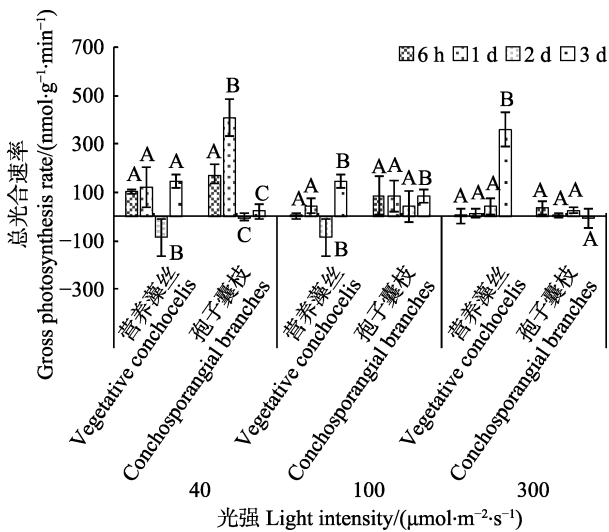


图 6 35℃不同光强对条斑紫菜丝状体总光合速率(P_g)的影响

Fig.6 Gross photosynthesis rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 35℃

40 μmol/(m²·s)时大体一致。300 μmol/(m²·s)胁迫下, 6 h~2 d 中, 营养藻丝和孢子囊枝的 P_g 在 0 上下波动, 变化趋势不显著; 第 3 天时, 营养藻丝的 P_g 上升显著($P<0.05$)。

2.3 温度和光强对丝状体呼吸耗氧速率的影响

温度为 15℃时, 光强为 40 μmol/(m²·s)时, 1 d 时孢子囊枝与营养藻丝的 R_d 均显著上升($P<0.05$)随后维持较为稳定的水平。当光强达到 100 μmol/(m²·s)时, 6 h 时营养藻丝的 R_d 显著高于孢子囊枝($P<0.05$), 随胁迫时间延长, 孢子囊枝 R_d 逐渐升高, 且显著高于营养藻丝($P<0.05$)。光强 300 μmol/(m²·s)时, 实验前期, 营养藻丝和孢子囊枝 R_d 呈上升趋势, 且二者之间无显著差异($P>0.05$)。

温度达到 25℃时, 光照为 40 μmol/(m²·s)时, 营养藻丝的 R_d 均显著高于孢子囊枝($P<0.05$), 且二者均呈上升趋势, 此现象在孢子囊枝中尤为显著。光照为 100 μmol/(m²·s)时, 营养藻丝和孢子囊枝的 R_d 均呈先上升后下降趋势($P<0.05$)。300 μmol/(m²·s)光强胁迫下, 6 h 时, 营养藻丝 R_d 显著高于孢子囊枝($P<0.05$), 6 h~2 d 时, 孢子囊枝 R_d 上升($P<0.05$), 其余时间二者均无显著差异。

在 35℃高温、40 μmol/(m²·s)光照胁迫下, 营养藻丝和孢子囊枝的 R_d 波动较大, 呈先上升后下降再上升的趋势, 第 1 天时, 孢子囊枝 R_d 显著高于营养藻丝($P<0.05$)。100 μmol/(m²·s)光强中, 6 h~1 d 中, 二者 R_d 呈显著上升($P<0.05$), 孢子囊枝的 R_d 显著高

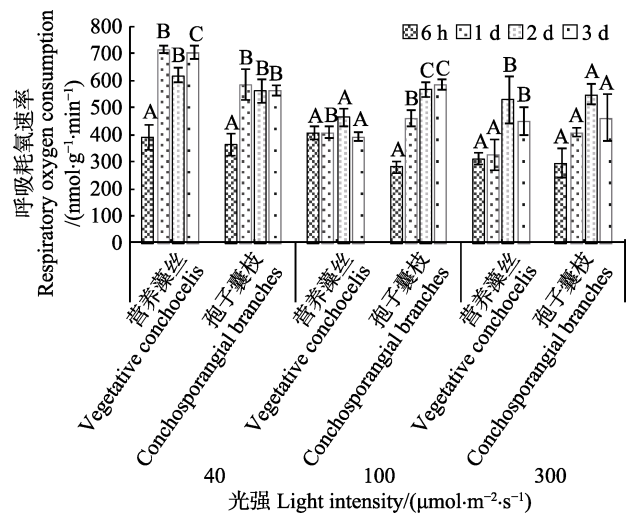


图 7 15℃不同光强对条斑紫菜丝状体呼吸耗氧速率(R_d)的影响

Fig.7 Respiratory oxygen consumption rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 15℃

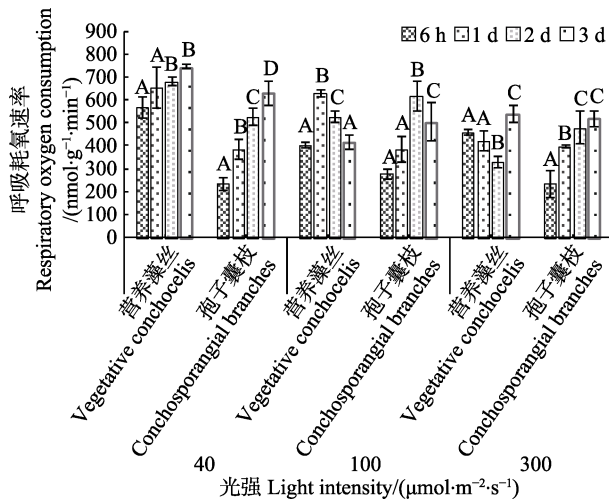


图 8 25°C 不同光强对条斑紫菜丝状体呼吸耗氧速率(R_d)的影响

Fig.8 Respiratory oxygen consumption rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 25°C

于营养藻丝。光强达到 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,二者 R_d 与前 2 组光照实验相比均有明显下降($P<0.05$),实验过程中,营养藻丝与孢子囊枝 R_d 均呈上升趋势,且实验后期营养藻丝 R_d 显著高于孢子囊枝($P<0.05$)。

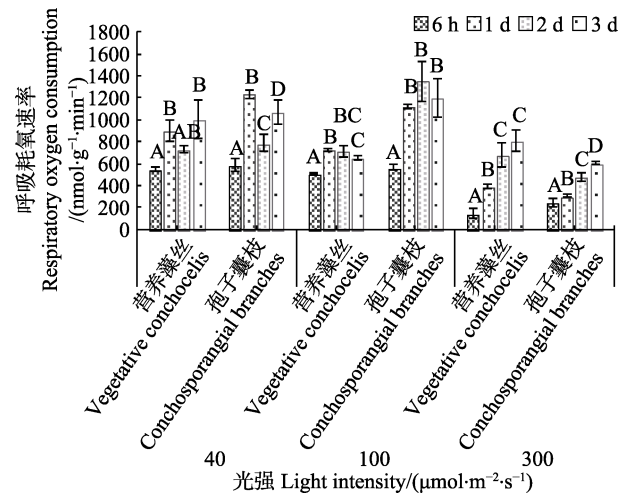


图 9 35°C 不同光强对条斑紫菜丝状体呼吸耗氧速率(R_d)的影响

Fig.9 Respiratory oxygen consumption rate of *P. yezoensis* under different light intensities at 35°C

2.4 温度和光强对丝状体净光合速率的影响

营养藻丝的净光合速率(P_n)均为负值。孢子囊枝在 15°C 和 25°C 时 P_n 为正值,且随光强增加而下降;当温度达到 35°C 时, P_n 急剧降低为负(表 1)。

表 1 温度、光照对条斑紫菜营养藻丝和孢子囊枝净光合速率(P_n)的影响
Tab.1 The net photosynthetic rate of vegetative conchocelis and conchosporangial branches under different light intensities and temperatures

光强 Light intensity [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]	温度 Temperature								
	15°C			25°C			35°C		
	40	100	300	40	100	300	40	100	300
营养藻丝 Vegetative conchocelis									
6 h	-198.51	-277.49	-280.70	-274.02	-344.19	-389.63	-448.87	-504.83	-145.96
1 d	-197.66	-142.99	-358.81	-368.97	-434.74	-400.02	-776.46	-681.66	-373.04
2 d	-261.50	-344.28	-319.18	-439.72	-369.18	-269.11	-817.64	-609.85	-637.30
3 d	-334.46	-338.74	-362.49	-536.19	-292.46	-445.70	-853.48	-631.48	-448.31
孢子囊枝 Conchosporangial branches									
6 h	343.86	289.43	193.88	322.46	232.09	166.68	-410.40	-479.08	-209.09
1 d	364.61	186.70	191.91	366.27	206.49	128.95	-823.62	-1033.70	-303.22
2 d	369.83	181.34	66.74	345.19	278.67	31.96	-784.46	-1305.50	-455.62
3 d	537.93	320.22	106.61	376.76	380.85	183.10	-1042.11	-1113.40	-610.41

3 讨论

藻类进行光化学反应和电子传递的成分位于叶绿体类囊体膜上(Chow *et al*, 2005), 叶绿素荧光参数可以反映 PS II 的活性以及对光能吸收、传递、分配、耗散等内在性的联系(Maxwell *et al*, 2000)。当藻类在逆境条件下产生光抑制时, 叶绿素各荧光参数均呈下降趋势(Zhou *et al*, 2004)。PS II 原初光能转化效率

F_v/F_m 反映植物在充足的暗适应后, 所有 PS II 反应中心均处于开放状态时的量子产量, 是衡量植物光合系统完整性的指标之一(张守仁, 1999)。当植物遭遇外界胁迫时, F_v/F_m 值存在不同程度的下降, 则表明 PS II 反应中心受到不同程度的损伤。总光合速率(P_g)表示在光照条件下, 单位时间内(叶绿体)所合成的有机物的量或同化 CO_2 的量, 表观光合速率(P_n)表示单位时间内植物所积累的有机物含量或者从外界环境所吸

收 CO_2 量(陈卫东, 2018), 由总光合速率(P_g)减去呼吸耗氧速率(R_d)所得。温度变化会影响藻细胞新陈代谢、种群增长和叶绿素含量(梁英等, 2009)。温度过高或过低均会使藻体生长缓慢, 甚至死亡(张美如等, 2009)。低温可以使植物类囊体膜上 PS II 反应中心功能受到抑制(Terashima *et al.*, 1989), 降低 PS II 的修复能力(Ottander *et al.*, 1993); 同时, PS II 也是对高温伤害最敏感的结构(Berry *et al.*, 1980)。光是植物进行光合作用的能量来源, 适宜的光强是保证植物正常生长发育的前提, 但光强过高, 则会对植物光合作用产生光抑制(郑宝福等, 1980; 陈国宜等, 1984; Zhang *et al.*, 1997)。植物适应或抵抗外界胁迫过程需要消耗大量能量, 呼吸作用为植物生命活动提供大部分能量, 通过增强呼吸作用来抵抗胁迫是植物抗逆途径之一。

温度和光照是影响紫菜丝状体生长发育的 2 个最基本环境要素。通常在一定的光照和温度范围内, 较高的温度、中短日长和较强的光照促进丝状体由营养藻丝发育为孢子囊枝(任国忠等, 1979; 骆其君等, 1999; 陈翠芬等, 2008; 卢晓等, 2014; 夏云捷等, 2016; Zhong *et al.*, 2016), 但有关调控机制尚不清楚。实践中, 营养藻丝在适宜的情况下, 只要培养条件不变, 可以长久维持营养生长, 而不会向孢子囊枝转化。那么, 光温的升高是否因不利于营养藻丝的生长, 从而启动相关内源信号调控藻丝转向另一个发育阶段? 为了验证这一假设, 本研究设置温度和光照强度较大, 包括适宜范围与极端胁迫。结果显示, 在适宜温度范围内($15^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$), 除了温度为 15°C 、光强为 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 二者在多数时间点的 F_v/F_m 相当, 其他条件下, 孢子囊枝的 F_v/F_m 、 P_g 与 P_n 均高于营养藻丝($P<0.05$)。营养藻丝在 25°C 时, F_v/F_m 、 P_g 与 P_n 值均低于 15°C 时, 而孢子囊枝在 25°C 时, 以上 3 个指标均高于或相当于 15°C 时, 说明孢子囊枝比营养藻丝适于更高的温度。这从 R_d 的变化也可以看出, 2 种藻丝在 15°C 时, R_d 差距不显著, 在温度为 25°C 、光强为 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 6 h~1 d 时, 营养藻丝显著高于孢子囊枝。光合作用降低、呼吸作用增强是植物遭遇胁迫时的常见反应。因此, 推测营养藻丝在温度为 25°C 、光照强度为 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时已受到胁迫。研究表明, 35°C 对紫菜丝状体已是致死高温胁迫, 2 种藻丝的 F_v/F_m 趋于 0, 出现藻体死亡现象。2 种藻丝的以上光合生理指标基本上都随实验光强的增加而下降。说明过高的光强可以显著降低丝状体 PS II 的光能利用效率。温度为 15°C 、光强为 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 营养藻丝和孢子囊枝在多数时间点具有相近的

F_v/F_m 值, 相同温度下, 光强增加至 $100\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 孢子囊枝 F_v/F_m 值则显著高出营养藻丝; 在温度为 $15^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$ 、光照为 $300\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 虽然孢子囊枝的光合生理指标数值相比温度为 $15^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$ 、光强为 $40\sim 100\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时有所下降, 但还维持在较高水平, 而营养藻丝的数值已降至 0 附近, 可见孢子囊枝对高光的耐受性显著高于营养藻丝。

孢子囊枝相对营养藻丝具备适应更高温度和光照的能力, 可能与其在结构和成分上的改变有关。超微结构显示, 首先, 孢子囊枝中央液泡形成并增大(沈颂东等, 2000), 液泡在多种逆境条件下起积极的渗透调节作用; 第二, 线粒体体积增大, 数量变多(沈颂东等, 2000)。线粒体是进行呼吸代谢和能量转换的主要场所, 细胞生命活动所需的能量大约有 95% 来自线粒体(Chance *et al.*, 1979), 条斑紫菜孢子囊枝中线粒体增多可能为机体抵抗外界胁迫提供了能量保障; 第三, 色素体被挤压分散排列在细胞边缘, 并由大量的线粒体和淀粉粒分割开来(周文君等, 2006), 极大提高了光能的吸收利用效率和有机物合成(光合碳固定); 第四, 细胞壁增厚疏松, 外胶层变薄, 内纤维质层极度加厚, 细胞外壁凹凸不平, 形成脊突, 并随孢子囊枝日益成熟数量明显增加(朱家彦等, 1984)。植物细胞壁增厚是抵御逆境胁迫的有效途径之一(庄惠如等, 2001)。另外, 前期研究表明, 在紫菜丝状体发育过程中, 磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LPC)含量增加(Wang *et al.*, 2015)。PC 对 PS II 膜复合物有保护作用(李冬海等, 2003), 可以增强其放氧速率(Gounaris *et al.*, 1983), 同时, 还可诱导 Triton 处理的光系统膜复合物的再活化(Ruan *et al.*, 2002)。PC 脂酰基侧链的不饱和程度对调节细胞的高温/低温适应能力具有重要影响。LPC 是植物抗逆过程中重要的信号传递物质(卢静婵等, 2012)。同时, 孢子囊枝中藻胆蛋白含量及其与叶绿素 *a* 含量的比值等均有所上升(陈焯等, 2007)。藻胆蛋白为红藻主要捕光色素(姚南瑜, 1987), 直接参与光合作用能量吸收和传递(Glazer, 1984), 同时, 还具有抗逆功能(Zhong *et al.*, 2016)。孢子囊枝藻胆蛋白含量上升, 可增加光能捕获效率, 促进光反应和碳水化合物合成。研究发现, 在坛紫菜丝状体由营养藻丝发育到孢子囊枝过程, 碳水化合物和蛋白质比值明显上升(陈焯等, 2007)。碳水化合物是细胞结构的主要成分和主要供能物质, 碳水化合物的含量及其与蛋白质的比值是植物响应胁迫的重要指标, 如, 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)在干旱胁迫下, 水溶性碳水化合物的含量显著升高(Mafakheri

et al., 2011); 细基江蓠(*Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*)碳水化合物和蛋白质比值随温度的降低和光照的减弱下降(刘静雯等, 2001)。紫菜孢子囊枝细胞内这些结构和组成的改变, 为孢子囊枝应对高温和高光胁迫提供了支撑。

综上所述, 在条斑紫菜营养藻丝的光合作用被严重抑制的光强、温度条件下, 孢子囊枝仍然具备相对高的光合活力, 说明温度和光强升高到不利于营养藻丝生长的情况下, 刺激藻丝转向孢子囊枝发育阶段, 后者同时具备适应更高温度和光照的能力。育苗实践中, 可利用二者对高温/高光耐受阈值的差异来调控丝状体的生长和发育。

参 考 文 献

- Berry J, Bjorkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980, 31(1): 491–543
- Cao Y, Wang WJ, Liu FL, *et al.* AFLP fingerprints of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) populations revealed the important effect of farming protocols on genetic diversity. *Botanica Marina*, 2018, 61(2): 141–147
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 1979, 59(3): 527–605
- Chen CF, Li XS, Yang L, *et al.* Effect of external factors on formation and growth of free-living conchosporangia in *Porphyra yezoensis*. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 166–170 [陈翠芬, 李信书, 杨玲, 等. 外界因子对条斑紫菜自由壳孢子囊枝形成和生长的影响. *生物技术通报*, 2008(4): 166–170]
- Chen GY, Zhang XP, Zhou HQ, *et al.* The effect of some ecological factor on the photosynthetic activity of free-living filaments in early stage of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 1984, 8(2): 115–124 [陈国宜, 张小平, 周鸿侨, 等. 不同生态因子对坛紫菜自由丝状体早期生长和光合作用活性的影响. *水产学报*, 1984, 8(2): 115–124]
- Chen Y, Pei LQ, Yan XJ, *et al.* Changes of chemical components during sporangial branchlets formation of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Marine Science*, 2007(2): 23–28 [陈焯, 裴鲁青, 严小军, 等. 坛紫菜孢子囊枝形成过程中生化组分的变化. *海洋学研究*, 2007(2): 23–28]
- Chen WD. Comparative analysis of gross photosynthesis rate and net photosynthetic rate. *Science Exam Research (High School Edition)*, 2018(23): 61–63 [陈卫东. 总光合速率、净光合速率的比较分析. *理科考试研究(高中版)*, 2018(23): 61–63]
- Chow WS, Kim EH, Horton P, *et al.* Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: The physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2005, 4(12): 1081
- Davison IR, Pearson GA. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology*, 2010, 32(2): 197–211
- Glazer AN. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Bioenergetics*, 1984, 768(1): 29–51
- Gounaris K, Whitford D, Barber J. The effect of thylakoid lipids on an oxygen-evolving photosystem II preparation. *FEBS Letters*, 1983, 163(2): 230–234
- Green LA, Neefus CD. Effects of temperature, light level, photoperiod, and ammonium concentration on *Pyropia leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta) from the Northwest Atlantic. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(3): 1253–1261
- Guo WZ. Effects of light and temperature on growth and development of sporophyte in different stages of *Porphyra yezoensis*. *Science and Technology Information*, 2012(17): 244–244 [郭文竹. 光温对条斑紫菜孢子体各阶段生长发育的影响. *科技资讯*, 2012(17): 244–244]
- He JY, He LW, Zhang X, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Porphyra yezoensis* using AFLP. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 489–494 [贺剑云, 何林文, 张辛, 等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)遗传多样性的 AFLP 分析. *海洋与湖沼*, 2010, 41(4): 489–494]
- Hou HS, He WJ, Li HY, *et al.* Effects of high temperature stress on growth and physiology of conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Liaoning Normal University (Natural Science)*, 2008, 31(4): 487–490 [侯和胜, 何文君, 李洪艳, 等. 高温胁迫对条斑紫菜丝状体的生长和生理影响. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 31(4): 487–490]
- Jiang H, Wang Y, Zhu J. Comparative studies on pigments and photosynthetic characteristics of sexually different vegetative and reproductive tissues of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(1): 73–79
- Katz S, Kizner Z, Dubinsky Z, *et al.* Response of *Porphyra linearis* (Rhodophyta) to environmental factors under controlled culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(3–5): 535–542
- Li DH, Xu Q, Gong YD, *et al.* Protective effect of phosphatidylcholine on PSII membrane complex during heat treatment. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(7): 3 [李冬海, 许强, 公衍道, 等. 热处理过程中磷脂酰胆碱对光系统 II 膜复合物的保护作用. *科学通报*, 2003, 48(7): 3]
- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, *et al.* Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 156–163]

- Liang Y, Chen SX. Effects of temperatures on the chlorophyll fluorescence parameters and the astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009, 30(3): 112–120 [梁英, 陈书秀. 温度对雨生红球藻叶绿素荧光特性及虾青素含量的影响. *海洋湖沼通报*, 2009, 30(3): 112–120]
- Liu JW, Dong SL. Interactions between light and temperature on the growth and levels of chemical constituents of *Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2001, 31(3): 332–338 [刘静雯, 董双林. 光照和温度对细基江蓠繁枝变型的生长及生化组成影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2001, 31(3): 332–338]
- Lu JC, Wang MY, Jiang P, *et al.* Functioning mechanism of plant signal substances generated in mycorrhizal symbionts. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2012, 33(3): 290–295 [卢静婵, 王明元, 姜攀, 等. 菌根共生体中植物信号物质的产生及其作用机制. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2012, 33(3): 290–295]
- Lu X, Li MZ, Wang ZG, *et al.* Effects of different temperature and illumination intensity on growth and biochemical constituents of *Gracilaria chouae*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1236–1243 [卢晓, 李美真, 王志刚, 等. 光照和温度对脆江蓠的生长和生化组成的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1236–1243]
- Luo QJ, Lu D, Fei ZQ, *et al.* Effect of ecological factors on growth of freeliving conchocelis of *Porphyra yezoensis* Ueda in Zhejiang. *Fisheries Science*, 1999(4): 6–9 [骆其君, 卢冬, 费志清, 等. 生态因子对条斑紫菜自由丝状体生长的影响. *水产科学*, 1999(4): 6–9]
- Ma JH, Cai SQ. *Cultivation and processing of Porphyra yezoensis*. Beijing: Science Press, 1996 [马家海, 蔡守清. 条斑紫菜的栽培与加工. 北京: 科学出版社, 1996]
- Maxwell K. Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659–668
- Mafakheri A, Siosemardeh A, Bahramnejad B, *et al.* Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, 5(10): 1255–1260
- Ottander C, Hundal T, Andersson B, *et al.* Photosystem II reaction centres stay intact during low temperature photoinhibition. *Photosynthesis Research*, 1993, 35(2): 191–200
- Ren GZ, Cui GF, Fei XG, *et al.* The Effect of Temperature on the growth and development of the conchocelis of *Porphyra yezoensis* Ueda. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1979, 110(1): 28–38 [任国忠, 崔广法, 费修纛, 等. 温度对条斑紫菜丝状体生长发育的影响. *海洋与湖沼*, 1979, 110(1): 28–38]
- Ruan X, Li DH, Xu Q, *et al.* Phosphatidylcholine-induced reactivation of photosystem II membranes pretreated with Triton X-100. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002, 67(2): 109–115
- Shen SD, Dai JX, Zhou LR, *et al.* Ultrastructure of vegetative and reproductive conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Marine Science Bulletin*, 2000, 19(3): 38–44 [沈颂东, 戴继勋, 周立冉, 等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)丝状体的超微结构观察. *海洋通报*, 2000, 19(3): 38–44]
- Teng YJ, Wang XQ, Wang P, *et al.* Effects of temperature and nutrients on the growth of somatic cells in *Porphyra yezoensis*. *Agricultural Economics and Management*, 2007(5): 37–40 [滕亚娟, 王兴强, 王萍, 等. 温度和营养盐对条斑紫菜体细胞生长发育的影响. *农业经济与管理*, 2007(5): 37–40]
- Terashima I, Huang LK, Osmond CB. Effects of leaf chilling on thylakoid functions, measured at room temperature, in *Cucumis sativus* L. and *Oryza sativa* L. *Plant and Cell Physiology*, 1989, 30(6): 841–850
- Varela-Alvarez E, Stengel DB, Guiry MD. The use of image processing in assessing conchocelis growth and conchospore production in *Porphyra linearis*. *Phycologia*, 2004, 43(3): 282–287
- Wang X, Zhao P, Luo Q, *et al.* Metabolite changes during the life history of *Porphyra haitanensis*. *Plant Biology*, 2015, 17(3): 660–666
- Wang XL, Ma YC, Lu XP, *et al.* A review of species diversity of *Pyropia* and fundamental studies of *Pyropia* cultivation. *Marine Sciences*, 2017, 41(2): 125–135 [王旭雷, 马颖超, 鲁晓萍, 等. 法紫菜生物多样性及其栽培生物学基础. *海洋科学*, 2017, 41(2): 125–135]
- Xia YJ, Gong XZ, Gao W, *et al.* A comparative study on effects of light intensity and photoperiod on the growth and development of filaments of the northern and the southern *Scytosiphon lomentaria* in China. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1039–1049 [夏云捷, 宫相忠, 高伟, 等. 光照对中国南北方萱藻丝状体生长发育影响的比较. *水产学报*, 2016, 40(7): 1039–1049]
- Xu P, Zhang XC, Wang SJ, *et al.* *Reproduction and development of major economic marine algae in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2013 [许璞, 张学成, 王素娟, 等. 中国主要经济海藻的繁殖与发育. 北京: 中国农业出版社, 2013]
- Yang H, Mao YX, Kong FN, *et al.* Profiling of the transcriptome of *Porphyra yezoensis* with Solexa sequencing technology. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(20): 2119–2130
- Yu NY. *Physiology of algae*. Dalian: Dalian Institute of Technology Press, 1987 [姚南瑜. 藻类生理学. 大连: 大连工学院出版社, 1987]
- Zhang MR, Lu QQ, Zhu JY. The significance and influencing factors of amplification of free-living conchocelis in *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2009(2): 77–79 [张美如, 陆勤勤, 朱建一. 条斑紫菜自由丝状体扩增的意义及影响因子. *水产科技情报*, 2009(2): 77–79]
- Zhang SR. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics

- parameters and their significance. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 444–448 [张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. *植物学通报*, 1999, 16(4): 444–448]
- Zhang X, Brammer E, Pedersén M, *et al.* Effects of light photon flux density and spectral quality on photosynthesis and respiration in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Phycological Research*, 1997, 45(1): 29–37
- Zhang XC, Xu P, Qin S, *et al.* The genetics of marine algae. Beijing: China Agricultural Press, 2005 [张学成, 许璞, 秦松, 等. 海藻遗传学. 北京: 中国农业出版社, 2005]
- Zheng BF, Chen MQ, Fei XG. On the effect of culture light intensity on the growth and development of the conchocelis phase of *Porphyra yezoensis* Ueda. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1980, 11(4): 362–369 [郑宝福, 陈美琴, 费修纆. 培养光强对条斑紫菜丝状体生长发育的影响. *海洋与湖沼*, 1980, 11(4): 362–369]
- Zhong ZH, Wang WJ, Sun XT, *et al.* Developmental and physiological properties of *Pyropia dentata* (Bangiales, Rhodophyta) conchocelis in culture. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(6): 3435–3445
- Zhou R, Zhao H. Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance (EI). *Physiologia Plantarum*, 2004, 121(3): 399–408
- Zhou WJ, Li Y, Dai JX. Observation on free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 217–223 [周文君, 李赟, 戴继勋. 条斑紫菜自由丝状体的形态结构观察. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 217–223]
- Zhou XH, Yi LF, Xu JT, *et al.* Photosynthetic characteristics and SAMS gene expression in the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda under high salinity. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(20): 6730–6735 [周向红, 易乐飞, 徐军田, 等. 高盐下条斑紫菜光合特性和 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因表达的变化. *生态学报*, 2013, 33(20): 6730–6735]
- Zhu JY, Ma JH, Jiang HX. Observation on the ultrastructure of free-living filament cells of *Porphyra haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 1984, 8(3): 235–242 [朱家彦, 马家海, 蒋虎祥. 坛紫菜自由丝状体细胞超微结构的初步研究. *水产学报*, 1984, 8(3): 235–242]
- Zhuang HR, Chen WL, Lu HS, *et al.* The research of ultrastructure for different morphological cells of *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7(5): 428–433 [庄惠如, 陈文列, 卢海声, 等. 雨生红球藻不同形态细胞的超微结构研究. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(5): 428–433]

(编辑 冯小花)

Effects of Light Intensity and Temperature on Photosynthetic Adaptability of the Different Stages of *Pyropia yezoensis* Free-Living Conchocelis

WEI Jiahui^{1,2}, LI Guoliang^{1,2}, WANG Wenjun^{1,3①}, LIANG Zhouhui^{1,3},
LU Xiaoping^{1,3}, LIU Fuli^{1,3}, SUN Xiutao^{1,3}, ZHANG Pengyan^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract The photosynthetic physiology of the different stages of the *Pyropia yezoensis* free-living conchocelis were investigated at different temperatures (15°C, 25°C, and 35°C) and light intensities [40, 100, and 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$] to reveal the regulation mechanism and establish a foundation for efficient and accurate *P. yezoensis* seedling technology. The main results were as follows: 1) At 15°C and 25°C, the optimum PS II quantum yield (F_v/F_m), gross photosynthesis rate (P_g), and net photosynthetic rate (P_n) of the vegetative conchocelis and conchosporangial branches decreased as light intensity increased. F_v/F_m and P_g of the vegetative conchocelis filaments dropped to zero under 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ light intensity, and the values of P_n were below zero. The respiratory oxygen consumption rate (R_d) of the vegetative conchocelis was significantly higher than that of the conchosporangial branches at 25°C and 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. The difference in the R_d values between vegetative and conchosporangial branches decreased gradually during culturing under the other conditions. In general, F_v/F_m , P_g , and P_n of the conchosporangial branches were significantly higher than those of the vegetative conchocelis filaments and there was no significant difference in R_d between the two developmental stages under most culture conditions; 2) F_v/F_m of the conchosporangial branches was significantly higher than that of the vegetative conchocelis at 6 h of culture at 35°C, which decreased with increasing light intensities. F_v/F_m of the other treatments was nearly zero. P_g and R_d of the conchosporangial branches were higher than or equivalent to that of the vegetative conchocelis after 6 h of culture at 35°C, and 40 or 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. After 1 d or 2 d, P_n and R_d of the vegetative conchocelis were higher than those of the conchosporangial branches, while the P_n and R_d were all below zero under 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ conditions during the entire experimental period. Overall, F_v/F_m , P_g , and P_n of free-living *P. yezoensis* conchocelis were significantly lower (mostly zero or below), whereas R_d was higher at 35°C than at 15°C or 25°C. After 1~3 d, both vegetative conchocelis and conchosporangial branches became green or white. In summary, under the light intensity and temperature conditions in which the vegetative conchocelis was severely inhibited, conchosporangial branches had relatively high photosynthetic activity. The present findings indicated that high light intensity and temperature were not beneficial to vegetative conchocelis, but they could stimulate the vegetative conchocelis to turn into conchosporangial branches, and conchosporangial branches have greater resistance ability under high-temperature and light intensity stress.

Key words *Pyropia*; Vegetative conchocelis; Conchosporangial branches; Photosynthesis; High light intensity; High temperature

① Corresponding author: WANG Wenjun, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190514001

http://www.yykxjz.cn/

赵强, 杨爽, 刘心田, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 125-139
Zhao Q, Yang S, Liu XT, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. Structure and analysis of mitochondrial sequences of introduced Russian red sea cucumber. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 125-139

引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析*

赵 强^{1,2#} 杨 爽^{2,4#} 刘心田³ 孙国华^{2①}
冯艳微² 王卫军² 杨建敏²



(1. 烟台市海洋经济研究院 烟台 264003; 2. 鲁东大学农学院 烟台 264025;
3. 威海市渔业技术推广站 威海 264200; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究通过高通量测序技术对引入养殖的俄罗斯红参(*Apostichopus japonicus*)线粒体全基因组进行随机测序并分析,结果显示,俄罗斯红参线粒体基因组全长为 16111 bp,共含有 37 个基因,包括 22 个 tRNA、2 个 rRNA (l-rRNA 和 s-rRNA)和 13 个蛋白编码基因。全序列共存在 24 处基因间隔和 5 处基因重叠区。蛋白编码基因与全序列的碱基使用均表现出 A、T 偏倚。13 个蛋白编码基因的密码子完整,除 ND1 以 GTG 为起始密码子外,其他均以 ATN 为起始密码子;终止密码子都是完整密码子,除 ND2 与 ND4 的终止密码子分别为 TTG 与 TAG 外,其他终止密码子以 TAA 为主;氨基酸频率最高为丝氨酸 Ser(S),其次为亮氨酸 Leu(L)。22 个 tRNA 长度范围为 66~72 bp,2 个基因存在重复,且 21 个基因能预测其三叶草结构。l-rRNA 与 s-rRNA 的长度与位置不同,对碱基的使用相似。蛋白编码基因的基因排列与海参纲(Holothuroidea)、海胆纲(Echinoidea)排列顺序相同,并与海星纲(Asteroidea)及蛇尾纲(Ophiuroidea)共享基因模块。BLAST 分析表明,俄罗斯红参与仿刺参(*Apostichopus japonicus*)同源性最高。不同海参遗传距离分析发现,俄罗斯红参与 3 个海域仿刺参最为接近。基于最大似然法分别根据氨基酸与核苷酸序列构建的系统发生树显示,基于核苷酸序列的建树结果更符合亲缘关系较近的海参种类间的分析。引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析可为后续俄罗斯红参的遗传研究及种质应用提供支持。

关键词 俄罗斯红参; 线粒体基因组; 系统发生

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0125-15

近年来,随着市场需求的增加,刺参养殖业发展迅速,但养殖效率不高、良种匮乏、生长性状稳定性较差等一直影响刺参产业的发展(曲洪霞等, 2016),因此,不同品种和品系的刺参逐步进入养殖和消费市

场。俄罗斯红参(*Apostichopus japonicus*)简称“红参”,原产于俄罗斯远东近海,是本地刺参的地理远缘种,由于环境及摄食等因素体表呈红棕色。海参崴附近纬度高,海水温度较低,食物较少,俄罗斯红参生长缓

* 山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)、国家自然科学基金(31602144)、科技部重点研发计划(2018YFD0901602)和黄河三角洲学者岗位共同资助 [This work was supported by Shandong Province Agriculture Research System (SDAIT-22-02), National Natural Science Foundation of China (31602144), Ministry of Science and Technology Key Research and Development Plan (2018YFD0901602), and Yellow River Delta Scholars Post].

#共同第一作者: 赵 强, E-mail: shell-zhao@163.com; 杨 爽, E-mail: 18615356650@163.com

① 通讯作者: 孙国华, 副研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2019-05-14, 收修改稿日期: 2019-11-09

慢,代谢及生命力较为旺盛,且体积略小,被认为其体内可以积蓄更多营养(关崇新等,2015)。目前,俄罗斯红参已引入我国养殖。

线粒体基因组(mtDNA)为闭合的环状双链结构,大部分动物的 mtDNA 由 37 个基因与 1 段长度可变的控制区组成,基因排列较为保守,结构相对紧凑。mtDNA 遗传方式为母性遗传方式,不存在双亲遗传的遗传差异,很少发生重组,无组织特异性,易于取材与测序分析(康立森,2018)。相比核基因组,mtDNA 的分子量相对较小,仅占细胞的 1%,易于分离纯化。具有选择压力更小、结构相对稳定、编码速率更快等特点(赵娜娜,2013)。线粒体 DNA 包含更全面的信息,利用其进行系统进化分析的可信度更高(Cui *et al.*, 2009)。目前,针对水产动物 mtDNA 已有大量研究,但海参 mtDNA 的研究较少。俄罗斯红参与普通养殖刺参在生长及营养含量方面稍有差异,为了解俄罗斯红参在遗传上的特点及其与其他海参间的差异,本研究对俄罗斯红参线粒体全基因组进行测序,分析其线粒体基因组的构成及其系统发育关系,为海参线粒体基因组的研究及后续俄罗斯红参的种质创新应用提供遗传数据基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用俄罗斯红参取自山东华春渔业有限公司,2010年引入,养殖于黄河三角洲滩涂区刺参池塘,持续进行生长性状的养殖选育。2017年11月取样,数量为20个,参龄约为1年半,平均体质量为(48.96±7.56)g。清洗、解剖并取肌肉部分,将所取组织送至上海天昊生物公司进行测序。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及质量检测 本实验取约 30 mg 肌肉组织,按常规酚-氯仿法获得俄罗斯红参总 DNA。使用 NanoDrop 检测样品的浓度和纯度;琼脂糖凝胶电泳检测样品的完整度。

1.2.2 随机文库构建及 PCR 扩增 DNA 文库 采用转座酶建库试剂盒构建随机测序文库。利用转座酶随机打断 DNA,同时在片段两端加接头,并使用高保真聚合酶扩增原始文库,利用 PCR(扩增循环数控制在 12~15 之间)在文库两端引入特异性标签(Index)和测序接头。

1.2.3 文库片段筛选及质量检测 使用 Agencourt SPRIselect 核酸片段筛选试剂盒纯化放大的文库,同时筛选片段的大小。采用两步法筛选(Double size

selection),先用 SPRI 磁珠去掉目标区域左侧小片段(Left-side sizes election),再除去位于目标片段区域右侧的大片段(Right-side size selection),最终筛选片段峰值在 300 bp 的测序文库。使用 Qubit 准确定量文库浓度,均匀混合样品,确保每个样本的数据量合适均衡。并用 Agilent 2100 Bioanalyzer 确定文库片段大小分布,评估是否适合上机。

1.2.4 混样并进行上机测序 将质检合格的样品稀释,以等摩尔数对多个样品混样并上机。使用 Illumina HiSeq 平台,以 2×150 原始双端测序策略来测序文库。

1.3 数据处理

所用序列经串联后,使用 BioEdit 7.0.9(Hall, 1999)软件中的 ClustalW 进行序列比对,利用软件 Gblocks 0.91b (Castresana 2000)去除不可信区间。利用 Mega 4.0 软件统计碱基组成、密码子使用等。使用 tRNAscanSE 在线网站(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)预测 tRNA 的二级结构。

1.4 系统发生分析

本研究使用俄罗斯红参、半索动物门及棘皮动物门共 28 个物种的线粒体序列构建系统发生树,线粒体序列为 13 个蛋白编码基因串联的氨基酸序列与核苷酸序列,线粒体序列均从 NCBI 获得(表 1)。以半索动物门的囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*)与肉花柱头虫(*Balanoglossus carnosus*)为外类群,将处理后的核苷酸序列使用 jModelTest2.1.5 (2014)软件 AIC 标准选择出最佳替代模型为 GTR+F+R5,氨基酸序列使用 ProtTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005)软件 AIC 标准选择出最佳替代模型为 CpREV+I+G+F,根据最佳模型使用应用最大似然法 PhyML3.0 (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg)构建系统发生树。最大似然法节点的支持度通过 1000 次重抽样获得。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

提取的俄罗斯红参 DNA 浓度 ≥ 20 ng/μl,总量 ≥ 100 ng, OD_{260 nm}/OD_{280 nm}=1.8~2.2;基因组 DNA 主带清晰可见,无明显降解弥散存在,可用于下一步实验。

2.2 测序质量

测序获得序列根据比对结果(表 2),Q20=94.42%,Q30=88.13%测序错误率在正常范围内,测序结果可进行后续分析。

表 1 构建系统发生树所用物种及其 GenBank 号
Tab.1 The GenBank number of the species used to construct the phylogenetic tree

物种 Species	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	拉丁学名 Latin name	GenBank 序列号 Accession No.
多棘海盘车	<i>Asterias amurensis</i>	NC_006665.1	加州拟刺参	<i>Parastichopus californicus</i>	KP398509.1
多棘槭海星	<i>Astropecten polyacanthus</i>	NC_006666.1	具疣拟刺参	<i>Parastichopus parvimensis</i>	KU168761.1
棘冠海星	<i>Acanthaster brevispinus</i>	AB231476	大连仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Dalian	FJ986223.1
蓝海燕	<i>Patiria pectinifera</i>	NC_001627.1	青岛仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Qingdao	GU557148.1
砂海星	<i>Luidia quinaria</i>	NC_006664.1	威海仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i> Weihai	EU294194.1
长棘海星	<i>Acanthaster planci</i>	NC_007788.1	糙刺参	<i>Stichopus horrens</i>	HQ000092.1
地中海海洋齿	<i>Antedon mediterranea</i>	NC_010692.1	叶瓜参	<i>Cucumaria miniata</i>	AY182376
海百合	<i>Neogymnocrinus richeri</i>	DQ068951.1	白色真蛇尾	<i>Ophiura albida</i>	NC_010691.1
花形羽枝	<i>Florometra serratissima</i>	NC_001878.1	灰色真蛇尾	<i>Ophiura lutkeni</i>	AY184223.1
栉羽星	<i>Phanogenia gracilis</i>	DQ068952.1	紫蛇尾	<i>Ophiopholis aculeata</i>	AF314589.1
白棘球海胆	<i>Strongylocentrotus pallidus</i>	NC_009941.1	绿棘海胆	<i>Strongylocentrotus</i> <i>droebachiensis</i>	EU054306.1
黑海胆	<i>Arbacia lixula</i>	NC_001770.1	囊舌虫	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	AY336131.1
拟球海胆	<i>Paracentrotus lividus</i>	NC_001572.1	肉花柱头虫	<i>Balanoglossus carnosus</i>	NC001887.1
紫棘球海胆	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	NC_001453.1			

表 2 比对结果统计
Tab.2 Statistics of comparison results

Raw reads	Choose reads	Choose bases	Clean reads(%)	Clean reads GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
28597308	60014	8933159	0.21	37.94	94.42	88.13

2.3 线粒体基因组结构组成

2.3.1 基因结构 本研究测得俄罗斯红参线粒体基因组全长为 16111 bp, 共含有 37 个基因(图 1), 为环状 DNA 结构, 与目前已知的棘皮动物相似。37 个基因(表 3)包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个核糖体 RNA 基因。13 个蛋白编码基因由 11 个电子传递系统的基因(复合体 I、复合体 IV、Cytb 基因)与 2 个氧化磷酸化基因(ATP6、ATP8)组成, 其中包括 7 个还原酶复合体的亚单位复合体 I (ND4L、ND1、ND2、ND3、ND4、ND5 和 ND6)、3 个氧化酶的亚单位复合体 IV 基因(COX1、COX2 和 COX3)、1 个细胞色素 b 基因(Cytb)、2 个 ATP 合成酶基因(ATP6 和 ATP8)。除 tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser 与 ND6 位于 L 链外, 其他基因均位于 H 链上。

2.3.2 基因间隔区与重叠区 俄罗斯红参线粒体的基因间隔较多, 共存在 24 处基因间隔(表 3), tRNA-Thr 与 tRNA-Pro 间隔最大为 460 bp, 占全长序

列的 2.86%, 其次为 ND6 与 ND5 基因间隔, 为 189 bp, 以及 ND4 与 ND3 间隔为 181 bp。全序列共存在 5 处基因重叠区, 在 tRNA-Pro 与 tRNA-Gln 之间存在 4 bp 的重叠, 1-rRNA 与 COX1 之间存在 6 bp 的重叠, COX3 与 tRNA-Ser 存在 3 bp 的重叠。ND4 与 tRNA-His 间存在 10 bp 的重叠, tRNA-His 与 tRNA-Ser2 间存在 1 bp 的重叠。

2.3.3 碱基含量 线粒体基因全序列碱基组成中, A、G、C 和 T 分别为 31.79%、17.87%、20.17%和 30.17%。A+T 和 C+G 含量分别为 61.96%和 38.04%, A+G 含量高于 G+C, 表现为较强 A、T 偏倚。蛋白编码基因碱基组成中, A、T、C 和 G 含量分别为 30.03%、31.34%、20.89%和 17.74%, A+T 和 C+G 的含量分别为 61.37%和 38.63%, 蛋白编码基因的碱基使用与全序列相似, 均表现出 A、T 偏倚。

2.4 蛋白编码基因的密码子使用

13 个编码蛋白基因全长为 10868 bp, 占全序列的 67.5%, 共编码 3186 个氨基酸(除终止密码子外)。

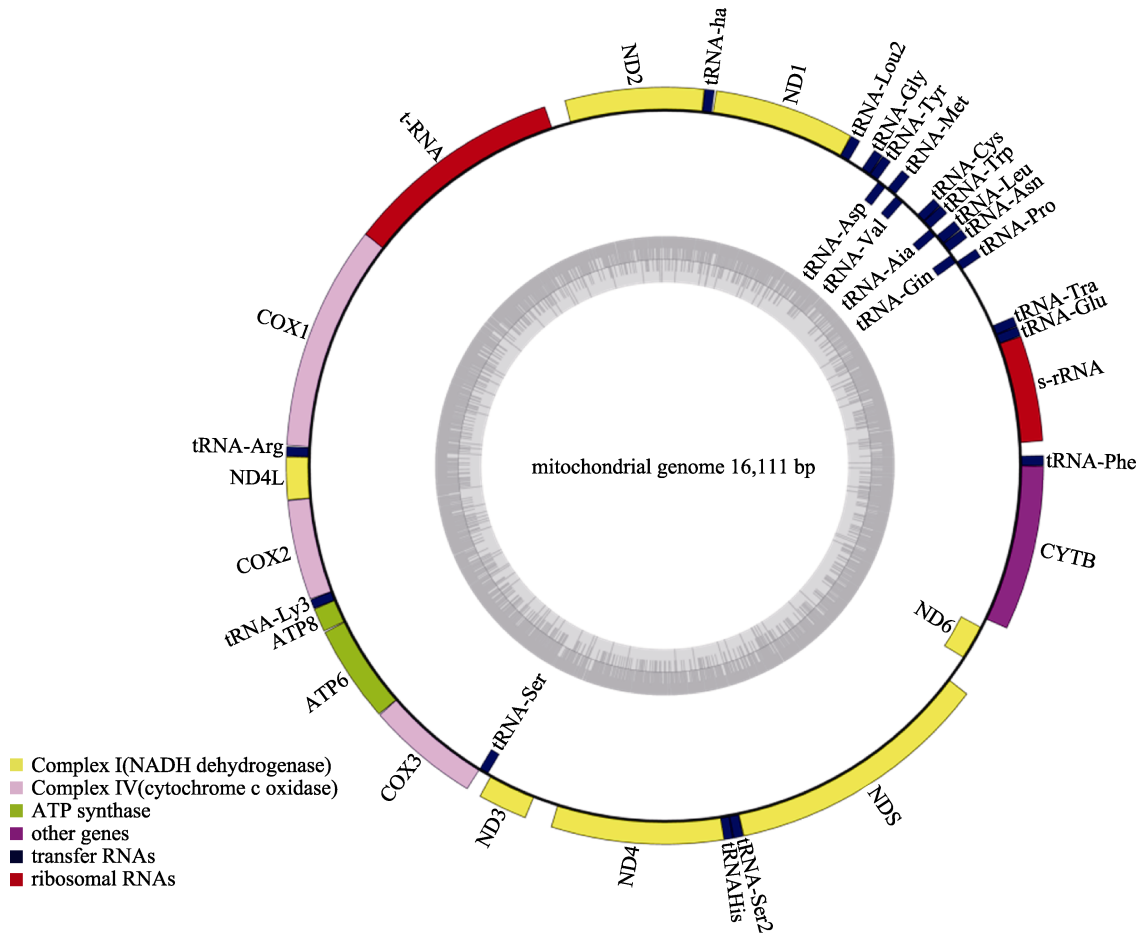


图 1 俄罗斯红参线粒体基因组结构

Fig.1 Gene organization of Russian red sea cucumber mitochondrial genome

表 3 俄罗斯红参线粒体基因组中基因位置及特征

Tab.3 Localization and features of genes in the mitochondrial genome of Russian red sea cucumber

基因名称 Gene name	位置 Position		长度 Size (bp)	密码子 Codon		编码链 Strand	基因间隔大小 Intergenic length (bp)
	From	To		起始 Initial	终止 Termination		
tRNA-Phe	1	71	71			H	95
s-rRNA	167	897	731			H	0
tRNA-Glu	898	966	69			H	0
tRNA-Thr	967	1036	70			H	460
tRNA-Pro	1497	1563	67			H	-4
tRNA-Gln	1560	1629	70			L	27
tRNA-Asn	1657	1727	71			H	2
tRNA-Leu	1730	1801	72			H	3
tRNA-Ala	1805	1870	66			L	1
tRNA-Trp	1872	1940	69			H	0
tRNA-Cys	1941	2006	66			H	136
tRNA-Val	2143	2212	70			L	12
tRNA-Met	2225	2294	70			H	14
tRNA-Asp	2309	2376	68			L	12
tRNA-Tyr	2389	2456	68			H	1

续表 3

基因名称 Gene name	位置 Position		长度 Size (bp)	密码子 Codon		编码链 Strand	基因间隔大小 Intergenic length (bp)
	From	To		起始 Initial	终止 Termination		
tRNA-Gly	2458	2526	69			H	111
tRNA-Leu2	2638	2708	71			H	0
ND1	2709	3680	972	GTG	TAA	H	9
tRNA-Ile	3690	3757	68			H	0
ND2	3758	4715	958	ATG	TTG	H	138
l-rRNA	4854	6369	1516			H	-6
COX1	6364	7917	1554	ATT	TAA	H	6
tRNA-Arg	7924	7991	68			H	1
ND4L	7993	8289	297	ATG	TAA	H	1
COX2	8291	8980	690	ATG	TAA	H	1
tRNA-Lys	8982	9048	67			H	0
ATP8	9049	9216	168	ATG	TAA	H	5
ATP6	9222	9893	672	ATT	TAA	H	2
COX3	9896	10678	783	ATG	TAA	H	-3
tRNA-Ser	10676	10747	72			L	26
ND3	10774	11118	345	ATG	TAA	H	181
ND4	11300	12493	1194	ATA	TAG	H	-10
tRNA-His	12484	12550	67			H	-1
tRNA-Ser2	12550	12619	70			H	0
ND5	12620	14455	1836	ATG	TAA	H	189
ND6	14645	14902	258	ATT	TAA	L	68
Cytb	14971	16111	1141	ATG	TAA	H	0

注: 基因间隔大小一栏中, 正数代表基因间隔碱基数, 负数代表基因重叠碱基数

Note: In the column of intergenic length, the positive number indicates interval base pairs between genes, while the negative number indicates overlapping base pairs between genes

表 4 俄罗斯红参线粒体全基因组编码蛋白基因密码子使用情况
Tab.4 Codon usage of the protein-coding genes in Russian red sea cucumber mitogenome

密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)	密码子 Codon	个数 N	比例 Percentage (%)
UUC(F)	76	0.58	UCC(S)	50	0.85	UAC(Y)	57	0.68	UGC(C)	27	0.95
UUA(L)	109	1.56	UCA(S)	58	0.99	UAA(*)	49	1.26	UGA(W)	55	1.28
UUG(L)	29	0.42	UCG(S)	19	0.32	UAG(*)	29	0.74	UGG(W)	31	0.72
CUU(L)	105	1.51	CCU(P)	55	1.28	CAU(H)	47	0.94	CGU(R)	19	0.90
CUC(L)	46	0.66	CCC(P)	45	1.05	CAC(H)	53	1.06	CGC(R)	15	0.71
CUA(L)	97	1.39	CCA(P)	54	1.26	CAA(Q)	50	1.39	CGA(R)	27	1.29
CUG(L)	32	0.46	CCG(P)	18	0.42	CAG(Q)	22	0.61	CGG(R)	23	1.10
AUU(I)	101	1.37	ACU(T)	67	1.15	AAU(N)	102	1.22	AGU(S)	50	0.85
AUC(I)	46	0.63	ACC(T)	58	1.00	AAC(N)	65	0.78	AGC(S)	69	1.17
AUA(M)	117	1.21	ACA(T)	80	1.37	AAA(K)	123	1.28	AGA(S)	68	1.15
AUG(M)	76	0.79	ACG(T)	28	0.48	AAG(K)	69	0.72	AGG(S)	61	1.04
GUU(V)	76	1.59	GCU(A)	58	1.43	GAU(D)	46	0.95	GGU(G)	34	0.75
GUC(V)	32	0.67	GCC(A)	46	1.14	GAC(D)	51	1.05	GGC(G)	36	0.80
GUA(V)	48	1.01	GCA(A)	43	1.06	GAA(E)	63	1.38	GGA(G)	76	1.68
GUG(V)	35	0.73	GCG(A)	15	0.37	GAG(E)	28	0.62	GGG(G)	35	0.77

注: 加粗为偏好密码子

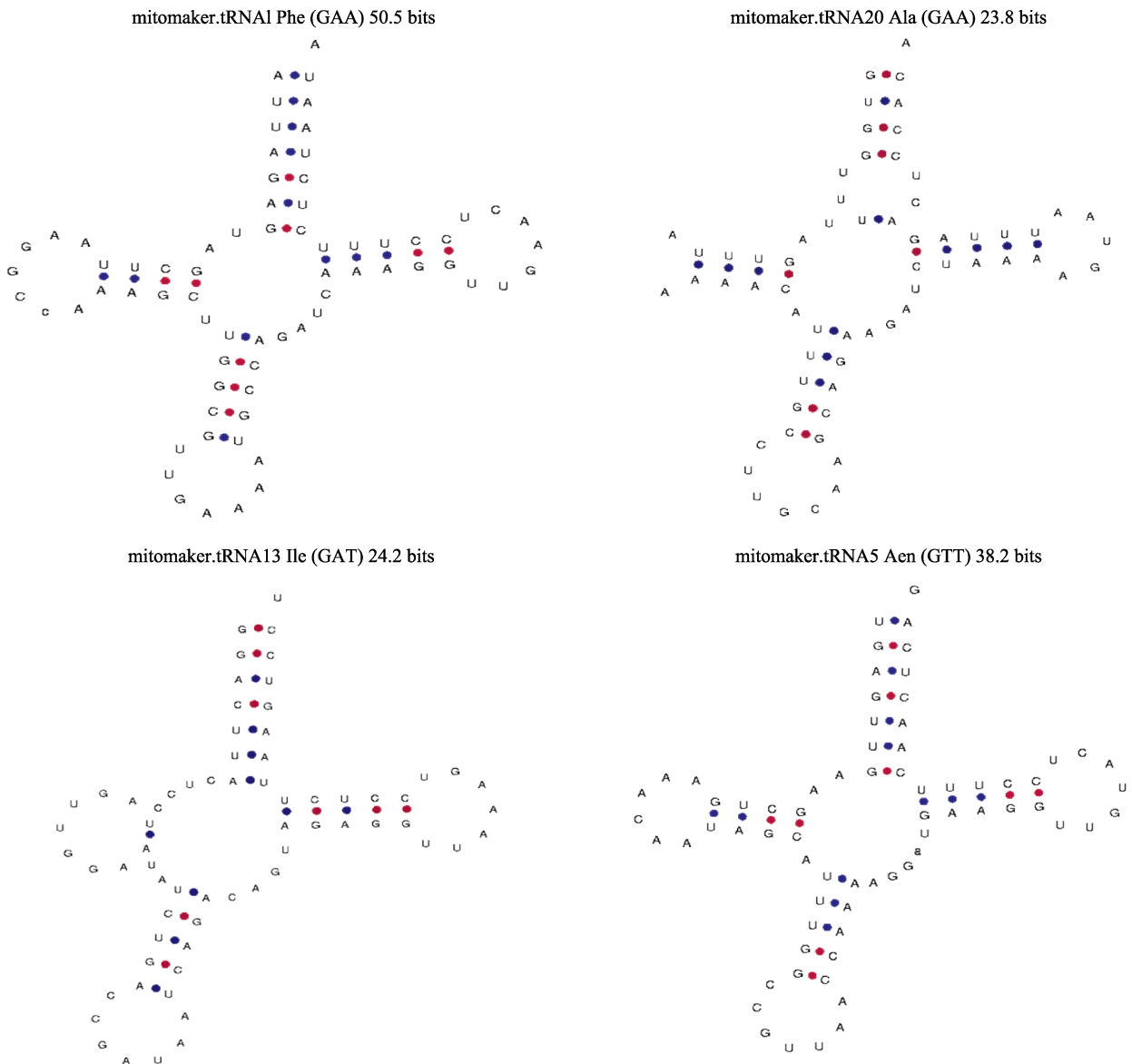
Note: Bold is preferred codon

氨基酸编码频率最高为丝氨酸 Ser(S), 其次为亮氨酸 Leu(L)。使用 Mega 软件统计密码子使用情况(表 4), 13 个编码蛋白基因的密码子完整, 且存在 30 个偏好密码子, 其中第 3 位点对 A 或 T(U)的使用频率较高。除 ND1 以 GTG 为起始密码子, 其他均以 ATN 为起始密码子。ND2、ND4L、COX2、ATP8、COX3、ND3、ND5 和 Cytb 起始密码子为 ATG, COX1、ATP6 和 ND6 以 ATT 为起始密码子, 而 ND4 以 ATA 为起始密码子。终止密码子都是完整密码子, 除 ND2 与 ND4 的终止密码子分别为 TTG 与 TAG 外, 其他终止密码子以 TAA 为主。

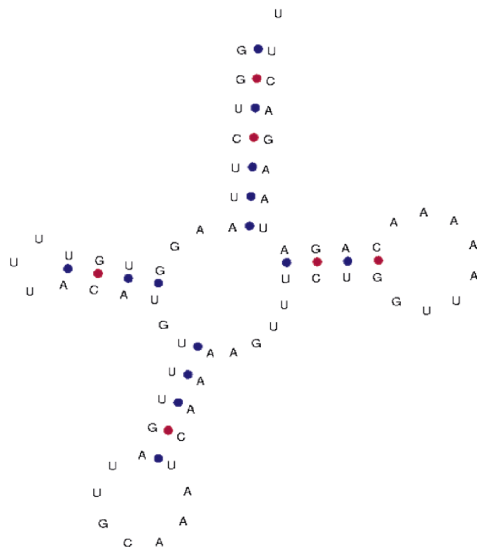
2.5 tRNA

俄罗斯红参 mtDNA 序列包含 22 个 tRNA, 长度范围为 66~72 bp, tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser 位于轻链, 其他 tRNA 位于重

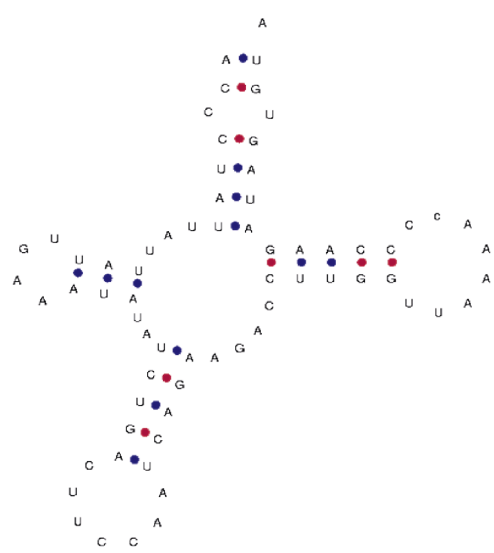
链。tRNA-Ser 与 tRNA-Leu 各重复 1 次, 最小的为 tRNA-Cys, 最大的为 tRNA-Leu 和 tRNA-Ser。除 1 个 tRNA-Ser2 缺少 D 环, 无法形成三叶草结构, 其他 tRNA 使用 tRNAscanSE 在线软件预测 tRNA 的二级结构均为三叶草结构(图 2), 包括受体臂、T Ψ C 臂、反密码子臂, D 臂。受体臂: tRNA-Met、tRNA-Gly 和 tRNA-Ala 发生 1 对碱基错配, tRNA-Tyr 插入 1 个碱基, tRNA-Arg 发生 2 对碱基错配。T Ψ C 臂碱基组成变化不大, tRNA-Cys、tRNA-His 在 T Ψ C 臂上存在 4 对碱基, 其他为 5 对。D 臂: tRNA-Ile 只有 1 对碱基, tRNA-Gly、tRNA-Leu、tRNA-Tyr、tRNA-Leu2、tRNA-Thr、tRNA-Gln 和 tRNA-Val 为 3 对碱基, 其他均为 4 对。反密码子臂: tRNA-Pro 存在 1 对碱基错配, tRNA-Lys、tRNA-Asp、tRNA-Ser、tRNA-Tyr 的反密码子臂存在 4 对碱基, 其他 tRNA 为 5 对。



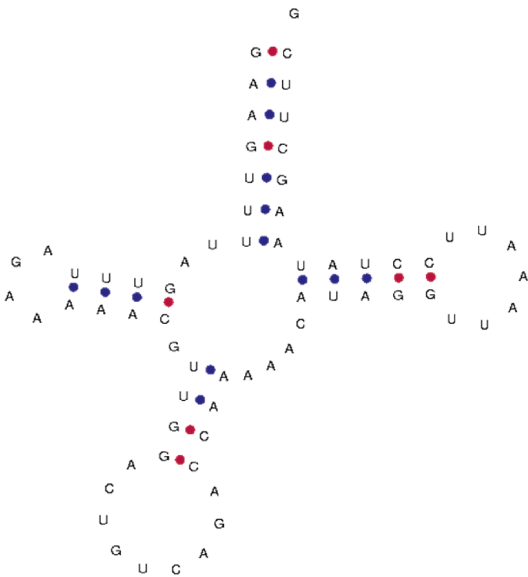
mitomaker.tRNA8 Cys (GCA) 16.7 bits



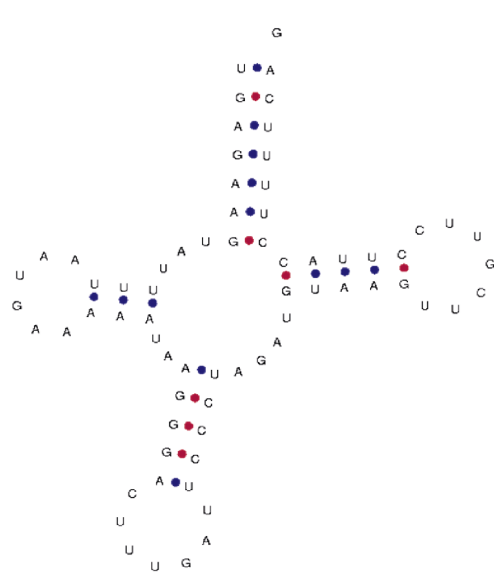
mitomaker.tRNA11 Cly (TCC) 32.6 bits



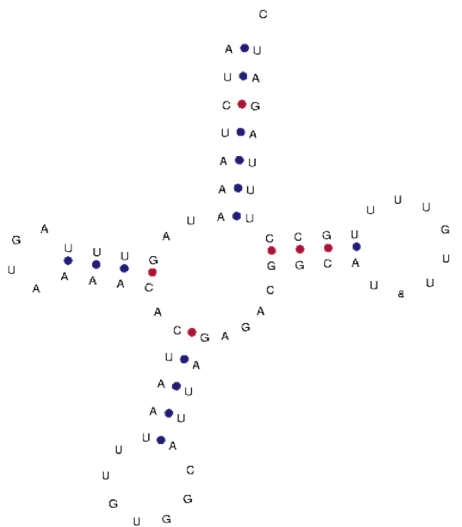
mitomaker.tRNA18 Asp (GTC) 51.1 bits



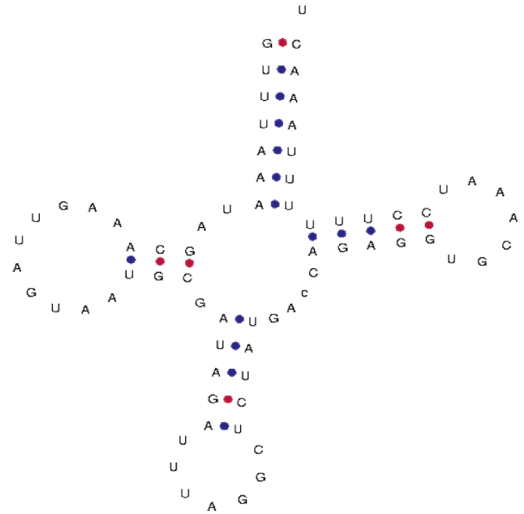
mitomaker.tRNA21 Gln (TTG) 44.9 bits



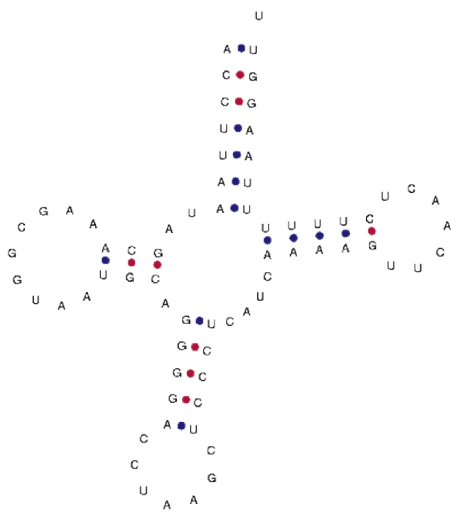
mitomaker.tRNA16 His (GTG) 28.8 bits



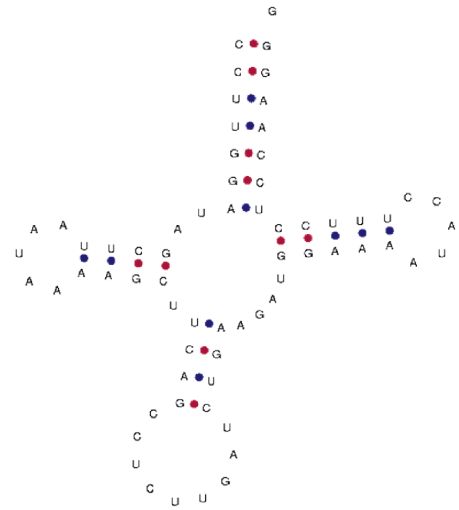
mitomaker.tRNA6 Leu (TAG) 55.4 bits



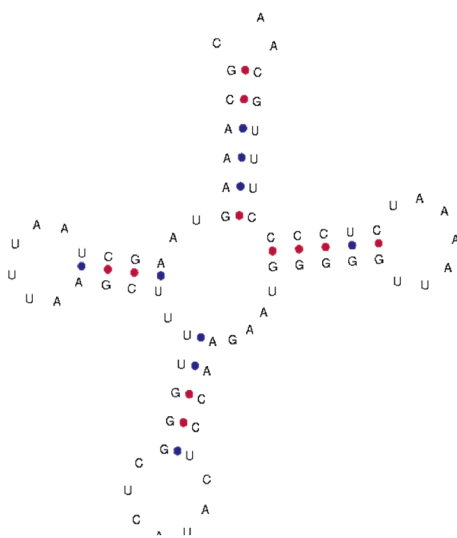
mitomaker.tRNA12 Leu (TAA) 53.3 bits



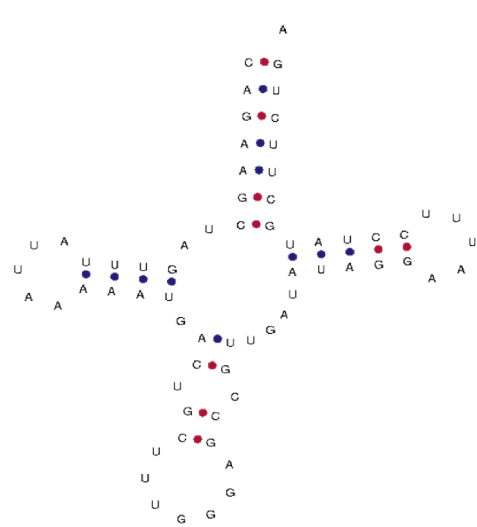
mitomaker.tRNA15 Lys (CTT) 25.6 bits



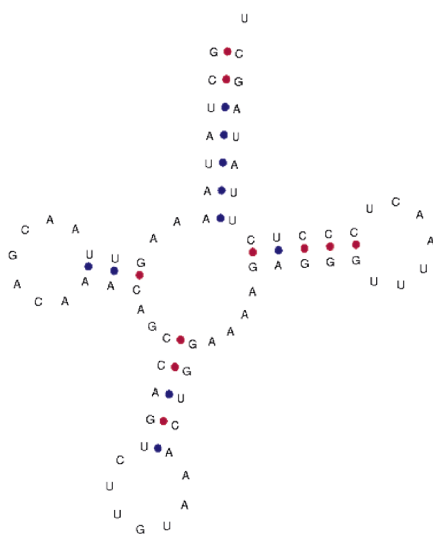
mitomaker.tRNA9 Met (GAT) 38.0 bits



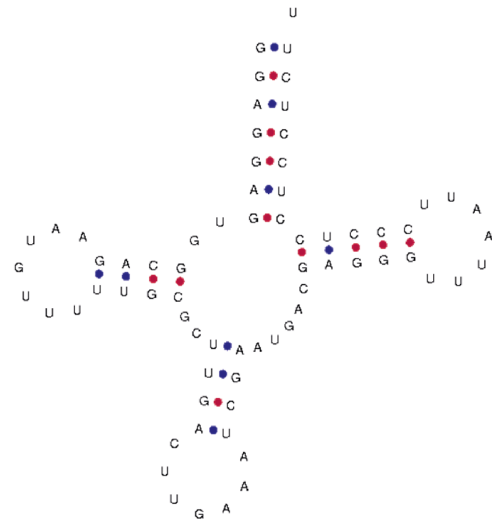
mitomaker.tRNA4 Pro (TGG) 20.2 bits



mitomaker.tRNA3 Thr (TGT) 43.5 bits



mitomaker.tRNA17 Ser (TGA) 52.5 bits



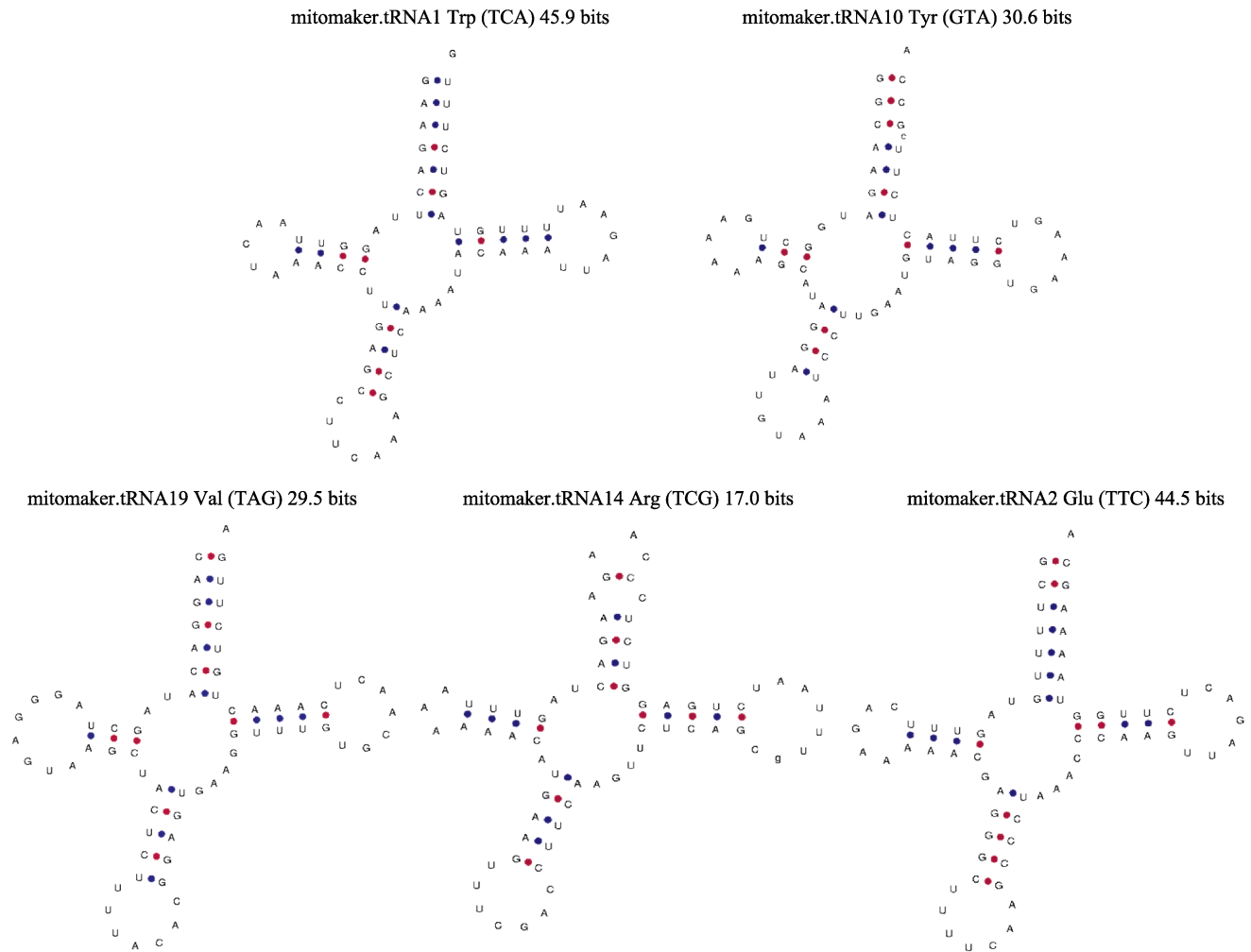


图 2 俄罗斯红参的 tRNA 的二级结构

Fig.2 The secondary structure of tRNA genes from Russian red sea cucumber

2.6 rRNA

俄罗斯红参线粒体全基因组中只存在 2 个 rRNA, 分别是位于 tRNA-Phe 与 tRNA-Glu 之间的 s-rRNA 和位于 tRNA-Ile 与 COX1 之间的 l-rRNA。s-rRNA 位于 H 链, 长度为 731 bp, 碱基 A、G、C 和 T 的含量分别为 37.76%、18.74%、18.74%和 23.12%, A+T 为 60.88%。l-rRNA 位于 H 链上, 长度为 1516 bp。碱基 A、G、C 和 T 的含量分别为 37.86%、19.92%、18.14%、24.08%, A+T 的含量为 61.94%。2 个基因的长度和位置不相同, 但对碱基的使用相似。

2.7 基因排列比较

从 NCBI 下载的动物线粒体编码蛋白基因顺序与所测俄罗斯红参序列对比(图 3), 发现这些物种间基因排列顺序有一定相似性。俄罗斯红参与海参纲(Holothuroidea)及海胆纲(Echinoidea)基因排列顺序相同, 海星纲(Asteroidea)与海百合纲(Crinoidea)中的

花形羽枝(*Florometra serratissima*)、栉羽星(*Phanogenia gracilis*)及蛇尾纲(Ophiuroidea)中的紫蛇尾(*Ophiopholis aculeata*)基因排列顺序相同, 白色真蛇尾(*Ophiura albida*)与灰色真蛇尾(*Ophiura lutkeni*)基因排列顺序相同。俄罗斯红参、海参纲、海胆纲与海星纲等相同基因排序的物种共享 COX1-ND4L-COX2-ATP8-ATP6-COX3-ND3-ND4-ND5-ND6-CYTB 基因模块, 与白色真蛇尾和灰色真蛇尾共享 COX1-ND4L-COX2-ATP8-ATP6-COX3-ND3-ND4-ND5-ND6 基因模块。几乎每个物种都与其他物种间共享某些特定模块, 最多为海百合(*Neogymnocrinus richeri*)与肉花柱头虫, 存在 ND1-COX1-COX2-ATP8-ATP6、COX3-ND3和 ND4-ND5共3个基因模块, 并与海星纲等相同基因排序物种共享 ND1-COX1、COX2-ATP8-ATP6、COX3-ND3-ND4-ND5-ND6-CYTB-ND2共3个基因模块, 剩余物种都同其他物种存在共享特定模块。

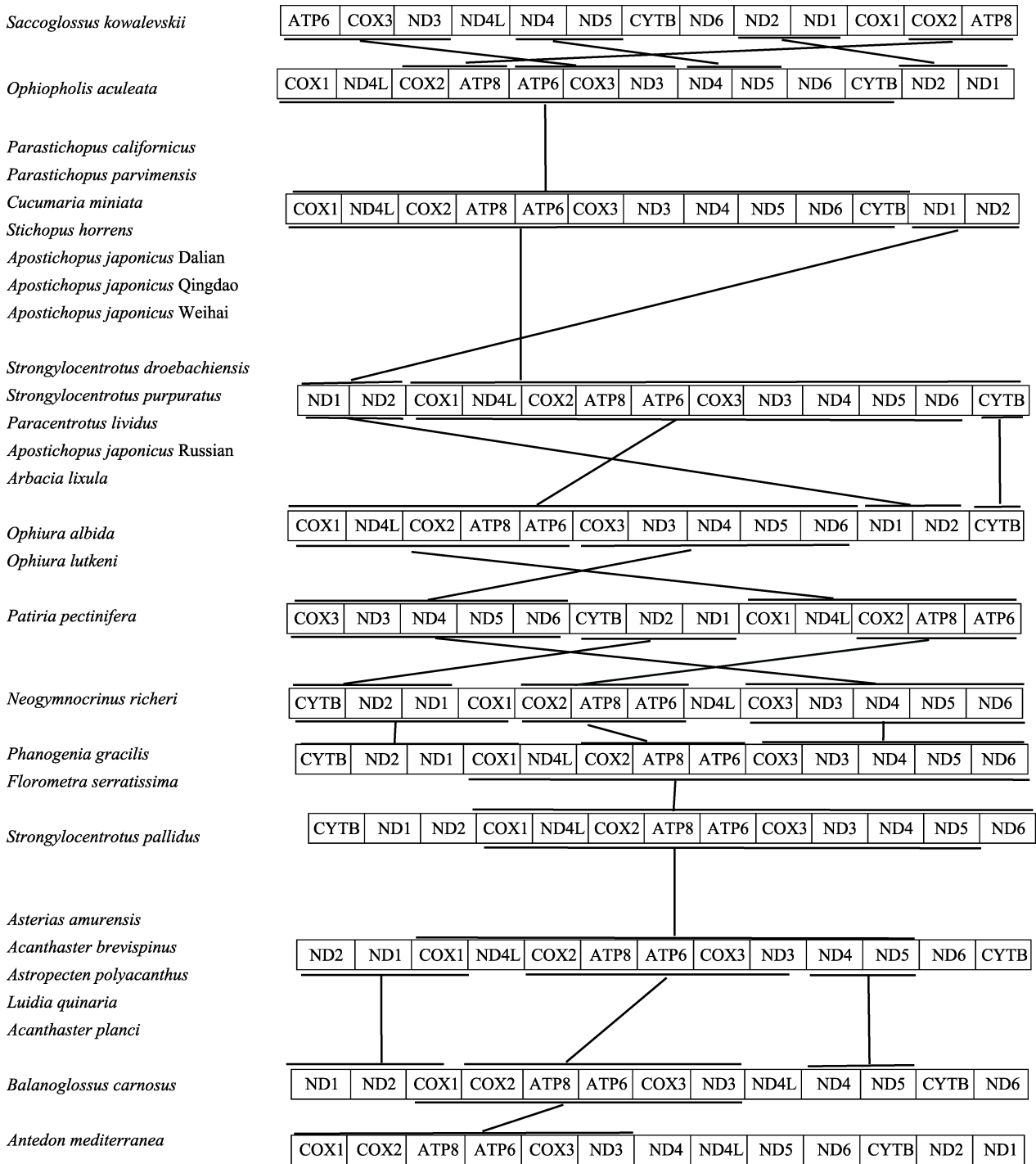


图 3 基因排列对比

Fig.3 Gene arrangement contrast

2.8 遗传距离

根据不同种类海参与不同地理分布刺参的线粒体核苷酸序列，利用 Mega 软件计算遗传距离，使用 Kimura-2-parameter 计算其遗传距离(表 5)。结果显示，俄罗斯红参与所选海参的遗传距离范围为 0.017~0.385，相较其他海参的遗传距离，俄罗斯红参与青

岛仿刺参、威海仿刺参和大连仿刺参间的遗传距离更为接近，分别为 0.017、0.019 和 0.021。

2.9 BLAST 分析

将俄罗斯红参线粒体全序列与 NCBI 上的物种比对(表 6)，结果显示，其与同名物种的相似率达 98% 以上，与同源性最高的仿刺参(GenBank 序列号：

表 5 不同海参核苷酸序列的遗传距离
Tab.5 Genetic distances of nucleotide sequences of different sea cucumbers

物种 Species	大连仿刺参 <i>A. japonicas</i> Dalian	具疣拟刺参 <i>P. parvimensis</i>	加州拟刺参 <i>P. californicus</i>	青岛仿刺参 <i>A. japonicas</i> Qingdao	叶瓜参 <i>C. miniata</i>	威海仿刺参 <i>A. japonicas</i> Weihai	糙刺参 <i>S. horrens</i>	俄罗斯红参 <i>A. japonicas</i> Russian
大连仿刺参 <i>A. japonicas</i> Dalian								
具疣拟刺参 <i>P. parvimensis</i>	0.117							
加州拟刺参 <i>P. californicus</i>	0.114	0.059						
青岛仿刺参 <i>A. japonicas</i> Qingdao	0.009	0.117	0.113					
叶瓜参 <i>C. miniata</i>	0.371	0.370	0.372	0.371				
威海仿刺参 <i>A. japonicas</i> Weihai	0.011	0.118	0.113	0.008	0.372			
糙刺参 <i>S. horrens</i>	0.377	0.378	0.382	0.375	0.393	0.376		
俄罗斯红参 <i>A. japonicas</i> Russian	0.021	0.128	0.124	0.017	0.385	0.019	0.385	

表 6 俄罗斯红参 BLAST 分析表
Tab.6 Analysis of on Russian red sea cucumber BLAST

GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	覆盖度 Query coverage (%)	相似度 Identity (%)	GenBank 序列号 Accession No.	物种 Species	覆盖度 Query coverage (%)	相似度 Identity (%)
AB525437.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.59	EU294194.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.34
FJ906623.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.57	FJ594968.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.29
MK216560.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.56	FJ986223.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.16
AB525760.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.50	MK208925.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.92
GU557148.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.48	KP170618.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.84
MK216561.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.46	KP170617.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.84
GU557147.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.46	FJ594967.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	98.56
KP170616.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.45	AB525762.1	<i>Parastichopus nigripunctatus</i>	100	97.40
AB525761.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.45	KP398509.1	<i>Parastichopus californicus</i>	99	90.12
FJ594963.1	<i>Apostichopus japonicus</i>	100	99.35	KU168761.1	<i>Parastichopus parvimensis</i>	99	89.76

AB525437.1)的相似性为 99.59%，存在 24 处碱基的插入与缺失(图 4)，突变的基因存在转换与颠换，其中，保守位点 16024 个，变异位点 81 个，变异位点约占分析位点的 0.5%。

2.10 系统发生分析

基于表 1 及俄罗斯红参的蛋白编码基因的氨基酸序列，利用最大似然法构建系统发生树(图 5)，结

果显示，海百合纲聚为一枝。俄罗斯红参与具疣拟刺参(*P.parvimensis*)聚为一枝，并与海参纲其他物种以及多棘槭海星(*Astropecten polyacanthus*)、蓝海燕(*Patiria pectinifera*)、灰色真蛇尾、紫蛇尾聚为一大枝。海星纲的长棘海星(*Acanthaster planci*)、棘冠海星(*Acanthaster brevispinus*)、砂海星(*Luidia quinaria*)、多棘海盘车(*Asterias amurensis*)与海胆科(*Temnopleuridae*)聚为一大枝。基于表 1 及俄罗斯红参的蛋白编码基因

```

Query 1086-1088 C-T 1055-1057 C-T 1392-1408 CTCCTTTATATAATACT
      ||          ||          |||  |||  |||
Sbjct 10834-10836 CTT 10844-10846 CTT 11142-11158 C-CC--CT-TCATA-T
Query 1632-1635 T--T 1651-1653 C-T 1800-1804 C--T
      ||          ||          |  |
Sbjct 11374-11377 TTAT 11393-11395 CTT 11545-11549 CTATT
Query 2104-2107 TTTA 2117-2124 CAAGTATA 5160-5162 G-A
      ||          |  ||          ||
Sbjct 11852-11855 T-A 11865-11872 C--A-A 14901-14903 GAA
Query 5461-5163 CAA 6206-6208 G-A
      ||          ||
Sbjct 15203-15205 C-A 15947-15949 GAA
    
```

图 4 BLAST 比对碱基的缺失与插入

Fig.4 Deletion and insertion of alignment bases by BLAST

Query 为俄罗斯红参序列, Sbjct 为参考序列
 Query is Russian red sea cucumber sequence,
 and Sbjct is the reference sequence

核苷酸序列, 利用最大似然法构建系统发生树(图 6), 结果显示, 俄罗斯红参与 3 个海域的仿刺参聚为一枝, 这 4 种海参再与海参纲的其他物种聚为一大枝, 并与海百合纲 4 个物种构成姊妹群。海星纲与海胆纲构成姊妹群。蛇尾纲聚为一枝。

3 讨论

本研究通过高通量测序技术对俄罗斯红参的线粒体基因组进行随机测序并分析, 利用线粒体序列进行系统发生分析, 结果发现, 俄罗斯红参与棘皮动物门下的其他动物存在较高的相似性, 均存在 37 个基因(13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 以及 22 个 tRNA 基因), 31 个基因编码在 H 链上, 5 个 tRNA (RNA-Gln、

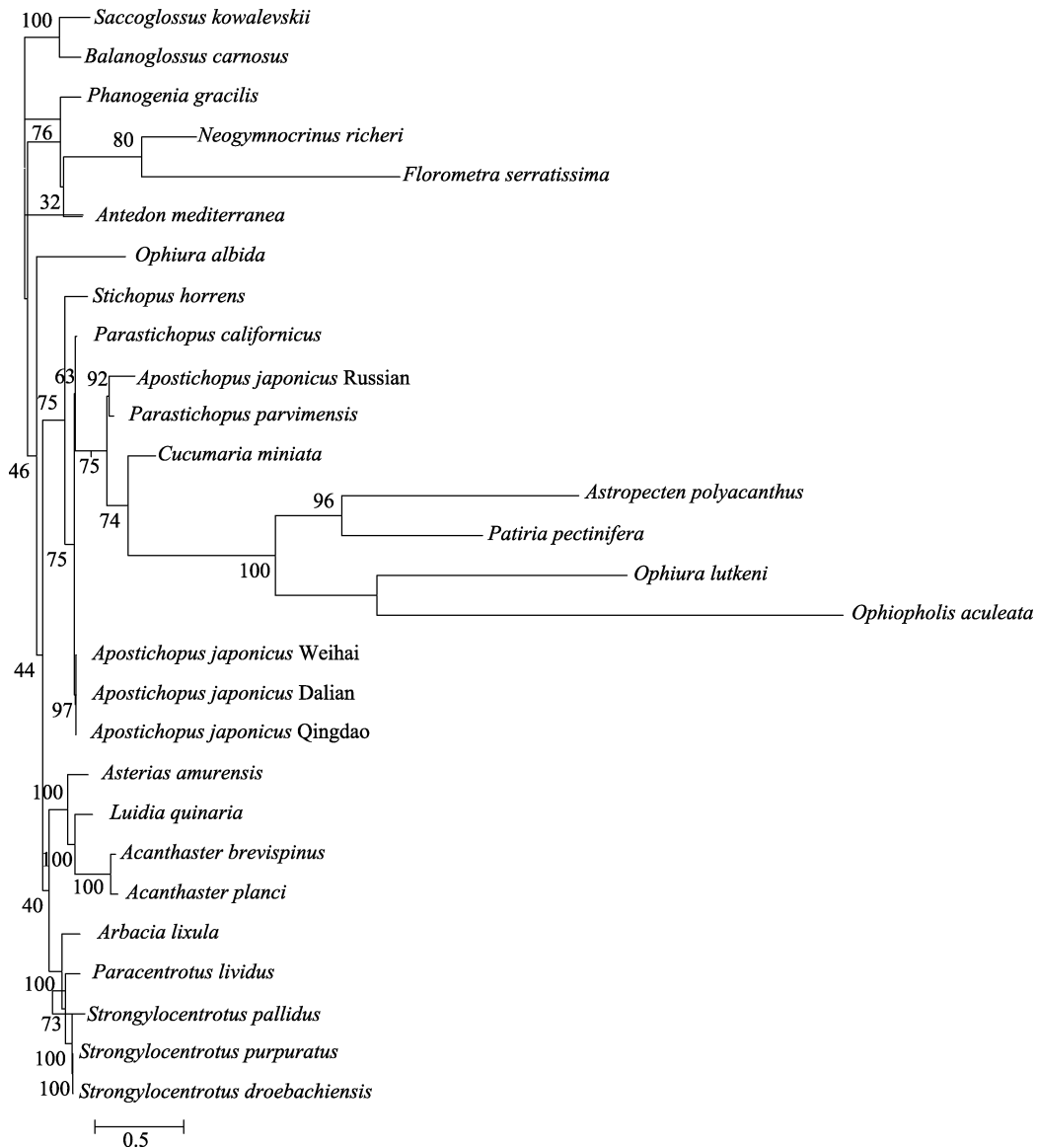


图 5 氨基酸序列基于最大似然法构建的系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of amino acid sequences based on maximum likelihood method

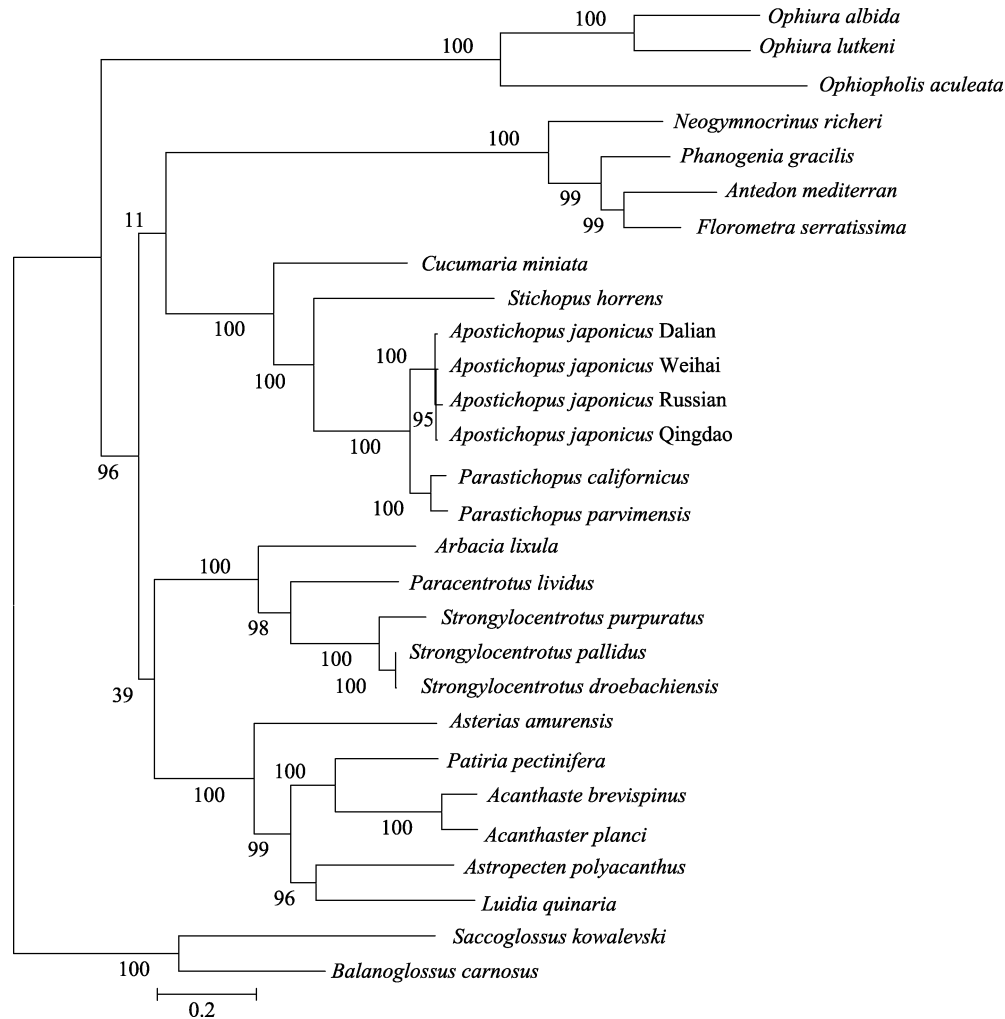


图 6 核苷酸序列基于最大似然法构建系统发生树

Fig.6 Phylogenetic tree of nucleotide sequences based on maximum likelihood method

tRNA-Ala、tRNA-Val、tRNA-Asp 和 tRNA-Ser) 和 1 个蛋白编码基因(ND6)编码在 L 链上。基因的组成与分布情况均与孙秀俊(2013)所研究的刺参完全相同。全序列与蛋白编码基因的 A、T 碱基含量同大部分后生动物一样存在 A、T 偏向性(付婉莹, 2015), 分别为 61.96%与 61.37%, 且同脊椎及无脊椎动物的 mtDNA 蛋白编码基因的第 3 位点也存在明显的 A、T 偏向性, 但碱基的含量存在差异, A、T 含量因物种的差异略有不同。

俄罗斯红参的 13 个蛋白编码基因的密码子使用分析表明, 除 ND1 以 GTG 为起始密码子外, 其他均以 ATN 为起始密码子。终止密码子与大连仿刺参(李云峰等, 2012)相同, 均为完整密码子, 大多以 TAA 为主。基因重叠区与基因间隔区同糙刺参(*Stichopus horrens*)(范嗣刚等, 2011)及某些水产动物线粒体相似(李亚莉, 2012; 袁亮等, 2015)。22 个 tRNA 中除 tRNA-Ser 外, 其余的 tRNA 均能预测其三叶草结构,

这同魏峦峦等(2011)研究的瘤背石磺(*Onchidium struma*) tRNA 一样, 都是由于缺少 D 臂而无法预测其结构, Cheng 等(2012)证明了缺失 D 臂并不会影响其进入核糖体及转运氨基酸等功能; 相比细胞质中 tRNA, 线粒体中的 tRNA 存在差异, 在受体臂与反密码子臂等部分均有碱基错配的情况。此外, 俄罗斯红参的 tRNA(tRNA-Cys、tRNA-Trp、tRNA-Ala、tRNA-Leu 和 tRNA-Asn)同某些后生动物一样, 均出现簇集现象, 即几个 tRNA 集中在一起的现象。tRNA 的重复与闫锦锦(2014)所研究的光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)相同, 皆存在 tRNA-Ser 与 tRNA-Leu 基因重复 1 次。俄罗斯红参的 2 个 rRNAs (s-rRNA 和 l-rRNA)及位置均与申欣等(2011)研究的威海仿刺参和范嗣刚等(2011)研究的糙刺参相同。线粒体基因组排列顺序在研究系统进化关系等方面起着重要作用(李石磊等, 2015), 俄罗斯红参线粒体编码基因的排列与大部分棘皮动物具有一定相似性, 且

与其他物种共享基因模块。

线粒体基因组数据广泛应用于系统进化生物学、保护生物学及种质鉴定等领域的研究,如利用线粒体基因组中的 CO I 及 16S rRNA 进行分子标记对海参品种及产品进行鉴别(Wen *et al.*, 2013)。An 等(2013)对韩国红海参野生种群与养殖种群进行微卫星位点多重分析,发现两种种群间存在高水平的多态性及遗传异质性。本研究通过对所选海参的核苷酸序列进行遗传距离分析,发现俄罗斯红参与 3 个海域的仿刺参较为接近,与青岛仿刺参遗传距离最近,为 0.017。将俄罗斯红参的线粒体全序列进行 BLAST 分析,与仿刺参(GenBank 序列号: AB525437.1)的相似度为 99.59%。基于 28 个物种的编码蛋白基因的氨基酸及核苷酸序列,利用最大似然法分别构建系统发生树,结果发现,2 种方法所建的发生树有一定相似性,但在俄罗斯红参与其他海参聚簇上存在差异。在利用核苷酸构建的系统发生树中,俄罗斯刺参与 3 个海域的仿刺参聚支的节点的自展值(bootstrap 值)都在 95%以上,具有较高可信性;利用氨基酸构建系统发生树在较远距离的系统进化分析中更具有优势和可信性。通常考虑这 2 种序列的进化信息,才可能得到更自然的系统发生关系,本研究中核苷酸序列建树结果与传统分类学更为相似。

目前,利用物种线粒体全基因组序列的测定与分析已成为研究物种进化必不可少的手段,广泛应用于各个领域。通过对线粒体基因组的比对和分析,为种质鉴定、地理种群划分和亲缘关系鉴定等提供基础信息。本研究对引入养殖的俄罗斯红参线粒体全基因组进行随机测序,分析发现,其基因结构、碱基含量、密码子、tRNA、rRNA、基因间隔与重叠、组成排列等皆与棘皮动物相似;遗传距离及 BLAST 分析发现,俄罗斯红参与仿刺参较为接近。本研究中,俄罗斯红参为引入养殖,作为刺参的地理远缘种,其遗传特点、结构等方面与仿刺参差异较小,具有较高相似性。本研究可为引入养殖俄罗斯红参进一步的遗传系统进化和分类等研究提供资料,同时,对后续俄罗斯红参养殖的推广发展和种质创新与应用提供参考。

参 考 文 献

- Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2104-2105
- An HS, Lee JW, Hong SW, *et al.* Genetic differences between wild and hatchery populations of red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) inferred from microsatellite markers: Implications for production and stocking programs design. *Genes and Genomics*, 2013, 35(6): 709-717
- Cheng Y, Wang R, Sun Y, *et al.* The complete mitochondrial genome of the small yellow croaker and partitioned Bayesian analysis of Sciaenidae fish phylogeny. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(1): 191-199
- Cui Z, Liu Y, Lic P, *et al.* The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*, 2009, 432(1-2): 33-43
- Fan SG, Hu CQ, Wen J, *et al.* Mitochondrial genome of *Stichopus horrens* and a new genetic sequence. *Scientia Sinica (Vita)*, 2011, 41(4): 281-288 [范嗣刚, 胡超群, 文菁, 等. 糙刺参(*Stichopus horrens*)线粒体基因组及一种新的基因排列顺序. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(4): 281-288]
- Fu WY. The study on microstructure of spines from four sea urchins and phylogenetic based on complete mitochondrial genome. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [付婉莹. 四种海胆棘的显微结构和基于线粒体基因组全序列的系统发育学研究. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2015]
- Guan CX, Diao QP, Hou DY, *et al.* Study on fatty acids in Russian sea cucumbers by GC-MS. *Journal of Anshan Normal University*, 2015, 17(4): 33-35 [关崇新, 刁全平, 侯冬岩, 等. 俄罗斯海参脂肪酸的气相色谱-质谱分析. *鞍山师范学院学报*, 2015, 17(4): 33-35]
- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98
- Kang LS. Phylogenetic analysis of the family Loliginidae based on complete mitochondrial sequences. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2018 [康立森. 基于 mtDNA 全基因组探究枪乌贼科的系统发生关系. *浙江海洋大学硕士研究生学位论文*, 2018]
- Li SL, Zhang M, Wang QZ, *et al.* Gene order, characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes in sixteen members in Annelida. *Fisheries Science*, 2015, 34(2): 104-112 [李石磊, 张明, 王庆志, 等. 16 种环节动物线粒体基因排列、特征比较及系统发育分析. *水产科学*, 2015, 34(2): 104-112]
- Li YF, Li MY, Wang J, *et al.* Comparative structure of complete mitochondrial genome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2012, 31(8): 454-462 [李云峰, 李梦遥, 王健, 等. 仿刺参线粒体全基因组序列结构及比较研究. *水产科学*, 2012, 31(8): 454-462]
- Li YL. Mitochondrial complete genome determination and molecular evolution analysis of three Schizothoracinae in Qinghai-Tibet Plateau. Doctoral Dissertation of Fudan University, 2012 [李亚莉. 青藏高原三种裂腹鱼线粒体全基因组的测定及分子进化分析. *复旦大学博士研究生学位论文*, 2012]
- Qu HX, Liu XT, Yang YN. Problems and countermeasures in the development of sea cucumber industry. *Agriculture and Technology*, 2016, 36(22): 138 [曲洪霞, 刘心田, 杨燕妮. 刺参产业发展存在的问题及应对措施. *农业与技术*, 2016,

- 36(22): 138]
- Shen X, Tian M, Cheng HL, *et al.* Characteristics and exploration of molecular markers in Holothuroidea mitochondrial genomes. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 400–404 [申欣, 田美, 程汉良, 等. 海参纲线粒体基因组特征分析及分子标记探讨. *水产科学*, 2011, 30(7): 400–404]
- Sun XJ. Studies on larval development and genetics and breeding in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [孙秀俊. 刺参的幼体发育与遗传育种学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Wei LL, Shen HD, Zhang Y, *et al.* Analysis of complete mitochondrial genome of *Onchidium struma* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Onchidiidae). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(4): 493–500 [魏峦峦, 沈和定, 张雨, 等. 瘤背石磺线粒体基因组全序列分析. *水产学报*, 2011, 35(4): 493–500]
- Wen J, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* Corrigendum to “Genetic identification of global commercial sea cucumber species on the basis of mitochondrial DNA sequences”. *Food Control*, 2011, 22: 72–77
- Yan JJ. Sequence and organization of *Acrossocheilus fasciatus* and *Zacco platypus* complete mitochondrial genome. Master’s Thesis of Anhui Normal University, 2014 [闫锦锦. 光唇鱼和宽鳍鱲线粒体全序列测定及分析. 安徽师范大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Yuan L, Li WY, Ye XF, *et al.* Analysis of population genetic diversity of *Ranodon sibiricus* in China inferred from mitochondrial DNA control region. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2015, 54(2): 194–198 [袁亮, 李伟业, 叶小芳, 等. 基于线粒体 DNA 控制区的新疆北鲎种群遗传多样性分析. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2015, 54(2): 194–198]
- Zhao NN. Cryptic species of China *Coelomactra antiqvata* based on complete mitochondrial genomic evidence. Master’s Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 [赵娜娜. 中国西施舌隐种的线粒体全基因组证据. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2013]

(编辑 冯小花)

Structure and Analysis of Mitochondrial Sequences of Introduced Russian Red Sea Cucumber

ZHAO Qiang^{1,2#}, YANG Shuang^{2,4#}, LIU Xintian³, SUN Guohua^{2①},
FENG Yanwei², WANG Weijun², YANG Jianmin²

(1. Yantai Institute of Marine Economy, Yantai 264003; 2. College of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025;

3. Weihai Fisheries Technology Extension Station, Weihai 264200;

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

Abstract The whole genome of Russian red sea cucumber mitochondria introduced into culture was randomly sequenced and analyzed by high-throughput sequencing. The results show that the genome is 16,111 base pairs (bp) in length, and contains 37 genes, including 22 tRNA, 2 rRNA (l-rRNA, s-rRNA), and 13 protein-coding genes. There are 24 gene-spacing and 5 gene-overlap regions; both the protein-coding gene and the full-sequence pair base exhibit an A and T bias; the highest frequency of amino acid coding is Ser, followed by Leu; and the codon is complete, except ND1 with GTG as the starting codon and the others with ATN as the starting codon. Most termination codons are TAA, but the termination codons of ND2 and ND4 are TTG and TAG, respectively; The length of tRNA ranges from 66 to 72 bp, two genes are duplicated, and 21 genes predict their clover structure. The length and position of l-rRNA and s-rRNA are different, and the use of bases is similar. The gene arrangement of the protein-coding gene is the same as that of Holothuroidea and Echinoidea, and gene models are shared with Asteroidea and Ophiuroidea. A genetic distance analysis shows that the Russian red sea cucumber is closest to *Apostichopus japonicus* from three habitats. A BLAST analysis shows that Russian red sea cucumbers have the highest homology with *A. japonicus*. A phylogenetic tree was constructed based on the maximum likelihood method and the amino acid and nucleotide sequences, which provides a theoretical basis for subsequent genetic research of Russian red sea cucumbers.

Key words Russian red sea cucumber; Mitochondrial genome; Phylogenetic

① Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh_smile@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190703003

http://www.yykxjz.cn/

朱凯, 张立川, 肖楚源, 陈新军, 林东明, 朱俊磊. 南海鸢乌贼微型群雌性个体繁殖力研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 140-148

Zhu K, Zhang LC, Xiao CY, Chen XJ, Lin DM, Zhu JL. Characterizing fecundity of dwarf form of female purple flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in the South China Sea. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 140-148

南海鸢乌贼微型群雌性个体繁殖力研究*



朱凯¹ 张立川¹ 肖楚源¹ 陈新军^{1,2} 林东明^{1,2①} 朱俊磊¹

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

摘要 根据2017年灯光罩网船在南海海域采集的鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)微型群雌性样本, 进行繁殖力特性的测定分析。结果显示, 南海鸢乌贼微型群雌性个体潜在繁殖力为1218~32843 cell, 卵巢卵母细胞数为1178~30397 cell, 输卵管成熟卵子数为113~2904 cell。相对繁殖力为48.93~842.12 cell/g, 总体潜在繁殖投入指数为0.005~0.213。潜在繁殖力与胴长呈幂函数关系, 与体重呈线性相关关系。相对繁殖力与胴长呈指数函数关系, 与体重呈线性相关关系。潜在繁殖投入指数与胴长和体重均呈线性相关关系。产卵繁殖期, 雌性个体的分批繁殖力为1895~2904 cell, 产卵批次为6~15, 平均值为9.87±4.36。卵巢卵母细胞的卵径范围为0.17~0.99 mm, 均值为(0.51±0.14) mm, 不同性腺成熟度之间的卵径存在显著性差异($P<0.05$)。Ⅲ~Ⅵ期的卵巢卵母细胞卵径大小均呈单峰值区间分布, 随性腺发育峰值区间呈前移趋势, Ⅲ~Ⅳ期时峰值区间为0.35~0.60 mm, Ⅴ~Ⅵ期为0.40~0.75 mm。输卵管成熟卵子的卵径为0.50~1.08 mm。研究表明, 南海鸢乌贼微型群雌性个体繁殖力随个体生长发育呈增长趋势, 卵巢卵母细胞为批次发育成熟, 产卵活动为分批次产卵。

关键词 鸢乌贼; 繁殖力; 微型群; 多次产卵; 南海

中图分类号 Q958.8 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0140-10

鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)为暖水性较强的大洋性种类, 为重要的头足类渔业捕捞对象, 主要有4个渔场: 琉球群岛渔场、台湾西南渔场、亚丁湾渔场和印度洋西北海域渔场(陈新军等, 2009)。鸢乌贼在南海的资源量丰富, 具有较大开发潜力(Jereb *et al*, 2005; 张俊等, 2014), 尤其在金乌贼(*Sepia esculenta*) (李达等, 2017)等沿海渔业资源衰退的背景下更具开发价值。在声学调查中发现, 不同季节的南海鸢乌贼资源量波动明显, 该种群资源的变动机制既与栖息地的洋流、海水温度、营养丰度等相

关(陈新军等, 2005), 也受其自身的繁殖特性和洄游习性等内在机理的影响调节(Stearns, 1992; McGraw *et al*, 1996)。同时, 鸢乌贼在南海生态系统中占据着重要位置, 既是多种浮游动物和小型游泳动物的捕食者, 也是多种大型游泳动物的饵料来源, 起着连接低营养级和高营养级的桥梁作用(Wormuth, 1976; Wetherall, 1991; Ménard *et al*, 2007)。鸢乌贼主要存在5个群体, 其中, 微型群主要分布于赤道海域(Nesis, 1977), 在南海和印度洋海域均有分布。

繁殖是生物体生活史的关键阶段, 了解每个物种

* 国家自然科学基金(41276156; 41876144)和上海市自然科学基金(16ZR1415400)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41276156; 41876144), and Natural Science Foundation of Shanghai (16ZR1415400)]. 朱凯, E-mail: zhukaid@126.com

① 通讯作者: 林东明, E-mail: dmlin@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-07-03, 收修改稿日期: 2019-08-23

的生殖特征是揭示其整个生命周期的关键(王腾等, 2013; 滕广亮等, 2018)。头足类(除鸚鵡螺属外)寿命短、终生 1 次繁殖, 其产卵策略具有很高的属种特殊性和环境适应性(Nigmatullin *et al*, 2009)。鸢乌贼的交配活动发生于海表面, 以抱头式的方式完成(童逸修, 1976), 卵巢中的卵母细胞数量巨大, 输卵管 1 次储存的卵子并不能将其全部排出(Harman *et al*, 1989), 而是分批次排出。1 个产卵周期的卵子可能以众多卵块的形式排出(Chembian, 2013)。繁殖力作为产卵策略的重要性状之一, 决定着补充群体的大小, 是种群资源评估的关键参数(Stearns, 1992; McGraw *et al*, 1996)。目前, 关于南海鸢乌贼的研究, 多集中在资源评估(Jereb *et al*, 2005; 张俊等, 2014)、渔场环境(范江涛等, 2016)、摄食生态(颜云榕等, 2012; 龚玉艳等, 2016、2018)、种群结构(张鹏等, 2015)和生长发育(招春旭等, 2017)等方面, 个体繁殖力及卵母细胞发育模式方面的研究则鲜有报道。本研究根据 2017 年在我国南海海域采集的鸢乌贼样本, 进行微型群雌性个体的繁殖力研究, 分析该群体的潜在繁殖力、分批繁殖力、卵母细胞大小及其发育成熟模式, 以期探索其产卵策略, 进一步丰富鸢乌贼的繁殖生物学研究, 为可持续开发和管理南海鸢乌贼资源提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本研究的鸢乌贼样本采自我国南海海域作业的灯光罩网船渔获物(111°15'36"~115°52'12"E, 9°11'16"~11°22'55"N); 采集时间为 2017 年 6~7 月。样本采集后, 经 -20℃ 冷冻保藏运回实验室。

1.2 生物学测定

样本在实验室常温解冻后, 进行胴长(Mantle length, ML)、体重(Body weight, BW)、卵巢重、输卵管重、性腺成熟度等生物学测定。长度测定精确到 1 mm, 重量测定精确到 0.1 g。性腺成熟度划分参照林东明等(2014), 结合实验样本观察, 划分为 I~VIII 共 8 个时期, 其中, I 和 II 期为发育前期, 卵巢呈现透明或白色; III 期为生理性发育期, 卵巢中可见颗粒状的卵母细胞; IV~VI 期为成熟期, 卵巢发育显著, 输卵管积聚成熟卵子; VII 期为排卵期, 卵巢膨大, 鳃基部可见精英, 缠卵腺灰白变软; VIII 期为排卵后期, 卵巢松软萎缩, 可见少量卵母细胞附着于中央组织。本研究共分析微型群雌性样本 84 尾, 各成熟度尾数

分别为 I 期 18 尾、II 期 45 尾、III 期 3 尾、IV 期 5 尾、V 期 9 尾、VI 期 4 尾。

本研究随机选取性腺成熟度为 III~VI 期雌性个体 21 尾(III 期 3 尾、IV 期 5 尾、V 期 9 尾、VI 期 4 尾), 进行繁殖力分析。繁殖力的测定采用重量比例法(陈新军等, 2017)。卵巢卵母细胞测定: 卵巢整体称重后, 随机剪取部分卵巢组织(中部位置), 称重(约 100 mg), 并计数卵母细胞, 用于换算整体卵巢的卵母细胞数量。输卵管成熟卵子测定: 性腺成熟度为 IV 期样本的输卵管饱满程度不高, 进行输卵管卵子的整体计数; 性腺成熟度为 V~VI 期样本, 整体称量输卵管重量后, 称取一定量的卵团(约 100 mg), 计数卵子, 用于换算整体输卵管的卵子数量。卵巢卵母细胞或输卵管卵子数量的换算公式为:

$$N=n \times W/w$$

式中, N 为卵巢卵母细胞或输卵管成熟卵子的总数量; W 为卵巢总重或输卵管总重; w 为选取的部分卵巢重量或输卵管卵团重量; n 为选取部分卵巢组织的卵母细胞数或选取部分输卵管卵团的成熟卵子数。

单个成熟卵子重量为输卵管取样重与其卵子数量的商。

卵径的测定: 计数后, 卵巢卵母细胞或输卵管成熟卵子置于培养皿中, 加入 0.9% 生理盐水, 并用铁针将其分离开来, 然后, 置于解剖显微镜(1~6 倍)下, 用相配套的 Digimizer Image Analysis 软件拍照, 并测量卵子直径, 测量精确度为 0.01 mm。

1.3 数据分析

鸢乌贼潜在繁殖力(Potential fecundity, PF)为卵巢卵母细胞数目和输卵管成熟卵子数目之和, 单位为 cell。相对繁殖力(Relative fecundity, RP)为潜在繁殖力与相应个体体重的商数, 单位为 cell/g。潜在繁殖投入指数(Index of potential reproduction investment, PRI)为相对繁殖力与相应个体单个成熟卵子重量的乘积(Laptikhovskiy *et al*, 1992; Nigmatullin *et al*, 1995; Gonzalez *et al*, 1996)。批次排卵量计算为性腺成熟 VI 期时输卵管的成熟卵子数量(Harman *et al*, 1989), 单位为 cell; 并计算批次排卵量与潜在繁殖力的商数, 作为潜在的排卵次数。

利用线性、幂函数和指数等函数分别拟合潜在繁殖力、相对繁殖力、潜在繁殖投入指数 3 项与胴长、体重的关系, 选择拟合 R^2 值最高者作为最终的拟合函数。卵巢卵母细胞的大小分布, 以 0.05 mm 为组距来确定卵巢卵母细胞的分布特征及其生长发育模式。

数据采用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 软件进行

分析。

2 结果

2.1 潜在繁殖力和分批繁殖力

分析显示,南海鳶乌贼微型群雌性个体的潜在繁殖力为1218~32843 cell,平均值为(6487±8527) cell。随着性腺发育,个体的潜在繁殖力增加显著(ANOVA: $F=20.172$, $P<0.01$),在Ⅵ期达到最大值,为(21919±9004) cell(表1)。其中,随着性腺发育,卵巢卵母细胞数量增加显著(ANOVA: $F=16.09$, $P<0.01$),在Ⅵ期时达到最值为(19629±9045) cell,占潜在繁殖力的(87.41±5.64)%。Ⅳ~Ⅵ期的输卵管成熟卵子数为113~2904 cell,占潜在繁殖力的4.09%~22.33%;成熟后期输卵管载卵量增加迅速(ANOVA: $F=98.43$, $P<0.01$)。根据成熟后期(Ⅵ期)个体的输卵管载卵量,微型群繁殖产卵批次为6~15次,平均为(9.87±4.36)次;批次排卵量为1895~2904 cell,占潜在繁殖力的

16.45%~6.69%,平均占比为10.13%。

随着个体的生长,微型群雌性个体的潜在繁殖力也逐步增大,与胴长和体重分别呈幂函数和线性函数关系($PF=8.578e^{-23}ML^{12.926}$, $R^2=0.909$; $PF=986.1BW-20512$, $R^2=0.775$)(图1),表明,潜在繁殖力与个体大小呈正相关关系。

2.2 相对繁殖力

微型群雌性个体相对繁殖力为48.93~842.12 cell/g,平均值为(195.38±188.35) cell/g(表2)。随着性腺的发育,个体相对繁殖力呈上升趋势(ANOVA: $F=21.77$, $P<0.01$),生理发育期(Ⅲ期)为48.93~66.16 cell/g,平均值为(56.02±7.35) cell/g。性腺成熟期(Ⅳ~Ⅵ期)为63.87~842.12 cell/g,平均值为(218.60±193.91) cell/g,在Ⅴ~Ⅵ期相对繁殖力增加显著(Tukey HSD: $P=1.00$)。在个体生长过程中,相对繁殖力与个体胴长呈指数函数关系($RF=0.026e^{0.090ML}$, $R^2=0.770$),与个体体重呈线性相关关系($RF=19.61BW-341.7$, $R^2=0.629$)(图2)。

表1 南海鳶乌贼微型群雌性个体不同性腺成熟度个体的潜在繁殖力
Tab.1 The potential fecundity (PF, cell) between different maturity stages of dwarf form of *S. oualantiensis* in the South China Sea

性腺成期 Maturity stages	尾数 Sample size (ind.)	胴长 Mantle length (mm)	潜在繁殖力 Potential fecundity (cell)		
			数量 Counting	卵巢卵母细胞数 Number of ovarian oocyte	输卵管卵子数 Number of oviduct egg
Ⅲ	3	86~95	1348±96 (1218~1449)	1348±96 (1218~1449)	—
Ⅳ	5	82~114	2224±681 (1405~3006)	2018±726 (1218~1449)	206±63 (113~300)
Ⅴ	9	88~102	3709±955 (2227~5480)	3153±926 (1777~4773)	557±120 (434~707)
Ⅵ	4	98~114	21919±9004 (11517~32843)	19629±9045 (9622~30397)	2290±418 (1895~2904)
总计 Total	21	86~114	6487±8527 (1218~32843)	5763±7858 (1178~30397)	844±816 (112~2904)

注:数据表示为平均值±标准差,小括号内为数据范围

Note: Data represented as mean±SD, and range indicated in the bracket

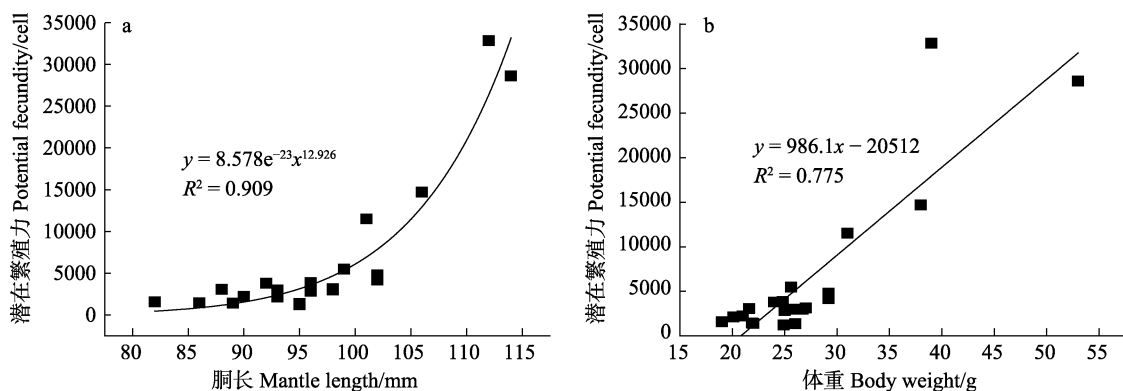


图1 南海鳶乌贼微型群雌性个体潜在繁殖力与胴长(a)和体重(b)的关系
Fig.1 Relationship between potential fecundity and dorsal mantle length (a) and body weight (b) of dwarf form of *S. oualantiensis* in the South China Sea

表 2 南海鸢乌贼微型群雌性个体不同性腺成熟度个体的相对繁殖力
Tab.2 The relative fecundity (RF, cell/g) between different maturity stages of dwarf form of *S. oualaniensis* in the South China Sea

性腺成熟期 Maturity stages	尾数 Sample size (ind.)	最小值 Min (cell/g)	最大值 Max (cell/g)	平均值 Mean (cell/g)	标准差 SD
III	3	48.93	66.16	56.02	7.35
IV~VI	18	63.87	842.12	218.60	193.91
总计 Total	21	48.93	842.12	195.38	188.35

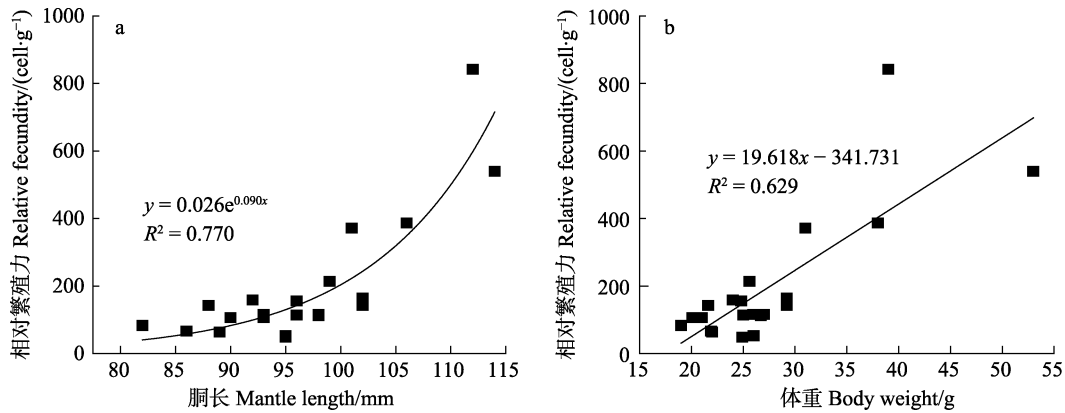


图 2 南海鸢乌贼微型群雌性个体相对繁殖力与胴长(a)和体重(b)的关系
Fig.2 Relationship between the relative fecundity and mantle length (a) and body weight (b) of dwarf form of *S. oualaniensis* in the South China Sea

2.3 潜在繁殖投入指数

微型群雌性个体的潜在繁殖投入指数见表3。从表3可以看出, 性腺成熟期为0.005~0.213, 平均值为0.055±0.048。随着性腺发育, 个体的潜在繁殖投入指数也随之增加(ANOVA: $F=29.63, P<0.05$)。根据检验, 潜在繁殖投入指数在IV~V期无显著差异(Tukey HSD: $P=0.17$), 之后增加迅速(Tukey HSD: VI期为 $P<0.05$)。同时, 个体的潜在繁殖投入指数与胴长和体重的关系分别符合幂函数和线性函数模型($PRI=1.983e^{-19} ML^{8.721}, R^2=0.609$; $PRI=0.0047BW-0.0749, R^2=0.609$)(图3)。表明, 在个体生长发育过程中, 其潜在繁殖投入指数呈增长趋势。

2.4 卵巢卵母细胞和输卵管成熟卵子的卵径大小

研究发现, 卵巢卵母细胞的卵径范围为0.17~0.99 mm, 平均值为(0.51±0.14) mm。不同性腺成熟度之间, 卵巢卵母细胞的卵径存在显著差异(ANOVA: $F=10.68, P<0.01$)(图4)。其中, 生理发育期(III期)的卵巢卵母细胞最小(Tukey HSD, $P<0.05$), 卵径为0.20~0.85 mm, 平均值为(0.49±0.12) mm; V期时卵巢卵母细胞最大(Tukey HSD, $P<0.05$), 卵径为0.23~0.99 mm, 平均值为(0.54±0.16) mm。

分析显示, 每个性腺成熟度(III~VI期)的卵巢卵母细胞大小均呈单峰值区间分布(图 5)。其中, III、IV期时的卵母细胞峰值区间均为 0.35~0.60 mm, III

表 3 南海鸢乌贼不同个体的潜在繁殖投入指数
Tab.3 The index of potential reproductive investment of dwarf form of *S. oualaniensis* in South China Sea

性腺成熟期 Maturity stages	尾数 Sample size (ind.)	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 SD
IV	6	0.005	0.054	0.029	0.016
V	8	0.016	0.066	0.039	0.016
VI	4	0.071	0.213	0.127	0.053
总计 Total	18	0.005	0.213	0.055	0.048

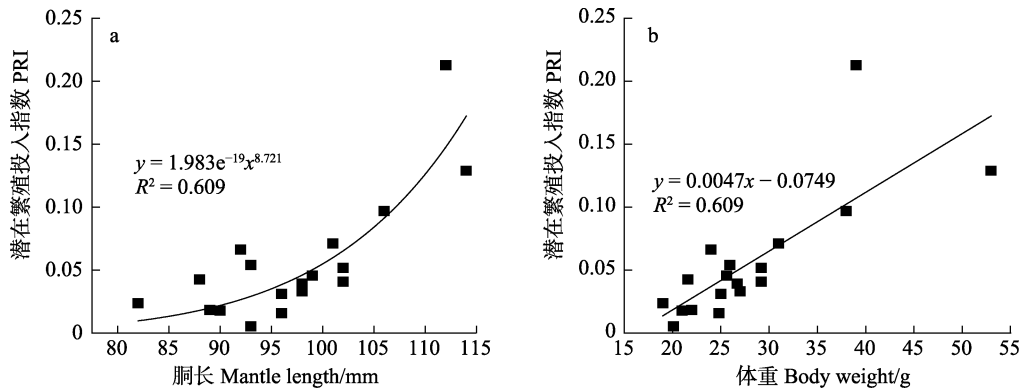


图3 南海鸢乌贼潜在繁殖投入指数与胴长(a)和体重(b)的关系

Fig.3 Relationship between the index of potential reproductive investment and mantle length (a) and body weight (b) of dwarf form of *S. oualaniensis* in the South China Sea

期时峰值区间内的卵母细胞数占比为 76.79%，IV期峰值区间内卵母细胞数占比为 68.05%；V、VI期的峰值区间均为 0.40~0.75 mm，V期时峰值区间内卵母细胞数占比为 78.75%，VI期峰值区间内卵母细胞数占比为 63.01%(图 5)。

此外，输卵管成熟卵子的卵径为0.50~1.08 mm，平均值为(0.68±0.11) mm。ANOVA检验显示，IV~VI每个成熟期的成熟卵子卵径无显著差异($F=2.879$, $P=0.057$)，且均呈单峰值区间分布，IV期的峰值区间为0.60~0.80 mm，V期和VI期的峰值区间均为0.50~0.70 mm。

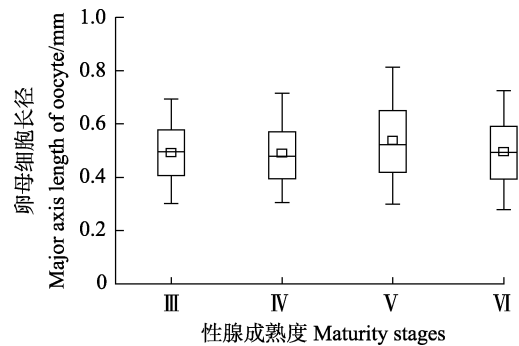


图4 南海鸢乌贼不同性腺成熟度卵母细胞的长径

Fig.4 The major axis length of oocyte at different maturity stages of *S.oualaniensis* in South China Sea

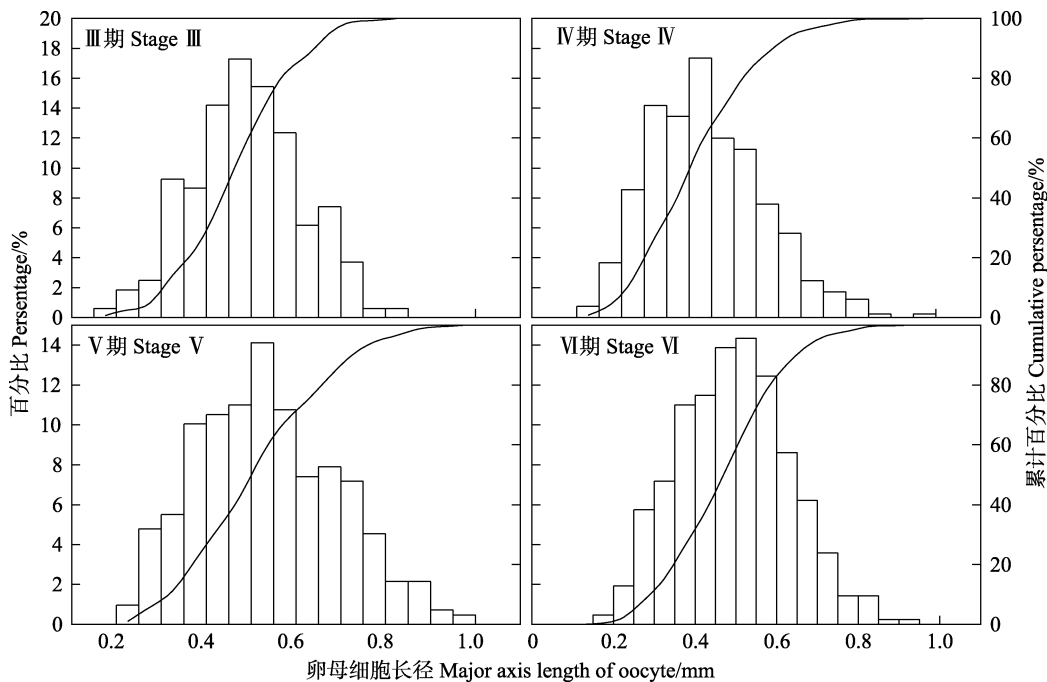


图5 南海鸢乌贼不同性腺成熟度卵母细胞大小分布

Fig.5 The oocyte size distribution at different maturity stages of *S. oualaniensis* in South China Sea

3 讨论

3.1 繁殖力大小

头足类具有灵活的生活史特性以适应多变的海洋环境, 进化出了多种环境适应性的繁殖策略, 其繁殖模式可由繁殖力和卵子大小等进行定义(Zuyev *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2001)。本研究表明, 微型群雌性个体的最大潜在繁殖力为 32842 cell, 远小于其他群体的最大潜在繁殖力。日本及邻近海域中型群的最大潜在繁殖力大于 25 万 cell (Okutani *et al.*, 1978), 大型群的最大潜在繁殖力为 2200 万 cell (Zuyev *et al.*, 2002)。这可能与微型群成熟个体较小的特性密切相关。通常头足类(尤其是柔鱼类)的繁殖力与其成熟个体大小密切相关, 成熟体型越大, 其繁殖力也越大(Zuyev *et al.*, 2002)。因此, 若研究海域的鳶乌贼存在多个群体时, 其繁殖力分布将具有较大的波动性。南海海域分布有微型群和中型群 2 个群体, 栗丽等(2016)发现, 混合群体的个体繁殖力随着胴长增加, 波动较为明显, 呈现出 2 个峰值区间分布。其中, 第一个峰值区间的结果与本研究结果相近, 可推测, 该峰值区间由小个体(微型群)所组成, 另一个峰值区间则应该为体型较大的中型群所组成。本研究也发现, 南海鳶乌贼微型群雌性个体的潜在繁殖力在不同的性腺发育时期变化较大, 这是由于个体的胴长随着性腺的发育而增长显著, 而个体的潜在繁殖力与其胴长呈显著的正相关关系, 因此, 潜在繁殖力随体型大小变化。潜在繁殖力还与发育时期相关, 卵巢的发育具有阶段性(Boyle *et al.*, 2005), 在发育后期增长显著, 相应的繁殖力也增长较为明显。该结果与印度洋海域的鳶乌贼繁殖力研究结果类似(Chembian, 2013), 也与其他大洋性头足类相一致(Laptikhovsky *et al.*, 2002、2005; Vellathi *et al.*, 2013)。

同时, Chembian(2013)研究发现, 南海鳶乌贼微型群的繁殖力远低于印度洋微型群的繁殖力, 后者潜在繁殖力可高达 60 万 cell 卵母细胞。这种差异性可能与鳶乌贼微型群对不同海域环境的适应性相关。因为, 头足类对栖息环境具有高度的适应性, 而南海作为一个半封闭性海域, 其在食物丰度、叶绿素浓度、温度等方面均与印度洋海域差异明显(邱永松, 2013)。然而, 与其他头足类相比, 南海鳶乌贼微型群的潜在繁殖力是相对可观的, 大于近岸生活的大部分头足类, 诸如莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*) (Sivashanthini *et al.*, 2010)等。

此外, 本研究还发现, 南海鳶乌贼微型群雌性个

体输卵管中的成熟卵子数目与其胴长和体重也具有一定的正相关关系。该结果与印度洋海域鳶乌贼的研究一致(Chembian, 2013), 但与夏威夷海域的鳶乌贼群体有所差异(Harman *et al.*, 1989), 并且与其他大洋性种类, 如茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)(Nigmatullin *et al.*, 2009)及产卵批次较小的阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)也有不同(林东明等, 2015)。理论上, 头足类输卵管中的成熟卵子数量是随机的, 且与其繁殖产卵策略密切相关(Gonzalez *et al.*, 1996)。Harman 等(1989)的研究也显示, 批次产卵的种类其输卵管中的卵子数目与胴长没有显著相关性。本研究结果表明, 鳶乌贼微型群的输卵管成熟卵子积累具有一定属种特殊性和(或者)海域特异性。但是, 值得注意的是本研究的样本均处于产卵前阶段, 并且鳶乌贼个体性腺成熟后仍保持肌肉组织持续增长的生活史特性(Harman *et al.*, 1989), 这些特性也可能是引起输卵管成熟卵子数目与其个体大小呈正相关关系的原因之一, 具体原因仍需后续深入研究。

3.2 产卵批次

头足类(除鸚鵡螺属)为终生 1 次繁殖产卵, 但是, 其产卵模式则表现出单批次的瞬时终端产卵, 或者多批次的间歇性或多次性产卵等(Rocha *et al.*, 2001)。有研究表明, 鳶乌贼的产卵模式为多次产卵, 在产卵活动前, 将成熟卵子暂存于输卵管中, 待交配后排出体外(Harman *et al.*, 1989, Nigmatullin *et al.*, 2009)。本研究结果显示, 鳶乌贼成熟雌性个体输卵管中的成熟卵子数目远小于其潜在繁殖力和卵巢卵母细胞数, 说明卵巢卵母细胞不可能一次性全部发育成熟, 输卵管也不可能一次性集聚与繁殖力相当地成熟卵子; 卵巢卵母细胞分批成熟、多次排卵应该是该种类产卵策略的一种选择(Harman *et al.*, 1989)。卵巢卵母细胞和输卵管成熟卵子的单峰值区间分布模式, 也在一定程度上证明了该种类卵巢卵母细胞批次成熟的发育模式。

本研究基于分析性腺成熟度 VI 期时饱满输卵管成熟卵子数目, 推算鳶乌贼微型群的产卵批次为 6~15 次。该产卵批次与其他海域群体相一致, 且不受群体体型大小影响。例如, 阿拉伯海域大型群输卵管中成熟卵子数为 30 万 cell (Snýder, 1998), 其产卵批次为 6~16 次。这种一致的产卵批次也进一步证实了鳶乌贼多次产卵的产卵策略选择(Harman *et al.*, 1989)。同时, 鳶乌贼的产卵批次数目与其他大洋性柔鱼类诸如茎柔鱼(Nigmatullin *et al.*, 2009)的 10~14 个产卵批次数目相当, 但大于近海或浅海水层生活柔鱼类如阿根廷滑柔鱼的产卵批次数目(林东明等, 2014)。这种大洋性

种类和近海性种类产卵批次数目的差异,一方面,可能是二者之间的产卵策略有别,前者为多次产卵型,后者多为间歇性产卵型;另一方面,则可能是大洋性种类为了适应远洋多变环境而作出产卵策略等适应性的进化,并反映了头足类栖息地从近海向远洋的进化适应过程(Laptikhovskiy *et al.*, 2005)。

此外,头足类的产卵策略与其生殖投入密切相关,并在一定程度上决定着其产卵批次(Lin *et al.*, 2017)。鸢乌贼的多次产卵策略表现为卵巢卵母细胞异步发育、批次成熟,产卵期间持续摄食,产卵周期持续约3个月(Harman *et al.*, 1989),1个批次的卵子以多个卵块的形式排出(Chembian 2013),2次产卵之间肌肉细胞持续生长等(Harman *et al.*, 1989)。生殖投入类型为外源性,即生殖所需能量来源于性腺发育期间和产卵期间的食物摄取(Harman *et al.*, 1989)。性腺成熟个体在繁殖期间存在正常的摄食行为是柔鱼科产卵策略的一个重要特征(Nigmatullin *et al.*, 1994, Laptikhovskiy *et al.*, 2005, Nigmatullin, 2007),这种摄食行为可为其配子发生提供持续的、稳定的能量供给(Wells *et al.*, 1996),并增加其生殖产出,提高生殖效率(Harman *et al.*, 1989)。因此,本研究发现,鸢乌贼雌性个体的潜在繁殖力投入指数与其个体大小的正相关关系,应该是其外源性生殖投入策略的一种体现。这种能量投入模式使得该种类更灵活地投入生殖活动,使其生殖产出及生殖效率最大化(Wells *et al.*, 1996)。

综上所述,南海鸢乌贼微型群雌性个体具有较大的潜在繁殖力,且与个体大小密切相关。同时,该种类的卵巢卵母细胞表现为批次发育成熟、分批次产卵,产卵活动可能由6~15个排卵事件构成,潜在繁殖力投入指数随着个体生长发育呈增长趋势。这些繁殖力特性进一步说明鸢乌贼对多次产卵策略的选择适应性,以使其生殖产出及生殖效率最大化;并且,这种繁殖力特性也可能是其对栖息环境的一种选择适应性。但是,具体的繁殖力特性与时间因素和环境因素之间的关系仍需后续深入研究,尤其需要深入开展不同季节个体的繁殖力特征与其栖息环境的比较分析。

参 考 文 献

- Boyle P, Rodhouse P. Cephalopods: Ecology and fisheries. Oxford: Wiley-Blackwell, 2005, 464
- Chembian AJ. Studies on the biology, morphometrics and biochemical composition of the ommastrephid squid, *Sthenoteuthis oualaniensis* (Lesson, 1830) of the south west coast of India. Doctoral Dissertation of Cochin University of Science and Technology, 2013
- Chen XJ, Liu BL, Wang YG. The world Cephalopods. Beijing: China Ocean Press, 2009, 312-313 [陈新军, 刘必林, 王尧耕. 世界头足类. 北京: 海洋出版社, 2009, 312-313]
- Chen XJ, Liu BL. Fishery resources biology. Beijing: Science Press, 2017 [陈新军, 刘必林. 渔业资源生物学. 北京: 科学出版社, 2017]
- Chen XJ, Ye XC. Preliminary study on the relationship between fishing ground of *Symplectoteuthis oualaniensis* and environmental factors in northwestern Indian Ocean. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(1): 55-60 [陈新军, 叶旭昌. 印度洋西北部海域鸢乌贼渔场与海洋环境因子关系的初步分析. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 55-60]
- Fan JT, Chen ZZ, Zhang J, *et al.* *Sthenoteuthis oualaniensis* fishing grounds analysis based on marine environmental factors and different weight coefficients in the Zhongxisha and Xisha Islands, South China Sea. South China Fisheries Science, 2016, 12(4): 57-63 [范江涛, 陈作志, 张俊, 等. 基于海洋环境因子和不同权重系数的南海中沙西沙海域鸢乌贼渔场分析. 南方水产科学, 2016, 12(4): 57-63]
- Gong YY, Kong XL, Yang YT, *et al.* Feeding habits of dwarf-form *Sthenoteuthis oualaniensis* population in the South China Sea. Marine Fisheries, 2018, 40(4): 394-403 [龚玉艳, 孔啸兰, 杨玉滔, 等. 南海鸢乌贼微型群体的摄食习性研究. 海洋渔业, 2018, 40(4): 394-403]
- Gong YY, Zhan FP, Yang YT, *et al.* Feeding habits of *Symplectoteuthis oualaniensis* in the South China Sea. South China Fisheries Science, 2016, 12(4): 80-87 [龚玉艳, 詹凤娉, 杨玉滔, 等. 南海鸢乌贼摄食习性的初步研究. 南方水产科学, 2016, 12(4): 80-87]
- Gonzalez AF, Guerra A. Reproductive biology of the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda, Ommastrephidae) of the Northeastern Atlantic. Sarsia, 1996, 81(2): 107-118
- Harman RF, Young RE, Reid SB, *et al.* Evidence for multiple spawning in the tropical oceanic squid *Sthenoteuthis oualaniensis* (Teuthoidea: Ommastrephidae). Marine Biology, 1989, 101(4): 513-519
- Jereb P, Roper C. Cephalopods of the world, an annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae). Rome: FAO, 2005
- Laptikhovskiy V, Nigmatullin C. Caracteristicas reproductivas de machos y hembras del calamar (*Illex argentinus*). Frente Marítimo, 1992, 12(A): 23-37
- Laptikhovskiy VV, Arkhipkin AI, Middleton DAJ, *et al.* Ovary maturation and fecundity of the squid *Loligo gahi* on the southeast shelf of the Falkland Islands. Bulletin of Marine Science, 2002, 71(1): 449-464
- Laptikhovskiy VV, Nigmatullin CM. Aspects of female reproductive biology of the orange-back squid, *Sthenoteuthis pteropus* (Steenstrup) (Ommastrephidae: Oegopsidae) in the eastern tropical Atlantic. Scientia Marina, 2005, 69(3): 383-390
- Li D, Liu CL, Li A, *et al.* Principal component analysis of the morphometric traits of the cuttlebone of *Sepia esculenta* at

- early developmental stages. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 41–49 [李达, 刘长琳, 李昂, 等. 金乌贼 (*Sepia esculenta*) 早期发育阶段内壳形态学指标的主成分分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 41–49]
- Lin DM, Chen XJ, Fang Z. Preliminary study on reproductive biology of summer spawning stock of *Illex argentinus* in the southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 843–852 [林东明, 陈新军, 方舟. 西南大西洋阿根廷滑柔鱼夏季产卵种群繁殖生物学的初步研究. *水产学报*, 2014, 38(6): 843–852]
- Lin DM, Fang XY, Chen XJ. Fecundity and oocyte development of Argentine shortfin squid *Illex argentinus* summer spawning stock in the Southwest Atlantic. *Marine Fisheries*, 2015, 37(5): 389–398 [林东明, 方学燕, 陈新军. 阿根廷滑柔鱼夏季产卵种群繁殖力及其卵母细胞的生长模式. *海洋渔业*, 2015, 37(5): 389–398]
- Lin DM, Chen XJ, Wei YR, et al. The energy accumulation of somatic tissue and reproductive organs in post-recruit female *Illex argentinus* and the relationship with sea surface oceanography. *Fisheries Research*, 2017, 185: 102–114
- McGraw JB, Caswell H. Estimation of individual fitness from life-history data. *American Naturalist*, 1996, 147(1): 47–64
- Ménard F, Potier M, Romanov E, et al. New information from predator diets on the importance of two Ommastrephidae: *Sthenoteuthis oualaniensis* in the Indian Ocean and *Hyaloteuthis pelagica* in the Atlantic Ocean. *Global Ocean Ecosystem Dynamics*, 2007, 24: 49–52
- Nesis KN. Population structure of the squid *Sthenoteuthis oualaniensis* (Lesson, 1830) in the tropical West Pacific. *Proceedings of the Academy of Science Union of Soviet Socialist Republics*, Shirsch Institute of Oceanography, 1977, 107: 15–29
- Nigmatullin CM, Arkhipkin AI, Sabirov RM. Age, growth and reproductive biology of diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* (Oegopsida: Thysanoteuthidae). *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 124(5): 73–87
- Nigmatullin CM, Laptikhovskiy VV. Reproductive strategies in the squids of the family Ommastrephidae. *Ruthenica*, 1994, 4(1): 79–82
- Nigmatullin CM, Markaida U. Oocyte development, fecundity and spawning strategy of large sized jumbo squid *Dosidicus gigas* (Oegopsida: Ommastrephinae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2009, 89(4): 789–801
- Nigmatullin CM. Brief review on evolutionary and ecological aspects of biology of squids family Ommastrephidae (Cephalopoda: Teuthida). *Proceedings of the Kazan State University. Series Natural Sciences*, 2007, 149: 182–193
- Okutani T, Tung IH. Reviews of biology of commercially important squids in Japanese and adjacent waters. I. *Symplectoteuthis oualaniensis* (Lesson). *Veliger*, 1978, 21(1): 87–94
- Qiu YS. Ocean fertilization and its potential for fishery development in the oligotrophic South China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 223–233 [邱永松. 海洋施肥及其在南海外海渔业开发方面的应用前景. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 223–233]
- Rocha F, Guerra A, Gonzalez AF. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Reviews*, 2001, 76(3): 291–304
- Sivashanthini K, Thulasitha WS, Charles GA. Reproductive characteristics of squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) from the Northern coast of Sri Lanka. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2010, 5: 12–22
- Snjyder R. Aspects of the biology of the giant form of *Sthenoteuthis oualaniensis* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Arabian Sea. *Journal of Molluscan Studies*, 1998, 64(1): 21–34
- Stearns SC. *The evolution of life histories*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1992
- Su L, Chen ZZ, Zhang P. Reproductive biology of purpleback flying squid (*Symplectoteuthis oualaniensis*) in the south-central South China Sea in spring and autumn. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(4): 96–102 [粟丽, 陈作志, 张鹏. 南海中南部海域春秋季节鳶乌贼繁殖生物学特征研究. *南方水产科学*, 2016, 12(4): 96–102]
- Teng GL, Shan XJ, Jin XS, et al. A study on the ovary-development characters and oocyte size-distribution of *Cleisthenes herzensteini* in the Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 12–20 [滕广亮, 单秀娟, 金显仕, 等. 黄海高眼蝶卵巢发育特征及卵径分布. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 12–20]
- Tung IS. On the reproduction of common squid, *Symplectoteuthis oualaniensis* (Lesson). *Reports on the Institute of Fisheries Biology, Taiwan University*, 1976, 3: 26–48 [童逸修. 南鱿生殖之研究. 台大渔业生物实验所研究报告, 1976, 3: 26–48]
- Vellathi V, Rajagopal S. Fecundity of bigfin squid, *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) (Cephalopoda: Loliginidae). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2013, 6(1): 39–44
- Wang T, Huang D, Sun GW, et al. The research progress of fish batch fecundity and spawning frequency. *Chinese Journal of Zoology*, 2013, 48(1): 143–149 [王腾, 黄丹, 孙广文, 等. 鱼类分批繁殖力和繁殖频率的研究进展. *动物学杂志*, 2013, 48(1): 143–149]
- Wells MJ, Clarke A. Energetics: The costs of living and reproducing for an individual cephalopod. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 1996, 351(1343): 1083–1104
- Wetherall JA. *Biology, oceanography, and fisheries of the North Pacific transition zone and subarctic frontal zone*. NOAA Technical Report NMFS, 1991, 105
- Wormuth JH. *The biogeography and numerical taxonomy of the oegopsid squid family Ommastrephidae in the Pacific Ocean*. University of California Press, 1976, 23: 1–90
- Yan YR, Feng B, Lu HS, et al. Fishery biology of purpleback flying squid *Sthenoteuthis oualaniensis* in northern sea areas around Nansha Islands in summer. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1177–1186 [颜云榕, 冯波, 卢伙胜, 等. 南沙群岛北部海域鳶乌贼 (*Sthenoteuthis oualaniensis*) 夏季渔业生物学研究. *海洋与湖沼*, 2012, 43(6): 1177–1186]
- Zhang J, Chen GB, Zhang P, et al. Estimation of purpleback flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) resource in the

central and southern South China Sea based on fisheries acoustics and light-falling net. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 822–831 [张俊, 陈国宝, 张鹏, 等. 基于渔业声学 and 灯光罩网的南海中南部鸢乌贼资源评估. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 822–831]

Zhang P, Yan L, Yang BZ, *et al.* Population structure of purpleback flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in Nansha area in spring. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(5): 11–19 [张鹏, 晏磊, 杨炳忠, 等. 春季南沙海域鸢乌贼种群结构特征的研究. *南方水产科学*, 2015, 11(5): 11–19]

Zhao CX, Chen ZP, He XB, *et al.* Age, growth and population structure of purple back flying squid, *sthenoteuthis oualaniensis* in the South China Sea in spring based on statolith microstructure. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(4): 884–890 [招春旭, 陈昭澎, 何雄波, 等. 基于耳石微结构的南海春季鸢乌贼日龄、生长与种群结构的研究. *水生生物学报*, 2017, 41(4): 884–890]

Zuyev G, Nigmatullin C, Chesalin M, *et al.* Main results of long-term worldwide studies on tropical nektonic oceanic squid genus *Sthenoteuthis*: An overview of the Soviet investigations. *Bulletin of Marine Science*, 2002, 71(2): 1019–1060

(编辑 马瑾艳)

Characterizing Fecundity of Dwarf form of Female Purple Flying Squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in the South China Sea

ZHU Kai¹, ZHANG Lichuan¹, XIAO Chuyuan¹, CHEN Xinjun^{1,2}, LIN Dongming^{1,2}⊙, ZHU Junlei¹

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

2. Shanghai Ocean University; Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education; National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries; Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306)

Abstract Female specimens of the dwarf form of *Sthenoteuthis oualaniensis*, the purple flying squid, were collected from light-falling fishery catches from the South China Sea in 2017. The fecundity of this species was investigated and characterized. The results showed that the potential fecundity of female individuals ranged from 1218 to 32843 oocytes. The number of ovarian oocytes ranged from 1178 to 30397 cells, and the number of ripe eggs in the oviducts ranged from 113 to 2904 cells. In addition, the relative fecundity ranged from 48.93 to 842.12 cell/g of a female's total weight, and the overall potential reproductive investment index varied from 0.005 to 0.213. The potential fecundity showed a significant power regression relationship to mantle length and linear relation to body weight. Relative fecundity showed a significant exponential relation to mantle length and linear correlation with body weight. Potential individual reproductive investment index increased linearly with increasing mantle length as well as body weight. Batch fecundity had an estimated range from 1895 to 2904 cells based on the number of ripe oocytes in the oviducts of late-maturing individuals (stage VI), and the number of spawn per batch was estimated to range from 6 to 15 with an average of 9.87±4.36. Major axis length of ovarian oocytes was measured and ranged from 0.17 to 0.99 mm with an average of (0.51±0.14) mm. There were significant differences in major axis length of ovarian oocytes among different maturity stages ($P<0.05$). The frequency of major axis length of oocytes in the ovary showed a unimodal distribution for specimens at stages III to VI. Moreover, the frequency distribution peak showed a forward increase with maturation when the mode was between 0.35 and 0.60 mm for stages III and IV, while it showed a forward increase when the mode was between 0.40 and 0.75 mm for stages V and VI. The major axis length of ripe eggs in the oviducts ranged from 0.50 to 1.08 mm. Cumulatively, these findings indicate that fecundity of the dwarf form of female *S. oualaniensis* tends to increase as body size increases and as maturation progresses. Furthermore, the ovarian oocytes develop in a pattern of group-synchrony, and ovulation occurs multiple times.

Key words *Sthenoteuthis oualaniensis*; Fecundity; Dwarf form; Multiple spawning; South China Sea

⊙ Corresponding author: LIN Dongming, E-mail: dmlin@shou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190626001

http://www.yykxjz.cn/

张金勇, 何暮春, 项子龙, 柳淑芳, 庄志猛. 基于全长转录组测序的金乌贼微卫星位点筛选与特征分析. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 149–155

Zhang JY, He MC, Xiang ZL, Liu SF, Zhuang ZM. Microsatellite screening and characterization analysis of *Sepia esculenta* based on full-length transcriptome sequencing. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 149–155

基于全长转录组测序的金乌贼 微卫星位点筛选与特征分析*



张金勇^{1,2,3} 何暮春⁴ 项子龙^{1,2,5} 柳淑芳^{1,2,3①} 庄志猛^{1,2,3}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;
4. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 5. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 以金乌贼(*Sepia esculenta*)转录组测序获得的 177,951 条 Unigene 为对象,采用 Micro Satellite (MISA)软件检测及分析其中的简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)的位点信息。结果显示,在金乌贼转录组中共检测出 161,327 个 SSR 位点,分布在 64,933 条 Unigene 中,SSR 位点发生频率为 36.49%,出现频率为 90.66%。其中,最主要的重复类型为单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸,分别占 SSR 总数的 46.00%、39.93%和 9.48%。SSR 包含的重复基元中,A/T 是单核苷酸的优势重复基元,AT/AT 和 AC/GT 是二核苷酸的优势重复基元类型。66,004 个重复基元长度 ≥ 20 bp,占 SSR 总数的 40.91%,且其中含有低级重复基元(二、三核苷酸重复)的 SSR 位点数量占优。以上结果表明,金乌贼转录组中 SSR 位点出现频率较高且类型丰富、多态性潜能较高,研究结果可为更好地开发金乌贼 SSR 分子标记、种质资源保护利用、遗传多样性评价和分子标记辅助育种等提供参考。

关键词 金乌贼; 转录组; SSR; 重复基元; 位点信息

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0149-07

金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle, 1885)俗称墨鱼或乌鱼,主要分布于中国沿海海域、日本北海道以南、朝鲜西南海域及菲律宾群岛海域(Okutani, 1995)。金乌贼是一种具有较高经济价值的优良品种,曾是我国渤、黄海重要捕捞对象。然而,20 世纪 80 年代以来,由于过度捕捞、栖息地破坏等原因,金乌贼资源急剧衰退(郝振林等, 2007)。金乌贼具有营养丰富、生长

迅速、个体大(均重 700 g)、生命周期短(约 1 年)、世代更新快和洄游规律性强等特点,为保护和恢复金乌贼资源,我国学者在金乌贼基础生物学、增殖技术以及种群遗传学等方面开展了系列研究(郑小东等, 2002、2003; 赵厚钧等, 2004; 郝振林等, 2008; 韩松等, 2010; Zheng *et al*, 2007、2009),并于 2010 年突破了金乌贼人工繁育和增殖放流技术(佚名, 2010)。为更

* 国家自然科学基金项目(31672645)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2019HY-JC02)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672645), Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2019HY-JC02), and Taishan Scholar Project, Shandong Province]. 张金勇, E-mail: jinyongzhang2013@126.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-06-26, 收修改稿日期: 2019-09-27

好地开展金乌贼繁育及增殖养护工作,有必要从分子层面精准评估现有种群的种质状况和遗传多样性。

简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)分子标记技术,也称为微卫星 DNA 序列标记,其串联重复的核心序列为 1~6 个核苷酸(Powell *et al.*, 1996; Toth *et al.*, 2000)。作为一种遗传标记,SSR 广泛存在于原核和真核生物基因中,具有重复性好、共显性高、稳定性强、多态性丰富等特点(Tuler *et al.*, 2015)。按照 SSR 的来源,可分为表达序列标签 SSR (EST-SSR)和基因组 SSR(g-SSR)。近年来,相对于传统的 EST-SSR 开发,通过转录组测序平台开发 SSR 标记已在多种水产动物中得到应用。本研究在金乌贼 Pacific Biosciences 单分子实时(Single-molecule real-time, SMRT)测序技术和 Illumina RNA-Seq 技术转录组测序获得生物学数据信息的基础上,利用 Micro Satellite (MISA)软件筛选 SSR 位点并分析其分布及组成特征,以期为后续的金乌贼群体遗传结构分析、遗传图谱构建、重要性状 QTL 定位和良种选育等研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 动物材料

实验用金乌贼于 2017 年 1 月~7 月取自青岛金沙滩水产开发有限公司,挑选体形完整,无伤害的个体。分别从生长(约 6 月龄)、产卵(10~11 月龄)和产后濒死(11~12 月龄)三个关键时期随机选择 3 个雌性金乌贼亲体。从选择的雌性个体解剖脑亚脚叶/嗅叶、视腺、卵巢和缠卵腺组织样品,浸没在 RNAlater(天根,中国)中,并于-80℃储存。

1.2 转录组数据来源

提取金乌贼不同时期的脑亚脚叶/嗅叶、视腺、卵巢和缠卵腺组织样品的总 RNA,送天津诺禾致源生物信息科技有限公司,采用 PacBio SMRT 测序技

术和 Illumina RNA-Seq 技术进行转录组测序,通过整合 PacBio SMRT 和 Illumina 测序数据,生成高质量的金乌贼转录组,包含 177,951 条全长转录本(Zhang *et al.*, 2019),以此作为分析数据。

1.3 金乌贼 EST-SSR 的筛选

为检测金乌贼的 SSR 位点,利用 MISA(v1.0) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>)对其 Unigene 序列进行分析。SSR 位点包含了单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸以及六核苷酸重复。判断的标准为单核苷酸重复至少 12 次;二核苷酸重复至少 6 次;三核苷酸重复至少 5 次、四核苷酸重复至少 5 次、五核苷酸重复至少 4 次、六核苷酸重复至少 4 次。

2 结果与分析

2.1 金乌贼转录组 SSR 位点数量与分布

金乌贼转录组测序共获得 177,951 条全长转录本,序列总长度为 198,175,926 bp。检索 Unigene 序列,共发现 161,327 个 SSR 位点,分布在 64,933 条 Unigene 中,发生频率(含 SSR 的 Unigene 数与 Unigene 总数之比)为 36.49%,出现频率(SSR 数目与 Unigene 总数之比)为 90.66%,平均每 1,228 bp 含有 1 个 SSR 位点。此外,有 33,136 条 Unigene 含超过 1 个 SSR 位点,33,260 条 Unigene 含有复合型 SSR(表 1)。

金乌贼 EST-SSR 类型丰富,从表 2 可以发现,单核苷酸到四核苷酸重复最多,占总 SSR 位点数量的 99.55%,其中,单核苷酸和二核苷酸所占的比例较大,分别占总数的 46.00%和 39.93%;其次为三核苷酸和四核苷酸,分别为 9.48%和 4.14%。五、六核苷酸重复率总计 0.448%,数量很少。

2.2 金乌贼 SSR 重复基元的序列组成

金乌贼 SSR 中,单核苷酸重复以 A/T 重复基序最多,占总 SSR 的 44.79%;二核苷酸重复以 AT/AT

表 1 金乌贼转录组中的 SSR 搜索结果
Tab.1 Searching results of SSR in transcriptome of *S. esculenta*

类目 Category	数量 Quantity
搜索序列总数 Total number of search sequences	177,951
搜索序列总长度 Total length of search sequences (bp)	198,175,926
SSR 总数 Total number of SSRs	161,327
SSR 发生频率数 SSR frequency of distribution	36.49%
SSR 出现频率数 SSR frequency of occurrence	90.66%
10 kb 含 SSR 数目 10 kb with SSR number	8.14
含 SSR 位点的序列数目 Number of sequences containing SSR sites	64,933
含超过 1 个 SSR 位点的序列数目 Number of sequences containing more than 1 SSR locus	33,136
含复合型 SSR 的序列数目 Number of sequences containing complex SSRs	33,260

和 AC/GT 重复基序为主要类型, 共占 SSR 总数的 34.73%; 三核苷酸重复则以 AAT/ATT 和 ATC/ATG 出现频率最高, 共占 4.71%; 四核苷酸重复则以

AAAG/CTTT 居多, AGAT/ATCT 次之。其他五核苷酸和六核苷酸重复基元类型较多, 数量非常少, 出现频率很低, 见表 3。

表 2 金乌贼 EST-SSR 不同重复基元分布情况

Tab.2 Distribution of different repeat motifs in *S. esculenta*

重复类型 Repeat type	SSR 数 SSR number	出现频率 Frequency of occurrence (%)	占总 SSR 比例 Proportion of total SSR (%)
单核苷酸 Mononucleotide	74,204	41.70	46.00
二核苷酸 Dinucleotide	64,423	36.20	39.93
三核苷酸 Trinucleotide	15,293	8.59	9.48
四核苷酸 Tetranucleotide	6,679	3.75	4.14
五核苷酸 Pentanucleotide	570	0.32	0.35
六核苷酸 Hexanucleotide	158	0.09	0.10

表 3 金乌贼 EST-SSR 重复基元的类型

Tab.3 Type of EST-SSR repeat motifs in *S. esculenta*

重复类型 Repeat type	重复基元 Repeat motif	重复个数 Repeat number	出现频率 Frequency of occurrence (%)	占总 SSR 比例 Proportion of total SSR (%)
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	72,262	40.61	44.79
	C/G	1,942	1.09	1.20
二核苷酸 Dinucleotide	AC/GT	19,599	11.01	12.15
	AG/CT	8,335	4.68	5.17
	AT/AT	36,427	20.47	22.58
	CG/CG	62	0.03	0.04
	AAAC/GTT	1473	0.83	0.91
三核苷酸 Trinucleotide	AAG/CTT	1175	0.66	0.73
	AAT/ATT	5912	3.32	3.66
	ACC/GGT	1013	0.57	0.63
	ACG/CGT	195	0.11	0.12
	ACT/AGT	1193	0.67	0.74
	AGC/CTG	1569	0.88	0.97
	AGG/CCT	951	0.53	0.59
	ATC/ATG	1680	0.94	1.04
	CCG/CGG	132	0.07	0.08
	AAAG/CTTT	2663	1.50	1.65
四核苷酸 Tetranucleotide	AGAT/ATCT	1960	1.10	1.21
	ACAT/ATGT	935	0.53	0.58
	AAAT/ATTT	414	0.23	0.26
	AAAC/GTTT	133	0.07	0.08
	其他类型四核苷酸 Other types of tetranucleotide	574	0.32	0.36
五核苷酸 Pentanucleotide	AAAAT/ATTTT	187	0.11	0.12
	AAAAC/GTTTT	112	0.06	0.07
	AAAAG/CTTTT	95	0.05	0.06
	AAACC/GGTTT	39	0.02	0.02
	AATAT/ATATT	26	0.01	0.02
其他类型五核苷酸 Other types of pentanucleotide	111	0.06	0.07	
六核苷酸 Hexanucleotide	AAAAAG/CTTTTT	18	0.01	0.01
	AAAAAT/ATTTTT	13	7.31×10^{-5}	8.06×10^{-5}
	ACCAGC/CTGGTG	13	7.31×10^{-5}	8.06×10^{-5}
其他类型六核苷酸 Other types of hexanucleotide	114	0.06	0.07	

2.3 金乌贼转录组中的 SSR 重复次数

重复片段的长度会影响SSR多态性,而SSR重复次数可以决定重复片段的长度。金乌贼SSR的碱基重复次数很广泛,整体波动在5~100次范围内,多集中于5~29次。单核苷酸重复12~102次;二核苷酸重复6~50次;三核苷酸重复5~24次;四核苷酸重复6~19次;五核苷酸重复6~19次;六核苷酸重复6~12次。重复12次的频率最高,共有18,289条,占总SSR数的11.34%,其次是重复6次(10.98%)、13次(7.73%)、7次(6.82%)、14次(6.28%),30次以上(含30)占3.40%。总体上,金乌贼转录组SSR的重复次数以11~20次最多,占总SSR比例为47.92%,4~10次次之,为35.03%;重复次数21~30次为14.24%;重复次数大于30次为2.80%(图1)。

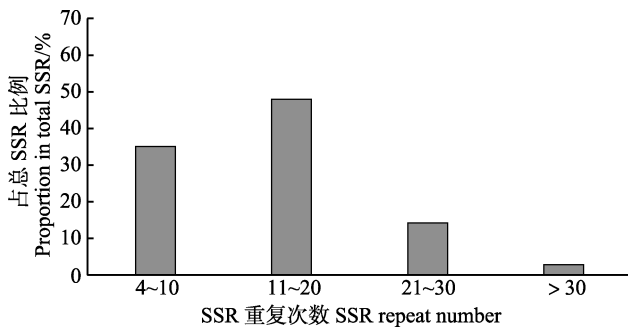


图1 金乌贼转录组 EST-SSR 不同重复基元的重复次数
Fig.1 Repeat numbers of EST-SSR with different motifs in transcriptome of *S. esculenta*

2.4 金乌贼转录组 SSR 的长度

SSR位点中重复基元的长度是影响其多态性高低的重要因素,当SSR \geq 20 bp时,其多态性高;重复基元长度 $12 \leq$ SSR < 20 bp时,多态性中等;而低于12 bp时,多态性极低。本研究中去除了12 bp以下的SSR,长度 \geq 12 bp的SSR共有161,327个。从金乌贼转录组中SSR基元长度分布情况可以看出,其中,重复基元长度在12~19 bp的SSR位点最多,共有95,323个,占SSR总数的59.09%;其次为20~30 bp,共有43,977个,占SSR总数的27.26%;长度在31~40 bp的,共10,931个,占SSR总数的6.78%;长度在41~50 bp的,共5,588个,占SSR总数的3.46%;基元长度大于50 bp的数量最少,共5,508(3.41%)。根据该结果,可推测该研究中II型SSR(长度为12~20 bp)的SSR的比例为59.09%,具有中等多态性,有较高的潜在可用性。而具有高度多态性的I型SSR(长度 \geq 20 bp)中,含有低级基元

(二、三核苷酸重复)SSR位点数量占优,这部分SSR位点具有丰富的多态性(图2)。

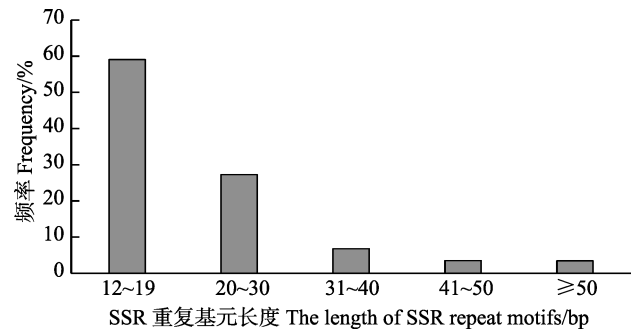


图2 金乌贼转录组 SSR 位点重复基元序列长度分布频率
Fig.2 Frequency of SSR repeat sequence length distribution in transcriptome of *S. esculenta*

3 讨论

本研究以金乌贼转录组信息对其 EST-SSR 进行开发。结果显示,金乌贼转录组中含有丰富的 SSR 位点。从金乌贼转录组的 177,951 条 Unigene 中,共搜索出 161,327 个 SSR,分布在 64,933 条 Unigene 中,SSR 的出现频率为 90.66%。与其他水生动物 SSR 的出现频率相比,明显高于扁玉螺(*Neverita didyma*) (86.53%) (卢玮筱等, 2018)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*) (39.30%) (龚诗琦等, 2016)、翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) (27.51%) (袁文成等, 2015)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (45.91%) (王传聪等, 2018)、无针乌贼(*Sepiella japonica*) (48.70%) (吕振明等, 2017; 管奥等, 2018)、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*) (13.34%) (王忠良等, 2015)、栉江珧(*Atrina pectinata*) (8.2%) (李东明等, 2017)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*) (8.89%) (刘博等, 2012)、泥蚶(*Tegillarca granosa*) (14.83%) (周小龙等, 2013) (表 5)。

SSR 检索标准、数据库丰富程度以及物种差异,都会影响 SSR 的出现频率(Varshney *et al.*, 2005)。如张秀英等(2012)采用不同检索条件从栉孔扇贝 BES 文库筛选 SSR,表明 SSR 出现频率随检索标准的提高而降低。数据库丰富程度也会影响 EST-SSR 位点出现频率,石耀华等(2008)和王忠良等(2015)先后从马氏珠母贝 6,979 和 74,007 条 EST 序列中筛选得到 243 和 9,872 个 EST-SSR 位点,位点出现频率分别为 3.48%和 13.34%。Franklin 等(2005)和王艳红等(2011)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同数量的 EST 序列进行 EST-SSR 筛选,其出现频率分别为 4.9%和 7.8%。

表 5 目前已获得 EST-SSRs 出现频率的部分水生动物
Tab.5 Some aquatic animals that have obtained the frequency of EST-SSRs

物种 Species	SSR 出现频率 Frequency of SSR(%)	文献 Reference
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	39.30	龚诗琦等(2016)
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i>	27.51	袁文成等(2015)
波纹唇鱼 <i>Cheilinus undulates</i>	14.93	刘洪涛等(2018)
双须骨舌鱼 <i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	6.67	王且鲁等(2016)
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	45.91	王传聪等(2018)
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	7.8	王艳红等(2011)
无针乌贼 <i>Sepiella japonica</i>	48.70	吕振明等(2017)
泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	14.83	周小龙等(2013)
马氏珠母贝 <i>Pinctada martensii</i>	13.34	王忠良等(2015)
墨西哥湾扇贝 <i>Argopecten irradians concentricus</i>	10	谭杰等(2018)
栉江珧 <i>Atrina pectinata</i>	8.2	李东明等(2017)
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	8.89	刘博等(2012)

大量研究表明, 在已开发的 EST-SSR 标记中, 二核苷酸和三核苷酸重复基元类型最为丰富。虾夷扇贝和栉江珧的 EST-SSR 均以二核苷酸重复基元所占比例最高, 分别占 40.54%和 77.08% (李云峰等, 2010; 李东明等, 2017); 缢蛏 SSR 以三核苷酸重复 SSR 比例最高, 为 37.13% (刘博等, 2012)。本研究发现, 金乌贼 EST-SSR 重复类型中, 以单核苷酸重复基元最多, 比例达到 46.00%, 其次为二核苷酸, 为 39.93%。这和无针乌贼(吕振明等, 2017)、马氏珠母贝(王忠良等, 2015)、罗氏沼虾(王传聪等, 2018)和扁玉螺(卢玮筱等, 2018)中单核苷酸重复基元是主导类型的研究结果相似。同时, 本研究发现, 金乌贼转录组中, SSR 位点最多的是单核苷酸的重复基元 A/T, 占总 SSR 的 44.79%; 其次为二核苷酸的 AT/AT 和 AC/GT, 共占 SSR 总数的 34.73%。此外, 金乌贼转录组 SSR 位点重复基元序列长度在 20 bp 以上的 SSR 位点共有 66,004 个, 占 SSR 总数的 40.91%, 并且其中含有低级基元(二、三核苷酸重复) SSR 位点数量占优, 这部分 SSR 可能具有较高的利用价值。

4 结论

整体而言, 金乌贼转录组 SSR 出现频率较高且类型丰富, 共检测出 161,327 个 SSR 位点, 分布在 64,933 条 Unigene 中, SSR 位点发生频率为 36.49%, 出现频率高达 90.66%。这些 SSR 在提高物种遗传多样性潜能方面发挥着重要的作用。研究结果为下一阶段开发金乌贼多态性 SSR 分子标记提供了基础数据, 也为开展金乌贼种质资源保护利用、遗传多样性评价和未来分子标记辅助育种等研究奠定基础。

参 考 文 献

- Franklin P, Juan O, Mariuxi Z, *et al.* Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Marin Biotechnology*, 2005, 7(5): 554–569
- Gong SQ, Wang ZY, Xiao SJ, *et al.* Development and verification of SSR based on transcriptome of yellow drum, *Nibea albiflora*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2016, 21(4): 241–246 [龚诗琦, 王志勇, 肖世俊, 等. 黄姑鱼转录组 SSR 的开发与验证. 集美大学学报(自然科学版), 2016, 21(4): 241–246]
- Guan A, Wu YT, Chen Y, *et al.* Deep sequence-based transcriptome analysis of microsatellites in the cuttlefish (*Sepiella japonica*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 144–151 [管奥, 毋玉婷, 陈宇, 等. 曼氏无针乌贼转录组微卫星特征分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 144–151]
- Han S, Zheng XD, Li Q, *et al.* Ultrastructure of *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiida) spermatozoa and its damage by low temperature. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 483–488 [韩松, 郑小东, 李琪, 等. 金乌贼(*Sepia esculenta*) 精子超微结构和低温损伤电镜观察. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 483–488]
- Hao ZL, Zhang XM, Zhang PD, *et al.* Fluorescent marking method in golden cuttlefish *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae). *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(4): 577–583 [郝振林, 张秀梅, 张沛东, 等. 金乌贼荧光标志方法的研究. 水产学报, 2008, 32(4): 577–583]
- Hao ZL, Zhang XM, Zhang PD. Biological characteristics and multiplication techniques of *Sepia esculenta*. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(4): 601–606 [郝振林, 张秀梅, 张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术. 生态学杂志, 2007, 26(4): 601–606]
- Li DM, Yang AG, Wu B, *et al.* Development and application of the EST-SSR markers in *Atrina pectinata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 137–142 [李东明, 杨爱国,

- 吴彪, 等. 栉江珧(*Atrina pectinata*) EST-SSR 标记的开发与应用. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 137-142
- Li YF, Liu WD, Gao XG, *et al.* Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 578-585 [李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产科学, 2010, 17(3): 578-585]
- Liu B, Shao YQ, Teng SS, *et al.* Characterization, development and utilization of EST-derived microsatellites in *Sinonovacula constricta*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(1): 132-137 [刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*) EST-SSR 分布特征及引物开发利用. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 132-137]
- Liu HT, Liu JY, Yang MQ, *et al.* SSR and SNP polymorphic feature analysis based on *Cheilinus undulates* transcriptome. Genomics and Applied Biology, 2020, 1-28 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20190318.1703.010.html> [刘洪涛, 刘金叶, 杨明秋, 等. 基于转录组测序的波纹唇鱼 SSR 和 SNP 多态特征分析. 基因组学与应用生物学, 2020, 1-28 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20190318.1703.010.html>]
- Lu WX, Chen YX, Qi PZ. Analysis of SSR information in the transcriptional group of *Neverita didyma*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 37(3): 215-220 [卢玮筱, 陈永霞, 祁鹏志. 扁玉螺转录组 SSR 信息分析. 渔业科学进展, 2018, 37(3): 215-220]
- Lü ZM, Hou L, Gong L, *et al.* Isolation and analysis on EST microsatellites of *Sepiella japonica* by de novo high-throughput transcriptome sequencing. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2017, 48(4): 877-883 [吕振明, 侯龙, 龚理, 等. 基于 de novo 高通量测序的曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) ESTs 中微卫星位点筛选与特征分析. 海洋与湖沼, 2017, 48(4): 877-883]
- Okutani T. Cuttlefish and squids of the world in color. Tokyo: National Cooperative Association of Squid Processors, 1995, 1-185
- Powell W, Machray GC, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222
- Rizhao Fisheries Research Institute. The first success of the artificial seedling rearing of *Sepia esculenta* Hoyle in our country. Fishery Information And Strategy, 2010, 25(4): 37 [日照市水产研究所. 金乌贼全人工育苗在我国首获成功. 渔业信息与战略, 2010, 25(4): 37]
- Shi YH, Hong K, Guo XM, *et al.* Microsatellite markers screening from EST sequences of *Pinctada martensii* Dunker. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 174-181 [石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 2008, 32(2): 174-181]
- Tan J, Yao GY, Liu ZG, *et al.* SSR information analysis and unigene functional annotation of transcriptome from *Argopecten irradians* "Bohaihong" and *Argopecten irradians concentricus*. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(12): 5242-5250 [谭杰, 姚高友, 刘志刚, 等. 扇贝“渤海红”与墨西哥湾扇贝转录组 SSR 信息分析及 unigene 功能注释. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(12): 5242-5250]
- Toth G, Gaspari ZJ. Microsatellites in different eukaryotic genomes survey and analysis. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981
- Tuler AC, Carrijo TT, N6ia LR, *et al.* SSR markers: A tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). Molecular Biology Reports, 2015, 42(11): 1501-1513
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55
- Wang CC, Tang XY, Xiang J, *et al.* Analysis of SSR marker information in the transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(22): 56-59 [王传聪, 唐修阳, 项杰, 等. 罗氏沼虾转录组 SSR 标记信息分析. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 56-59]
- Wang QL, Liu Y, Song HM, *et al.* Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Osteoglossum bicirrhosum*. Freshwater Fisheries, 2016, 46(6): 8-13 [王且鲁, 刘奕, 宋红梅, 等. 双须骨舌鱼转录组 EST-SSR 标记开发与引物筛选. 淡水渔业, 2016, 46(6): 8-13]
- Wang YH, Hu CQ, Zhang LP, *et al.* A preliminary study on microsatellite markers screening from EST sequences of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 969-976 [王艳红, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾 EST 微卫星标记初步筛选. 水产学报, 2011, 35(7): 969-976]
- Wang ZL, Ding Y, Xu YH, *et al.* Polymorphism of EST-SSRs from *Pinctada martensii* based on transcriptome datasets. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(3): 687-693 [王忠良, 丁燊, 许尤厚, 等. 基于转录组数据的马氏珠母贝 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 687-693]
- Yuan WC, Huang HZ, Li WL, *et al.* Analysis of EST-SSRs information in *Siniperca chuatsi* transcriptome and detection of polymorphism. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(2): 403-409 [袁文成, 黄鹤忠, 李文龙, 等. 翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*) 转录组 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测. 海洋与湖沼, 2015, 46(2): 403-409]
- Zhang JY, Liu CL, He MC, *et al.* A full-length transcriptome of *Sepia esculenta* using a combination of single-molecule long-read (SMRT) and Illumina sequencing. Marine Genomics, 2019, 43: 54-57
- Zhang XY, Zhang XJ, Zhao C, *et al.* The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and analysis on population genetic diversity in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 815-824 [张秀英, 张晓军, 赵翠, 等. 栉孔扇贝 BES-SSR 的开发及遗传多样性分析. 水产学报, 2012, 36(6): 815-824]
- Zhao HJ, Wei BF, Hu M, *et al.* Preliminary study on *Sepia esculenta* oosperm hatching and effects of different adhesion

- substrates. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004, 11(3): 64–68 [赵厚钧, 魏邦福, 胡明, 等. 金乌贼受精卵孵化及不同材料附着基附卵效果的初步研究. *海洋湖沼通报*, 2004, 11(3): 64–68]
- Zheng XD, Ikeda M, Kong LF, *et al.* Genetic diversity and population structure of the golden cuttlefish, *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae) indicated by microsatellite DNA variations. *Marine Ecology*, 2009, 30(4): 448–454
- Zheng XD, Ikeda M, Barinova A, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from the golden cuttlefish, *Sepia esculenta* Hoyle (Cephalopoda). *Molecular Ecology Resources*, 2007, 7(1): 40–42
- Zheng XD, Wang RC. Morphological study on radula of nine cephalopods in the coastal waters of China. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(5): 417–422 [郑小东, 王如才. 中国沿海九种头足类齿舌的形态学. *水产学报*, 2002, 26(5): 417–422]
- Zheng XD, Yang JM, Wang HY, *et al.* Analysis and evaluation of the nutritive composition of the ink of the golden cuttlefish *Sepia esculenta*. *Chinese Journal of Zoology*, 2003, 38(4): 32–35 [郑小东, 杨建敏, 王海艳, 等. 金乌贼墨汁营养成分分析及评价. *动物学杂志*, 2003, 38(4): 32–35]
- Zhou XL, Zhu JH, Dong YH, *et al.* Development and comparative study of genomic-SSR and EST-SSR in *Tegillarca granosa*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 467–475 [周小龙, 朱靖华, 董迎辉, 等. 泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 467–475]

(编辑 冯小花)

Microsatellite Screening and Characterization Analysis of *Sepia esculenta* Based on Full-length Transcriptome Sequencing

ZHANG Jinyong^{1,2,3}, HE Muchun⁴, XIANG Zilong^{1,2,5}, LIU Shufang^{1,2,3①}, ZHUANG Zhimeng^{1,2,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003; 5. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract To better protect the resource of *Sepia esculenta*, we need to understand its population genetic structure. In the field of genetics, microsatellites have become important molecular markers for genetic diversity and marker-assisted breeding, because of their unique advantages, such as abundant polymorphism, rich information, codominance, and conservation. In this study, 177,951 unigenes obtained via transcriptome sequencing of the golden cuttlefish were used to detect and analyze the simple sequence repeat (SSR) loci information using Micro Satellite (MISA) software. The results showed that 161,327 SSR loci were detected in the transcriptome of *S. esculenta*, which are distributed in 64,933 unigenes with a distribution frequency (of SSR loci) of 36.49%, and the frequency of occurrence was 90.66%. Among them, the main types of repeats were mononucleotide, dinucleotides, and trinucleotides, which accounted for 46.00%, 39.93%, and 9.48% of the total SSR, respectively. Among the repeat motifs contained in the SSR, A/T was the predominant repeat type of a mononucleotide, and AT/AT and AC/GT were the dominant repeat types of dinucleotides. There were 66,004 repeat motifs with a length of ≥ 20 bp, accounting for 40.91% of the total number of SSRs, and the number of SSR loci in which low-level motifs (di- and trinucleotide repeats) are dominant. The above results indicated that SSR loci in the transcriptome of golden cuttlefish had a high frequency and a rich variety, and high polymorphic potential. The results provided a powerful reference for the better development of SSR molecular markers and the protection and utilization of *S. esculenta* germplasm resources, genetic diversity evaluation, and future molecular marker-assisted breeding.

Key words *Sepia esculenta*; Transcriptome; SSR; Repeat motif; Loci information

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200524001

http://www.yykxjz.cn/

邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 邱亮, 张庆利. 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 156-164

Zou Y, Guo XM, Wan XY, Qiu L, Zhang QL. Establishment and application of the LAMP detection method for decapod iridescent virus 1 (DIV1). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 156-164

十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用*

邹莹^{1,2} 郭晓萌¹ 万晓媛¹ 邱亮¹ 张庆利^{1,2①}

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究以十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1)主要衣壳蛋白基因为靶序列设计引物,建立了DIV1的环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法,并以pMD18-DIV1质粒标准品为模板对该方法的检测灵敏度、检测特异性等进行了评估。结果显示,此方法最适反应温度为64.4℃,优化后的25 μl反应体系中包含2.5 μl 10×Isothermal amplification buffer、4.0 mmol/L Mg²⁺、1.2 mmol/L dNTPs、6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA聚合酶、0.8 μmol/L EvaGreen[®]和4.4 μl ddH₂O。该方法检测灵敏度下限为3.54×10²拷贝/反应;与虾肝肠胞虫(EHP)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp*_{AHPND})、对虾偷死野田村病毒(CMVN)、传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)、白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)和黄头病毒(YHV)等主要虾类病原没有交叉反应;具有较好的重复性和稳定性。以GeneFinder[®]替换EvaGreen[®]并将其预置于反应管内,结合上述扩增方法可实现对DIV1的现场快速高灵敏检测。本研究建立的DIV1-LAMP实时荧光定量和现场检测方法具有灵敏、特异和快速等特点,为近几年新发虾类病原DIV1的定性、定量以及现场快速检测提供了新的技术选择,有利于对虾养殖业中开展DIV1的监测、预警和防控。

关键词 十足目虹彩病毒(DIV1); 虾血细胞虹彩病毒(SHIV); 环介导等温扩增(LAMP); 检测方法
中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0156-09

虾血细胞虹彩病毒(Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)和红螯螯虾虹彩病毒(*Cherax quadricarinatus* iridovirus, CQIV)是近年报道的、虹彩病毒科中

可感染甲壳类的2种新发病毒(Xu *et al*, 2016; Qiu *et al*, 2017),对对虾养殖业构成了威胁。2014年,SHIV首次在浙江一养殖场的凡纳滨对虾(*Litopenaeus*

* 国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39)和中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费项目(20603022020005)共同资助 [This work was supported by National R&D Program of China (2017YFC1404503), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020005)].

邹莹, E-mail: 15216481627@163.com

① 通讯作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-05-24, 收修改稿日期: 2020-05-31

vannamei) 中被发现。随后几年的流行病学调查显示, 我国沿海包括河北、山东、江苏、浙江和福建等省部分区域养殖凡纳滨对虾中均有SHIV检出(Qiu *et al.*, 2017、2018)。Xu等(2016)研究显示, 红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)中分离到的一种虹彩病毒(CQIV)对凡纳滨对虾也具有较强致病性。

SHIV基因组为双链DNA, 长度约为166 kb, 与CQIV的基因组同源率为99.97%。2019年, 国际病毒分类委员会将二者作为2个病毒株, 统一命名为十足目虹彩病毒1(Decapod iridescent virus, DIV1), 并将其归入虹彩病毒科的一个新属——十足目虹彩病毒属(*Decapodiridovirus*)(Xu *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2017、2019; 陈形, 2019)。目前, 虹彩病毒科共有6个属, 其中, 蛙病毒属(*Ranavirus*)、肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)和淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)均可感染鱼类等脊椎动物(Chinchar *et al.*, 2011; Kurita *et al.*, 2012)。例如, 大鲈虹彩病毒(Giant seaperch iridovirus, GSIV)感染会导致大鲈(*Andrias davidanus*)全身水肿、多脏器受损, 该病毒的流行使大鲈养殖业遭受了重大打击(孟彦, 2013); 而新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)则会引起石斑鱼全身性疾病, 威胁石斑鱼养殖业的发展(Teng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014)。研究发现, DIV1可感染凡纳滨对虾、红螯螯虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarki*)和脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的造血组织和血细胞, 被感染细胞出现核固缩, 细胞质内可见嗜碱性包涵体(Qiu *et al.*, 2017、2019)。感染DIV1后的对虾出现肝胰腺颜色变浅、空肠空胃、停止摄食、活力下降等症状(Qiu *et al.*, 2017、2019)。

目前, DIV1的检测主要依赖Qiu等(2018)基于ATPase基因(GenBank登录号: KY681040)建立的TaqMan探针实时荧光定量PCR和套式PCR检测方法(陈蒙蒙, 2017; 邱亮, 2018)。由于DIV1实时荧光定量

PCR方法对检测仪器设备要求较高, 检测时间长, 无法现在在取样现场对患病对虾进行快速检测。而环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)具有扩增效率高、扩增速度快、恒温扩增无需复杂仪器设备等特点, 非常适用于现场检测(Priyanka *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2012; Shirato, 2019), 目前已被广泛应用于人类、动物卫生和食品相关病原微生物的检测(Notomi *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020)。因此, 本研究基于DIV1的主要衣壳蛋白基因建立了其LAMP检测技术, 以期对DIV1病原的实验室和现场检测及防控提供新的技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

参考Qiu等(2017)的方法, 对购自山东日照的健康凡纳滨对虾进行DIV1人工感染实验, 并使用基因组DNA提取试剂盒(天根, 北京, 中国)提取健康个体和患病个体的基因组DNA。利用NanoDrop 2000c测定所提取DNA的质量和浓度(Thermo Scientific, Waltham, 美国), 然后将DNA保存于-80℃冰箱备用。研究中用到的虾肝肠胞虫(EHP)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp_{AHPND}*)、对虾偷死野田村病毒(CMVN)、传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)、白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)和黄头病毒(YHV)等病原阳性核酸均来自于作者实验室。

1.2 DIV1-LAMP引物设计

本研究利用Primer Explorer V5.0软件, 根据DIV1的衣壳蛋白基因序列(GenBank登录号为ATE87157.1), 设计了3对LAMP扩增引物(表1), 包括2条内引物、2条外引物以及2条环引物。由上海生工生物技术有限公司合成该引物。

表1 DIV1-LAMP反应引物序列
Tab.1 Primer sequences for DIV1-LAMP assay

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence (5'-3')	在MCP基因中的位置 Sites in MCP gene (5'-3')
DIV1-MCP-FIP	CCGCAACATTAGATACGAATCTTCTTTTATCAGTGAGAAGTAATCGGC	332~356 TTTT 290~309
DIV1-MCP-BIP	CCTATGGGATCGAATGCGCTTTTTTTACACAACCGCATCACC	359~378 TTTT 419~436
DIV1-MCP-F3	GTGCCTTG TAGTAGGGTTC	270~288
DIV1-MCP-B3	AATCCAAATGTTTGGTCCAA	437~456
DIV1-MCP-LF	AGATCGTATTCCC GTGATGACT	310~331
DIV1-MCP-LB	CTGATCTGGGTCGAAATCAATCTT	379~402

1.3 DIV1-LAMP 反应条件优化

以 DIV1 阳性核酸为模板, 25 μl LAMP 初始反应体系中包含 2.5 μl 10 \times Isothermal amplification buffer、4 mmol/L MgSO_4 、1.2 mol/L Betaine、1.2 mmol/L dNTPs、1.6 $\mu\text{mol/L}$ DIV1-FIP/BIP、0.2 $\mu\text{mol/L}$ DIV1-F3/B3、0.8 $\mu\text{mol/L}$ LF/LB、6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶、0.8 $\mu\text{mol/L}$ EvaGreen[®]及适量的水, 于实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, California, 美国)中设置 8 个温度梯度(58.0 $^{\circ}\text{C}$ ~68.0 $^{\circ}\text{C}$), 反应 50 min (50 个循环, 每个循环 1 min); MgSO_4 终浓度按照 3.2、4.0、4.8、5.6 mmol/L, dNTPs 终浓度按照 0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 进行反应体系正交实验优化; *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶用量按照 3.2、4.8、6.4、8.0、9.6 U 进行添加; 核酸染料 EvaGreen[®]终浓度分别按照 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的添加量进行优化。每个待优化指标的单个变量设置 3 个重复, 依据扩增 C_t 值和 SD 值选出最佳反应条件。

1.4 DIV1 的质粒标准品制备

以 DIV1 阳性核酸为模板, 通过 DIV1-F3/B3 引物进行 PCR 扩增, 获取 DIV1 靶基因核酸目的片段。将纯化的目的片段接入 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连, 中国)进行克隆和测序验证, 对测序验证正确的克隆扩大培养。随后, 用质粒提取试剂盒(Omega Inc., Norcross, 美国)提取 pMD18-DIV1 质粒, 利用 NanoDrop 2000c 测定质粒浓度。用 TE 缓冲液将 pMD18-DIV1 质粒 10 倍梯度稀释成质粒标准品, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 DIV1-LAMP 分析灵敏度检验和标准曲线的建立

使用梯度稀释的 pMD18T-DIV1 质粒($3.54 \times 10^9 \sim 10^0$ 拷贝/反应)和无 RNA 酶 H_2O 作为模板, 获得 DIV1 的 LAMP 扩增曲线以确定该方法的检测灵敏度, 使用 BioRad CFX96 软件(版本 6.0.14), 以扩增的 C_t 值(y)相对于 pMD18-DIV1 质粒浓度的对数值(x)生成标准曲线。每个浓度设置 3 个重复。

1.6 DIV1-LAMP 分析特异性检验

分别以 EHP、 V_{pAHPND} 、CMNV、IHHNV、WSSV、TSV 和 YHV 等病原的阳性 DNA 或 cDNA 为模板, 检验本研究建立的 LAMP 方法的特异性。反应以 3.54×10^5 拷贝/反应 pMD18-DIV1 质粒为阳性对照, 以未感染 DIV1 的对虾组织 DNA 为阴性对照, 以无 RNA 酶的水为空白对照。

1.7 DIV1-LAMP 方法可重复性和可重现性检验

按照世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疫病诊

断手册》中检测方法确认章节的要求, 对新建立的 DIV1-LAMP 检测方法进行可重复性和可重现性分析。LAMP 检测方法组内可重复性测试, 采用 10 倍浓度梯度稀释的质粒为模板, 对每个浓度的模板设置 3 次平行测试, 利用平行测试产生的 C_t 平均值和标准偏差(SD)来计算组内变异系数 CV。可重现性则以不同实验室环境条件下 LAMP 检测方法对质粒标准品扩增曲线的稳定性来评定, 并利用 SPSS 软件单因素方差分析(One-way ANOVA)对扩增 C_t 值进行差异显著性分析。

1.8 DIV1-LAMP 方法对实际样品的检验

利用本研究建立的 LAMP 方法对人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品进行定性分析, 同时, 利用 TaqMan 荧光定量 PCR 对上述样品进行定性和定量分析, 并对比 DIV1-LAMP 检测方法和 TaqMan 荧光定量 PCR 的分析结果。

1.9 基于 FTA 卡和 LAMP 的 DIV1 现场快速检测方法

利用 1.2 μl GeneFinder[®] 替换 DIV1-LAMP 反应体系中的 EvaGreen[®], 并将其通过粘附剂预先封闭于 200 μl PCR 小管管盖内, PCR 管内添加 30 μl DIV1 LAMP 反应预混液(不含模板和荧光染料 EvaGreen[®]); 按照 Whatman FTA 卡说明书, 利用其提取 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾组织核酸及 2 尾健康对虾组织核酸, 将核酸分别加入上述含有 30 μl DIV1 LAMP 反应预混液的 PCR 小管内, 同时, 设置阳性对照和阴性对照; 在 64.4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 保温 50 min, 然后, 通过在 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 3 min 使预置在管盖内的 GeneFinder[®] 染料脱落进入 LAMP 反应预混液, 完成扩增产物染色。PCR 小管内有扩增产物生成, 则显示为荧光绿色, 表明样品为 DIV1 阳性; PCR 小管内无扩增产物生成, 则显示为橙黄色, 表明样品为 DIV1 阴性。

2 结果

2.1 DIV1 的 LAMP 反应体系条件的优化

LAMP 优化结果显示, 扩增反应温度在 64.4 $^{\circ}\text{C}$ 时, C_t 值(15.44)和重复间 C_t 值标准偏差(SD 值)(0.09)最小(图 1a)。在 64.4 $^{\circ}\text{C}$ 扩增温度下, 综合考虑扩增 C_t 均值及重复测试 C_t 值标准偏差最小、成本经济和方法稳定等因素, 确立优化后的扩增反应预混体系中 dNTPs 和 MgSO_4 的浓度分别为 1.2 和 4.0 mmol/L (图 1b), *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶的用量为 6.4 U (图 1c), EvaGreen[®] 的用量为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ (图 1d)。

2.2 DIV1-LAMP 分析灵敏度检验与标准曲线的建立

使用优化后的 LAMP 反应体系对 10 倍梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒标准品进行检测, 结果显示, 质粒标准品在 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^2$ 拷贝/反应范围内均有较强的荧光信号(图 2a), 说明本研究建立的 DIV1

的 LAMP 检测方法对质粒模板的检测下限可低至 3.54×10^2 拷贝/反应。在 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$ 拷贝/反应的起始模板浓度范围内, pMD18-DIV1 起始模板浓度对数值与扩增反应 C_t 值之间具有良好的线性关系(图 2b)。其关系曲线为 $C_t = -2.918 \text{ Lg}(Sg) + 39.331$, $R^2 = 0.996$ 。

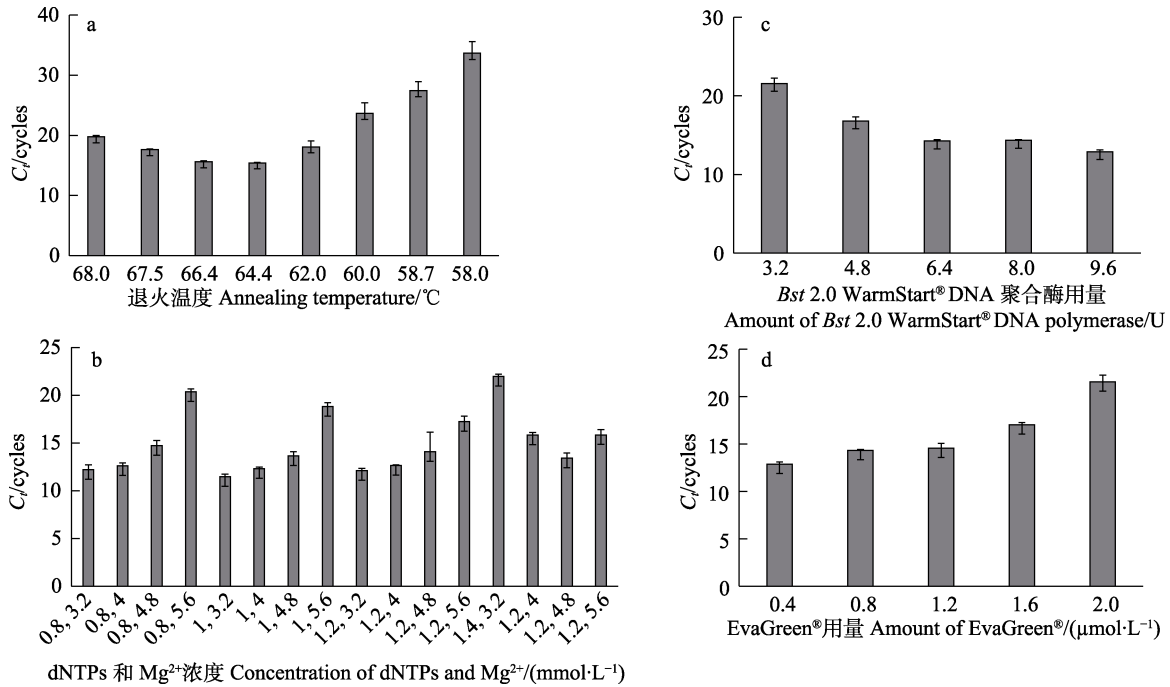


图 1 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 反应体系的优化
Fig.1 Optimization of DIV1-LAMP reaction

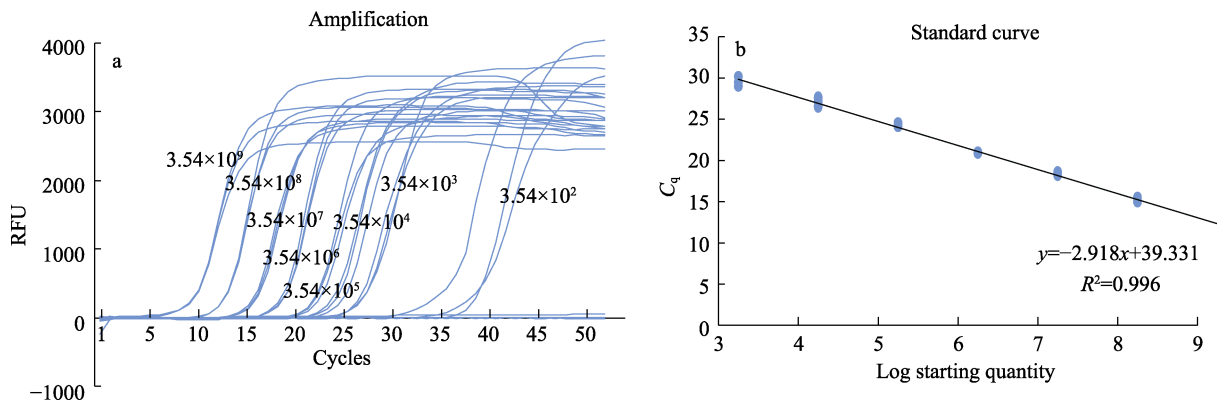


图 2 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 方法以 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板产生的扩增曲线(a)和标准曲线(b)
Fig.2 Amplification curve (a) and standard curve (b) of DIV1-LAMP detection method by using pMD18-DIV1 plasmid standard as templates

a: 以梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板的扩增曲线, pMD18-DIV1 质粒的拷贝数: 3.54×10^9 , 3.54×10^8 , 3.54×10^7 , 3.54×10^6 , 3.54×10^5 , 3.54×10^4 , 3.54×10^3 , 3.54×10^2 拷贝(从左到右);

b: 反应起始模板(pMD18-DIV1)质粒浓度对数值和 C_t 值之间的标准曲线方程

a: LAMP amplification curve of serially diluted 10-fold pMD18-DIV1 plasmid. Copies of pMD18-DIV1 plasmids: 3.54×10^9 , 3.54×10^8 , 3.54×10^7 , 3.54×10^6 , 3.54×10^5 , 3.54×10^4 , 3.54×10^3 , 3.54×10^2 (from left to right);

b: Standard curve equation between log concentration of pMD18-DIV1 plasmid and C_t value.

2.3 DIV1-LAMP 分析特异性检验

以 DIV1、EHP、 Vp_{AHPND} 、CMNV、IHHNV、WSSV、TSV 和 YHV 等主要虾类病原 DNA 或 cDNA 为模板进行 DIV1-LAMP 检测的特异性分析,结果显示,只有当检测样品含有 DIV1 阳性核酸时,扩增反应才产生“S”形扩增曲线,其他病原的核酸均无阳性

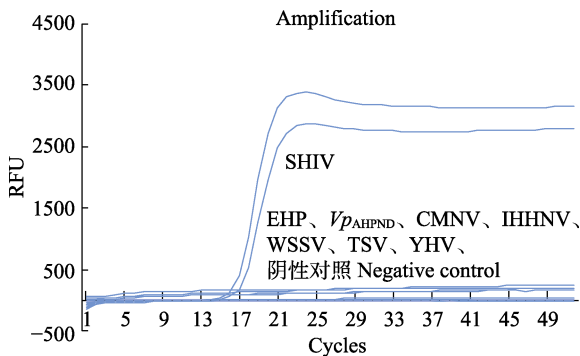


图3 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 方法的分析特异性
Fig.3 Analytical specificity of shrimp hemocyte iridescent virus (DIV1) LAMP assay

扩增曲线(图 3)。该结果说明,本研究建立的 DIV1-LAMP 方法与上述其他常见的对虾病原无交叉反应,可特异性检测 DIV1。

2.4 DIV1-LAMP 方法可重复性和可重现性分析

以 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$ 拷贝/反应的 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板,对 DIV1-LAMP 检测方法的可重复性进行评估。结果显示,在起始模板浓度为 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$ 拷贝/反应的范围内, DIV1-LAMP 检测方法组内和组间检测的变异系数 CV 分别小于 1.89%和 1.63%(表 2),说明在此起始模板浓度范围内该方法稳定性较好。

以 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$ 拷贝/反应的质粒标准品为模板,在 3 个不同实验室环境下进行 DIV1 可重现性分析,结果显示,在上述模板浓度范围内 DIV1-LAMP 反应的组间 C_t 值的 P 值均大于 0.05(表 3),说明不同环境下,该方法扩增标准曲线与即时检测的标准品曲线差异不显著。说明本研究建立的 DIV1-LAMP 方法在不同实验室环境具有良好的可重现性。

表 2 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 检测组内和组间重复性
Tab.2 Intra-assay and inter-assay variability of DIV1-LAMP assay

质粒标准品拷贝数 Copies of plasmid standard	组内 Intra-assay C_t			组间 Inter-assay C_t		
	平均值 Mean	标准偏差 SD	变异系数 CV/%	平均值 Mean	标准偏差 SD	变异系数 CV/%
3.54×10^9	12.15	0.15	1.21	11.66	0.04	0.32
3.54×10^8	15.23	0.23	1.51	14.62	0.04	0.28
3.54×10^7	18.43	0.13	0.71	17.76	0.17	0.94
3.54×10^6	20.92	0.02	0.12	20.53	0.13	0.63
3.54×10^5	24.40	0.24	0.98	24.04	0.23	0.94
3.54×10^4	27.05	0.42	1.55	26.14	0.43	1.63
3.54×10^3	29.51	0.56	1.89	28.72	0.26	0.92

表 3 DIV1-LAMP 分析法的组间变异性
Tab.3 Analysis of variance of inter-assay variability of DIV1-LAMP assay

质粒标准品拷贝数 Copies of plasmid standard	组间 Inter-assay C_t	
	F	P
3.54×10^9	1.254	0.325
3.54×10^8	0.705	0.448
3.54×10^7	4.074	0.114
3.54×10^6	2.372	0.198
3.54×10^5	1.537	0.283
3.54×10^4	3.273	0.145
3.54×10^3	0.833	0.413

2.5 DIV1-LAMP 方法对临床样品的检测

本研究对人工感染 DIV1 3 d 后的 40 尾凡纳滨对虾样品(编号 20191114001~20191114040)分别进行了

LAMP 检测和 TaqMan 荧光定量 PCR 检测,结果显示,2 种方法对病毒载量超过 10^2 copies/ μ l 的样品定性结果基本一致;而对病毒载量低于 10^2 copies/ μ l 的部分样品,LAMP 方法检测结果与 TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果不一致(表 4),说明本方法不适用于分析 DIV1 载量低于 10^2 copies/ μ l 的样品。

2.6 基于 FTA 卡和 DIV1-LAMP 方法的对虾样品 DIV1 现场快速检测

取 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾及 2 尾健康凡纳滨对虾,利用 Whatman FTA 卡现场制备核酸,将核酸加入内置 GeneFinder[®]、含有 DIV1-LAMP 扩增反应预混体系的 PCR 小管内进行等温扩增反应,50 min 后进行显色,结果显示,阳性对照和 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品对应的 PCR 管内呈

表 4 利用 DIV1-LAMP 和 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对人工感染 DIV1 凡纳滨对虾的检测结果
Tab.4 Detection results of DIV1-LAMP and TaqMan qPCR for *L. vannamei* samples artificially infected with DIV1

样本编号 No. of samples	TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果 Result of Real-time PCR(copies/ μ l)	LAMP 检测结果 Result of LAMP assay	样本编号 No. of samples	TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果 Result of Real-time PCR(copies/ μ l)	LAMP 检测结果 Result of LAMP assay
20191114001	1.95×10^8	+	20191114021	3.67×10^7	+
20191114002	3.63×10^8	+	20191114022	3.81×10^6	+
20191114003	2.89×10^8	+	20191114023	1.31×10^4	+
20191114004	3.59×10^8	+	20191114024	3.63×10^4	+
20191114005	3.16×10^8	+	20191114025	3.80×10^6	+
20191114006	3.94×10^5	+	20191114026	2.60×10^3	+
20191114007	3.20×10^8	+	20191114028	2.42×10^2	+
20191114008	1.02×10^9	+	20191114029	8.55×10^1	-
20191114009	1.80×10^8	+	20191114030	1.24×10^3	+
20191114010	3.79×10^7	+	20191114031	8.53×10^2	+
20191114011	5.72×10^8	+	20191114032	5.64×10^2	+
20191114012	1.66×10^8	+	20191114033	9.48×10^1	-
20191114013	2.78×10^8	+	20191114034	2.05×10^4	+
20191114014	4.17×10^8	+	20191114035	1.95×10^4	+
20191114015	9.37×10^7	+	20191114036	6.25×10^4	+
20191114016	1.09×10^7	+	20191114037	5.11×10^1	-
20191114017	1.36×10^8	+	20191114038	6.10×10^1	-
20191114018	6.36×10^7	+	20191114039	7.81×10^1	-
20191114019	1.11×10^7	+	20191114040	1.04×10^2	-
20191114020	1.49×10^6	+			

注：“+”表示 DIV1-LAMP 检测结果呈阳性，“-”表示 DIV1-LAMP 检测结果呈阴性

Note: "+" indicates the positive result of DIV1-LAMP assay, and "-" indicates the negative result of DIV1-LAMP assay

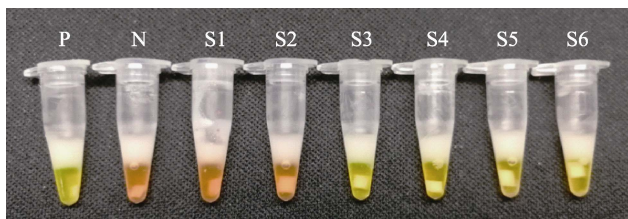


图 4 利用 FTA 卡和 DIV1-LAMP 方法现场检测凡纳滨对虾样品中 DIV1 的显色图

Fig.4 Results of on-site detection of DIV1 in *L. vannamei* by using FTA card and DIV1-LAMP assay

P: 阳性对照; N: 阴性对照; S1~S6: 凡纳滨对虾样品
P: Positive control; N: Negative control;
S1~S6: Samples of *L. vannamei*

荧光绿色, 为 DIV1 阳性, 而阴性对照及 2 尾健康凡纳滨对虾样品对应的 PCR 管内呈橙红色, 为 DIV1 阴性(图 4)。该结果说明, 利用 Whatman FTA 卡进行核酸现场制备, 结合核酸染料 GeneFinder[®]预制成扩增反应体系小管内的方法, 可以实现对感染 DIV1 对虾的现场快速检测。

3 讨论

本研究基于 DIV1 主要衣壳蛋白基因设计 DIV1 的 LAMP 扩增引物, 在优化 LAMP 反应温度、各试剂组分浓度和用量的基础上建立了 DIV1-LAMP 实时荧光检测技术。本着成本经济和体系稳定的原则, 以求得扩增反应最小 C_t 值和 SD 值为目标, 确定优化后的 DIV1-LAMP 扩增温度和反应体系, 反应温度在 64.4℃ 时最佳; 优化后的反应体系中的 $MgSO_4$ 和 dNTPs 浓度分别为 4.0 和 1.2 mmol/L, *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶和 EvaGreen[®] 的用量分别为 6.4 U 和 0.8 μ mol/L。该技术通过 *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶进行等温扩增, 利用 EvaGreen[®] 染料指示反应过程, 能够实现对 DIV1 靶基因的实时荧光快速检测。

以 10 倍浓度梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒为模板扩增并构建的标准扩增曲线结果显示, 在 $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$ 拷贝/反应的范围内, 起始模板浓

度对数值与扩增 C_t 值间呈良好的线性关系 ($R^2=0.996$), 利用扩增 C_t 值可准确评估起始模板拷贝数, 这表明在该浓度范围内, 本研究所建立的 LAMP 方法适合作为 DIV1 定量检测的有效工具。前期多项有关 LAMP 实时荧光定量方法的研究显示, 由于 LAMP 反应本身的特性, 当起始模板浓度 <1000 拷贝时, 起始模板浓度对数值与扩增 C_t 值的相关系数明显降低(Mori *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017)。本研究中, DIV1-LAMP 在低拷贝起始模板条件下的定量分析结果与此前的相关报道一致, 这也说明 DIV1-LAMP 方法不适用于对低拷贝(<1000)模板进行准确定量。Qiu 等(2018)基于 DIV1 基因组中 ATPase 基因(*ORF114R*)所设计的引物和探针, 建立了 DIV1 的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法, 该方法于实验室条件下可在 2.5 h 内完成检测, 检测限低至 4 拷贝/反应, 可用于 DIV1 感染早期的检测预警, 适用于对对虾苗种、出入境对虾样品等进行 DIV1 病原的筛查。与已报道的 DIV1 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法相比, 本研究建立的 DIV1-LAMP 检测方法在实验室条件下可在 50 min 完成反应, 检测时间大大缩短, 且成本低廉, 可用于发病对虾(一般携带较高拷贝病原)样品的快速检测和辅助诊断, 适用于水产技术推广部门、研究单位进行 DIV1 流行病学调查的大规模定性或定量检测。

作者实验室此前比较了基于 DIV1 ATPase 基因和衣壳蛋白基因开发的 2 种 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法, 发现上述 2 个目标基因对检测方法灵敏度和特异性的影响很小。本研究对人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品分别进行基于 ATPase 基因的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法和基于衣壳蛋白基因的 LAMP 方法检测, 结果显示, 2 种方法对病毒载量低于 10^2 copies/ μ l 的部分样品的检测结果不一致, 推测其原因可能是由于本研究中所建立的 DIV1-LAMP 方法不适用于分析病毒载量低于 10^2 copies/ μ l 的样品所致。

目前, LAMP 技术在病原检测领域的应用已十分广泛, 该技术也被用于多种水生动物相关致病细菌、病毒和真菌的检测中。如 Arunrut 等(2016)报道一种以胶体金为探针的 LAMP-AuNP 方法, 可快速检测 $V_{P_{AHPND}}$ 的 *PirA* 基因, 检出限为 100 CFU, 具有很高的实用价值。Zhang 等(2017)和李小平(2018、2019)分别利用 RT-LAMP 技术研发出对虾偷死野田村病毒和行动障碍野田村病毒(Movement disorder nodavirus, MDNV)的定量检测方法, 并通过将核酸染料添加到反应体系中的方法, 使 LAMP 检测结果可视化。Kumar 等(2018)利用 LAMP 方法与 Whatman FTA 卡

相结合的方法, 用于检测引起对虾生长缓慢的虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)的 SSU rRNA 基因, 可实现对 EHP 的现场快速检测。基于对虾养殖者、养殖企业、水产技术推广部门和研究单位等开展 DIV1 现场快速检测的需求, 本研究在建立 DIV1-LAMP 荧光定量方法的基础上, 通过结合 Whatman FTA 卡现场制备对虾组织核酸和显色染料预置的方法, 实现了对 DIV1 的现场快速检测。整个检测无需 PCR 仪等复杂或昂贵的仪器设备, 只需温度计和保温杯提供恒温水浴即可完成检测, 检测过程不超过 1 h, 单个检测反应成本相当于 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的 1/10 ~ 1/5。

综上所述, 本研究建立并优化了一种检测 DIV1 的 LAMP 实时荧光定量检测方法, 其特异性强, 速度快, 成本低, 适用于在实验室内对患病对虾进行 DIV1 的快速检测或辅助诊断。同时, 本研究还将 Whatman FTA 卡核酸现场制备方法与 DIV1-LAMP 方法相结合, 进一步开发了 DIV1 的现场快速高效检测技术, 适用于开展养殖对虾的 DIV1 现场快速检测。本研究为 DIV1 这一新发虾类病原提供了可靠的检测方法, 对实现低成本、大规模、快速 DIV1 检疫, 以及控制该病毒性疫病的传播和流行具有重要意义。

致谢: 中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室研究生协助 DIV1 感染对虾取样和核酸提取, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- Arunrut N, Kampeera J, Sirithammajak S, *et al.* Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA-functionalized gold nanoparticles as probes. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151769
- Chen MM. Application of real-time PCR in detection of pathogens VP_{AHPND} and SHIV of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [陈蒙蒙. 实时荧光定量 PCR 在凡纳滨对虾病原 $V_{P_{AHPND}}$ 及 SHIV 检测中的应用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Chen X. Susceptible host survey of Decapod iridescent virus 1(DIV1). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [陈彤. 十足目虹彩病毒 1(DIV1)的易感宿主调查. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- Chinchar VG, Yu KH, Jancovich JK. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates. *Viruses*, 2011, 3(10): 1959-1985
- Jiang T, Liu J, Deng YQ, *et al.* Development of RT-LAMP and real-time RT-PCR assays for the rapid detection of the new duck Tembusu-like BYD virus. *Archives of Virology*, 2012,

- 157(12): 2273–2280
- Kumar TS, Krishnan AN, Rajan JJS, *et al.* Visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid diagnosis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Parasitology Research*, 2018, 117(5): 1485–1493
- Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses. *Viruses*, 2012, 4(4): 521–538
- Li P, Yan Y, Wei S, *et al.* Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities. *Virus Research*, 2014, 188: 146–154
- Li XP. Establishment and application of nucleic acid detection techniques for two emerging shrimp viruses. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [李小平. 两种对虾新发病毒核酸检测技术的建立及应用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Li XP, Wan XY, Zhang QL, *et al.* Molecular epidemiological survey of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustaceans in China in 2016–2017. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 65–73 [李小平, 万晓媛, 张庆利, 等. 2016–2017 年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒 (CMNV) 分子流行病学调查. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 65–73]
- Meng Y. Isolation, identification, genome sequencing of a novel *Ranavirus* isolate in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) and genetic diversity of Chinese giant salamander. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2013 [孟彦. 大鲵虹彩病毒病原的分离、鉴定、基因组测序及大鲵群体遗传多样性分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2013]
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, *et al.* Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(2): 145–157
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1–5
- Priyanka N, Siddhant J, Prasad S. An integrated one-step assay combining thermal lysis and loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) in 30 min from *E. coli* and *M. smegmatis* cells on a paper substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 291(15): 74–80
- Qiu L, Chen MM, Wan XY, *et al.* Characterization of a new member of Iridoviridae, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11834
- Qiu L, Chen MM, Wan XY, *et al.* Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 95–101
- Qiu L, Chen X, Zhao R, *et al.* Description of a natural infection with Decapod iridescent virus 1 in farmed giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*, 2019, 11(4): 354
- Qiu L. Viral metagenomics analysis of farmed shrimp and molecular epidemiological study of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV). Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2018 [邱亮. 养殖对虾的病毒宏基因组分析及虾血细胞虹彩病毒 (Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV) 的分子流行病学研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2018]
- Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiology and Immunology*, 2019, 63(10): 407–412
- Silva SJRD, Pardee K, Pena L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review. *Viruses*, 2020, 12(1): 193–203
- Suzuki Y, Narimatsu S, Furukawa T, *et al.* Comparison of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of noroviruses in municipal wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(4): 369–372
- Teng Y, Hou Z, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, 2008, 377(1): 39–48
- Wei H, Zeng J, Deng C, *et al.* A novel method of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification developed for rapid and quantitative detection of human astrovirus. *Journal of Virological Methods*, 2013, 188(1–2): 126–131
- Wong YP, Othman S, Lau YL, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 626–643
- Xu L, Wang T, Li F, *et al.* Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(1): 17–26
- Zhang QL, Liu S, Yang HL, *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of covert mortality nodavirus in shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 150: 130–135

Establishment and Application of the LAMP Detection Method for Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1)

ZOU Ying^{1,2}, GUO Xiaomeng¹, WAN Xiaoyuan¹, QIU Liang¹, ZHANG Qingli^{1,2}①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method of Decapod iridescent virus 1 (DIV1) was established and optimized based on primers designed from the DIV1 capsid protein gene in present study. Analytic sensitivity of the newly established method was assessed using the pMD18-DIV1 plasmid standard as a template, and the detection specificity was also determined. The results showed that the optimal reaction temperature for the DIV1-LAMP method was 64.4 °C, and the optimized 25 μl reaction system contained 2.5 μl 10×isothermal amplification buffer, 4.0 mmol/L Mg²⁺, 1.2 mmol/L dNTPs; 6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA polymerase and 0.8 μmol/L EvaGreen[®]. The detection limit of the new method was 3.54×10² copies/reaction; it did not cause a cross-reaction with major shrimp pathogens such as *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), *Vibrio* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (*Vp*_{AHPND}), covert mortality nodavirus (CMNV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), white spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), or yellow head virus (YHV). The newly developed method showed good repeatability and stability. The on-site, rapid, highly sensitive detection method of DIV1 was established by replacing EvaGreen[®] with GeneFinder[®] which was preset in the cap of the reaction tube. The DIV1-LAMP real-time fluorescence and on-site LAMP detection method established in this study is sensitive, specific, and rapid. This novel method will provide new technical options for the qualitative, quantitative, and rapid on-site detection of the emerging DIV1, which will benefit the shrimp farming industry by facilitating the monitoring, early warning, and prevention of DIV1.

Key words Decapod iridescent virus 1 (DIV1); Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV); Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Detection method

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190810002

http://www.yykxjz.cn/

宁梓健, 姜宏波, 刘琦, 包杰. 虾肝肠胞虫全基因组分泌蛋白的预测分析. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 165–173

Ning ZJ, Jiang HB, Liu Q, Bao J. Genome-wide prediction and analysis of secreted proteins of *Enterocytozoon hepatopenaei*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 165–173

虾肝肠胞虫全基因组分泌蛋白的预测分析*



宁梓健 姜宏波 刘琦 包杰^①

(沈阳农业大学 畜牧兽医学院 沈阳 110866)

摘要 分泌蛋白是在细胞内合成后分泌到细胞外起作用的蛋白质, 其在许多原生动植物寄生虫操纵宿主细胞和影响虫体的毒力中起着重要作用。虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是一种可感染多种经济虾类的专性细胞内寄生虫, 是近年来影响全球对虾养殖生产较严重的病害之一。本研究利用真核生物分泌蛋白预测流程 EuSecPred2.0 对 EHP 全基因组的分泌蛋白进行预测, 并对分泌蛋白长度、信号肽长度、切割位点处氨基酸分布等信息进行分析, 对分泌蛋白功能进行分析。结果显示, 分泌蛋白氨基酸长度主要集中在 30~400 aa 之间; 信号肽长度集中在 9~32 aa 之间; 信号肽切割位点处以疏水性氨基酸为主。对信号肽进行基序分析, 发现存在基序 NV[VT][IK]CA[ED][SA]。对所获蛋白质进行功能注释, 发现了多种与微孢子虫黏附侵染、调节细胞周期和免疫反应等相关的关键蛋白。研究结果有助于了解 EHP 对宿主的侵染机制, 同时为进一步明确 EHP 的致病相关因子提供理论依据。

关键词 虾肝肠胞虫; 基因组; 分泌蛋白; 信号肽; 基序

中图分类号 Q18 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0165-09

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是一种严格细胞内寄生的微孢子虫, 成熟的孢子呈椭圆形, 大小为 $(1.4\pm 0.3)\times(0.8\pm 0.1)\ \mu\text{m}$, 后端有 1 个空泡, 胞内含 1 个细胞核, 5~6 圈极丝, 1 个与极丝相连的锚定盘和 1 层电子致密的孢子壁(乔毅等, 2018)。EHP 于 2009 年首次从斑节对虾(*Penaeus monodon*)中发现并命名(Tourtip *et al.*, 2009), 感染 EHP 的对虾往往正常进食, 但生长缓慢甚至停滞, 直接影响到养殖产量, 给养殖户带来严重的经济损失(刘珍等, 2016; 宋增磊等, 2019), 如何预防和治疗 EHP 已经成为对虾养殖产业急需解决的科学问题。明确 EHP 的入侵机理是切断 EHP 的传播途径和针对性用药的基础。EHP 的一些生物合成途径和

三羧酸循环的基因缺失表明其对宿主有很强的依赖性(Katinka *et al.*, 2001), 需要从宿主吸收营养完成生活史发育, 因此, 在进化过程中微孢子虫进化出一种极其复杂和独特的感染机制以抵抗宿主免疫系统的攻击。

分泌蛋白(Secreted protein)是在细胞内合成后分泌到细胞外起作用的蛋白质, 已有研究表明, 其是介导真核病原微生物与宿主之间相互作用的重要因子(McKerrow *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 2012)。在其他微孢子虫中已有研究表明, 一些分泌蛋白在虫体入侵宿主过程中扮演着重要角色(李田等, 2013; Wang *et al.*, 2015)。因此, 查找和分析 EHP 的分泌蛋白对于揭示入侵机理和虫体的免疫逃避将具有重要意义。目前,

* 现代农业产业技术体系(CARS-48)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48)].

宁梓健, E-mail: 897290003@qq.com

^① 通讯作者: 包杰, E-mail: baojie@syau.edu.cn

收稿日期: 2019-08-10, 收修改稿日期: 2019-10-09

对 EHP 在虾体内的感染机制了解甚少,尤其是在宿主-寄生虫相互作用水平上。本研究在基因组测序数据的基础上,利用生物信息学方法在全基因组范围内预测 EHP 的分泌蛋白,同时,对所得分泌蛋白的功能进行注释,并对其序列特征和基序进行分析,研究结果可为筛选 EHP 致病相关因子和探究其侵染机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 基因组数据来源和主要分析软件

虾肝肠胞虫基因组数据来源于 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),其 NCBI 登录号为 MNPJ00000000.1。

用到的主要分析软件和网站如下:蛋白质跨膜结构域预测软件 Tmhmm-2.0c(Krogh *et al*, 2001),线粒体蛋白预测软件 MitoProt II (Claros *et al*, 1996),细胞核蛋白预测软件 Nucpred-1.1(Brameier *et al*, 2007)、NLStradamus.1.7(Nguyen Ba *et al*, 2009)和 PredictNLS (<https://roslab.org/owiki/index.php/PredictNLS>),蛋白质信号肽预测软件 SignalP-4.0(Petersen *et al*, 2011),蛋白质 GPI 锚定位点预测软件 Kohgpi-1.5(Fankhauser *et al*, 2005),蛋白质亚细胞定位预测软件 TargetP-1.1 (Emanuelsson *et al*, 2000)和 WoLF PSORT(Horton *et al*, 2007),真核生物分泌蛋白预测程序 EuSecPred2.0 (<https://silkipathdb.swu.edu.cn/eusecpred>),氨基酸组成分析软件 WebLogo(<http://weblogo.threepiusone.com/create.cgi>)(Crooks *et al*, 2004),蛋白质序列基序分析程序为 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)(Bailey *et al*, 2009)。

1.2 分泌蛋白的预测

针对 EHP 全基因组的蛋白质编码序列,运行 EuSecPred 2.0 在线流程筛选分泌蛋白(Druzhinina *et al*, 2012)。由于本程序的局限性,只能预测到经典途径分泌的蛋白质,可能会漏掉部分非经典途径分泌的蛋白质。运行 Tmhmm 程序去除跨膜蛋白,运行 Nucpred、NLStradamus.pl 和 PredictNLS 程序剔除其中的细胞核蛋白质,然后,通过 SignalP-4.0 过滤掉其中无信号肽序列的蛋白质,通过 MitoProt 程序过滤掉定位于线粒体的蛋白,利用 TargetP 和 WoLF PSORT 对具有信号肽的蛋白质进行亚细胞定位预测,保留定位于细胞膜外的蛋白质,最后,利用 Kohgpi 程序剔除具有 GPI 锚定位点的蛋白质,最终得到 EHP 的分泌蛋白集合。

1.3 分泌蛋白的功能分析

利用 BLASTP 程序,将预测获得的 EHP 分泌蛋白序列分别与数据库 Nr 和 Swiss-Prot 数据库进行比对,将比对结果中得分最高的同源序列的功能作为对应分泌蛋白的功能参考(李田等, 2013; 罕园园等, 2014)。

1.4 分泌蛋白的序列特征分析

根据 SignalP-4.0 信号肽预测的结果,截取所有分泌蛋白的信号肽序列,并统计分泌蛋白和信号肽序列的长度以及各类氨基酸组成,同时,截取信号肽剪切位点前后各 3 个氨基酸,并利用 WebLogo 对其组成进行统计,然后,利用 MEME 程序预测分泌蛋白和信号肽中的基序。

2 结果与分析

2.1 预测的虾肝肠胞虫分泌蛋白

利用 EuSecPred 流程对获得的 2548 个虾肝肠胞虫蛋白质序列进行预测,发现具有跨膜域的蛋白有 2018 个,1741 个蛋白质具有细胞核定位信号,144 个蛋白质具有信号肽序列,126 个蛋白具有线粒体定位信号,119 个蛋白具有亚细胞定位信号,筛选后最终获得了 109 个分泌蛋白(表 1)。

2.2 虾肝肠胞虫分泌蛋白的功能分类

预测获得 109 个分泌蛋白,对其进行功能注释得出,其中 60 个蛋白质(占预测所得分泌蛋白的 54.05%)为无明确功能信息的蛋白质,另外 49 个分泌蛋白在数据库中检索到了同源蛋白,其中酶类数目最多,包括具有调控宿主细胞增殖和免疫系统功能的酶类:多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶和泛素羧基末端水解酶;同时,还预测到 1 个孢壁蛋白:SWP7,孢壁蛋白被认为在粘附、侵染以及致病等方面扮演着重要角色;另外,预测到 2 种蛋白抑制因子: α -胰蛋白酶抑制剂重链 H1、亮氨酸拉链假定肿瘤抑制因子 2,这 2 种蛋白抑制因子可能会抑制宿主免疫系统、调控细胞增殖;还预测到 2 种糖蛋白(图 1)。

2.3 虾肝肠胞虫分泌蛋白的序列特征

2.3.1 分泌蛋白与信号肽的长度和氨基酸组成 虾肝肠胞虫 109 个分泌蛋白序列长度范围为 30~700 aa,主要集中在 30~400 aa,平均长度为 219.34 aa,中值为 181.00 aa(图 2);信号肽长度范围在 9~32 aa,主要长度集中在 15~20 aa,平均长度为 18.09 aa,中值为 18.00 aa(图 3)。

表 1 预测的虾肝肠胞虫分泌蛋白基因及序列分析
Tab.1 Coding genes and sequence information of the predicted EHP secreted proteins

基因编号 Gene ID	基因名称 Gene name	基因长度 Length of gene (bp)	GC 含量 Content of GC (%)	蛋白质长度 Length of protein (aa)	信号肽长度 Length of signal peptide (aa)
EHP00_2619	Hypothetical protein	192	30	63	20
EHP00_2497	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	249	34	82	16
EHP00_2643	Hypothetical protein	264	20	87	23
EHP00_634	Leucine zipper putative tumor suppressor 2 homolog	942	25	313	17
EHP00_1709	Hypothetical protein	369	21	122	15
EHP00_1921	Hypothetical protein	246	22	81	17
EHP00_1834	Hypothetical protein	366	21	121	18
EHP00_1831	Hypothetical protein	849	18	282	21
EHP00_2132	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	108	22	35	24
EHP00_1676	Hypothetical protein	720	24	239	15
EHP00_1895	ATP-dependent rRNA helicase spb4	573	21	190	11
EHP00_1099	Serine hydroxymethyltransferase	1398	34	465	25
EHP00_1094	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	543	29	180	17
EHP00_2309	V-type proton ATPase subunit a, vacuolar isoform	597	29	198	15
EHP00_1540	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha 2	1122	24	373	18
EHP00_732	Hypothetical protein	951	18	316	18
EHP00_2316	Hypothetical protein	363	21	120	17
EHP00_738	Hypothetical protein	1059	24	352	18
EHP00_739	Prosolanapyrone synthase	228	35	75	22
EHP00_743	C-terminal-binding protein 2	528	24	175	20
EHP00_750	Hypothetical protein	555	34	184	19
EHP00_751	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	627	29	208	26
EHP00_1904	Hypothetical protein	1038	28	345	32
EHP00_1639	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	546	24	181	14
EHP00_1636	Gap junction alpha-5 protein	966	30	321	19
EHP00_1635	Hypothetical protein	402	23	133	1
EHP00_2130	Protein C2	210	40	69	28
EHP00_696	Nuclear pore complex protein Nup153	750	25	249	18
EHP00_711	Hypothetical protein	867	21	288	16
EHP00_1530	Hypothetical protein	1794	22	597	19
EHP00_879	Zinc finger protein 778	387	20	128	20
EHP00_878	Protein NETWORKED 4A	444	23	147	16
EHP00_877	Hypothetical protein	480	21	159	20
EHP00_868	Hypothetical protein	1155	18	384	19
EHP00_1803	Uncharacterized protein YggL	600	38	199	24
EHP00_2112	Glycoprotein	174	19	57	20
EHP00_508	Hypothetical protein	459	25	152	17
EHP00_506	Hypothetical protein	420	26	139	19
EHP00_2251	Demethylmenaquinone methyltransferase	765	21	254	21
EHP00_772	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	561	22	186	19
EHP00_773	Linear gramicidin synthase subunit C	1236	24	411	18

续表

基因编号 Gene ID	基因名称 Gene name	基因长度 Length of gene (bp)	GC 含量 Content of GC (%)	蛋白质长度 Length of protein (aa)	信号肽长度 Length of signal peptide (aa)
EHP00_1718	Protocadherin Fat 4	843	28	280	12
EHP00_1408	Probable cell cycle serine/threonine-protein kinase CDC5 homolog	1776	29	591	18
EHP00_168	Hypothetical protein	588	24	195	19
EHP00_2110	Hypothetical protein	429	23	142	23
EHP00_964	Phosphopantetheine adenylyltransferase	423	18	140	17
EHP00_962	Large tegument protein deneddylase	366	19	121	15
EHP00_1331	Hypothetical protein	687	21	228	19
EHP00_2121	Hypothetical protein	243	26	80	19
EHP00_2122	Hypothetical protein	171	24	56	9
EHP00_1752	Translation machinery-associated protein 22	1380	23	459	15
EHP00_944	SWP7	753	34	250	21
EHP00_2111	Protein FAM178B	189	26	62	16
EHP00_268	Hypothetical protein	207	28	68	17
EHP00_266	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 3	684	23	227	23
EHP00_1549	Hypothetical protein	546	23	181	17
EHP00_1547	Hypothetical protein	519	23	172	19
EHP00_1546	Hypothetical protein	654	20	217	18
EHP00_1545	Trigger factor	498	22	165	17
EHP00_1717	Hypothetical protein	216	16	71	14
EHP00_1449	Phosphate acyltransferase	450	25	149	23
EHP00_613	Uncharacterized Sell-like repeat-containing protein C1B3.10c	1755	28	584	15
EHP00_2114	Hypothetical protein	258	29	85	19
EHP00_2574	Hypothetical protein	1257	21	418	16
EHP00_2577	Hypothetical protein	393	20	130	22
EHP00_1194	Hypothetical protein	456	16	151	19
EHP00_1185	Hypothetical protein	438	20	145	22
EHP00_1182	Hypothetical protein	1257	21	418	16
EHP00_2131	UPF0182 protein SACE_1102	180	21	59	19
EHP00_1483	Protein Teyrha-meyrha	639	36	212	19
EHP00_2119	Hypothetical protein	177	21	58	26
EHP00_1595	30S ribosomal protein S17	987	22	328	17
EHP00_2586	Decapping and exoribonuclease protein 1	471	29	156	22
EHP00_2123	Hypothetical protein	141	35	46	13
EHP00_477	Hypothetical protein	840	28	279	22
EHP00_480	Hypothetical protein	1200	26	399	15
EHP00_1976	Histone transcription regulator 3 homolog	366	25	121	18
EHP00_1942	Nebulin-related-anchoring protein	285	22	94	20
EHP00_1612	Hypothetical protein	1035	23	344	15
EHP00_372	Coatomer subunit beta'-2	2286	28	761	23
EHP00_393	Hypothetical protein	516	25	171	20

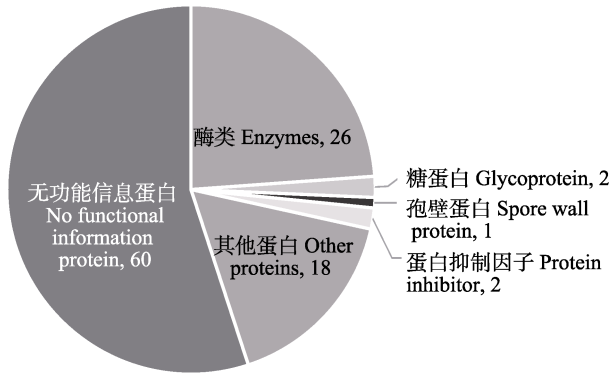


图 1 虾肝肠胞虫分泌蛋白的功能分类

Fig.1 Functional classification of EHP secreted proteins

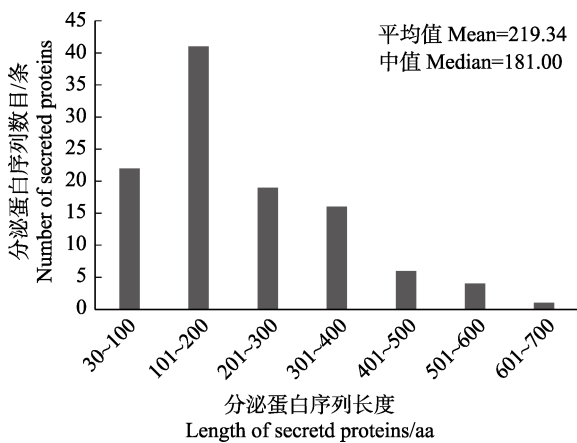


图 2 虾肝肠胞虫分泌蛋白氨基酸长度分析

Fig.2 Analysis of the lengths of EHP secreted proteins

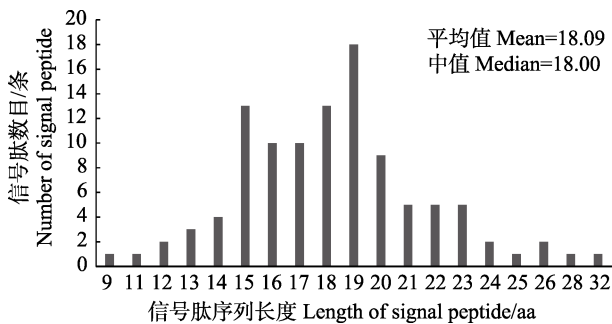


图 3 虾肝肠胞虫分泌蛋白信号肽长度分析

Fig.3 Analysis of the signal peptides length of secreted proteins in EHP

对分泌蛋白和信号肽的氨基酸组成统计分析发现, 分泌蛋白和信号肽均以疏水性氨基酸为主(图 4)。分泌蛋白序列中疏水性氨基酸占比为 42.57%, 其次是亲水性氨基酸, 占比为 29.30%。而信号肽同样以疏水性氨基酸为主, 占比高达 68.93%, 而亲水性氨基酸比例仅为 22.42%。

2.3.2 信号肽剪切位点处氨基酸组成 统计信号肽剪切位点前后各 3 个氨基酸的组成(图 5), 分析发

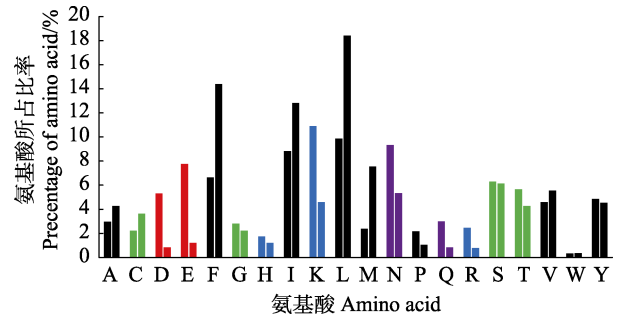


图 4 虾肝肠胞虫分泌蛋白的氨基酸组成

Fig.4 Amino acid composition of EHP secreted proteins

A: 丙氨酸 Ala; C: 半胱氨酸 Cys; D: 天冬氨酸 Asp; E: 谷氨酸 Glu; F: 苯丙氨酸 Phe; G: 甘氨酸 Gly; H: 组氨酸 His; I: 异亮氨酸 Ile; K: 赖氨酸 Lys; L: 亮氨酸 Leu; M: 甲硫氨酸 Met; N: 天冬酰胺 Asn; P: 脯氨酸 Pro; Q: 谷氨酰胺 Gln; R: 精氨酸 Arg; S: 丝氨酸 Ser; T: 苏氨酸 Thr; V: 缬氨酸 Val; W: 色氨酸 Trp; Y: 酪氨酸 Tyr。每种氨基酸上方左侧柱为在所有分泌蛋白序列中占有的比率, 右侧柱为在所有信号肽序列中占有的比率。黑色为疏水性氨基酸, 绿色为亲水性氨基酸, 红色为酸性氨基酸, 蓝色为碱性氨基酸, 紫色为中性氨基酸。下同 Left column above each amino acid is the ratio in all secreted protein sequences. Right column above each amino acid is the ratio in all signal peptide sequences. Black column: Hydrophobic amino acid; Green column: Hydrophilic amino acid; Red column: Acid amino acid; Blue column: Basic amino acid. The same as below

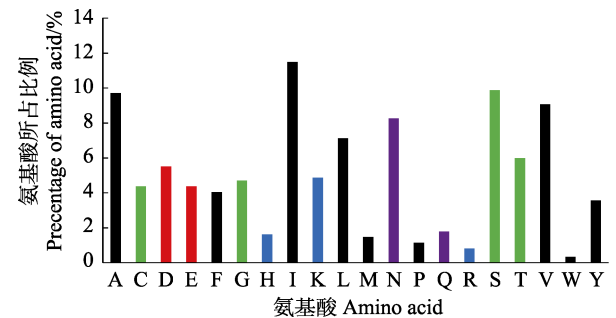


图 5 虾肝肠胞虫分泌蛋白信号肽剪切位点处氨基酸的组成

Fig.5 The composition of amino acids flanking the signal peptide splice site in the secretory proteins of EHP

现, 与整个信号肽氨基酸组成类似, 信号肽剪切位点氨基酸组成同样以疏水性氨基酸为主, 其占比为 47.90%, 其中, 异亮氨酸(I)和丙氨酸(A)含量最丰富; 亲水性氨基酸占比为 34.95%, 其中, 丝氨酸(S)和天冬酰胺(N)所占比例较高。从各个位置的氨基酸组成分析, 上游的-3 位主要为异亮氨酸(I), -2 位主要为苯丙氨酸(F), 紧邻信号肽剪切位点的-1 和 1 位主要为丙氨酸(A), 下游的 3 位同样主要为异亮氨酸(I) (图 6)。

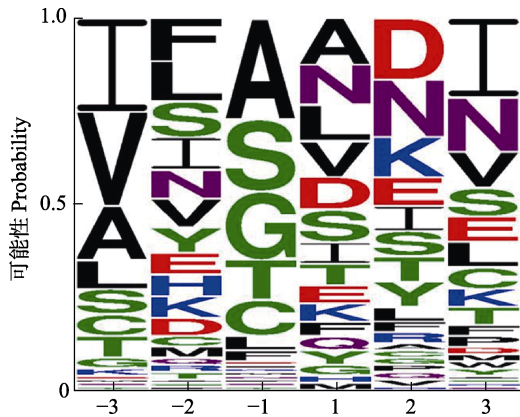


图6 虾肝肠胞虫分泌蛋白信号肽剪切位点处氨基酸组成
Fig.6 Composition patterns of amino acids flanking the signal peptide splice site in the secreted proteins of EHP

2.3.3 分泌蛋白和信号肽中的基序 对虾肝肠胞虫信号肽区域的基序分析,发现了1种氨基酸组成模式: NV[VT][IK]CA[ED][SA](图7)。对其非信号肽区分析发现3种基序: VAYDMFLSRCILHMLDVMMMLYVE

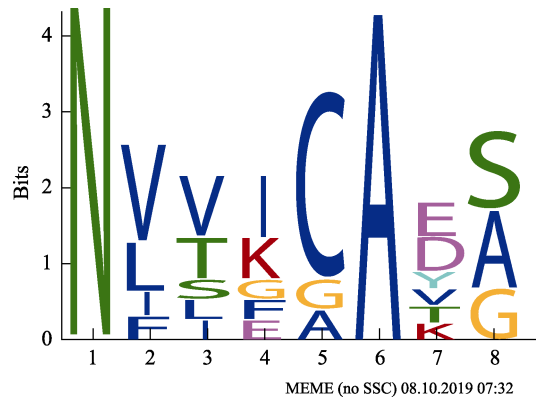


图7 虾肝肠胞虫分泌蛋白信号肽基序
Fig.7 Motif in signal peptide of EHP secreted proteins

NESFMDQVAEVFCFNWTATEFYNSIIR, [QM]L[RK]
[FA]QN[TR][ND]G[SC][NK]D[NE][KE]I[SK][QE]L[KF]
[IE]KIK[TE][MI]C[NK][RK]I[ED][LA][IF][VI][NF][MK]
[VI][VE]Q[QA][QM][TQ][YN][QE][LI]K[ME]DD[PH]
和 SCFGKFSFPISNRSAEYFKTVYDQWNETLVKIPV
KIYRTTL(图8)。

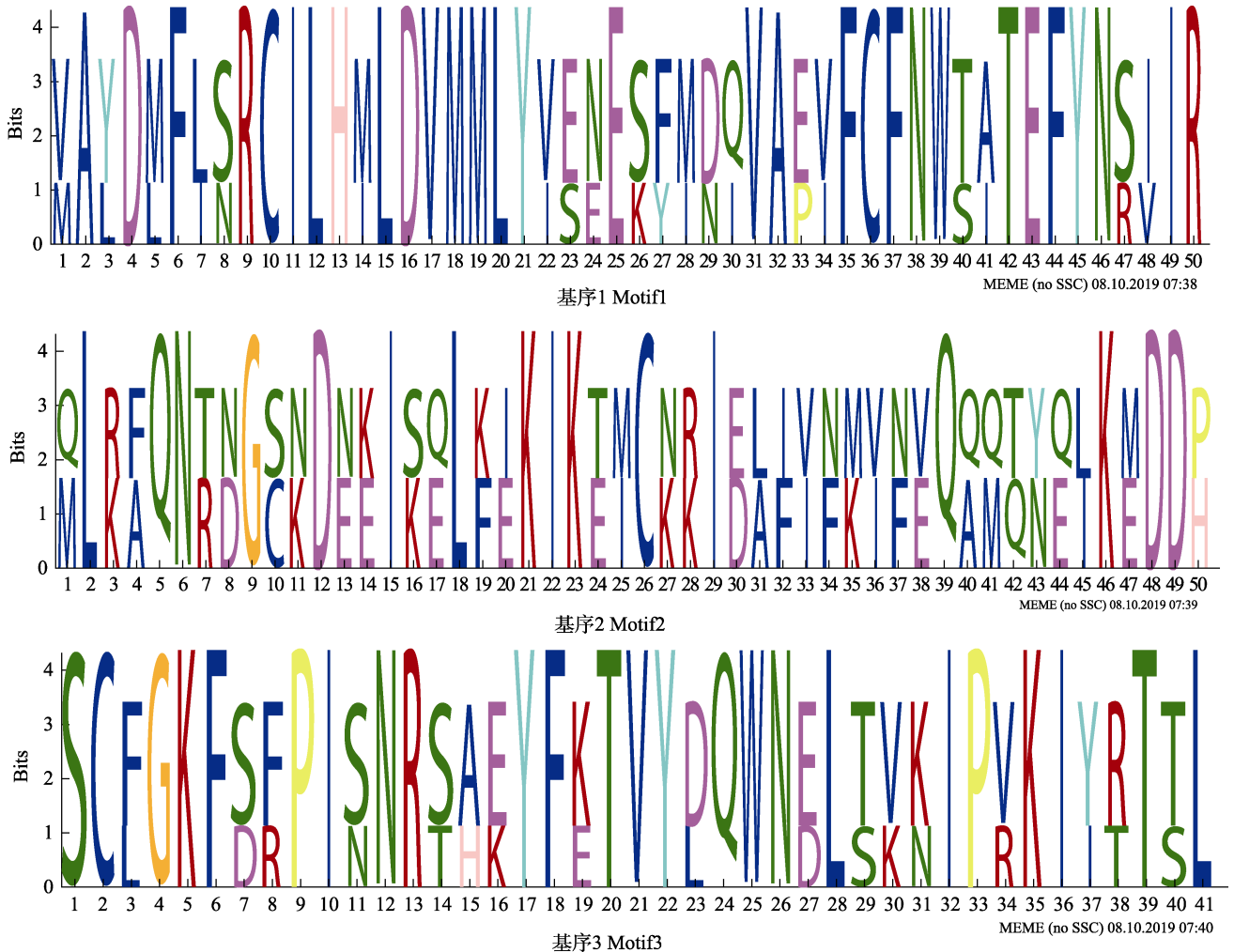


图8 虾肝肠胞虫非信号肽区基序
Fig.8 Motif in non-signal peptide of EHP secreted proteins

3 讨论

对于专性胞内寄生的微孢子虫来说, 目前, 仅有一些关于孢壁蛋白分离方法的报道(吴正理等, 2007), 尚没有分泌蛋白的分离方法。生物信息学算法的快速发展为成功预测微孢子虫的分泌蛋白提供了可能。本研究基于虾肝肠胞虫基因组数据库, 运行 EuSecPred 2.0 在线流程在全基因组 2548 条蛋白质中进行筛选和预测, 最终获得了 109 条分泌蛋白, 这些分泌蛋白组成以疏水性氨基酸为主, 这与其信号肽和剪切位点前后各 3 个氨基酸组成相一致。

本研究预测获得的 109 条分泌蛋白, 其中, 60 个是无功能注释的蛋白质, 这部分蛋白质可能是虾肝肠胞虫分泌的特有蛋白质。在有明确功能注释的 49 个分泌蛋白中, 有些是与微孢子虫黏附和入侵相关的蛋白, 如孢壁蛋白(Spore wall protein, SWP)、钙粘蛋白(Cadherin)和多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 12 (Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12, GALNT12)。孢壁(Spore wall)是微孢子虫最外层的结构, 在侵染过程中, 孢壁应最先与宿主细胞接触。孢壁蛋白作为孢壁的主要成分, 对维持孢壁稳固结构和保护胞内原生质起着重要作用, 同时直接参与侵染过程中与宿主细胞的特异性识别过程。Jaroenlak 等(2018)鉴定并分离了 EHP 的第 1 个孢壁蛋白(EhSWP1), 在其 N 末端发现了 3 个肝素结合基序, 进一步的体外结合实验、竞争实验和诱变研究表明, EhSWP1 能够和肝素结合进而引发入侵。同样, Yang 等(2018)研究证明, 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)的部分孢壁蛋白在粘附和侵染过程中起关键作用, 本研究中筛选的 SWP7 也可能与 EHP 的入侵相关。钙粘蛋白是 1 种 Ca 依赖的细胞粘着糖蛋白, 可能与宿主细胞的靶向信号识别并粘附; 同时, Frixione 等(1994)研究表明, Ca^{2+} 会以某种方式触发孢子萌发。GALNT12 是合成 O-糖链的起始酶, 而粘蛋白主要由 O-糖链组成, 参与很多与粘附相关的过程, O-糖链还可调控细胞表面受体的表达, 进而影响细胞的生长和凋亡(刘可人等, 2006)。因此, 推测 EHP 侵染过程中分泌的 GALNT1 可能参与到宿主细胞的识别和粘附。

在这些分泌蛋白中还有一些抑制宿主免疫功能的分泌蛋白。 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H1(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, ITIH1)可调控细胞外基质稳定并抑制 C5 转化酶活性(Zhuo *et al*, 2008), 进而抑制宿主免疫系统。泛素羧基末端水解酶(Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, UCH)可水解被泛素(Ubiquitin)标记的需要被分解的蛋白质, 也可

以标记跨膜蛋白, 然后通过酶促反应相互连接, 进而介导靶蛋白的降解或跨膜运输。Ciechanover 等(2000)研究表明, 泛素蛋白水解系统在广泛的细胞基本过程中发挥重要作用。其中, 包括调节细胞周期、调节免疫和炎症反应、控制信号转导途径、发育和分化、DNA 修复等。这些复杂的过程是通过蛋白质的单个或子集的特异性降解来控制的。虾肝肠胞虫 UCH7 在侵染过程中的信号传递及调控宿主免疫方面行使何种功能尚需研究进行明确。

另外, 还有调控细胞增殖的蛋白, 比如亮氨酸拉链假定肿瘤抑制因子 2 (Leucine zipper putative tumor suppressor, LZTS2), 拥有特定的亮氨酸拉链结构域(LZ), 参与 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 β -catenin 的表达及细胞内分布, 与 NF- κ B 拥有广泛的相互作用, 从而调控细胞增殖和凋亡(Peng *et al*, 2011; 王泉雄等, 2014)。在微管系统中, LZTS2 也有重要的调节作用, 可抑制细胞的有丝分裂和迁移(张轶等, 2016)。EHP 分泌的 LZTS2 是否能抑制宿主细胞的增殖和迁移从而抑制宿主细胞行使其功能尚需进一步研究。

分泌蛋白在多种寄生虫系统中介导粘附和侵袭, 对于明确胞内寄生虫的感染机制至关重要。本研究初步筛选了 109 个分泌蛋白, 接下来进一步对这些分泌蛋白进行功能研究对于理解虾肝肠胞虫的入侵机理具有重要意义。

参 考 文 献

- Nguyen Ba A, Pogoutse A, Provart N, *et al*. NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC bioinformatics*, 2009, 10(1): 202
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, *et al*. MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2): W202–W208
- Brameier M, Krings A, MacCallum RM. NucPred—Predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*, 2007, 23(9): 1159–1160
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *BioEssays*, 2000, 22(5): 442–451
- Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241(3): 779–786
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, *et al*. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome research*, 2004, 14(6): 1188–1190
- Druzhinina IS, Shelest E, Kubicek CP. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 337(1): 1–9
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, *et al*. Predicting subcellular

- localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 300(4): 1005–1016
- Fankhauser N, Mäser P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 1846–1852
- Frixione E, Ruiz L, Undeen AH. Monovalent cations induce microsporidian spore germination *in vitro*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1994, 41(5): 464–468
- Gupta N, Hartmann A, Lucius R, *et al.* The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* secretes a soluble phosphatidylserine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(27): 22938–22947
- Han YY, Ma KL. A genome-wide prediction and analysis of secreted proteins of *Tupaia chinensis*. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2014, 24(4): 33–37 [罕园园, 马开利. 树鼩全基因组分泌蛋白的预测分析. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 33–37]
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, *et al.* WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 2007, 35(S2): W585–W587
- Jaroenlak P, Boakye DW, Vanichviriyakit R, *et al.* Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Parasites and Vectors*, 2018, 11(1): 177
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, *et al.* Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 2001, 414(6862): 450–453
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567–580
- Li T, Liu XL, Han B, *et al.* A genome-wide prediction and analysis on secreted proteins of *Nosema bombycis*. *Science of Sericulture*, 2013, 39(2): 295–301 [李田, 刘显林, 韩冰, 等. 家蚕微孢子虫全基因组分泌蛋白的预测分析. *蚕业科学*, 2013, 39(2): 295–301]
- Liu KR, Jin MF, Wu SL. Prediction of O-glycosylation site and catalytic characteristics of glycosylation enzyme. *Chemistry of Life*, 2006, 26(1): 25–27 [刘可人, 金美芳, 吴士良. O-糖基化位点预测及糖基化酶催化特点. *生命的化学*, 2006, 26(1): 25–27]
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, *et al.* The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, 1993, 47(1): 821–853
- Peng Y, Clark C, Luong R, *et al.* The leucine zipper putative tumor suppressor 2 protein LZTS2 regulates kidney development. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(46): 40331–40342
- Petersen TN, Brunak S, Heijn GV, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785–786
- Qiao Y, Shen H, Wan XH, *et al.* Preliminary isolation and morphological observation of *Enterocytozoon hepatopenaei* infecting the shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 1051–1058 [乔毅, 沈辉, 万夕和, 等. 南美白对虾肝肠胞虫的分离及形态学观察. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 1051–1058]
- Song ZL, Dong X, Zhao RH, *et al.* Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 122–132 [宋增磊, 董宣, 赵若恒, 等. 基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 122–132]
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29
- Wang XX, Yang G, Zhang DM, *et al.* LZTS2 tumor suppressor gene and advancements in tumor research. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2014, 41(20): 1328–1332 [王泉雄, 杨光, 张大明, 等. LZTS2 抑癌基因与肿瘤相关性的研究进展. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(20): 1328–1332]
- Wang Y, Dang X, Ma Q, *et al.* Characterization of a novel spore wall protein NbSWP16 with proline-rich tandem repeats from *Nosema bombycis* (microsporidia). *Parasitology*, 2015, 142(4): 534–542
- Wu ZL, Tan XH, Pan GQ, *et al.* Extraction of spore wall proteins of *Nosema bombycis* with improved methods. *Science of Sericulture*, 2007, 33(1): 62–66 [吴正理, 谭小辉, 潘国庆, 等. 家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 孢壁蛋白提取方法的优化研究. *蚕业科学*, 2007, 33(1): 62–66]
- Yang D, Pan L, Chen Z, *et al.* The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Experimental Parasitology*, 2018, 187: 93–100
- Zhang Y, Yu WW, Tao RY, *et al.* LZTS2: A novel tumor suppressor play an important role in tumor. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(12): 2372–2375 [张轶, 余稳稳, 陶瑞雨, 等. LZTS2 抑癌基因在肿瘤中的作用机制. *现代生物医学进展*, 2016, 16(12): 2372–2375]
- Zhuo L, Kimata K. Structure and function of inter- α -trypsin inhibitor heavy chains. *Connective Tissue Research*, 2008, 49(5): 311–320

Genome-Wide Prediction and Analysis of Secreted Proteins of *Enterocytozoon hepatopenaei*

NING Zijian, JIANG Hongbo, LIU Qi, BAO Jie^①

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract Secreted proteins are synthesized in cells and secreted to function outside the cell. They play an important role in the manipulation of host cells and the virulence of many eukaryotic protozoan parasites. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is an obligate intracellular parasite that can infect a variety of economically valuable shrimp species, and is one of the most serious diseases affecting global shrimp production. Here, we predict the secreted proteins of the EHP genome with the EuSecPred2.0 pipeline and analyzed the length of these secreted proteins, the length of the signal peptide, and the amino acid distribution at the cleavage site, and annotated the function of secreted proteins. The results show that the length of the secreted proteins ranged from 30 to 400 amino acid residues, the signal peptides covered approximately 9~32 amino acids, and the cleavage sites of the signal peptides were mainly composed of hydrophobic amino acids. Motif analysis revealed a NV[VT][IK]CA[ED][SA] motif in signal peptides. Functional annotation of proteins revealed that a variety of key proteins are involved in adhesion and infection of microsporidia, regulation of cell cycle, and immune response. The results shed light on the infection mechanism of EHP and provide a theoretical basis for further defining the pathogenic factors of EHP.

Key words *Enterocytozoon hepatopenaei*; Genome; Secreted protein; Signal peptide; Motif

① Corresponding author: BAO Jie, E-mail: baojie@syau.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190820003

http://www.yykxjz.cn/

李翠苹, 翟倩倩, 王想, 李健. 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 174-180

Li CP, Zhai QQ, Wang X, Li J. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp culture ponds and analysis of its drug resistance and virulence genes. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 174-180

对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其 耐药特征、毒力基因分析*



李翠苹^{1,2} 翟倩倩² 王想^{2,4} 李健^{2,3①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

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

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

4. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 为了解对虾养殖池中副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的耐药性和毒力基因的携带情况, 2018年从山东4个地区的对虾养殖池收集分离副溶血弧菌, 采用Kirby-Bauer纸片法检测其对12种抗生素的耐药性, 用PCR方法检测其携带耐热直接溶血素基因(*tdh*)和耐热相关溶血素基因(*trh*)的情况。从对虾养殖池共分离副溶血弧菌50株。药敏实验结果显示, 副溶血弧菌对庆大霉素、硫酸新霉素和氨苄西林的耐药情况最为严重, 耐药率分别高达98%、90%和86%, 对氟苯尼考、氯霉素、头孢他啶等敏感性较高, 耐药率分别为10%、10%和20%。88%的菌株具有多重耐药性。毒力基因检测结果显示, 所有菌株均不携带*tdh*基因, 4%的菌株表现为*trh*阳性。本研究表明, 对虾养殖水环境中的副溶血弧菌对抗生素的耐药性较为严重, 应加强副溶血弧菌的病原学监测, 在养殖过程中合理使用抗生素, 以实现水产养殖业健康发展。

关键词 副溶血弧菌; 耐药性; 毒力基因; 对虾养殖池

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0174-07

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 广泛存在于养殖水域、底泥和沉积物中, 附着于海洋生物的体表进行生长繁殖, 为重要的病原性弧菌, 其引发的水产动物疾病不仅会对水产养殖业造成重大的经济损失, 还对人体健康构成潜在威胁(黄梦诗等, 2019; 王娜等, 2016; 李国等, 2008; Su *et al.*, 2007)。目前, 副溶血弧菌已成为世界上多个沿海国家和地区急性胃肠炎的重要病原菌之一, 严重者

可引起伤口感染和败血症等。在我国, 副溶血弧菌引起的食物中毒高居微生物性食物中毒的第2位(Hu *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016)。与副溶血弧菌致病力相关的毒力因子主要为溶血素类, 包括耐热直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)、不耐热直接溶血素(Thermolabile hemolysin, TLH)和耐热相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)(Wang *et al.*, 2008)。其中, 分别由*tdh*和*trh*基因编码的TDH和TRH被认为

* 现代农业产业技术体系专项(CARS-48)和泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System(CARS-48), and Program of Shandong Leading Talent(LJNY2015002)].

李翠苹, E-mail: lcp1201@163.com

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

收稿日期: 2019-08-20, 收修改稿日期: 2019-09-23

是副溶血弧菌的主要致病因子,几乎存在于所有临床分离株中,而来自美国、欧洲和亚洲的研究分析显示,环境样品中的*tdh*和*trh*基因的阳性率仅为0~6% (Alam *et al*, 2002; Hervio-Heath *et al*, 2002; Depaola *et al*, 2000)。

使用抗生素是治疗和预防细菌性感染的重要手段,在水产养殖过程中抗生素的过度使用和不规范使用,导致副溶血弧菌耐药性逐年上升,甚至出现交叉耐药和多重耐药等现象,给水产疾病的治疗带来巨大挑战(张德福等, 2018; Li *et al*, 2014)。耐药细菌一旦通过食物链等途径传播给人类,将会导致临床抗生素治疗的失效,严重威胁人类健康。

本研究旨在调查山东地区对虾养殖池中副溶血弧菌的耐药状况,并从分子层面对其毒力基因的携带

情况进行调查,以期为我国临床治疗副溶血弧菌感染及水产养殖业合理使用抗生素提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株 2018年4~8月期间,分别从山东省日照、青岛、烟台和潍坊4个地区养殖场内,随机采集12个对虾健康生长无病害的养殖池内的水样,每个池塘随机取4个不同地点的水样,每个地点15 ml,混合均匀后,取100 μ l涂板。经分离纯化,共得到50株副溶血弧菌,具体采样信息及菌株数见表1。药敏性测定标准质控菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922,购自北纳生物。

表1 50株副溶血弧菌采样点信息
Tab.1 Sampling site information of 50 strains of *V. parahaemolyticus*

采样地点 Sampling sites	采样时间 Sampling time	菌株数(株) Number of strains (strains)
山东青岛卓越海洋集团有限公司 Excellent Ocean Group Co., LTD	2018.04~2018.08	47
山东海阳黄海水产养殖有限公司 Yellow Sea Aquaculture Co., LTD	2018.04~2018.08	3
山东潍坊海丰水产养殖有限公司 Haifeng Aquaculture Co., LTD	2018.04~2018.08	0
山东日照海辰水产有限公司 Haichen Aquatic Products Co., LTD	2018.04~2018.08	0

1.1.2 实验药物及试剂 庆大霉素、盐酸多西环素、氟苯尼考、氯霉素、硫酸新霉素、磺胺甲噁唑、复方新诺明、恩诺沙星、诺氟沙星、头孢他啶、氨苄西林和呋喃唑酮 12 种抗生素药敏纸片均购自杭州微生物试剂公司。TSB 液体培养基、TCBS 培养基和 MH 琼脂培养基,均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 实验仪器 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)、PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、麦氏比浊仪(法国 Bio-Merieux 公司)、电泳仪(美国 Bio Rad 公司)和凝胶成像系统(美国 Kodak 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离纯化 在超净工作台内,将水样均匀涂布于 TCBS 琼脂培养基,置于 28℃ 恒温培养箱内培养 20~24 h,观察菌落形态。将培养出的细菌进行划线纯化,再挑取单菌落接种到 TSB 培养基,过夜培养,部分菌液置于 4℃ 冰箱保存备用,部分菌液加 20% 甘油冻存于 -80℃ 冰箱。

1.2.2 菌株鉴定 挑取 TCBS 平板上的疑似副溶

血弧菌蓝绿色单菌落,利用副溶血弧菌生化检测试剂盒进行生化鉴定,生化实验阳性的菌株,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,具体方法按照说明书进行。针对副溶血弧菌 16S rRNA 和 HSP60 设计 2 对特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:DNA 模板 2 μ l;上下游引物 F/R (10 μ mol/L)各 1 μ l; 2 \times Reaction Mix 10 μ l; 灭菌 ddH₂O 5.9 μ l; Golden DNA 聚合酶 0.1 μ l。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,选取条带明亮的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行同源比对。本研究用全部引物序列及反应条件见表 2。

1.2.3 副溶血弧菌药敏实验 采用美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 Kirby-Bauer 纸片法对副溶血弧菌进行 12 种常见抗生素的药物敏感性实验,副溶血弧菌过夜培养后,用 0.85% 无菌生理盐水调菌液浓度至 0.5 麦士比浊度,用无菌棉签涂布整个 MH 培养基后贴药敏纸片,28℃ 恒温培养箱内培养 24~28 h,

测量抑菌圈直径。以大肠杆菌菌 ATCC25922 作为质控菌株。记录各类药物对副溶血弧菌菌株产生的抑

菌圈直径, 并根据 CLSI 标准对实验结果进行判定(表 3)。

表 2 引物序列及反应条件
Tab.2 Primer sequence and reaction condition

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	长度 Size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	反应条件 Reaction condition
16S rRNA-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	1400	55	94°C 3 min, (94°C 45 s, 55°C 45 s,
16S rRNA-R	TACGGTTACCTTGTTACGACTT			72°C 1 min) 35 个循环, 72°C 10min
HSP60-F	ACAACAGCAACGGTACTAGC	550	51	94°C 3 min, (94°C 45 s, 51°C 45 s,
HSP60-R	CAACTTTCACCGATGCCAC			72°C 45 s) 35 个循环, 72°C 10 min
Tdh-F	CTAAATAGGGCTGTTCGGCT	294	51.5	94°C 3 min, (94°C 45 s, 51.5°C 45 s,
Tdh-R	GAAAAGGGACAGATGGAAGC			72°C 45s) 35 个循环, 72°C 10 min
Trh-F	CTTTTCCTTCTCCAGTTTCG	237	51.3	94°C 3 min, (94°C 45 s, 51.3°C 45 s,
Trh-R	CAGAAAGAGCAGCCATTGTG			72°C 45s) 35 个循环, 72°C 10 min

表 3 抗菌药物抑菌圈直径判定标准(mm)
Tab.3 Criteria for judging the diameter of
antimicrobial circle (mm)

抗生素 Antibiotic	敏感 S Susceptible	中介 I Intermediate	耐药 R Resistant
氨苄西林 Ampicillin	≥17	14~16	≤13
头孢他啶 Ceftazidime	≥21	18~20	≤17
庆大霉素 Gentamicin	≥15	13~14	≤12
盐酸多西环素 Doxycycline	≥14	11~13	≤10
诺氟沙星 Norfloxacin	≥17	13~16	≤12
复方新诺明 Sulfamethoxazole	≥16	11~15	≤10
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	≥17	13~16	≤12
恩诺沙星 Enrofloxacin	≥17	13~16	≤12
氯霉素 Chloramphenicol	≥18	13~17	≤12
氟苯尼考 Florfenicol	≥20	17~19	≤16
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	≥17	13~16	≤12
呋喃唑酮 Furazolidone	≥17	15~16	≤14

1.2.4 副溶血弧菌毒力基因检测 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取副溶血弧菌基因组 DNA, 采用

PCR 对毒力基因 *tdh*、*trh* 进行检测。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及反应条件见表 2。PCR 反应体系为同 1.2.2。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖(1.0×TAE)凝胶电泳 20 min 后, 使用凝胶成像系统分析结果。将条带明亮的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2 结果

2.1 副溶血弧菌的分离鉴定

从山东省日照、青岛、烟台和潍坊 4 个地区采集的对虾养殖池中的水样, 经 TCBS 分离纯化培养后, 对其进行 16S rRNA 和 HSP60 基因扩增, 将单一明亮的目的条带送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI-Blast 比对后, 确定 50 株副溶血弧菌(GenBank 登录号分别为 MN419060、MN419061、MN419062、MN419063、MN419064、MN419065、MN419066、MN419067、MN419068、MN419069、MN419070、MN419071、MN419072、MN419073、MN419074、MN419075、MN419076、MN419077、MN419078、MN419079、MN419080、MN419081、MN419082、MN419083、MN419084、MN419085、MN419086、MN419087、MN419088、MN419089、MN419090、MN419091、MN419092、MN419093、MN419094、MN419095、MN419096、MN419097、MN419098、MN419099、MN419100、MN419101、MN419102、MN419103、MN419104、MN419105、MN419106、MN419107、MN419108 和 MN419109), 47 株分离自山东青岛卓越海洋集团有限

公司对虾养殖池, 3 株分离自山东海阳黄海水产养殖有限公司对虾养殖池。

2.2 副溶血弧菌的药物敏感性分析

50 株副溶血弧菌的药物敏感性结果见表 4。仅 1 株副溶血弧菌对所有抗生素均表现为敏感, 其余 49 株呈现出不同程度的抗生素抗性, 98% 的菌株具有耐药性。耐药率最高的是氨基糖苷类药物庆大霉素和硫酸新霉素, 分别达 98% 和 90%; 其次是青霉素类药物氨苄西林, 耐药率为 86%; 此外, 水产养殖中禁止使用的硝基咪唑类药物呋喃唑酮, 耐药率高达 74%。所分离副溶血弧菌对酰氨醇类药物氟苯尼考、氯霉素较敏感, 耐药率均为 10%。副溶血弧菌分离株多重耐药情况严重, 多重耐药菌 44 株, 占总菌株数的 88%, 最严重的可耐 7 种抗菌药物, 其中, 耐 6 种抗生素的菌株数量最多(32%), 多重耐药菌株的比例见图 1。

表 4 50 株副溶血弧菌的药敏实验结果
Tab.4 Drug susceptibility test results of 50 strains of *V. parahaemolyticus*

抗生素 Antibiotic	耐药 R Resistant	中介 I Intermediate	敏感 S Susceptible	耐药率 Drug resistance rate (%)
庆大霉素 Gentamicin	49	1	0	98
盐酸多西环素 Doxycycline	33	2	15	66
氟苯尼考 Florfenicol	5	3	42	10
氯霉素 Chloramphenicol	5	6	39	10
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	45	4	1	90
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	35	11	4	70
复方新诺明 Sulfamethoxazole	30	0	20	60
恩诺沙星 Enrofloxacin	23	3	24	46
诺氟沙星 Norfloxacin	20	2	28	40
头孢他啶 Ceftazidime	10	20	20	20
氨苄西林 Ampicillin	43	4	3	86
呋喃唑酮 Furazolidone	37	4	9	74

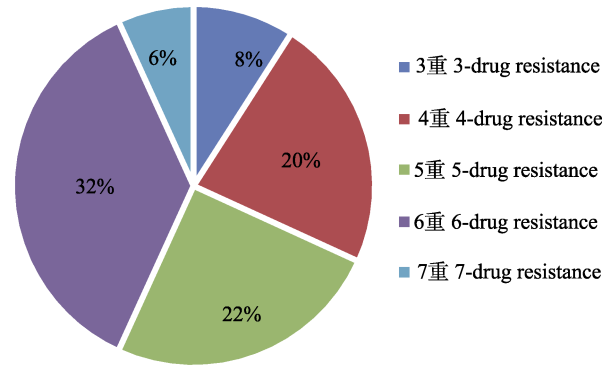


图 1 副溶血弧菌多重耐药菌株比例
Fig.1 Proportion of multidrug resistance of *V. parahaemolyticus*

2.3 毒力基因检测

耐热直接溶血素和耐热相关溶血素是副溶血弧菌的主要毒力因子, 通过PCR对毒力基因进行检测, 并将条带明亮的样品测序, 结果显示, 50株副溶血弧菌均未检测到*tdh*基因, 仅2株副溶血弧菌检测到*trh*基因, *trh*携带率为4%。*trh*毒力基因PCR扩增结果见图2。

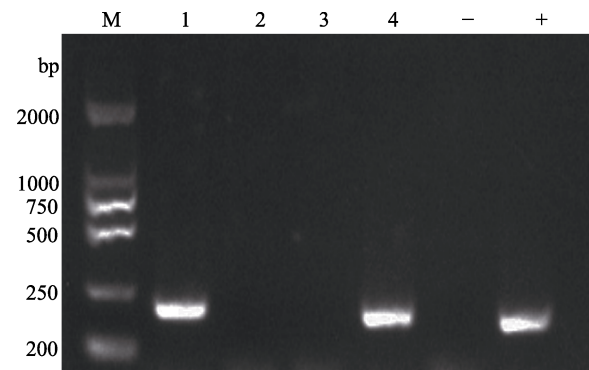


图 2 部分副溶血弧菌 *trh* 基因扩增电泳图谱
Fig.2 Electrophoretogram of the *trh* gene amplification from some of the *V. parahaemolyticus*

M: Marker; 1~4: *trh*; +: 阳性对照 Positive control (ATCC17802); -: 阴性对照 Negative control (ddH₂O)

3 讨论

现阶段, 细菌耐药性问题已经引起世界范围的广泛关注, 世界卫生组织(WHO)将其作为 21 世纪威胁人类健康的重大挑战之一(Levy *et al*, 2004; Neu, 1992)。2016 年 9 月 5 日, G20 峰会上通过的《二十国集团领导人杭州峰会公报》中明确指出, 抗生素耐药性严重威胁公共健康、经济增长和全球经济稳定, 并认为有必要从体现 20 国集团自身优势的角度, 采取

包容的方式应对抗生素耐药性问题,以实证方法预防和减少抗生素耐药性,同时推动研发新的和现有的抗生素。《2017年食品安全关键技术研发重点专项申报指南》中,将重要食源性致病菌耐药机制及传播规律研究作为首要研究任务,要求针对我国食源性致病菌耐药性不断加重的严峻形势,重点关注水产品和畜禽产品等具有世界性优势的农产品,以食源性致病菌为对象,研究细菌耐药性产生与传播的机制。耐药性副溶血弧菌不仅给海水养殖业带来巨大的经济损失,还可通过食物链传播给人类,严重威胁人类食品安全和身体健康,并给临床治疗带来巨大挑战(Li *et al.*, 2015; Willis, 2000)。作为最重要的食源性致病菌之一的副溶血弧菌的耐药性及致病性应引起足够重视。

美国最早于1978年发现了氨苄西林抗性的副溶血性弧菌菌株(Blake *et al.*, 1979),到目前为止,抗药性副溶血性弧菌在全球都有检出,并随着抗药能力的提高,研究者从临床和水产品中分离得到越来越多的副溶血性弧菌多重耐药菌株。2009年上海市售水产品分离的副溶血弧菌,有近70%的菌株对氨苄西林表现为耐药,并有20株表现为多重耐药,对萘啶酸等3种抗生素完全敏感(安秀华等, 2009)。广东省2014年分离病例源、食品源副溶血弧菌共60株,其对氨苄西林均耐药,磺胺复合物耐药率达43.3%,对庆大霉素等其他抗生素的耐药率均低于10.0%(李柏生等, 2015)。在大西洋海岸美国马里兰州沿海海湾分离的副溶血弧菌,对青霉素类抗生素的耐药率很高,其中,青霉素耐药率为68.00%,氨苄西林耐药率为53.00%,对哌拉西林和链霉素的耐药率较低,均为4.00%(Shaw *et al.*, 2014)。根据魏大伟(2018)报道,临床及水产品中副溶血弧菌抗生素耐药率较高,环境中除了青霉素类耐药以外,总体表现为对抗生素敏感。这与本研究结果有所不同,本研究从山东省4个地区水产养殖环境分离得到50株副溶血弧菌,这50株副溶血弧菌对抗生素的耐药现象已相当普遍,除对青霉素类的氨苄西林产生较高的耐药率外,对氨基糖苷类的庆大霉素和硫酸新霉素的耐药率也极高,分别达98%和90%。对氟苯尼考、氯霉素和头孢他啶具有较高的敏感性。绝大部分菌株出现多重耐药现象。此外,47株耐药菌株均分离自山东青岛卓越海洋集团有限公司对虾养殖池,调查资料显示,该养殖场早年常用的抗生素包括庆大霉素和硫酸新霉素,可能是本研究结果中庆大霉素和硫酸新霉素耐药率高的重要原因。但值得注意的是,无论是临床分离株、水产品分离株,还是环境分离株,均对氨苄西林有较强的耐药性,揭示副溶血弧菌耐药问题已越来越严重,不仅临床分离株耐药现象严重,环境分

离株耐药现象也越来越严重,同样需要加强防范。副溶血弧菌耐药性的产生与传播应引起足够的重视。为实现水产养殖健康发展,有必要继续开展菌株耐药监测,及时发现各类致病性弧菌菌株的耐药变化趋势,并在水产养殖过程中合理使用抗生素。

副溶血弧菌有一系列的毒力相关因子,包括黏附素、生物膜、铁载体、胞外蛋白酶、耐热直接溶血素、耐热直接相关溶血素、Ⅲ型分泌系统和Ⅵ型分泌系统(Raghunath, 2015)。其中,TDH和TRH是副溶血弧菌的主要毒力因子,与副溶血弧菌引起的肠胃炎密切相关。研究表明,约90%的临床分离株携带溶血素基因,而环境分离株极少携带*tdh*和*trh*(Banerjee *et al.*, 2014; Mahoney *et al.*, 2010)。本研究与其研究结果相吻合,山东地区50株环境分离副溶血弧菌均不携带*tdh*基因,4%的菌株表现为*trh*阳性,本研究50株副溶血环境分离株均分离自对虾健康生长无病害的养殖池塘,可能是毒力因子阳性率低的重要原因。虽然,环境分离株和水产品分离株*tdh*和*trh*的携带率低,多为非致病性和弱致病性,但最近研究表明,越来越多的临床株被发现不携带此类基因。例如, Jones等(2012)报道,发现约27%的临床菌株为*tdh*和*trh*基因阴性。WHO的《2011年关于海产品中副溶血弧菌风险评估报告》显示,不携带*tdh*或*trh*基因的临床分离株比率在增加,这些菌株可能携带其他导致肠毒性毒力因子,并且可产生重症病例(李柏生等, 2015; 郑文龙等, 2015)。因此,仍需加强对这一食源性疾病重要致病因子的了解,从而更好地预防和控制副溶血弧菌的感染和流行,减轻副溶血弧菌导致的经济损失和疾病负担。

为研究副溶血弧菌耐药性与毒力因子的相关性, 姜阳(2016)从上海水产品中分离出的副溶血性弧菌菌株中发现,氨苄青霉素和头孢唑林的抗性分别为85%和30%,而携带*tdh*基因的分离菌,其耐药率明显高于别的菌株。但 Baker-Austin等(2008)在不同的季节,采集了美国乔治亚州和南卡罗来纳州附近大西洋海岸3个位置的海水和沉积物,共分离350株副溶血弧菌,对其毒力基因进行分析,却发现毒力株的耐药性略低。本研究分离得到携带*trh*的副溶血弧菌2株,均为多重耐药菌株,耐药种类分别为耐庆大霉素、硫酸新霉素、磺胺甲恶唑、恩诺沙星、氨苄西林、呋喃唑酮和耐庆大霉素、硫酸新霉素、恩诺沙星、诺氟沙星、头孢他啶、氨苄西林和呋喃唑酮,但其他不携带毒力基因的菌株也多为耐药菌株,且耐药谱包含以上几种抗生素。因此,不能得出副溶血弧菌耐药性与毒力因子相关的结论,仍需要进一步研究探讨。

参 考 文 献

- Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI, *et al.* Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 208(1): 83–87
- An XH, Ning XB. Isolation, identification and drug-resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquatic products in Shanghai markets. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(7): 657–659 [安秀华, 宁喜斌. 上海市市售水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及耐药性研究. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(7): 657–659]
- Baker-Austin C, McArthur JV, Tuckfield RC, *et al.* Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(12): 2552–2558
- Banerjee SK, Kearney AK, Nadon CA, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Canadian clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* collected from 2000 to 2009. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(4): 1081–1088
- Blake PA, Merson MH, Weaver RE, *et al.* Disease caused by a marine vibrio-clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine*, 1979, 300(1): 1–5
- Chen Y, Chen X, Yu F, *et al.* Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(3): 258–259
- Depaola A, Kaysner CA, Bowers J, *et al.* Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4649–4654
- Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, *et al.* Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(6): 1123–1135
- Hu QX, Chen LM. Virulence and antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from crustaceans and shellfish in Shanghai, China. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(8): 1371–1377
- Huang MS, Yang QQ, Zhang Y, *et al.* Study on the effects of temperature, salinity, pH, phosphate, nitrate, and ammonium on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* using response surface methodology. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 132–140 [黄梦诗, 杨倩倩, 张艳, 等. 响应面法研究温度、盐度、pH 及磷酸盐、硝氮、氨氮对副溶血弧菌生长的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 132–140]
- Jones JL, Lüdeke CHM, Bowers JC, *et al.* Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7): 2343–2352
- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 2004, 10: S122–S129
- Li BS, Tan HL, Ke BX, *et al.* Etiologic characteristics of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Guangdong, 2014. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2015(11): 1283–1287 [李柏生, 谭海玲, 柯碧霞, 等. 广东省 2014 年食源性副溶血弧菌病原学特征分析. *中华流行病学杂志*, 2015(11): 1283–1287]
- Li G, Yan MC, Chang WS, *et al.* Review on studying of *Vibriosis* of shellfish farming in China. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2008, 27(3): 327–334 [李国, 闫茂仓, 常维山, 等. 我国海水养殖贝类弧菌病研究进展. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2008, 27(3): 327–334]
- Li RC, Lin DC, Chen KC, *et al.* First detection of AmpC β -Lactamase bla (CMY-2) on a conjugative IncA/C plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate of food origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(7): 4106–4111
- Li YH, Xie X, Shi XL, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus*, southern coastal region of China, 2007–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(4): 685–688
- Lou Y. Study on antimicrobial resistance and risk analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Shanghai. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 65 [娄阳. 上海市不同来源副溶血性弧菌耐药性研究及潜在风险分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 65]
- Mahoney JC, Gerding MJ, Jones SH, *et al.* Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7459–7465
- Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992, 257(5073): 1064–1073
- Raghunath P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2015(5): 805
- Shaw KS, Rosenberg Goldstein RE, He X, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89616
- Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 549–558
- Wang JW, Xu SW. Effects of cold stress on the messenger ribonucleic acid levels of corticotrophin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in hypothalami of broilers. *Poultry Science*, 2008, 87(5): 973–978
- Wang N, Wang HL, Bai N, *et al.* Isolation of lysogenic phage in *Vibrio parahaemolyticus* and its relationship with the pathogenicity of the host bacteria. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 105–110 [王娜, 王海亮, 白楠, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性. *渔业科学进展*, 2016, 37(2):

- 105–110]
- Wei DW. Epidemiological investigation and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal areas of China. Master's Thesis of Northwest A & F University, 2018, 16 [魏大伟. 中国沿海地区副溶血弧菌流行病学调查及遗传多样性分析. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2018, 16]
- Willis C. Antibiotics in the food chain: Their impact on the consumer. *Reviews in Medical Microbiology*, 2000, 11(3): 153–160
- Zhang DF, An H, Zhang J, *et al.* Research progress of the drug-resistance and its mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(9): 311–317, 324 [张德福, 安慧, 张健, 等. 副溶血弧菌耐药及其机制的研究进展. *食品工业科技*, 2018, 39(9): 311–317, 324]
- Zheng WL, Wang Z, Ma J, *et al.* Progress in research of etiological and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*. *Disease Surveillance*, 2015, 30(4): 337–341 [郑文龙, 王卓, 马洁, 等. 副溶血性弧菌病原学和分子流行病学流行特征研究进展. *疾病监测*, 2015, 30(4): 337–341]

(编辑 马璀艳)

Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp Culture Ponds and Analysis of its Drug Resistance and Virulence Genes

LI Cuiping^{1,2}, ZHAI Qianqian², WANG Xiang^{2,4}, LI Jian^{2,3①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract To understand the drug resistance and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp culture ponds, we collected and isolated *V. parahaemolyticus* from shrimp culture ponds in four different areas of Shandong Province in 2018. The Kirby-Bauer disk method was used to detect the resistance of *V. parahaemolyticus* to 12 antibiotics, and PCR was used to detect the heat-resistant direct hemolysin gene (*tdh*) and heat-resistant-related hemolysin gene (*trh*). A total of 50 *V. parahaemolyticus* strains were isolated from the shrimp culture ponds. Drug susceptibility test showed that the resistance of *V. parahaemolyticus* to gentamicin, neomycin sulfate, and ampicillin were high at 98%, 90%, and 86%, respectively. The susceptibility rates to florfenicol, chloramphenicol, and ceftazidime were higher, and the resistance rates were 10%, 10%, and 20%, respectively. Overall, 88% of the strains showed multidrug resistance. The virulence gene test showed that all the strains lacked the *tdh* gene and 4% of the strains were *trh*-positive. This study suggests that the antibiotic resistance of *V. parahaemolyticus* in a shrimp aquaculture environment is concerning. Etiological surveillance of *V. parahaemolyticus* should be strengthened, and antibiotics should be reasonably used in the aquaculture process to realize the healthy development of the aquaculture industry.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*; Antibiotic resistance; Virulence gene; Shrimp culture ponds

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190917001

http://www.yykxjz.cn/

陈小雷, 胡王, 马朝彬, 凌俊, 段国庆, 鲍凯. 丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏品质的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 181-191
Chen XL, Hu W, Ma CB, Ling J, Duan GQ, Bao K. Effects of clove oil on storage quality of crab cream and shrimp sauce. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 181-191

丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏品质的影响*



陈小雷¹ 胡王^{2①} 马朝彬³ 凌俊¹ 段国庆¹ 鲍凯⁴

(1. 安徽省农业科学院水产研究所 水产增殖安徽省重点实验室 合肥 230031;
2. 安徽省农业科学院 合肥 230031; 3. 阜阳市老庙镇农村综合服务站 阜阳 236143;
4. 安徽惠民实业有限责任公司 芜湖 238331)

摘要 将丁香油添加到蟹黄鲜虾酱中, 25℃恒温贮藏 180 d, 通过对蟹黄鲜虾酱贮藏过程中丙二醛含量、总巯基含量、脂肪酸组成及含量、呈味物质含量进行定期检测, 并结合滋味物质的味道强度值和味道当量在贮藏过程中的变化, 探索丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏过程品质的影响。结果显示, 丁香油能抑制丙二醛的生成、总巯基的降低和不饱和脂肪酸的分解, 添加丁香油的蟹黄鲜虾酱呈味核苷酸、鲜味氨基酸、甜味氨基酸、游离氨基酸含量和味精当量值显著高于不添加丁香油的蟹黄鲜虾酱。研究表明, 在贮藏过程中, 丁香油对蟹黄鲜虾酱不仅具有抗脂肪和蛋白质氧化的作用, 还能够提高其贮藏稳定性和风味。

关键词 丁香油; 蟹黄鲜虾酱; 脂肪酸; 呈味核苷酸; 游离氨基酸

中图分类号 S984 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0181-11

蟹黄鲜虾酱是将巢湖秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)、河蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹黄煸炒后添加到黄豆酱中, 经炒制、调味、冷却、包装、高温杀菌后制成的佐餐调味酱。蟹黄鲜虾酱油脂含量高, 富含高蛋白、高不饱和脂肪酸蟹黄、鲜虾的添加使其在贮藏过程中更易出现脂肪酸败和蛋白质氧化变质, 进而影响蟹黄鲜虾酱的组织、风味等特性, 且氧化产物会引起人体动脉粥样硬化、胃肠病以及癌症等(Negre-Salvayre *et al.*, 2010)。

丁香既是 GB2760-2014 中允许使用的食用香料, 又是植物源食品保鲜剂和抗氧化剂, 除赋予食品独特的风味外(Suhaj, 2006), 还能降低食品的过氧化物值

(沈勇根等, 2012), 抑制汉母逊氏酵母菌(*Torulopsis*)、青霉(*Penicillium*)、黑曲霉(*Rhizopus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长(吴传茂等, 2000), 丁香油和桂皮油复合使用能延缓冷却猪肉的腐败变质(姚成强等, 2011), 丁香醇提取物可以延长新鲜羊肉保质期至 4 d(Kumudavally *et al.*, 2011)。在实际使用过程中, 丁香油少量添加达不到抗氧化效果, 大量使用则会影响产品的风味。基于此, 本研究着重考察丁香油作为香料和抗氧化剂对蟹黄鲜虾酱贮藏过程中风味、脂肪酸组成及含量、蛋白质和脂肪氧化的影响, 以探索蟹黄鲜虾酱贮藏过程中, 脂肪氧

* 芜湖市科技攻关(2018cg22)、安徽省农业科学院创新团队(15C0501)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和安徽省水产产业技术体系(皖农科〔2016〕84号)共同资助 [This work was supported by Wuhu Scientific and Technological Project (2018cg22), the Scientific and Technological Innovation Project Supported by Anhui Academy of Agricultural Sciences (15C0501), Modern Shrimp-Crab-Industry and Technology Research System (CARS-48), and the Earmarked Fund for Anhui Fishery Research System (2016-84)]. 陈小雷, E-mail: chenxiaolei3344@126.com

① 通讯作者: 胡王, 副研究员, E-mail: huwang101@sina.com

收稿日期: 2019-09-17, 收修改稿日期: 2019-10-28

化与脂肪酸组成及含量的关系,并为丁香油在酱制品的工业化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蟹黄鲜虾酱采自安徽省惠民实业有限责任公司,采购时间为2018年6月;丁香油为丁香全提取物,总酚含量约80%,购自陕西浩洋生物科技有限公司,采购时间为2018年6月。

高氯酸、尿素、十二烷基磺酸钠、乙二胺四乙酸、Tris-HCl 等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;IMP(5'-肌苷酸)标准品、GMP(5'-鸟苷酸)标准品、AMP(5'-腺苷酸)标准品,购自上海安谱实验科技股份有限公司;MDA 试剂盒和 BCA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验仪器

FA25 型高速分散机,弗鲁克(上海)公司;CR22G 型高速冷冻离心机,日本日立公司;TU-1901 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪,日本日立公司;GC-2010 Plus 气相色谱仪,日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理 按照安徽省惠民实业有限责任公司生产蟹黄鲜虾酱常规方法制好后,平均分成2组:1组按酱质量添加0.2%丁香油,混匀,分装后121℃高温灭菌30 min,为实验组;另1组分装后121℃高温灭菌30 min,为对照组。2组样品于25℃恒温贮藏,每45 d 取样进行检测,每组6个平行。

1.3.2 游离氨基酸的测定 参考 Wang 等(2016)的方法并稍作修改。将酱制品混匀,取适量均质后加入15 ml 5%三氯乙酸溶液,冰浴匀浆2 min,超声5 min 后静置2 h,4℃ 15000 r/min 离心10 min。取5 ml 上清液,用1 mol/L NaOH 溶液调节pH至(2.00±0.05)后,蒸馏水定容至10 ml。取适量溶液过0.45 μm 的水相针式超滤膜后待检测。将待测液放入自动氨基酸分析仪中,在570和440 nm (Pro)下进行检测。

1.3.3 脂肪酸的测定 按照 GB 5009.168-2016 方法测定。

1.3.4 呈味核苷酸的测定 参照 Kong 等(2012)的方法并稍作修改。称(5.00±0.01) g 样品均质后加入30 ml 4℃预冷的5% HClO₄ 溶液,冰浴匀浆2 min 后超声5 min,然后4℃ 15000 r/min 冷冻,离心10 min

取上清液,向沉淀加入10 ml 4℃预冷的5% HClO₄ 溶液,重复上述步骤至离心结束,合并2次上清液,用提前配好的KOH和HClO₄ 溶液调节pH至5.75,之后将上清液定容至50 ml,取适量用0.22 μm 微量过滤膜过滤至进样瓶,待测。

高效液相色谱条件如下:色谱柱:岛津 Intersil ODS-3(205.0 mm×4.6 mm);柱温为30℃;流动相:甲醇(A)和 pH 为 5.75 的磷酸缓冲液(B);流速:1 ml/min;洗脱程序见表1,洗脱时间为30 min;PDA 检测器全波段扫描,选取248 nm 进行数据处理。

1.3.5 味道强度值(TAV)及味精当量(EUC) 参照王丹青等(2018),滋味物质的味道强度值(Taste activity value)的计算公式如下:

$$TAV = \frac{C}{T} \quad (1)$$

式中,C为滋味物质的绝对浓度值,T为该滋味物质的阈值。

味道当量(Equivalent umami concentration)的计算公式如下:

$$EUC = \sum a_i b_i + 1218 \left(\sum a_i b_i \right) \left(\sum a_j b_j \right) \quad (2)$$

式中,EUC单位为g MSG/100 g;1218为协同作用常数;a_i为鲜味氨基酸的浓度(g/100 g);b_i为鲜味氨基酸相对于MSG的鲜度系数(天门冬氨酸 Asp 为0.077,谷氨酸 Glu 为1);a_j为呈味氨基酸的浓度(g/100 g);b_j为呈味氨基酸相对于IMP的鲜度系数(IMP为1,GMP为2.3,AMP为0.18)。

1.3.6 总巯基含量的测定 (1)肌原纤维蛋白的提取:参照 Yang 等(2015)的方法。取10 g 样品,加入20 ml、4℃预冷的去离子水,12000 r/min 匀浆30 s,10000 r/min、4℃离心20 min,弃上清液,向沉淀加入去离子水,重复提取1次。沉淀中再加入20 ml、4℃预冷的0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 为7.2)(其中补充0.6 mol/L NaCl),12000 r/min 匀浆30 s,10000 r/min、4℃离心20 min,收集上清液。沉淀用上述含有NaCl的磷酸缓冲液重复提取1次,合并上清液。蛋白质含量采用BCA 试剂盒测定。

(2)总巯基含量的测定:参考 Benjakul 等(2009)的方法。调节(1)中提取的肌原纤维蛋白溶液浓度至4 mg/ml,取0.5 ml,加入4.5 ml 0.2 mol/L Tris-HCl Buffer [pH 为6.8,含有8 mol/L 尿素、2%十二烷基磺酸钠(SDS)、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]。取1 ml 上述混合液,加入0.1 ml 0.1% DTNB,40℃温育25 min,测定其OD_{412 nm}。空白对照以0.6 mol/L KCl 溶液(pH 为7.0)代替样品。总巯基含量的计算公式如下:

$$\text{总巯基含量(nmol/mg)} = [(D \times n) / (\epsilon \rho)] \times 10^6 \quad (3)$$

式中, D 为 412 nm 波长处的吸光度; n 为稀释倍数; ε 为摩尔吸光系数, 取值为 13600 L/(mol·cm); ρ 为蛋白质质量浓度(mg/ml)。

1.3.7 丙二醛含量的测定 称取定量蟹黄鲜虾酱, 加入 5 倍体积去离子水, 10000 r/min 匀浆 1 min, 进行丙二醛含量的检测。依据硫代巴比妥酸法原理采用试剂盒检测, 结果以 1 mg 样品中丙二醛的含量 (nmol/mg) 表示。

1.3.8 数据统计分析 实验结果采用平均值±标准差(Mean±SD, $n=6$)表示。采用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析和多重方差分析, 所有显著性均在 $P \leq 0.05$ 水平下检验。

2 结果与分析

2.1 蟹黄鲜虾酱贮藏过程中丙二醛含量的变化

丙二醛常用来衡量脂质氧化程度, 其含量越高, 肉制品氧化程度就越高, 品质也越差(Pignoli *et al.*, 2009)。作为脂肪氧化二级产物, 丙二醛还可以与蛋白的多肽骨架及其边链发生氧化修饰, 改变蛋白质的构象(Zhao *et al.*, 2012)。

蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏过程中丙二醛的变化情况见图 1。从图 1 可以看出, 对照组和实验组丙二醛含量均显著升高。0 d 时, 对照组和实验组差异不显著; 45 d 后, 对照组显著高于实验组, 说明 0.2% 的丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏过程中脂肪氧化有抑制作用, 这与江慎华等(2010)、沈勇根等(2012)、Karuppiiah 等(2012)的研究结果一致, 因为丁香油的主要物质丁香酚(沈勇根等, 2012)具有疏水性, 疏水性氨基酸可以捕获脂类自由基, 加强抗氧化肽与疏水性多不饱和脂肪酸的相互作用, 从而延缓脂质氧化反应(Burt, 2004)。

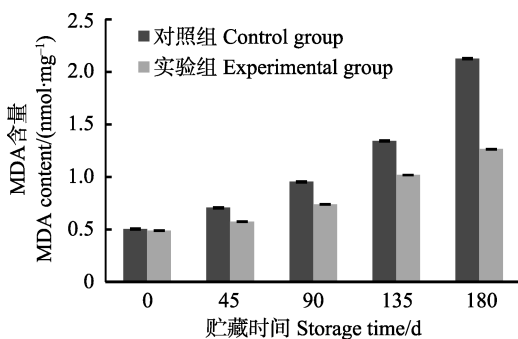


图 1 蟹黄鲜虾酱贮藏过程丙二醛含量变化
Fig.1 The changes of MDA content during storage of crab cream and shrimp sauce

2.2 蟹黄鲜虾酱贮藏过程中总巯基含量的变化

肉品中蛋白质的巯基含量很丰富, 且易发生氧化

反应(陆玉芹等, 2015), 在加工、运输、贮藏过程中, 肌原纤维蛋白空间结构发生改变, 使埋藏在分子内部的疏基活性基团暴露出来被氧化成二硫键, 导致巯基含量减少(Dean *et al.*, 1997), 因而常用巯基含量的变化指示蛋白质氧化的程度(屠冰心等, 2014)。蛋白质氧化会降低肉制品品质、功能及消费者的可接受性。

蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏过程中总巯基含量的变化如图 2 所示。随着贮藏时间的延长, 对照组和实验组总巯基含量呈下降趋势, 贮藏 90 d 以上, 总巯基含量均显著降低, 因为经过加热和高温灭菌处理, 蟹黄鲜虾酱中蛋白质空间结构发生改变, 且受到各种促氧化成分如自由基等的攻击, 蛋白质发生氧化, 巯基含量下降(Xia *et al.*, 2009)。贮藏 90 d 后, 实验组总巯基含量显著高于对照组, 说明丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏过程蛋白质氧化有抑制作用, 与 Karuppiiah 等(2012)和姚洁玉等(2019)的研究结果类似, 因为脂质氧化生成的活性和非活性自由基夺取蛋白的氢原子, 生成蛋白自由基, 引发蛋白质链式反应, 从而促进蛋白质氧化(Stadtman *et al.*, 2003), 而丁香油抑制脂肪氧化, 也会对蛋白质氧化起到一定的抑制作用。

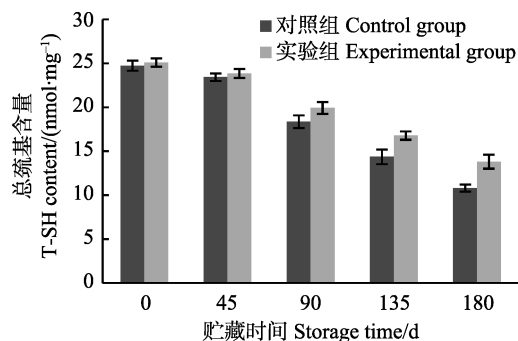


图 2 蟹黄鲜虾酱贮藏过程总巯基含量的变化
Fig.2 The changes of T-SH content during storage of crab cream and shrimp sauce

2.3 蟹黄鲜虾酱贮藏过程中脂肪酸组成及含量的变化

肉类的营养和品质与肌肉脂肪的含量和组成密切相关(Utaiwan *et al.*, 2007)。脂肪酸的分解不仅导致食品风味的劣变, 氧化产物还会与蛋白质发生反应, 进一步促进蛋白质的氧化(Stadtman *et al.*, 2003)。

对照组蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏过程中, 脂肪酸组成及含量变化如表 2 所示。新鲜蟹黄鲜虾酱中共检出 29 种脂肪酸, 随着贮藏时间的延长, 脂肪酸种类不断减少, 180 d 后, 仅检出 19 种。饱和脂肪酸总量从 55.869% 增至 80.439%, 单不饱和脂肪酸总量从 19.141% 降至 4.906%, 多不饱和脂肪酸总量从 24.991% 降至 14.655%; 其中, C8:0、C12:0、C13:0、C14:1、C15:0、C15:1、C16:0、C17:1、C18:1n9t、

C18:2n6t、C20:1、C20:3n6、C20:3n3、C20:4n6 和 C22:1n9 显著降低, C16:1、C17:0、C18:0、C18:2n6c、C20:0、C18:3n3、C21:0、C20:2、C22:0、C23:0、C22:2n6 和 C20:5n3 显著升高。这种变化是因为蟹黄鲜虾酱经过加热和高温灭菌处理,加之贮藏过程中温度、自由基等因素的影响,脂肪酸体系受到破坏,不饱和脂肪

酸优先发生氧化降解(Yagiz *et al.*, 2009);同时,脂肪氧化过程中,自由基连锁攻击不饱和脂肪酸,使其趋于饱和,一部分不饱和脂肪酸转变成饱和脂肪酸,一部分变成单不饱和脂肪酸(刘冬敏等, 2013);一些长链不饱和脂肪酸多位于磷脂中,会发生碳链延长和去饱和现象(Memon *et al.*, 2011)。

表1 高效液相法核苷酸梯度洗脱程序
Tab.1 HPLC gradient elution program for nucleotide analysis

流动相 Mobile phase	时间Time (min)					
	0	10	15	23	26	30
A (%)	0	6	6	30	0	0
B (%)	100	94	94	70	100	100

表2 对照组蟹黄鲜虾酱贮藏过程脂肪酸组成及含量变化(g/100 g)
Tab.2 The changes of fatty acids and their contents during storage of control crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

脂肪酸 Fatty acids	贮藏时间 Storage time (d)				
	0	45	90	135	180
C8:0	3.269±0.006 ^a	2.541±0.115 ^b	0.048±0.000 ^c	0.048±0.001 ^c	—
C12:0	3.738±0.103 ^a	3.495±0.057 ^b	1.810±0.016 ^c	1.273±0.003 ^d	0.766±0.004 ^e
C13:0	0.306±0.003 ^a	0.293±0.001 ^b	0.473±0.003 ^c	0.503±0.004 ^d	0.287±0.005 ^b
C14:0	0.381±0.004 ^a	0.356±0.004 ^b	0.469±0.004 ^b	0.371±0.004 ^a	0.390±0.004 ^a
C14:1	1.562±0.011 ^a	1.403±0.041 ^b	1.372±0.010 ^b	1.075±0.002 ^c	0.422±0.006 ^d
C15:0	1.138±0.022 ^a	0.997±0.029 ^b	0.082±0.002 ^c	0.078±0.001 ^c	—
C15:1	2.554±0.003 ^a	1.319±0.023 ^b	0.614±0.004 ^c	0.435±0.009 ^d	0.280±0.000 ^e
C16:0	0.305±0.006	—	—	—	—
C16:1	0.895±0.008 ^a	0.585±0.002 ^b	1.005±0.016 ^c	0.972±0.022 ^c	1.041±0.050 ^c
C17:0	0.312±0.010 ^a	0.317±0.007 ^a	1.257±0.016 ^b	1.281±0.008 ^b	1.281±0.002 ^b
C17:1	1.026±0.009 ^a	0.610±0.002 ^b	0.171±0.003 ^c	0.175±0.005 ^c	0.153±0.007 ^d
C18:0	2.709±0.013 ^a	4.715±0.061 ^b	4.411±0.048 ^c	4.612±0.035 ^b	3.100±0.032 ^d
C18:1n9t	3.008±0.027 ^a	3.312±0.036 ^b	4.703±0.118 ^c	—	—
C18:1n9c	9.316±0.065 ^a	0.457±0.008 ^b	4.435±0.036 ^c	4.544±0.014 ^d	3.010±0.023 ^e
C18:2n6t	21.804±0.137 ^a	18.799±0.477 ^b	2.993±0.052 ^c	—	—
C18:2n6c	0.688±0.006 ^a	0.769±0.026 ^a	6.240±0.085 ^b	6.721±0.085 ^c	6.355±0.103 ^b
C20:0	42.713±0.022 ^a	54.503±0.498 ^b	53.184±0.462 ^c	60.515±0.158 ^d	66.752±0.180 ^e
C20:1	0.479±0.008 ^a	0.424±0.009 ^b	0.331±0.014 ^c	0.369±0.021 ^d	—
C18:3n3	0.973±0.012 ^a	1.769±0.036 ^b	5.337±0.096 ^c	5.448±0.004 ^c	4.843±0.036 ^d
C21:0	0.404±0.001 ^a	0.333±0.002 ^a	5.721±0.090 ^b	6.288±0.111 ^c	5.921±0.018 ^d
C20:2	0.031±0.011 ^a	0.313±0.002 ^b	1.606±0.014 ^c	1.661±0.018 ^d	1.426±0.008 ^e
C22:0	0.197±0.011 ^a	0.399±0.001 ^b	1.245±0.005 ^c	1.262±0.003 ^d	1.394±0.001 ^e
C20:3n6	0.458±0.003	—	—	—	—
C20:3n3	0.082±0.008	—	—	—	—
C20:4n6	0.073±0.004	—	—	—	—
C22:1n9	0.300±0.025 ^a	0.247±0.001 ^b	0.051±0.000 ^c	—	—
C23:0	0.397±0.010 ^a	0.458±0.008 ^b	0.439±0.005 ^b	0.487±0.003 ^c	0.546±0.014 ^d
C22:2n6	0.490±0.004 ^a	0.817±0.001 ^b	0.687±0.024 ^c	0.694±0.013 ^c	0.736±0.020 ^d
C20:5n3	0.391±0.021 ^a	0.769±0.010 ^b	1.315±0.017 ^c	1.187±0.002 ^d	1.296±0.012 ^c
SFA	55.869±0.437 ^a	68.407±0.785 ^b	69.140±0.653 ^b	76.720±0.334 ^c	80.439±0.261 ^d
MUFA	19.141±0.157 ^a	8.358±0.122 ^b	12.681±0.201 ^c	7.570±0.073 ^d	4.906±0.087 ^e
PUFA	24.991±0.205 ^a	23.235±0.551 ^b	18.178±0.288 ^c	15.711±0.122 ^d	14.655±0.180 ^e

注: 同行不同字母表示差异显著, $P<0.05$; —表示未检出。下同

Note: Different letters in the same line mean significant difference ($P<0.05$), — means not detected. The same as below

实验组蟹黄鲜虾酱 25℃贮藏过程中, 脂肪酸组成及含量变化如表 3 所示。随着贮藏时间的延长, 饱和脂肪酸含量由 55.786% 升至 69.814%, 单不饱和脂肪酸由 18.847% 降至 10.233%, 多不饱和脂肪酸由 25.367% 降至 19.953%; 其中, C8:0、C12:0、C13:0、C14:0、C14:1、C15:0、C15:1、C16:0、C17:1、C18:1n9t、C18:1n9c、C18:2n6t、C20:1、C20:3n6、C20:3n3、C20:4n6 和 C22:1n9 显著降低, C16:1、C17:0、C18:0、C18:2n6c、C20:0、C18:3n3、C21:0、C20:2、C22:0、C23:0、C22:2n6 和 C20:5n3 显著升高, 而 C13:0、C14:0、C14:1、C15:0、C15:1、C16:0、C17:0、C17:1、

C18:1n9t、C20:1、C20:3n6、C20:3n3、C20:4n6 和 C22:1n9 的变化趋势与对照组有所不同。贮藏 180 d 后, 实验组饱和脂肪酸含量比对照组降低 13.2%, 单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸含量分别提高 1.1 倍和 36.2%。由此可见, 丁香油对蟹黄鲜虾酱不饱和脂肪酸具有保护作用, 因为丁香油的主要成分丁香酚能够清除顽固 2,2-二苯基-1-苦基肼自由基, 降低过渡金属离子的浓度, 从而有效延缓不饱和脂肪酸反应生成烷氧基、过氧化氢的反应和脂质过氧化启动物铁氧系螯合物的产生(罗雨婷等, 2017)。

表 3 实验组蟹黄鲜虾酱贮藏过程脂肪酸组成及含量变化(g/100 g)

Tab.3 The changes of fatty acids and their contents during storage of test crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

脂肪酸 Fatty acids	贮藏时间 Storage time (d)				
	0	45	90	135	180
C8:0	3.334±0.006 ^a	2.541±0.115 ^b	0.036±0.003 ^c	0.044±0.001 ^c	—
C12:0	3.781±0.103 ^a	3.198±0.016 ^b	1.265±0.025 ^c	0.739±0.012 ^d	0.764±0.006 ^d
C13:0	0.310±0.003 ^a	0.309±0.008 ^a	0.310±0.003 ^a	0.243±0.001 ^b	0.280±0.001 ^c
C14:0	0.386±0.004 ^a	0.370±0.016 ^a	0.167±0.002 ^b	0.071±0.001 ^c	—
C14:1	1.580±0.011 ^a	1.471±0.016 ^b	1.515±0.007 ^c	0.781±0.002 ^d	0.849±0.005 ^e
C15:0	0.970±0.127	—	—	—	—
C15:1	2.584±0.003 ^a	1.956±0.008 ^b	0.551±0.001 ^c	0.566±0.001 ^c	0.643±0.009 ^d
C16:0	0.386±0.007 ^a	0.275±0.006 ^b	0.036±0.000 ^c	—	—
C16:1	0.905±0.008 ^a	1.026±0.046 ^b	1.170±0.006 ^c	1.175±0.011 ^c	1.422±0.011 ^d
C17:0	0.315±0.011 ^a	0.498±0.012 ^b	1.454±0.013 ^c	0.888±0.001 ^d	0.797±0.001 ^e
C17:1	0.714±0.007	—	—	—	—
C18:0	2.741±0.013 ^a	3.052±0.019 ^b	3.449±0.023 ^c	3.669±0.012 ^d	2.905±0.005 ^e
C18:1n9t	3.043±0.027 ^a	2.819±0.050 ^b	2.203±0.041 ^c	1.813±0.007 ^d	1.060±0.010 ^e
C18:1n9c	9.425±0.065 ^a	8.946±0.007 ^b	6.920±0.143 ^c	7.120±0.081 ^c	6.260±0.033 ^d
C18:2n6t	22.060±0.137 ^a	16.900±0.191 ^b	1.875±0.014 ^c	—	—
C18:2n6c	0.696±0.006 ^a	1.648±0.008 ^b	9.597±0.021 ^c	9.621±0.046 ^c	11.668±0.050 ^d
C20:0	42.814±0.022 ^a	49.934±0.049 ^b	49.624±0.474 ^b	55.357±0.185 ^c	54.042±0.223 ^d
C20:1	0.398±0.005	—	—	—	—
C18:3n3	0.985±0.008 ^a	1.650±0.017 ^b	3.627±0.051 ^c	3.636±0.056 ^c	4.144±0.057 ^d
C21:0	0.408±0.012 ^a	0.758±0.015 ^b	6.010±0.063 ^c	6.630±0.074 ^d	7.695±0.156 ^e
C20:2	0.031±0.001 ^a	0.074±0.001 ^b	0.869±0.004 ^c	0.846±0.019 ^c	0.964±0.010 ^d
C22:0	0.199±0.011 ^a	0.375±0.007 ^b	4.176±0.045 ^c	2.471±0.028 ^d	2.458±0.006 ^d
C20:3n6	0.505±0.003 ^a	0.329±0.005 ^b	0.253±0.001 ^c	—	—
C20:3n3	0.106±0.008 ^a	0.187±0.001 ^a	1.072±0.001 ^b	0.508±0.011 ^{ab}	—
C20:4n6	0.093±0.004 ^a	0.130±0.006 ^b	0.415±0.003 ^c	0.406±0.004 ^c	—
C22:1n9	0.197±0.025	—	—	—	—
C23:0	0.142±0.010 ^a	0.212±0.001 ^b	0.734±0.009 ^c	0.725±0.003 ^c	0.873±0.021 ^d
C22:2n6	0.496±0.003 ^a	0.677±0.007 ^b	0.709±0.001 ^c	0.755±0.009 ^d	0.923±0.002 ^e
C20:5n3	0.396±0.021 ^a	0.663±0.020 ^b	1.959±0.008 ^c	1.936±0.010 ^c	2.254±0.013 ^d
SFA	55.786±0.460 ^a	61.523±0.431 ^b	67.262±0.325 ^c	70.837±0.318 ^d	69.814±0.420 ^d
MUFA	18.847±0.319 ^a	16.218±0.127 ^b	12.360±0.199 ^c	11.455±0.103 ^d	10.233±0.067 ^e
PUFA	25.367±0.189 ^a	22.260±0.257 ^b	20.378±0.102 ^c	17.708±0.155 ^d	19.953±0.133 ^e

2.4 蟹黄鲜虾酱贮藏过程中呈味核苷酸及游离氨基酸组成的变化

核苷酸是一种重要的呈味物质, GMP 和 IMP 鲜

味最强, 除了增鲜, 核苷酸对甜味有增效作用, 对咸味、苦味、酸味和焦味等有消杀作用(Fuke *et al*, 1996): IMP 增强食物的咸感, 具有减盐作用; GMP

增强食物的入口爽滑感,能改善食物在口中滞留的感觉; AMP 在较低浓度(<50~100 mg/100 g)下呈甜味,当浓度>100 mg/100 g 时,甜味逐渐减弱,鲜味逐渐增强(Rotzoll *et al*, 2006); 低浓度的 IMP 能够增强 AMP 的鲜味和甜味。对照组蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏

过程中呈味氨基酸含量变化如表 4 所示,含量最高的是 GMP,其次是 IMP。随着贮藏时间的延长,3 种呈味核苷酸波动降低,因为在有水体系中,呈味核苷酸的稳定性随蟹黄鲜虾酱 pH、含水量、温度和酸碱度的变化而变化(崔桂友, 1999)。

表 4 对照组蟹黄鲜虾酱贮藏过程中呈味核苷酸及游离氨基酸组成的变化(g/100 g)

Tab.4 The changes of taste nucleotides and free amino acids during storage of control crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

呈味成分 Taste compositions	贮藏时间 Storage time (d)				
	0	45	90	135	180
GMP	0.028±0.001 ^a	0.023±0.008 ^b	0.029±0.002 ^c	0.026±0.001 ^d	0.025±0.004 ^d
IMP	0.017±0.001 ^a	0.015±0.003 ^b	0.10±0.001 ^c	0.011±0.002 ^d	0.012±0.000 ^d
AMP	0.015±0.001 ^a	0.003±0.000 ^b	0.10±0.000 ^c	0.005±0.001 ^d	0.011±0.001 ^e
总量 Total	0.060±0.003 ^a	0.041±0.011 ^b	0.049±0.003 ^c	0.042±0.003 ^b	0.048±0.005 ^c
天门冬氨酸 Asp	0.164±0.006 ^a	0.225±0.007 ^b	0.931±0.009 ^c	0.934±0.009 ^c	0.905±0.002 ^d
苏氨酸 Thr	0.110±0.001 ^a	0.111±0.001 ^a	0.383±0.005 ^b	0.393±0.006 ^b	0.386±0.006 ^b
丝氨酸 Ser	0.145±0.005 ^a	0.145±0.005 ^a	0.406±0.006 ^b	0.434±0.007 ^c	0.417±0.005 ^b
谷氨酸 Glu	1.651±0.002 ^a	1.582±0.058 ^a	3.081±0.052 ^b	3.165±0.057 ^b	3.392±0.031 ^c
脯氨酸 Pro	0.153±0.005 ^a	0.095±0.002 ^b	0.525±0.005 ^c	0.539±0.005 ^d	0.472±0.003 ^e
甘氨酸 Gly	0.135±0.005 ^a	0.135±0.006 ^a	0.481±0.003 ^b	0.475±0.004 ^b	0.471±0.002 ^b
丙氨酸 Ala	0.250±0.006 ^a	0.196±0.004 ^b	0.605±0.005 ^c	0.607±0.002 ^c	0.584±0.007 ^d
缬氨酸 Val	0.150±0.003 ^a	0.147±0.004 ^a	0.467±0.003 ^b	0.515±0.004 ^c	0.498±0.009 ^d
蛋氨酸 Met	0.033±0.001 ^a	0.035±0.001 ^a	0.368±0.006 ^b	0.194±0.008 ^c	0.165±0.006 ^d
异亮氨酸 Ile	0.225±0.005 ^a	0.132±0.003 ^b	0.452±0.002 ^c	0.435±0.003 ^d	0.438±0.006 ^d
亮氨酸 Leu	0.225±0.005 ^a	0.230±0.010 ^a	0.734±0.005 ^b	0.742±0.006 ^b	0.715±0.002 ^c
酪氨酸 Tyr	0.014±0.000 ^a	0.061±0.001 ^b	0.317±0.008 ^c	0.215±0.002 ^d	0.234±0.008 ^e
苯丙氨酸 Phe	0.100±0.001 ^a	0.135±0.008 ^b	0.422±0.007 ^c	0.435±0.007 ^c	0.427±0.009 ^c
赖氨酸 Lys	0.162±0.002 ^a	0.161±0.002 ^a	0.629±0.004 ^c	0.555±0.023 ^d	0.621±0.005 ^e
组氨酸 His	0.014±0.001 ^a	0.018±0.002 ^a	0.162±0.002 ^b	0.157±0.004 ^b	0.158±0.004 ^b
精氨酸 Arg	0.133±0.002 ^a	0.166±0.003 ^b	0.497±0.003 ^c	0.505±0.014 ^c	0.496±0.006 ^c
游离氨基酸总量 TAA	3.664±0.038 ^a	3.574±0.117 ^a	10.460±0.125 ^b	10.300±0.161 ^b	10.379±0.111 ^b
鲜味氨基酸 FAA	1.815±0.008 ^a	1.807±0.065 ^a	4.012±0.061 ^b	4.099±0.066 ^b	4.297±0.033 ^c
鲜味氨基酸/氨基酸总量 FAA/TAA	0.495	0.506	0.384	0.398	0.414
甜味氨基酸 SAA	0.793±0.022 ^a	0.682±0.018 ^b	2.400±0.024 ^c	2.448±0.024 ^c	2.330±0.023 ^d
甜味氨基酸/氨基酸总量 SAA/TAA	0.216	0.191	0.229	0.238	0.225
苦味氨基酸 BAA	1.042±0.008 ^a	1.024±0.034 ^a	3.731±0.040 ^b	3.538±0.071 ^c	3.518±0.055 ^c
苦味氨基酸/氨基酸总量 BAA/TAA	0.284	0.287	0.357	0.344	0.339

注: 鲜味氨基酸包括天门冬氨酸、谷氨酸; 甜味氨基酸包括苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸; 苦味氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、精氨酸、赖氨酸、蛋氨酸(张慧林等, 2019)。下同

Note: Flavor amino acid includes Asp, Glu; sweet amino acid includes Thr, Ser, Gly, Ala and Pro; bitter amino acid includes Leu, Ile, Phe, His, Val, Arg, Lys and Met (Zhang *et al*, 2019). The same as below

游离氨基酸的种类和含量与蟹黄鲜虾酱的口感、风味、营养和生理活性有关(Namanug *et al*, 2010)。对照组蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏过程中游离氨基酸含量变化如表 4 所示。检出的 16 种游离氨基酸贮藏 180 d 均显著提高, 因为随着蟹黄鲜虾酱贮藏时间的延长, 蛋白质不断发生降解, 导致游离氨基酸含量增加。呈鲜味氨基酸中, 含量最高的为谷氨酸, 与 IMP 有显著的协同增效作用, 是蟹黄鲜虾酱鲜味的主要贡献者; 呈甜味氨基酸中, 丙氨酸含量最高, 与谷氨酸、

肌苷酸等呈味物质有协同作用, 还具有协助葡萄糖代谢的功能(赵亭亭等, 2018), 是蟹黄鲜虾酱甜味的主要贡献者; 精氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸和缬氨酸虽然是苦味氨基酸, 但对蟹黄鲜虾酱特殊的水产风味具有重要的贡献(Wang *et al*, 2015)。

实验组蟹黄鲜虾酱在 25℃ 贮藏过程中呈味核苷酸及游离氨基酸的变化如表 5 所示。GMP 和 IMP 呈降低趋势, 180 d 后, 分别降至 0.306 和 0.156 g/100 g; AMP 含量先降后升, 180 d 后, 升至 0.180 g/100 g;

呈味核苷酸总量先降后升, 180 d 与 0 d 差异不显著。检出的 16 种游离氨基酸, 主要为谷氨酸、天门冬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸、缬氨酸、丝氨酸和脯氨酸, 占总游离氨基酸的 78.13%。贮藏 180 d 后, 16 种游离氨基酸含量均显著提高; 游离氨基酸总量, 鲜味和甜味氨基酸含量贮藏 45 d 后显著升高。对照组蟹黄鲜虾酱贮藏 180 d 后, GMP、IMP 和 AMP 降低幅度分别为 10.7%、29.4% 和 26.7%, 实验组 GMP 和 IMP 降低幅度分别为 8.8% 和 23.8%, 而 AMP 含量增加 1.3 倍。GMP 是香菇和酵母的主要呈味物质, 具有菌类特征风味(孙芝杨, 2011), IMP 和 AMP 是虾鲜味的特征呈味物质(李婉君, 2015), 且 AMP 的甜滋味轮廓表现出来是独立的, 使蟹黄鲜虾酱变得香甜可

口。说明丁香油能有效抑制蟹黄鲜虾酱中主要呈味核苷酸分解, 从而对蟹黄鲜虾酱的主要风味起稳定和强化作用, 与 Milan(2006)的结论一致。从游离氨基酸方面来看, 蟹黄鲜虾酱主要呈味物质是谷氨酸, 丁香油对其贮藏过程中的变化没有显著影响。蟹黄鲜虾酱贮藏 180 d 后, 除了丙氨酸和赖氨酸, 其余游离氨基酸含量在添加丁香油酱制品中均比不添加高, 其中, 对丝氨酸和蛋氨酸影响最大。蛋氨酸是酱制品挥发性风味物质中含硫化化合物的前体物(赵改名等, 2006), 对酱制品风味有影响(康旭等, 2011)。丁香油对蟹黄鲜虾酱的游离氨基酸的影响可能是通过抑制蛋白质的氧化, 促进其向游离氨基酸方向的降解实现的。

表 5 实验组蟹黄鲜虾酱贮藏过程呈味核苷酸及游离氨基酸组成的变化(g/100 g)

Tab.5 The changes of taste nucleotides and free amino acids during storage of test crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

呈味成分 Taste compositions	贮藏时间 Storage time (d)				
	0	45	90	135	180
GMP	0.034±0.001 ^a	0.027±0.012 ^b	0.029±0.001 ^c	0.029±0.000 ^c	0.031±0.002 ^d
IMP	0.021±0.001 ^a	0.019±0.003 ^b	0.015±0.000 ^c	0.015±0.001 ^c	0.016±0.001 ^d
AMP	0.008±0.000 ^a	0.005±0.001 ^b	0.009±0.001 ^c	0.008±0.000 ^a	0.018±0.004 ^d
总量 total	0.063±0.001 ^a	0.051±0.016 ^b	0.053±0.002 ^c	0.052±0.002 ^{bc}	0.065±0.008 ^a
天门冬氨酸 Asp	0.256±0.004 ^a	0.222±0.001 ^a	1.113±0.051 ^b	1.124±0.002 ^{bc}	1.046±0.023 ^{bd}
苏氨酸 Thr	0.127±0.003 ^a	0.113±0.002 ^a	0.443±0.025 ^b	0.444±0.006 ^b	0.416±0.004 ^b
丝氨酸 Ser	0.165±0.002 ^a	0.142±0.002 ^b	0.464±0.006 ^c	0.472±0.007 ^c	0.538±0.008 ^d
谷氨酸 Glu	1.666±0.027 ^a	1.565±0.027 ^b	3.234±0.024 ^c	3.295±0.043 ^c	3.422±0.056 ^d
脯氨酸 Pro	0.164±0.001 ^a	0.093±0.001 ^b	0.584±0.032 ^{cd}	0.541±0.011 ^c	0.498±0.014 ^{ce}
甘氨酸 Gly	0.138±0.005 ^a	0.121±0.001 ^a	0.512±0.022 ^b	0.514±0.012 ^b	0.498±0.007 ^b
丙氨酸 Ala	0.226±0.007 ^a	0.186±0.008 ^b	0.618±0.025 ^c	0.625±0.004 ^c	0.575±0.005 ^d
缬氨酸 Val	0.174±0.004 ^a	0.145±0.006 ^b	0.525±0.019 ^c	0.561±0.005 ^d	0.534±0.002 ^c
蛋氨酸 Met	0.029±0.001 ^a	0.034±0.001 ^a	0.311±0.013 ^b	0.248±0.014 ^c	0.218±0.004 ^d
异亮氨酸 Ile	0.132±0.004 ^a	0.136±0.004 ^a	0.521±0.014 ^b	0.495±0.007 ^c	0.473±0.004 ^d
亮氨酸 Leu	0.255±0.008 ^a	0.235±0.006 ^a	0.849±0.046 ^b	0.846±0.006 ^b	0.765±0.003 ^c
酪氨酸 Tyr	0.021±0.001 ^a	0.059±0.001 ^b	0.367±0.013 ^c	0.269±0.016 ^d	0.228±0.009 ^e
苯丙氨酸 Phe	0.124±0.002 ^a	0.147±0.007 ^a	0.503±0.022 ^b	0.505±0.007 ^b	0.457±0.013 ^c
赖氨酸 Lys	0.175±0.006 ^a	0.156±0.004 ^a	0.717±0.031 ^b	0.674±0.013 ^b	0.606±0.011 ^c
组氨酸 His	0.018±0.000 ^a	0.017±0.000 ^a	0.183±0.004 ^b	0.185±0.005 ^b	0.172±0.012 ^b
精氨酸 Arg	0.193±0.002 ^a	0.167±0.008 ^a	0.621±0.015 ^b	0.628±0.016 ^b	0.558±0.014 ^c
游离氨基酸总量 TAA	3.863±0.077 ^a	3.538±0.079 ^a	11.565±0.262 ^b	11.426±0.179 ^{bc}	11.004±0.189 ^c
鲜味氨基酸 FAA	1.922±0.031 ^a	1.787±0.028 ^b	4.347±0.075 ^c	4.419±0.045 ^c	4.468±0.079 ^c
鲜味氨基酸/氨基酸总量 FAA/TAA	0.498	0.505	0.376	0.387	0.406
甜味氨基酸 SAA	0.820±0.018 ^a	0.655±0.014 ^b	2.621±0.110 ^c	2.596±0.040 ^c	2.525±0.038 ^c
甜味氨基酸/氨基酸总量 SAA/TAA	0.212	0.185	0.227	0.227	0.230
苦味氨基酸 BAA	1.100±0.028 ^a	1.037±0.037 ^a	4.230±0.077 ^b	4.142±0.094 ^b	3.783±0.072 ^c
苦味氨基酸/氨基酸总量 BAA/TAA	0.285	0.293	0.366	0.363	0.344

2.5 蟹黄鲜虾酱贮藏过程滋味强度值(TAV)及味精当量(EUC)的变化

TAV 是评价食品中单一组分的滋味强度及对整体风味贡献最经典和客观的方法(王曜等, 2014),

TAV 值越大, 说明该物质对食品滋味贡献越大。对照组和实验组蟹黄鲜虾酱贮藏过程呈味物质的滋味强度值变化如表 6~表 7 所示。GMP、IMP 和谷氨酸是蟹黄鲜虾酱中最主要的呈鲜味物质。

表6 对照组蟹黄鲜虾酱呈味物质的阈值和贮藏过程滋味强度值、味精当量的变化(g/100 g)
Tab.6 The changes of TAV and EUC during storage of control crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

呈味成分 Taste compositions	呈味情况 Taste (张家奇等, 2017)	阈值 Threshold	贮藏时间 Storage time (d)				
			0	45	90	135	180
GMP		0.0125	2.24	1.84	2.32	2.08	2.00
IMP		0.025	0.68	0.60	0.40	0.44	0.48
AMP		0.05	0.30	0.06	0.20	0.10	0.22
天门冬氨酸 Asp	鲜/酸(+) Umami/Sour	0.10	1.64	2.25	9.31	9.34	9.05
苏氨酸 Thr	甜(+) Sweet	0.26	0.42	0.43	1.47	1.51	1.48
丝氨酸 Ser	甜(+) Sweet	0.15	0.97	0.97	2.71	2.89	2.78
谷氨酸 Glu	鲜/酸(+) Umami/Sour	0.03	55.03	52.73	102.70	105.50	113.07
脯氨酸 Pro	甜/苦(+) Sweet/Bitter	0.30	0.51	0.32	1.75	1.80	1.57
甘氨酸 Gly	甜(+) Sweet	0.13	1.04	1.04	3.70	3.65	3.62
丙氨酸 Ala	甜(+) Sweet	0.06	4.17	3.27	10.08	10.12	9.73
缬氨酸 Val	甜/苦(-) Sweet/Bitter	0.04	3.75	3.68	11.68	12.88	12.45
蛋氨酸 Met	苦/甜/硫(-) Bitter/Sweet/Sulfur	0.03	1.10	1.17	12.27	6.47	5.50
异亮氨酸 Ile	苦(-) Bitter	0.09	2.50	1.47	5.02	4.83	4.87
亮氨酸 Leu	苦(-) Bitter	0.19	1.18	1.21	3.86	3.91	3.76
苯丙氨酸 Phe	苦(-) Bitter	0.09	1.11	1.50	4.69	4.83	4.74
赖氨酸 Lys	甜/苦(-) Sweet/Bitter	0.05	3.24	3.22	12.58	11.10	12.42
组氨酸 His	苦(-) Bitter	0.02	0.70	0.90	8.10	7.85	7.90
精氨酸 Arg	甜/苦(+) Sweet/Bitter	0.05	2.66	3.32	9.94	10.10	9.92
EUC(g MSG/100 g)			171.91	135.98	306.54	287.11	304.50

表7 实验组蟹黄鲜虾酱呈味物质的阈值和贮藏过程滋味强度值、味精当量的变化(g/100 g)
Tab.7 The changes of TAV and EUC during storage of test crab cream and shrimp sauce (g/100 g)

呈味成分 Taste compositions	呈味情况 Taste (张家奇等, 2017)	阈值 Threshold	贮藏时间 Storage time (d)				
			TAV 值 TAV value				
			0	45	90	135	180
GMP		0.0125	2.72	2.16	2.32	2.32	2.48
IMP		0.025	0.84	0.76	0.60	0.60	0.64
AMP		0.05	0.16	0.10	0.18	0.16	0.36
天门冬氨酸 Asp	鲜/酸(+) Umami/Sour	0.10	2.56	2.22	11.13	11.24	10.46
苏氨酸 Thr	甜(+) Sweet	0.26	0.49	0.43	1.70	1.71	1.60
丝氨酸 Ser	甜(+) Sweet	0.15	1.10	0.95	3.09	3.15	3.59
谷氨酸 Glu	鲜/酸(+) Umami/Sour	0.03	55.53	52.17	107.80	109.83	114.07
脯氨酸 Pro	甜/苦(+) Sweet/Bitter	0.30	0.55	0.31	1.95	1.80	1.66
甘氨酸 Gly	甜(+) Sweet	0.13	1.06	0.93	3.94	3.95	3.83
丙氨酸 Ala	甜(+) Sweet	0.06	3.77	3.10	10.30	10.42	9.58
缬氨酸 Val	甜/苦(-) Sweet/Bitter	0.04	4.35	3.63	13.13	14.03	13.35
蛋氨酸 Met	苦/甜/硫(-) Bitter/Sweet/Sulfur	0.03	0.97	1.13	10.37	8.27	7.27
异亮氨酸 Ile	苦(-) Bitter	0.09	1.47	1.51	5.79	5.50	5.26
亮氨酸 Leu	苦(-) Bitter	0.19	1.34	1.24	4.47	4.45	4.03
苯丙氨酸 Phe	苦(-) Bitter	0.09	1.38	1.63	5.59	5.61	5.08
赖氨酸 Lys	甜/苦(-) Sweet/Bitter	0.05	3.50	3.12	14.34	13.48	12.12
组氨酸 His	苦(-) Bitter	0.02	0.90	0.90	9.15	9.25	8.60
精氨酸 Arg	甜/苦(+) Sweet/Bitter	0.05	3.86	3.34	12.42	12.56	11.16
EUC(g MSG/100 g)			208.24	159.59	334.07	345.64	389.58

EUC 可衡量鲜味氨基酸与呈味核苷酸混合产生的协同效应。对照组和实验组蟹黄鲜虾酱贮藏过程味精当量的变化如表 6~表 7 所示。随着贮藏时间的延长, 对照组和实验组 EUC 呈先下降后上升的趋势, 贮藏 180 d 时, 分别达到 304.50 g 和 389.58 g MSG/100 g, 说明添加丁香油, 对蟹黄鲜虾酱的鲜甜味有提升作用。

3 结论

丁香油在蟹黄鲜虾酱贮藏过程中, 能抑制丙二醛生成、总巯基降低和不饱和脂肪酸的分解, 对蟹黄鲜虾酱贮藏过程中呈味核苷酸总量、鲜味氨基酸、甜味氨基酸和游离氨基酸总量也有显著提高的作用, 使酱制品的味精当量显著高于不添加丁香油的酱制品。说明丁香油在蟹黄鲜虾酱贮藏过程中, 不仅具有抗脂肪和蛋白质氧化的作用, 还能提高蟹黄鲜虾酱的贮藏稳定性和风味。

参 考 文 献

- Benjakul S, Sutthipan N. Muscle changes in hard and soft shell crabs during frozen storage. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42(3): 723–729
- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223–253
- Cui GY. Flavor nucleotides and their usage in food. *Chinese Cuisine Research*, 1999(2): 1–6 [崔桂友. 呈味核苷酸及其在食品调味中的应用. *中国烹饪研究*, 1999(2): 1–6]
- Dean RT, Fu SL, Stochker R, *et al.* Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 324(1): 1–18
- Fuke S, Ueda Y. Interactions between umami and the other flavor characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, 1996, 7(12): 407–411
- Jiang SH, Wang SY, Ma HL, *et al.* Extracting technology and antioxidant activity of bioactive components from clove. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2010, 41(1): 132–138 [江慎华, 王书源, 马海乐, 等. 丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究. *农业机械学报*, 2010, 41(1): 132–138]
- Kang X, Qiao X, Li DS, *et al.* Amino acid changes relating with volatile flavor compound in the soybean paste. *Food Science and Technology*, 2011, 36(6): 281–286 [康旭, 乔鑫, 李东生, 等. 豆酱中黄豆氨基酸变化与挥发性物质的关系. *食品科技*, 2011, 36(6): 281–286]
- Karuppiyah P, Rajaram S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinal* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(8): 597–601
- Kong L, Cai CF, Ye YT, *et al.* Comparison of non-volatile compounds and sensory characteristics of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) reared in lakes and ponds: Potential environmental factors. *Aquaculture*, 2012, 364: 96–102
- Kumudavally KV, Tabassum A, Radhakrishna K, *et al.* Effect of ethanolic extract of clove on the keeping quality of fresh mutton during storage at ambient temperature (25±2)°C. *Journal of Food Science and Technology*, 2011, 48(4): 466–471
- Li WJ. Nutritional and flavor components analysis of Antarctic krill and white shrimp. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [李婉君. 南极磷虾与南美白对虾营养与滋味成分比较. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Liu DM, Wang JH, Liu YL, *et al.* Changes in fatty acid composition during cold storage of fresh grass carp muscle. *Food Science*, 2013, 34(2): 194–198 [刘冬敏, 王建辉, 刘永乐, 等. 草鱼肌肉脂肪酸组成及其在冷藏过程中的含量变化. *食品科学*, 2013, 34(2): 194–198]
- Lu YQ, Yan MY, Chen DW, *et al.* Protein oxidation of processed fish products. *Food Science*, 2015, 36(19): 55–59 [陆玉芹, 颜明月, 陈德慰, 等. 鱼类加工制品蛋白质氧化程度分析. *食品科学*, 2015, 36(19): 55–59]
- Luo YT, Gu DH, Xu ZQ, *et al.* Antioxidant activity of natural spices used in meat products. *Meat Research*, 2017, 31(10): 53–57 [罗雨婷, 谷大海, 徐志强, 等. 天然香辛料在肉制品中抗氧化活性研究进展. *肉类研究*, 2017, 31(10): 53–57]
- Memon NN, Talpur FN, Bhangar MI, *et al.* Changes in fatty acid composition in muscle of three farmed carp fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Catla catla*) raised under the same conditions. *Food Chemistry*, 2011, 126(2): 405–410
- Milan S. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(6–7): 531–537
- Namanug HJ, Park HJ, Cho IH, *et al.* Metabolite profiling of doenjang, fermented soybean paste, during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(11): 1926–1935
- Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, *et al.* Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 2010, 44(10): 1125–1171
- Pignoli G, Bou R, Rodriguez-Estrada MT, *et al.* Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, 2009, 83(3): 412–416
- Rotzoll N, Dunkel A, Hofmann T. Quantitative studies, taste reconstitution and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(7): 2705–2711

- Shen YG, Pei ZP, Jiang SH, *et al.* Antioxidant activity of non-volatiles from clove. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(10): 131–137 [沈勇根, 裴志鹏, 江慎华, 等. 丁香非挥发性成分抗氧化活性. *农业机械学报*, 2012, 43(10): 131–137]
- Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, 25(3–4): 207–218
- Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(6): 531–537
- Sun ZY. Application and development prospects of flavour agent. *China Condiment*, 2011, 36(6): 1–4 [孙芝杨. 鲜味剂的应用及发展前景. *中国调味品*, 2011, 36(6): 1–4]
- Tu BX, Lou YJ, Liu YG. Sharp freezing effects on the quality of frozen stored *Larimichthys crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 55–59 [屠冰心, 娄永江, 刘永固. 低温速冻处理对养殖大黄鱼冻藏品质的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 55–59]
- Utaiwan C, Arunee A, Alan EB. Effects of hydrocolloid addition and high pressure processing on the rheological properties and microstructure of a commercial ostrich meat product “Yor” (Thai sausage). *Meat Science*, 2007, 76(3): 548–554
- Wang DQ, Zhang L, Wu XG, *et al.* Effect of 8‰ low salinity seawater on taste compounds and sensory evaluation of female Chinese mitten crab during temporary culture. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 1–7 [王丹青, 张龙, 吴旭干, 等. 8‰低盐度海水暂养对中华绒螯蟹雌蟹肌肉滋味品质的影响. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 1–7]
- Wang S, He Y, Wang YY, *et al.* Comparison of flavor qualities of three sourced *Eriocheir sinensis*. *Food Chemistry*, 2016, 200(12): 24–31
- Wang Y, Chen SS. Comparative composition of free amino acids in wild and cultured *Procambarus clarkia*. *Food Science*, 2014, 35(11): 269–273 [王曜, 陈舜胜. 野生与养殖克氏原螯虾游离氨基酸的组成及比较研究. *食品科学*, 2014, 35(11): 269–273]
- Wang Y, Hui T, Zhang YW, *et al.* Effects of frying conditions on the formation of heterocyclic amines and *trans* fatty acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Food Chemistry*, 2015, 167: 251–257
- Wu CM, Wu ZH. Studies on antibacterial activity of *Eugenia caryophyllata thunb* extract. *Journal of Hubei Polytechnic University*, 2000, 15(1): 43–45 [吴传茂, 吴周和. 丁香提取液的抑菌作用研究. *湖北工学院学报*, 2000, 15(1): 43–45]
- Xia XF, Kong BH, Liu Q, *et al.* Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles. *Meat Science*, 2009, 83(2): 239–245
- Yagiz Y, Kristinsson HG, Balaban MO, *et al.* Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chemistry*, 2009, 116(4): 828–835
- Yang F, Rustad T, Xu YS, *et al.* Endogenous proteolytic enzymes- a study of their impact on cod (*Gadus morhua*) muscle proteins and textural properties in a fermented product. *Food Chemistry*, 2015, 172: 551–558
- Yao CQ, Zheng QR. Preservation effects of cassia essential oil and clove essential oil on chilled pork. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(17): 3604–3606 [姚成强, 郑俏然. 桂皮精油和丁香精油对冷却猪肉保鲜效果的研究. *湖北农业科学*, 2011, 50(17): 3604–3606]
- Yao JY, Li Y, Jiang YY, *et al.* Optimization of chitosan-citrus essential oil microcapsules for application in the preservation of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 203–209 [姚洁玉, 李苑, 江杨阳, 等. 壳聚糖-柑橘精油微胶囊制备工艺优化及其在南美白对虾保鲜中的应用. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 203–209]
- Zhang HL, Wang YS, Li CW. Correlation between microbial community structure and free amino acid composition of traditional fermented soybean paste. *Food Science*, 2019, 40(14): 192–197 [张慧林, 王永胜, 李冲伟. 传统发酵豆酱的微生物群落结构和游离氨基酸组成及其相关性分析. *食品科学*, 2019, 40(14): 192–197]
- Zhang JQ, Zhang L, Wang XC. Effects of rice culture and pond culture on the quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(13): 229–236 [张家奇, 张龙, 王锡昌. 稻田养殖和池塘养殖对中华绒螯蟹滋味品质的影响. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 229–236]
- Zhao GM, Zhou GH, Liu YX, *et al.* Muscle changes of non-protein nitrogen and free amino acids during Jinhua ham processing. *Food Science*, 2006, 27(2): 33–37 [赵改名, 周光宏, 柳艳霞, 等. 肌肉非蛋白氮和游离氨基酸在金华火腿加工中的变化. *食品科学*, 2006, 27(2): 33–37]
- Zhao J, Chen J, Zhu HN, *et al.* Mass spectrometric evidence of malonaldehyde and 4-hydroxynonenal adductions to radical-scavenging soy peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(38): 9727–9736
- Zhao TT, Zhang Y, Chen C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 89–96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 89–96]

Effects of Clove Oil on Storage Quality of Crab Cream and Shrimp Sauce

CHEN Xiaolei¹, HU Wang^{2①}, MA Chaobin³, LING Jun¹, DUAN Guoqing¹, BAO Kai⁴

(1. Fishery Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Anhui Key Laboratory of Aquaculture and Stock Enhancement, Hefei 230031; 2. Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031; 3. Laomiao Town Rural Integrated Service Station, Fuyang 236143; 4. Anhui Huimin Industrial Corporation Limited, Wuhu 238331)

Abstract The effects of adding clove oil on the storage quality of crab cream and shrimp sauce have been studied in terms of MDA content, total sulfhydryl (T-SH) content, fatty acid composition and content, free amino acid content, and taste nucleotide content. Here, taste activity value and equivalent umami concentration (EUC) were used to evaluate the taste strength of these ingredients, then combined with other items to comprehensively analyze the storage quality of crab cream and shrimp sauce. The results showed that after 180 days of storage, MDA content with added clove oil was lower than without clove oil, but adding clove oil produced higher T-SH levels. After the same storage period, the saturated fatty acid content without added clove oil was significantly higher than with clove oil. However, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid content showed contrary results. GMP, IMP, and AMP were significantly reduced after 180 days of storage without clove oil, but AMP levels with clove oil significantly rose during the same storage period. The total taste nucleotide content with and without clove oil was reduced significantly. All free amino acids improved with and without clove oil during storage, but the total free amino acid content, flavor amino acid content, and sweet amino acid content were significantly higher with clove oil than without. GMP, IMP, Glu, Ala, Val, Lys, and Arg are major constituents of crab cream and shrimp sauce. The EUC without clove oil rose from 171.91 g MSG/100 g to 304.50 g MSG/100 g. However, after adding clove oil, it rose from 208.24 g MSG/100 g to 389.58 g MSG/100 g after storage. The results suggest that clove oil has fat and protein anti-oxidation effects, and improves the storage stability and flavor of crab cream and shrimp sauce.

Key words Clove oil; Crab cream and shrimp sauce; Fatty acid; Taste nucleotide; Free amino acid

① Corresponding author: HU Wang, E-mail: huwang101@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200224001

http://www.yykxjz.cn/

李娇, 公丕海, 常青, 孟振, 关长涛, 李佳佳. 岩礁鱼类行为生态学研究进展. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 192-199
Li J, Gong PH, Chang Q, Meng Z, Guan CT, Li JJ. Research progress on behavioral ecology of reef fish. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 192-199

岩礁鱼类行为生态学研究进展*



李 娇^{1,2} 公丕海^{1,2} 常 青^{1,2} 孟 振^{1,2} 关长涛^{1,2①} 李佳佳^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 岩礁鱼类多具有较高的经济价值,但过度开发、环境污染、全球气候变化造成岩礁鱼类及其栖息地受到不同程度的破坏,资源量锐减,栖息地退化。为应对全球海洋生态环境和资源面临的压力,以人工鱼礁、增殖放流为水生生物资源养护基础措施的海洋牧场建设成为世界沿海国家的战略性选择。开展岩礁鱼类行为生态学研究,解析生物对鱼礁结构物和人工生境的响应行为及人工环境对岩礁鱼类行为的影响,对优化水生生物放流策略、提高增殖物种成活率、养护生物资源、科学开展人工鱼礁工程建设和促进渔业经济发展具有重要作用。为此,本文综述了国内外对岩礁鱼类在栖息地选择、索饵、繁殖、集群、领域、防御等行为生态学研究进展,梳理了岩礁鱼类行为生态学研究在渔业资源保护与开发中的重要作用,同时,就岩礁鱼类行为生态研究中存在的问题进行讨论并提出建议,以期为我国海洋牧场建设提供更科学的理论基础和更高效的技术方案。

关键词 岩礁鱼类; 行为生态学; 研究进展; 人工鱼礁

中图分类号 S953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0192-08

岩礁鱼类或因肉质鲜美具有较高的食用价值,或因体型优美、色彩亮丽具有较高的观赏价值,是水产业竞相养殖、捕捞的对象。但随着全球气候变化、过度捕捞、环境污染的加剧,岩礁鱼类的生存环境不断恶化,资源数量持续下降,礁石、珊瑚礁等岩礁性鱼类赖以生存的栖息地受到损坏,出现栖息地退化、甚至消失的现象(金显仕等, 2015; Devine, 2011),保护增殖岩礁鱼类已成为迫在眉睫的重要问题。海洋牧场作为现代生态渔业的重要组成部分,以人工鱼礁、增殖放流和海藻场修复为主要措施,已成为沿海渔业国家的战略性选择,经过十多年的发展,成为当前我国渔

业资源养护的主要模式,在海洋渔业资源增殖、生态环境修复显现一定的效果。海洋牧场技术体系是一个多学科交叉融合的系统。行为生态学作为这一技术体系的重要学科,研究岩礁鱼类在鱼礁生境中的行为特征,对改进人工鱼礁结构、优化增殖放流策略、提高水生生物养护效果具有指导作用。我国的动物行为学研究起步较晚,研究对象以陆生生物为主,研究内容主要集中于繁殖和摄食行为(Toro *et al*, 1998; Jiang *et al*, 1993),近年来,虽取得不少显著的成果,但研究范围较小,研究内容比较集中,尤其是对水生生物行为生态关注度较低。本文通过对岩礁鱼类行为生态

*国家重点研发计划(2019YFD0902101)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZD11)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0902101), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019ZD11)]. 李 娇, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2020-02-24, 收修改稿日期: 2020-03-09

学研究进展和主要技术应用进行综述,对岩礁鱼类在礁区生境中的行为特征进行分析、讨论,并给出建议,以期为我国海洋牧场建设和渔业资源养护提供更科学的理论基础和更高效的技术方案。

1 行为生态学基础

1.1 定义

行为生态学属行为学和生态学交叉领域,主要研究行为机制和动物行为的生态学意义和进化意义(尚玉昌,1998),探索动物行为对环境的适应和环境变化对动物行为的影响。行为生态学可细分为趋性行为生态学、时空行为生态学、索饵行为生态学、防御行为生态学、繁殖行为生态学、集群行为生态学、迁移(洄游)行为生态学、社会行为生态学等内容(Cuthill,2005;尚玉昌,1998;朱存良,2007;韩正康,1987)。

1.2 发展历程

行为生态学作为一门交叉学科,其形成时间在学术界并没有一个明确的定论。目前,一般认为行为生态学从20世纪60年代开始萌芽。70年代,史密斯和普莱斯提出的ESS理论(进化稳定策略)成为行为生态学的核心概念(刘季科等,2007),即生物个体之间常常为各种资源(包括食物、栖息地、配偶等)而竞争或合作,竞争或合作不是杂乱无章的,而是以一定的行为方式进行的(Smith,1979)。对动物觅食策略的研究掀起了行为生态学研究的第一次高潮,Charnov(1976)提出的最优觅食理论(Optimal foraging theory)模型被其他学者用在许多动物的觅食行为研究中(Jiang *et al*,1993;Stephens *et al*,1986)。80年代,《An Introduction to Behavioral Ecology》(行为生态学引论)的出版标志着行为生态学成为一门独立的学科(Gross,1996)。进入90年代,人们对动物行为生态学研究的范围逐步扩大,动物繁殖策略和性选择行为的研究受到重视(Toro *et al*,1998;Andersson,1994)。

我国动物行为生态学研究起步较晚,经过30多年的发展已取得一些显著成果,研究对象主要为哺乳动物,其次是鸟类;研究内容以繁殖行为为主,其次是摄食行为(崔绍朋等,2016)。尚玉昌(1998)的相关研究工作对我国行为生态学的发展发挥了巨大的推动作用,《行为生态学》为我国出版的第一部动物行为生态学专著。其后,我国在动物行为生态学方面开展了一些初步研究,研究对象也逐步涉及到水生生物,但总体发展相对缓慢,在研究方法和试验设备方面也存在不完善、相对落后等问题。

2 岩礁鱼类行为生态学研究现状

2.1 岩礁鱼类趋性行为

趋性是具有自由运动能力的生物对外部刺激的反应而引起的具有一定方向性的运动(Pitts,1979),鱼类的趋性主要包括趋光性、趋音性、趋动性、趋流性、趋触性、趋化性、趋电性和趋地性等(杨齐等,2005),其中,趋触性是岩礁性鱼类喜聚集在鱼礁周围的本能行为,较长时间栖息在鱼礁缝隙中,身体大部分通过皮肤、侧线接触鱼礁。鱼礁诱集岩礁鱼类的另一个重要因素是其阴影效应满足负趋光性岩礁鱼类的环境需求,褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)(林超等,2013)和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)(邓雅敏等,2018)在不同光色环境下在人工鱼礁的聚集率显示2种鱼类均具有一定的负趋光性。赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)多栖息在管状礁体内部,或挤入礁体间的窄缝和礁体遮挡的阴影区内(何大仁等,1995a)。鱼类通过侧线系统(Webb,1989;Bodanick *et al*,1981;Brendan *et al*,2016)感觉周围的水流环境,获取水动力信息,并根据水流速度、方向调整自身姿态、位置作为趋流性行为反应。鱼礁产生的流场效应是吸引趋流性鱼类在不同位置聚集的重要因素;游泳能力较强的鱼类喜欢急流,常聚集在鱼礁的迎流面,游泳能力较差的鱼类多聚集在鱼礁周围或后方的缓流区。研究发现,许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)幼鱼对水流速度的感应范围在0.1~0.15 m/s,喜流范围在0.2~0.45 m/s,极限流速在0.6~0.7 m/s(张硕等,2005)。鱼礁环境中的各种声音是引导一些岩礁鱼类聚集的重要因子,如被认为受海流、潮汐和天气事件控制的珊瑚礁鱼类幼体并不是单纯的被动扩散,一些珊瑚礁鱼类幼体能从至少1 km 的距离定向游到珊瑚礁栖息地,环境礁声已经被证明是吸引珊瑚礁鱼类幼鱼定向运动的关键因素(Montgomery *et al*,2001)。

2.2 栖息地选择行为

栖息地为动物提供生存、繁衍和休憩的场所,其差异性对动物的繁殖、生长和索饵等行为造成重要的影响,水生动物对栖息地的选择受到温度、盐度、溶解氧、底质类型和水流速度等各种环境因子的影响(Snickars *et al*,2009;Wahle *et al*,1991)。研究发现,水温升高2℃,黑莓鲈(*Pomoxis nigromac ulfastus*)在空旷区域的活动和游泳行为增加,对砖石外围覆盖区域的使用率减少;黑鲷(*Ameiurus melas*)对空地和植物覆盖区域的使用率增加,对砖石内部的利用减少

(Walberg, 2011)。

鱼礁作为岩礁鱼类赖以生存的基石,为其提供产卵场、索饵场、育幼场和庇护场等必需的生存场所,其结构、材料、布局影响岩礁鱼类的选择偏好。许氏平鲉幼鱼对不同结构模型礁均表现出显著的趋集反应(陈勇等, 2002、2006);大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)在十字型礁的出现率高于方型礁(张硕等, 2008);有效空间较大的礁体对褐菖鲉效果较好(周艳波等, 2011);牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在顶部密封、四周开孔较小的立方体礁周围聚集较多(吴静等, 2004);口径较大的鱼礁模型对赤点石斑鱼的诱集效果更好;黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)对鱼礁孔径没有明显的选择性(何大仁等, 1995b)。相对于三角形礁和框架礁,黑鲷更多选择有效空间最大、遮蔽效果最好的箱体礁(李磊等, 2018)。通过利用鱼探仪、水下摄像和潜水等方式研究发现,真鲷(*Pagrus major*)在小型单体礁排列组成的鱼礁群中数量较多。不同结构鱼礁诱集鱼类的种类、规格不同,构造越复杂的鱼礁诱集鱼类种类数和生物量越多(小川良德等, 1966; 1968; 岗本峰雄等, 1979)。珊瑚礁鱼类对珊瑚生境同样具有不同喜好,相对于分枝和块状形态的珊瑚,大型礁鱼更喜欢栖息在扁平的板珊瑚周围(Kerry *et al*, 2012)。拿骚石斑鱼(*Epinephelus striatus*)喜欢以结构复杂的大型结构物为栖息地,如水深70~100 m的活眼珊瑚(Smith, 1972)。岩礁结构庇护物规格对珊瑚礁鱼类具有不同的适宜性,鱼礁大小和洞穴大小相同条件下,鱼礁周围鱼类数量随洞穴的增加而增加。在保持鱼礁大小和洞穴数量不变的情况下,鱼礁周围大型定居鱼类的数量随着鱼礁上大洞的增多而增加,但小型定居鱼类的数量变化不明显。当鱼礁上的小型庇护所减少时,小型鱼类的丰度随之减少,而大型鱼类的数量则没有受到影响,表明岩礁鱼类在不同生活史阶段对栖息地的选择具有阶段性特征(Hixon *et al*, 1989)。

产卵基是黏性卵鱼类繁殖所必需基质。鱼类产卵的方式、卵块的形状和黏性决定其对产卵基的要求,因此,产卵基的选择对黏性鱼卵发育具有关键性作用,不适合的产卵基容易导致鱼卵脱落、被捕食,降低种群的生态适应性,甚至导致种群崩溃(Taylor *et al*, 2017)。大泷六线鱼倾向于选择礁石网袋作为产卵基(Kimura *et al*, 2011),经过幼体浮游期后游回到礁区附近生活(Gorbunova, 1970)。研究岩礁鱼类对产卵基质的选择特征,根据其产卵方式的特异性和鱼卵形状、黏性等特征选择适宜材质和结构的礁体作为产卵基是保护渔业资源,补充种群结构的必要手段。

2.3 索饵行为生态学

从动物在环境中获取食物信号,到最后将食物吞食或是摒弃,索饵行为是一种与食物摄取密切相关的复杂行为,鱼类的水生特性更给其索饵行为的研究带来很大的挑战(Volkoff *et al*, 2006)。鱼类索饵过程是视觉、嗅觉、听觉、味觉等多种感觉功能的综合应用(梁旭方等, 1998)。在高照度下摄食的竹荚鱼(*Trachurus japonicas*),视觉在摄食过程中占主要作用(Hunter, 1968)。以滤食方式在夜间摄食的拟西鲱鱼(*Alosa pseudoharengus*),其化学感觉对摄食成功率起决定性作用(Janssen, 1978)。斑点杜父鱼(*Cottus bairdi*)利用侧线感觉猎物(Janssen, 1990)。鱼类索饵行为特征和变化受到水域生态环境因素的影响。温度是影响鱼类索饵行为的重要环境因子,在温度升高的情况下,黑莓鲈的摄食量降低,黑鲷的摄食量增加(Walberg, 2011)。饵料效应是鱼礁诱集鱼类的基本因素,在地中海东南部的贫营养水域投放鱼礁后,在此捕食的石斑鱼显著增加(Spanier *et al*, 1990)。纵带狗母鱼(*Synodus englemani*)在白天每4 min改变一次位置捕食猎物,但在日落前30 min停止捕猎(Sweatman, 1984)。蜥蜴岛珊瑚礁中的斑马狮子鱼(*Dendrochirus zebra*)采用合作捕食,一般由2~3个个体组成一个捕食团队,通过摆动背部脊椎,利用网状鳍作为视觉屏障,一起把猎物聚集到一个有限的区域,然后个体轮流攻击它们的猎物(Rizzari *et al*, 2014)。

2.4 繁殖行为生态学

繁殖行为是生物为延续种族所进行的产生后代的生理过程,鱼类繁育行为包括求偶、交配、孵卵及育幼等(Navarrete-Fernández *et al*, 2014; Hoar, 1962)。为了提高繁殖成功率,确保后代存活率,鱼类通过释放“婚姻色”、展示特殊的身体动作吸引异性交配,评估后代照顾的必要性,并确定育幼行为的变化和终止时间(Ochi, 1985)。繁殖季节的大泷六线鱼体色变成鲜亮的黄色(Kimura *et al*, 2011),在发现雌鱼后,加快鱼体摆动的频率,且摆动时间更持久(Munehara *et al*, 2000)。繁殖期的灰鳞鲀雄鱼(*Balistes capriscus*)规格显著大于雌鱼,且呈现明显的深炭黑色(Simmons *et al*, 2012)。部分拿骚石斑鱼在产卵期显现上深下浅的特殊颜色(Smith, 1972)。黑缘九棘鲈(*Cephalopholis spiloparaea*)的求爱在下午晚些时候开始,一直持续到日落,在此期间,雄鱼反复访问多雌交配鱼群(Donaldson, 1995)。领地鱼类通过建立临时的繁殖地来获得配偶,这些繁殖地以洞穴等结构用来放置鱼卵

(Kawase *et al.*, 2013), 如红海珊瑚礁海域的灰边圆雀鲷(*Dascyllus marginatus*)雄鱼垄断并控制珊瑚, 以吸引潜在的配偶, 鱼群中性活跃雄性的数量随珊瑚大小的增加而增加, 在小型珊瑚上呈现成对或一雄多雌, 在大型珊瑚礁出现多雄性, 该研究结果表明, 珊瑚礁生境环境对灰边圆雀鲷的繁殖行为有重要影响(Fricke, 1980)。作为单亲育幼的典型, 太平洋东南海域珊瑚礁区的黑光鳃鱼(*Chromis crusma*)雄鱼在繁殖期筑巢, 并花费 80%~95%的时间呆在巢内守护、孵化鱼卵(Navarrete-Fernández *et al.*, 2014)。

2.5 集群行为生态学

鱼类的集群行为是鱼类间的集体合作行为, 分为临时性和永久性, 鱼类通过集群更好地捕食猎物、对抗天敌、增加繁殖效率、提高种群的生存能力(周应祺等, 2013), 集群行为对种群的稳定性和持久性具有重要作用。产卵聚集是热带岩礁鱼类的常见繁殖集群, 在特定的时间和地点, 以产卵为目的形成的鱼群密度明显高于非生殖期, 这种产卵性集群有 2 种模式, 一种是定居性, 鲷科, 笛鲷科、蓝子鱼科属于定居型产卵聚集; 另一种是临时性, 鹦嘴鱼科、隆头鱼科、刺尾鱼科属于临时性产卵聚集(Domeier *et al.*, 1997)。岩礁鱼类通过集群提高捕食效率、降低捕食危险, 蓝刺尾鱼(*Acanthurus coeruleus*)通过集群方式在被雀鲷鱼守护的藻丛中获取食物, 蓝刺尾鱼个体对藻丛的啃食率与鱼群规模呈正相关, 表明大规模鱼群可以保护蓝刺尾鱼受到较少的雀鲷鱼攻击(Foster, 1985)。生活在加勒比海珊瑚礁海域的双带锦鱼(*Thalassoma bifasciatum*)幼鱼多处于集群状态, 鱼群规模越大, 个体幼鱼的死亡率越低(White *et al.*, 2007)。

2.6 防御行为生态学

防御行为是指任何一种能够减少来自其他动物伤害的行为(尚玉昌, 1998)。动物采用穴居、拟态、回缩、假死、隐蔽等多种方法, 以维持种群丰度和种群组成稳定性。白点眶锯雀鲷(*Stegastes leucostictus*)、月尾刺尾鱼(*Acanthurus bahianus*)、小带刺尾鱼(*Acanthurus chirurgus*)、长刺真鳃(*Holocentrus rufus*)均在礁区洞穴里躲避敌害, 并在黄昏时会积极保护一个至几个庇护所, 且黄昏对庇护所的竞争行为比白日激烈, 对庇护所的种内竞争优势主要依赖个体大小, 种间竞争的结果依赖个体大小和物种种类(Shulman, 1985)。对常栖息在珊瑚或鱼礁等结构物下石鲈(*Pomadasys maculatus*)、笛鲷(*Lutjanus*)、和刺尾鱼

(*Acanthuridae*)的研究表明, 礁石庇护结构物对在礁区大面积活动的鱼类的种群稳定性具有长期重要作用(Khan *et al.*, 2017)。小型岩礁鱼类喜选择小型洞穴作为庇护物, 小型洞穴较多的鱼礁可显著保护小型鱼类免受大型食鱼鱼类的捕食, 这一现象表明, 为持久性渔业而设计的人工鱼礁应包括为小鱼提供庇护的小孔, 以作为被捕食者的避难所, 也要具有大洞为掠食者提供捕食空间(Hixon, 1989)。

2.7 领域行为生态学

领域行为是指保卫领域地的有关行为, 以减少个体或群体冲突, 占有资源, 有利于求偶、交配、繁殖、育幼(尚玉昌, 1986; Brawley *et al.*, 1997)。鱼类在栖息水域某一区域划定的一块属于自己的地盘作为自己的领域, 当其他生物入侵的时候, 采用各种方法驱赶入侵生物, 保护领域, 从而有利于自身在繁殖季节竞争配偶和保护产卵场, 进一步保护鱼卵和幼鱼的行为。墨西哥湾北部人工鱼礁区的灰鳞鲷(*Balistes caprisus*)雄鱼在受精前会在特定的礁石位置建造并维持 1~13 个底层巢穴, 积极保护巢穴周围区域免受其他雌性灰鳞鲷和其他鱼类的攻击, 以吸引 1~5 个雌鱼到巢穴产卵, 受精前的雌性经常参观和检查新筑的巢。受精后雌性一直呆在巢穴保护鱼卵, 雄性继续在巢周围保卫领地, 看望巢穴中的雌性, 并追逐其他鱼类(Simmons *et al.*, 2012)。中等种群密度盾豆娘鱼(*Parma*)成鱼的领域在非生殖期是相连的, 领域大小与个体密度呈负相关, 雄性成鱼和雌性成鱼的领域大小相同, 它们在领域防卫和觅食活动上花费的时间没有区别, 通过改变种群密度和食物丰度实验得到盾豆娘鱼的领域大小主要受到种内相互作用(Norman *et al.*, 1984)。

3 岩礁鱼类行为生态学在资源保护与开发中的应用

3.1 栖息地保护与修复

20 世纪以来, 世界沿海国家的渔业发展经历了“快速发展-过度开发-渔业管理”的过程, 大规模粗放型捕捞、工业化开采与发展及全球气候变化造成水生生物栖息地环境恶化、面积退缩、碎片化严重, 栖息地保护与生态修复已成为刻不容缓的问题。栖息地是生物赖以生存的基础环境, 水生栖息地与生物之间的关系是渔业资源管理的重要决策依据, 对水生生物保护和持续利用具有至关重要的作用。保护渔业资源栖息地环境, 修复受损产卵场, 建设人工渔场是目前迫

切需要解决的问题,更是现代渔业发展的必然方向。研究岩礁鱼类摄食、繁殖和庇护等行为对栖息地环境的响应特征,探明栖息地环境因子变化对岩礁鱼类行为偏好的影响,以此为基础开展人工鱼礁工程学设计,珊瑚礁保护与重建,为岩礁鱼类和黏性卵鱼类提供适宜的产卵基、庇护所,和繁殖、休憩空间,科学开展栖息地和产卵场的保护与修复。

3.2 渔业资源保护与增殖

渔业资源衰退是全球沿海国家共同面临的严重资源问题。石斑鱼等岩礁鱼类一直以名贵经济鱼类出现在人类的餐桌上,为了获取味觉满足和经济回报,各种破坏性网具和“涸泽而渔”的捕捞方式给岩礁鱼类种群数量和生境带来极大的压力。鱼类行为学研究作为鱼类资源保护的基础,对开发选择性渔具,合理开展增殖放流,科学制定渔业管理政策具有重要的指导作用。鱼类行为特性是渔具渔法设计的基础,随着对渔业资源和生态环境保护意识的增强,选择型渔具和资源保护型渔具成为生态保护和渔业可持续发展的必然选择。研究岩礁鱼类行为生态学,根据捕捞对象对各种环境刺激的反应,开发适宜的捕捞工具和作业方式,提高对目标物种捕捞效率,同时实现对其他物种和环境的保护。研究岩礁鱼类在不同生活史阶段的对外界环境变化的响应特征,掌握对生境的特殊需求,确定放流物种的最适放流规格、放流方法、放流海域和时间,对提高放流成活率,改善种群数量和维持种群多样性具有重要意义。

3.3 鱼类养殖与开发利用

随着“绿色发展”成为水产养殖业的根本指导方向,养殖鱼类的动物福利(Bergqvist *et al.*, 2013)也得到越来越多的关注。环境丰容(Mellen *et al.*, 2001)是提高鱼类养殖福利,增加养殖利润,保障水产品质量安全,推动水产养殖业持续健康发展的必由之路。环境丰容与鱼类行为相辅相成,密切相关,鱼类通过行为表达对外界环境的适应性和对生存环境条件需求。作为我国工厂化养殖的重要经济鱼类,研究石斑等名贵岩礁鱼类各种行为下的真实目的,是优化养殖环境,满足养殖鱼类生理、心理、行为需求的基础。结合养殖鱼类行为特征和环境丰容技术,在养殖池内搭载舒适的生存环境,提高饲养饵料的营养和口感,减少养殖过程中病害的发生和药物的使用,实现水产养殖的无公害、绿色、有机,满足人们对健康水产品的需求,实现养殖渔业的绿色健康发展。

4 建议与展望

渔业资源衰退,天然产卵场受损和水生生物多样性下降等一系列资源和环境问题正在提醒人类加快海洋生态保护的必要性,天然渔场修复和人工渔场建设已成为海洋生态修复的必然选择。岩礁渔场中鱼类的行为主要由先天趋性、交配繁殖、避害空间及索饵欲求等生理因素决定。岩礁鱼类的趋触性是利用人工鱼礁营造或修复其栖息地的根本出发点,各类人工鱼礁的投放为岩礁鱼类提供必需的生境基础设施,岩礁鱼类的趋流和趋光行为则为人工鱼礁的结构设计和人工渔场规模配置提供参考依据。通过深入开展岩礁鱼类生态行为学研究,掌握岩礁鱼类在礁区的行为生态特征,阐明目标鱼类对栖息地环境的喜好特征,查明海域海流的自然条件,摸清岩礁鱼类全生活史阶段对人工鱼礁和珊瑚礁的结构、材料的选择特征,研发适合海域自然环境、符合目标物种行为习性的产卵礁、庇护礁;通过人工鱼礁的布放,调整礁区流体流态和流速大小,为增殖鱼类营造适宜的生存环境。利用人工鱼礁开展环境丰容,提高岩礁鱼类动物福利,提高受精率、孵化率和成活率;增加活鱼运输中的适应性,保障增殖放流物种的成活率;改进渔具的选择性和生态保护功能,制定科学的岩礁鱼类开发利用策略;加快渔业资源增殖、保护,发展生态友好型渔业,确保渔业资源持续利用,为水域生态环境修复和生物资源增殖保护提供理论基础和技术支撑。

参 考 文 献

- Andersson M. Sexual selection. Princeton, New Jersey: Princeton University, 1994
- Bergqvist J, Gunnarsson S. Finfish aquaculture: Animal welfare, the environment, and ethical implications. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 2013, 26(1): 75-99
- Bodanick D, Northcutt GR. Electroreception in lampreys: Evidence that the earliest vertebrates were electroreceptive. *Science*, 1981, 212(4493): 465-467
- Brawley SH, Adey WH. Territorial behavior of threespot damselfish (*Eupomacentrus planifrons*) increases reef algal biomass and productivity. *Environmental Biology of Fishes*, 1977, 2(1): 45-51
- Brendan C, Eva K. Fishlike rheotaxis. *Journal of Fluid Mechanics*, 2016, 793: 656-666
- Charnov EL. Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology*, 1976, 9(2): 129-136
- Chen Y, Wu XY, Shao LP, *et al.* The influence of model artificial reef on behavior in juvenile abalone and sea urchin. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(4): 361-365 [陈勇,

- 吴晓郁, 邵丽萍, 等. 模型礁对幼鲷、幼海胆行为的影响. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 361–365]
- Chen Y, Yu CQ, Zhang GS, *et al.* The environmental function and fish gather effect of artificial reef. Journal of Dalian Fisheries University, 2002, 17(1): 64–68 [陈勇, 于长清, 张国胜, 等. 人工鱼礁的环境功能与集鱼效果. 大连水产学院学报, 2002, 17(1): 64–68]
- Cui SP, Li WQ, Yi LN, *et al.* A bibliometrical analysis of status on animal behavior in China. Acta Theriologica Sinica, 2016, 36(4): 476–484 [崔绍朋, 李玮琪, 伊丽娜, 等. 中国动物行为学研究现状的文献计量学分析. 兽类学报, 2016, 36(4): 476–484]
- Cuthill I. The study of function in behavioural ecology. Animal Biology, 2005, 55(4): 399–417
- Deng YM, Liu W, He JJ, *et al.* Effects of flow velocity and light color on attraction of *Oplegnathus fasciatus* by artificial reef. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2018, 37(3): 203–207 [邓雅敏, 刘威, 何娇娇, 等. 流速和光色对人工鱼礁诱集条石鲷效果的影响. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(3): 203–207]
- Devine BM. The effects of ocean acidification on habitat associations of coral reef fishes. Master's Thesis of James Cook University, Australia, 2011
- Domeier ML, Colin PL. Tropical reef fish spawning aggregations: Defined and reviewed. Bulletin of Marine Science, 1997, 60(3): 698–726
- Donaldson TJ. Courtship and spawning behavior of the pygmy grouper, *Cephalopholis spiloparaea* (Serranidae: Epinephelinae), with notes on *C. argus* and *C. urodeta*. Environmental Biology of Fishes, 1995, 43(4): 363–370
- Foster SA. Group foraging by a coral reef fish: A mechanism for gaining access to defended resources. Animal Behaviour, 1985, 33(3): 782–792
- Fricke HW. Control of different mating systems in a coral reef fish by one environmental factor. Animal Behaviour, 1980, 28(2): 561–569
- Gorbunova NN. Spawning and development of greenlings (Family Hexagrammidae). In: Rass TS(ed). Greenlings: Taxonomy, biology and interoceanic transplantation. Israel Program for Scientific Translations, Moskva, 1970, 121–185
- Gross MR. The evolution of behavioral ecology. Trends in Ecology and Evolution, 1996, 9(10): 358–360
- Han ZK. Application of ethology in animal husbandry. World Agriculture, 1987, 9: 48–50 [韩正康. 动物行为学在畜牧业中的应用. 世界农业, 1987, 9: 48–50]
- He DR, Ding Y. Gathering effect of artificial reef model on garrupa (*Epeinephelus akaara*). Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1995a, 14(4): 394–398 [何大仁, 丁云. 鱼礁模型对赤点石斑鱼的诱集效果. 台湾海峡, 1995a, 14(4): 394–398]
- He DR, Shi YM. Attractive effect of fish reef model on black porgy (*Sparus macrocephalus*). Journal of Xiamen University (Natural Science), 1995b, 35(4): 653–658 [何大仁, 施养明. 鱼礁模型对黑鲷的诱集效果. 厦门大学学报: 自然科学版, 1995b, 35(4): 653–658]
- Hixon MA, Beets JP. Shelter characteristics and Caribbean fish assemblages: Experiments with artificial reefs. Bulletin of Marine Science, 1989, 44(2): 666–680
- Hoar WS. Reproductive behavior of fish. General and Comparative Endocrinology, 1962(Suppl 1): 206–216
- Hunter JR. Effects of light on schooling and feeding of jack mackerel *Trachurus symmetricus*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1968, 25(2): 393–407
- Janssen J, Coombs S, Pride S. Feeding and orientation of mottled sculpin, *Cottus bairdi*, to water jets. Environmental Biology of Fishes, 1990, 29(1): 43–50
- Janssen J. Will alwives (*Alosa pseudoharengus*) feed in the dark? Environmental Biology of Fishes, 1978, 3: 239–240
- Jiang ZG, Hudson RJ. Optimal grazing of wapiti (*Cervus elaphus*) on grassland: Patch and feeding station departure rules. Evolutionary Ecology, 1993, 7(5): 488–498
- Jin XS, Dou SZ, Shan XJ, *et al.* Hot spots of frontiers in the research of sustainable yield of Chinese inshore fishery. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(1): 124–131 [金显仕, 窦硕增, 单秀娟, 等. 我国近海渔业资源可持续产出基础研究热点问题. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 124–131]
- Kawase H, Okata Y, Ito K. Role of huge geometric circular structures in the reproduction of a marine pufferfish. Scientific Reports, 2013, 3(1): 1–6
- Kerry JT, Bellwood DR. The effect of coral morphology on shelter selection by coral reef fishes. Coral Reefs, 2012, 31(2): 415–424
- Khan JA, Goatley CHR, Brandl SJ, *et al.* Shelter use by large reef fishes: Long-term occupancy and the impacts of disturbance. Coral Reefs, 2017, 36(4): 1123–1132
- Kimura MR, Munehara H. Spawning substrata are important for breeding habitat election but do not determine premating reproductive isolation in three sympatric Hexagrammos species. Journal of Fish Biology, 2011, 78(1): 112–126
- Li L, Chen D, Peng JX, *et al.* On the attractive effects of three artificial reef models for *Sparus macrocephalus*. Marine Fisheries, 2018, 40(5): 625–630 [李磊, 陈栋, 彭建新, 等. 3种人工鱼礁模型对黑棘鲷的游记效果研究. 海洋渔业, 2018, 40(5): 625–630]
- Liang XF, He DR. Sensory basis in the feeding behavior of fishes. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(3): 278–284 [梁旭方, 何大仁. 鱼类摄食行为的感受基础. 水生生物学报, 1998, 22(3): 278–284]
- Lin C, Gui FK. The attractive effects of artificial model at different light colors on *Sebastes marmoratus* and *Argyrosomus japonicus*. Fishery Modernization, 2013, 40(2): 66–70, 75 [林超, 桂福坤. 不同光色下人工鱼礁模型对褐菖鲉和日本黄姑鱼诱集效果试验. 渔业现代化, 2013, 40(2): 66–70, 75]

- Liu JK, Nie HY, Bian JH, *et al.* Progress of evolutionarily stable strategy in animal. *Bulletin of Biology*, 2007, 42(4): 1–2 [刘季科, 聂海燕, 边疆晖, 等. 动物进化稳定对策(ESS)及其研究进展. *生物学通报*, 2007, 42(4): 1–2]
- Mellen J, Macphee MS. Philosophy of environmental enrichment: Past, present, and future. *Zoo Biology*, 2001, 20(3): 211–226
- Mineo O, Toshiro K, Toru M. Preliminary study on artificial reef near fish clams-overview of the fish reef group in the north of monkey island. *Journal of the Japan Fisheries Association*, 1979(45): 709–713 [岗本峰雄, 黑木敏郎, 村井彻. 人工鱼礁近傍の魚群生に関する予備的研究-猿島北方魚礁群の概要. *日本水产学会誌*, 1979(45): 709–713]
- Montgomery JC, Tolimieri N, Haine OS. Active habitat selection by pre-settlement reef fish. *Fish and Fisheries*, 2001, 2(3): 261–277
- Munchara H, Kanamoto Z, Miura T. Spawning behavior and interspecific breeding in three Japanese greenling (Hexagrammidae). *Ichthyological Research*, 2000, 47(3/4): 287–292
- Navarrete-Fernández T, Landaeta MF, Bustos CA, *et al.* Nest building and description of parental care behavior in a temperate reef fish, *Chromis crusma* (Pisces: Pomacentridae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 2014, 87(1): 30
- Norman MD, Jones GP. Determinants of territory size in the pomacentrid reef fish, *Parma victoriae*. *Oecologia*, 1984, 61(1): 60–69
- Ochi H. Termination of parental care due to small clutch size in the temperate damselfish, *Chromis notata*. *Environmental Biology of Fishes*, 1985, 12(2): 155–160
- Pitts J. Taxis and behaviour: Elementary sensory systems in biology. *Endeavour*, 1979, 3(4): 185–186
- Rizzari JR, Lönnstedt OM. Cooperative hunting and gregarious behaviour in the zebra lionfish, *Dendrochirus zebra*. *Marine Biodiversity*, 2014, 44(4): 467–468
- Ryotoku O, Yoshio T. Experiment on effect of artificial reef to fish action I ~VI. *Tokai Institute of Water*, 1966(45): 107–161 [小川良徳, 竹村嘉夫. 人工鱼礁に対する魚群行動の試験的研究 I ~VI. *东海水研报*, 1966(45): 107–161]
- Ryotoku O. Artificial reef and reef fish: Artificial reef and its effect. *Fisheries Enhancement*, 1968(7): 1–21 [小川良徳. 人工鱼礁と魚付き: 人工鱼礁とその効果. *水产増殖臨号*, 1968(7): 1–21]
- Shang YC. Behavioral ecology (Fourteenth): Territorial behavior (1). *Journal of Ecology*, 1986(6): 62–66 [尚玉昌. 行为生态学(十四): 动物的领域行为(1). *生态学杂志*, 1986(6): 62–66]
- Shang YC. Behavioral ecology. Beijing: Peking University Press, 1998 [尚玉昌. 行为生态学. 北京: 北京大学出版社, 1998]
- Shang YC. Defensive behavior of animal. *Bulletin of Biology*, 1999(6): 8–11 [尚玉昌. 动物的防御行为. *生物学通报*, 1999(6): 8–11]
- Shulman MJ. Coral reef fish assemblages: Intra- and interspecific competition for shelter sites. *Environmental Biology of Fishes*, 1985, 13(2): 81–92
- Simmons CM, Szedlmayer ST. Territoriality, reproductive behavior, and parental care in gray triggerfish, *Balistes capriscus*, from the northern gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 2012, 88(2): 197–209
- Smith JM. Game theory and the evolution of behaviour. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1979, 205(1161): 475–488
- Smith LC. A spawning aggregation of Nassau grouper, *Epinephelus striatus* (Bloch). *Transactions of the American Fisheries Society*, 1972, 101(2): 257–261
- Snickars M, Sundblad GOR, Sandstr OMA, *et al.* Habitat selectivity of substrate-spawning fish: Modelling requirements for the Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, 398(3): 235–243
- Spanier E, Tom M, Pisanty S, *et al.* Artificial reefs in the low productive marine environments of the Southeastern Mediterranean. *Marine Ecology*, 1990, 11(1): 61–75
- Stephens DW, Kerbs JR. Foraging theory. New Jersey: Princeton University Press, 1986
- Sweatman HPA. A field study of the predatory behavior and feeding rate of a piscivorous coral reef fish, the lizardfish *Synodus englemani*. *Copeia*, 1984(1): 187–194
- Taylor JJ, Rytwinski T, Bennet JR. The effectiveness of spawning habitat creation or enhancement for substrate spawning temperate fish: A systematic review protocol. *Environmental Evidence*, 2017, 6(5): 1–7
- Toro MA, Lopez-Fanjul C. Recent advances in animal breeding theory and its possible application in aquaculture. *CIHEAM*, 1998, 31–45
- Volkoff H, Peter RE. Feeding behavior of fish and its control. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 131–140
- Wahle RA, Steneck RS. Recruitment habitats and nursery grounds of the American lobster *Homarus americanus*: A demographic bottleneck? *Marine Ecology Progress Series*, 1991, 69(3): 231–243
- Walberg E. Effect of increased water temperature on warm water fish feeding behavior and habitat use. *Journal of Undergraduate Research at Minnesota State University, Mankato*, 2011, 11: 1–13
- Webb JF. Gross morphology and evolution of the mechanoreceptive lateral-line system in teleost fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 1989, 33(1): 34–53
- White JW, Warner RR. Safety in numbers and the spatial scaling of density-dependent mortality in a coral reef fish. *Ecology*, 2007, 88(12): 3044–3054
- Wu J, Zhang S, Sun MC, *et al.* Experiment on the distribution of different artificial reef models for *Paralichthys olivaceus*. *Marine Fisheries*, 2004, 26(4): 394–398 [吴静, 张硕, 孙满昌, 等. 不同结构的人工鱼礁模型对牙鲆的诱集效果初探. *海洋渔业*, 2004, 26(4): 394–398]

- Yang L, Liu TY, Huang RK. Theory and practice of artificial reef in China. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2005 [杨齐, 刘同渝, 黄汝堪. 中国人工鱼礁的理论与实践. 广州: 广东科技出版社, 2005]
- Zhang S, Chen Y. Preliminary study on the rheotaxis of juvenile *Sebastes fuscescens*. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(3): 282–287 [张硕, 陈勇. 黑鲷幼鱼趋流性的初步研究. 上海水产大学学报, 2005, 14(3): 282–287]
- Zhang S, Sun MC, Chen Y. The attractive effects of different structural artificial reef models on juvenile Schlegel's rockfish *Sebastes schlegeli* and fat greenling *Hexagrammos otakii*. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(1): 13–19 [张硕, 孙满昌, 陈勇. 人工鱼礁模型对大泷六线鱼和许氏平鲈幼鱼个体的诱集效果. 大连水产学院学报, 2008, 23(1): 13–19]
- Zhou YB, Cai WG, Chen HG, et al. Attraction effect of various artificial reef models on *Sebastes marmoratus*(Cuvier et Valenciennes). Guangdong Agriculture Science, 2011(2): 8–10 [周艳波, 蔡文贵, 陈海刚, 等. 不同人工鱼礁模型对褐菖鲈的诱集效应. 广东农业科学, 2011(2): 8–10]
- Zhou YQ, Wang J, Qian WG, et al. Review of fish schooling behavior study. Journal of Shanghai University, 2013, 22(5): 734–741 [周应祺, 王军, 钱卫国, 等. 鱼类集群行为的研究进展. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 734–741]
- Zhu CL. Progress on behavioral ecology of fish. Journal of Beijing Fisheries, 2007(1): 20–24 [朱存良. 鱼类行为生态学研究进展. 北京水产, 2007(1): 20–24]

(编辑 陈 辉)

Research Progress on Behavioral Ecology of Reef Fish

LI Jiao^{1,2}, GONG Pihai^{1,2}, CHANG Qing^{1,2}, MENG Zhen^{1,2}, GUAN Changtao^{1,2①}, LI Jijia^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Reef fish are expensive, but owing to overdevelopment, environmental pollution, and global warming, reef fish resources are collapsing and their habitats are undergoing varying degrees of degradation. In order to solve the stress in the global marine ecological environment and its resources, the construction of marine ranching based on artificial reef and stock enhancement and release has become the main strategy for protecting aquatic organisms in coastal countries. By researching the behavioral ecology of reef fish, analyzing their reaction to reef structure and artificial habitat and the effect of artificial environments on fish, the fish release strategy will be optimized, survival rate will be increased, resources will be protected, and artificial reef constructions will be more scientific. Therefore, in this paper, research progress on the behavioral ecology of reef fish, both in China and abroad, was summarized, including habitat selection and foraging, aggression, territorial and defensive behaviors. Moreover, the importance of reef fish behavioral ecology on resource protection and development was analyzed. Meanwhile, existing problems in the behavioral ecology of reef fish were discussed, and suggestions put forward, to provide a more scientific theoretical basis and more efficient technical scheme for the development of marine ranching in China.

Key words Reef fish; Behavioral ecology; Research progress; Artificial reef

① Corresponding author: GUAN Changtao, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200113001

http://www.yykxjz.cn/

唐嘉嘉, 李诗钰, 李安兴. 鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 200–210

Tang JJ, Li SY, Li AX. Research progress and prospects of parasitic diseases in salmon and trout. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 200–210

鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望*



唐嘉嘉 李诗钰 李安兴^①

(中山大学生命科学院 广东省水生经济动物重点实验室 广州 510275)

摘要 鲑鳟鱼类是典型的冷水性鱼类, 经济价值高, 是世界重要经济养殖鱼类之一。然而, 随着其养殖产量攀升, 养殖密度增大, 养殖环境恶化, 鲑鳟鱼类寄生虫病的发生和危害也日趋频繁和严重, 严重制约了产业的健康发展。鲑鳟鱼常见的、危害较为严重的寄生虫主要包括三代虫(*Gyrodactylus*)、鱼虱(*Caligus rogercresseyi*)、阿米巴原虫(*Neoparamoeba perurans*)、脑碘泡虫(*Myxobolus cerebralis*)、苔藓鲑四囊虫(*Tetracapsuloides bryosalmonae*)和库道虫(*Kudoa* spp.)。这些寄生虫生活史简单, 繁殖速度快, 大多寄生在鱼体表面及体内的各种组织器官上, 导致鱼体生长缓慢、抵抗力下降, 引起鱼体损伤并造成死亡。在防治方法上, 通过物理控制、化学药物和免疫治疗相结合的方法进行综合防控。本文对鲑鳟鱼常见寄生虫病领域的研究和成果进行简要综述, 以期对鲑鳟鱼寄生虫病的研究和防治提供参考。

关键词 鲑鳟鱼类; 寄生虫病; 生活史; 防治措施

中图分类号 S941.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0200-11

鲑鳟鱼类即鲑科鱼类的统称。鲑鱼属深海冷水性鱼类, 也是一种溯河洄游鱼类, 它于生殖季节在淡水江河上游产卵, 产卵后再回到海洋肥育。鲑鱼主要分布于太平洋、大西洋北部及北冰洋海区和沿岸诸水系, 包括大西洋鲑(*Salmo salar*)、太平洋鲑属(*Oncorhynchus* spp.)、北鲑(*Stenodus leucichthys nelma*)等; 而鳟鱼通常分布于淡水中, 栖息在流速较缓的水域或湖泊, 包括虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、金鳟(*Oncorhynchus aguabonita*)、河鳟(*Salmo fario* Linnaeus)等。三文鱼通常指鲑科鱼类中的鲑鱼, 主要为大西洋鲑。鲑鳟鱼在欧美国家养殖极为普遍, 随着渔业生产技术的不断发展, 我国鲑鳟鱼类养殖范围也在不断扩大, 养殖品种也由单一的虹鳟扩大到金鳟、银鲑、大西洋鲑等(邵如玉等, 2019)。在养殖产业化

和集约化程度不断提高的同时, 寄生虫也随之出现(陈国生, 2011)。寄生虫的感染可导致鱼体生长缓慢, 抵抗力下降, 组织损伤和死亡。鲑鳟鱼感染的寄生虫多数具有简单生活史和直接发育型(不需要中间宿主), 这无疑加大了寄生虫病的治疗难度, 大多数寄生虫病的防治至今仍是一个难题。深入了解鲑鳟鱼寄生虫的生活习性和危害, 能在生产上预判疾病的发展规律, 提前做好相关措施, 减少损失。为此, 本文就目前鲑鳟鱼类危害较为严重的寄生虫病(表 1)的病原学、生活史、危害性及防治方法的研究进行介绍, 以期为国内养殖业者提供参考与借鉴。

1 三代虫病

三代虫病(*Gyrodactylus salaris*)的病原是三代虫

* 现代农业产业体系海水鱼寄生虫病防控岗位项目(CARS-47-G18)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System for the Prevention and Control of Marine Fish Parasitic Diseases (CARS-47-G18)].

唐嘉嘉, E-mail: m18392084850@163.com

^① 通讯作者: 李安兴, 教授, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-13, 收修改稿日期: 2020-03-06

(*Gyrodactylus*), 属单殖吸虫纲(Monogeneoidea)、三代虫目(*Gyrodactylida*)、三代虫科(*Gyrodactylidae*)、三代虫属(*Gyrodactylus*)。三代虫是一种专性寄生虫, 胎

生, 生活史类型是直接型, 无中间宿主。在一个生命周期中, 三代虫个体一般产出 2~4 代子代, 子代出生后 24 h 内就可产出子二代(Harris *et al*, 1994)。

表 1 鲑鳟鱼类常见寄生虫病
Tab.1 Common parasitic diseases of salmon and trout

病名 Name of diseases	病原 Pathogens	寄生部位 Parasitic sites	流行时间 Prevalence time (Months)	生活史周期 Life cycle (d)
三代虫病 <i>Gyrodactylus salaris</i>	三代虫 <i>Gyrodactylus</i>	皮肤和鳃 Skin and gill	3~9	1~2
鱼虱病 Fish lice disease	鱼虱 <i>Caligus rogercresseyi</i>	皮肤、鳍和鳃 Skin, fin and gill	5~10	17~72
变形虫性鳃病 Amoebic gill disease	阿米巴原虫 <i>Neoparamoeba perurans</i>	鳃 Gill	4~6, 7~9	22~24
鲑鱼旋转病 Salmonid whirling disease	脑碘泡虫 <i>Myxobolus cerebralis</i>	内部软骨组织 Internal cartilaginous tissues	-	180
增生性肾病 Proliferative kidney disease	苔藓鲑四囊虫 <i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	血液、肾脏、脾脏 Blood, kidney and spleen	5~11	-
库道虫病 Kudoasis	库道虫 <i>Kudoa</i> spp.	肌肉 Muscle	4~9	-
微孢子虫鳃病 Microsporidial gill disease	微孢子虫 <i>Loma salmonae</i>	鳃 Gill	3~9	-
小瓜虫病 Ichthyophthiriasis	多子小瓜虫 <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	皮肤、鳍、鳃 Skin, fin and gill	4~5, 10~11	4~10
肠道角化病 Ceratomyxosis	萨氏角形虫 <i>Ceratomyxa shasta</i>	肠道 Intestine	4~12	-

注: -: 尚不清楚
Note: -: Not clear

三代虫的寄生是通过固着器的 1 对中央大钩和 8 对边缘小钩固着在鱼的体表和鳃上(图 1)。位于虫体前端的附着盘与后端的固着器相互配合, 使三代虫在鱼体上做“尺蠖式”运动(李冉冉等, 2014)。少量寄生时无明显症状, 大量寄生时, 可导致鱼鳃丝黏液增多、鳃部浮肿、鳃组织损伤、体表发白, 进而导致鱼窒息死亡。此外, 三代虫的附着和摄食破坏了宿主鳃和表皮的完整性(图 2), 导致其抵抗细菌及病毒的能

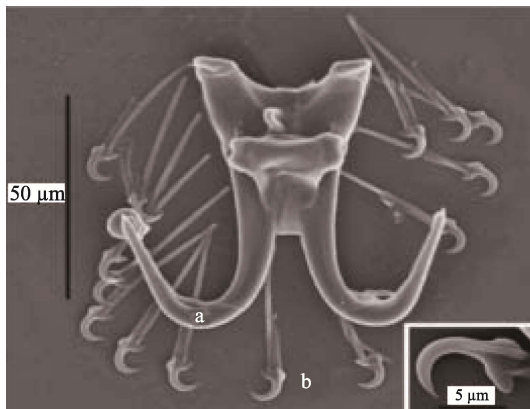


图 1 三代虫固着器扫描电子显微照片

Fig.1 Scanning electron micrograph of *Gyrodactylus fixator* (Jørgensen *et al*, 2007)

a: 中央大钩 Hamulus; b: 边缘小钩 Marginal hook

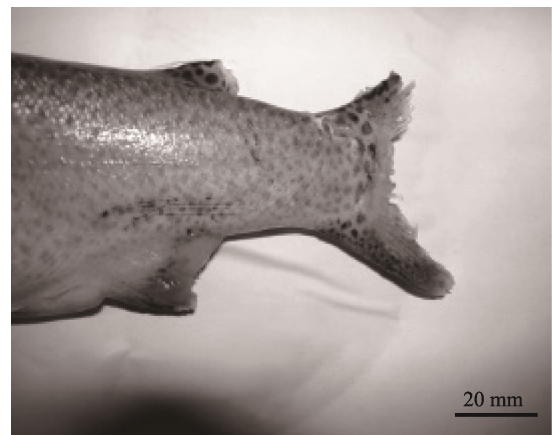


图 2 感染三代虫病的虹鳟尾部严重溃烂

Fig.2 Caudal region of *O. mykiss* showing extensive caudal erosion associated with severe infections of *G. salaris* (You *et al*, 2006)

力下降, 进而有可能引发潜在的继发性感染(Busch *et al*, 2003)。对此病的诊断可用显微镜检查鳃的临时压片, 若发现有大量三代虫寄生(每片鳃上有 50 只以上, 或在低倍显微镜下, 每个视野中有 3~4 只)时, 可确诊为三代虫病。

温度是影响三代虫病暴发的最主要环境因子。在一定范围内, 三代虫种群增长速率与水温呈正相关, 其

具体表现在随水温升高, 虫体产出子代所需时间变短。因此, 夏秋等高温季节有利于三代虫的流行与传播(Sereno-Urbe *et al*, 2012)。三代虫可寄生于宿主的所有发育阶段, 但更偏好寄生于幼龄宿主(Cable *et al*, 2000)。该病是淡水养殖鲑鳟鱼类较为常见的寄生虫性疾病, 大量寄生能引发虹鳟体表损伤甚至死亡。

养殖者广泛采取池水中泼洒福尔马林(37%甲醛)来治疗鲑鳟鱼类三代虫病(Stoltze *et al*, 2001)。在丹麦, Buchmann等(2003)用甲醛对虹鳟进行浸浴处理, 暴露在浓度为20 mg/L的甲醛中18 h, 可杀灭寄生虫; 而5和10 mg/L的处理可显著减少寄生虫。一些抗虫药物(如 H_2O_2)也可用于三代虫病的治疗。在美国, Rach等(2000)以严重患有三代虫病的虹鳟稚鱼为对象, 按高浓度(560 mg/L) H_2O_2 药浴30 min/d, 连续处理3 d, 结果显示, H_2O_2 药浴可将病鱼体表寄生虫清除。Bowker等(2012a)以50 mg/L H_2O_2 隔天药浴30 min自然感染的成年虹鳟, 三代虫平均丰度减少99%。

2 鱼虱病

鱼虱病(Fish lice disease)是由鱼虱寄生于鱼体表引起的疾病。鱼虱属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustaceans)、桡足亚纲(Copepoda)、鱼虱目(Caligoida)、鱼虱科(Argulidae)、鱼虱属(*Argulus*)。20世纪70年代, 在大西洋鲑海水网箱养殖于挪威兴起之际, 鱼虱病迅速出现。目前, 该病已发展成为挪威、英格兰、爱尔兰、加拿大等国家海水养殖大西洋鲑最重要的寄生虫性疾病(Denholm *et al*, 2002), 主要危害品种有大西洋鲑、大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)及虹鳟, 其中, 大西洋鲑和虹鳟是鱼虱最易感染的2个物种(Bravo *et al*, 2014)。

鲑鱼虱有11个形态不同的阶段(图3)。雌虱具有2个卵囊, 其中充满正在发育的胚胎。随着胚体孵化, I期无节幼体在水中产出, 以旋转的运动方式离开。在10℃左右水温条件下, 约4 d后, 无节幼体变态成为感染性桡足幼体。此后, 桡足幼体开始以宿主的黏液和表皮组织为食, 经过4个附着幼体期和2个前体成虫期, 最终发育至生殖成虫期(Gonzalez *et al*, 2003)。

鱼虱流行季节为5~10月, 7、8月最严重, 25℃~30℃为其适宜流行水温(Bjørn *et al*, 2001)。鱼虱以寄主的黏液、表皮组织和血液为食, 造成体表机械损伤。早期寄生期的皮肤损伤通常相对较小, 呈轻微感染(图4A)。而较大和可移动的鱼虱成虫寄生可导致大面积的皮肤侵蚀, 并伴随宿主的渗透调节问题和潜在的

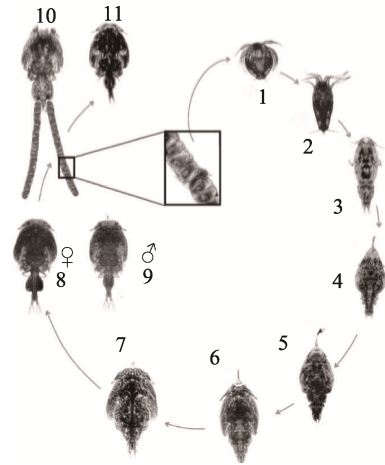


图3 鱼虱的生活史

Fig.3 Life cycle of *C. rogercresseyi* (Gonzalez *et al*, 2003)

- 1: 第1期无节幼体(0.43 mm); 2: 第2期无节幼体(0.46 mm);
3: 桡足幼体(0.66 mm); 4: 第1期幼体(0.83 mm); 5: 第2期幼体(1.27 mm); 6: 第3期幼体(2.15 mm); 7: 第4期幼体(3.15 mm); 8: 前体成虫期(雌, 4.10 mm); 9: 前体成虫期(雄, 4.10 mm); 10: 成虫(雌, 4.83 mm); 11: 成虫(雄, 4.79 mm)
- 1: First nauplius (0.43 mm); 2: Second nauplius (0.46 mm);
3: Copepodid (0.66 mm); 4: First chalimus (0.83 mm);
5: Second chalimus (1.27 mm); 6: Third chalimus (2.15 mm);
7: Fourth chalimus (3.15 mm); 8: Pre-adult stage (female, 4.10 mm); 9: Pre-adult stage (male, 4.10 mm);
10: Adult (female, 4.83 mm); 11: Adult (male, 4.79 mm)

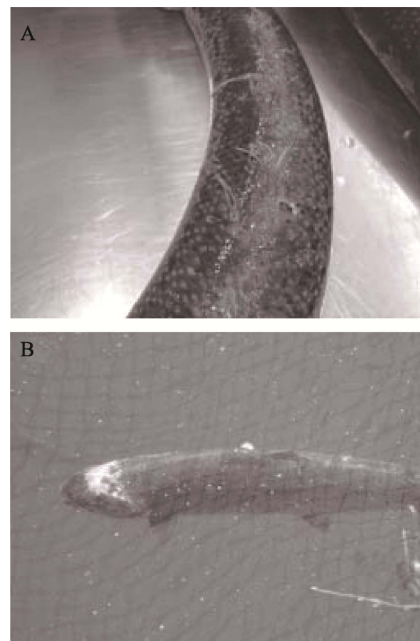


图4 大西洋鲑感染鱼虱后的皮肤损伤

Fig.4 Skin damage of Atlantic salmon infected with fish lice (Burka *et al*, 2012)

A: 轻微感染, 造成轻微磨损及失水

B: 严重感染, 鱼虱已经穿过皮肤和肌肉进入头骨

A: Mild infection causing minor abrasion and fluid loss
B: Severe infection where the lice have eaten through skin and flesh thereby exposing the skull

宿主死亡(图 4B)。对此病采取镜检的诊断方法, 镜下观察有大量鱼虱寄生, 即可确诊。

对于鲑鳟鱼类鱼虱病的治疗对策, 挪威养殖者采取降低放养密度、定期空箱休养、世代分群放养等措施对鱼虱病进行预防。20世纪90年代早期, 有养殖者使用敌百虫等有机杀虫剂治疗鲑鳟鱼类鱼虱病(Costello, 1993), 但敌百虫会对环境产生不利影响, 且疗效不稳定。之后, 在美国、加拿大、苏格兰、爱尔兰、挪威和智利等国, H_2O_2 被广泛用于海水养殖大西洋鲑鱼虱病防治。Thomassen等(1993)研究表明,

当被虱子感染的鲑鱼暴露在 1500 mg/L 的 H_2O_2 浓度下 20 min, 85%~100% 的虱子能被有效清除。不过, 依据 Kiemer 等(1997)的研究, H_2O_2 有效处理浓度范围较窄(1200~1500 mg/L), 过高 H_2O_2 浓度可能引起鳃组织损伤, 并导致死亡。近年来, 在挪威、芬兰等国开始使用合成除虫菊酯(氯氰菊酯、溴氰菊酯)药浴治疗鱼虱病(Aaen *et al.*, 2015)。除药浴治疗外, 饲料中预混杀虫药物也是世界上主要鲑鱼生产国综合防控鱼虱战略的重要组成部分(Ritchie *et al.*, 2002; Bowker *et al.*, 2012b)。表2为控制鱼虱的常用方法。

表 2 控制鱼虱的常用方法
Tab.2 Common methods for controlling fish lice

处理 Treatments	浓度 Concentrations	条件 Conditions	效果 Effects	参考文献 Reference
浸浴处理 Bath treatment	敌百虫 Trichlorfon 0.2 mg/L	作用于鱼虱的桡足幼体阶段, 对无节幼体作用较小	乙酰胆碱酯酶抑制剂, 可引起兴奋性麻痹, 导致海虱死亡	Costello(1993)
	过氧化氢 Hydrogen peroxide 1500 mg/L	20 min, 14°C	鱼虱有效清除率>85%	Thomassen 等(2004)
	除虫菊酯 Pyrethrin -	作用于鱼虱前体成虫期及成虫期	有效降低鱼虱数量, 最高可达 90%	Aaen 等(2015)
饲喂处理 In-feed treatment	甲氨基阿维菌素 Emamectin benzoate 50 µg/(kg·d)	连续饲喂 7 d	感染率下降 33%~53%	Bowker 等(2012)
	除虫脲 Diflubenzuron 10 mg/(kg·d)	连续饲喂 7 d	有效抑制鱼虱蜕皮	Ritchie 等(2002)

3 变形虫性鳃病

变形虫性鳃病(Amoebic gill disease, AGD)是由新阿米巴原虫引起的体外寄生虫病(Zilberg *et al.*, 2001)。该病病原新阿米巴原虫隶属肉足鞭毛门(Sarcomastigophora)、肉足纲(Lobosasida)、阿米巴目(Amoebida)。阿米巴原虫生活史分为滋养体(Trophont)和包囊期(Tomont) 2个阶段。其滋养体内外质分明, 内质丰富, 有大量的细小颗粒性内容物; 外质透明, 运动时外质伸出, 形成伪足, 能做定向运动(Young *et al.*, 2014)。滋养体是摄食、活动和增殖的生活时期。包囊期是具有保护性外壁的生活阶段, 无致病性(黄道超等, 2006)。包囊多呈球形, 直径为10~16 µm, 未染色时为一个折光性圆形小体, 碘染色后呈黄色。AGD最早于1986年在塔斯马尼亚岛养殖的大西洋鲑中被发现, 从那时起, 世界上许多国家在不同的海洋有鳍鱼类中报道了AGD (Green *et al.*, 2005)。近年来, AGD已成为欧洲大西洋鲑养殖业最严重的寄生虫病之一, 给养殖业造成了严重的经济损失(Rodger, 2013)。

寄生虫与宿主的相互作用导致鳃上出现肉眼可见的多灶白色黏液斑块、黏液分泌过多, 呼吸窘迫。严重患病的鱼鳃上部分白斑连成一片, 局灶性鳃丝增生, 板层囊肿(图 5A)。AGD 的组织学证据是鳃组织出现原发性和继发性上皮增生、片层融合(图 5B)。

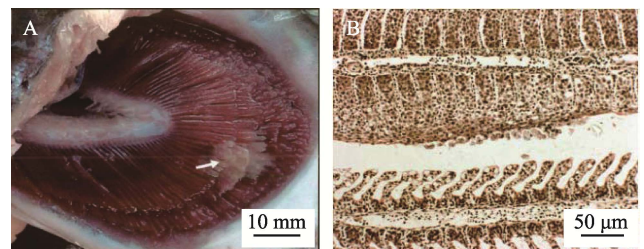


图 5 感染变形虫性鳃病的大西洋鲑临床症状
Fig.5 Clinical symptoms of Atlantic salmon infected with AGD (Johnson-MacKinnon *et al.*, 2016)

A: 大西洋鲑鳃上出现白色的黏液斑块; B: 受变形虫性鳃病影响的大西洋鲑鳃病理表现为上皮增生、片层融合
A: Pale mucoid patches (arrowhead) appearing upon the gills of Atlantic salmon; B: The pathological manifestations of the Atlantic salmon gills affected by AGD include epithelial hyperplasia and lamellar fusion

大西洋鲑 AGD 发病主要受环境温度的影响(Lundebye *et al*, 1999)。AGD 最初仅局限于夏季暴发, 现在呈现出全年性问题。大西洋鲑 AGD 发病率呈双峰分布, 第 1 个峰值较大, 出现于夏季, 第 2 个峰值较小, 出现于秋季(Bridle *et al*, 2010)。此外, Clark 等(1999)研究表明, 盐度对 AGD 也起着重要作用。阿米巴原虫是一种海洋变形虫, 对淡水的耐受性较差。因此, 大西洋鲑在溯河洄游产卵期几乎不受感染。Kent 等(1988)初步研究发现, 阿米巴原虫在盐分短暂降低后就能从患病鱼鳃上清除。

Munday 等(1993)研究发现, 大多数外用治疗药物并不能根除该病, 而通过淡水浴治疗可以迅速将变形虫从患病鱼鳃中根除。病原体的生长和生存需要海水, 在盐度低于 10 的环境下生长缓慢, 迄今为止这仍然是首选且有效的治疗方法(Powell *et al*, 2015)。在夏季 AGD 的高发期, 每隔 4~6 周重复实施淡水浴, 具有较好的杀虫效果(Parsons *et al*, 2001)。在澳大利亚, 淡水浴作为大西洋鲑 AGD 控制技术于 20 世纪 80 年代末最初引进时, 实施 2~3 次即足以缓解 AGD 症状。但目前, 在相同生产时期内, 可能需要实施多达 10 次才会成功避免 AGD 蔓延(Adams *et al*, 2004)。另外, 也有研究表明, 在 200~400 mg/L 的剂量下, 持续 18~22 min H₂O₂ 浴对控制 AGD 感染也具有较好的效果(Rodger, 2013)。目前, 研究者对 AGD 抗性的选择性育种进行了研究。在塔斯马尼亚进行的实验表明, 褐鳟(*Salmo trutta*)和大西洋鲑杂交品种对 AGD 的抗性有了显著提高。具体来说, 在遭受自然 AGD 感染的患病鱼中, 大西洋鲑需要 4 次淡水浴治疗, 杂交鲑鱼只需浸浴 1 次, 同时, 该杂交品种保持与大西洋鲑相当的存活率和生长速度(Maynard *et al*, 2016)。

4 鲑鱼旋转病

鲑鱼旋转病(Salmonid whirling disease)的病原为脑碘泡虫, 隶属黏体动物门(Myxozoa)、粘孢子虫纲(Myxosporidia)、碘泡科(Myxobolidae)、碘泡虫属(*Myxobolus*)。脑碘泡虫有 2 个专性寄主, 感染在鲑科鱼类宿主(如虹鳟)和淡水寡毛纲宿主颤蚓(*Tubifex tubifex*)之间交替发生(Nehring *et al*, 2016)。当寄生虫的黏孢子从受感染鱼的软骨中释放出来时(图 6A), 就开始了其生命周期(图 6)。释放的黏孢子壳面呈卵圆形或圆形, 缝面观呈瓜子形, 2 个等大的极囊位于孢子前端(图 6B)。要使生命周期继续下去, 粘孢子需寄生在颤蚓的肠道内进行无性繁殖(图 6C)。生活史的最后阶段, 虫体形成三叉放射孢子, 正面呈锚状, 孢子

体与尾突之间有长约 150 μm 的柄, 3 个尾突等长, 约 200 μm (图 6D)。虫子释放到水体, 在水体中感染下一个鱼宿主。

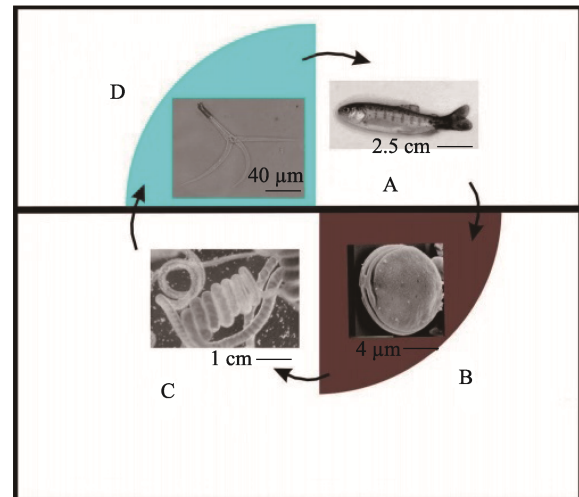


图 6 脑碘泡虫生活史

Fig.6 The life cycle of *M. cerebralis* (Andree *et al*, 1997)

由脑碘泡虫引起的鲑鱼旋转病是存在于鲑鱼养殖场和野生种群的一个重大健康问题。当虫体迁移至鱼体软骨组织发育并开始吞噬软骨细胞后, 鱼的听觉前庭器官严重受损并导致其保持身体直立方向的能力受损, 引起病鱼的螺旋游泳运动。同时, 寄生虫以鱼体软骨为食, 引起鱼体脊髓和下脑干区域的收缩, 可导致病鱼脊椎骨畸形。此外, 脊柱后部的炎症也对负责控制色素沉积的尾神经造成损伤, 从而导致黑尾(Rose *et al*, 2000; Chiaramonte *et al*, 2018)。在普通光学显微镜下观察, 在鱼体脑组织中见到呈卵圆形或圆形、缝面呈瓜子形的孢子, 可确诊为鲑鱼旋转病。

该病最早于 100 年前在欧洲的虹鳟身上发现, 并不引起严重疾病, 随着易感宿主虹鳟通过渔业贸易进入北美地区后, 病原得以大量增殖(Bartholomew *et al*, 2002; Hogge *et al*, 2004)。随后, 又随着渔业跨境贸易传播至非洲、大洋洲等地。目前, 该病流行于北美、欧洲及日本等鲑鱼养殖区, 对养殖幼苗期的鲑鱼危害严重, 常常导致大量苗种死亡, 死亡率可达 90% 以上。这种寄生虫能够感染包括大西洋鲑和淡水虹鳟在内的多个鲑科鱼类, 如大西洋鲑、红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)、虹鳟、金鳟、溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)(Hedrick *et al*, 1999)。

脑碘泡虫的放射孢子期(Triactinomyxon, TAM), 在水生寡毛纲宿主的消化道上皮细胞之间发育, 是最易被破坏而失活的阶段。因此, 针对 TAM 阶段的控制策略可能卓有成效(Wagner *et al*, 2003)。在水产养殖和

渔业管理中, 次氯酸钠(5.25%溶液, 即漂白剂)、聚维酮碘(10%溶液)和 H_2O_2 被广泛用作消毒剂治疗外部寄生虫和病原体(Dubey *et al.*, 2007)。除化学消毒外, 病原控制还可通过冷冻、加热和干燥等物理手段来实现。Wagner等(2003)研究发现, 冷冻、干燥1 h、温度高于 $75^\circ C$ 持续5 min均可有效杀灭TAM。此外, 设备消毒能防止病原向未感染部位转移, 也是控制该寄生虫病的重要措施。

5 增生性肾病

增生性肾病(Proliferative kidney disease, PKD)的病原为苔藓鲑四囊虫, 该病原隶属黏体动物门(Myxozoa)、软孢子虫纲(Malacosporea)。这种寄生虫的生命周期在淡水苔藓虫和鲑鳟鱼类之间交替进行(Morris *et al.*, 2007)。处于单细胞阶段的寄生虫表现为隐性感染(Covert infection), 此后, 在苔藓虫体腔内增殖发育成多细胞孢囊(直径可达 $350\ \mu m$), 寄生虫发展为显性感染(Overt infection)(Canning *et al.*, 2000)。孢子(直径约为 $20\ \mu m$)在成熟孢囊内产生, 每个孢子内有4个极囊。从苔藓虫体腔内释放到水中的孢子, 通过极囊内的极丝附着在鱼身上, 从而造成鱼

的感染(图7)。增生性肾病(PKD)被认为是鲑鳟鱼类最严重的寄生虫病之一, 是造成养殖场和野生鱼类种群高死亡率的原因(Canning *et al.*, 2003)。

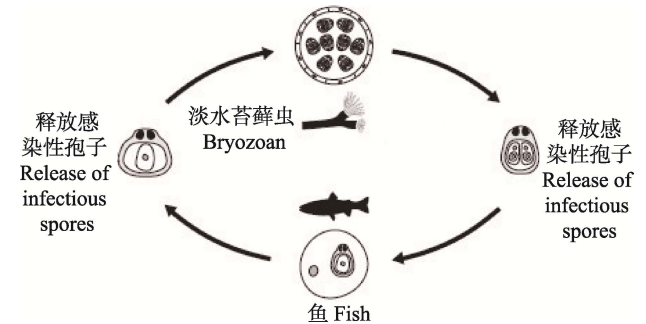


图 7 苔藓鲑四囊虫的生活史
Fig.7 The life cycle of *T. bryosalmonae*
(Okamura *et al.*, 2015)

从淡水苔藓虫中释放出来的寄生孢子主要通过鳃和皮肤侵入鱼体。随后, 寄生虫经血液循环系统迁移至肾脏组织, 并在其中进一步发育, 引起炎症反应, 损害肾组织(Longshaw *et al.*, 2002)。PKD 的外部临床症状包括鱼体发白、鳃贫血和腹部肿胀(Chilmonczyk *et al.*, 2002); 组织病理学特征包括肾间质增生、肾小管萎缩、白细胞浸润和肉芽肿性肾炎(图 8)。

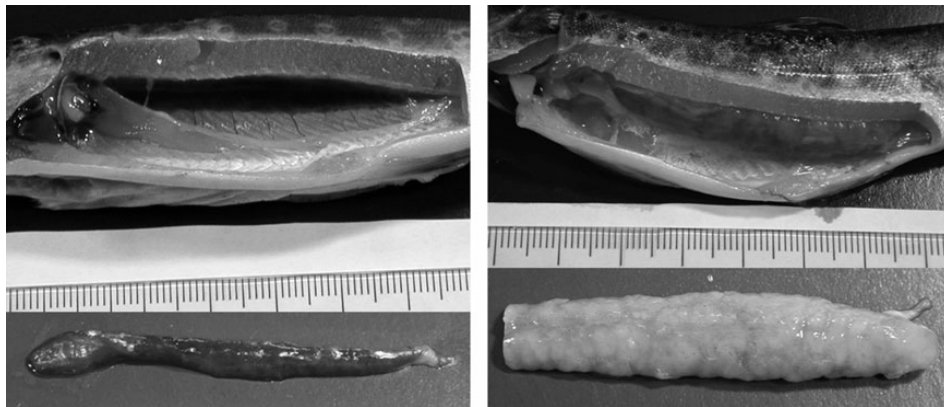


图 8 无增生性肾病(左)和有增生性肾病(右)的褐鳟
Fig.8 Brown trout without proliferative kidney disease (PKD) (left) and with PKD(right)(Okamura *et al.*, 2011)

PKD 是一种严重的季节性疾病。该病主要发生于 5~11 月, 8、9 月达到高峰(Wahli *et al.*, 2002)。PKD 的发生与温度有关, 最适温度在 $12^\circ C$ ~ $18^\circ C$ 之间。温度升高会促进其他疾病的发生, 进而加剧 PKD 的感染(Bettge *et al.*, 2009)。该病主要感染幼鱼, 死亡率高达 95%(Okamura *et al.*, 2011)。虹鳟、褐鳟、大西洋鲑、奇努克三文鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)和银大马哈鱼(*O. kisutch*)等多种鲑鳟鱼类均为易感品种(Sterud *et al.*, 2007)。大西洋鲑在海水养殖季节与产卵季节均

可受其感染, 但因其产卵期在秋、冬季, 感染率较低。

孔雀石绿和烟曲霉素等化学制剂对 PKD 的治疗有效, 但由于其对人体的毒性, 这些化学药物无法获得许可。因此, 在缺乏有效控制措施的情况下, 免疫治疗可能是一种有效的方法。存活下来的鱼对 PKD 再次感染具有免疫力。在生产上, 养殖者在夏末或秋季气温开始下降时, 将鱼苗暴露于苔藓虫感染, 暴露在这种环境下的鱼, 在接下来的一年里, 当温度升高时, 不会严重感染 PKD, 或者表现出 PKD 临床症状

的减少(Kallert *et al.*, 2011)。

6 库道虫病

库道虫病(Kudoasis)的病原为库道虫属, 该病原属于粘体动物门(Myxozoa)、粘孢子虫纲(Myxosporaea)、多壳目(Multivalvulida)、库道虫科(Kudoidae)(Moran *et al.*, 1999)。目前, 世界上发现的库道虫有 100 多种, 均寄生于海水鱼类中, 淡水养殖的虹鳟不易感染(Kristmundsson *et al.*, 2014)。关于库道虫的生命周期及其与寄主的关系尚不清楚, 但与其他粘孢子虫一样, 它被认为存在寄生于鱼类宿主和另一种无脊椎宿主的 2 个发育阶段(Jones *et al.*, 2016)。

在世界范围内, 库道虫已对开放式海水网箱中的大西洋鲑和银大马哈鱼造成严重感染, 引起肌肉液化症(Soft-flesh syndrome)(Chase *et al.*, 2001; Henning *et al.*, 2012)。感染时, 寄生虫寄生在宿主的骨骼肌细胞内, 被结缔组织包围形成白色极性孢囊(图9)。感染是隐性的, 没有临床症状的发展, 不会导致寄主死亡。但由寄生虫产生的蛋白酶会在鱼体死后降解鱼肉, 影响鱼片纹理和肌肉的价值, 严重影响鲑鱼的销售价值(Funk *et al.*, 2008)。

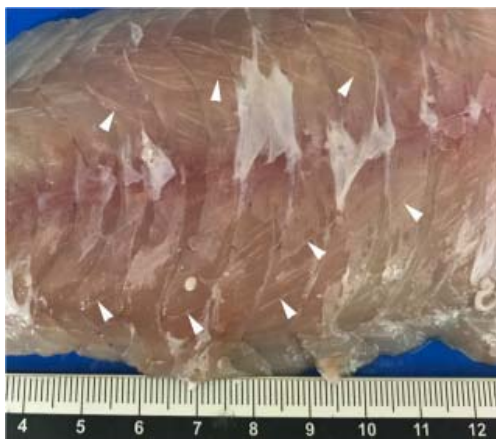


图9 生长在肌纤维中的库道虫孢子(箭头所示白色条纹)
Fig.9 Spores of *K. thyrsites* growing in the myofiber, and some of them (white stripes) are indicated by arrowheads (Sakai *et al.*, 2019)

库道虫感染在夏、秋季最易发生, 在冬季和早春月份不易发生。感染的进程与环境温度密切相关, 随水温的升高, 库道虫感染的速度加快(Moran *et al.*, 1999)。

受库道虫特异性疫苗缺乏和获批治疗方法的限制, 目前, 鲑鱼养殖者对库道虫的控制以预防为主, 如饲料中预混化学药物和早期检测。几种口服化合物

已被证明对治疗鲑鱼黏体寄生虫的感染有效。如烟曲霉素可用于治疗大西洋鲑宿主中的几种黏液寄生虫(Athanassopoulou *et al.*, 2004); 在养殖过程中, 饲喂含有尼卡巴嗪(Nicarbazin)的鱼饲料对控制库道虫也有一定效果(Jones *et al.*, 2012)。另外, 预防养殖鲑鱼库道虫的感染也可通过早期检测的手段, 可通过对新鲜组织的显微镜检查直接实现, 也可通过血清学或分子方法间接实现(Taylor *et al.*, 2005)。

7 其他寄生虫病

除上述几种危害较为严重的鲑鳟鱼类寄生虫病外, 还有一些由微孢子虫、多子小瓜虫、萨氏角形虫等病原引起的鲑鳟鱼类寄生虫病, 对鲑鳟鱼类养殖业也造成了不同程度的影响。

7.1 多子小瓜虫

多子小瓜虫属于纤毛门(Ciliophora)、寡膜纲(Oligohymenophorea)、膜口目(Hymenostomalia)、凹口科(Ophryoglenidae)、小瓜虫属(*Ichthyophthirius*)。虫体呈卵圆形或球形, 全身密布短而均匀的纤毛。由该病原引起的小瓜虫病仅对淡水养殖的虹鳟和金鳟的稚鱼危害较大。小瓜虫主要寄生在鱼类的皮肤、鳍、鳃、头、口腔和眼等部位, 形成肉眼可见的白色点状孢囊。发病的鱼游动缓慢, 反应迟钝, 肉眼可见其背部、头部和尾部等部位有许多针尖大小的白点, 俗称“白点病”(姚嘉赞等, 2019)。小瓜虫生长的适宜水温为 15℃~25℃, 在水温降至 10℃以下或升至 28℃以上时小瓜虫停止发育。因此, 温度升高或者降低都可控制病情(张其中等, 2010)。

7.2 微孢子虫

微孢子虫属于微孢子虫纲(Microsporididae)、微孢子目(Microsporida)、微孢子虫属(*Microsporidia*)。该病原主要寄生于鲑鳟鱼的鳃部, 引起微孢子虫鳃病(Microsporidial gill disease, MGD)(Ramsay *et al.*, 2003)。在鱼鳃的内皮细胞和支柱细胞内, 产生充满孢子的异肿瘤, 异肿瘤在孢子成熟时破裂, 引发严重的鳃部发炎和上皮增生性反应, 导致呼吸窘迫, 直至死亡(Rodríguez-Tovar *et al.*, 2003)。该病发生在春季水温上升的时候, 每年夏末、秋初季节流行趋势较强(Kent *et al.*, 1995)。微孢子虫主要感染太平洋鲑鱼属的虹鳟和奇努克三文鱼(Shaw *et al.*, 2000)。用灭活的孢子腹腔注射接种于虹鳟, 能使虹鳟对微孢子虫的再次感染产生抗性, 保护养殖三文鱼免受 MGD 的感染具有可行性(Rodríguez-Tovar *et al.*, 2006)。

7.3 萨氏角形虫

萨氏角形虫是一种黏体动物寄生虫,主要存在于太平洋西北部和加利福尼亚的一些水域,主要感染虹鳟等鲑科鱼类。萨氏角形虫是一种组织内寄生虫,以侵入宿主肠道的方式感染鲑鳟鱼类,引起肠道角化病。该病以肠出血和坏死为特征,寄生虫侵入肠道组织,引发急性炎症反应,从而导致鱼类宿主死亡(Bjork *et al.*, 2009)。感染主要发生在4~12月。感染的严重程度取决于多种因素,如水温、鱼宿主的固有抗性和寄生虫剂量(Zatti *et al.*, 2017)。目前,还没有发现彻底治愈肠道角化病的药物,但药物和化学治疗在降低萨氏角形虫感染的严重程度方面被证明是有效的。如烟曲霉素的产物富马西林可在一定程度上减少虹鳟萨氏角形虫的自然感染(Whipple *et al.*, 2002)

8 总结与展望

随着鲑鳟鱼类养殖规模的增加,鲑鳟鱼类寄生虫病的研究已经成为水产疾病研究的热点。目前,人们对大部分鲑鳟鱼类寄生虫的生活史、流行情况、危害已基本明确,并结合生产实践总结和探索出一些行之有效的防控措施。但是,由于鲑鳟鱼类寄生虫的种类繁多,涉及到原生动物和甲壳动物的许多种和属,且在养殖环境逐渐变差的情况下,可能会出现新的寄生虫病。因此,在寄生虫病的治疗方面至今还没有效果显著的药物。中草药提取液中含活性杀菌成分,开发中草药药物杀灭寄生虫是研究的热点。鱼体表黏液中提取的蛋白也具有一定的抗虫效果,是今后寄生虫病防治的研究热点。此外,在一些海水鱼的寄生虫病防治上,抗寄生虫疫苗也相继开发出来,可采取类似的手段,针对鲑鳟鱼寄生虫病开发相应的疫苗。

相信在不久的将来,随着科学技术的发展,研究方法和手段的不断更新,鲑鳟鱼类寄生虫病的研究能不断取得突破性成果,为寄生虫病的防治开辟新天地。

参 考 文 献

Aaen SM, Helgesen KO, Bakke MJ, *et al.* Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 2015, 31(2): 72–81

Adams MB, Nowak BF. Sequential pathology after initial freshwater bath treatment for amoebic gill disease in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 2004, 27(3): 163–173

Andree KB, Gresoviac SJ, Hedrick RP. Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative

agent of whirling disease in salmonid fish. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1997, 44(3): 208–215

Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, *et al.* Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 62(3): 217–226

Bartholomew JL, Reno PW. The history and dissemination of whirling disease. *American Fisheries Society Symposium*, 2002(29): 3–24

Bettge K, Segner H, Burki R, *et al.* Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: Temperature- and time- related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology*, 2009, 136(6): 615–625

Bjork SJ, Bartholomew JL. Effects of *Ceratomyxa shasta* dose on a susceptible strain of rainbow trout and comparatively resistant chinook and coho salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 86(1): 29–37

Bjørn PA, Finstad B, Kristoffersen R. Salmon lice infection of wild sea trout and Arctic char in marine and freshwaters: The effects of salmon farms. *Aquaculture Research*, 2001, 32(12): 947–962

Bowker JD, Carty D, Dotson MM. Efficacy of 35% PEROX-AID (hydrogen peroxide) in reducing an infestation of *Gyrodactylus salmosis* in freshwater-reared rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 2012a, 74(2): 154–159

Bowker JD, Carty DG, Wandelaar N, *et al.* Efficacy of SLICE premix (0.2% Emamectin Benzoate) for reducing infestations of *Salmincola* spp. on freshwater-reared rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 2012b, 74(3): 428–437

Bravo S, Silva MT, Treasurer J. Factors affecting the abundance of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) on farmed salmonids in Chile in the period 2006–2007. *Aquaculture*, 2014, 434: 456–461

Bridle AR, Crosbie PBB, Cadoret K, *et al.* Rapid detection and quantification of *Neoparamoeba perurans* in the marine environment. *Aquaculture*, 2010, 309(1–4): 56–61

Buchmann K, Kristensson RT. Efficacy of sodium percarbonate and formaldehyde bath treatments against *Gyrodactylus derjavini* infestations of rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 2003, 65(1): 25–27

Burka JF, Fast MD, Revie CW. *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*. In: Woo PTK, Buchmann K. *Fish parasites: Pathobiology and protection*. Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph, 2012, 350

Busch S, Dalsgaard I, Buchmann K. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: Effects on infection and mortality of host. *Veterinary Parasitology*, 2003, 117(1–2): 117–122

Cable J, Harris PD, Bakke TA. Population growth of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) on Norwegian and Baltic

- Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Parasitology*, 2000, 121(6): 621–629
- Canning EU, Curry A, Feist SW, *et al.* A new class and order of *myxozoans* to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2000, 47(5): 456–468
- Canning EU, Okamura B. Biodiversity and evolution of the *Myxozoa*. *Advances in Parasitology*, 2003, 56: 43–131
- Chase JC, Dawson-Coates JA, Haddow JD, *et al.* Analysis of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) spore antigens using monoclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45(2): 121–129
- Chen GS. Epidemiological investigation and analysis of parasitic diseases of cage-cultured fish in Luoyuan Bay. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary*, 2011, 33(3): 11–14 [陈国生. 罗源湾网箱养殖鱼类寄生虫病流行病学调查与分析. *福建畜牧兽医*, 2011, 33(3): 11–14]
- Chiaramonte LV, Burbank D, Scott R, *et al.* Comparison of sampling and detection methods for chinook salmon and steelhead naturally infected with *Myxobolus cerebralis*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2018, 30(1): 57–64
- Chilmonczyk S, Monge D, de Kinkelin P. Proliferative kidney disease: Cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(4): 217–226
- Clark A, Nowak BF. Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases*, 1999, 22(6): 433–443
- Costello MJ. Review of methods to control sea-lice (Caligidae: Crustacea) infestations on salmon farms. In: Boxshall GA, Defaye D (Ed.). *Pathogens of wild and farmed fish: Sea lice*. Chichester: Ellis Horwood Limited Publisher, 1993
- Denholm I, Devine GJ, Horsberg TE, *et al.* Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Pest Management Science*, 2002, 58(6): 528–536
- Dubey RJ, Caldwell CA, Gould WR. Relative susceptibility and effects on performance of Rio Grande Cutthroat trout and rainbow trout challenged with *Myxobolus cerebralis*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2007, 136(5): 1406–1414
- Funk VA, Olafson RW, Raap M, *et al.* Identification, characterization and deduced amino acid sequence of the dominant protease from *Kudoa paniformis* and *K. thyrsites*: A unique cytoplasmic cysteine protease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(3): 477–489
- Gonzalez L, Carvajal J. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 2003, 220(1): 101–117
- Green TJ, Powell MD, Harris JO, *et al.* Effects of dissolved organic carbon and hardness in freshwater used to treat amoebic gill disease. *Aquaculture Research*, 2005, 36(4): 398–404
- Harris PD, Jansen PA, Bakke TA. The population age structure and reproductive biology of *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Monogenea). *Parasitology*, 1994, 108(2): 167–173
- Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, *et al.* Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 37(3): 173–183
- Henning SS, Hoffman LC, Manley M. A review of Kudoa-induced myoliquefaction of marine fishes in South Africa and other countries. *South African Journal of Science*, 2012, 109(11–12): 1–5
- Hogge C, Campbell M, Johnson K. Discriminating between a neurotropic *Myxobolus* sp. and *M. cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2004, 16(3): 137–144
- Huang DC, Yang GY, Wang Q, *et al.* Progress on amoebiasis of human and animals. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(5): 51–55 [黄道超, 杨光友, 王强, 等. 人和动物阿米巴原虫病研究进展. *动物医学进展*, 2006, 27(5): 51–55]
- Johnson-MacKinnon J, Oldham T, Nowak B. Amoebic gill disease: A growing threat. *Microbiology Australia*, 2016, 37(3): 140–142
- Jones SRM, Cho S, Nguyen J, *et al.* Acquired resistance to *Kudoa thyrsites* in Atlantic salmon *Salmo salar* following recovery from a primary infection with the parasite. *Aquaculture*, 2016, 451: 457–462
- Jones SRM, Forster I, Liao XJ, *et al.* Dietary nicarbazin reduces prevalence and severity of *Kudoa thyrsites* (Myxosporea: Multivalvulida) in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts. *Aquaculture*, 2012, 342–343: 1–6
- Jørgensen TR, Larsen TB, Jørgensen LG, *et al.* Characterisation of a low pathogenic form of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 73(3): 235–244
- Kallert DM, Bauer W, Haas W, *et al.* No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(3–4): 271–276
- Kent ML, Dawe SC, Speare DJ. Transmission of Loma salmonae (Microsporea) to chinook salmon in sea water. *Canadian Veterinary Journal*, 1995, 36(2): 98–101
- Kent ML, Sawyer TK, Hedrick RP. Paramoeba pemaquidensis (Sarcomastigophora: Paramoebidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1988, 5(3): 163–169
- Kiemer MCB, Black KD. The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo solar* L.. *Aquaculture*, 1997, 153(3–4): 181–189
- Li RR, Li WX, Wu XD, *et al.* Identification of *Gyrodactylus* species in goldfish (*Carassius auratus*) through morphological study and the analysis of the rDNA ITS sequence. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(5): 903–909 [李冉冉, 李文祥, 吴旭东, 等. 金鱼寄生三代虫的形态学及基于

- rDNA ITS 序列的分子鉴定. 水生生物学报, 2014, 38(5): 903–909]
- Longshaw M, Le Deuff RM, Harris AF, *et al.* Development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(8): 443–449
- Lundebye AK, Berntssen MHG, Bonga SEW, *et al.* Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 39(1–12): 137–144
- Maynard BT, Taylor RS, Kube PD, *et al.* Salmonid heterosis for resistance to amoebic gill disease (AGD). *Aquaculture*, 2016, 451: 106–112
- Moran JDW, Kent ML, Whitaker DJ. *Kudoa thyrssites* (Myxozoa: Myxosporaea) infections in pen-reared Atlantic salmon in the Northeast Pacific Ocean with a survey of potential nonsalmonid reservoir hosts. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, 11(2): 101–109
- Morris DJ, Adams A. Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporaea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitology Research*, 2007, 100(5): 983–992
- Munday BL, Lange K, Foster C, *et al.* Amoebic gill disease of sea-caged salmonids in Tasmanian waters. *Tasmanian Fish Research*, 1993, 28: 14–19
- Nehring RB, Schisler GJ, Chiamonte L, *et al.* Accelerated deactivation of *Myxobolus cerebralis* myxospores by susceptible and non-susceptible *Tubifex tubifex*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 121(1): 37–47
- Okamura B, Gruhl A, Reft AJ. Cnidarian origins of the Myxozoa. *Myxozoan Evolution Ecology and Development*, 2015, 45–68
- Okamura B, Hartikainen H, Schmidt-Posthaus H, *et al.* Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 2011, 56(4): 735–753
- Parsons H, Nowak B, Fisk D, *et al.* Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 2001, 195(3–4): 205–210
- Powell MD, Reynolds P, Kristensen T. Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: Considerations of water chemistry and fish welfare in Norway. *Aquaculture*, 2015, 448: 18–28
- Rach JJ, Gaikowski MP, Ramsay RT. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(4): 267–273
- Ramsay JM, Speare DJ, Becker JA, *et al.* *Loma salmonae*-associated xenoma onset and clearance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Comparison of *per os* and cohabitations exposure using survival analysis. *Aquaculture Research*, 2003, 34(14): 1329–1335
- Ritchie G, Rønsberg SS, Hoff KA, *et al.* Clinical efficacy of teflubenzuron (Calicide) for the treatment of *Lepeophtheirus salmonis* infestations of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* at low water temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 51(2): 101–106
- Rodger HD. Amoebic gill disease (AGD) in farmed salmon (*Salmo salar*) in Europe. *Fish Veterinary Journal*, 2013, 14: 16–27
- Rodríguez-Tovar LE, Becker JA, Markham RJF, *et al.* Induction time for resistance to microsporidial gill disease caused by *Loma salmonae* following vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a spore-based vaccine. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(2): 170–175
- Rodríguez-Tovar LE, Wright GM, Wadowska DW, *et al.* Ultrastructural study of the late stages of *Loma salmonae* development in the gills of experimentally infected rainbow trout. *Journal of Parasitology*, 2003, 89(3): 464–474
- Rose JD, Marrs GS, Lewis C, *et al.* Whirling disease behavior and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(2): 107–118
- Sakai H, Kawai T, Zhang J, *et al.* New host records of three *Kudoa* spp. (*K. yasunagai*, *K. thalassomi*, and *K. igami*) with notable variation in the number of shell valves and polar capsules in spores. *Parasitology Research*, 2019, 118(1): 143–157
- Kristmundsson Á, Freeman MA. Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp. (Myxosporaea: Kudoidae) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. *International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife*, 2014, 3(2): 135–146
- Sereno-Urbe AL, Zambrano L, García-Varela M. Reproduction and survival under different water temperatures of *Gyrodactylus mexicanus* (Platyhelminthes: Monogenea), a parasite of *Girardinichthys multiradiatus* in central Mexico. *Journal of Parasitology*, 2012, 98(6): 1105–1108
- Shaw RW, Kent ML, Brown AM, *et al.* Experimental and natural host specificity of *Loma salmonae* (Microsporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(2): 131–136
- Sterud E, Forseth T, Ugedal O, *et al.* Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77(3): 191–198
- Stoltze K, Buchmann K. Effect of *Gyrodactylus derjavini* infections on cortisol production in rainbow trout fry. *Journal of Helminthology*, 2001, 75(3): 291–294
- Tai RY, Xu J, Jiang YL, *et al.* Development of a universal 96 single nucleotide polymorphism array for salmonid fishes. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 53–61 [邵如玉, 许建, 江炎亮, 等. 鲑鳟通用型高通量单核苷酸多态性芯片的开发. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 53–61]
- Taylor K, Jones S. An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Kudoa thyrssites* in Atlantic salmon *Salmo*

- salar*. *Aquaculture*, 2005, 250(1–2): 8–15
- Thomassen JM. Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon. In: Boxshall GA, Defaye D. Pathogens of wild and farmed fish: Sea lice. Ellis Horwood Limited Chichester UK, New York, USA. 1993, 290–295
- Wagner EJ, Smith M, Arndt R, *et al.* Physical and chemical effects on viability of the *Myxobolus cerebralis* triactinomyxon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(2): 133–142
- Wahli T, Knuesel R, Bernet D, *et al.* Proliferative kidney disease in Switzerland: Current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(8): 491–500
- Whipple MJ, Gannam AL, Bartholomew JL. Inability to control ceratomyxosis in rainbow trout and steelhead with oral treatments of glucan immunostimulant or the fumagillin analog TNP-470. *North American Journal of Aquaculture*, 2002, 64(1): 1–9
- Yao JY, Xu Y, Yuan XM, *et al.* Synthesis of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives and its antiparasitic activity against *Ichthyophthirius multifiliis* *in vitro*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 141–146 [姚嘉赞, 徐洋, 袁雪梅, 等. 四氢异喹啉衍生物的合成及体外抗多子小瓜虫活性的研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 141–146]
- You P, Yuan B, Yang J, *et al.* Pathogenic infections of *Gyrodactylus brachymystacis* (Monogenea) on *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) at a fish farm in the Qinling Mountain region of China. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(5): 313–316
- Young ND, Dyková I, Crosbie PB, *et al.* Support for the coevolution of *Neoparamoeba* and their endosymbionts, *Perkinsela amoebae*-like organisms. *European Journal of Protistology*, 2014, 50(5): 509–523
- Zatti SA, Atkinson SD, Bartholomew JL, *et al.* Amazonian waters harbour an ancient freshwater *Ceratomyxa* lineage (Cnidaria: Myxosporea). *Acta Tropica*, 2017, 169: 100–106
- Zhang QZ, Zhang ZH, Chen DL, *et al.* Influence of water temperature on hatchability and activity power of theront of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Ecological Science*, 2010, 29(2): 116–120 [张其中, 张占会, 陈达丽, 等. 水温对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响. *生态科学*, 2010, 29(2): 116–120]
- Zilberg D, Gross A, Munday BL. Production of salmonid amoebic gill disease by exposure to *Paramoeba* sp. harvested from the gills of infected fish. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(2): 79–82

(编辑 马璀艳)

Research Progress and Prospects of Parasitic Diseases in Salmon and Trout

TANG Jiajia, LI Shiyu, LI Anxing^①

(School of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangdong Key Laboratory of Aquatic Economics, Guangzhou 510275)

Abstract Salmon and trout are typical cold-water fishes with high economic values; they are among the most important economic fishes in the world. However, with increasing aquaculture density, the aquaculture environment is becoming increasingly degraded. The occurrence of salmon and trout parasitic diseases and corresponding damage to fishes are also increasing. These factors severely restrict the healthy development of the industry. Common and severe parasites of salmon and trout are *Gyrodactylus*, *Caligus rogercresseyi*, *Neoparamoeba perurans*, *Myxobolus cerebralis*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, and *Kudoa* spp. These parasites have simple life cycles and rapid reproduction rates. Most of them inhabit the skin and various organs of the fish body, thereby slowing growth and weakening the resistance of the fish. This effect damages the fish body and eventually kills the fish. Physical control methods and chemicals are used in combination for comprehensive prevention and control. This paper reviews the research progress and achievements in the field of the common parasitic diseases of salmon and trout to provide useful references for the research and control of such diseases.

Key words Salmon and trout; Parasitic diseases; Life cycle; Prevention and control measures

① Corresponding author: LI Anxing, E-mail: lianxing@mail.sysu.edu.cn

《渔业科学进展》2020 年第 41 卷总目录

第 1 期

研究论文

- 黄、东海渔业资源群落结构变化研究……………戴芳群 朱 玲 陈云龙 (1)
- 基于遥感的黄海东南部越冬鳀资源密度分布与环境因子的关系研究……………
……………牛明香 王 俊 吴 强 孙坚强 (11)
- 崂山近岸浮游植物群落结构季节变化及其环境影响因素……………
……………柴 然 冯 娟 陈碧鹃 夏 斌 孙雪梅 王晓晓 陈聚法 崔正国 曲克明 (21)
- 桑沟湾浮游植物粒径结构及其与环境因子的关系……………
……………李凤雪 蒋增杰 高亚平 杜美荣 王晓芹 李文豪 侯 兴 董世鹏 王军威 张义涛 (31)
- 基于 GIS 的桑沟湾及周围海域海带养殖适宜性评价……………
……………孙倩雯 刘 慧 尚伟涛 于良巨 姜晓鹏 蔡碧莹 常丽荣 肖露阳 (41)
- 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例……………
……………李 苗 单秀娟 王伟继 丁小松 戴芳群 吕 丁 吴欢欢 (51)
- 海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较……………唐隆晨 钟晨辉 林 琪 陆 振 黄瑞芳 宦忠艳 (58)
- 养殖水电化学同步脱氮响应面优化与验证……………张 鹏 张 龙 陈世波 朱建新 (66)
- 基于多个线粒体序列的中韩俄沿海不同地理群体刺参的遗传多样性及种群结构分析……………
……………王锦锦 廖梅杰 李 彬 王印庚 荣小军 张 正 葛建龙 (75)
- 高温胁迫条件下大菱鲂肾脏转录组研究……………杨 凯 黄智慧 马爱军 刘晓菲 杨双双 (86)
- 不同培育水温 and 饲料对刺参人工促熟效果的影响……………
……………谭 杰 李凤辉 陈四清 马添翼 陈爱华 葛建龙 孙慧玲 王 亮 (96)
- 绿鳍马面鲀幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究……………张鹏飞 常 青 陈四清 徐郑鑫 赵捷杰 (104)
- 盐度对花鲈幼鱼鳃、脾及肌肉组织结构的影响……………温久福 蓝军南 曹 明 周 慧 区又君 李加儿 (112)
- 尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系建立及优化……………
……………康 恺 吴 江 苑麟勇 刘丽欢 陈永灵 效 梅 安立龙 (119)
- 脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及其表达特征分析……………
……………孙金秋 徐莞媛 马杭柯 高 威 欧阳乐飞 高 焕 阎斌伦 (127)
- 养殖长茎葡萄蕨藻黑褐病的病原学研究……………
……………张艳楠 王印庚 刘福利 廖梅杰 李 彬 张 正 梁洲瑞 于永翔 荣小军 (135)
- 日本米虾胚胎发育及离体孵化……………曹林泉 秦 政 姜玉声 刘 鑫 李晓东 林 源 黄楷涛 刘 胥 (145)
- LED 光源在海水养殖水体中传播特征解析……………
……………张延青 秦 菲 费 凡 李笑天 黄 滨 赵奎峰 刘宝良 (153)
- LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响……………
……………魏平平 李 鑫 张俊鹏 费 凡 马 贺 高东奎 宋昌斌 陈 涛 刘 鹰 (162)
- 苦草粉对草鱼幼鱼生长性能与生理生化性能的影响……………
……………黄仲园 何文辉 彭自然 刘玉超 华雪铭 冯 悦 李 向 左 琳 (169)

- 冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化.....陈依萍 崔文萱 高瑞昌 李渐鹏 曾名湧 唐淑玮 冯秋凤 赵元晖 (178)

第 2 期

研究论文

- 海洋牧场景观生态分类研究：以柘林湾海洋牧场为例.....段丁毓 秦传新 朱文涛 马鸿梅 (1)
- 一种圆台型人工鱼礁非线性波浪作用受力分析.....刘彦 赵云鹏 董国海 (12)
- 胶州湾底栖生态系统健康评价——基于大型底栖动物生态学特征.....丁敬坤 张雯雯 李阳 薛素燕 李加琦 蒋增杰 方建光 毛玉泽 (20)
- 温度对浒苔降解过程中溶解有机物释放及其组成的影响.....耿倩倩 陈晶 李鸿妹 杨茹君 张永雨 (27)
- 渤海当年生小黄鱼矢耳石微结构特征.....张廷廷 王玉堃 袁威 金显仕 陈超 孙耀 (35)
- Direct Detection of Target Genes in Viable Bacteria and Extracellular DNA Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay.....YANG Qianqian, ZHANG Xuzhi, JIANG Xiaoyu, LI Yang, ZHAO Jun, HAO Zhihui, WANG Pingping, QU Keming (41)
- 氨氮急性胁迫对大菱鲆幼鱼的毒性效应.....孟振 张鸿丽 刘新富 姜勇 贾玉东 刘滨 曲江波 徐荣静 (51)
- 黄条鲷仔稚幼鱼消化酶活性变化研究.....张正荣 柳学周 于毅 史宝 张言祥 徐永江 王滨 姜燕 孙冉冉 (61)
- 半滑舌鳎蛋白激酶 C- α (PKC α)的基因克隆和免疫应答分析.....李坤明 徐文腾 扶晓琴 陈松林 (69)
- 温度和元素浓度对 Sr 在褐牙鲆仔稚鱼耳石中的沉积影响.....田洪林 刘金虎 曹亮 窦硕增 (78)
- 黑棘鲷仔鱼饥饿实验及不可逆点的确定.....杨育凯 林黑着 王志勇 谢仰杰 郭奕惠 黄小林 李涛 (87)
- 海南南渡江唇鳞染色体核型和银染分析.....李安 李高俊 王世锋 柳淑芳 周永灿 申志新 薛献坵 蔡岩 (95)
- 圆斑星鲈 *piwil2* 基因的克隆与表达分析.....杨珍珍 边力 张岩 常青 陈四清 刘长琳 葛建龙 胡建成 张盛农 (103)
- 利用微卫星标记分析军曹鱼养殖群体的遗传多样性.....李伟强 陈刚 马骞 黄建盛 施钢 潘传豪 周晖 谢瑞涛 张健东 汤保贵 (113)
- 饲料添加益生菌对多病原阳性的凡纳滨对虾生长与存活的影响.....练小军 朱开玲 张庆起 万晓媛 谢国驷 郭程程 黄捷 (121)
- 对虾工厂化养殖中浮游动物群落结构的变化规律.....罗强 李健 常志强 陈钊 乔玲 杨力敢 (131)
- 密度胁迫对中国对虾幼虾生长、抗氧化系统功能及水质指标的影响.....张海恩 何玉英 李健 胡硕 韩旭 (140)
- 地榆醇提物对对虾致病菌 VP_{AHPND} 生长影响及最适内参基因的筛选.....杨泽禹 廖梅杰 王印庚 张正 韦信贤 李彬 荣小军 (150)
- 凡纳滨对虾 6-磷酸海藻糖合成酶在抗高温胁迫中的表达特征.....胡利杰 李旭鹏 孟宪红 栾生 罗坤 隋娟 陈宝龙 曹宝祥 曹家旺 孔杰 (159)
- 基于微卫星亲权鉴定技术的短蛸性选择研究.....范婷婷 冯艳微 刘文芬 王卫军 杨建敏 (168)
- 番红砗磲外套膜颜色多态性及其与生长性状相关性研究.....何园园 刘二田 顾志峰 石耀华 王爱民 刘春胜 (176)
- 牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白(ORF111)的基因克隆及表达.....张淑敏 白昌明 辛鲁生 李亚楠 李晨 王崇明 (183)
- 鳕鱼鱼鳔抗氧化肽制备工艺研究.....李娜 周德庆 刘楠 王珊珊 马玉洁 (191)

第 3 期

研究论文

- 基于 GNOME 的溢油污染渔业资源损失评估……………毕研军 刘心田 宋协法 董登攀 (1)
- 海洋酸化对颗石藻生理特性的影响……………黄书杰 徐 东 王东升 张现盛 叶乃好 (11)
- 极北海带对氮、磷吸收和砷、镉、铅吸附的研究……袁艳敏 刘福利 杜欣欣 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 (25)
- 基于 IBR 模型的 Cu^{2+} 对厚壳贻贝的毒性效应研究……李 磊 平仙隐 宋 炜 蒋 玫 黄 艇 王鲁民 (32)
- 布设间距对多孔方型人工鱼礁流场效应影响的数值模拟研究……………
……………王佳浩 刘莉莉 蔡新晨 陈佳滢 杨意馨 姜书侠 (40)
- 半滑舌鳎甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 1 基因的克隆及表达分析……………
……………王 倩 张 雪 陈亚东 沙珍霞 (49)
- 卵形鲳鲹对饲料中硒的需求量……………
……………于万峰 林黑着 黄 忠 虞 为 周传朋 谭连杰 荀鹏伟 黄倩倩 黄小林 (60)
- 四指马鲛淋巴器官发育组织学观察……蓝军南 温久福 李俊伟 区又君 周 慧 李加儿 李 活 (70)
- 斑石鲷 *TGF- β 1* 基因克隆和表达分析……………王 杉 徐文腾 李 明 王 洁 王 磊 翟介明 陈松林 (78)
- 低温驯化下斑马鱼 *LINE1* 的表达检测……………陶筱帆 谢婷婷 李小霞 罗军涛 白雅静 韩兵社 张俊芳 (88)
- 正反交奥尼罗非鱼形态性状差异及对体质量的影响……………
……………陈炳霖 肖 炜 邹芝英 祝璟琳 李大宇 喻 杰 杨 弘 胡平各 马银花 (94)
- 凡纳滨对虾 6 个国内群体的遗传背景分析……………
……………李旭鹏 栾 生 曹宝祥 罗 坤 谭 建 孔张伟 孟宪红 孔 杰 (103)
- 栉孔扇贝消化盲囊亚细胞组分分离与鉴定技术……………陈 维 魏守祥 李禹含 潘鲁青 (111)
- 短期高盐胁迫对脆江蓠抗氧化酶活性及光合酶活性的影响……………
……………徐 涵 薛素燕 李加琦 丁敬坤 霍恩泽 张雯雯 毛玉泽 方建光 (119)
- UV-B 紫外辐射对条斑紫菜生理生化的影响……潘 雪 茅云翔 王俊皓 曹 敏 毕桂萁 杜国英 (125)
- 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响……………
……………杨运楷 宋晓玲 王海亮 谢国驷 黄 捷 (133)
- 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析……………兰 欣 李 杰 李贵阳 肖 鹏 莫照兰 (142)
- 大口黑鲈弹状病毒的分离培养及其卵黄抗体的制备……………
……………袁雪梅 吕孙建 施伟达 杭小英 刘 莉 吴颖蕾 (151)
- 金乌贼端粒酶逆转录酶基因鉴定和组织差异表达分析……………
……………项子龙 刘长琳 张金勇 胡 鹏 何暮春 柳淑芳 庄志猛 薛同明 (158)
- 综述**
- 捕捞诱导鱼类生物学特征进化研究进展……………单秀娟 胡芷君 邵长伟 唐 政 (165)
- α -黑素细胞刺激素及黑皮质素受体-4 在能量平衡和繁殖中的功能研究……………
……………温海深 张 莹 冯启超 侯志帅 齐 鑫 李 昀 (176)

第 4 期

研究论文

- 舟山沿岸渔场春秋季节鱼类群落结构特征分析……郭朋军 江新琴 俞存根 邓小艳 张 平 许永久 (1)

牙鲆 *JNK2* 基因的表达分析及免疫功能探究.....司 瑜 王宣刚 王梦娅 王欣桐 于海洋 张全启 王志刚 (12)

鞍带石斑鱼(♂)与褐石斑鱼(♀)、云纹石斑鱼(♀)杂交后代变态发育和生长比较.....吴玉萍 田永胜 成美玲 李振通 张晶晶 王林娜 马文辉 庞尊方 张淞林 翟介明 (23)

基于线粒体 Cyt-b 序列的太湖湖鲚与短颌鲚种群遗传分析.....轩中亚 姜 涛 刘洪波 陈修报 杨 健 (33)

大菱鲆水通道蛋白(AQP1、AQP3)以及离子通道蛋白(CFTR、NHE1)对低盐胁迫的响应.....张金生 刘志峰 马爱军 崔文晓 曲江波 (41)

珠江流域 9 个大鳞副泥鳅群体遗传多样性的微卫星分析.....刘 洁 高风英 陈 刚 曹建萌 刘志刚 王 森 卢迈新 (50)

四川华鳊仔稚鱼生长与形态发育研究.....王亚利 刘 玥 田佳佳 尹 敏 蔡瑞钰 王志坚 (58)

基于简化基因组测序的中国明对虾 3 个选育世代遗传多样性分析.....王凤娇 孟宪红 傅 强 栾 生 隋 娟 (68)

中国鲎人工繁育及 1 龄稚鲎形态性状对体质量的影响.....鲍虞园 叶国玲 颀晓勇 (77)

三疣梭子蟹 *Apaf-1* 基因的克隆及其在低盐和病原胁迫后的表达分析.....王 磊 任宪云 宋 柳 吕建建 高保全 刘 萍 孙东方 (85)

胶州湾菲律宾蛤仔个体生长模型的构建与验证.....董世鹏 蔺 凡 姜妮妮 杜美荣 高亚平 王晓芹 李凤雪 侯 兴 蒋增杰 (94)

莱氏拟乌贼肌肉营养成分分析及评价.....王 峥 刘长琳 翟介明 陈四清 毛东亮 孙礼娟 葛建龙 边 力 (102)

双齿围沙蚕对潮间带不同类型底质选择行为的研究.....孟 珊 房景辉 蒋增杰 许 越 董世鹏 于伟松 侯 兴 高亚平 杜美荣 蔺 凡 (110)

泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析.....熊 钢 王晓清 王 佩 陈贞年 周先文 康 骊 曾志南 (117)

富藻养殖水体中金鱼藻和篦齿眼子菜的抑藻效果研究.....李晨露 常孟阳 董 静 代杜娟 王佳慧 尚向阳 范聪利 (125)

山东主要刺参养殖区幼参肠道抗生素耐药菌及耐药基因分布特征.....闫倩倩 李 彬 廖梅杰 王印庚 张 正 于永翔 荣小军 李德军 (134)

环境条件对 1 株假交替单胞菌脱氮效果的影响.....于党辉 王秀华 张宇哲 武和英 张 琴 (144)

真鲷虹彩病毒引起养殖斑石鲷大规模死亡的研究.....王海波 史成银 谢国骊 刘冉阳 任宁欣 (151)

沙雷氏蛋白酶 MP 及其抑制剂 LupI 的复合物纯化及结晶.....张琳桓 王 伟 孙晶晶 刘均忠 李尚勇 张 洁 郝建华 (159)

简报

不同罗非鱼品系感染无乳链球菌后对血液和肝胰腺生化指标的影响.....敖秋桅 罗永巨 吕 敏 朱佳杰 (167)

脊尾白虾甘露糖结合凝集素(MBL)基因在抗辐胁迫中的生物学功能分析.....徐莞媛 马杭柯 孙金秋 段健诚 邓高威 高 焕 阎斌伦 (174)

综述

海草植株扩繁理论及其定植效应的研究进展.....张沛东 张彦浩 张宏瑜 张秀梅 (181)

臭氧水处理在水产品杀菌保鲜中的应用研究进展.....蓝蔚青 赵亚楠 刘 琳 谢 晶 (190)

第 5 期

研究论文

- 西北太平洋秋刀鱼 CPUE 标准化研究石永闯 朱清澄 黄硕琳 冯慧丽 (1)
- 渤海伏季休渔效果初步评价胡芷君 单秀娟 杨涛 丁琪 (13)
- 舟山群岛以东沿岸海域虾类资源状况及其多样性分析胡嘉豪 俞存根 刘惠 (22)
- 西江流域卷口鱼线粒体 D-loop 序列的遗传多样性分析彭敏 王大鹏 施军 韩耀全 雷建军 李育森 吴伟军 何安尤 (30)
- 广西仙岛公园和沙井红树林土壤碳氮储量的空间分布陶玉华 黄星 王薛平 钟秋平 亢振军 (38)
- 东南太平洋茎柔鱼资源丰度灰色预测研究闫永斌 陈新军 汪金涛 雷林 程起群 (46)
- 江苏省 4 个太湖新银鱼种群遗传多样性和遗传结构分析李大命 唐晟凯 刘燕山 谷先坤 刘小维 殷稼雯 张彤晴 潘建林 (52)
- 大黄鱼消化道菌群结构、消化酶和非特异性免疫酶活力分析姜燕 徐永江 于超勇 柳学周 王滨 郑炜强 官曙光 史宝 陈佳 柯巧珍 (61)
- 线粒体 COI、Cyt b 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析陆键萍 姚琳 信红梅 曲梦 江艳华 李凤铃 郭莹莹 王联珠 许加超 (73)
- 凡纳滨对虾养殖体系中群体感应淬灭菌的筛选、安全性评估及发酵条件优化于鹏 叶海斌 单洪伟 马甦 王腾 (82)
- 三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆及在病原胁迫后的表达特征分析张云滨 任宪云 高保全 吕建建 王磊 刘萍 (92)
- 基于微卫星分子标记的凡纳滨对虾商业苗种遗传多样性分析方振朋 孟宪红 李旭鹏 栾生 曹家旺 陈宝龙 孔杰 闫茂仓 胡利华 (101)
- 基于 DEB 理论的皱纹盘鲍个体生长模型参数的测定段娇阳 刘慧 陈四清 蒋增杰 蔺凡 常丽荣 卢龙飞 (110)
- 墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传分析姚高友 谭杰 吴羽媛 苏晓盈 刘付少梅 张元 方家熙 陈楠生 王春德 刘志刚 (118)
- 短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢及能量收支的影响薛素燕 李加琦 李阳 丁敬坤 徐涵 张雯雯 毛玉泽 方建光 (127)
- 桑沟湾海带标准化养殖模式的优势探析房景辉 蒋增杰 蔺凡 高亚平 方建光 张鹏 郭智俐 杜美荣 孟珊 (134)
- 盐度及钒酸钠胁迫对红毛菜光合生理的影响魏家慧 李晓蕾 马德英 汪文俊 梁洲瑞 李国梁 刘福利 孙修涛 王飞久 (141)
- 光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆及其在全组织和卵母细胞中的表达分析周丹 苏泳霖 钟如卓 郭志诚 邬婧 郑哲 王庆恒 (150)
- 利用 mini-Tn10 转座子文库筛选鳗弧菌 M3 表型发生变化的基因李倩 李贵阳 李杰 莫照兰 (160)
- 暗纹东方鲀鱼精蛋白的提取工艺优化研究张家源 张洪才 陈舜胜 (168)
- 印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价宋红梅 屈政委 汪学杰 牟希东 刘超 刘奕 赖明信 胡隐昌 (177)

综述

水生生物环境丰容技术及其应用研究进展.....
 秦传新 潘莞倪 于 刚 左 涛 席世改 朱文涛 马鸿梅 (185)
 主要经济双壳贝类性别分化的分子机制概述..... 周丽青 赵 丹 吴 宙 吴 磊 杨金龙 (194)

第 6 期

研究论文

基于不同空间插值法的黄海和东海北部游泳动物多样性空间分布研究.....
 唐 政 单秀娟 关丽莎 金显仕 胡芷君 韩青鹏 (1)
 天津大神堂海域不同时间序列礁体附着生物群落特征变化.....
 郭 彪 陈 卫 高 燕 张博伦 王 硕 王 宇 张 雪 曾祥茜 (12)
 秋季莱州湾弓子网网囊网目尺寸选择性研究..... 许庆昌 李显森 孙 珊 樊钢洲 (19)
 草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究..... 朱亚华 姜 涛 陈修报 刘洪波 杨 健 (28)
 许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 B₆ 需求量的研究.....
 周 莹 王际英 李宝山 王成强 王世信 孙永智 马长兴 (37)
 塔里木裂腹鱼消化系统形态学与组织学研究..... 任永丽 聂竹兰 杨志军 张 升 魏 杰 (49)
 恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾的抗氧化功能的影响.....
 陈梓聪 陈丕茂 袁华荣 冯 雪 佟 飞 陈文静 龙鑫玲 张皓铭 (58)
 不同光照周期对日本囊对虾生长、蜕皮和糖代谢的影响..... 王 想 任宪云 绳秀珍 李翠苹 李 健 (66)
 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响..... 肖 威 单洪伟 马 甦 李忠帅 (74)
 不同性别口虾蛄形态性状对体重的影响分析及曲线拟合..... 张新明 程顺峰 (82)
 三疣梭子蟹体内 As 的蓄积特异性研究..... 韩雅荃 陈碧鹃 张 艳 夏 斌 唐学玺 (92)
 基于叶绿素 a 时空分布的胶州湾菲律宾蛤仔养殖容量评估.....
 董世鹏 蔺 凡 姜妮妮 杜美荣 高亚平 李凤雪 侯 兴 蒋增杰 (100)
 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响..... 刘 洋 于瑞海 张 哲 田传远 钱嘉文 (108)
 条斑紫菜丝状体不同发育时期对光照和温度的光合适应能力.....
 魏家慧 李国梁 汪文俊 梁洲瑞 鲁晓萍 刘福利 孙修涛 张朋艳 (115)
 引入养殖俄罗斯红参线粒体全序列结构与分析.....
 赵 强 杨 爽 刘心田 孙国华 冯艳微 王卫军 杨建敏 (125)
 南海鸢乌贼微型群雌性个体繁殖力研究..... 朱 凯 张立川 肖楚源 陈新军 林东明 朱俊磊 (140)
 基于全长转录组测序的金乌贼微卫星位点筛选与特征分析..... 张金勇 何暮春 项子龙 柳淑芳 庄志猛 (149)
 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用.....
 邹 莹 郭晓萌 万晓媛 邱 亮 张庆利 (156)
 虾肝肠胞虫全基因组分泌蛋白的预测分析..... 宁梓健 姜宏波 刘 琦 包 杰 (165)
 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析..... 李翠苹 翟倩倩 王 想 李 健 (174)
 丁香油对蟹黄鲜虾酱贮藏品质的影响..... 陈小雷 胡 王 马朝彬 凌 俊 段国庆 鲍 凯 (181)
 综述
 岩礁鱼类行为生态学研究进展..... 李 娇 公丕海 常 青 孟 振 关长涛 李佳佳 (192)
 鲑鳟鱼类寄生虫病研究进展与展望..... 唐嘉嘉 李诗钰 李安兴 (200)

Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 41, 2020

No.1

- Variations of Fishery Resource Structure in the Yellow Sea and East China Sea DAI Fangqun, ZHU Ling, CHEN Yunlong (1)
- The Relationship of Stock Density Distribution of Wintering Anchovy (*Engraulis japonicus*) and Environmental Factors Based on Remote Sensing in Central and Southern Yellow Sea NIU Mingxiang, WANG Jun, WU Qiang, SUN Jianqiang (11)
- Seasonal Variations in the Phytoplankton Community Structure and Their Environmental Impact Factors in the Offshore Area of Laoshan, Qingdao CHAI Ran, FENG Juan, CHEN Bijuan, XIA Bin, SUN Xuemei, WANG Xiaoxiao, CHEN Jufa, CUI Zhengguo, QU Keming (21)
- Distribution of Size-Fractionated Phytoplankton and Its Relationship with Environmental Variables in Sanggou Bay LI Fengxue, JIANG Zengjie, GAO Yaping, DU Meirong, WANG Xiaoqin, LI Wenhao, HOU Xing, DONG Shipeng, WANG Junwei, ZHANG Yitao (31)
- GIS-Based Assessment for Culture Suitability of Kelp (*Saccharina japonica*) in Sanggou Bay and the Surrounding Waters SUN Qianwen, LIU Hui, SHANG Weitao, YU Liangju, JIANG Xiaopeng, CAI Biying, CHANG Lirong, XIAO Luyang (41)
- Studying the Retention Time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in Water LI Miao, SHAN Xiujuan, WANG Weiji, DING Xiaosong, DAI Fangqun, LÜ Ding, WU Huanhuan (51)
- Comparative Study on the Community Structure of Epiphytic Bacteria in Sporophyte and Gametophyte Stages of Kelp *Saccharina japonica* TANG Longchen, ZHONG Chenhui, LIN Qi, LU Zhen, HUANG Ruifang, HUAN Zhongyan (58)
- Optimization and Validation of Electrochemical Technology for Simultaneous Nitrogen Removal in Aquaculture by Using Response Surface Methodology ZHANG Peng, ZHANG Long, CHEN Shibo, ZHU Jianxin (66)
- Genetic Diversity and Population Structure of Different Geographical Populations of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) from China, South Korea and Russia Based on Mitochondrial Genes WANG Jinjin, LIAO Meijie, LI Bin, WANG Yingeng, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, GE Jianlong (75)
- Transcriptome Study of Kidney of Turbot under High-Temperature Stress YANG Kai, HUANG Zhihui, MA Aijun, LIU Xiaofei, YANG Shuangshuang (86)
- Effect of Temperature and Diet on the Reproductive Condition of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Broodstock TAN Jie, LI Fenghui, CHEN Siqing, MA Tianyi, CHEN Aihua, GE Jianlong, SUN Huiling, WANG Liang (96)
- Diet Feeding Rhythm and Analysis of Gastric Evacuation Associated Mathematical Models in Juvenile *Thamnaconus septentrionalis* ZHANG Pengfei, CHANG Qing, CHEN Siqing, XU Zhengxin, ZHAO Jiejie (104)
- Effects of Salinity on the Histological Structure of the Gills, Spleen, and Muscle in *Lateolabrax maculatus* Juveniles WEN Jiufu, LAN Junnan, CAO Ming, ZHOU Hui, OU Youjun, LI Jiaer (112)
- Establishment and Optimization of an Isolation and Culture System for Sertoli Cells of Nile Tilapia KANG Kai, WU Jiang, YUAN Linyong, LIU Lihuan, CHEN Yongling, XIAO Mei, AN Lilong (119)
- Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (*SHMT*) Genes from *Exopalamon carinicauda* SUN Jinqiu, XU Wanyuan, MA Hangke, GAO Wei, OUYANG Lefei, GAO Huan, YAN Binlun (127)
- Etiology of Black-Brown Disease in Cultured *Caulerpa lentillifera* ZHANG Yannan, WANG Yingeng, LIU Fuli, LIAO Meijie, LI Bin, ZHANG Zheng, LIANG Zhourui, YU Yongxiang, RONG Xiaojun (135)
- Embryonic Development of *Caridina japonica* and *in vitro* Incubation of Its Fertilized Eggs CAO Linquan, QIN Zheng, JIANG Yusheng, LIU Xin, LI Xiaodong, LIN Yuan, HUANG Kaitao, LIU Xu (145)
- Analysis of Propagation Characteristics of LED Light Source in Aquaculture Water ZHANG Yanqing, QIN Fei, FEI Fan, LI Xiaotian, HUANG Bin, ZHAO Kuifeng, LIU Baoliang (153)
- Effects of LED Spectra on Morphological Characters and Gene Expression of Growth in *Takifugu rubripes* Larvae WEI Pingping, LI Xin, ZHANG Junpeng, FEI Fan, MA He, GAO Dongkui, SONG Changbin, CHEN Tao, LIU Ying (162)
- Effects of Adding *Vallisneria natans* Meal to Diet on Growth Performance, Physiological and Biochemical Properties of Juvenile Grass Carps (*Ctenopharyngodon idellus*) HUANG Zhongyuan, HE Wenhui, PENG Ziran, LIU Yuchao, HUA Xueming, FENG Yue, LI Xiang, ZUO Lin (169)

- Changes in Quality of Sturgeon Fillet During 4°C and -3°C Partial Freezing Storage.....CHEN Yiping,
CUI Wenxuan, GAO Ruichang, LI Jianpeng, ZENG Mingyong, TANG Shuwei, FENG Qiufeng, ZHAO Yuanhui (178)

No.2

- Ecological Classification of Marine Ranching Based on Landscape Ecology: A Case Study of Zhelin Bay Marine Ranching DUAN Dingyu, QIN Chuanxin, ZHU Wentao, MA Hongmei (1)
- Non-Linear Analysis of the Horizontal Wave Force on A Type of Frustum Cones Artificial Reef.....LIU Yan, ZHAO Yunpeng, DONG Guohai (12)
- Health Assessment of the Benthic Ecosystem in Jiaozhou Bay: Ecological Characteristics of the Macrobenthos DING Jingkun, ZHANG Wenwen, LI Yang, XUE Suyan, LI Jiaqi, JIANG Zengjie, FANG Jianguang, MAO Yuze (20)
- Release Dynamics and Composition of Dissolved Organic Matter from the Macroalgae *Ulva prolifera* under Different Temperature Regimes.....GENG Qianqian, CHEN Jing, LI Hongmei, YANG Rujun, ZHANG Yongyu (27)
- Sagitta Microstructure Characteristics of Young of the Year (YOY) *Larimichthy polyactis* in the Bohai SeaZHANG Tingting, WANG Yukun, YUAN Wei, JIN Xianshi, CHEN Chao, SUN Yao (35)
- Direct Detection of Target Genes in Viable Bacteria and Extracellular DNA Using Loop-Mediated Isothermal Amplification AssayYANG Qianqian, ZHANG Xuzhi, JIANG Xiaoyu, LI Yang, ZHAO Jun, HAO Zhihui, WANG Pingping, QU Keming (41)
- Toxic Effects of Acute Ammonia Stress on Young Turbot *Scophthalmus maximus*MENG Zhen, ZHANG Hongli, LIU Xinfu, JIANG Yong, JIA Yudong, LIU Bin, QU Jiangbo, XU Rongjing (51)
- The Variations of Digestive Enzymes in Larval and Juvenile *Seriola aureovittata* ZHANG Zhengrong, LIU Xuezhou, YU Yi, SHI Bao, ZHANG Yanxiang, XU Yongjiang, WANG Bin, JIANG Yan, SUN Ranran (61)
- Cloning and Immune Response Analysis of Protein Kinase C-alpha (PKC α) in Chinese Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) LI Kunming, XU Wenteng, FU Xiaoqin, CHEN Songlin (69)
- Temperature and Water Elemental Concentration Affecting Strontium Incorporation into Otoliths in Larval-Juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus* TIAN Honglin, LIU Jinhu, CAO Liang, DOU Shuozen (78)
- Experimental Starvation of *Acanthopagrus schlegelii* Larvae, and Definition of the Point of No Return YANG Yukai, LIN Heizhao, WANG Zhiyong, XIE Yangjie, GUO Yihui, HUANG Xiaolin, LI Tao (87)
- The Karyotype and Ag-NORs of *Hemibarbus labeo* from Nandujiang River of Hainan..... LI An, LI Gaojun, WANG Shifeng, LIU Shufang, ZHOU Yongcan, SHEN Zhixin, XUE Xianqiu, CAI Yan (95)
- Cloning and Expression of the *piwil2* Gene in the Spotted Halibut (*Verasper variegatus*) YANG Zhenzhen, BIAN Li, ZHANG Yan, CHANG Qing, CHEN Siqing, LIU Changlin, GE Jianlong, HU Jiancheng, ZHANG Shengnong (103)
- Genetic Diversity in Five Cultured Population of Cobia (*Rachycentron canadum*) Using Microsatellite Markers LI Weiqiang, CHEN Gang, MA Qian, HUANG Jiansheng, SHI Gang, PAN Chuanhao, ZHOU Hui, XIE Ruitao, ZHANG Jiandong, TANG Baogui (113)
- Effects of Probiotics-Supplemented Diets on the Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Carrying Multiple PathogensLIAN Xiaojun, ZHU Kailing, ZHANG Qingqi, WAN Xiaoyuan, XIE Guosi, GUO Chengcheng, HUANG Jie (121)
- Changes in Zooplankton Community Structure in Industrial Shrimp Farming Ponds LUO Qiang, LI Jian, CHANG Zhiqiang, CHEN Zhao, QIAO Ling, YANG Ligan (131)
- Effects of Stocking Density on Growth, Water Quality, and Antioxidant System of Juvenile *Fenneropenaeus chinensis* ZHANG Hai'en, HE Yuying, LI Jian, HU Shuo, Han Xu (140)
- Effects on the Growth of Shrimp Pathogen VP_{AHPND} and Selection of Suitable Reference Genes Under Different Concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. Alcoholic Extracts YANG Zeyu, LIAO Meijie, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, WEI Xinxian, LI Bin, RONG Xiaojun (150)
- Expression Characteristics of Trehalose-6-Phosphate Synthase in *Litopenaeus vannamei* under High-Temperature Stress..... HU Lijie, LI Xupeng, MENG Xianhong, LUAN Sheng, LUO Kun, SUI Juan, CHEN Baolong, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, KONG Jie (159)
- Sexual Selection in *Octopus ocellatus* Based on Microsatellite Paternity Identification Technology FAN Tingting, FENG Yanwei, LIU Wenfen, WANG Weijun, YANG Jianmin (168)
- Colour Polymorphism of *Tridacna crocea* Mantle and Its Correlation with Growth Traits HE Yuanyuan, LIU Ertian, GU Zhifeng, SHI Yaohua, WANG Aimin, LIU Chunsheng (176)
- Gene Cloning and Expression of Ostreid Herpesvirus 1 Envelope Protein (ORF111)

- ZHANG Shumin, BAI Changming, XIN Lusheng, LI Yanan, LI Chen, WANG Chongming (183)
 Research on Preparation of Antioxidant Peptides from Cod Swim Bladder
 LI Na, ZHOU Deqing, LIU Nan, WANG Shanshan, MA Yujie (191)

No.3

- Oil Spill Pollution and Fishery Resource Loss Assessment Based on GNOME BI Yanjun, LIU Xintian, SONG Xiefa, DONG Dengpan (1)
 Effects of Ocean Acidification on Physiological Characteristics of Coccolithophores HUANG Shujie, XU Dong, WANG Dongsheng, ZHANG Xiansheng, YE Naihao (11)
 Study on the Assimilation of Nitrogen and Phosphorus and on the Sorption of Heavy Metals in *Laminaria hyperborea* ... YUAN Yanmin, LIU Fuli, DU Xinxin, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao (25)
 Toxic Effects of Copper Ion in *Mytilus coruscus*: An Integrated Biomarker Approach LI Lei, PING Xianyin, SONG Wei, JIANG Mei, HUANG Ting, WANG Lumin (32)
 Numerical Simulation Study on Influence of Disposal Space on Effects of Flow Field Around Porous Square Artificial Reefs WANG Jiahao, LIU Lili, CAI Xinchun, CHEN Jiaying, YANG Yixin, JIANG Shuxia (40)
 Cloning and Expression Analysis of the *MASP1* Gene from the Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) WANG Qian, ZHANG Xue, CHEN Yadong, SHA Zhenxia (49)
 Dietary Selenium Requirement of Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*) ... YU Wanfeng, LIN Heizhao, HUANG Zhong, YU Wei, ZHOU Chuanpeng, TAN Lianjie, XUN Pengwei, HUANG Qianqian, HUANG Xiaolin (60)
 Histological Observations on the Early Development of Lymphoid Organs in *Eleutheronema tetradactylum* LAN Junnan, WEN Jiufu, LI Junwei, OU Youjun, ZHOU Hui, LI Jiaer, LI Huo (70)
 Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of *TGF- β 1* in Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) WANG Shan, XU Wenteng, LI Ming, WANG Jie, WANG Lei, ZHAI Jieming, CHEN Songlin (78)
 Expression of *LINE1* in Zebrafish (*Danio rerio*) During Cold Acclimation TAO Xiaofan, XIE Tingting, LI Xiaoxia, LUO Juntao, BAI Yajing, HAN Bingshe, ZHANG Junfang (88)
 Correlation Analysis and Morphological Difference and Contributions to Body Weight of Reciprocally-Crossed Subgroups of *Oreochromis niloticus* \times *O. Aureus* CHEN Binglin, XIAO Wei, ZOU Zhiying, ZHU Jinglin, LI Dayu, YU Jie, YANG Hong, HU Pingge, MA Yinhua (94)
 Genetic Background Analysis of Six Groups of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* in China Using SSR Markers LI Xupeng, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LUO Kun, TAN Jian, KONG Zhangwei, MENG Xianhong, KONG Jie (103)
 Isolation and Identification of Subcellular Fractions from Digestive Glands of *Chlamys farreri* CHEN Wei, WEI Shouxiang, LI Yuhan, PAN Luqing (111)
 Effects of Short Period High-Salinity Stress on Antioxidant Enzyme Activities and Photosynthesis Enzyme Activities of *Gracilaria chouae* XU Han, XUE Suyan, LI Jiaqi, DING Jingkun, HUO Enze, ZHANG Wenwen, MAO Yuze, FANG Jianguang (119)
 Effects of UV-B Ultraviolet Radiation on the Physiology and Biochemistry of *Pyropia yezoensis* PAN Xue, MAO Yunxiang, WANG Junhao, CAO Min, BI Guiqi, DU Guoying (125)
 Effect of A Compound Probiotics on the Ability of *Litopenaeus vannamei* to Resist *Vibrio parahaemolyticus* Infection ... YANG Yunkai, SONG Xiaoling, WANG Hailiang, XIE Guosi, HUANG Jie (133)
 Sequencing and Phylogenetic Analysis of the 16S rRNA Genes of Bacterial Strains Isolated from Diseased Flatfish LAN Xin, LI Jie, LI Guiyang, XIAO Peng, MO Zhaolan (142)
 Isolation and Egg-Yolk Antibody Preparation of *Micropterus salmonides* Rhabdovirus YUAN Xuemei, LV Sunjian, SHI Weida, HANG Xiaoying, LIU Li, WU Yinglei (151)
 Gene Identification and Tissue Differential Expression Analysis of *Sepia esculenta* Telomerase Reverse Transcriptase ... XIANG Zilong, LIU Changlin, ZHANG Jinyong, HU Peng, HE Muchun, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng, XUE Tongming (158)
 Progress in the Study of Fishing-Induced Evolution of Fish Biological Characteristics SHAN Xiujian, HU Zhijun, SHAO Changwei, TANG Zheng (165)
 The Functions of α -Melanocyte Stimulating Hormone and Melanocortin-4 Receptor During Energy Homeostasis and Reproduction WEN Haishen, ZHANG Ying, FENG Qichao, HOU Zhishuai, QI Xin, LI Yun (176)

No.4

- Analysis of the Fish Community Structure in the Spring and Autumn of the Zhoushan Coastal Fishing Grounds GUO Pengjun, JIANG Xinqin, YU Cungen, DENG Xiaoyan, ZHANG Ping, XU Yongjiu (1)
- Expression Analysis and Functional Characterization of *JNK2* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) SI Yu, WANG Xuangang, WANG Mengya, WANG Xintong, YU Haiyang, ZHANG Quanqi, WANG Zhigang (12)
- Comparison of Metamorphosis Development and Growth of Hybrid Offspring of *Epinephelus lanceolatus* (♂) and *E. bruneus* (♀) or *E. moara* (♀) WU Yuping, TIAN Yongsheng, CHENG Meiling, LI Zhentong, ZHANG Jingjing, WANG Linna, MA Wenhui, PANG Zunfang, ZHANG Songlin, ZHAI Jieming (23)
- Genetic Divergence of *Coilia nasus taihuensis* and *Coilia brachygnathus* Populations Based on the Mitochondrial Cyt-b Gene XUAN Zhongya, JIANG Tao, LIU Hongbo, CHEN Xiubao, YANG Jian (33)
- Response of Aquaporin (AQP1, AQP3) and Ion Channel Protein (CFTR, NHE1) of Turbot (*Scophthalmus maximus*) to Low-Salinity Stress ZHANG Jinsheng, LIU Zhifeng, MA Aijun, CUI Wenxiao, QU Jiangbo (41)
- Genetic Diversity Analysis of Nine Loach (*Paramisgurnus dabryanus*) Populations in the Pearl River Basin Based on Microsatellite Markers LIU Jie, GAO Fengying, CHEN Gang, CAO Jianmeng, LIU Zhigang, WANG Miao, LU Maixin (50)
- Growth and Morphological Development of Larval and Juvenile *Sinibrama taeniatus* WANG Yali, LIU Yue, TIAN Jiajia, YIN Min, CAI Ruiyu, WANG Zhijian (58)
- Analysis of Genetic Diversity in Three Generations of Breeding Populations of *Fenneropenaeus chinensis* Based on Reduced-Representation Genome Sequencing WANG Fengjiao, MENG Xianhong, FU Qiang, LUAN Sheng, SUI Juan (68)
- Effects of Morphological Characters on Body Weight of Artificially Bred the First Instars of Horseshoe Crabs (*Tachypleus tridentatus*) BAO Yuyuan, YE Guoling, XIE Xiaoyong (77)
- Cloning and Expression Analysis of the *Apaf-1* Gene in *Portunus trituberculatus* after Exposure to Low Salt and Pathogenic Stresses WANG Lei, REN Xianyun, SONG Liu, LÜ Jianjian, GAO Baoquan, LIU Ping, SUN Dongfang (85)
- Simulation and Validation of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Growth with a DEB-Based Individual Growth Model in Jiaozhou Bay DONG Shipeng, LIN Fan, JIANG Weiwei, DU Meirong, GAO Yaping, WANG Xiaoqin, LI Fengxue, HOU Xing, JIANG Zengjie (94)
- Analysis and Evaluation of Muscle Nutrition of *Septeuthis lessoniana* WANG Zheng, LIU Changlin, ZHAI Jieming, CHEN Siqing, MAO Dongliang, SUN Lijuan, GE Jianlong, BIAN Li (102)
- Experimental Study of the Choice Behavior of *Perinereis aibuhitensis* Grube among Different Sediment Types MENG Shan, FANG Jinghui, JIANG Zengjie, XU Yue, DONG Shipeng, YU Weisong, HOU Xing, GAO Yaping, DU Meirong, LIN Fan (110)
- Development and Genetic Diversity Analysis of *Babylonia lutosa* with EST-SSR Markers XIONG Gang, WANG Xiaoqing, WANG Pei, CHEN Zhennian, ZHOU Xianwen, KANG Li, ZENG Zhinan (117)
- Responses of Eutrophic Ponds to *Ceratophyllum demersum* and *Potamogeton pectinatus* LI Chenlu, CHANG Mengyang, DONG Jing, DAI Dujuan, WANG Jiahui, SHANG Xiangyang, FAN Congli (125)
- Distribution Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria and Antimicrobial Resistant Genes in the Intestine of Cultured Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) Seedlings in Shandong Province YAN Qianqian, LI Bin, LIAO Meijie, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, YU Yongxiang, RONG Xiaojun, LI Dejun (134)
- Effect of Environmental Conditions on Denitrification of *Pseudomonas* sp. YU Danghui, WANG Xiuhua, ZHANG Yuzhe, WU Heying, ZHANG Qin (144)
- Red Seabream Iridovirus Causing Mass Mortality in Farmed Spotted Knifejaw, *Oplegnathus punctatus* WANG Haibo, SHI Chengyin, XIE Guosi, LIU Ranyang, REN Ningxin (151)
- Purification and Crystallization of Complex Serralysin-Like MP and Its Inhibitor LupI ZHANG Linhuan, WANG Wei, SUN Jingjing, LIU Junzhong, LI Shangyong, ZHANG Jie, HAO Jianhua (159)
- Effects of *Streptococcus agalactiae* Infection on Blood and Hepatopancreatic Tissue Biochemical Indices in Different Species of Tilapia AO Qiwei, LUO Yongju, LÜ Min, ZHU Jiajie (167)
- Biological Functional Analysis of MBL Gene in Resistance to Cadmium Stress in *Exopalaemon carinicauda* XU Wanyuan, MA Hangke, SUN Jinqiu, DUAN Jiancheng, DENG Gaowei, GAO Huan, YAN Binlun (174)
- Research Advances in Shoot Propagation Theory and Planting Technique of Seagrasses ZHANG Peidong, ZHANG Yanhao, ZHANG Hongyu, ZHANG Xiumei (181)
- Research Progress on the Applications of Ozonated Water in the Sterilization and Preservation of Aquatic Products LAN Weiqing, ZHAO Yanan, LIU Lin, XIE Jing (190)

No.5

- Study on CPUE Standardization of Chinese Pacific Saury (*Cololabis saira*) Fishery in the Northwest Pacific Ocean SHI Yongchuang, ZHU Qingcheng, HUANG Shuolin, FENG Huili (1)
- Preliminary Evaluation of Summer Fishing Moratorium in the Bohai Sea HU Zhijun, SHAN Xiujian, YANG Tao, DING Qi (13)
- Current Status and Diversity Analysis of the Shrimp Resources in Coastal Waters East of the Zhoushan Islands HU Jiahao, YU Cungen, LIU Hui (22)
- Genetic Diversity Analysis of Mitochondrial D-loop Sequence of *Ptychidio jordani* in Xijiang River Basin PENG Min, WANG Dapeng, SHI Jun, HAN Yaoquan, LEI Jianjun, LI Yusen, WU Weijun, HE Anyou (30)
- Spatial Distribution of Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Mangrove Wetland of Xiandao Park and Shajing in Guangxi TAO Yuhua, HUANG Xing, WANG Xueping, ZHONG Qiuping, KANG Zhenjun (38)
- Prediction of Abundance Index of the Humboldt Squid (*Dosidicus gigas*) in the Southeast Pacific Ocean Based on a Grey System-Based Model YAN Yongbin, CHEN Xinjun, WANG Jintao, LEI Lin, CHENG Qiqun (46)
- Genetic Diversity and Population Structure of Four *Neosalanx taihuensis* Populations in Jiangsu Province LI Daming, TANG Shengkai, LIU Yanshan, GU Xiankun, LIU Xiaowei, YIN Jiawen, ZHANG Tongqing, PAN Jianlin (52)
- Analysis of Microbiota Structure, Digestive Enzyme and Nonspecific Immune Enzyme Activity in the Gastrointestinal Tract of Large Yellow Croaker JIANG Yan, XU Yongjiang, YU Chaoyong, LIU Xuezhou, WANG Bin, ZHENG Weiqiang, GUAN Shuguang, SHI Bao, CHEN Jia, KE Qiaozhen (61)
- Applicability Analysis of Mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA Genes in Identification of Six Tuna Species LU Jianping, YAO Lin, XIN Hongmei, QU Meng, JIANG Yanhua, LI Fengling, GUO Yingying, WANG Lianzhu, XU Jiachao (73)
- Screening, Safety Evaluation and Fermentation Conditions Optimization of Quorum Quenching Bacteria from *Litopenaeus vannamei* Culture System YU Peng, YE Haibin, SHAN Hongwei, MA Shen, WANG Teng (82)
- Cloning and Expression Analysis of c-Jun N-Terminal Kinase Gene in *Portunus trituberculatus* after Pathogenic Stress ZHANG Yunbin, REN Xianyun, GAO Baoquan, LÜ Jianjian, WANG Lei, LIU Ping (92)
- Genetic Diversity Analysis of Domestic Commercial Brands Seedlings of *Litopenaeus vannamei* Based on Microsatellite Molecular Markers FANG Zhenpeng, MENG Xianhong, LI Xupeng, LUAN Sheng, CAO Jiawang, CHEN Baolong, KONG Jie, YAN Maocang, HU Lihua (101)
- The Measurement of Parameters for the Dynamic Energy Budget (DEB) Model in *Haliotis discus hannai* (Disk Abalone) DUAN Jiaoyang, LIU Hui, CHEN Siqing, JIANG Zengjie, LIN Fan, CHANG Lirong, LU Longfei (110)
- Genetic Analysis of *Argopecten irradians concentricus*, “Bohai Red” and Their Hybrids YAO Gaoyou, TAN Jie, WU Yuyuan, SU Xiaoying, LIUFU Shaomei, ZHANG Yuan, FANG Jiayi, CHEN Nansheng, WANG Chunde, LIU Zhigang (118)
- Effects of Short-Term Acidification on Feeding, Respiratory Metabolism, and Energy Budget of *Scapharca broughtonii* XUE Suyan, LI Jiaqi, LI Yang, DING Jingkun, XU Han, ZHANG Wenwen, MAO Yuze, FANG Jianguang (127)
- Analysis on the Advantages of Standard Kelp Long Line Culture in Sanggou Bay FANG Jinghui, JIANG Zengjie, LIN Fan, GAO Yaping, FANG Jianguang, ZHANG Peng, GUO Zhili, DU Meirong, MENG Shan (134)
- Effects of Salinity and Na₃VO₄ Stress on Photosynthetic Physiology of *Bangia* WEI Jiahui, LI Xiaolei, MA Deying, WANG Wenjun, LIANG Zhourui, LI Guoliang, LIU Fuli, SUN Xiutao, WANG Feijiu (141)
- Molecular Cloning and Expression Analysis of *HSP90* of Peanut Worm *Sipunculus nudus* ZHOU Dan, SU Yonglin, ZHONG Ruzhuo, GUO Zhicheng, WU Jing, ZHENG Zhe, WANG Qingheng (150)
- Construction of A mini-Tn10 Transposon Library to Identify Genes Associated with Several Phenotypes of *Vibrio aquillarum* M3 LI Qian, LI Guiyang, LI Jie, MO Zhaolan (160)
- Optimization of Extraction Process of Protamine from *Takifugu obscurus* ZHANG Jiayuan, ZHANG Hongcai, CHEN Shunsheng (168)
- Analysis and Assessment for Nutritional Components of the Muscle of *Datnioides pulcher* SONG Hongmei, QU Zhengwei, WANG Xuejie, MU Xidong, LIU Chao, LIU Yi, LAI Mingxin, HU Yinchang (177)
- Review on Environmental Enrichment for Aquatic Organisms QIN Chuanxin, PAN Wannan, YU Gang, ZUO Tao, XI Shigai, ZHU Wentao, MA Hongmei (185)
- Review: Molecular Mechanism of Sex Differentiation in Major Economic Bivalves ZHOU Liqing, ZHAO Dan, WU Zhou, WU Lei, YANG Jinlong (194)

No.6

- Study of the Distribution of Nekton Diversity Base on Spatial Interpolation Methods in the Yellow Sea and North East China Sea TANG Zheng, SHAN Xiujuan, GUAN Lisha, JIN Xianshi, HU Zhijun, HAN Qingpeng (1)
- Community Characteristics of Attaching Organisms on the Artificial Reefs Built in Different Years in Dashentang, Tianjin GUO Biao, CHEN Wei, GAO Yan, ZHANG Bolun, WANG Shuo, WANG Yu, ZHANG Xue, ZENG Xiangxi (12)
- Selectivity of Codend Mesh of Beam Trawl in Laizhou Bay in Autumn XU Qingchang, LI Xiansen, SUN Shan, FAN Gangzhou (19)
- The Marking Characteristics of Otoliths of Larval Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Immersion in Alizarin Complexone ZHU Yahua, JIANG Tao, CHEN Xiubao, LIU Hongbo, YANG Jian (28)
- Dietary Vitamin B₆ Requirements of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegeli*) ZHOU Ying, WANG Jiying, LI Baoshan, WANG Chengqiang, WANG Shixin, SUN Yongzhi, MA Changxing (37)
- Morphology and Histology Studies of the Digestive System of *Schizothorax biddulphi* REN Yongli, NIE Zhulan, YANG Zhijun, ZHANG Sheng, WEI Jie (49)
- Effect of Recovery Time on Antioxidant Capacity of Juvenile *Penaeus monodon* After Exhaustive Exercise CHEN Zicong, CHEN Pimao, YUAN Huarong, FENG Xue, TONG Fei, CHEN Wenjing, LONG Xinling, ZHANG Haoming (58)
- Effects of Different Photoperiods on Growth, Molting and Glucose Metabolism of *Marsupenaeus japonicas* WANG Xiang, REN Xianyun, SHENG Xiuzhen, LI Cuiping, LI Jian (66)
- Effects of Chronic Nitrite Stress on Body Composition and Glucose Metabolism of *Litopenaeus vannamei* XIAO Wei, SHAN Hongwei, MA Shen, LI Zhongshuai (74)
- Effect and Curve Fitting of Morphological Traits to Body Weight Between Male and Female Mantis Shrimp (*Oratosquilla oratoria*) ZHANG Xinming, CHENG Shunfeng (82)
- Study on the Accumulation Specificity of Arsenic in *Portunus trituberculatus* HAN Yaquan, CHEN Bijuan, ZHANG Yan, XIA Bin, TANG Xuexi (92)
- Estimation of Carrying Capacity of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay Based on Spatial and Temporal Distribution of Chlorophyll *a* DONG Shipeng, LIN Fan, JIANG Weiwei, DU Meirong, GAO Yaping, LI Fengxue, HOU Xing, JIANG Zengjie (100)
- Effects of Different pH on Embryo Development and Larval Growth of Bay Scallop (*Argopecten irradians*) LIU Yang, YU Ruihai, ZHANG Zhe, TIAN Chuanyuan, QIAN Jiawen (108)
- Effects of Light Intensity and Temperature on Photosynthetic Adaptability of the Different Stages of *Pyropia yezoensis* Free-Living Conchocelis WEI Jiahui, LI Guoliang, WANG Wenjun, LIANG Zhourui, LU Xiaoping, LIU Fuli, SUN Xiutao, ZHANG Pengyan (115)
- Structure and Analysis of Mitochondrial Sequences of Introduced Russian Red Sea Cucumber ZHAO Qiang, YANG Shuang, LIU Xintian, SUN Guohua, FENG Yanwei, WANG Weijun, YANG Jianmin (125)
- Characterizing Fecundity of Dwarf form of Female Purple Flying Squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) in the South China Sea ZHU Kai, ZHANG Lichuan, XIAO Chuyuan, CHEN Xinjun, LIN Dongming, ZHU Junlei (140)
- Microsatellite Screening and Characterization Analysis of *Sepia esculenta* Based on Full-length Transcriptome Sequencing ZHANG Jinyong, HE Muchun, XIANG Zilong, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng (149)
- Establishment and Application of the LAMP Detection Method for Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) ZOU Ying, GUO Xiaomeng, WAN Xiaoyuan, QIU Liang, ZHANG Qingli (156)
- Genome-Wide Prediction and Analysis of Secreted Proteins of *Enterocytozoon hepatopenaei* NING Zijian, JIANG Hongbo, LIU Qi, BAO Jie (165)
- Isolation and Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Shrimp Culture Ponds and Analysis of its Drug Resistance and Virulence Genes LI Cuiping, ZHAI Qianqian, WANG Xiang, LI Jian (174)
- Effects of Clove Oil on Storage Quality of Crab Cream and Shrimp Sauce CHEN Xiaolei, HU Wang, MA Chaobin, LING Jun, DUAN Guoqing, BAO Kai (181)
- Research Progress on Behavioral Ecology of Reef Fish LI Jiao, GONG Pihai, CHANG Qing, MENG Zhen, GUAN Changtao, LI Jiajia (192)
- Research Progress and Prospects of Parasitic Diseases in Salmon and Trout TANG Jiajia, LI Shiyu, LI Anxing (200)

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李健 LI Jian	李军(美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士瓘 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美国)CHEN Yong
林洪 LIN Hong	岳根华(新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐跑 XU Pao
徐皓 XU Hao	黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 李健 LI Jian 孔杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第41卷 第6期 2020年12月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.41 No.6 Dec. 2020

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 科学出版社
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.ykxjz.cn>
E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕
印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.ykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发行

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986200

1 2 >