

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第44卷 VOL.44 第2期 NO.2



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 44 卷 第 2 期

2023 年 4 月

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

目 次

- 秋季黄海渔业生物多样性及生物量平均温度的时空变化 金 岳 李 娜 金显仕 单秀娟 (1)
- 基于生计渔业调查的黄河口西南侧潮间带渔业生物多样性及其季节变化
..... 张家旭 左 涛 左 明 王安东 王 俊 牛明香 (10)
- 黄河口近岸海域鲎渔业生物学特征研究 张家旭 王 俊 牛明香 左 涛 常 雯 陈瑞盛 (20)
- 不同规格双齿围沙蚕对沉积物氮磷赋存形态影响分析 刘忠航 常志强 袁晟译 李 健 (30)
- 金属编码标签对许氏平鲈放流苗种的标记效果
..... 李 影 徐永江 崔爱君 姜 燕 王 滨 柳学周 田云臣 (40)
- 斑石鲷 *irf7* 基因克隆及其在病毒感染下的表达 宋 煜 李开敏 徐文腾 陈松林 王 磊 (50)
- 红鳍东方鲀 AFP、CIRP、HMGB1 和 YB-1 基因对低温胁迫的响应
..... 刘志峰 马爱军 孙建华 朱理光 包玉龙 张 涛 俞兰良 (58)
- 3 种抗凝剂对大菱鲆血液抗凝效果、血细胞形态和血液生理生化指标的影响
..... 谢 婷 高云涛 李明月 高云红 贾玉东 闫冬春 (68)
- 养殖和野生亚东鲑机体成分比较分析 李 琳 张斐然 刘长琳 刘宝良 李 杰 多吉欧珠
热 旦 德吉措姆 措 姆 卫育良 梁萌青 徐后国 (77)
- 温度渐变和骤变下凡纳滨对虾 *ddit4l* 基因的表达分析
..... 程 琳 李旭鹏 曹宝祥 盖超伟 栾 生 孔 杰 孟宪红 (87)
- 低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下生理生化指标的影响
..... 吴丽娜 吴 彪 刘志鸿 于 涛 孙秀俊 周丽青 郑言鑫 王振原 (98)
- 刺参响应灿烂弧菌侵染差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析
..... 畅孟阳 李 彬 荣小军 王锦锦 于永翔 王印庚 廖梅杰 张 正 范瑞用 刘清兵 (107)
- 基于 MaxEnt 模型和 ArcGIS 对巨藻在我国适生情况的分析
..... 李宝贤 李国梁 姚海芹 申 欣 鲁晓萍 梁洲瑞 刘福利 张朋艳 汪文俊 (118)
- 巨藻中谷胱甘肽 S 转移酶基因对细长聚球藻 PCC7942 耐镉性的影响
..... 顾梓鹏 任玉东 程 芬 张晓雯 徐 东 叶乃好 梁成伟 (127)
- 坛紫菜诱变及 F₁ 代叶状体表型性状分析 张亦弛 王文磊 徐 燕 许 凯 纪德华 陈昌生 谢潮添 (137)
- 干露胁迫对鼠尾藻生理生化影响的研究 袁艳敏 刘福利 梁洲瑞 张朋艳 刘 义 郑言鑫 张海宁 (149)
- 宁夏地区不同模式养殖池塘夏季浮游微藻群落特征
..... 刘锦帆 胡晓娟 曹煜成 许云娜 文国樑 李 力 孙 真 沈 斌 (161)
- 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)易感宿主调查
..... 张 翔 谷 莉 郑玉东 李 晨 白昌明 辛鲁生 王崇明 刘金兰 (174)
- 紫菜腐霉拮抗菌的筛选和鉴定 翁佩文 杨慧超 李 杰 张文彬 阎永伟 莫照兰 (186)
- 稻田和池塘养殖禾花鲤肌肉营养与品质分析
..... 孙文波 周明瑞 侯梦丹 文露婷 杜雪松 翟旭亮 李 虹 林 勇 罗 辉 (196)
- 食盐添加对乌鳢鱼头汤熬煮过程营养物质溶出与微纳颗粒稳定性的影响 苏 丽 李 欣 高瑞昌 (205)
- 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长性能及肌肉品质的影响
..... 莫翠琴 黄 凯 曹鑫盛 江林源 于 凯 郭睿婕 王超男 (214)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.44 No.2 April 2023

Spatiotemporal Variation of Biodiversity and Mean Temperature of the Biomass of Fishery Resources in the Yellow Sea in Fall	JIN Yue, LI Na, JIN Xianshi, SHAN Xiujuan	(1)
Seasonal Biodiversity of Fishery Resources by Set Net in the Intertidal Zone to the Southwest of the Yellow River Estuary	ZHANG Jiayu, ZUO Tao, ZUO Ming, WANG Andong, WANG Jun, NIU Mingxiang	(10)
Biological Characteristics of <i>Liza haematocheila</i> in the Shallow Coastal Waters of the Yellow River Estuary	ZHANG Jiayu, WANG Jun, NIU Mingxiang, ZUO Tao, CHANG Wen, CHEN Ruisheng	(20)
Analysis of Influence of Different Sizes of <i>Perinereis aibuhitensis</i> on the Occurrence Form of Nitrogen and Phosphorus in Sediments	LIU Zhonghang, CHANG Zhiqiang, YUAN Shengyi, LI Jian	(30)
Marking Effect of Coded Wire Tag on Released Juveniles of Black Rockfish (<i>Sebastes schlegelii</i>)	LI Ying, XU Yongjiang, CUI Aijun, JIANG Yan, WANG Bin, LIU Xuezhou, TIAN Yunchen	(40)
Cloning and Expression of <i>irf7</i> Gene in Spotted Knifejaw (<i>Oplegnathus punctatus</i>) Under Virus Infection	SONG Yu, LI Kaimin, XU Wenteng, CHEN Songlin, WANG Lei	(50)
Response of AFP, CIRP, HMGB1 and YB-1 Gene of <i>Takifugu rubripes</i> to Low-Temperature Stress	LIU Zhifeng, MA Aijun, SUN Jianhua, ZHU Liguang, BAO Yulong, ZHANG Tao, YU Lanliang	(58)
Effects of Three Different Anticoagulants on Blood Cell Morphology, Anticoagulation, and Hematological Parameters in Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	XIE Ting, GAO Yuntao, LI Mingyue, GAO Yunhong, JIA Yudong, YAN Dongchun	(68)
Composition Analysis of Farmed and Wild Yadong Trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	LI Lin, ZHANG Feiran, LIU Changlin, LIU Baoliang, LI Jie, DUOJI Ouzhu, RE Dan, DEJI Cuomu, CUO Mu, WEI Yuliang, LIANG Mengqing, XU Houguo	(77)
Expression Analysis of the <i>ddit4l</i> Gene in <i>Litopenaeus vannamei</i> Under Sudden and Gradual Change of Temperature	CHENG Lin, LI Xupeng, CAO Baoxiang, GAI Chaowei, LUAN Sheng, KONG Jie, MENG Xianhong	(87)
Effects of Hypoxic Preconditioning on the Physiological and Biochemical Characteristics of <i>Scapharca broughtonii</i> under Hypoxia Stress	WU Li'na, WU Biao, LIU Zhihong, YU Tao, SUN Xiujun, ZHOU Liqing, ZHENG Yanxin, WANG Zhenyuan	(98)
Identification of Differential Expression microRNAs and Target Genes Analysis of Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>) in Response to <i>Vibrio splendidus</i> Infection	CHANG Mengyang, LI Bin, RONG Xiaojun, WANG Jinjin, YU Yongxiang, WANG Yingeng, LIAO Meijie, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong, LIU Qingbing	(107)
Potential Geographic Distribution of <i>Macrocystis pyrifera</i> in China Based on MaxEnt Model and ArcGIS	LI Baoxian, LI Guoliang, YAO Haiqin, SHEN Xin, LU Xiaoping, LIANG Zhourui, LIU Fuli, ZHANG Pengyan, WANG Wenjun	(118)
Effects of the Glutathione S-Transferase Gene Extracted from Giant Kelp (<i>Macrocystis pyrifera</i>) on the Cadmium Tolerance of <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	GU Zipeng, REN Yudong, CHENG Fen, ZHANG Xiaowen, XU Dong, YE Naihao, LIANG Chengwei	(127)
Mutagenesis and Blade Phenotypic Traits of <i>Neoporphyra haitanensis</i> F ₁ Lines	ZHANG Yichi, WANG Wenlei, XU Yan, XU Kai, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian	(137)
Study on the Physiological and Biochemical Influence of <i>Sargassum thunbergii</i> Under Dehydration	YUAN Yanmin, LIU Fuli, LIANG Zhourui, ZHANG Pengyan, LIU Yi, ZHENG Yanxin, ZHANG Haining	(149)
Community Characteristics of Planktonic Microalgae in Aquaculture Ponds of Different Modes in Ningxia in Summer	LIU Jinfan, HU Xiaojuan, CAO Yucheng, XU Yunna, WEN Guoliang, LI Li, SUN Zhen, SHEN Bin	(161)
Survey of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) Susceptible Hosts Based on <i>in situ</i> LAMP Technique	ZHANG Xiang, GU Li, ZHENG Yudong, LI Chen, BAI Changming, XIN Lusheng, WANG Chongming, LIU Jinlan	(174)
Screening and Identification of Antagonistic Bacteria Against <i>Pythium</i> Causing Red Rot Disease in <i>Neopyropia</i>	WENG Peiwen, YANG Huichao, LI Jie, ZHANG Wenbin, YAN Yongwei, MO Zhaolan	(186)
Comparing the Effects of Pond and Rice Field Culture Methods on Muscle Quality of Rice Flower Carp	SUN Wenbo, ZHOU Mingrui, HOU Mengdan, WEN Luting, DU Xuesong, ZHAI Xuliang, LI Hong, LIN Yong, LUO Hui	(196)
Effect of the Time of NaCl Addition on Nutrient Migration and Micro and Nanoparticles of <i>Channa argus</i> Head Soup	SU Li, LI Xin, GAO Ruichang	(205)
Effects of Dietary Lipid Levels on Growth Performance and Muscle Quality of Juvenile <i>Procambarus clarkii</i>	MO Cuiqin, HUANG Kai, CAO Xinsheng, JIANG Linyuan, YU Kai, GUO Ruijie, WANG Chaonan	(214)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210926001

http://www.yykxjz.cn/

金岳, 李娜, 金显仕, 单秀娟. 秋季黄海渔业生物多样性及生物量平均温度的时空变化. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 01-09
JIN Y, LI N, JIN X S, SHAN X J. Spatiotemporal variation of biodiversity and mean temperature of the biomass of fishery resources in the Yellow Sea in fall. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 01-09

秋季黄海渔业生物多样性及生物量 平均温度的时空变化*



金 岳^{1,2,3} 李 娜^{1,2,3} 金显仕^{1,2,3} 单秀娟^{1,2,3①}

(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 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 山东长岛近海渔业资源国家野外科学观测研究站 山东 烟台 265800)

摘要 全球变暖等气候变化使渔业资源有向两极移动的趋势,导致渔业生物多样性的变化和生物量随纬度的变化,后者表现为生物量平均温度(mean temperature of the biomass, MTB)的改变。为充分了解黄海渔业资源多样性、生物量及 MTB 的长期时空动态,本研究基于 2000、2009 和 2018 年每年秋季(10 月)底拖网调查数据,选择生物量占比超过 0.05% 的种类作为黄海渔业资源的表征种类,结合海表面温度(sea surface temperature, SST)遥感数据,对黄海鱼类、甲壳类和头足类等重要渔业生物的多样性时空分布及其与 SST 的关系,生物量及 MTB 的时空分布进行分析。结果显示,2000、2009 和 2018 年的表征种类分别为 39、37 和 46 种。2009 年丰度的绝对优势种占比最高,而 2000 年丰度的绝对优势种占比最低。生物量占比方面,鱼类各年份占比均高于 70%,呈先下降后上升的趋势,甲壳类占比由 11.45% 增至 25% 以上,头足类占比最小(<1%)且不断下降。在生物多样性指数时空分布方面, Berger-Parker 指数和 Shannon-Wiener 多样性指数的空间分布趋势相反,且未发现经向或纬向的变化趋势; Margalef 丰富度指数高值区主要分布在黄海南部海域。SST 与生物多样性指数间无显著线性关系($P>0.05$)。MTB 呈西南高、东北低的趋势,且在 34°N 附近变化明显,黄海深水区低于近岸; MTB 最小值出现在黄海北部,最大值出现在调查海域南端。

关键词 黄海; 渔业生物; 多样性; 时空分布; 生物量平均温度

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0001-09

黄海是我国的重要渔场,主要渔业经济种类约有 50 余种,年产量超过万吨的鱼类 14 种、甲壳类 5 种、头足类 4 种(李晓炜等, 2018)。充分了解黄海渔业资源多样性和生物量时空变动趋势,是黄海渔业资源可持续利用的重要前提,也是实现黄海渔业资源适应性管理的重要一环。目前,学者们对黄海渔业资源生物

多样性指数有大量研究(吴强等, 2012、2015; 单秀娟等, 2013、2014; 逢志伟等, 2015),但对其时空分布鲜有报道。对于渔业种类,气候变化可能导致高纬度海域渔获量的增加和热带海域渔获量的减少(尤其太平洋)(Cheung *et al*, 2010),而全球变暖则是主导因素(Cheung *et al*, 2013)。因此,通过建立渔获量平均温

* 国家自然科学基金项目(31872692)、山东省泰山学者专项(TSDN202103135)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD01)共同资助。金 岳, E-mail: jinyue@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2021-09-26, 收修改稿日期: 2021-11-22

度(mean temperature of the catch, MTC)指数,可反映全球变暖对渔获量时空分布的影响。Cheung 等(2013)利用 MTC 分析发现,全球尺度海洋渔业渔获物组成的变化与海水温度息息相关,高纬度海域温水种渔获量的主导地位提高,热带海域亚热带种类的渔获量比例下降。在中国海(Liang *et al.*, 2018)和地中海(Tsikliras *et al.*, 2014)等中尺度海域也有类似的发现,而对于 MTC 是否能反映黄海小尺度海域中渔获量与海水温度的关系却鲜有报道。为此,需深入研究海水温度升高对黄海渔业生物量时空分布的影响。本研究利用 2000、2009 和 2018 年每年秋季(10 月)渔业资源调查数据,结合海表面温度(sea surface temperature, SST)遥感数据,对黄海渔业种类组成、生物多样性时空分布及其与 SST 的关系,生物量时空分布和生物量平均温度(mean temperature of the biomass, MTB)的时空分布进行分析,以期对黄海渔业资源可持续利用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 数据来源

数据来自“北斗号”调查船于 2000、2009 和 2018 年每年秋季(10 月)在黄海进行的渔业资源底拖网调查。底拖网网口高度为 6.1~8.3 m,网口宽度约为 25 m,囊网网目为 24 mm,平均拖速为 3.0 kn,拖网时间约为 1 h,现场对种类进行鉴定,资源密度标准化为单位时间丰度(ind./h)或生物量(kg/h)。为确保数据的年间可比较性,每年分别在相同渔区进行渔业资源调查,3 年累计调查 117 个站位,每年各 39 个站位。将各调查站位栅格化为 0.5°×0.5°的研究单元,得到各年份相同的单元格数量及位置。选取生物量占比超过 0.05% 的鱼类、甲壳类和头足类作为黄海渔业种群空间分布格局的表征种类。

考虑到 SST 是目前最易获取的海洋环境参数,且已证明对渔业生物量有重要影响(Cheung *et al.*, 2010、2013),本研究利用 SST 分析并验证其对黄海渔业生物多样性研究的可行性。各年月平均 SST 来自 <https://oceanwatch.pifsc.noaa.gov/>,空间分辨率为 0.04°×0.04°,为匹配调查数据,将 SST 的空间分辨率网格化为 0.5°×0.5°。

1.2 数据分析

1.2.1 生物多样性指数 Margalef 指数是用来衡量物种丰富度的指数。Shannon-Wiener 多样性指数是评价生物群落物种多样性的重要指标,其同时考虑了物种丰富度和均匀度 2 个维度,是应用最广泛的生物

多样性指数。Berger-Parker 指数受物种丰富度和均匀度的影响,物种丰富度越高且各种类丰度相同时,Berger-Parker 指数越大(Jørgensen *et al.*, 2008)。

Berger-Parker 指数和 Margalef 指数对物种丰富度的变化非常敏感,对群落多样性变化的区分能力较强,与 Shannon-Wiener 指数有互补性,可结合使用。本研究选择上述 3 种指数,分别计算各单元格渔业生物种类数,并根据种类数和丰度计算多样性指数,公式如下(Margalef, 1958; Wilhm, 1968; Berger *et al.*, 1970):

$$\text{Margalef 丰富度指数 } D = (S - 1) \ln N$$

$$\text{Shannon-Wiener 多样性指数 } H' = - \sum_{i=1}^S (P_i \ln P_i)$$

$$\text{Berger-Parker 指数 } D' = N_{\max} / N$$

式中, S 为种类数; N 为总个体数; $P_i = \frac{n_i}{N}$ 为种类 i 占总个体数的比例; N_{\max} 是单元格中优势种的个体数。

物种累积曲线用于描述不同站点数量情况下物种丰富度状况,记录连续站点调查时新物种出现速率,是分析物种组成和预测物种丰富度的有效工具。通常,在开始时,随着站点数量的不断增加,大量物种被发现,物种累积曲线急剧上升;随后,站点数量达到一定水平,物种累积速率下降,曲线趋于平缓。因此,可通过物种累积曲线判断站点数量是否充足,曲线急剧上升,说明站点数量不足,需要增加调查站位;反之,表明站点数量充足,可以进行数据分析(Ugland *et al.*, 2003; 孙志强等, 2012)。

Rényi 多样性曲线可提供丰富度和均匀度信息,并按顺序对多样性排序,是常用且重要的多样性排序技术之一,但该曲线不再提供各物种的比例信息,计算公式如下(Kindt *et al.*, 2005):

$$H_\alpha = \frac{\ln \left(\sum_{i=1}^S p_i^\alpha \right)}{1 - \alpha}$$

式中, H_α 为 Rényi 多样性曲线取值; S 为种类数; p_i 为种类 i 占总物种数的比例; α 为尺度参数,由 0、0.25、0.5、1、2、4、8 和 ∞ 组成。 α 取值为 0 和 ∞ 时,分别对应物种丰富度和优势种比例。

1.2.2 生物量平均温度 随着全球变暖,渔业生物的空间分布会随之改变,主要表现为高纬度渔获量增加和低纬度渔获量的减少(Cheung *et al.*, 2010)。SST 作为反映全球变暖的重要参数,可结合渔获量建立 MTC 指数,进而解析全球变暖对渔获量时空分布的影响(Cheung *et al.*, 2013),目前, MTC 指数已被应用到中国海(Liang *et al.*, 2018)和地中海(Tsikliras *et al.*,

2014)的渔业研究中。本研究以渔业资源调查的生物量代替渔业生产中的渔获量计算 MTB, 它是根据各种类秋季平均偏好温度和每年秋季生物量计算, 最终得出各站位的 MTB 值。

$$MTB_j = \frac{\sum_i^n T_i B_{ij}}{\sum_i^n B_{ij}}$$

式中, B_{ij} 为种类 i 在年份 j 的生物量; T_i 为种类 i 的平均偏好温度, 是各种类出现站位 SST (2000、2009 和 2018 年) 的平均值; n 为种类数。

1.2.3 数据处理 数据处理和图形绘制均由 R 语言完成。生物多样性指数由“BiodiversityR”程序包中的“diversityresult”函数计算; 多样性曲线由“BiodiversityR”程序包中的“renyicomp”和“renyicomp.long”函数完成; 物种累积曲线由“BiodiversityR”程序包中的“accumcomp”函数完成(Kindt *et al.*, 2005)。环境因子与种类数和多样性指数之间的线性回归分析由基础程序包中的“lm”函数完成(R Core Team,

2021)。绘图由“ggplot2”程序包完成(Wickham, 2016)。

2 结果

2.1 种类组成

对调查种类进行筛选后, 发现 2000 年的表征种类共 39 种(鱼类 32 种、甲壳类 6 种、头足类 1 种), 2009 年的表征种类共 37 种(鱼类 27 种、甲壳类 9 种、头足类 1 种), 2018 年的表征种类共 46 种(鱼类 32 种、甲壳类 13 种、头足类 1 种)。根据物种数的时空分布发现(图 1), 黄海南部鱼类种数高于黄海北部, 且在 $33^{\circ}\sim 34^{\circ}\text{N}$ 附近鱼类种数最多; 34°N 以南甲壳类种数较多, 2018 年甲壳类种数最多、2000 年最低; 各年份仅发现太平洋褶柔鱼(*Todarodes pacificus*) 1 种头足类的生物量大于总生物量的 0.05%。总体看来, 2018 年物种数最多, 鱼类是影响物种数分布的主要因素; 除头足类外, 各类别均存在种类数随年份向北增多的趋势(图 1 和图 2)。根据物种累积曲线, 物种累积速率在站位数达到 20 时已十分缓慢, 因此, 各年份需随机选择约 20 个站位即可表征黄海种类数(图 2)。

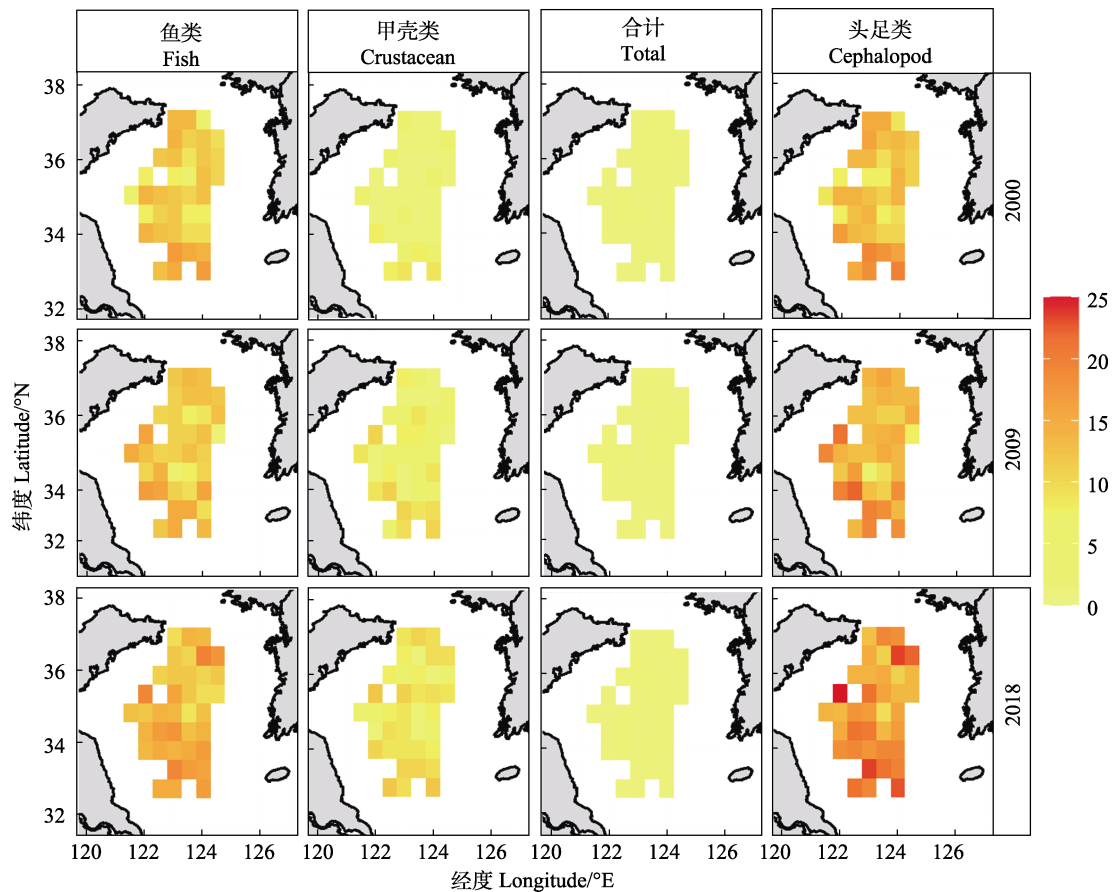


图 1 秋季黄海渔业生物物种丰富度(种类数)时空分布

Fig. 1 Spatiotemporal distribution of species richness (number) for fishery resources in the Yellow Sea in fall

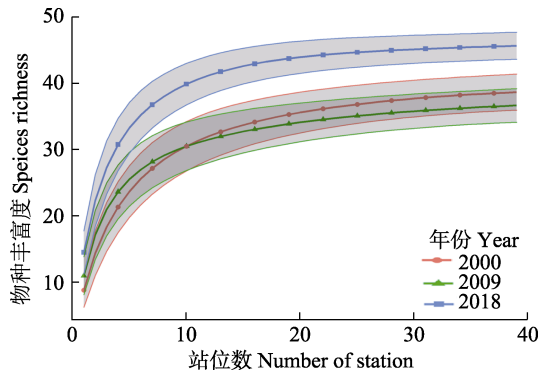


图2 秋季黄海渔业生物物种累积曲线年间变化
Fig.2 Species accumulation curve of fishery resources in the Yellow Sea in fall

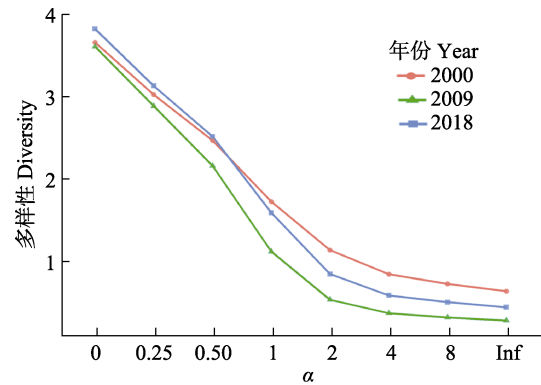


图3 秋季黄海渔业生物 Rényi 多样性曲线
Fig.3 Rényi diversity profile in the Yellow Sea in fall

2.2 Rényi 多样性曲线

Rényi 多样性曲线在 2000、2009 和 2018 年均呈现由左向右下降的趋势,表明黄海各种类并非均匀分布。与 2000 和 2018 年相比,2009 年具有较低的多样性,即具有较低的丰富度和均匀度;而 2000 和 2018 年存在交叉,因此,无法从该轮廓中比较 2 个年份的多样性(图 3)。根据 $\alpha=0$ 时的多样性,2000—2009 年间物种数量下降,随后在 2018 年逐渐增加;根据 $\alpha=\infty$ 时的多样性,2009 年绝对优势种占比最高,而 2000 年绝对优势种占比最低,优势种比例越高则均匀度越低。

2.3 生物量及生物多样性指数分布

各年份表征黄海渔业生物总生物量的空间分布存在较大差异(图 4),2000 年高生物量站位占比最低,仅占 1/3,主要分布在 $35^{\circ}\sim 37^{\circ}\text{N}$;2009 和 2018 年高生物量站位占比约为 1/2,分布相对均匀。从生物量占比看,各年份鱼类占比均高于 70%,总体呈先下降后上升的趋势,甲壳类占比从 2000 年的 11.45%增至 2009 和 2018 年的 25%以上,头足类占比最小($<1\%$)且在不断下降(表 1)。

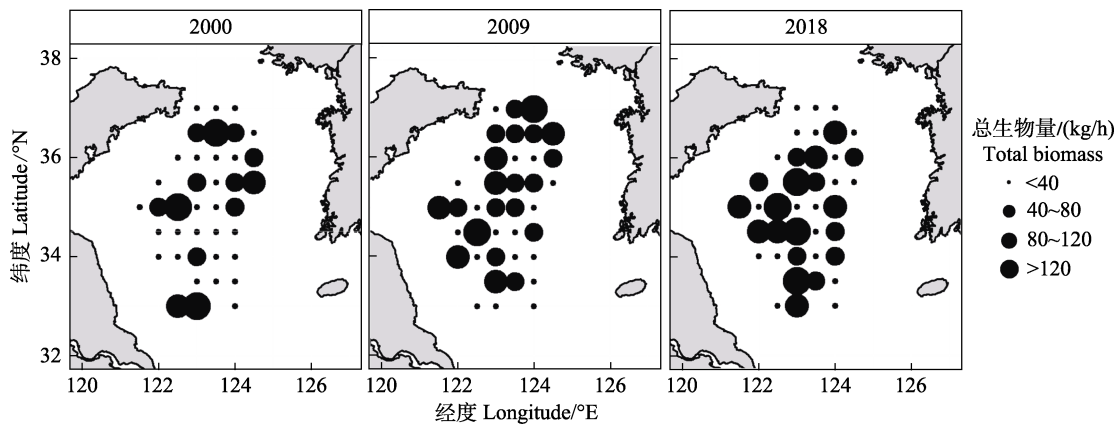


图4 秋季黄海渔业生物总生物量时空分布
Fig.4 Spatiotemporal distribution of total biomass for fishery resources in the Yellow Sea in fall

表 1 秋季黄海各类型渔业资源生物量占比

Tab.1 Biomass proportion of different type of fishery resources in the Yellow Sea in fall

年 Year	鱼类 Fish/%	甲壳类 Crustacean/%	头足类 Cephalopod/%
2000	87.83	11.45	0.72
2009	70.61	29.09	0.31
2018	74.06	25.84	0.10

不同生物多样性指数的空间分布有较大差异,同一多样性指数的空间分布也有年间差异(图 5)。相同年份的 Berger-Parker 指数和 Shannon-Wiener 多样性指数的空间分布趋势相反,即 Berger-Parker 指数高值区的 Shannon-Wiener 多样性指数较低,Shannon-Wiener 多样性指数的高值区主要分布于黄海南部, Berger-Parker 指数高值区主要分布于黄海中南部。Margalef

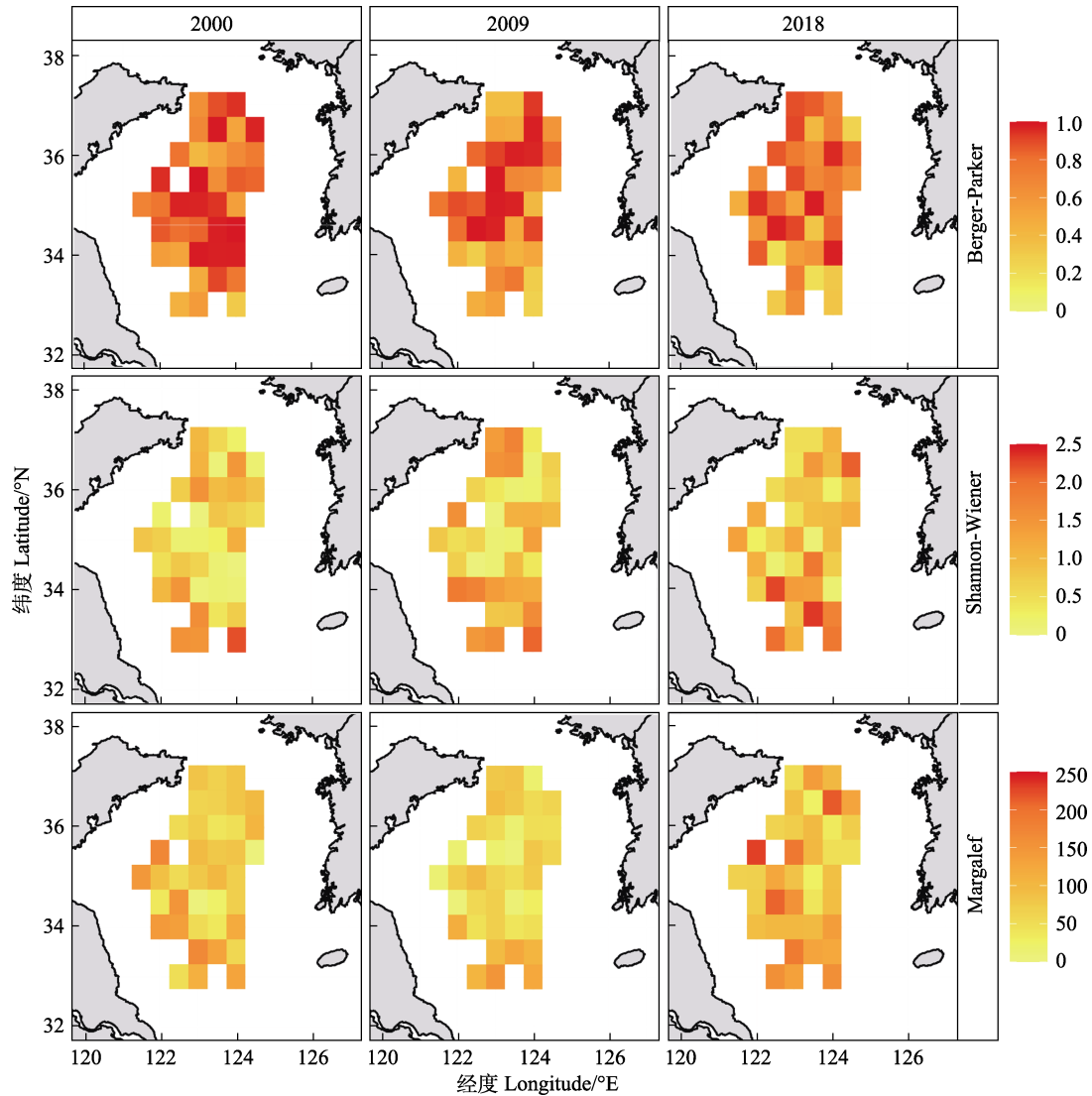


图 5 秋季黄海渔业生物多样性指数时空分布

Fig.5 Spatiotemporal distribution of biodiversity for fishery resources in the Yellow Sea in fall

丰富度指数高值区则主要分布在黄海南部。对于不同年份的同一多样性指数, 与其他年份相比, 2018 年的 Berger-Parker 指数减小, 而 Margalef 丰富度指数和 Shannon-Wiener 多样性指数则增大。

2.4 多样性指数与 SST 的关系

SST 与所有生物多样性指数均不存在显著的线性关系($P>0.05$), 且 r^2 均极小, 即二者的线性关系相对较弱。SST 与种类数、Margalef 丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数呈弱正相关, 而与 Berger-Parker 指数则呈弱负相关(表 2)。

2.5 生物量平均温度(MTB)

MTB 总体呈现西南高、东北低的趋势, 且在 34°N 附近变化明显; 深水区 MTB 低于近岸; MTB 最小值出现在黄海北部, 最大值出现在调查海域南端(图 6)。

表 2 秋季黄海海表面温度与生物多样性指数线性回归分析

Tab.2 Linear regression analysis between SST and biodiversity index in the Yellow Sea in fall

多样性指数 Diversity index	<i>a</i>	<i>b</i>	r^2	<i>P</i>
Shannon-Weiner	-0.66	0.07	0.008 9	0.313
Berger-Parker	1.32	-0.03	0.009 4	0.299
Margalef	-41.77	6.04	0.009 3	0.302
Richness	5.50	0.30	0.002 0	0.629

3 讨论

3.1 种类组成及生物量的年间比较

通过筛选生物量占比超过 0.05% 的种类作为黄海渔业的表征种类, 发现在 2000—2018 年间, 鱼类表征种类减少 5 种后又恢复至原有数目, 甲壳类增加

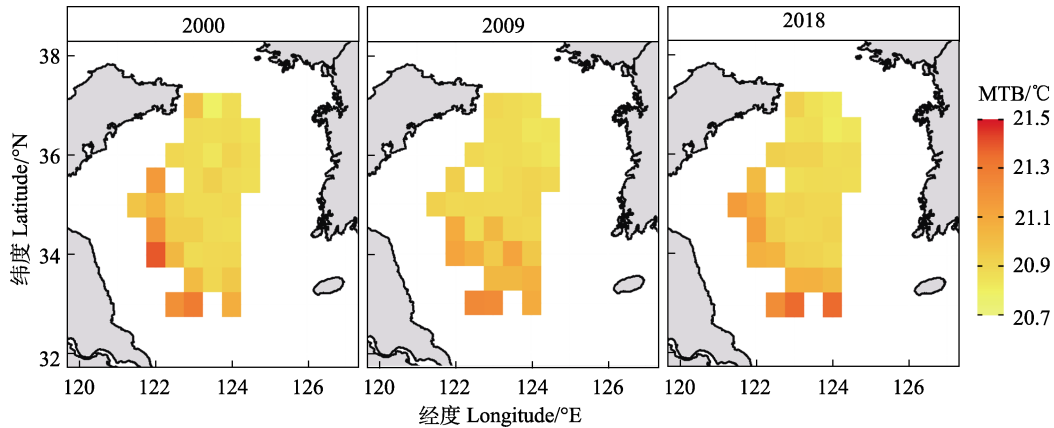


图6 秋季黄海生物量平均温度(MTB)时空分布

Fig.6 Spatiotemporal distribution of mean temperature of the biomass in the Yellow Sea in fall

7种,头足类1种保持不变。苏程程等(2021)对1985—2018年黄海鱼类种群研究发现,2018年鱼类种类数为历年最多,鱼类优势种生物量占比呈先增大后减小的趋势(1985、2001、2009和2018年分别为30.35%、72.72%、80.39%和53.99%)。本研究发现,鱼类生物量占比减少,而甲壳类生物量占比增加(表1)。Wu等(2019)对1985—2014年10月的黄海渔业资源生物量分析发现,种类组成存在2个阶段的变化:第1阶段为1958—2000年,优势种类由底层高价值种类向中上层低价值种类转变;第2阶段为2000—2014年,优势种类由中上层低价值种类向底层低价值种类转变。此外,无脊椎动物尤其是甲壳类的优势度也逐渐凸显(Wu *et al.*, 2019),这与本研究结果一致。

2018年表征种类数最多(46种),可能因为优势种类生物量下降,使得其他种类优势度得以凸显,低纬度种类向北移动并占据一定的生态位。尽管不同年份生物量绝对优势种均为细纹狮子鱼(*Liparis tanakae*),但其生物量占比有较大差异:2000年占27.00%,2009年占37.85%,2018年占22.82%。

3.2 生物多样性及其与SST的关系

物种累积曲线中,决定物种丰富度的因素之一为样本大小,即站位数(Kindt *et al.*, 2005)。为此,本研究选择相同站位进行了年代际调查,各年份分别选择39个站位,共117个站位。

对于Rényi多样性曲线,它可以提供物种丰富度和均匀度信息,并对多样性排序。若该轮廓中的曲线为一条水平直线,表明各种类均匀度相同,曲线越陡说明均匀度越低(Kindt *et al.*, 2005),结合多样性指数的空间分布结果(图3和图5),发现本研究中各种类空间分布差异较大。根据 $\alpha=0$ 时的纵坐标值,可计算出各子数据集的物种数,即纵坐标的自然指数。根据

$\alpha=\infty$ 时的纵坐标值,可计算出丰度的绝对优势种比例,即为纵坐标自然指数的倒数。在本研究筛选的表征种中,脊腹褐虾(*Crangon affinis*)的丰度在各年份中均占绝对优势,其中,2000年占53.25%,2009年占75.40%,2018年占63.81%。

对于生物多样性指数的空间分布,本研究发现,Berger-Parker指数和Shannon-Wiener多样性指数的空间分布趋势相反,这与前人发现的二者呈显著负相关($r=-0.808$, $P<0.01$)的结果一致(苏宇乔等, 2017)。本研究中,与2000和2009年相比,2018年Berger-Parker指数减小, Margalef丰富度指数、Shannon-Wiener多样性指数增大,这与2018年物种数的骤增、生物量优势种及丰度优势种占比的骤减有关。由此看出,当一定区域内优势种的占比下降时,其物种数和生物多样性会增加。

多样性指数与SST的线性关系相对较弱,这与采样方式和范围有较大关系。本研究利用底拖网进行调查,主要采集底层动物,物种数对SST的变化不敏感,且采样纬度范围仅跨越4°,SST并不存在较大差异。对于黄海的底栖动物,可按照适宜栖息温度将其划分为冷水种、狭温性暖水种和广温性暖水种;在近岸海域,分布着广温性暖水种;在水深>40m或50m的深水区,分布着大量冷水种,分布范围向南一般不超过33°N(刘瑞玉等, 1963)。在黄海,冷温性和广温性种类居多,加之SST跨度较小,是多样性指数与SST线性关系较弱的主要原因。因此,今后应加强生物多样性与底层环境因子关系的研究。

3.3 生物量平均温度(MTB)的时空分布

高纬度海域的MTB低于低纬度海域(图6),这可能是由于海水温度升高、海平面上升、溶解氧下降和海洋酸化等气候变化在不断影响着海洋生态系统,导

致生物多样性、时空分布格局和栖息环境等均发生了不同程度的改变(单秀娟等, 2016、2017)。调查海域东北部是黄海冷水团的主要分布区, 水温较低, 是黄海冷温性海洋生物较为适宜的栖息地, 而沿海区域因水深较浅, 受光照、潮汐等影响, 水温较高, 这是MTB西南高、东北低的主要原因。受全球变暖的影响, 渔业资源生物量也会受“热带化”的影响, 表现为非热带海域暖水种优势度增加(Perry *et al.*, 2005; Wernberg *et al.*, 2013)。Cheung等(2013)发现, 高纬度海域温水种渔获量的主导地位提高, 热带海域亚热带种类的渔获量比例下降。在中国海(Liang *et al.*, 2018)和地中海(Tsikliras *et al.*, 2014)等区域性海域也有类似的发现。本研究中, 虽然渔业生物种类数随时间有向北增加的趋势(图1), 但并未在渔业生物的生物量和生物量平均温度方面发现这一趋势(图4和图6), 这可能与本研究海域尺度较小、海水温度变化不明显有关。

参 考 文 献

- BERGER W H, PARKER F L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Science*, 1970, 168: 1345–1347
- CHEUNG W W L, LAM V W Y, SARMIENTO J L, *et al.* Large-scale redistribution of maximum fisheries catch potential in the global ocean under climate change. *Global Change Biology*, 2010, 16(1): 24–35.
- CHEUNG W W L, WATSON R, PAULY D. Signature of ocean warming in global fisheries catch. *Nature*, 2013, 497(7449): 365–368
- JØRGENSEN, S E, FATH, B D. *Encyclopedia of ecology*. Elsevier Science, 2008
- KINDT R, COE R. Tree diversity analysis: A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi (Kenya). 2005, ISBN 92-9059-179-X, <http://www.worldagroforestry.org/output/tree-diversity-analysis>
- LI X W, ZHAO J M, LIU H, *et al.* Status, problems and optimized management of spawning, feeding, overwintering grounds and migration route of marine fishery resources in Bohai Sea and Yellow Sea. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(5): 147–157 [李晓炜, 赵建民, 刘辉, 等. 渤海渔业资源三场一通道现状、问题及优化管理政策. 海洋湖沼通报, 2018(5): 147–157]
- LIANG C, XIAN W W, PAULY D. Impacts of ocean warming on China's fisheries catches: An application of “mean temperature of the catch” concept. *Frontiers in Marine Science*, 2018, 5: 00026
- LIU R Y, XU F S. Preliminary studies on the benthic fauna of the Yellow Sea and the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1963, 5(4): 306–321 [刘瑞玉, 徐凤山. 黄、东海底栖动物区系的特点. 海洋与湖沼, 1963, 5(4): 306–321]
- MARGALEF R. Information theory in ecology. *General System*, 1958, 3: 36–71
- PANG Z W, LI X S, YING Y P, *et al.* Shrimp community structure and its relationships with environmental factors in the Yellow Sea in summer. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(11): 3509–3515 [逢志伟, 李显森, 应一平, 等. 黄海夏季虾类群落结构及其与环境因子的关系. 应用生态学报, 2015, 26(11): 3509–3515]
- PERRY A L, LOW P J, ELLIS J R, *et al.* Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, 2005, 308(5730): 1912–1915
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. <https://www.R-project.org/>
- SHAN X J, CHEN Y L, DAI F Q, *et al.* Variations in fish community structure 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]
- SHAN X J, CHEN Y L, JIN X S, *et al.* Reshaping the distribution of fish abundance by climate change: A case study in the Yangtze River Estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 1–15 [单秀娟, 陈云龙, 金显仕, 等. 气候变化对长江口鱼类资源密度分布的重塑作用. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 1–15]
- SHAN X J, CHEN Y L, JIN X S. Projecting fishery ecosystem health under climate change scenarios: Yangtze River Estuary and Yellow River Estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 1–7 [单秀娟, 陈云龙, 金显仕. 气候变化对长江口和黄河口渔业生态系统健康的潜在影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 1–7]
- SHAN X J, SUN P F, JIN X S, *et al.* Seasonal variations of fishery resource structure in the sections of the southern Yellow Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 425–435 [单秀娟, 孙鹏飞, 金显仕, 等. 黄海典型断面渔业资源结构的季节变化. 水产学报, 2013, 37(3): 425–435]
- SU C C, SHAN X J, YANG T, *et al.* Interdecadal changes in keystone species of fish community during autumn in the Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 1–14 [苏程程, 单秀娟, 杨涛, 等. 黄海秋季鱼类群落关键种的年代际变化. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 1–14]
- SU Y Q, ZHANG Y, JIA X R, *et al.* Application of several diversity indexes in forest community analysis. *Ecological Science*, 2017, 36(1): 132–138 [苏宇乔, 张毅, 贾小容, 等. 几种多样性指标在森林群落分析中的应用比较. 生态科学, 2017, 36(1): 132–138]
- SUN Z Q, ZHU Y P, ZHANG X Y, *et al.* Assessment of shrub and herb diversity ordering by Rényi diversity profiles for Kunyushan Forest Reserve. *Journal of Nanjing Forestry*

- University (Natural Science Edition), 2012, 36(1): 73–78 [孙志强, 朱彦鹏, 张星耀, 等. 采用 Rényi 多样性曲线法评价昆嵛山林下灌草层多样性排序效果. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(1): 73–78]
- TSIKLIRAS A C, STERGIU K I. Mean temperature of the catch increases quickly in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 2014, 515: 281–284
- UGLAND K I, GRAY J S, ELLINGSEN K E. The species-accumulation curve and estimation of species richness. *Journal of Animal Ecology*, 2003, 72(5): 888–897
- WERNBERG T, SMALE D A, TUYA F, *et al.* An extreme climatic event alters marine ecosystem structure in a global biodiversity hotspot. *Nature Climate Change*, 2013, 3(1): 78–82
- WICKHAM H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. New York: Springer-Verlag, 2016
- WILHM J L. Use of biomass units in Shannon's formula. *Ecology*, 1968, 49(1): 153–156
- WU Q, WANG J, LI Z Y, *et al.* Spatial variation of crustacean community structure in Yellow Sea and Bohai Sea in spring. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(11): 1685–1693 [吴强, 王俊, 李忠义, 等. 黄渤海春季甲壳类群落结构的空问变化. 水产学报, 2012, (11): 1685–1693]
- WU Q, WANG J, LI Z Y, *et al.* The community structure and biodiversity of Cephalopoda in central and southern Yellow Sea. *Marine Sciences*, 2015, (8): 16–23 [吴强, 王俊, 李忠义, 等. 黄海中南部头足类的群落结构与生物多样性. 海洋科学, 2015, (8): 16–23]
- WU Q, YING Y P, TANG Q S. Changing states of the food resources in the Yellow Sea large marine ecosystem under multiple stressors. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2019, 163: 29–32

(编辑 马璀艳)

Spatiotemporal Variation of Biodiversity and Mean Temperature of the Biomass of Fishery Resources in the Yellow Sea in Fall

JIN Yue^{1,2,3}, LI Na^{1,2,3}, JIN Xianshi^{1,2,3}, SHAN Xiujuan^{1,2,3}①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Laoshan Laboratory, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Shandong Changdao Fishery Resources National Observation and Research Station, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract Due to climate change, the biomass and biodiversity of fishery resources are increasing at higher latitudes and decreasing at lower latitudes (reflected by the mean temperature of the biomass, MTB). Studies have shown that the change in catch composition of marine fisheries at the global scale is largely related to seawater temperature. It remains important to accurately analyze biodiversity and biomass distribution to inform the sustainable utilization and adaptive management of fishery resources. To evaluate the long-term spatiotemporal dynamics of biodiversity and MTB of fishery resources in the Yellow Sea, we selected species that account for more than 0.05% of the total biomass as representative species based on scientific bottom trawling data in autumn (October) of 2000, 2009, and 2018. A total of 117 stations (39 stations each year) were surveyed by R/V Beidou. Considering that sea surface temperature (SST) is the most accessible oceanographic variable and has been shown to affect marine biomass, the impact of SST on the biodiversity of benthic fisheries in the Yellow Sea was analyzed. Therefore, the spatiotemporal distribution of fish, crustaceans, and cephalopods, their relationship with SST, and the spatiotemporal distribution of biomass and MTB were analyzed. The Shannon-Wiener, Berger-Parker, and Margalef biodiversity indices were used to evaluate distribution changes. Location-related data were matched at the same resolution (0.5°×0.5°)

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

for further analysis. Data processing and plotting were performed using R. The results showed that 39 species in 2000, 37 species in 2009, and 46 species in 2018 were representative of the total biomass collected by bottom trawling. The increase in diversity observed in 2018 may have resulted from a decrease in the abundance of dominant species. Although *Liparis tanakae* was dominant between years, there were significant differences in biomass proportions: 27.00% in 2000, 37.85% in 2009, and 22.82% in 2018. Fish showed the highest richness around 33°~34°N, and that of the southern Yellow Sea was higher than the northern Yellow Sea; crustaceans showed higher richness south of 34°N, and gradually increased from 2000 to 2018. For cephalopods, Japanese flying squid (*Todarodes pacificus*) was the only species occupying more than 0.05% of the total biomass. Except for cephalopods, the richness of all categories increased northward. According to the species accumulation curve, approximately 20 random stations were needed to represent Yellow Sea species richness. The Rényi profile further verified that 1) species were not evenly distributed, 2) species richness decreased from 2000 to 2009 and increased in 2018, and 3) the proportion of the most dominant species was highest in 2009 and lowest in 2000. In terms of biomass, high biomass stations occupied only one-third of the total stations and were mainly distributed around 35°~37°N in 2000, while high biomass stations occupied half of the total stations in 2009 and 2018. The proportion of fish was >70% in all years with a downward trend, followed by an upward trend; the proportion of crustaceans increased from 11.45% to more than 25%; the proportion of cephalopods was the lowest (less than 1%) with a downward trend. Previous studies have also shown that crustaceans gradually dominate over time in both abundance and biomass. In particular, the abundance of *Crangon affinis* was dominant in all years, accounting for 53.25% in 2000, 75.40% in 2009, and 63.81% in 2018. In terms of the spatiotemporal distribution of biodiversity indices, the Berger-Parker index and Shannon-Wiener index showed contradictory distribution trends; high Shannon-Wiener and Margalef index values were mainly distributed in the southern Yellow Sea, whereas high Berger-Parker index values were mainly distributed in the middle and southern Yellow Sea. For the same diversity index, Berger-Parker had the lowest values in 2018, while the Shannon-Wiener index and Margalef index values increased over time, and no obvious longitudinal or latitudinal change was found for any of the indices. There was no significant linear relationship between the SST and biodiversity indices ($P>0.05$). SST had a weak positive correlation with species richness, the Margalef index, and the Shannon-Weiner index, while SST had a weak negative correlation with the Berger-Parker index. Therefore, we concluded that bottom species are not sensitive to changes in SST, and bottom sea temperature should be compared to diversity indices in future studies. In terms of MTB, it was higher in the southwest and lower in the northeast with an obvious change around 34°N; it was lower in the deep-water area than in the coastal area; the lowest value appeared in the northern survey area, while the highest value appeared in the southern survey area. Considering the weak relationship between SST and diversity indices, SST is not feasible for diversity studies of bottom species. Research on the relationship between bottom sea temperature and diversity and the spatiotemporal distribution of bottom temperature-based MTB are needed in the future.

Key words Yellow Sea; Fishery resources; Biodiversity; Spatiotemporal distribution; Mean temperature of the biomass

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211025001

http://www.yykxjz.cn/

张家旭, 左涛, 左明, 王安东, 王俊, 牛明香. 基于生计渔业调查的黄河口西南侧潮间带渔业生物多样性及其季节变化. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 10-19

ZHANG J X, ZUO T, ZUO M, WANG A D, WANG J, NIU M X. Seasonal biodiversity of fishery resources by set net in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 10-19

基于生计渔业调查的黄河口西南侧潮间带 渔业生物多样性及其季节变化*



张家旭^{1,5} 左涛^{1,2①} 左明³ 王安东⁴ 王俊^{1,2} 牛明香^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071; 2. 青岛市海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 东营市海洋发展研究院 山东 东营 257091; 4. 山东黄河三角洲国家级自然保护区管理委员会 山东 东营 257091; 5. 东营市自然资源和规划局东营港经济开发区分局 山东 东营 257020)

摘要 基于 2020 年黄河口须子网生计渔业和生物组成周年监测数据, 开展黄河口潮间带渔业生物多样性及其季节变化研究, 评价须子网生产对黄河口渔业资源补充的影响。结果显示, 黄河口潮间带的渔业生物种类丰富, 共鉴定记录 61 种生物, 以鱼类和甲壳类居多。生物多样性和优势种组成均具有明显的月变化。多样性水平以夏季 7—8 月较高, 秋季 10—11 月较低; 5—9 月、10—11 月组群分别具有较高的种类组成相似度。各类群的数量组成中, 4—7 月螺类数量居多, 8 月螺类和鱼类数量居多, 9 月鱼类数量居多, 10—11 月蟹类数量居多。鱼类是各调查月渔获的优势类群, 其中, 花鲈(*Lateolabrax maculatus*)和鲈(*Liza haematocheila*)为各调查月都出现的优势种。个体大小—频数百分比分布显示, 黄河口潮间带是小型渔业生物以及多种幼鱼分布的重要区域。4—9 月, 渔获物的主体均由个体重量 < 2 g 的生物组成(44%~82%), 鱼类以个体质量 < 20 g 为主, 优势种类组成月更替明显。研究表明, 开展须子网生计渔业调查和监测是采集黄河口沿岸咸、淡水交汇区潮间带包括鱼类补充群体在内的诸多渔业生物分布资料的有效途径。研究还表明, 须子网渔业生产虽为黄河口沿岸当地传统的生计渔业, 但其低选择性及在迁移通道的布设方式等易对渔业资源自然补充和增殖养护群体造成破坏, 建议主管部门根据幼鱼种类组成和出现季节特征, 重点在夏季和初秋季对该渔业的网目和布设区域进行相应管控。

关键词 渔业资源; 生物多样性; 须子网; 潮间带; 黄河口

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0010-10

黄河口是我国三大河口(长江口、珠江口和黄河口)之一, 其邻近海域生物资源丰富, 是渤、黄海渔业生物重要栖息、产卵、育幼、索饵场和洄游通道。

已有研究表明, 自 20 世纪 50 年代以来, 在环境变化及捕捞的影响下, 黄河口邻近海域的渔业生物群落结构和多样性发生重大变化, 生物组成小型化和低值化

* 科技部国家重点研发计划(2019YFD0901202)、青岛市海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室青年人才培育项目(LMEES-YTSP-2018-04-03)和中国海油海洋环境与生态保护公益基金项目(CF-MEEC/TR/2018-06)共同资助。张家旭, E-mail: 1317657622@qq.com

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

收稿日期: 2021-10-25, 收修改稿日期: 2021-11-15

明显(邓景耀等, 2000; 朱鑫华等, 2001; Jin *et al.*, 2013; 陈宁等, 2017), 渔业资源面临严重的衰退压力(Jin *et al.*, 2013; 孙鹏飞等, 2014; 杨尧尧等, 2016)。

为加强生境保护和资源养护, 黄河口沿岸海域多被划入国家级海洋生态特别保护区, 禁止大型商业渔船作业。但受历史遗留问题的影响, 此海域仍存在少量以家庭为单位的多类型生计渔业, 主要生产渔具有流刺网、弓子网、地笼和须子网(俗称定置网)等。其中, 须子网生产是该水域生计渔业中最为传统的生产方式之一, 集中在黄河口西南侧紧邻小岛河至广利河口外浅滩水域, 生产季节介于农历节气“惊蛰”至“小雪”间。虽然该渔业的从业人员老龄化严重且生产规模总体呈下降趋势, 但须子网属于导陷插网陷阱类渔具, 是农业部【2013】2号通告中禁用和限制性使用的渔具之一, 其网目小、选择性低、生产捕获物的幼鱼比例高, 严重威胁河口区渔业资源群体的补充(高慧良等, 2016)。因此, 有必要对黄河口须子网生产实施跟踪调查和监测, 以了解该渔业方式的生产状况, 评价渔具捕捞渔获物选择效率, 为规范渔具使用和实际生产、兼顾渔业资源保护和渔民生计、制定长期保护区管理规划和资源养护政策提供依据。

已有的黄河口邻近海域相关渔业研究报道中, 调查网具常采用底拖网(吕振波等, 2013; 孙鹏飞等, 2014; 翟璐等, 2015; 杨尧尧等, 2016; 王晶等, 2016; 王娇等, 2018)和弓子网(张旭等, 2009、2010; 李凡等, 2013), 受调查船及上述网具适用水深等所限, 研究区域多限于较深的潮下带及近海水域。而在诸多生物幼体迁移或洄游通道的重要节段——咸、淡水连接处的潮间带和浅滩, 由于水深浅且受潮汐影响日变化大, 常规调查船不易操作, 相关研究报道少(高慧良等, 2016)。而须子网为被动型定置网具, 选择性低, 操作简单灵活, 捕捞小型鱼、虾蟹类效率较高, 多布设于潮间带及浅滩、渔业生物迁移或洄游通道。如能借助当地生计渔业分布和须子网渔具特点, 可以有效采集咸、淡水交汇区潮间带和浅滩渔业生物数据资料, 弥补以往调查方法不足, 促进黄河河口渔业生物早期补充群体的分布和迁移相关研究的开展。

为此, 2020年通过走访方式, 调研黄河口须子网生计渔业生产, 了解该类渔业现状, 并开展了渔获生物组成的周年监测分析, 以深入认识黄河口潮间带和浅滩渔业生物多样性特征, 评价须子网生产对黄河口渔业资源补充的影响, 研究结果将为黄河口生态国家级海洋特别保护区建设和制定渔业资源养护措施提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 监测点和采样方法

调研显示, 黄河口沿岸从事须子网生计渔业生产约50户, 其中, 从事连续生产有20余户, 渔民年龄均在50岁以上, 10%的渔民年龄已超过60岁。生产区域多数分布于黄河口南侧, 其中, 多数在小岛河口, 少数在广利河口, 两区域的插拦网开口宽度均值分别为250 m/户和500 m/户。生产时间为除12月—翌年3月冰期外的4—11月。

监测点设在某连续生产渔户的生产点。该生产点(37°26'52"N, 118°57'59"E)位于小岛河口南侧24 km, 距岸垂直距离约3 km(图1a)。该位点最高潮时水深约3 m, 最低潮时可直接目视海底。取样网具为渔户自制须子网(图1b), 海上插拦网呈M形, 拦网开口宽400 m、网高1.5 m、网目20 mm, 外内栏网单侧长分别为200 m和150 m, 拦网的3个凹折角和开口两端各设陷阱网囊1个, 网囊直径70 cm、长度1.5 m、网目20 mm。以24 h取渔获物1次定义为1网次。

2020年4—11月期间, 每月定期选择海况良好、渔获量相对较多的大潮日(农历初三或十八)前后, 收集监测点的渔获物2~4网次。分析渔获物时, 先粗拣、大致分为鱼类、虾蟹类、螺类和其他, 再依据《海洋调查规范 第6部分: 海洋生物调查》(GB/T12763.6-2007)进行渔业生物学取样、种类鉴定和计数及生物学测定。生物种类分类名称参考《中国海洋生物名录》(刘瑞玉, 2008)。

1.2 数据处理

渔获量分别采用每网次渔获生物量(g/net 或 kg/net)和每网次渔获生物个体数(ind./net)表示。对该月所有网次渔获量取均值得到月渔获量。6月渔获物中还出现约61 kg海蜇(*Rhopilema esculentum*), 因其仅单月出现, 故未计入。

参考卞晓东等(2018), 基于 α 多样性测度方法, 采用物种丰富度指数(D)、Shannon多样性指数(H')和Pielou均匀度指数(J')分析渔获物的生物组成多样性; 基于 β 多样性测度方法, 采用Jaccard种类相似性指数比较相邻月间渔业生物的种类组成更替程度, 该指数值 <0.25 时为极不相似, 介于 $0.25\sim0.50$ 时为中等不相似, 介于 $0.50\sim0.75$ 时为中等相似, >0.75 时为极相似; 采用相对重要性指数(IRI)确定渔业生物组成种类中的优势种, IRI >1000 时定为优势种。

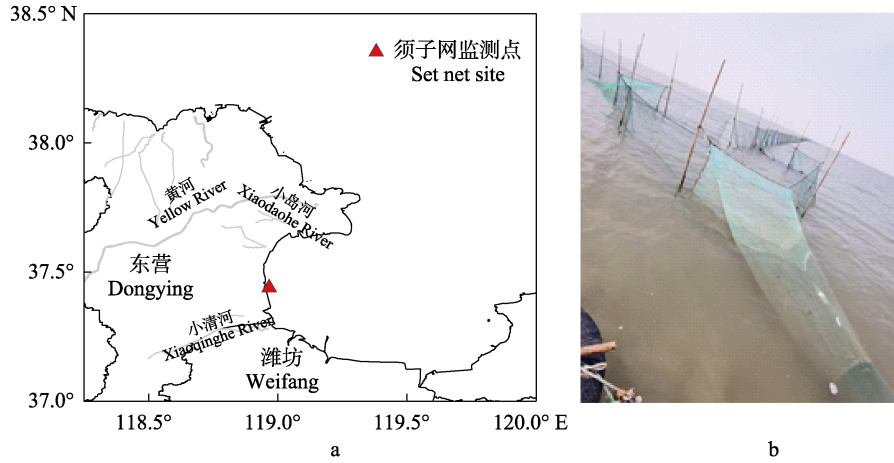


图1 黄河口西南侧潮间带须子网渔业生物监测调查位置示意(a)和须子网实景照(b)
Fig.1 Geographic distribution (a) and fishing scene (b) of set net in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

2 结果

2.1 渔获量

4—11月的月渔获量介于13~29 kg/net、750~5300 ind./net之间,以9月最高、7月最低(图2)。就生物量而言,鱼类是各调查月的优势类群,各月占比超过50%,平均占比达67%;就个体数量而言,鱼类是6—9月渔获中的优势类群,在月渔获生物个体

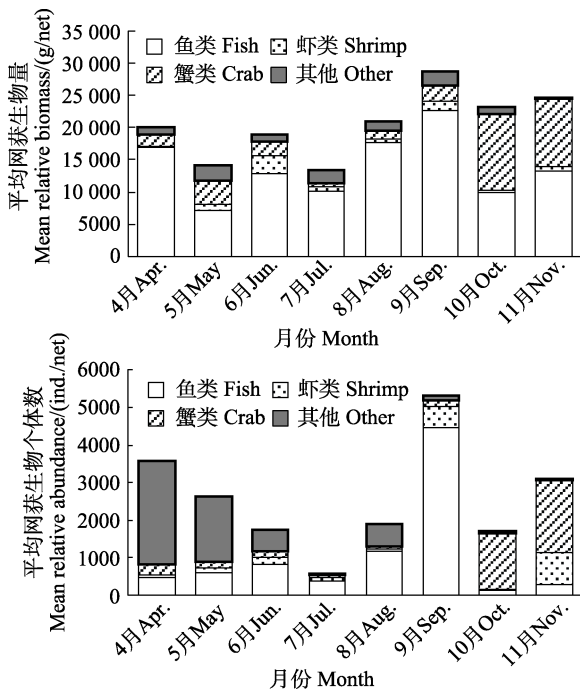


图2 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物生物量和数量组成
Fig.2 Relative biomass and abundance of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

数中的占比为47%~83%;螺类和蟹类分别为4—5月、10—11月渔获的优势类群,其在月渔获生物个体数中的占比分别为65%~77%和63%~90%。

2.2 种类组成和多样性

共鉴定记录4门4纲15目42科58属61种,其中,鱼类34种,甲壳动物中的虾、蟹类23种,其他4种。8月出现种类数最多,有36种;11月出现种类数最少,为21种;月均出现28种,仅有10种在所有调查月都出现。

各调查月份的 H' 多样性指数介于0.53~2.67之间,均值为1.88; J' 均匀度指数值介于0.17~0.84之间,均值为0.58;多样性和均匀度指数季节变化趋势相同,7月最高,10月最低。物种丰富度指数 D 介于2.37~4.74之间,平均值为3.47,4—8月呈上升趋势,8月达峰值后逐月下降(图3)。

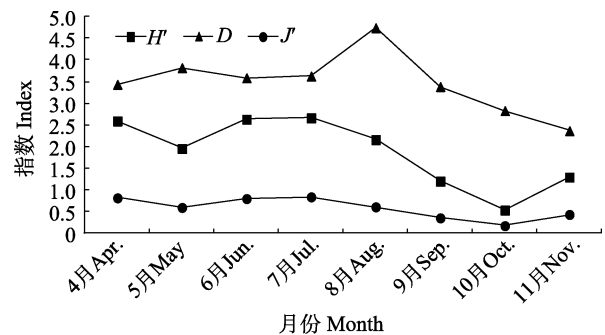


图3 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物 Shannon H' 多样性指数、物种丰富度指数 D 和 Pielou J' 均匀度指数
Fig.3 Shannon H' diversity, species richness D , and Pielou J' even indices of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

总渔获物的 β 多样性指数值为 0.42~0.59 (图 4), 平均相似性指数值为 0.52, 显示其种类组成在相邻月间处于中等相似水平。主要组成类群中, 鱼类和虾类 β 多样性指数值多 < 0.50, 表明相邻月间的种类组成中等不相似, 种类月更替率较高; 蟹类的 β 多样性指数值多 > 0.60, 6—8 月间甚至接近 90%, 表明蟹类的月间种类组成相似度高, 月更替率较低。

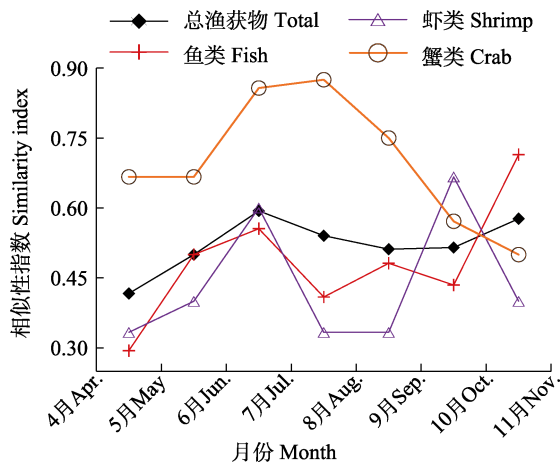


图 4 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物的 β 种类组成相似性指数

Fig.4 β similarity index of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

基于种类组成的聚类分析显示(图 5), 不同季节采集的渔获物组成在 57% 的相似水平下, 可分为 2 个组群: 5—9 月组群和 10—11 月组群。2 个组群的种类组成差异达显著水平(ANOSIM, $r=0.764$, $P<0.05$)。

2.3 优势种组成

表 1 显示优势种组成存在季节差异。其中, 花鲈在全部调查月份中均为优势种, 其生物量占总渔获物生物量的 15%; 鲮在除 6 月和 9 月外的其他月份调查中为优势种; 此外, 在较多月份(>4)出现的优势种还

有斑鲮 (*Konosirus punctatus*) 和矛尾刺虾虎鱼 (*Acanthogobius hasta*)。

2.4 个体大小分布

与聚类分析结果相似, 4—9 月和 10—11 月 2 组在生物个体大小分布组成上表现明显不同(图 5)。4—9 月, 个体质量 < 2 g 的生物是渔获物个体数量组成的主体, 4—7 月该质量组的生物类群为螺类, 8 月为螺类和鱼类, 9 月则为鱼类。10—11 月, 渔获物中数量最多的是个体质量介于 5~10 g 的小型蟹类(图 6)。就鱼类而言, 其个体平均质量为 13 g/ind., 月均值以 9 月最低(5 g/ind.), 10 月最高(74 g/ind.)。4—9 月都以个体质量 < 20 g 组的个体居多, 该质量组个体占鱼类总数的 80%, 其中, 4—5 月以质量组 2~5 g 的个体居多、8—9 月以质量 < 2 g 的个体居多。个体质量 < 20 g 组的鱼类种类组成中, 4 月以虾虎鱼类、5 月以花鲈、6—8 月以斑鲮数量居多; 7 月和 8 月还有较多的白姑鱼 (*Pennahia argentata*)、虾虎鱼类、鲮等; 9 月的幼鱼种类组成多样化, 包括青鳞小沙丁鱼 (*Sardinella zunasi*)、赤鼻棱鯮 (*Thrissa kammalensis*)、中颌棱鯮 (*Thrissa mystax*)、多鳞鱮 (*Sillago sihama*)、叉尾圆颌针鱼 (*Tylosurus melanotus*)、虾虎鱼类、鲮等。

3 讨论

本研究基于黄河口须子网渔业生产开展了周年定点监测, 虽然监测水面范围小, 但采集记录的生物种类涵盖了黄河口邻近海域大多数已报道的渔业生物种类(陈大刚等, 2000; 郑亮, 2014), 丰富度和多样性指数水平也与大面调查的结果相近(孙鹏飞等, 2014)。这不仅反映了黄河口潮间带与河口区近海水域相似, 都具有丰富的渔业生物种类, 是渔业生物重要的分布区域, 而且也证实了本研究方法的可行性, 借助当地生计渔业生产和须子网渔具渔法, 采集黄河

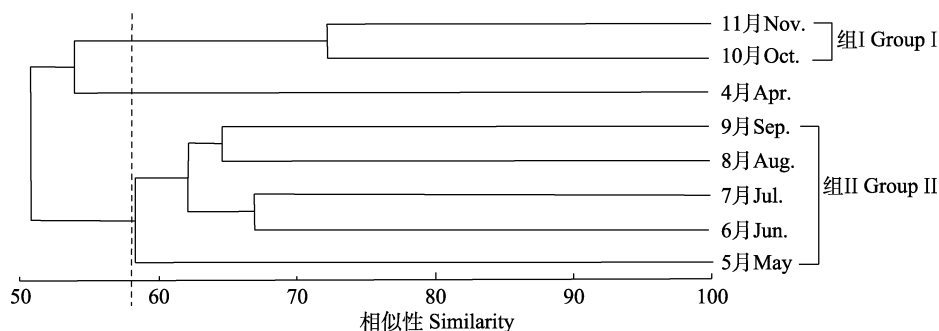


图 5 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物月种类组成聚类分析

Fig.5 Cluster analysis based on the species compositions of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

表1 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物的优势种(IRI>1000)组成

Tab.1 Dominant species (IRI>1000) of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

物种 Species	4月 Apr.	5月 May	6月 Jun.	7月 Jul.	8月 Aug.	9月 Sep.	10月 Oct.	11月 Nov.
海蜆 <i>Rhopilema esculentum</i>			+					
脊腹褐虾 <i>Crangon affinis</i>								+
脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>				+				
细螯虾 <i>Leptochela gracilis</i>								+
日本蛄 <i>Charybdis japonica</i>	+	+						
日本大眼蟹 <i>Macrophthalmus japonicus</i>		+					+	+
泥脚隆背蟹 <i>Carcinoplax vestita</i>			+					
口虾蛄 <i>Oratosquilla oratoria</i>		+						
斑螯 <i>Konosirus punctatus</i>			+	+	+	+		
赤鼻棱鯧 <i>Thrissa kammalensis</i>			+					
花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
鲈 <i>Liza haematocheila</i>	+	+		+	+		+	+
白姑鱼 <i>Pennahia argentata</i>					+			
青鳞小沙丁鱼 <i>Sardinella zunasi</i>						+		
蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>			+	+				
六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>					+			
矛尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius hasta</i>	+		+	+	+	+		
拟矛尾虾虎鱼 <i>Parachaeturichthys polynema</i>	+							
红鳗虾虎鱼 <i>Taenioides rubicundus</i>								+

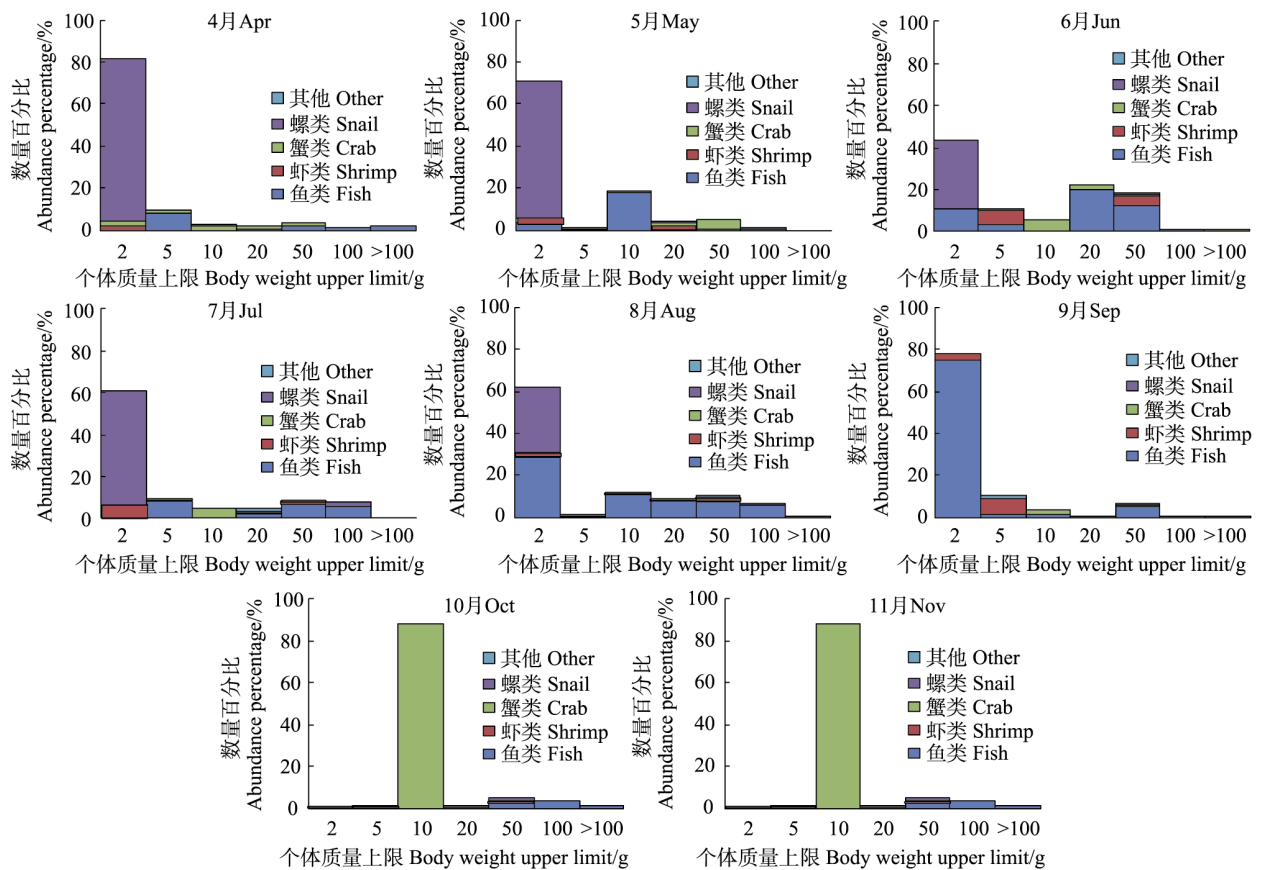


图6 黄河口西南侧潮间带须子网渔获物个体质量(g)-数量百分比分布

Fig.6 Individual body weight-abundance percentage distributions of set net catches in the intertidal zone to the southwest of the Yellow River estuary

口潮间带渔业生物多样性资料数据,是弥补常规调查方法的不足、提高黄河口渔业数据的区域完整性的有效途径。

与2012年底拖网调查中有关渔业生物种类组成的结果(郑亮,2014)相比较,本研究增加了鲈形目(Perciformes)、颌针鱼目(Beloniformes)和银汉鱼目(Atheriniformes)的5种鱼类,未出现鲑形目(Salmoniformes)、鲉形目(Scorpaeniformes)、鲈形目和鲑形目(Tetraodontiformes)等偏深水底栖分布的鱼种。此外,结果2.3中青鳞小沙丁鱼仅在9月为优势种,而在底拖网调查中,7—9月青鳞小沙丁鱼均为优势种(郑亮,2014)。结果2.4显示,须子网渔获中以小型生物种类为主,个体质量<20g的幼鱼所占数量比例较高,这与使用相同网目(20mm)的弓子网的调查结果(李凡等,2013)相似,但其认为8月鱼类个体质量最低,而本研究中,鱼类个体质量均值以9月最低。上述种类组成和出现季节的不同可能与调查所涉月份及网具的选择性差异有关。

黄河口邻近海域是诸多渔业生物资源产卵场、育幼场和洄游迁移通道所在。本研究结果也证实,在黄河口邻近海域潮间带,小型渔业生物特别是幼鱼资源丰富,尤其是在9月,超过75%的渔获量由多种幼鱼贡献(见2.4)。在采集到的渔获物中,还发现如鲰和花鲈等多个鱼种从幼体到性成熟个体均有分布。此外,结果2.2和2.4显示,此海域渔业生物的优势种组成存在明显的种类更替,生物多样性具有明显的月变化。春、夏之交(5—6月)以及秋季(9—10月)水域内组成的生物类别发生明显的转变,个体质量<20g以下的鱼类的优势鱼类种群月更替更为明显,4月为虾虎鱼类,5月为花鲈,6—8月为斑鲆,7、8月为白姑鱼、虾虎鱼类、鲰等,9月则为蓝点马鲛、中颌棱鲷、青鳞小沙丁鱼等中上层洄游鱼类。上述研究结果可为该水域制定有针对性的渔业资源补充群体养护策略提供依据。

黄河口须子网生产多布设河口外的潮间带及浅滩,沿海岸线横切潮水的流向设置网具来拦截和捕获生物。由于小型生物个体游泳能力较弱,受潮汐水流作用一旦冲入囊网,则无法逃脱,因此,潮间带上布设的须子网极可能阻断许多生物种类由河口迁移或洄游进入开阔海域。此外,在须子网渔获物中,除出现大量的幼鱼外,还发现相当数量的当年增殖放流物种,如海蜇、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)等。其中,6—7月,海蜇单网次捕获量超过60kg,但个体伞径均在200mm以下,中国明对虾平均体长约6cm,半滑舌鳎的个

体重量不超过20g,均为刚放流或放流后不久的小个体。根据粗略估算,黄河口沿岸须子网渔业年产量应超过300t,幼鱼产量约120t、900万尾(按2.4中鱼类个体平均质量13g/ind.计),其中,个体质量<5g的幼鱼产量应超过20t、500万尾,约是山东省东营市2020年鱼类总放流量(半滑舌鳎,规格为2~5g/尾,共65万尾)的8倍。因此,在增殖放流期间布设须子网,极可能会严重损害增殖资源养护和修复效果,需要在夏季和秋初及增殖放流期对须子网生产和渔具渔法采取必要的管控措施,尽可能减少其对区域内渔业资源养护的不利影响。

4 结语

基于黄河口沿岸须子网生计渔业的周年监测结果,开展了黄河口潮间带渔业生物多样性研究。研究发现,黄河口潮间带的渔业生物种类丰富,是小型生物以及多种鱼类补充群体分布的重要区域。采集当地渔业生产数据,能够补充现有调查资料的不足,促进相关的渔业生态研究。须子网渔业生产虽为黄河口沿岸当地传统的生计渔业,但其低选择性和在迁移通道的布设方式等问题,易造成对渔业资源自然补充和增殖养护群体的破坏,建议主管部门对该渔业的网目、布设区域以及生产季节进行相应的管控。

致谢: 须子网生产监测渔获样品由山东省东营市小岛河坝头和南海铺的渔民提供,陈瑞盛、陈阳春和陈加强参与渔业调研、样品采集和分析工作,在此一并致谢!

参 考 文 献

- BIAN X D, WAN R J, JIN X S, *et al.* Ichthyoplankton succession and assemblage structure in the Bohai Sea during the past 30 years since the 1980s. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 1–15 [卞晓东, 万瑞景, 金显仕, 等. 近30年渤海鱼类种群早期补充群体群聚特性和结构更替. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 1–15]
- CHEN N, YANG Y Y, WEI Z H, *et al.* Composition and distribution of fishery resources before and after the water and sediment discharge regulation in the Yellow River estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 953–962 [陈宁, 杨艳艳, 魏振华, 等. 调水调沙前后黄河口渔业资源结构变化. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 953–962]
- CHEN D G, SHEN W Q, LIU Q, *et al.* The geographic characteristics and fish diversity in the Laizhou Bay and Yellow Sea estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*,

- 2000, 7(3): 46–52 [陈大刚, 沈谓铨, 刘群, 等. 莱州湾及黄河口水域地理学特征与鱼类多样性. 中国水产科学, 2000, 7(3): 46–52]
- DENG J Y, JIN X S. Study on fishery biodiversity and its conservation in Laizhou Bay and Yellow River estuary. *Zoological Research*, 2000, 21(1): 76–82 [邓景耀, 金显仕. 莱州湾及黄河口水域渔业生物多样性及其保护研究. 动物学研究, 2000, 21(1): 76–82]
- GAO H L, HUANG L Y, LI L, *et al.* Analysis on the catch composition of Xuzi net at Yellow River estuary in spring and summer. *Fishery Modernization*, 2016, 43(2): 62–67 [高慧良, 黄六一, 李龙, 等. 黄河口水域春季和夏季须子网渔获物组成分析. 渔业现代化, 2016, 43(2): 62–67]
- JIN X S, SHAN X J, LI X S, *et al.* Long-term changes in the fishery ecosystem structure of Laizhou Bay, China. *Science China (Earth Sciences)*, 2013, 56(3): 366–374
- LI F, LÜ Z B, WEI Z H, *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]
- LIU R Y. Checklist of marine biota of China Seas. Beijing: Science Press, 2008 [刘瑞玉. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 2008]
- LÜ Z B, LI F, QU Y B, *et al.* Fish community diversity in the Huanghe estuary and its adjacent area in summer, 2010. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 10–18 [吕振波, 李凡, 曲业兵, 等. 2010年夏季黄河口及邻近海域鱼类群落多样性. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 10–18]
- SUN P F, SHAN X J, WU Q, *et al.* Seasonal variations in fish community structure in the Laizhou Bay and the Yellow River estuary. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(2): 367–376 [孙鹏飞, 单秀娟, 吴强, 等. 莱州湾及黄河口水域鱼类群落结构的季节变化. 生态学报, 2014, 34(2): 367–376]
- WANG J, XU B D, REN Y P, *et al.* Size spectrum of fish community and its seasonal change in the Yellow River estuary and its adjacent waters. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2016, 46(7): 44–53 [王晶, 徐宾铎, 任一平, 等. 黄河口及邻近海域鱼类群落长度谱及其季节变化. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(7): 44–53]
- WANG J, ZHANG C L, XUE Y, *et al.* Taxonomic diversity of fish community in the Yellow River estuary. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(4): 86–95 [王娇, 张崇良, 薛莹, 等. 黄河口鱼类群落分类学多样性的研究. 海洋学报, 2018, 40(4): 86–95]
- YANG Y Y, LI Z Y, 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]
- ZHAI L, XU B D, JI Y P, *et al.* Spatial pattern of fish assemblage and the relationship with environmental factors in Yellow River Estuary and its adjacent waters in summer. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(9): 2852–2858 [翟璐, 徐宾铎, 纪毓鹏, 等. 黄河口及其邻近水域夏季鱼类群落空间格局及其与环境因子的关系. 应用生态学报, 2015, 26(9): 2852–2858]
- ZHANG X, ZHANG X M, GAO T X, *et al.* Composition of catches by beam trawl and its seasonal variations in Yellow River estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 118–124 [张旭, 张秀梅, 高天翔, 等. 黄河口水域弓子网渔获物组成及其季节变化. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 118–124]
- ZHANG X, ZHANG X M, GAO T X. 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. 春季黄河口水域2种网具渔获物组成的比较分析. 南方水产, 2010, 6(1): 59–67]
- ZHENG L. Preliminary study of fish community structure in Yellow River estuary waters. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [郑亮. 黄河口水域鱼类群落结构初步研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- ZHU X H, LIAO F, LIU D, *et al.* Spatio-temporal pattern and dominant component of fish community in the Yellow River estuary and its adjacent waters. *Studia Marina Sinica*, 2001, 43: 141–151 [朱鑫华, 缪锋, 刘栋, 等. 黄河口及邻近海域鱼类群落时空格局与优势种特征研究. 海洋科学集刊, 2001, 43: 141–151]

(编辑 冯小花)

Seasonal Biodiversity of Fishery Resources by Set Net in the Intertidal Zone to the Southwest of the Yellow River Estuary

ZHANG Jiayu^{1,5}, ZUO Tao^{1,2①}, ZUO Ming³, WANG Andong⁴, WANG Jun^{1,2}, NIU Mingxiang^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Marine Ecology and Environmental Science Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Marine Development Research Institute, Dongying, Shandong 257091, China; 4. Shandong Yellow River Delta National Nature Reserve Management Committee, Dongying, Shandong 257091, China; 5. Dongying Natural Resources and Planning Bureau, Dongying Port Economic Develop Area Substation, Dongying, Shandong 257020, China)

Abstract The Yellow River estuary is one of the three largest estuaries along the coastal waters of China, along with the Yangtze and Pearl River estuaries. Its adjacent seawaters are rich in biological resources, with abundant fish habitat, spawning grounds, and migration channels in the Bohai Sea and the Yellow Sea. However, as the waters are too shallow for a survey ship, data was insufficient for research in the intertidal zone of the salt and freshwater interchange. Instead, by interviewing and analyzing the daily catches by the set net of the local fishermen, this study explored the fishery biodiversity in the intertidal zone of the Yellow River estuary from April to November 2020. Yellow River estuary is rich in fishery resources, especially small fishery organisms and fish recruitment stocks. There were monthly variations in the dominant species composition and biodiversity index. A total of 61 species were recorded, most of which were fish and crustaceans. The diversity, evenness, and species richness index increased in summer (July and August) and decreased in autumn (October and November). By cluster analysis of the species compositions, the surveyed months can be divided into two groups: May to September, and October to November. *Lateolabrax maculatus* and *Liza haematocheila* were the most common and dominant species in all surveyed months. The main contributors to the catch of each month were: snails from April to July, snails and fish in August, fish in September, and crabs from October to November. Catches by the set net were mainly composed of individuals with body mass <2 g from April to September. From body mass-frequency distributions, fish with body mass <10 g were the main contributors to total catches from April to September. The mean body mass of fish in all surveyed months was 13 g/ind.. The dominant fish species with body mass with <20 g were: Gobioidi in April; *L. maculatus* in May; *Konosirus punctatus* in June; *Pennahia argentata*, Gobioidi, and *L. haematocheila* in June to August; and *Sardinella zunasi*, *Thrissa kammalensis*, *T. mystax*, *Sillago sihama*, *Tylosurus melanotus*, Gobioidi, and *L. haematocheila* in September. From the above results, the local set net fishery survey proved to be an effective method of collecting fishery data in the intertidal zone and can be incorporated in studies considering the distribution of fishery resources and breeding grounds in the seawaters adjacent to estuaries. In addition, this study provided clear evidence that set net fishing practices could severely impact the natural recruitment and stock enhancement of fish resources due to the low selectivity of nets and the overlap with larval fish migration channels. The number of larval fish captured by the set net fishery was, roughly estimated, several times higher than the local enhancement released. To minimize the effects of net mesh size, considering the spatial-temporal distributions of fish larvae, set net fishing practices should be concentrated to summer and early autumn, though further research is required to comprehensively account for both the protection of fishery resources and livelihoods.

Key words Fishery resource; Biodiversity; Intertidal; Set net; Yellow River estuary

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

续表

种类 Species	4 月 Apr.	5 月 May	6 月 Jun.	7 月 Jul.	8 月 Aug.	9 月 Sep.	10 月 Oct.	11 月 Nov.
多鳞鱻 <i>Sillago sihama</i>					+	+		
白姑鱼 <i>Pennahia argentata</i>					+	+		
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>						+		
叫姑鱼 <i>Johnius grypotus</i>					+			
红鳃虾虎鱼 <i>Taenioides rubicundus</i>		+	+	+	+	+	+	+
六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>		+	+		+			
矛尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius hasta</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
矛尾虾虎鱼 <i>Chaemrichthys stigmatias</i>						+		
拟矛尾虾虎鱼 <i>Parachaeturichthys polynema</i>	+					+	+	+
纹缟虾虎鱼 <i>Tridentiger trionocephalus</i>	+	+				+		
髯缟虾虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>		+						
长丝虾虎鱼 <i>Cryptocentrus filifer</i>			+		+	+	+	+
小带鱼 <i>Eupleurogrammus</i> sp.			+					
真鲷 <i>Pagrus major</i>				+	+	+		
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>			+	+	+		+	+
短吻红舌鳎 <i>Cynoglossus joyneri</i>		+						
石鲈 <i>Kareius bicoloratus</i>					+			
叉尾圆颌针鱼 <i>Tylosurus melanotus</i>	+				+	+	+	+
日本下鱈鱼 <i>Hyporhamphus sajori</i>		+	+		+			
长蛇鲻 <i>Saurida elongata</i>								+
尖海龙 <i>Syngnathus acus</i>	+							
布氏银汉鱼 <i>Allanetta bleekeri</i>			+		+	+		

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211011001

http://www.yykxjz.cn/

张家旭, 王俊, 牛明香, 左涛, 常雯, 陈瑞盛. 黄河口近岸海域鲮渔业生物学特征研究. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 20–29
ZHANG J X, WANG J, NIU M X, ZUO T, CHANG W, CHEN R S. Biological characteristics of *Liza haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 20–29

黄河口近岸海域鲮渔业生物学特征研究*



张家旭^{1,3} 王 俊^{1,2①} 牛明香^{1,2} 左 涛^{1,2} 常 雯⁴ 陈瑞盛¹

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

山东省渔业资源与生态环境重点实验室 山东 青岛 266071;

2. 青岛市海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 山东 青岛 266237;

3. 东营市自然资源和规划局东营港经济开发区分局 山东 东营 257020;

4. 东营市海洋发展研究院 山东 东营 257091)

摘要 为探究黄河口近岸海域鲮(*Liza haematocheila*)的渔业生物学特征及资源状况,本研究根据2020年4—11月黄河口渔业生产定置网的采样数据,研究了黄河口水域重要渔业种类鲮群体的体长体重分布、体长-体重关系、繁殖、生长和死亡等渔业生物学特征和开发率。结果显示,鲮体长分布范围为45~460 mm,优势体长组为55~185 mm;体重范围为2~1100 g,优势体重组为2~80 g。方差分析表明,鲮的平均体长、体重均存在显著的月间差异;各月及全年鲮的体长-体重关系均呈显著的幂函数关系,生长类型为负异速生长。黄河口近岸海域,鲮在7月肥满度最大,而6月最小;产卵盛期为4—5月。鲮的生长速率为 $0.31 a^{-1}$,总死亡系数为 $1.42 a^{-1}$,自然死亡系数估算结果为 $0.51 a^{-1}$,捕捞死亡系数为 $0.91 a^{-1}$,其开发率为0.64,鲮种群资源被过度利用。定置网渔业生产对于黄河口渔业资源有一定的破坏作用,尤其对幼鱼和补充群体资源影响较大,应对定置网渔业生产采取必要的管理措施。

关键词 黄河口; 定置网; 鲮; 渔业生物学特征

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0020-10

黄河口及其邻近海域受到黄河调水调沙、污水排放、过度捕捞等人类活动以及气候变化的影响,渔业生物栖息环境遭到破坏,渔业生物正常繁殖和生长受到了严重的影响,渔业资源向着低营养级群体发展。同时,资源结构也有较大变化,自20世纪80年代以来,黄河口海域渔业资源持续衰退,具有较高经济价值的传统捕捞鱼类如带鱼(*Trichiurus lepturus*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)等资源显著衰退(张旭等, 2009),价值低的小型鱼类和虾蟹类成为该水域的主

要渔获物(朱鑫华等, 2001; 杨涛等, 2018)。为促进生态环境修复和渔民增收,渔业管理部门开展了增殖放流、限制捕捞等资源养护措施。因此,开展鱼类生物学特征研究,可为渔业资源合理利用和增殖养护提供科学依据,为制定相关渔业政策提供支持。

鲮(*Liza haematocheila*)属鲮形目(Mugiliformes)、鲮科(Mugilidae)、鲮属(*Liza*)鱼类,是黄河口及其邻近海域的重要经济鱼类,也是黄河口近岸水域生计渔业的重要捕捞种。鲮一般在河口水域和内湾海域等半咸

* 国家重点研发计划项目(2019YFD0901201; 2019YFD0901202)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2018HY-ZD0102)共同资助。张家旭, E-mail: 1317657622@qq.com

① 通信作者: 王 俊, 研究员, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-10-11, 收修改稿日期: 2021-11-15

水或咸水区域活动,也可以在淡水区域中生活(朱元鼎等, 1963);受海水温度的影响,冬季时会在离岸较远、水深较深的水域越冬,直到春季水温升高后才向浅水区洄游。因为鲎肉质鲜美、易于捕获,是我国近岸人民较为喜欢的经济鱼种之一(朱元鼎等, 1963),在我国沿海近岸均有分布(成庆泰等, 1997; 庄平等, 2006)。鲎主要以有机碎屑为食,蓝绿藻(Cyanophyceae)、绿藻(Chlorophyceae)、硅藻(Bacillariophyceae)、轮虫(Rotifera)都是鲎的主要饵料(成庆泰等, 1997)。不同生态环境下鲎的生长、死亡(李明德等, 1982)、年龄(纪严等, 2018)、摄食(成庆泰等, 1997)、繁殖(朱元鼎等, 1963)等生物学特征和资源开发状况(叶金清等, 2020)等已有研究,但关于黄河口近岸水域鲎的生物学特征未见报道。

本研究根据 2020 年 4—11 月黄河口近岸海域定置网采样数据,研究鲎体长体重分布、体长-体重关系、繁殖、生长、死亡等渔业生物学特征和开发率,以为黄河口重要经济种类鲎资源增殖养护和合理开发提供科学依据,为黄河口区域生态修复等研究提供基础生物学资料。

1 材料与方法

1.1 数据来源

渔获数据来源于 2020 年 4—11 月在东营黄河口近岸海域(37°26'52"N, 118°57'59"E 附近)(图 1)逐月进行的定置网渔业生产调查。每月调查时间在大潮期(农历初三或十八)进行,每网次作业时间约为 24 h,共采集 4 个网次。调查采样的须子网主尺度为 250 m (网长) × 1.78 m (网高),囊网网目为 18 mm。

1.3 研究方法

1.3.1 体长体重分布 利用频率分布法对鲎的体长和体重进行统计分析,分别以 10 mm 和 10 g 为组距,各体长、体重组上限包含在各组中。利用方差分

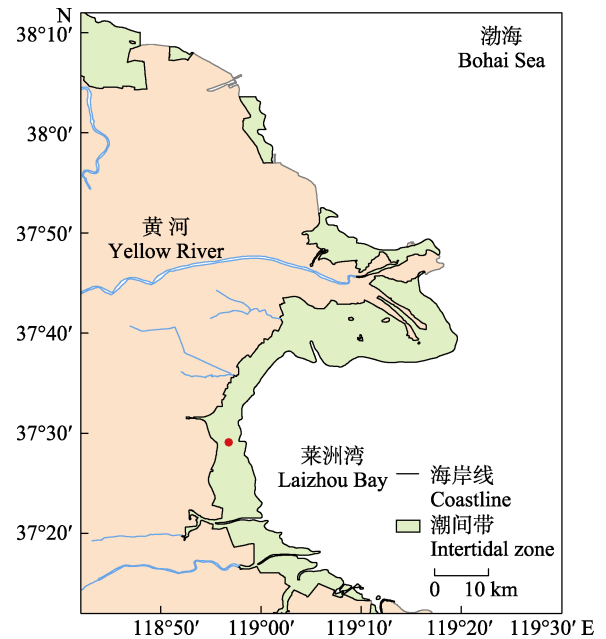


图 1 黄河口定置网调查站

Fig.1 Set nets survey station in Yellow River estuary waters

图中实心圆表示调查采样点。

The solid circle in the figure indicates the survey sampling point.

1.2 数据处理

依据《海洋调查规范第 6 部分: 海洋生物调查》(GB/T12763.6-2007)对渔获物进行分类、种类鉴定和生物学测定。每个网次随机取 50 尾样品,测量鲎的体长和体重,不足 50 尾则全部测量;在样品中随机取 30 尾进行解剖,观察其摄食等级和性腺成熟度。其中,生物学分析样品共 981 尾,性腺成熟度分析样品共 690 尾(表 1)。

表 1 鲎各月生物学分析样品量(尾)

Tab.1 Sample quantity for data analysis of *L. haematocheila* in each month (ind.)

项目 Items	4 月 Apr.	5 月 May	6 月 Jun.	7 月 Jul.	8 月 Aug.	9 月 Sep.	10 月 Oct.	11 月 Nov.	总计 Total
体长体重分析 Body length and weight analysis	176	51	42	125	120	97	163	207	981
性腺成熟度分析 Gonadal maturity analysis	120	51	42	90	90	57	120	120	690

析研究各月鲎的平均体长和平均体重是否有显著性差异(Pauly, 1984)。

1.3.2 体长-体重关系 鲎的体长-体重关系采用以下幂函数公式进行拟合(Ricker, 1973):

$$W=aL^b \quad (1)$$

式中, W 为鱼体重(g), L 为鱼体长(mm), a 和 b 为待确定的参数。 a 表示鱼类生长的条件因子, b 为异速生长因子, 可以反映鱼类生长发育的不均匀性。当 $b=3$ 时, 为等速生长, 体重体长同速增长; 当 $b<3$ 时, 为负异速增长, 体重较体长增长慢; 当 $b>3$ 时, 为正异速生长, 体重较体长增长快(Froese, 2006)。

采用协方差分析(ANCOVA)检验全年及月间个体体长-体重关系参数的差异, 使用 t 检验分析参数 b 与 3 的差异, 检验公式:

$$t = \frac{SD(L)}{SD(W)} \times \frac{|b-3|}{\sqrt{1-r^2}} \times \sqrt{n-2} \quad (2)$$

式中, $SD(L)$ 、 $SD(W)$ 分别为体长、体重对数的标准差, n 、 r 分别为样本量和相关系数(Morey *et al*, 2003)。

1.3.3 肥满度 肥满度作为反映鱼类生长情况的指标, 一定程度上也可以反映鱼类生长环境的优劣。采用以下公式进行计算(Froese, 2006):

$$F = \frac{W \times 100}{L^3} \quad (3)$$

式中, F 为鱼类肥满度, W 为鱼类体重(g), L 为鱼类体长(mm)。

1.3.4 性腺成熟度 性腺成熟度根据《海洋调查规范第 6 部分: 海洋生物调查》(GB/T12763.6-2007)要求, 目测法进行划分, 统计鲛各月的性腺成熟度, 绘制各月性腺成熟度比例分布图。

1.3.5 生长、死亡参数估算及资源开发利用

1.3.5.1 生长参数 采用生长方程 VBGF 来描述鲛的生长, 其公式为(Fabens, 1965):

$$L_t = L_\infty \{1 - \exp[-K(t-t_0)]\} \quad (4)$$

式中, L_∞ (cm) 为鱼类的渐近体长, K 为鱼类生长速率 (a^{-1}), t_0 为理论常数, 表示理论上当鱼类体长为 0 时的年龄。采用 ELEFAN (electronic length frequency analysis) 方法对生长参数 L_∞ 、 K_t 进行估算。

理论初始年龄 t_0 根据 Pauly 经验公式进行估算 (Pauly, 1979; Pauly *et al*, 1981):

$$\ln(-t_0) = -0.3922 - 0.2752 \ln L_\infty - 1.038 \ln K \quad (5)$$

式中, L_∞ 为渐近体长(cm), K 为生长速率 (a^{-1})。

1.3.5.2 死亡系数 利用体长转换渔获曲线 (length converted catch curves) 计算总死亡系数 (Z) (Pauly, 1979), 公式如下:

$$\ln(N_t/\Delta t) = a + bt' \quad (6)$$

式中, N_t 为 t 体长组鱼类的尾数, Δt 为相应体长组中鱼类从最小体长生至最大体长的时间, t' 为相应体长组对应的相对年龄 (years- t_0), 拟合的数据点以“回归不采用未全部补充的年龄段和靠近渐近体长的年

龄段”为选取原则 (Pauly, 1990), 总死亡系数 (Z) 为拟合出曲线的相反数 ($-b$)。

一般使用 Pauly 经验公式来概算自然死亡系数 (M) (Pauly, 1980):

$$\lg M = -0.0066 - 0.2790 \lg L_\infty + 0.6543 \lg K + 0.4634 \lg T \quad (7)$$

式中, L_∞ 为渐近体长(cm), K 为生长速率 (a^{-1}), T 为海域平均水温 ($^{\circ}\text{C}$)。

捕捞死亡系数 (F) 计算公式为:

$$F = Z - M \quad (8)$$

1.3.5.3 资源开发利用 开发率 (E) 计算公式为:

$$E = F/Z \quad (9)$$

一般认为最适开发率为 0.5, 并以此来衡量鱼类开发利用的程度 (Gulland, 1971)。

捕捞选择性 (S) 是根据渔获曲线方程计算而得, 为线性回归中未被用到的数据点所对应的观测值和期望值的比值 (何宝全等, 1988), 开捕体长 (L_{50}) 为 $S=0.5$ 时所对应的体长。捕捞选择性和鱼类体长的关系表示为:

$$S_j = \frac{1}{1 + e^{-r(L_j - L_{50})}} \quad (10)$$

式中, L_j 为体长, S_j 为对应的选择性, L_{50} 为开捕体长, r 为常数。

2 结果

2.1 体长、体重组

4—11 月, 黄河口近岸海域鲛体长在 45~460 mm 之间, 平均体长为 149 mm; 优势体长组为 55~185 mm, 占全部个体的 70.03%。方差分析结果显示, 鲛各月平均体长存在显著差异 ($P<0.05$)。其中, 5 月个体平均体长最大, 为 229 mm, 优势体长组为 135~155 mm、215~275 mm; 9 月平均体长最小, 为 110 mm, 优势体长组为 75~105 mm; 其他月平均体长由大到小依次为 4、6、10、11、8 和 7 月, 平均体长分别为 196、195、153、134、123 和 113 mm (图 2)。

调查期间, 鲛的体重在 2~1100 g 之间, 平均体重为 83 g, 优势体重组为 2~80 g, 占全部个体的 75.40%, 个体间体重差异较大。方差分析表明, 鲛各月平均体重存在显著差异 ($P<0.05$)。其中, 5 月个体平均体重最大, 为 207 g, 优势体重为 11~60 g 和 121~180 g; 9 月个体平均体重最小, 为 26 g, 优势体重组为 1~20 g; 其他月平均体重由大到小依次为 4、6、8、10、7 和 11 月, 平均体重分别为 159、90、75、65、60 和 47 g (图 3)。

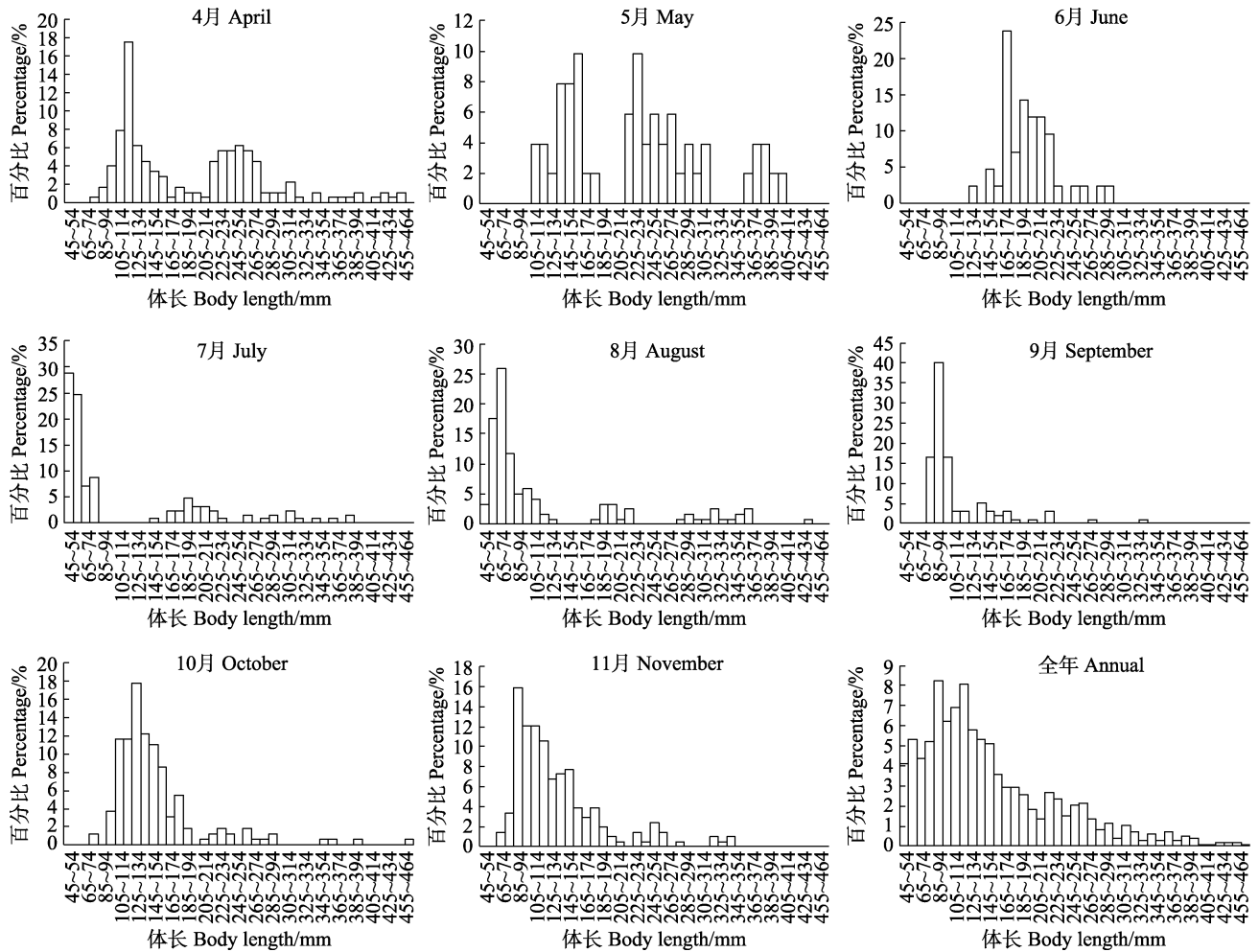


图 2 4—11 月黄河口近岸海域鲈体长分布频率直方图

Fig.2 Frequency histogram of body length of *L. haematocheila* from April to November in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

2.2 体长-体重关系及月变化

黄河口近岸海域鲈各月及全年的体长-体重幂函数关系显著($P < 0.05$) (图 4)。ANOVA 检验分析显示, 各月间鲈的体长-体重关系差异显著($P < 0.05$) (表 2)。条件因子 a 最大的月为 9 月(7.10×10^{-5}), 其次为 7 月和 8 月, 10 月、4 月和 5 月的条件因子相近, 6 月时最小。生长指数 b 的变化趋势与 a 相反, b 在 9 月最小, 为 2.65, 其他月的 b 值变化不大。全年体长-体重关系为 $W = 3.17 \times 10^{-5} L^{2.82}$ ($R^2 = 0.9805$, $n = 981$) (图 4), 经 t 检验, b 值与 3 差异显著($P < 0.05$)且 $b < 3$, 表明鲈的生长类型为负变速生长。

2.3 肥满度及各月变化

黄河口近岸海域鲈的肥满度数据分析表明, 4—6 月肥满度逐月下降, 7 月增大, 7—11 月鲈的肥满度起伏波动, 总体呈下降趋势。6 月鲈肥满度值最低, 为 1.102, 7 月鲈的肥满度最大, 为 1.535 (图 5)。

2.4 性腺成熟度

不同月鲈的性腺成熟度分析表明, 其性腺发育程度存在月间变化。每月性腺未发育的 I 期个体所占比例均超过 50%, 其中, 4 月性腺未发育的 I 期个体所占比例相对其他月最小, 占 54.62%; 其次为 III 期和 II 期个体, 所占比例分别为 34.45% 和 7.56%; 还有少量 IV 期和 V 期个体, 分别为 1.69% 和 1.68%。5 月出现 VI 期个体, 所占比例为 11.53%; I 期和 II 期个体所占比例分别为 84.61% 和 3.85%。6 月和 7 月渔获物中均仅有 I 期和 II 期的鲈个体, 分别占当月个体的 85.71%、14.29% 和 83.33%、16.67%。8—9 月, 鲈的性腺成熟度只有 I~III 期, 其中, II 和 III 期个体分别占当月个体的 10.09%、5.50% 和 14.04%、8.77%。10 月出现 IV 期个体, 所占比例为 2.48%; I 期、II 期和 III 期个体所占比例分别为 87.60%、3.31% 和 6.61%。在所有调查月中, 11 月性腺发育为 I 期的个体所占比例最大, 为 93.28%, 其余个体性腺成熟度为 II 期和 III 期, 所

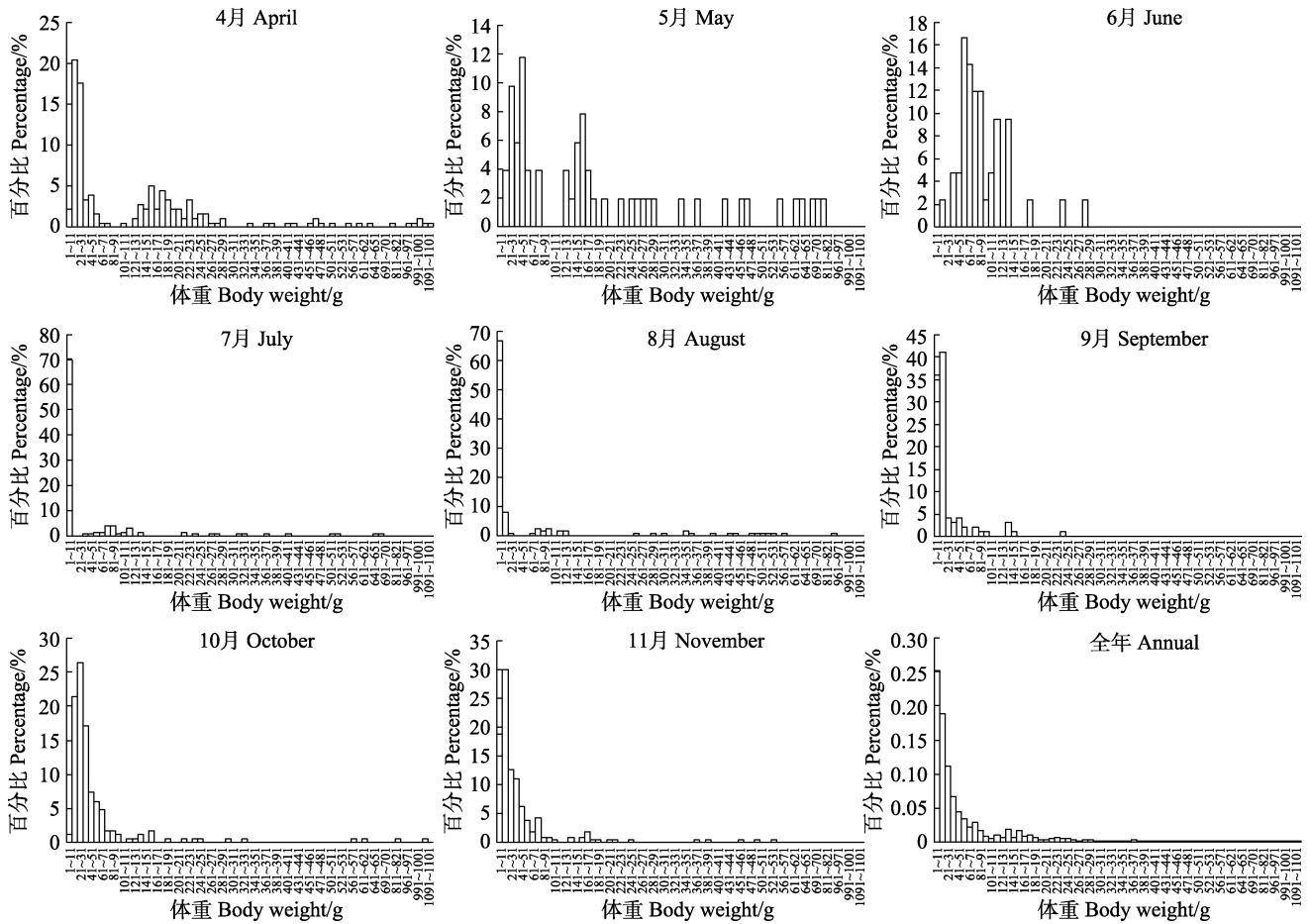


图3 4—11月黄河口近岸海域鲈体重分布频率直方图

Fig.3 Frequency histogram of body weight of *L. haematocheila* from April to November in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

表2 4—11月黄河口近岸海域鲈体长-体重关系

Tab.2 Length-weight relationships of *L. haematocheila* from April to November in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

项目 Items	4月 Apr.	5月 May.	6月 Jun.	7月 Jul.	8月 Aug.	9月 Sep.	10月 Oct.	11月 Nov.	全年 Annual
条件因子/ $\times 10^{-5}$ Conditional factors, <i>a</i>	1.97	1.96	1.74	4.80	2.57	7.10	1.98	2.47	3.17
生长指数 Growth index, <i>b</i>	2.92	2.91	2.92	2.74	2.86	2.65	2.90	2.87	2.82
样本数 Sample number, <i>n</i>	176	51	42	125	120	97	163	207	981
R^2	0.934	0.940	0.925	0.988	0.994	0.975	0.985	0.987	0.981

占比例分别为 5.04% 和 1.68% (图 6)。

2.5 生长、死亡及资源利用状况

利用 ELEFAN 方法拟合鲈的生长曲线, 对其生长参数进行估算 (图 7), 得到鲈的生长方程为:

$$L_t = 608(1 - e^{-0.31(t+0.39)})$$

鲈的总死亡系数根据渔获曲线计算, 选取一定的

数据点进行回归分析 (图 8), 得到总死亡系数为 1.42 a^{-1} 。根据 Pauly 经验公式, 鲈的自然死亡系数估算结果为 0.51 a^{-1} 。由此计算获得, 鲈捕捞死亡系数为 0.91 a^{-1} , 其开发率为 0.64, 表明黄河口近岸海域鲈资源存在过度利用的状况。

根据渔获曲线, 利用公式 7, 求得现阶段黄河口近岸海域生产调查中鲈的开捕体长 (L_{50}) 为 57.4 mm (图 9)。

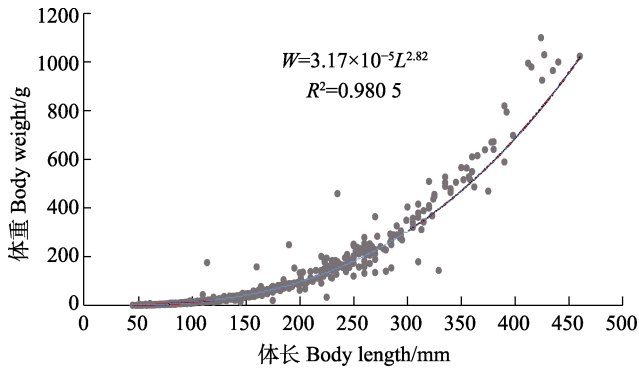


图 4 黄河口近岸海域鲈的体长-体重关系曲线

Fig.4 Length-weight relationship curve of *L. haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

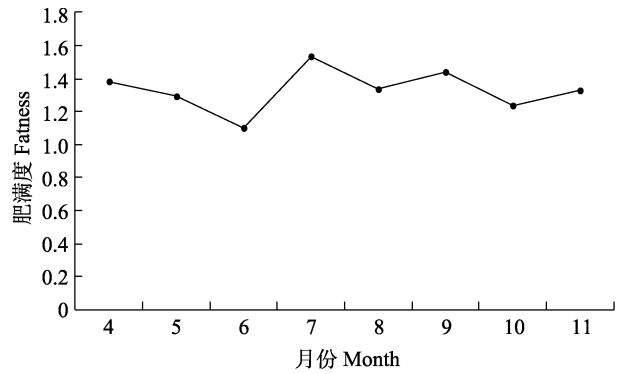


图 5 4—11月黄河口近岸海域鲈的肥满度

Fig.5 Fatness of *L. haematocheila* from April to November in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

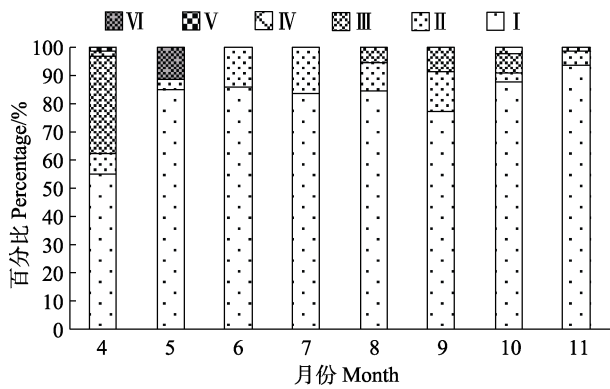


图 6 黄河口近岸海域鲈性腺成熟度各月变化

Fig.6 Monthly variations of gonadal maturity of *L. haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

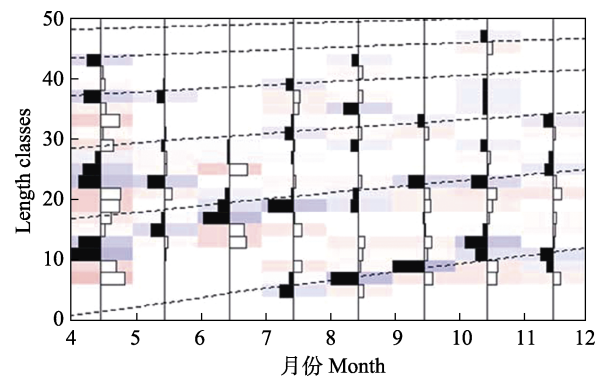


图 7 黄河口近岸海域鲈的体长频率分布和使用 ELEFAN 方法拟合的生长曲线

Fig.7 Length frequency distribution and growth curves estimated by ELEFAN of *L. haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

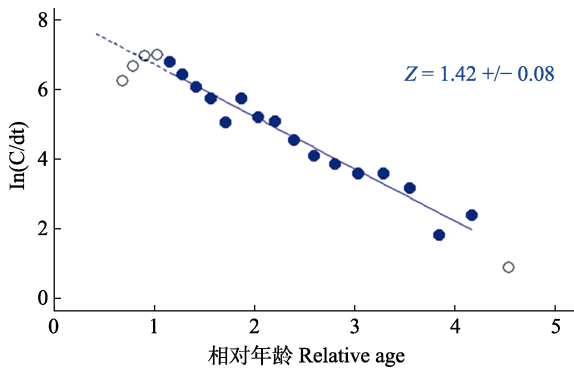


图 8 黄河口近岸海域鲈体长转换的渔获曲线

Fig.8 Length-converted catch curve for *L. haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

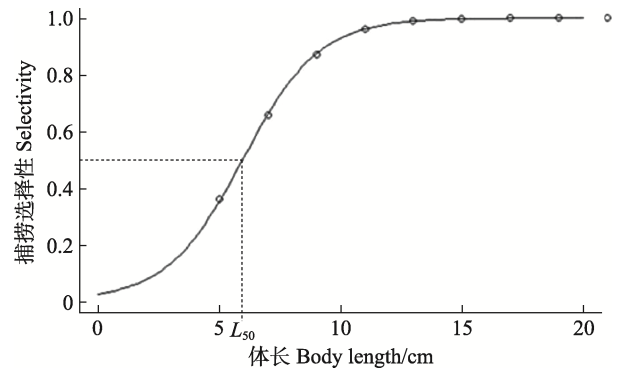


图 9 黄河口近岸海域鲈的捕捞选择性曲线

Fig.9 Size selectivity curve for *L. haematocheila* in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary

3 讨论

3.1 群体结构

研究表明, 黄河口近岸海域鲈主要以小个体为主, 体长<200 mm 的个体占总个体数量的 78%以上。

尽管如此, 鲈的体长、体重分布频率和体长优势组的月变化, 在一定程度上反映了调查区域内它们的生长和资源补充情况。

鲈一般在每年 3 月中下旬, 从深水游向近岸浅水区索饵, 4 月后鲈会在河口及附近沿海岸域进行繁

殖,一直持续到5月(李明德等,1982)。本研究利用定置网对黄河口近岸海域鲈的调查结果表明,4月和5月均有2个优势体长组,分别对应性腺未成熟的低龄个体及产卵期的性腺成熟个体。5月后,产卵后的个体向近河口区海域迁移觅食,而低龄小个体在6月后才离开定置网生产的近岸浅水区,从而导致优势体长组和优势体重组分别从6月的165~225 mm、50~150 g,降低到7月的45~85 mm和0~10 g。而7—11月的平均体长、体重逐渐增大,优势体长组和优势体重组也逐月增加,表明从7月开始,黄河口近岸浅水区鲈大部分为当年生的个体。

3.2 繁殖特性

黄河口近岸海域捕获的鲈,性腺未发育的小龄个体所占比重较大,性腺成熟度以I期为主。李明德等(1982)曾指出,在渤海同一海区的鲈产卵有先后,通常产卵期有相对集中的2~3个高峰,黄河口近岸海域调查中,鲈在4月出现较多IV期和V期个体,5月出现VI期个体,说明4—5月是鲈的繁殖期,这与李明德等(1982)对渤海鲈的产卵盛期研究结果相似。调查期间有6个月均捕获到了鲈的较小个体(<100 mm),这也表明黄河口海域的鲈的产卵期可能较长。

3.3 生长

黄河口近岸海域鲈体长—体重关系的 b 值为2.82,表明鲈为负异速生长,本结果均小于长江口鲈的 b 值(3.124 9)(纪严等,2018)和辽河口鲈的 b 值(2.954 5)(叶金清等,2020)。研究表明,性别或种群的不同(张国政等,2010)、环境、发育阶段、捕捞强度(朱立新等,2015)、胃饱满度、个体食性的转化(董婧等,2004)等因素都会导致 b 值出现差异。

鲈的肥满度受到年龄的影响,性腺尚未成熟的I~II期个体,由于摄食强度最为旺盛,积累了较多的脂肪,从而肥满度较高;而随着年龄的增长,性腺发育,由于消耗大量脂肪供给性腺发育,鲈的肥满度下降(李明德等,1982)。4—6月黄河口近岸海域鲈性腺发育,导致肥满度下降,而到了7月,产卵后的大个体离开定置网生产的浅水区域,捕获的鲈大多为低龄小个体,肥满度升高。另一方面,相关研究表明,鱼类肥满度受其饵料丰富度和外界水温等因素的影响(栾静等,2017)。7月,黄河近岸海域水温最高,饵料丰富,这也是鲈肥满度升高的重要原因。

研究表明,渐近体长 L_{∞} 的大小一定程度上可以反映鱼类种群构成的变化趋势,过度捕捞会导致鱼类种群结构小型化和低龄化,鱼类的渐近体长也会随之

减小(林龙山,2009;叶金清等,2020)。黄河口近岸海域定置网调查获取的鲈的渐近体长为608 mm,这一结果尽管小于20世纪80年代渤海鲈的渐近体长(620 mm),但高于2018年辽河口鲈的渐近体长(404.3 mm)(叶金清等,2020),说明黄河口海域鲈群体的小型化和低龄化现象有所缓解。这一变化,可能与2017年以来我国实行更为严格的伏季休渔制度有关。同时也表明,实行较为严格的休渔政策,对大中型经济鱼类资源的恢复有着积极作用。

3.4 种群死亡参数及资源利用状况

本研究结果表明,鲈种群开发率达0.64,资源处于过度利用的水平。根据我国对渤海经济鱼类可捕体长标准的相关规定(中华人民共和国农业部,2004),鲈的可捕体长在300 mm以上。而黄河口近岸海域定置网中鲈开捕体长均小于80 mm,且低于200 mm的个体占比超过70%,而达到可捕体长标准的鲈个体仅占总尾数的5.91%。这表明黄河口近岸海域定置网渔业生产对鲈的幼体损害严重,极大影响了鲈的资源补充;同时,4—5月为鲈的繁殖盛期(见3.2),也是众多鱼类的产卵期。目前,黄河口近岸海域禁渔期同渤海一致,为5月1日—8月31日,因此,从保护幼鱼和生殖群体的角度考虑,可以将渤海近岸海域禁渔期开始时间适当提前至4月中旬,使鱼类得到生长繁殖的时间和空间(胡芷君等,2020),并增大网目尺寸,减少对幼鱼的捕捞(许庆昌等,2020),从而缓解鲈资源开发过度的情况。

3.5 资源管理和增殖放流的建议

对鲈群体结构、生长、死亡和资源开发利用的结果进行分析,发现定置网生产对黄河口近岸海域鲈资源存在过度利用的现象,尤其是对幼鱼破坏更大。一方面是因为定置网网具存在囊网网目小、选择性差等缺陷,且设置在鲈育幼场海域,从而导致捕获到较多的幼鱼个体。另一方面,通过走访调查了解到,有水产企业出于养殖需求,向渔民大量收购幼鱼,从而助长了渔民对幼鱼的捕获需求。如果对定置网生产不加以管理,必然会影响到黄河口鲈的资源养护,甚至加剧黄河口渔业资源的衰退。针对定置网网具的生产特点,本研究认为对黄河口定置网生产应采取以下措施:①增加定置网的休渔时长,4—5月为鲈的产卵盛期,而定置网具往往在每年3月就进行插网生产,所以应将渤海近岸海域休渔开始时间适当提前至4月中旬;②加强对定置网具的渔政执法管理,改进定置网具和扩大网目尺寸,禁止捕捞天然苗种。

在加强对鲈资源管理的同时,要加大对其增殖放流的力度。鲈的人工繁殖技术早已发展成熟(潘海军, 2005), 可通过在黄河口海域投放苗种, 来恢复黄河口海域的鲈资源。

参 考 文 献

- CHENG Q T, ZHOU C W. Fishes of Shandong. Ji'nan: Shandong Science and Technology Press, 1997, 243-244 [成庆泰, 周才武. 山东鱼类志. 济南: 山东科学技术出版社, 1997, 243-244]
- DONG J, WANG C, TANG M Z, *et al.* Relationship between body length and body weight of Pacific sand lance in the Yellow Sea. *Fisheries Science*, 2004, 23(10): 9-11 [董婧, 王冲, 唐明芝, 等. 黄海区玉筋鱼体长和体重的关系. *水产科学*, 2004, 23(10): 9-11]
- FABENS A J. Properties and fitting of Von Bertalanffy growth curve. *Growth*, 1965, 29(3): 265-289
- FROESE R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(4): 241-253
- GULLAND J A. The fish resources of the oceans. FAO Fisheries Technical Paper No.97, 1971, 425
- HE B Q, LI H Q. Stock assessment of *Collichthys lucidus* in Pearl River estuary. *Journal of Fisheries of China*, 1988, 12(2): 124-134 [何宝全, 李辉权. 珠江河口棘头梅童鱼的资源评估. *水产学报*, 1988, 12(2): 124-134]
- HU Z J, SHAN X J, YANG T, *et al.* Preliminary evaluation of summer fishing moratorium in the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 13-21 [胡芷君, 单秀娟, 杨涛, 等. 渤海伏季休渔效果初步评价. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 13-21]
- JI Y, ZHAO F, YANG Q, *et al.* Sagittal otolith morphology and the relationship between its mass and the age of *Liza haematocheila* in the Yangtze estuary, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(3): 953-960 [纪严, 赵峰, 杨琴, 等. 长江口鲈矢耳石形态特征及质量与年龄的关系. *应用生态学报*, 2018, 29(3): 953-960]
- LI M D, WANG Z W. The age and growth of mullet in Bohai Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 1982, 4(4): 508-515 [李明德, 王祖望. 渤海梭鱼的年龄与生长. *海洋学报(中文版)*, 1982, 4(4): 508-515]
- LIN L S. Study on the fishery biology and management strategy of *Larimichthys polyactis* in the southern Yellow Sea and the East China Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009 [林龙山. 黄海南部和东海小黄鱼渔业生物学及其管理策略研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009]
- LUAN J, XU B D, XUE Y, *et al.* Size distribution and length weight relationships in *Pholis fangi* in Haizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1323-1331 [栾静, 徐宾铎, 薛莹, 等. 海州湾方氏云鲷体长与体重分布特征及其关系. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1323-1331]
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Biological resource conservation provisions in the Bohai Sea. *Gazette of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China*, 2004(4): 4-9 [中华人民共和国农业部. 渤海生物资源养护规定. 中华人民共和国农业部公报, 2004(4): 4-9]
- MOREY G, MORANTA J, MASSUTÍ E, *et al.* Weight-length relationships of littoral to lower slope fishes from the western Mediterranean. *Fisheries Research*, 2003, 62(1): 89-96
- PAN H J. Artificial reproduction technology of *Liza haematocheila*. *Journal of Aquaculture*, 2005, 26(2): 24-26 [潘海军. 梭鱼的人工繁殖技术. *水产养殖*, 2005, 26(2): 24-26]
- PAULY D, David N. ELEFAN I. A BASIC program for the objective extraction of growth parameters from length-frequency data. *Meeresforschung*, 1981, 28(4): 205-211
- PAULY D. Length-converted catch curves and the seasonal growth of fishes. *Fishbyte*, 1990, 8(3): 33-38
- PAULY D. Length-converted catch curves: A powerful tool for fisheries research in the Tropics (part 2). *Fishbyte*, 1984, 2(2): 24-30
- PAULY D. On the relationships between natural mortality, growth parameters and mean environmental temperature in 175 fish stocks. *ICES Journal of Marine Science*, 1980, 39(2): 175-192
- PAULY D. Theory and management of tropical multispecies stocks: A review, with emphasis on the Southeast Asian demersal fisheries. Metro Manila: ICLARM, 1979
- RICKER W E. Linear regressions in fishery research. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1973, 30(3): 409-434
- XU Q C, LI X S, SUN S, *et al.* Selectivity of codend mesh of beam trawl in Laizhou Bay in autumn. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 19-27 [许庆昌, 李显森, 孙珊, 等. 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]
- YANG T, SHAN X J, JIN X S, *et al.* Long-term changes in keystone species in fish community in spring in Laizhou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 1-11 [杨涛, 单秀娟, 金显仕, 等. 莱州湾春季鱼类群落关键种的长期变化. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 1-11]
- YE J Q, LIU G Z, YUAN X T, *et al.* Exploitation and protection of mullet *Liza haematocheila* stocks in Liaohe estuary based on biological characteristics. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(2): 302-307 [叶金清, 柳圭泽, 袁秀堂, 等. 基于生物学特征的辽河口鲈资源开发与保护. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(2): 302-307]
- ZHANG G Z, LI X S, ZHU J C, *et al.* The growth characteristics

- of small yellow croaker *Larimichthys polyactis* (Bleeker, 1987) under yearling in the central and southern Yellow Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 15–22 [张国政, 李显森, 朱建成, 等. 黄海中南部小黄鱼当年幼鱼生长特征的研究. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 15–22]
- ZHANG X, ZHANG X M, GAO T X, *et al.* Composition of catches by beam trawl and its seasonal variations in Yellow River estuary. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 118–124 [张旭, 张秀梅, 高天翔, 等. 黄河口海域弓子网渔获物组成及其季节变化. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 118–124]
- ZHU L X, HOU G, LIANG Z L. Parameter estimation of the weight-length relationship of Japanese anchovy in the north Yellow Sea using Bayesian methods. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 757–769 [朱立新, 侯刚, 梁振林. 基于贝叶斯方法的黄海北部鳀鱼体长与体重关系式参数估计. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 757–769]
- ZHU X H, LIAO F, LIU D, *et al.* Spatiotemporal pattern and dominant component of fish community in the Yellow River estuary and its adjacent waters. *Studia Marina Sinica*, 2001, 141–151 [朱鑫华, 缪锋, 刘栋, 等. 黄河口及邻近海域鱼类群落时空格局与优势种特征研究. *海洋科学集刊*, 2001, 141–151]
- ZHU Y D, ZHANG C L, CHENG Q T. *Fishes of the East China Sea*. Beijing: Science Press, 1993, 199–200 [朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. *东海鱼类志*. 北京: 科学出版社, 1993, 199–200]
- ZHUANG P, WANG Y H, LI S F, *et al.* *Fishes of Yangtze River estuary*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2006, 188–190 [庄平, 王幼槐, 李圣法, 等. *长江口鱼类(精)*. 上海: 上海科技出版社, 2006, 188–190]

(编辑 马璀璨)

Biological Characteristics of *Liza haematocheila* in the Shallow Coastal Waters of the Yellow River Estuary

ZHANG Jiaxu^{1,3}, WANG Jun^{1,2①}, NIU Mingxiang^{1,2}, ZUO Tao^{1,2}, CHANG Wen⁴, CHEN Ruisheng¹

(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, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao, Shandong 266237, China; 3. Dongying Natural Resources and Planning Bureau Dongying Port Economic Develop Area Substation, Dongying, Shandong 257020; 4. Marine Development Research Institute, Dongying, Shandong 257091, China)

Abstract In recent years, fishery species have decreased in size and quality in the Yellow River estuary seas due to the effects of climate change and human activities, such as water and sediment regulation of the Yellow River, overfishing, and sewage discharge, among others. At the same time, the fishery resource structure has changed greatly: Small-sized fish with low value, shrimps and crabs became the main catches. To conserve natural resources and maintain local fishery harvests, conservation efforts such as stock enhancement and fishing quotas have been employed. Research on the biological characteristics of important fish can provide a scientific basis for the rational utilization and stock enhancement of fishery resources in the future, and it can also offer support for making relevant fishery policies.

Liza haematocheila is an economically important fishery species in the Yellow River estuary and mainly feeds on zooplankton, phytoplankton, and organic detritus, which limits eutrophication and promotes energy and carbon cycling at the ecosystem level. The species plays an important role in ecosystem function and the maintenance of biodiversity. This study investigated the biological characteristics of *L. haematocheila* to provide a scientific basis for its conservation and rational

① Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

utilization in the Yellow River estuary. Furthermore, it can provide basic biological data for the study of ecological restoration in the Yellow River estuary.

This study evaluated the distribution of body length and weight, the relationship between body length and weight, reproduction, growth, death, and development. All of the analyses were based on sampling data from set nets between April and November 2020.

The body length range of *L. haematocheila* was 45~460 mm, the average body length was 149 mm, and the modal body length range was 55~185 mm. The body weight range was 2~1100 g, the average body weight was 83 g, and the modal body weight range was 2~80 g. Both the average body length and body weight were the highest in May and the lowest in September. Overall, small individuals were the most common, and individuals with a body length of less than 200 mm accounted for more than 78%. Analysis of variance showed significant monthly differences in both average body length and weight of *L. haematocheila*. The relationship between body length and body weight showed a strong correlation within and between months [$W=3.17\times 10^{-5}L^{2.82}$, ($R^2=0.9805$, $n=984$)]. The growth of *L. haematocheila* was negatively allometric, with the growth of body length being faster than that of body weight.

The body condition of *L. haematocheila* decreased with time, though it increased in July and fluctuated with a downward trend from July to November. The nadir body condition was observed in June (1.102 ± 0.173) and the peak body condition was observed in July (1.535 ± 0.467).

The rate of gonadal development varied from month to month, and the proportion of individuals who did not reach gonadal maturity was large, with an undeveloped gonad proportion of more than 50% per month. There was a peak spawning period from April to May.

The growth curve of *L. haematocheila* was fitted, and its growth parameters were estimated using the ELEFAN method. The total death coefficient of the population was estimated using a length-converted catch curve, the natural death coefficient was estimated using the empirical formula of Pauly, and the population development rate was calculated. The results indicated that the asymptotic length (L_∞) of *L. haematocheila* was 608 mm, the growth rate (K) was 0.31 a^{-1} , total death coefficient (Z) was 1.42 a^{-1} , natural death coefficient (M) was 0.51 a^{-1} , fishing death coefficient (F) was 0.91 a^{-1} , and its population development rate (E) was 0.64. The *L. haematocheila* resource was overfished in the shallow coastal waters of the Yellow River estuary, and its open fishing length (L_{50}) was only 57.4 mm in this production survey.

Fixed-net harvesting led to overfishing in the Yellow River estuary from April to November 2020, with juvenile fish and supplementary stocks experiencing the greatest impact. We should reconsider the management strategies for *L. haematocheila* in the Yellow River estuary, and promote stock enhancement at the same time. Artificial propagation technology for *L. haematocheila* should be considered for supplementing *L. haematocheila* in the Yellow River estuary seas. Research on the release time, release of krill size, population characteristics, growth, and development should be addressed to provide an informed and scientific basis for stock enhancement.

Key words Yellow River estuary; Set nets; *Liza haematocheila*; Fishery biological characteristics

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220111003

http://www.yykxjz.cn/

刘忠航, 常志强, 袁晟译, 李健. 不同规格双齿围沙蚕对沉积物氮磷赋存形态影响分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 30-39
LIU Z H, CHANG Z Q, YUAN S Y, LI J. Analysis of influence of different sizes of *Perinereis aibuhitensis* on the occurrence form of nitrogen and phosphorus in sediments. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 30-39

不同规格双齿围沙蚕对沉积物 氮磷赋存形态影响分析*



刘忠航^{1,2} 常志强² 袁晟译^{1,2} 李健^{2①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

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
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 沉积物作为养殖系统中氮磷的蓄积库,对养殖水体氮磷水平调控发挥着重要作用,氮磷赋存形态影响其在沉积物中的吸附和释放。为研究双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis* Grube)对海水养殖池塘沉积物氮磷赋存形态的影响,以400 g/m²生物量设计不同规格双齿围沙蚕养殖实验,分别为小规格[(0.7±0.3) g]、中规格[(2.5±0.3) g]和大规格[(4.3±0.3) g]处理组,不放养沙蚕设为对照组,实验周期为45 d,分别于实验初、末期采集不同深度的沉积物,测定其中氮磷各赋存形态的含量。结果显示,不同规格双齿围沙蚕均显著提高了沉积物上、中层离子交换态氮(IEF-N)、弱酸可浸取态氮(WAEF-N)和强碱可浸取态氮(SAEF-N)含量($P<0.05$),中、小规格处理组显著降低了沉积物中强氧化剂可浸取态氮(SOEF-N)含量($P<0.05$);不同规格双齿围沙蚕均显著提高了沉积物上、中层非磷灰石无机磷(NAIP)含量($P<0.05$),中、小规格处理组显著降低了沉积物中有机磷(OP)含量($P<0.05$)。本研究表明,中、小规格的双齿围沙蚕可以加速沉积物中有机氮磷的矿化,促进沉积物其他形态氮磷向上迁移,使其更容易分解和释放,进而被水体浮游植物所利用。

关键词 双齿围沙蚕; 生物扰动; 氮赋存形态; 磷赋存形态; 沉积物

中图分类号 Q178.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0030-10

中国是水产养殖大国,养殖总面积高达7.108 5×10⁶ hm² (农业农村部渔业渔政管理局等, 2020),但如今开展水产养殖工作多以追求高效益为主,高密度、高投入的养殖模式占比逐年增高。人们在追求养殖高效益时往往忽略了其带来的负面环境问题,其中氮磷污染导致水体富营养化现象尤为突出。在养殖过程中,养殖环境输入的氮磷主要来自饵料投喂,而大部分氮磷因无法被养殖生物利用而存在于底部沉积物

中(李玉全等, 2007; 赵艳飞等, 2021; 刘梅等, 2021)。沉积物作为氮磷蓄积的主要场所,其在养殖环境的氮磷迁移过程中发挥着重要作用。研究发现,当上覆水中氮磷营养盐得到控制时,沉积物会有向水体释放营养盐的风险(杜奕衡等, 2018),沉积物的再悬浮会使内源性营养盐向水体释放(陈聚法等, 2007),导致水体营养盐升高,易引起富营养化现象。沉积物氮磷赋存形态包括离子交换态氮(IEF-N)、弱酸可浸取态氮

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”课题(2019YFD0900403)、国家自然科学基金面上项目(31873039)、国家现代农业产业技术体系建设专项-虾蟹产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46; 2021XT06)共同资助。刘忠航, E-mail: 820537620@qq.com

① 通信作者: 李健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-01-11, 收修改稿日期: 2022-01-24

(WAEF-N)、强碱可浸取态氮(SAEF-N)和强氧化剂可浸取态氮(SOEF-N) (吕晓霞等, 2004)。沉积物磷赋存形态包括非磷灰石无机磷(NAIP)、磷灰石无机磷(AP)、无机磷(IP)、有机磷(OP)和总磷(TP) (郑余琦等, 2017)。氮磷赋存形态决定沉积物中氮磷的吸附和释放, 研究沉积物氮磷赋存形态及其垂直分布, 对明确沉积物中氮磷的转化和迁移, 控制沉积物中氮磷营养盐释放有重要意义。

底栖动物是沉积物有机组成的一部分, 其生物扰动是影响沉积物氮磷释放的重要因素(Sun *et al.*, 2017)。双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis* Grube)作为典型的多毛类底栖动物, 是我国人工养殖的沙蚕种类之一, 其生活在沉积物中, 以腐殖质和底栖藻类为食, 可以摄食沉积物中的有机颗粒物(Gómez *et al.*, 2019), 在养殖系统内可以利用养殖生物的残饵粪便(Fang *et al.*, 2016), 从而降低沉积物氮磷含量。研究发现, 双齿围沙蚕可通过摄食有机碎屑改善池塘底质, 能够加快沉积物无机氮磷向水体的释放速度(Chen *et al.*, 2016), 加速浮游植物的繁殖速率(邓锦松等, 2007)。双齿围沙蚕还可通过筑穴和生物扰动改变沉积物的物理结构, 将上覆水中的溶解氧运送至沉积物深处, 提高沉积物的氧化还原电位(李磊等, 2020), 这可进一步影响沉积物中氮磷各种赋存形态的转化。有研究表明, 不同规格双齿围沙蚕在底质中的移动距离差异显著(孟珊等, 2020), 而且其泵水量、泵水速率、轴向爬行速度及营养盐溶出效率存在显著差异(房景辉等, 2021)。目前, 关于各湖泊沉积物氮磷赋存形态和底栖生物扰动影响沉积物中氮磷营养盐释放的研究(Mermillod-Blondin *et al.*, 2006)较多, 但底栖生物对沉积物氮磷赋存形态分布的影响研究较少。双齿围沙蚕最佳放养密度为 330~500 g/m² (Lv *et al.*, 2018)。综合考虑已有资料, 以 400 g/m² 生物量设置大中小 3 个规格组, 研究不同规格双齿围沙蚕对沉积物氮磷赋存形态的影响。

本研究通过测定沉积物垂直方向各氮磷赋存形态含量, 探究双齿围沙蚕在沉积物氮磷各赋存形态转化过程中发挥的作用, 评估其作为生物修复物种应用于污染治理的可行性, 为绿色水产养殖和环境治理提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验在山东青岛市即墨金口即发基地开展, 养殖

周期为 45 d。实验用双齿围沙蚕均为山东乳山沙蚕养殖场提供, 实验开始前, 先将双齿围沙蚕暂养 3 d, 挑选有活力的健康个体进行称重分组。实验总共分 4 组, 以 400 g/m² 生物量设置小规格组[(0.7±0.3) g]、中规格组[(2.5±0.3) g]和大规格组[(4.3±0.3) g]为处理组, 不放沙蚕为对照组, 每组 3 个平行。在室内用 67 cm × 46 cm × 44 cm 的塑料箱养殖, 铺泥厚度为 20 cm, 底泥采自即墨金口养虾池, 于阳光下晒干, 去除大块碎石杂质, 充分混匀后使用。水深为 15 cm, 注水后培养 7 d, 使沉积物恢复自然状态。全程不投喂, 保持充氧并定期补充淡水。实验结束后, 将水缓缓排干, 用内径为 1.5 cm PVC 管采集底泥样品, 采集样品用隔板分为上层(0~6 cm)、中层(6~13 cm)和下层(13~20 cm)。

1.2 分析方法

采集沉积物样品于 60℃ 烘箱烘干, 过 100 目筛, 放入密封袋中于 4℃ 冰箱保存。参考马红波等(2003)在 Ruttenberg (1992)提出的方法上改良的分级浸提方法测定不同赋存形态氮, 参考 Ruban 等(2001)的方法测定不同赋存形态的磷。

1.2.1 沉积物不同赋存形态氮测定 (1) 在 50 mL 离心管中称取 1 g 干沉积物, 加入 20 mL 1 mol/L KCl, 振荡 2 h, 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液得到 IEF-N 浸提液。滤饼加入 10 mL 去离子水洗涤 1 次, 离心后于 60℃ 烘箱烘干备用。

(2) 将步骤(1)烘干的样品中加入 20 mL HAc-NaAc (pH=5), 振荡 6 h, 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液得到 WAEF-N 浸提液。滤饼加入 10 mL 去离子水洗涤 1 次, 离心后于 60℃ 烘箱烘干备用。

(3) 将步骤(2)烘干的样品中加入 20 mL 0.1 mol/L NaOH, 振荡 17 h, 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液得到 SAEF-N 浸提液。滤饼加入 10 mL 去离子水洗涤 1 次, 离心后于 60℃ 烘箱烘干备用。如有样品的浸提液呈现黄褐色, 需进行消解处理: 取浸提液 2 mL, 加入 5 mL H₂O₂, 氧化 15 min 在电热板上加热煮沸至近干, 冷却后用蒸馏水定容至 50 mL, 得到消解后 SAEF-N 浸提液。

(4) 将步骤(3)处理后的样品中加入 20 mL 碱性过硫酸钾氧化剂(0.24 mol/L NaOH, 20 g/L K₂S₂O₈), 振荡 2~3 h, 放入高压灭菌锅内氧化 1 h (110~115℃), 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液得到 SOEF-N 浸提液。

1.2.2 沉积物不同赋存形态磷测定 (1) 在 50 mL 离心管中称取 400 mg 干沉积物, 加入 20 mL 1 mol/L

NaOH, 振荡 16 h, 2000 g 离心 15 min。

(2) 在 50 mL 离心管中加入步骤(1)中提取的上清液 10 mL, 加入 4 mL 3.5 mol/L HCl, 大力振荡 20 s, 静置 16 h, 200 g 离心 15 min, 收集上清液得到 NAIP 浸提液。

(3) 用 12 mL 1 mol/L NaCl 洗涤步骤(1)中获得的滤饼, 振荡 5 min, 2000 g 离心 15 min, 弃上清液。重复洗涤 1 次, 加入 20 mL 1 mol/L HCl, 振荡 16 h, 2000 g 离心 15 min, 收集上清液得到 AP 浸提液。

(4) 在 50 mL 离心管中称取 400 mg 干沉积物, 加入 20 mL 1 mol/L HCl, 振荡 6 h, 2000 g 离心 15 min, 收集上清液得到 IP 浸提液。

(5) 加入 12 mL 去离子水洗涤步骤(4)中获得的滤饼, 振荡 5 min, 2000 g 离心 15 min, 弃上清液。重复洗涤 1 次, 让残渣在通风的干燥柜中 80℃ 干燥(管中)。将管放入超声波浴中 10 s, 然后转移到瓷坩埚中。在 450℃ 下煅烧 3 h, 将冷却的灰倒入新的 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 1 mol/L HCl, 振荡 16 h, 2000 g 离心 15 min, 收集上清液得到 OP 浸提液。

(6) 在陶瓷坩埚中称取 400 mg 干沉积物, 在 450℃ 下煅烧 3 h, 将冷却的灰倒入 50 mL 离心管中。加入 20 mL 3.5 mol/L HCl, 振荡 16 h, 2000 g 离心 15 min, 收集上清液得到 TP 浸提液。

用营养盐自动分析仪(Skalar SAN^{plus} Analyzer, 荷兰)检测各赋存形态氮浸提液中的 TN 含量和各赋存形态磷浸提液中 PO₄³⁻ 浓度。

1.3 数据处理与分析

数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用

统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较检验进行显著性评价($P < 0.05$), 使用 OriginPro 2018 软件作图。

2 结果

实验结束后, 所有处理组双齿围沙蚕生物量均有所降低, 但都保持在初始值 80% 以上。从表 1 可以看出, 中规格组生物量显著高于大规格组($P < 0.05$), 小规格组与中、大规格组差异不显著($P > 0.05$)。各处理组水体中 TN 含量均显著高于对照组($P < 0.05$); TP 含量也均显著高于对照组($P < 0.05$), 其中, 中规格组 TP 含量显著高于其他 2 个处理组($P < 0.05$)。

2.1 沉积物中各赋存形态氮含量

实验初始阶段, 各处理组和对照组中各形态氮含量相近, 无显著差异($P > 0.05$)(表 2)。如图 1 所示, 实验结束后, 上层小、中规格组 IEF-N 含量显著高于对照组($P < 0.05$), 大规格组高于对照组但无显著差异($P > 0.05$); 中层各处理组均显著高于对照组($P < 0.05$); 下层各处理组高于对照组但无显著差异($P > 0.05$)。实验结束后, 上层小、中规格组 WAEF-N 含量显著高于对照组($P < 0.05$), 大规格组高于对照组但无显著差异($P > 0.05$); 中层各处理组均显著高于对照组($P < 0.05$); 下层各处理组高于对照组但无显著差异($P > 0.05$)。各处理组增大了中、上层 WAEF-N 占比, 降低了下层占比。实验结束后, 上、下层各处理组 SAEF-N 含量显著高于对照组($P < 0.05$), 中层小、中规格组显著高于对照组($P < 0.05$), 大规格组高于对照组但无显著差异($P > 0.05$)。各处理组增大了上层

表 1 实验初、末双齿围沙蚕生物量和水体 TN 和 TP 含量(平均值±标准差)

Tab.1 Biomass of *P. aibuhitensis* and contents of TN and TP in the water at the beginning and the end of the experiment (Mean±SD)

组别 Group	初始阶段 Initial stage			结束阶段 Final stage		
	生物量 Biomass /g	TN /(μg/L)	TP /(μg/L)	生物量 Biomass /g	TN /(μg/L)	TP /(μg/L)
对照组 Control	—	827.97±107.80	57.52±6.58	—	1 177.76±262.66 ^a	81.75±17.12 ^a
小规格组 Small size	111.74±1.47	856.95±46.12	60.19±3.20	93.55±3.22 ^{ab}	3 414.55±134.37 ^b	134.26±12.17 ^b
中规格组 Medium size	111.08±0.98	799.42±37.63	61.22±2.92	97.15±2.39 ^b	3 575.06±209.81 ^b	172.19±16.20 ^c
大规格组 Large size	110.83±0.89	799.24±88.86	60.33±4.69	88.59±2.05 ^a	3 278.94±200.27 ^b	111.87±11.37 ^b

注: 同一列不同字母代表数据差异显著($P < 0.05$), 无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下同。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), no letters indicate no significant differences ($P > 0.05$). The same as below.

表 2 初始沉积物中各赋存形态氮磷含量(平均值±标准差) (mg/kg)
Tab.2 The contents of nitrogen and phosphorus of different forms in initial sediments (Mean±SD) (mg/kg)

组别 Group	各赋存形态磷含量 Contents of phosphorus of different forms					各赋存形态氮含量 Contents of nitrogen of different forms			
	NAIP	AP	IP	OP	TP	IEF-N	WAEF-N	SAEF-N	SOEF-N
对照组 Control	31.86±2.59	25.00±3.27	44.68±3.14	45.06±2.09	94.56±4.93	4.85±1.98	10.26±0.87	30.86±2.12	136.26±1.29
小规格组 Small size	31.71±1.82	26.11±2.93	46.93±1.12	43.89±1.75	95.16±2.66	4.95±0.72	10.80±1.26	30.81±1.17	137.11±0.51
中规格组 Medium size	31.67±1.68	26.16±3.29	46.70±0.20	45.52±0.99	92.99±6.42	4.37±0.48	10.10±0.17	32.26±1.20	136.73±1.52
大规格组 Large size	31.56±1.48	26.13±2.58	46.41±3.02	47.09±1.71	96.26±5.20	4.19±0.81	10.49±1.27	32.78±0.97	136.63±0.55

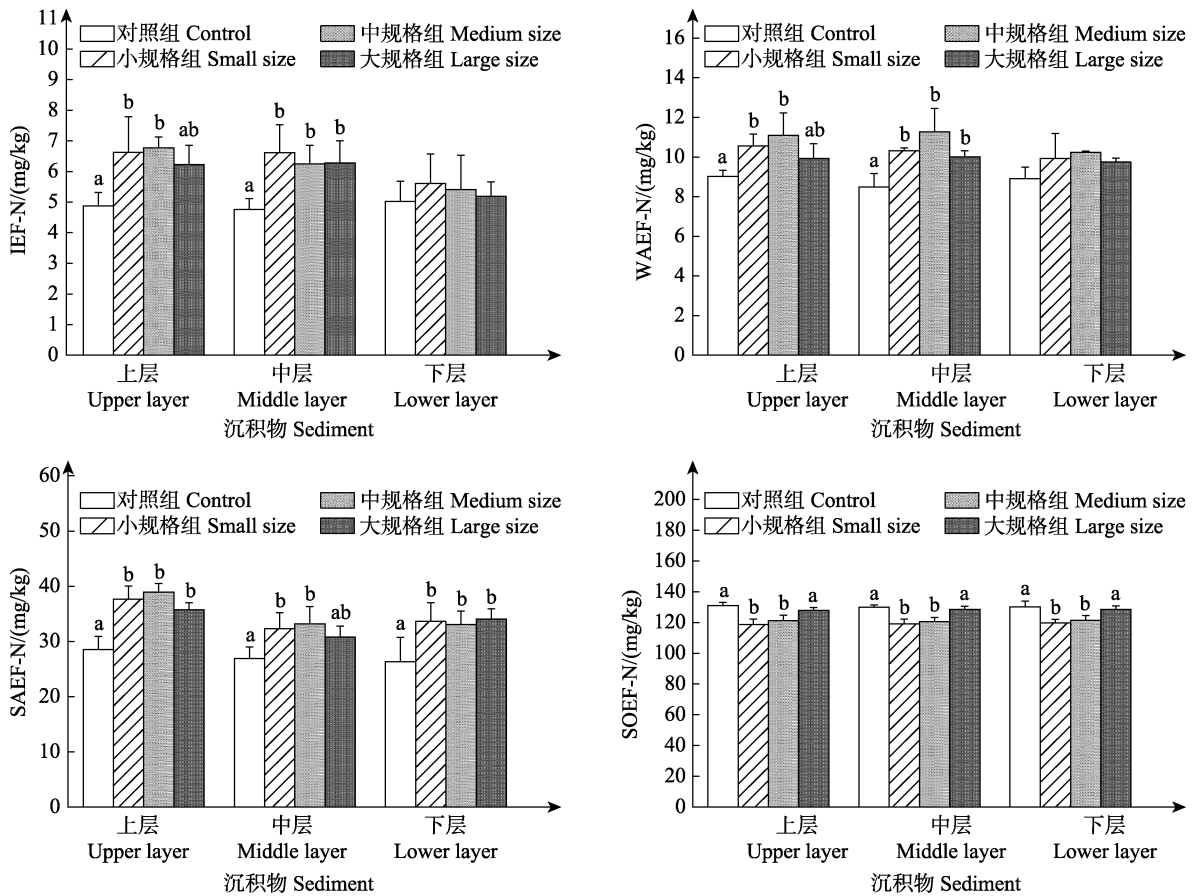


图 1 各层沉积物中各赋存形态氮含量
Fig.1 The nitrogen content of different forms in sediments of each layer

不同字母表示不同规格双齿围沙蚕在同层中数据差异显著(P<0.05)。下同。
Column with different letters were significantly different among different sizes of *P. aibuhitensis* Grube in the same layer of sediment (P<0.05). The same as below.

SAEF-N 占比, 降低了中层占比, 对下层占比影响较小。实验结束后, 各层小、中规格组 SOEF-N 含量显著低于对照组(P<0.05), 大规格组低于对照组但无显著差异(P>0.05)。

2.2 沉积物中各赋存形态磷含量

实验初始阶段, 各处理组和对照组中各形态磷含量相近, 无显著差异(P>0.05) (表 1)。如图 2 所示, 实验结束后, 上层各处理组 NAIP 含量均显著高于对

照组($P<0.05$),其中,中规格组 NAIP 含量最高,显著高于其他处理组($P<0.05$);中层各处理组 NAIP 含量均显著高于对照组($P<0.05$);下层各组间无显著差异($P>0.05$)。实验结束后,各层各处理组与对照组之间 AP 含量未见显著差异($P>0.05$)。实验结束后,上层各处理组 IP 含量均显著高于对照组,其中,中规格组含量最高;中、下层各处理组与对照组之间 IP 含量未见显著

差异($P>0.05$)。实验结束后,中、小规格组各层 OP 含量均显著低于对照组($P<0.05$)。大规格组下层显著低于对照组($P<0.05$),但中、上层无显著差异($P>0.05$)。实验结束后,各处理组的上层 TP 含量均高于对照组,其中,中、大规格组显著高于对照组($P<0.05$);中、下层沉积物中的中、小规格处理组显著低于对照组($P<0.05$)。

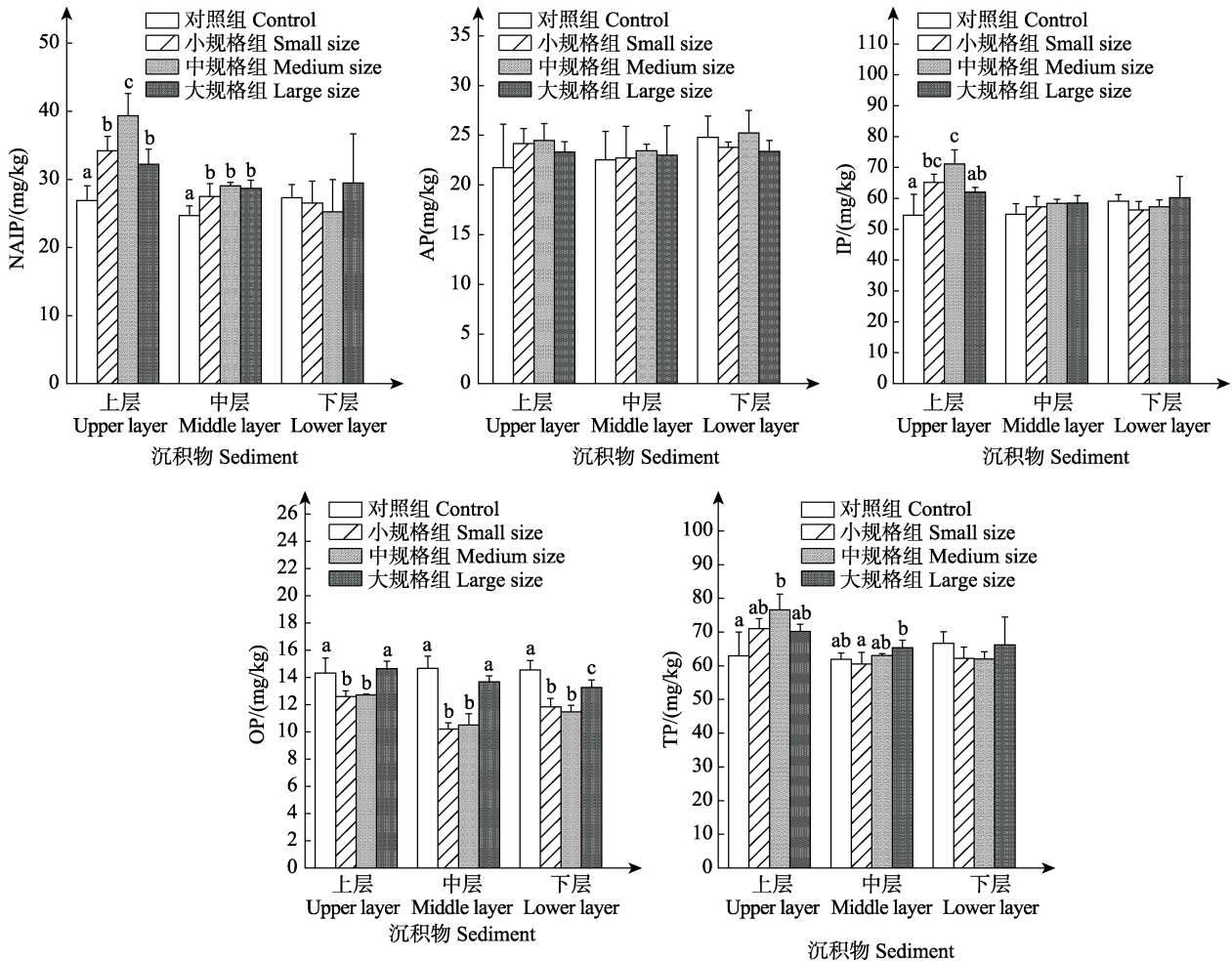


图2 各层沉积物中各赋存形态磷含量

Fig.2 The phosphorus content of different forms in sediments of each layer

3 讨论

3.1 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态氮的影响

3.1.1 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态氮含量的影响 本研究中,对照组各形态氮略有降低,这可能是因为实验末期温度较实验初期有所升高,促进了沉积物中氮的释放(许佟等,2020)。放养双齿围沙蚕后,水体中 TN 含量显著增加,表明在双

齿围沙蚕的扰动下,加速了沉积物中氮的释放。

IEF-N 是沉积物各形态氮中最易释放的一种氮,它主要来自于上覆水中硝酸盐的吸附和沉积物中有机氮的分解(马红波等,2003)。双齿围沙蚕的排泄和微生物对有机氮的降解导致沉积物中氨氮升高,从而提高了各处理组 IEF-N 含量。各处理组上、中层 IEF-N 含量显著高于对照组可能是因为双齿围沙蚕排泄主要集中在上、中层,使得上、中层 IEF-N 含量增加量更高。中、小规格组 IEF-N 增加量高于大规格组。

WAEF-N 主要包括与 CO_3^{2-} 结合的氮,受沉积物

中 CO_3^{2-} 浓度的影响(张硕等, 2020)。本研究中, 处理组 WAEF-N 含量升高可能由于双齿围沙蚕排泄产生的 NH_4^+ 一部分与沉积物中 CO_3^{2-} 结合, 使得 WAEF-N 含量较对照组显著升高, 这与 IEF-N 含量的变化趋势相吻合。各层 WAEF-N 含量增加量低于 IEF-N 含量增加量可能是受到沉积物中 CO_3^{2-} 浓度的限制。中规格组 WAEF-N 增加量最多。

SAEF-N 主要是指沉积物中铁锰结合态的氮, 它的形成和沉积物中氧化还原电位有关(周天宇等, 2018)。双齿围沙蚕通过凿穴泵水改变了沉积物内部的氧化还原电位(侯颖等, 2020), 将更多 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} , 促进了 SAEF-N 的生成。本研究中, 中、上层中的中、小规格 SAEF-N 含量高于大规格组, 下层低于大规格组, 可能是因为中、小规格沙蚕凿穴能力较弱, 洞穴多分布于中、上层, 大规格沙蚕洞穴更深, 底部氧化还原电位提高的更多。上、中层中的中规格组 SAEF-N 含量最高, 可能是中规格双齿围沙蚕生命活动使上层溶解氧高的水更多地流入沉积物中, 促进了更多 SAEF-N 的生成。

SOEF-N 主要指沉积物中以有机形态存在的氮, 这种形态氮一般是各赋存形态氮的主要形式(杨玉玮等, 2012)。双齿围沙蚕通过大量摄食可显著降低沉积物中有机态的氮, 使有机态的氮分解为 NH_4^+ , 大部分以 IEF-N 存在于沉积物中。本实验中, 中、小规格组对 SOEF-N 含量降低明显, 这可能是因为中、小规格沙蚕发育快, 摄食需求大, 对有机氮的摄取相应增加。大规格组降低不显著, 但也有一定程度的降低。

3.1.2 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态氮转化的影响 双齿围沙蚕降低了 SOEF-N 的含量, 促进了其向其他以 SAEF-N 为主的赋存形态转变。这使沉积物中氮更容易被释放, 进一步为养殖系统所利用, 也说明双齿围沙蚕主要通过摄食和改变沉积物溶解氧环境来影响不同赋存形态氮的含量变化。中、小规格处理组对氮转化均有明显效果。

3.2 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态磷的影响

3.2.1 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态磷含量的影响 放养双齿围沙蚕后, 水体中 TP 含量显著增加, 证明在双齿围沙蚕的扰动下, 同样加速了沉积物中磷的释放。中规格组较其他 2 个处理组有更显著的加速效果。

NAIP 是指在沉积物中与 Fe、Mn、Al 氧化物及其氢氧化物结合的磷, 这种形态的磷是沉积物中易于释放的磷。研究表明, 双齿围沙蚕在底部水体溶解氧

低于 1.47 mg/L 时, 启动径向起伏, 开始泵水, 提高沉积物的溶解氧水平(房景辉等, 2021)。溶解氧升高使沉积物中更多的 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 转化, Fe^{3+} 与上覆水中活性磷酸盐结合, 进一步生成 NAIP (张小勇等, 2013)。中、上层各处理组中的 NAIP 含量显著高于对照组可能是双齿围沙蚕凿穴泵水主要集中在中、上层, 使得中、上层可以结合更多的磷酸盐。在上层中规格组 NAIP 含量显著高于其他 2 个处理组, 可能由于中规格双齿围沙蚕泵水效率更高, 对氧化还原电位的提升更多。

AP 是指在沉积物中与钙结合的磷, 它被认为是一种比较惰性的一种形态, 一般在沉积物中稳定存在, 在自然状态下不易分解。它的含量高低主要与沉积物的来源有关。本研究中各处理组与对照组间未见显著差异, 这可能与养殖时间短和其不易分解的特性有关。

IP 是指在沉积物中所有的无机磷, 主要包括 NAIP 和 AP。各处理组中、上层 IP 含量略高于对照组, 因为各组 AP 含量无显著差异, 所以 IP 含量变化趋势和 NAIP 含量的变化趋势相似。

OP 是指在沉积物中有机磷, 有机磷的矿化是沉积物向水体释放磷的另一重要途径(郑余琦等, 2017)。OP 和 NAIP 是沉积物中比较活跃的磷形态, 它们的含量和占比与沉积物中磷的释放密切相关(刘永九等, 2021)。双齿围沙蚕可以摄食底部沉积物有机质, 通过消化吸收将其“搬运”到表层(Tian *et al*, 2019)。正常情况下, 双齿围沙蚕处理沉积物的速率可达 1.92 g/(g·d) (张青田等, 2008)。此外, 双齿围沙蚕的洞穴为微生物提供附着位点, 其分泌的黏液也可促进微生物的繁殖(Dale *et al*, 2019), 这可以加快底部 OP 的分解。由图 2 可以看出, 中、小规格对沉积物中 OP 含量降低显著, 大规格组略有降低但不显著, 可能是与中、小规格新陈代谢快、摄食旺盛有关。此外, 实验结束时, 大规格组双齿围沙蚕生物量较其他 2 个处理组有所降低, 这也可导致沉积物中有机磷的升高。

TP 是指沉积物中的总磷, 反映出沉积物中磷的总体变化。本研究中, 双齿围沙蚕的生物扰动使得沉积物上层总磷含量增加, 主要受 NAIP 含量增加的影响; 中、下层总磷含量降低, 主要受 OP 含量降低的影响。

3.2.2 不同规格双齿围沙蚕对沉积物中各赋存形态磷转化的影响 本研究中, 双齿围沙蚕加快了有机磷的矿化, 生成的磷大部分以 NAIP 存在于沉积物中。这种变化趋势和氮的变化趋势相吻合, 都促进了有机态的分解和 Fe、Mn、Al 氧化物及其氢氧化物结合态的生成。本研究中, 中、小规格处理组对磷转化均有明显的效果, 这也和氮转化的变化相吻合。

3.3 展望

双齿围沙蚕促进了沉积物中有机氮磷的矿化,使得沉积物中一部分氮磷向上迁移,提高了沉积物上层可利用氮磷的占比。沉积物中氮磷进一步被一些藻类和水生植物利用,从而降低沉积物中氮磷含量,以达到降低沉积物内源磷负荷的目的。双齿围沙蚕具有与其他水生植物和藻类联合修复环境污染的潜力。研究表明,狐尾藻(*Myriophyllum spicatum* L.)和金鱼藻(*Ceratophyllum demersum* L.)均能显著降低沉积物中NAIP的含量(周楠楠等, 2021),去除率分别为15.7%和8.7%。菹草(*Potamogeton crispus* L.)、粉绿狐尾藻(*M. aquaticum*)均能有效吸收沉积物中的磷(桑雨璇等, 2020)。投放双齿围沙蚕和马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)可以形成立体修复模式,降低沉积物中氮磷含量(江小桃等, 2012)。孙怡陶等(2021)研究发现,沉积物越疏松,内源磷越容易释放于水中,双齿围沙蚕的扰动一定程度上起到了松土的作用,这也可以促进内源磷的释放。此外,在养殖系统中,双齿围沙蚕可以丰富养殖系统的营养层级,使系统中食物链食物网更加复杂,提高系统的稳定性和能量利用效率。养殖系统营养层级越高,对能量利用效率越高(李卓佳等, 2012, 孙云飞等, 2015)。双齿围沙蚕在利用一部分的残饵粪便外,可以将沉积物中氮磷营养盐释放于水体中,促进藻类繁殖,为养殖生物提供更多的饵料。在池塘养殖的早期,双齿围沙蚕的扰动可以使水更快肥起来;在养殖后期,双齿围沙蚕可以减少沉积物中氮磷的累积量,使池塘保持良好的养殖条件。

4 结论

双齿围沙蚕的生物扰动改变了沉积物内部的物理化学条件,进一步影响了不同氮磷赋存形态的垂直分布。双齿围沙蚕通过摄食降低了沉积物中有机氮磷的含量,通过凿穴泵水等活动,提高了沉积物氧化还原电位,使沉积物生成了更多的SAEF-N和NAIP。双齿围沙蚕的生物扰动增加了沉积物中易被利用的氮磷赋存形态占比,使沉积物中氮磷更容易释放和利用,降低了沉积物中的氮磷负荷,中、小规格均有良好的影响效果。双齿围沙蚕可以作为良好的生物修复物种应用于环境治理中。

参 考 文 献

Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020.

- Beijing: China Agriculture Press, 2020 [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. 2020中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- CHEN J F, ZHAO J, SUN Y, *et al.* Dynamic mechanism of sediment resuspension with its effects on content of nutrients in water in the shellfish culture area of Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(3): 105–111 [陈聚法, 赵俊, 孙耀, 等. 桑沟湾贝类养殖水域沉积物再悬浮的动力机制及其对水体中营养盐的影响. *海洋水产研究*, 2007, 28(3): 105–111]
- CHEN M, DING S, LIU L, *et al.* Fine-scale bioturbation effects of tubificid worm (*Limnodrilus hoffmeisteri*) on the lability of phosphorus in sediments. *Environmental Pollution*, 2016, 219: 604–611
- DALE H, TAYLOR J D, SOLAN M, *et al.* Polychaete mucopolysaccharide alters sediment microbial diversity and stimulates ammonia-oxidising functional groups. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(2), doi: 10.1093/femsec/fiy234
- DENG J S, MA S, NUI H X, *et al.* An experiment of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) culture by inputting polychaetes (*Perinereis aibuhitensis*). *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007, 29(2): 135–141 [邓锦松, 马胜, 牛化欣, 等. 投放双齿围沙蚕养殖中国明对虾实验研究. *海洋湖沼通报*, 2007, 29(2): 135–141]
- DU Y H, LIU C, CHEN K N, *et al.* Occurrence and internal loadings of nitrogen and phosphorus in the sediment of Lake Baiyangdian. *Journal of Lake Sciences*, 2018, 30(6): 1537–1551 [杜奕衡, 刘成, 陈开宁, 等. 白洋淀沉积物氮磷赋存特征及其内源负荷. *湖泊科学*, 2018, 30(6): 1537–1551]
- FANG J H, MENG S, YUAN W, *et al.* Effects of temperature on the motion behavior of *Perinereis aibuhitensis* of different sizes. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1251–1262 [房景辉, 孟珊, 袁伟, 等. 温度对不同规格双齿围沙蚕运动行为特征的影响. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1251–1262]
- FANG J H, ZHANG J H, JIANG Z J, *et al.* Environmental remediation potential of *Perinereis aibuhitensis* (Polychaeta) based on the effects of temperature and feed types on its carbon and nitrogen budgets. *Marine Biology Research*, 2016, 12(6): 1–12
- GÓMEZ S, HURTADO C F, ORELLANA J. Bioremediation of organic sludge from a marine recirculating aquaculture system using the polychaete *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866). *Aquaculture*, 2019, 507: 377–384
- HOU Y, HAN X M, FU F W, *et al.* The influence of bioturbation by Polychaete *Perinereis aibuhitensis* on the distribution of AVS in sediment. *China Fishery Quality and Standards*, 2020, 10(3): 31–36 [侯颖, 韩雪萌, 付发武, 等. 双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)的生物扰动作用对沉积物中AVS分布的影响. *中国渔业质量与标准*, 2020, 10(3): 31–36]
- JIANG X T, TAN Y H, KE Z X, *et al.* Effects of introduction of

- Perinereis aibuhitensis* and *Sargassum hemiphyllum* on nitrogen and phosphorus in overlying water. *Journal of Tropical Oceanography*, 2012, 31(4): 129–134 [江小桃, 谭焯辉, 柯志新, 等. 投放双齿围沙蚕和马尾藻对养殖底泥上覆水氮、磷含量的影响. *热带海洋学报*, 2012, 31(4): 129–134]
- LI L, DAI M, WANG S J, *et al.* Study on bioremediation of *Perinereis aibuhitensis* aged shellfish culture sediments. *Ecology and Environmental Sciences*, 2020, 29(4): 794–801 [李磊, 戴明, 王帅杰, 等. 沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)对老化贝类养殖沉积物的生物修复研究. *生态环境学报*, 2020, 29(4): 794–801]
- LI Y Q, LI J, WANG Q Y, *et al.* Effect of stocking density on input and output of nitrogen and phosphorus in super-intensive shrimp farming pond. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 926–931 [李玉全, 李健, 王清印, 等. 养殖密度对工厂化对虾养殖池氮磷收支的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 926–931]
- LI Z J, YU W, ZHU C B, *et al.* Study on nitrogen and phosphorus budgets of experimental enclosures with shrimp monoculture and shrimp-tilapia polyculture. *Journal of Safety and Environment*, 2012, 12(4): 50–55 [李卓佳, 虞为, 朱长波, 等. 对虾单养和对虾-罗非鱼混养试验围隔氮磷收支的研究. *安全与环境学报*, 2012, 12(4): 50–55]
- LIU M, YUAN J L, NI M, *et al.* A comparative study on nitrogen and phosphorus budget and aquaculture effect of *Micropterus salmoides* in two modes. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(3): 718–728 [刘梅, 原居林, 倪蒙, 等. 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)不同养殖模式氮磷收支及养殖效果研究. *海洋与湖沼*, 2021, 52(3): 718–728]
- LIU Y J, HUANG S Z, ZHANG L, *et al.* Spatial distribution characteristics of phosphorus fractions and release risk in sediments of Honghu International Importance Wetland. *Environmental Science*, 2021, 42(7): 3198–3205 [刘永九, 黄素珍, 张璐, 等. 洪湖国际重要湿地沉积物磷空间分布特征及释放风险. *环境科学*, 2021, 42(7): 3198–3205]
- LV F, NIE Q, YU Y B, *et al.* Effects of density on growth, body composition and antioxidant indicators of *Perinereis aibuhitensis* and total nitrogen in sediments. *Aquaculture Research*, 2018, 49(6): 2288–2295
- LV X X, SONG J M, YUAN H M, *et al.* The potential ecological roles of nitrogen in the surface sediments of the South Yellow Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(8): 1635–1643 [吕晓霞, 宋金明, 袁华茂, 等. 南黄海表层沉积物中氮的潜在生态学功能. *生态学报*, 2004, 24(8): 1635–1643]
- MA H B, SONG J M, LV X X, *et al.* Nitrogen forms and their functions in recycling of the Bohai Sea sediments. *Geochimica*, 2003, 32(1): 48–54 [马红波, 宋金明, 吕晓霞, 等. 渤海沉积物中氮的形态及其在循环中的作用. *地球化学*, 2003, 32(1): 48–54]
- MENG S, FANG J H, JIANG Z J, *et al.* Experimental study of the choice behavior of *Perinereis aibuhitensis* Grube among different sediment types. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 110–116 [孟珊, 房景辉, 蒋增杰, 等. 双齿围沙蚕对潮间带不同类型底质选择行为的研究. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 110–116]
- MERMILLOD-BLONDIN F, ROSENBERG R. Ecosystem engineering: The impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquatic Sciences*, 2006, 68(4): 434–442
- RUBAN V, LÓPEZ-SÁNCHEZ J F, PARDO P, *et al.* Development of a harmonised phosphorus extraction procedure and certification of a sediment reference material. *Journal of Environmental Monitoring*, 2001, 3(1): 121–125
- RUTTENBERG K C. Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 1992, 37(7): 1460–1482
- SANG Y X, YANG J L, XIONG Y, *et al.* Comparative phosphorus accumulation and Ca-P content of two submerged plants in response to light intensity and phosphorus levels. *Environmental Science*, 2020, 41(6): 2698–2705 [桑雨璇, 杨珈乐, 熊怡, 等. 不同光照和磷水平下两种沉水植物磷富集和钙磷含量的比较. *环境科学*, 2020, 41(6): 2698–2705]
- SUN N, CHEN Y L, MA L X, *et al.* Release of anthracene from estuarine sediments by crab bioturbation effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(2): 1890–1897
- SUN Y F, WANG F, LIU F, *et al.* Nitrogen and phosphorus budgets in grass carp, silver carp, and common carp culture systems. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 450–459 [孙云飞, 王芳, 刘峰, 等. 草鱼与鲢、鲤不同混养模式系统的氮磷收支. *中国水产科学*, 2015, 22(3): 450–459]
- SUN Y T, GUO X N, WANG Q Q, *et al.* The chemical speciation and distribution of phosphorus in sediments of Qilihai lagoon and reclamation area of different years in Changli. *Marine Environmental Science*, 2021, 40(5): 659–665 [孙怡陶, 郭晓楠, 王茜茜, 等. 昌黎七里海潟湖及不同年限围垦区表层沉积物磷赋存形态及分布特征. *海洋环境科学*, 2021, 40(5): 659–665]
- TIAN S Y, TONG Y F, HOU Y. The effect of bioturbation by polychaete *Perinereis aibuhitensis* on release and distribution of buried hydrocarbon pollutants in coastal muddy sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 149(12): 110487
- XU T, GAO F, GUO J X, *et al.* Simulation of environmental factors on the release potential of endogenous nitrogen and phosphorus. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2020, 35(4): 115–120 [许佟, 高凡, 郭家选, 等. 环境因子对沉积物氮磷释放潜力的模拟研究. *北京农学院学报*, 2020, 35(4): 115–120]
- YANG Y W, GAO X L, LI P M. Geochemical characteristics of nitrogen in core sediments from Sishili Bay, China. *Environmental Science*, 2012, 33(10): 3449–3456 [杨玉玮, 高学鲁, 李培苗. 烟台四十里湾柱状沉积物氮形态地球化学特征. *环境科学*, 2012, 33(10): 3449–3456]
- ZHANG Q T, HU G K. Study on feeding natural sediment of *Perinereis aibuhitensis*. *Journal of Tianjing University of Science and Technology*, 2008, 23(3): 26–29 [张青田, 胡桂

- 坤. 双齿围沙蚕摄食自然沉积物的研究. 天津科技大学学报, 2008, 23(3): 26–29]
- ZHANG S, TANG M R, LU J K, *et al.* A laboratory experimental research into the bioturbation effects of *Sinonovacula constricta* on the content of nitrogen forms in columnar sediments. *Marine Environmental Science*, 2020, 39(5): 670–675 [张硕, 唐明蕊, 路吉坤, 等. 缢蛭扰动对柱状沉积物中氮形态及其含量影响的实验室模拟研究. 海洋环境科学, 2020, 39(5): 670–675]
- ZHANG X Y, YANG Q, SUN Y, *et al.* Forms and bioavailability of phosphorus in sediment cores of culture zones in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 36–44 [张小勇, 杨茜, 孙耀, 等. 桑沟湾养殖海域柱状沉积物中磷的赋存形态和生物有效性. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 36–44]
- ZHAO Y F, ZHONG S P, WANG X F, *et al.* Nitrogen and phosphorus budgets of polyculture system of mud crab *Scylla paramamosain*, tiger shrimp *Penaeus monodon* and razor clam *Sinonovacula constricta*. *Fisheries Science*, 2021, 40(4): 483–491 [赵艳飞, 钟声平, 王贤丰, 等. 拟穴青蟹、斑节对虾和缢蛭不同混养系统氮、磷收支的研究. 水产科学, 2021, 40(4): 483–491]
- ZHENG Y Q, ZHENG Z M, QIN W J. Effects of bioturbation by razor clam *Sinonovacula constricta* on vertical distribution of phosphorus form in sediment in an aquaculture wastewater treatment ecosystem. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 161–170 [郑余琦, 郑忠明, 秦文娟. 缢蛭(*Sinonovacula constricta*)生物扰动对养殖废水处理系统中沉积物磷赋存形态垂直分布的影响. 海洋与湖沼, 2017, 48(1): 161–170]
- ZHOU N N, WANG Y, GAO S F, *et al.* Effects of two submerged macrophytes with different root systems on different fractions of phosphorus in sediment profiles. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(6): 2222–2228 [周楠楠, 王赢, 高顺峰, 等. 两种不同根系特征沉水植物对沉积物剖面不同形态磷的影响. 环境科学学报, 2021, 41(6): 2222–2228]
- ZHOU T Y, LI H S, JIAN H M, *et al.* Nitrogen forms in surface sediment in the Yangtze River estuary and adjacent area. *Marine Environmental Science*, 2018, 37(2): 281–286 [周天宇, 李浩帅, 简慧敏, 等. 长江口及邻近海域表层沉积物中氮形态的研究. 海洋环境科学, 2018, 37(2): 281–286]

(编辑 马璀艳)

Analysis of Influence of Different Sizes of *Perinereis aibuhitensis* on the Occurrence Form of Nitrogen and Phosphorus in Sediments

LIU Zhonghang^{1,2}, CHANG Zhiqiang², YUAN Shengyi^{1,2}, LI Jian^{2①}

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306, China; 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; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Aquaculture in China is spread over a total area of 7.1085×10^6 hm². Nowadays, aquaculture is done with a focus on high bait utilization efficiency. Moreover, the proportion of high-density farming organisms and high investment in aquaculture is increasing every year. However, the negative environmental problems associated with high efficiency of aquaculture are often ignored, especially the eutrophication caused by nitrogen and phosphorus pollution. An aquaculture system is a reservoir of nitrogen and phosphorus and sediments play an important role in regulating nitrogen and phosphorus levels in the system. The occurrence forms of nitrogen and phosphorus are closely related to the adsorption and release rates of nitrogen and phosphorus. Benthic animals contribute to the organic composition of sediments, and biological interference is an important factor affecting the release of nitrogen and phosphorus. *Perinereis aibuhitensis* Grube is a typical benthic animal living in sediments, which feeds on humus and benthic algae, and is one of the main types of organisms that is artificially bred in China. *P. aibuhitensis* can change the physical structure of sediments by burrowing and through bioturbation; it can also transport dissolved oxygen from the upper water level to the

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

depths of sediments and increase the redox potential of sediments. Studies of Meng *et al* (2020) have shown that different specifications of *P. aibuhitensis* have significant differences in the distance covered by the sediments. Significant differences are also present in pump water, pump water rate, axial crawling speed, and nutrient salt dissolution efficiency. The optimum stocking density of *P. aibuhitensis* is 330–500 g/m². Investigation of the occurrence pattern and vertical distribution of nitrogen and phosphorus in sediments is essential for assessing the endogenous nitrogen and phosphorus load in sediments, controlling eutrophication of water bodies, and assessing the risk of nitrogen and phosphorus nutrient release in sediments. In this study, the effects and role of *P. aibuhitensis* on the transformation of nitrogen and phosphorus speciation in sediments were measured, and the feasibility of its application as a bioremediation species in pollution control was evaluated. This study can provide theoretical basis and technical support for green aquaculture and environmental governance. In order to study the effect of biological disturbance of *P. aibuhitensis* on the occurrence pattern of nitrogen and phosphorus in sediments, experiments involving *P. aibuhitensis* with different characteristics were performed. The experiments were divided into four groups with 400 g/m² biomass of *P. aibuhitensis*: A small size group [(0.7±0.3) g]; a medium size group [(2.5±0.3) g]; and a large size group [(4.3±0.3) g] as the treatment group; and a no-sand silkworm as the control group. The experimental period was 45 days. Sediment samples were collected in PVC tubes (inner diameter: 1.5 cm), and the collected samples were divided into the upper layer, middle layer, and lower layer by partitioning. The contents of nitrogen and phosphorus in each group were determined as per the methods described by Ruttenberg (1992) and Ruban *et al* (2001). The different occurrence forms of nitrogen include an ion-exchanged form (IEF-N), a weak acid extractable form (WAEF-N), a strong alkali extractable form (SAEF-N) and a strong oxidant extractable form (SOEF-N). Different forms of phosphorus include non-apatite inorganic phosphorus (NAIP), apatite inorganic phosphorus (AP), inorganic phosphorus (IP), organic phosphorus (OP), and total phosphorus (TP). IEF-N is the most easily released nitrogen form in sediments, which is mainly released due to the adsorption of nitrate in overlying water and the ammonia nitrogen generated by the decomposition of organic nitrogen in sediments. WAEF-N mainly includes nitrogen bound to CO₃²⁻, which is affected by CO₃²⁻ concentration in sediments. SAEF-N mainly refers to Fe/Mn bound nitrogen in sediments, and its formation is related to the redox potential in sediments. SOEF-N mainly refers to the organic form of nitrogen in sediments, which is generally the main form of nitrogen. NAIP refers to the phosphorus bound to Fe, Mn, and Al oxides and their hydroxides in sediments, and this form of phosphorus is easily released in the sediments. AP is a form of phosphorus bound to calcium in sediments, which is considered to be relatively inert. IP refers to total inorganic phosphorus in sediments, which mainly includes NAIP and AP. OP refers to organic phosphorus in sediments, and TP refers to all forms of phosphorus in sediments. The results showed that *P. aibuhitensis* significantly increased the quantity of IEF-N, WAEF-N, and SAEF-N in the upper and middle layers of sediments ($P<0.05$), and the medium and small size groups significantly decreased the content of SOEF-N in sediments ($P<0.05$). *P. aibuhitensis* significantly increased the content of NAIP in the upper and middle layers of sediments ($P<0.05$), and the medium and small size groups significantly decreased the content of OP in sediments ($P<0.05$). This study showed that *P. aibuhitensis* could increase the bottom redox potential and promote the formation of Fe/Al bound nitrogen and phosphorus. It could also accelerate the mineralization of organic nitrogen and phosphorus in sediments, promoting the upward migration of other forms of nitrogen and phosphorus in sediments, making nitrogen and phosphorus in sediments easier to decompose and release, which could be used by phytoplankton in water. In the early stages of pond culture, *P. aibuhitensis* disturbance can make water nutrient rich in the late stage of culture, *P. aibuhitensis* can reduce the accumulation of nitrogen and phosphorus in sediments, so that the ponds can maintain good breeding conditions. *P. aibuhitensis* has the potential to repair environmental pollution in conjunction with other aquatic plants and algae.

Key words *Pernereis aibuhitensis*; Biological disturbance; Nitrogen form; Phosphorus form; Sediment

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211024001

http://www.yykxjz.cn/

李影, 徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 柳学周, 田云臣. 金属编码标签对许氏平鲷放流苗种的标记效果. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 40–49

LI Y, XU Y J, CUI A J, JIANG Y, WANG B, LIU X Z, TIAN Y C. Marking effect of coded wire tag on released juveniles of black rockfish (*Sebastes schlegelii*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 40–49

金属编码标签对许氏平鲷放流苗种的标记效果*

李影^{1,2} 徐永江^{2①} 崔爱君² 姜燕²
王滨² 柳学周² 田云臣¹

(1. 天津农学院水产学院 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

摘要 利用金属编码标签(coded wire tag, CWT)对不同规格许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)放流苗种的不同部位(鳃部鄂弓提肌和背部肌肉)进行了标记实验,从标记苗种成活率、标签保持率、标记后苗种抗氧化酶活性及生长应激相关基因表达等方面评价了CWT的标记效果。结果显示,CWT标记30 d后,不同规格苗种成活率均为100%,小规格苗种鄂弓提肌标记组(SLM组)的实验鱼标签保持率为87%,大规格苗种鄂弓提肌标记组(LLM组)的实验鱼标签保持率为97%,苗种背部肌肉标记的标签保持率均为100%。CWT标记实验鱼特定生长率低于对照组。标记鱼暂养后,SLM组和大规格背部肌肉标记组(LDM)实验鱼肝脏过氧化氢酶(CAT)活性显著高于对照组,所有组实验鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性均显著高于对照组。除SDM组外,其他实验组肝脏中IGF-1 mRNA表达水平显著高于对照组,LDM组肝脏HSP70 mRNA表达水平最低。从存活率与标签保持率的角度考虑,CWT适宜于许氏平鲷苗种的标记放流,但CWT标记的苗种生长慢于对照组,且在免疫相关酶活性和生长及应激基因方面存在显著的表达差异,表明CWT标记操作对许氏平鲷苗种造成了一定的生理胁迫。因此,利用CWT标记的许氏平鲷苗种应有一个相对较长的室内暂养或野性驯化时间,有利于提高标记放流苗种成活率和放流后生长及回捕。

关键词 许氏平鲷; 苗种; 金属编码标签; 标记效果; 生理机制

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0040-10

许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)属鲷形目(Scorpaeniformes)、平鲷科(Sebastidae)、平鲷属(*Sebastes*),是我国近海常见的冷温性底层卵胎生鱼类(冯昭信, 2003; Feng *et al.*, 2014),也是我国北方重要海水养殖经济鱼类之一(万瑞景等, 1988),具有较高的商业及休闲垂钓价值,同时也是一种非常适宜海洋

牧场增殖的优质无远距离洄游鱼类。近年来,由于野生资源的过度捕捞和海洋环境的变化,许氏平鲷自然资源不断下降(曾慧慧等, 2012; Zhang *et al.*, 2015)。为了养护衰退的许氏平鲷自然资源,伴随着我国海洋牧场建设的快速发展,我国山东、河北、辽宁等多个沿海省份都开展了大规模的许氏平鲷增殖放流活动,每

* 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(2018SDKJ0501-2)、中国水产科学研究院基本科研业务费(TD47)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022020005)、国家海洋水产种质资源库项目和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系共同资助。李影, E-mail: llying95@163.com

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

收稿日期: 2021-10-24, 收修改稿日期: 2021-12-31

年在海洋牧场等近海水域放流数千万尾许氏平鲈苗种,对自然资源的养护和修复起到了积极的促进作用。标记放流是评估水生生物增殖效果的重要手段,为准确评估许氏平鲈的放流效果,学者们采用耳石荧光标记(Lü *et al.*, 2014)或定制网捕获等方法分析了其对资源增殖的效果,为许氏平鲈科学放流提供了参考依据。然而,目前已报道的可用于许氏平鲈增殖放流的标记技术仅有耳石荧光标记技术,且耳石染色(朱亚华等, 2020)存在标记不易检测、易消退等问题,有必要开发新型的高效标记技术,支撑许氏平鲈增殖放流效果的精准评估。

金属编码标签(coded-wire tag, CWT)具有体积小、易操作、精确度与回收率高且规模化操作价格低等优点,是评价鱼类放流效果重要标记技术之一(Guy *et al.*, 1996),国内外已在金头鲷(*Sparus aurata*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis younghusbandi* Regan, 1905)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、七鳃鳗(*Entosphenus tridentatus*)、欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)等多种标记放流鱼类中得到应用(Sánchez-Lamadrid *et al.*, 2001; Crozier *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016; 黄建华等, 2016; 徐永江等, 2017; Hanson *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2020),取得了较好的标记效果,但尚未见有关标记对鱼类生理指标的影响的研究报道。目前,CWT对许氏平鲈苗种的标记放流研究尚未见报道。本研究以许氏平鲈为对象,测试CWT标签对不同规格许氏平鲈苗种不同标记部位的标记效果,记录存活率、脱标率以及生长指标。放流苗种的标记操作对鱼类是一种胁迫,为了从生理学角度深入揭示CWT标记操作对放流苗种的生理胁迫与适应机制,本研究还通过测定免疫相关酶——超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性变化和生长及应激相关基因(*IGF-1*和*HSP70*)的表达变化评价苗种对CWT标记的生理适应特性,以期为许氏平鲈放流适宜标记方式选择与增殖效果评估提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验于2020年8—10月在青岛贝宝海洋科技有限公司开展,所需许氏平鲈苗种为该公司培育的人工苗种,苗种规格整齐且摄食游泳行为良好。小规格苗种全长为(8.25±0.84) cm,体重为(9.99±2.75) g;大规格苗种全长为(11.13±0.67) cm,体重为(20.95±2.99) g(表2)。实验场地为该公司育苗车间的6个容积为4 m³

的水泥池,实验期间的养殖条件:盐度为29~31,溶解氧为6~7 mg/L, pH为7.8~8.0,水温为21~23℃,日换水率为200%。投喂配合饲料,日投喂2次,饱食投喂。

选择实验鱼鳃部鄂弓提肌(levator arcus palatine muscle)和背部肌肉作为标记位点。不同规格苗种和不同标记位置设置4个实验组和2个对照组:小规格鳃部鄂弓提肌标记组(SLM)、小规格背部肌肉标记组(SDM)、大规格鳃部鄂弓提肌标记组(LLM)、大规格背部肌肉标记组(LDM)、小规格对照组(无标记)(SCN)和大规格对照组(LCN)。每个实验组设置1个重复。每组各使用120尾鱼进行实验,实验开始前和结束时,每组随机选取30尾进行体重、全长等指标测量并记录(表2)。暂养期间,每隔12 h进行投喂,并在投喂1 h后清理池底。

1.2 CWT 标记操作

实验所用CWT标记设备及探测器购自美国西北海洋技术公司。CWT标签的直径为0.25 mm,长度为1 mm,利用配套的标记器进行标记操作,利用探测器进行标签的扫描识别(图1)。所有实验鱼在标记开始前提前24 h停止投喂,对照组鱼苗不进行标记处理,实验组苗种以MS-222进行麻醉,小规格和大规格苗种的MS-222麻醉剂量分别为30和40 mg/L。由专业人员将麻醉后的苗种置于铺有湿毛巾的平面上进行CWT标记操作,左手戴手套用于固定鱼体,右手持标记枪进行操作,分别标记在鳃盖肌肉处和背部肌肉处(图2)。鳃部鄂弓提肌位于眼右后方和鳃盖后缘中间的位置,背部肌肉选择肌肉较厚的位置(背鳍基部下方4~5个鳞片处)进行标记,将标记枪头呈45°插入肌肉,标记方向与鳞片同向,深度为2~3 mm,轻轻推入标签,按动开关剪断标签后拔出。标记后,使用探测器(图1下)扫描实验鱼被标记部位,听到声

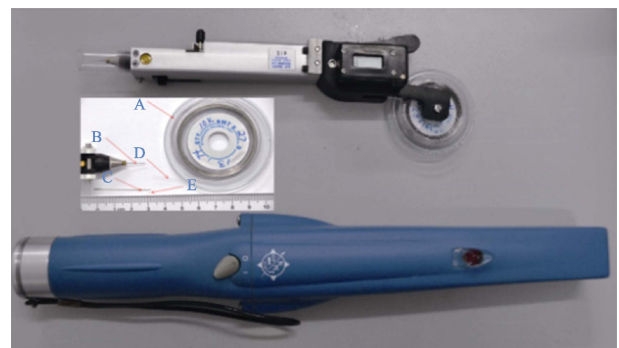


图1 CWT标记器(上)、标签系统(中)和探测器(下)
Fig.1 The CWT injector (upper), CWT system (middle), and detector (bottom)

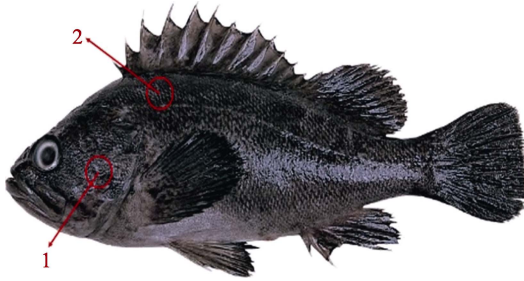


图2 许氏平鲈苗种标记位置
Fig.2 The schematic diagram of CWT tagging position in *S. schlegelii*

- 1: 鳃鄂弓提肌标记位置; 2: 背部标记位置。
1: Gill levator arcus palatine muscle tagging;
2: Dorsal muscle tagging.

响后确认标签植入成功。苗种标记后, 迅速置于洁净的海水中复苏。

1.3 生长测定和样品采集

标记完成后, 各实验组和对照组分别选取 120 尾鱼在池内养殖, 养殖时间为 30 d。标记苗种养殖期间, 观察标记苗种的游泳与摄食行为。在 5 d、15 d 和实验结束时, 使用探测器检测各实验组的 CWT 脱标情况, 及时拣出脱标的苗种, 记录脱标率。每天上午和下午投喂配合饲料, 投喂量为苗种体重的 3%, 日换水量为 200%。实验结束时, 随机选择 30 尾实验鱼, 测量并记录其体重和全长等数据, 特定生长率(SGR)的计算参照以下公式:

$$SGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{\Delta t} \times 100$$

式中, W_1 为起始个体体重, W_2 为实验结束后个体体重, Δt 为实验持续时间。

实验开始前后, 每实验组采集 6 尾实验鱼的脑和肝脏样品, 液氮保存, 并转移至 -80°C 冰箱保存, 用于 RNA 的提取。同时, 取肝脏组织样品, 置于冻存管中于 -20°C 保存, 用于 SOD 和 CAT 酶活性的测定。

1.4 酶活性测定

使用南京建成生物工程有限公司(南京, 中国)的 CAT 和 SOD 试剂盒, 按照使用说明测定酶活性。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量酶液中的蛋白浓度。CAT 酶活性单位定义为: 在 37°C 条件下, 每毫克组织蛋白每秒钟分解 $1 \mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为 1 个活性单位。SOD 酶活性单位定义为: 每 100 mg 组织在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为 1 个 SOD 活性单位(U/mL)。

1.5 基因表达分析

1.5.1 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成 利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)提取样品总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 分光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 的纯度和浓度, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性。使用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成第一链 cDNA。将反转录产物于 -20°C 冰箱保存备用。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 检测 参照 NCBI 数据库中许氏平鲈 *IGF-1* (AF481856)、*HSP70* (KC172645) 和 β -actin (JN226153) 设计各目基因的特异性实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物(表 1)。使用 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本)试剂盒以不同处理组的 cDNA 为模板进行基因定量表达分析, β -actin 为内参基因。RT-qPCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包括 $10 \mu\text{L}$ $2 \times$ SYBR® Premix Ex Taq™ II、 $0.8 \mu\text{L}$ 上下游引物(引物浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$)、 $1 \mu\text{L}$ cDNA 模板以及 $7.4 \mu\text{L}$ 无菌水, 利用 LightCycler® 96 real-time PCR 仪(Roche, 德国)进行荧光定量检测。每个样品 3 个平行, 采用三步 PCR 法: 95°C 5 s; 56°C 20 s, 72°C 10 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。所有目的基因和参考基因的标准曲线相关系数(r^2)和扩增效率(E): $0.99 < r^2 < 0.999$, $0.9 < E < 1.1$ 。基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。

表 1 许氏平鲈标记苗种实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequences used for RT-qPCR amplification of *IGF-1*, *HSP70* from *S. schlegelii*

基因(编号)	引物	序列
Gene (Number)	Primer	Sequence (5'~3')
<i>IGF-1</i> (AF481856)	Forward	TCACTCCGACCGCAACA
	Reverse	CTCTCTCCCCGCACACAAA
<i>HSP70</i> (KC172645)	Forward	AGGGATAAAGTCTCTGCCAAG
	Reverse	TCAATCACCGTCTTCTCGTC
β -actin (JN226153)	Forward	GACCACCTACAACAGCATCAT
	Reverse	TACCTCCAGACAGCACGG

1.6 数据处理

实验数据进以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。利用 IBM Statistic SPSS 25.0 软件对结果进行统计分析, 运用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 检验法对各实验组的荧光定量数据和酶活数据进行显著性差异分析和多重比较, 当显著性水平 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 CWT 标记对苗种摄食状态的影响

在苗种被麻醉标记后,不同规格的苗种在清洁海水中均能保证 3 min 内复苏并正常游动。SLM 和 LLM 组苗种在标记 1~5 d 摄食情况良好(30 min 后无剩余残饵),6~30 d 摄食情况积极(5 min 后无剩余残饵);SDM 和 LDM 组苗种在标记 1~5 d 摄食情况一般(30 min 后有剩余残饵),6~30 d 摄食情况积极(5 min 后无剩余残饵)。

2.2 CWT 标记苗种死亡率、脱标率及生长情况

CWT 标记后苗种经过 30 d 的暂养,成活率均为 100%。各实验组的脱标率、全长、体重和特定生长率变化情况见表 2。SLM 组和 LLM 组苗种脱标率分别为 13%和 3%;SDM 和 LDM 组苗种均未出现脱标现象。同等规格各实验组标记鱼的体长和体重与各自对应的对照组实验鱼差异显著($P<0.05$)。同等规格的标记苗种特定生长率均低于各自对照组苗种,且具有显著差异($P<0.05$)。

2.3 CWT 标记对肝脏 CAT、SOD 酶活性的影响

暂养 30 d 后,SLM 组实验鱼肝脏 CAT 酶活性(5.272 7 U/mL)显著高于对照组(3.572 1 U/mL) ($P<0.05$),而 SDM 组实验鱼肝脏中 CAT 酶活性略高于对照组

(图 3)。LLM 组实验鱼在暂养 30 d 后,肝脏组织 CAT 酶活性(4.552 1 U/mL)与对照组未有显著差异,而 LDM 组实验鱼肝脏 CAT 酶活性(5.366 1 U/mL)显著高于对照组($P<0.05$)和 LLM 组(3.915 3 U/mL) ($P<0.05$) (图 4)。

暂养 30 d 后,SLM 与 SDM 组实验鱼肝脏组织 SOD 酶活性(22.251 8、18.903 0 U/mL)均显著高于对照组(17.451 8 U/mL) (图 5)。LLM 与 LDM 组实验鱼肝脏组织 SOD 酶活性(17.865 7、17.625 6 U/mL)均显著高于对照组(16.087 7 U/mL) ($P<0.05$) (图 6)。

2.4 CWT 标记 30 d 后许氏平鲈苗种 IGF-1 和 HSP70 基因的组织表达

暂养 30 d 后,SLM 组实验鱼肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平显著高于对照组,而 SDM 组实验鱼肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平显著低于 SCN 组与 SLM 组 ($P<0.05$) (图 7)。LLM 组和 LDM 组实验鱼肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$),且以 LDM 组实验鱼肝脏 IGF-1 mRNA 表达水平为最高(图 8)。

暂养 30 d 后,小规格实验鱼与对照组脑组织 HSP70 mRNA 表达水平无显著差异(图 9),而大规格实验鱼在 CWT 标记暂养 30 d 后,LLM 组实验鱼脑中 HSP70 mRNA 表达水平显著高于 LDM 组($P<0.05$) (图 10)。

表 2 各实验组许氏平鲈苗种脱标率、死亡率及生长情况

Tab.2 The tag shedding rate, mortality and growth of *S. schlegeli* juveniles after tagged with CWT

组别 Groups	脱标率 Tag shedding rate/%	死亡率 Mortality /%	实验前全长 Initial total length/cm	实验后全长 Final total length/cm	实验前体重 Initial body weight/g	实验后体重 Final body weight/g	特定生长率 SGR/(%/d)
小规格鳃鄂弓提肌标记组 Small-sized levator arcus palatine muscle marking group	13	0	8.25±0.84	12.32±0.95*	9.99±2.75	17.51±4.50*	0.019*
小规格背部肌肉标记组 Small-sized dorsal muscle marking group	0	0	8.25±0.84	12.52±0.95*	9.99±2.75	16.76±4.96*	0.017*
大规格鳃鄂弓提肌标记组 Large-sized levator arcus palatine muscle marking group	3	0	11.13±0.67	15.41±0.82*	20.95±2.99	29.04±7.74*	0.011*
大规格背部肌肉标记组 Large-sized dorsal muscle marking group	0	0	11.13±0.67	15.66±0.83*	20.95±2.99	30.91±7.24*	0.013*
小规格对照组 Small-sized control group	—	0	8.25±0.84	12.86±1.15	9.99±2.75	19.39±5.38	0.022
大规格对照组 Large-sized control group	—	0	11.13±0.67	15.34±1.04	20.95±2.99	35.71±8.18	0.018

注: *表示差异显著($P<0.05$)。

Note: * indicates significant difference ($P<0.05$).

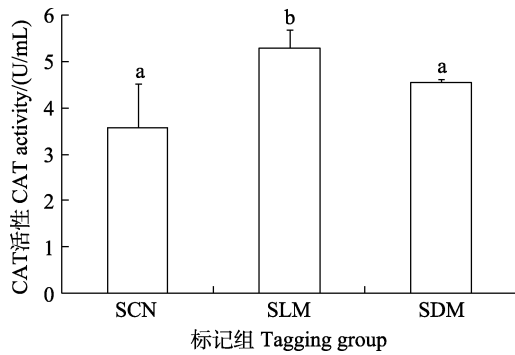


图3 CWT标记30 d小规格苗种肝脏中CAT酶活性
Fig.3 The activity of CAT in the liver of CWT labeled small-sized juveniles at 30 days post tagging

SCN: 小规格对照组; SLM: 小规格鳃鄂弓提肌标记组;
SDM: 小规格背部肌肉标记组。图5、7和9同。
不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

SCN: Small-sized control group; SLM: Small-sized levator arcus palatine muscle marking group; SDM: Small-sized dorsal muscle marking group. The same as in Fig.5, 7 and 9. Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

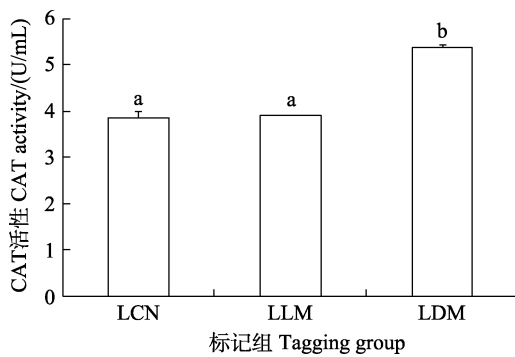


图4 CWT标记30 d大规格苗种肝脏中CAT酶活性
Fig.4 The activity of CAT in the liver of CWT labeled large-sized juveniles at 30 days post tagging

LCN: 大规格对照组; LLM: 大规格鳃鄂弓提肌标记组;
LDM: 大规格背部肌肉标记组。图6、8和10同。

LCN: Large-sized control group; LLM: Large-sized levator arcus palatine muscle marking group; LDM: Large-sized dorsal muscle marking group. The same as in Fig.6, 8 and 10.

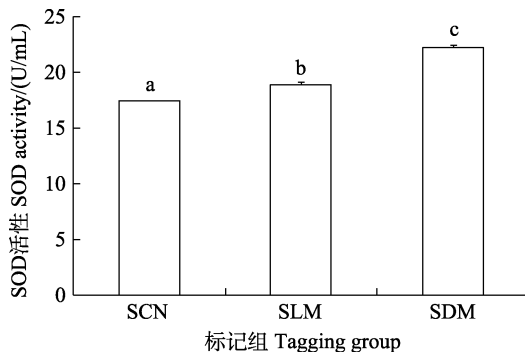


图5 CWT标记30 d小规格苗种肝脏中SOD酶活性
Fig.5 The activity of SOD in the liver of CWT labeled small-sized juveniles at 30 days post tagging

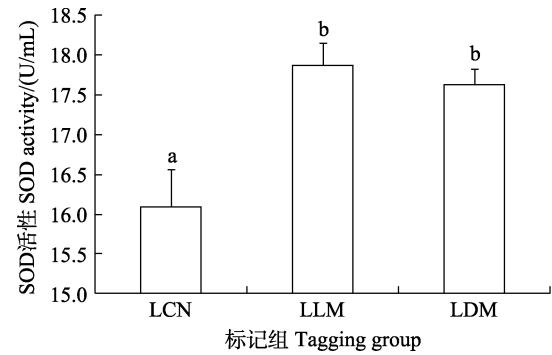


图6 CWT标记30 d大规格苗种肝脏中SOD酶活性
Fig.6 The activity of SOD in the liver of large-sized juveniles at 30 days post tagging

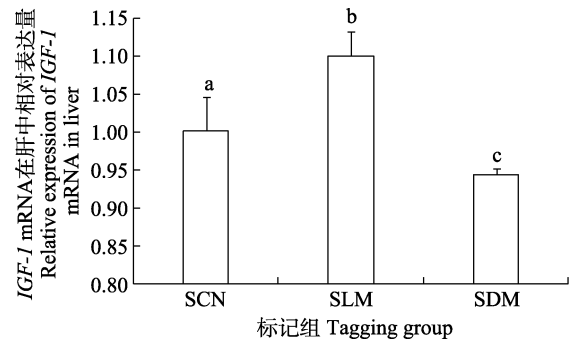


图7 CWT标记30 d小规格苗种肝脏中IGF-1 mRNA表达
Fig.7 IGF-1 mRNA expression in liver of CWT labeled small-sized juveniles at 30 days post tagging

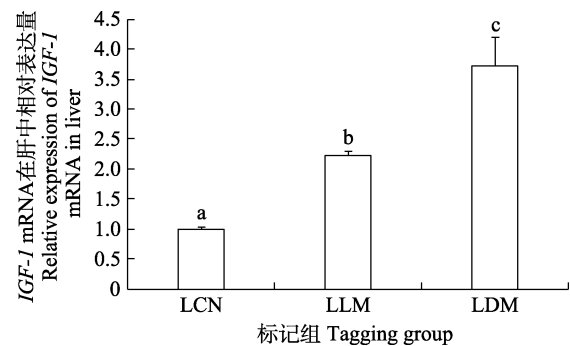


图8 CWT标记30 d大规格苗种肝脏中IGF-1 mRNA表达
Fig.8 IGF-1 mRNA expression in liver of CWT labeled large-sized juveniles at 30 days post tagging

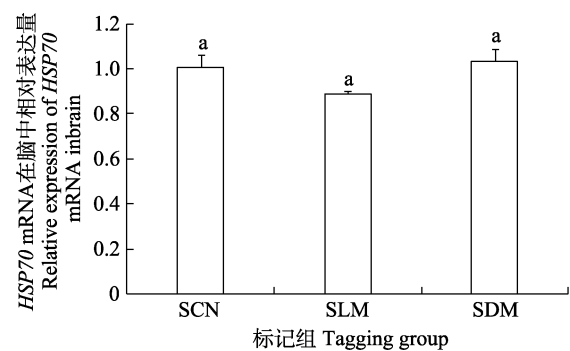


图9 CWT标记30 d小规格苗种脑中HSP70 mRNA表达
Fig.9 HSP70 mRNA expression in the brain of CWT labeled small-sized juveniles at 30 days post tagging

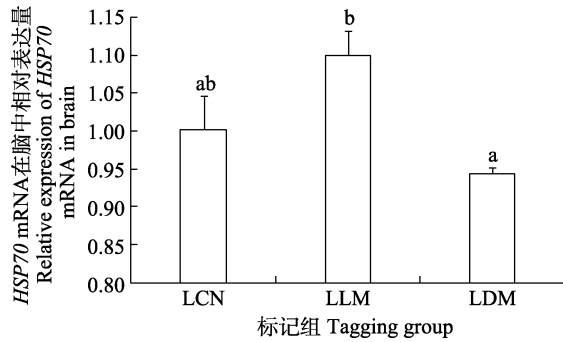


图 10 CWT 标记 30 d 大规格苗种脑中 HSP70 mRNA 表达
Fig.10 HSP70 mRNA expression in the brain of CWT labeled large-sized juveniles at 30 days post tagging

3 讨论

金属编码标签是一种小型且可高效标记的内部标记,作为评价标记鱼类放流效果的一种重要标记技术已在多种鱼类中成功对不同的部位进行标记(Simon *et al.*, 2020),在放流鱼种群密度、种群迁徙、鱼种生长等研究中广泛应用(Crum *et al.*, 2018; Beacham *et al.*, 2019、2020)。

3.1 CWT 标记 30 d 后对生长的影响

RASH 等(2018)通过实验证实,CWT 标签丢失主要是由于操作方法失误、标记部位不当造成的,可见标记部位的选择对成功标记至关重要。利用 CWT 标记不同规格欧洲鳗背部肌肉,是因为其具有全身弯曲游泳的特性,在快速游泳时容易造成标签的脱落(Hanson *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2020)。张彬等(2007)利用 CWT 标记稚鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)背部肌肉、腹壁、尾柄等部位后,经过一定时间的暂养发现背部肌肉标记效果最佳。Rash 等(2018)对褐鳟(*Salmo trutta*)的颊部、鼻软骨处进行 CWT 标记一段时间后发现,其颊部标记效果更佳。大西洋鲑通常在吻部会获得较好的标记效果,但标记回收时必须从鱼头处取出(Goulette *et al.*, 2016)。杨晓鸽等(2013)研究发现,利用 CWT 标记达乌尔鳊(*Huso dauricus*)背部肌肉可以获得较高的标签保持率。徐永江等(2017)利用 CWT 标记不同规格牙鲈背部肌肉和鳃弓提肌,均获得了较好的标记效果。本研究将不同规格的许氏平鲈背部肌肉和鳃弓提肌作为 CWT 标记部位,背部肌肉标记组标签保持率为 100%,获得了较好的标记效果;大规格鳃弓提肌标记组标签保持率为 97%,小规格鳃弓提肌标记组标签保持率为 87%,就不同标记部位比较而言,背部肌肉更适合作为许氏平鲈标记的理想部位;就不同规格比较而言,大规格标记效果更佳。

标记效果会受到鱼的种类和大小、标记操作方法、标记部位等因素的影响,鱼类的游泳行为也会对标签的保持率产生影响(Guy *et al.*, 1996),死亡率会受到由 CWT 标记针规格和标记鱼体厚度之间的比值构成的最小阈值影响(Meeuwig *et al.*, 2007)。徐永江等(2017)研究利用 CWT 标记不同规格牙鲈苗种时发现,6 cm 以下规格苗种出现较高的死亡率,6 cm 以上规格的苗种标记成功率较高。本研究标记不同规格许氏平鲈苗种的鳃弓提肌和背部肌肉后暂养 30 d,苗种成活率为 100%,说明标记苗种规格大小适宜。对不同规格标记苗种及其对照组苗种生长数据比较分析发现,标记组苗种特定生长率显著低于对照组,短期内标记的苗种生长受到抑制,但 SLM、LLM 和 LDM 组实验鱼肝脏 IGF-I mRNA 表达水平显著升高,表明 CWT 标记后暂养 30 d 的苗种虽然生长受到一定程度的影响,但生长轴的补充调控作用已启动。在今后苗种标记放流时,应适当延长标记苗种暂养驯化时间。这一结果与其他鱼类的研究结果具有一致性,如 CWT 标记太平洋七鳃鳗短期内其生长受到抑制,且其生理机制受到影响(Johnson *et al.*, 2016)。本研究建立的标记操作方法可以应用到许氏平鲈苗种标记放流中,如适当延长标记后苗种的暂养时间,则会获得更好的标记效果。

3.2 CWT 标记 30 d 后对肝脏 CAT 和 SOD 酶活性的影响

当鱼类受到环境胁迫时,会产生过量的活性氧导致氧化应激加剧,造成一定程度的生理胁迫,从而使鱼类的生长代谢受到影响(Valavanidis *et al.*, 2006; Amit *et al.*, 2015; 常志成等, 2018)。而 SOD 和 CAT 可通过清除过多的 $O_2^{\cdot-}$ 以及中间产物 H_2O_2 , 保护鱼体免受损伤(Sui *et al.*, 2016; 靳晓敏等, 2006), 该酶可以为机体起到抗氧化防御的作用。本研究结果表明, CWT 标记在体内存在 30 d 后, 仍然会造成一定的生理胁迫, 致使鱼体内由于脂质过氧化现象产生的活性氧积聚消散较慢。这与一些鱼类胁迫后体内组织或血清酶活性变化结果相一致。黄建华等(2016)研究 CWT 标记对大黄鱼血清酶活性的影响时发现, 标记操作后 CAT 和 SOD 酶活性表现为快速升高, 以免受因操作胁迫而产生的活性氧自由基的侵害。环境胁迫时也会引起体内氧自由基的升高, 如低温胁迫后的银鲈(*Pampus argenteus*)幼鱼通过血清及肝脏组织中 SOD 和 CAT 酶活性的升高来调节应激产生的氧自由基(谢明媚等, 2015)。而军曹鱼(*Rachycentron canadum*)受到低氧胁迫后肝脏组织中抗氧化酶活性降低, 表现

出低氧造成的损伤无法恢复(郭志雄等, 2020)。鱼体受到胁迫后体内生理变化复杂, 多种因素相互作用, 通过体内 SOD 和 CAT 活性的升高来消除产生的应激和过量的活性氧。说明标记苗种在暂养 30 d 后存在一定的生理应激, 为获得较好的标记放流后回捕效果, 应该适当增加标记鱼暂养时间。或者依赖于野生环境中的慢慢修复, 但这种生理胁迫对于放流后苗种存活与生长的影响值得关注。

3.3 CWT 标记 30 d 后 HSP70 的表达变化

研究表明, 当动物机体受到应激刺激时 HSP70 表达量迅速增加(Liu *et al.*, 2012), 提升细胞的抗损伤能力, 使其快速适应应激环境, 是机体自我保护的物质基础。金头鲷和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在急性饥饿胁迫条件下, 短时间内 HSP70 基因的表达表现为上调趋势(CARA *et al.*, 2005)。罗伟等(2016)通过对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂)幼鱼低温、饥饿及恢复的长时间监测发现, 35 d 后幼鱼肝脏组织中 HSP70 的表达会恢复至初始水平。本研究苗种标记 30 d 后, 肝脏组织中的 HSP70 基因的表达与对照组无差异($P>0.05$), 暂养 30 d 后标记苗种可稳定生长, 对环境的适应性与对照组无差异, 表明在基因表达层面, CWT 标记后苗种可快速适应环境。研究发现, CWT 标记太平洋七鳃鳗、欧洲鳗, 短时间内鱼的生长及生理机制会受到一定影响, 但经过长时间标记重捕实验监测发现, 其获得了较好的标记效果(Hanson *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2020), 表明针对不同鱼类, CWT 标记后经不同的暂养时间可获得不同的标记效果。

综上所述, 大小规格不同标记部位的许氏平鲈标记苗种标记 30 d 后标签保持率高, 无死亡发生, 生长状态良好, 是许氏平鲈苗种标记放流的合适标记方式; 标记后苗种肝脏组织抗氧化酶活性有所升高, 生长基因表达与对照组差异显著($P<0.05$), 生理受到一定的胁迫, 生长受到一定程度的抑制。在标记研究时, 应适当延长标记苗种的标记周期和室内暂养时间, 并在标记操作完成后将标记鱼苗进行体表消毒, 以期放流苗种提供准确的生理适应机制的评价, 为苗种放流的大规模应用提供参考。

参 考 文 献

AMIT KUMAR S, HAMADA A, GAURAV Z, *et al.* Nutritional status as the key modulator of antioxidant responses induced by high environmental ammonia and salinity stress in

- European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135091
- BEACHAM T D, JONSEN K, MCINTOSH B, *et al.* Large-scale parentage-based tagging and genetic stock identification applied in assessing mixed-stock fisheries and hatchery brood stocks for coho salmon in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2020, 77(9): 1505–1517
- BEACHAM T D, WALLACE C, JONSEN K, *et al.* Variation in migration pattern, broodstock origin, and family productivity of coho salmon hatchery populations in British Columbia, Canada, derived from parentage-based tagging. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(17): 9891–9906
- CARA J B, ALURU N, MOYANO F J, *et al.* Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142(4): 426–431
- CHANG C Z, WEN H S, ZHANG M Z, *et al.* Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and associate physiological mechanisms. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(7): 20–28 [常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(7): 20–28]
- CROZIER W W, KENNEDY G J A. Impact of tagging with coded wire tags on marine survival of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) migrating from the R. Bush, Northern Ireland. *Fisheries Research*, 2002, 59(1/2): 209–215
- CRUM K P, BALOUSKUS R G, TARGETT T E. Growth and movements of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) along armored and vegetated estuarine shorelines. *Estuaries and Coasts*, 2018, 41(1): 131–143
- FENG J R, LIU L M, JIANG H B, *et al.* Histological observation of germ cell development and discovery of spermatophores in ovoviviparous black rockfish (*Sebastes schlegeli*, Hilgendorf) in reproductive season. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(5): 830–836
- FENG Z X. *Ichthyology*. Beijing: China Agriculture Press, 2003 [冯昭信. 鱼类学. 北京: 中国农业出版社, 2003]
- GOULETTE G S, LIPSKY C A. Nonlethal batch identification of Atlantic salmon using coded wire tags. *North American Journal of Fisheries Management*, 2016, 36(5): 1084–1089
- GUO Z X, ZENG Z Q, HUANG J S, *et al.* Effects of acute hypoxia on oxidative stress, energy utilization and carbohydrate metabolism in liver of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(3): 134–140 [郭志雄, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 急性低氧胁迫对大规模军曹鱼幼鱼肝脏氧化应激、能量利用及糖代谢的影响. *广东海洋大学学报*. 2020, 40(3): 134–140]
- GUY C S, SCHULTZ R D, CLOUSE C P. Coded wire tag loss from paddlefish: A function of study location. *North*

- American Journal of Fisheries Management, 1996, 16(4): 931–934
- HANSON K C, BARRON J M. Evaluation of the effects of marking Pacific lamprey ammocoetes with visual implant elastomer, coded wire tags, and passive integrated transponders. Transactions of the American Fisheries Society, 2017, 146(4): 626–633
- HUANG J H, SHEN B, HUANG X T, *et al.* The effects of coded wire tagging on activities of five serum enzymes of large yellow croaker. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2016, 35(6): 483–488 [黄建华, 沈斌, 黄晓婷, 等. 金属线码标记操作对大黄鱼5种血清酶活力的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2016, 35(6): 483–488]
- JIN X M, WU Y, YANG S, *et al.* Effects of two kinds of prethrin pesticide on CAT and SOD in serum of common carp. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(3): 615–618 [靳晓敏, 吴垠, 杨松, 等. 两种菊酯类农药对鲤血清CAT和SOD的影响. 农业环境科学学报, 2006, 25(3): 615–618]
- JOHNSON N S, BRENDEN T O, SWINK W D, *et al.* Survival and metamorphosis of larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*) residing in Lakes Michigan and Huron near river mouths. Journal of Great Lakes Research, 2016, 42(6): 1461–1469
- LIU T, DANIELS C K, CAO S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. Pharmacology and Therapeutics, 2012, 136(3): 354–374
- LÜ H J, ZHANG X M, XI D, *et al.* Use of calcein and alizarin red S for immersion marking of black rockfish *Sebastes schlegelii* juveniles. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(1): 88–98
- LUO W, GAO Y, LI W H. Effects of low temperature and starvation stress, recovery on expression of *HSP70* gene in hybrid tilapia juveniles. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(10): 2640–2646 [罗伟, 高扬, 李文红. 低温、饥饿胁迫及恢复对奥尼罗非鱼幼鱼*HSP70*基因表达的影响. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2640–2646]
- MEEUWIG M H, PULS A L, BAYER J M. Survival and tag retention of Pacific lamprey larvae and macrophthalmia marked with coded wire tags. North American Journal of Fisheries Management, 2007, 27(1): 96–102
- RASH J M, GOODFRED D W, JONES JR E M. Evaluation of coded wire tag retention in brown trout (*Salmo trutta*) fingerlings tagged at three anatomical locations. Journal of Freshwater Ecology, 2018, 33(1): 503–509
- SÁNCHEZ-LAMADRID A. Effectiveness of four methods for tagging juveniles of farm-reared gilthead sea bream, *Sparus aurata*, L. Fisheries Management and Ecology, 2001, 8(3): 271–278
- SIMON J, WICKSTRÖM H. Long-term retention of alizarin red S marks and coded wire tags in European eels. Fisheries Research, 2020, 224: 105453
- SUI Y M, HUANG X Z, KONG H, *et al.* Physiological responses to salinity increase in blood parrotfish (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂). SpringerPlus, 2016, 5(1): 1246
- VALAVANIDIS A, VLAHOGIANNI T, DASSENAKIS M, *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64(2): 178–189
- WAN R J, CHEN R S. Reproductive behavior and morphology of early development of *Sebastes fuscescens* (Houttuyn) in the Bohai Sea. Marine Fisheries Research, 1988(9): 213–220 [万瑞景, 陈瑞盛. 黑鲷的生殖习性及早形态. 海洋水产研究, 1988(9): 213–220]
- XIE M M, PENG S M, ZHANG C J, *et al.* Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 541–549 [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541–549]
- XU Y J, LIU X Z, ZHANG K, *et al.* Tagging juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) with coded wire tags. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 168–174 [徐永江, 柳学周, 张凯, 等. 编码金属标签对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)苗种标记的效果. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 168–174]
- YANG X G, WEI Q W, DU H, *et al.* Primary study on tag performance tagged with visible implant of Kaluga sturgeon (*Huso dauricus*) elastomer and coded wire tag. Freshwater Fisheries, 2013, 43(2): 43–47 [杨晓鸽, 危起伟, 杜浩, 等. 可见植入荧光标记和编码金属标对达乌尔鳊标志效果的初步研究. 淡水渔业, 2013, 43(2): 43–47]
- ZENG H H, XU B D, XUE Y, *et al.* Study on fish species composition and seasonal variation in the shallow waters of Jiaozhou Bay. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2012, 42(1/2): 67–74 [曾慧慧, 徐宾铎, 薛莹, 等. 胶州湾浅水区鱼类种类组成及其季节变化. 中国海洋大学学报, 2012, 42(1/2): 67–74]
- ZHANG B, LI Z J. Tagging juvenile mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) with coded wire tag. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(7): 53–58 [张彬, 李钟杰. 微型金属标标记鳊稚鱼. 中国水产科学, 2007, 14(7): 53–58]
- ZHANG Y, XU Q, ALÓS J, *et al.* Short-term fidelity, habitat use and vertical movement behavior of the black rockfish *Sebastes schlegelii* as determined by acoustic telemetry. PLoS One, 2015, 10(8): e0134381
- ZHU T B, GUO W, WU X B, *et al.* Effects of visible implant elastomer and coded wire tags on growth and survival of *Schizopygopsis younghusbandi* Regan, 1905. Journal of Applied Ichthyology, 2016, 32(1): 110–112
- ZHU Y H, JIANG T, CHEN X B, *et al.* 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 [朱亚华, 姜涛, 陈修报, 等. 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]

Marking Effect of Coded Wire Tag on Released Juveniles of Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*)

LI Ying^{1,2}, XU Yongjiang^{2①}, CUI Aijun², JIANG Yan², WANG Bin², LIU Xuezhou², TIAN Yunchen¹

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Joint Laboratory for Open Sea Fishery Engineering, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Black rockfish (*Sebastes schlegelii*) is a member of the family Sebastidae—an ovoviviparous marine fish widely distributed in the coastal waters of China. This species has important commercial value and is also a delicious table fish. It often inhabits areas at the bottom of the sediment in rocky reefs with clear water quality. The species does not exhibit a long-distance migration habit or remarkable clustering. In recent years, sea ranching has developed rapidly in China. Black rockfish is a good candidate to promote sea ranching, because it does not exhibit a long migratory habit and is called a housekeeping fish. In recent decades, owing to the overfishing of wild resources and deterioration of the environment, the natural pools of black rockfish have decreased sharply. Thus, the national black rockfish release and breeding plan was implemented in 2006. Currently, millions of young black rockfish are released into the sea every year in China, which has played a positive role in promoting the conservation and restoration of natural resources. However, the release activity of marine organisms is random and under lax supervision. In recent years, various tagging technologies, including external markers, such as T-bar markers, and internal markers, such as otolith markers, have been developed to support the evaluation of the enhancement effect of released species. At present, otolith fluorescent labeling is the only reported marker technology that can be used for the proliferation and release of black rockfish. However, otolith staining has some problems, such as difficulty in detection and rapid fading, and it is not effective as an internal marker. Currently, there has been no efficient internal marker for black rockfish juveniles; thus, an effective marking technology must be established for evaluating the enhancement effect of black rockfish to support scientific release and natural resource maintenance. The coded wire tag (CWT) is a magnetized stainless-steel wire segment with a diameter of 0.25 mm. Several rows of numbers are engraved on the marking line to represent a specified batch or a single code. CWTs are widely used internal tags with many advantages, including small size, easy management, accuracy, and high retention. CWTs have been effectively used in over 30 fish genera worldwide because of their high retention rates and minimal biological impact on living fish, although serious effects on growth and survival have been reported among different species and tag placements. In the present study, we investigated the marking effects of CWTs on released juveniles of black rockfish. According to different sizes and marking placements, the experimental juveniles of black rockfish were divided into four groups: small fish [average total length = (8.25±0.84) cm, average body weight = (9.99±2.75) g] with gill levator arcus palatine muscle tagging group (SLM group); small fish with dorsal muscle tagging group (SDM group), large fish [average total length = (11.13±0.67) cm, average body weight = (20.95±2.99) g] with gill levator arcus palatine muscle tagging group (SDM group); and large fish with dorsal muscle tagging group (LDM group). The survival rate, tag retention, antioxidant enzyme activity, and expression of genes

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

related to growth or stress were measured to evaluate the effects of CWTs on black rockfish juveniles. The survival rate was 100% in all study groups. The tag retention rates in the SLM and LLM groups were 87% and 97%, respectively. The tag retention rate in the SDM and LDM was 100%. The specific growth rate of all tagged fish was lower than that of the control fish. After 30 days of culture post-tagging, the liver catalase enzyme activity in the SLM and LDM groups was significantly higher than that in the control group, and the liver superoxide dismutase enzyme activity in all experimental groups was significantly higher than that in the control group. The liver IGF-I mRNA levels were significantly higher in the SLM, LLM, and LDM groups than in the control group. There were no significant differences in *HSP70* mRNA levels between the small fish groups, while in the large fish groups, *HSP70* mRNA level in the LDM group was lower than that in the LLM and control groups. Therefore, CWT is suitable for marking black rockfish juveniles based on survival and tag retention data; however, the specific growth rate of tagged fish was lower than that of the control fish, and the antioxidant enzyme activities and expression of genes related to growth and stress showed significantly different expression responses to CWT marking, indicating that tagging caused physiological stress in released black rockfish juveniles. Therefore, indoor temporary breeding or wild domestication time should be relatively long for the seedlings marked with CWTs, which is conducive to improving the survival rate of the marked released seedlings and their growth after release. Overall, CWTs may be useful to evaluate the enhancement effects of released species and support accurate assessments of the proliferation and release effect of black rockfish.

Key words *Sebastes schlegelii*; Juvenile; Coded wire tags; Tagging effects; Physiological response

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211115001

http://www.yykxjz.cn/

宋煜, 李开敏, 徐文腾, 陈松林, 王磊. 斑石鲷 *irf7* 基因克隆及其在病毒感染下的表达. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 50–57
SONG Y, LI K M, XU W T, CHEN S L, WANG L. Cloning and expression of *irf7* gene in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) under virus infection. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 50–57

斑石鲷 *irf7* 基因克隆及其在病毒感染下的表达*

宋煜¹ 李开敏^{1,2} 徐文腾¹ 陈松林¹ 王磊^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 2. 山东师范大学 山东 济南 250014)

摘要 为探究斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)干扰素调节因子 *irf7* 在虹彩病毒(Iridovirus)感染过程中的作用机制,本研究通过 PCR 扩增获得了斑石鲷 *irf7* 基因 CDS 区序列,对其序列特征进行分析,并在组织水平和细胞水平研究该基因在病毒感染中的表达模式。结果显示, *Opirf7* 基因 CDS 区全长为 1332 bp, 编码 443 个氨基酸的多肽,具有干扰素调节因子家族的保守结构域。荧光定量 PCR (qRT-PCR)结果显示, *Opirf7* 基因在健康个体的不同组织中均有表达,在肝脏中表达量最高,在皮肤和肠等免疫组织中的表达量也较高。对斑石鲷腹腔注射虹彩病毒诱导抗病毒免疫反应,在组织水平检测 *Opirf7* 对病毒感染的响应模式。与对照组(0 h)相比, *Opirf7* 在免疫组织中的表达水平有不同程度的升高。在细胞水平,建立 poly I: C 感染的斑石鲷脑细胞系模型,利用 qRT-PCR 检测 *Opirf7* 的表达变化。结果显示, poly I: C 刺激后,脑细胞系 *Opirf7* 的表达量显著升高。结果表明, *Opirf7* 在斑石鲷抗病毒病的免疫应答过程中发挥重要作用。

关键词 斑石鲷; 干扰素调节因子 7; 抗病基因; 免疫反应

中图分类号 S942.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0050-08

干扰素调节因子(interferon regulatory factors, *irfs*)是一类转录因子家族,能够调控干扰素(interferon, IFN)的转录过程。在机体受到感染时, *irfs* 能结合 IFN 启动子并诱导调节 IFN 而得名(Veals *et al.*, 1992, Zhang *et al.*, 2012)。在哺乳动物 *irfs* 家族已发现 9 个 *irf* 成员(*irf1~irf9*)(Barnes *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 1997),随后在鸟类和鱼类中鉴定出 *irf10* 基因。通过解析鱼类基因组发现,鱼类中存在 11 个 *irf* 家族成员,其中, *irf11* 为硬骨鱼类所特有(Stein *et al.*, 2007)。所有的 IRFs N 端都有一个由 115 个氨基酸组成的结构域,称为 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)。DBD 含有 5 个色氨酸重复序列,其中 3 个重复序列可识别干扰素刺激反应元件(IFN-sensitive response

elements, ISRE)正调控序列区域 DNA 的 GAAA 和 AANNNGAA 序列(Escalante *et al.*, 1998)。IRFs 通过 C 末端的 IAD 结构域(IRF-associated domain),与其他转录因子相互作用来激活信号通路,实现其转录调控作用(Taniguchi *et al.*, 2001)。IRFs 是模式识别受体信号转导、促炎症因子与趋化因子转录及激活免疫应答反应过程中的重要分子,不仅参与 IFN 的信号通路,还在防御病毒与应激反应的过程中具有重要作用(Honda *et al.*, 2006, Tanaka *et al.*, 2000)。干扰素调节因子 7 (*irf7*)是诱导 I 型干扰素表达的关键因子,于 1997 年首次报道(Zhang *et al.*, 1997),其最重要功能是诱导 IFN α/β 产生,从而诱导机体抗病毒功能(Fitzgerald *et al.*, 2003)。目前,已在斑马鱼(*Danio rerio*) (Xiang *et al.*,

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900301-02)、国家自然科学基金项目(31802332)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD20)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助。宋煜, E-mail: 302969975@qq.com

① 通信作者: 王磊, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-11-15, 收修改稿日期: 2021-12-31

2010)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) (Sun *et al*, 2007)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Hu *et al*, 2010)等鱼类中被鉴定, 并揭示了鱼类 *irf7* 在先天免疫中的作用。

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)具有外形美观、肉质细嫩、生长速度快、成活率高等优点, 深受消费者喜爱。2014年以来, 随着斑石鲷人工繁育和养殖取得成功, 斑石鲷已成为我国名贵海水养殖品种之一。但随着国内水产养殖业集约化水平不断提高, 病毒病成为制约斑石鲷健康养殖的主要问题。本研究通过克隆斑石鲷 *irf7* 基因, 分析在虹彩病毒(Iridovirus)刺激后各免疫组织的表达模式, 有助于研究斑石鲷抗病毒及细菌免疫应答中的功能, 旨在为阐述斑石鲷免疫机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用斑石鲷购自山东莱州明波水产有限公司, 体重为(150±15) g, 健康无病。实验前在水箱中暂养1周, 水温维持在25℃左右。每日投喂饲料, 保持溶氧充足, 每日用清洁海水换水1次。

1.2 样品处理和采集

1.2.1 健康斑石鲷组织样品采集 随机选取4条健康斑石鲷, 经MS-222麻醉后抽取血液, 解剖后取肝、脾、肾、头肾、心脏、肠、鳃、脑、皮肤和肌肉等组织, 将所取组织迅速置于液氮中, 随后转移至-80℃冰箱中保存, 用于提取总RNA。

1.2.2 虹彩病毒感染斑石鲷及组织样品采集 选取15条健康斑石鲷用于斑石鲷虹彩病毒感染实验。本实验所用斑石鲷虹彩病毒由华南农业大学秦启伟教授提供。将斑石鲷虹彩病毒液用PBS稀释至 1×10^9 copies/mL。将斑石鲷麻醉后腹腔注射病毒液, 每尾注射100 μL。分别在0、1、4、7和10 d共5个时间点取样, 每个时间点取3条鱼, 每条鱼取肝脏、脾脏、肾脏3个组织。将组织立即放入液氮中冷冻, 并随后放入-80℃冰箱, 用于后续提取RNA。

1.2.3 poly I:C 刺激斑石鲷脑细胞系 将单层培养、生长状态良好的斑石鲷脑细胞系铺到12孔板上, 24 h后细胞覆盖率达到90%左右。将12孔板中的旧培养基吸弃, 使用无菌PBS (0.01 mmol/L, pH 7.2)洗涤3次。使用无菌PBS (0.01 mmol/L, pH 7.2)配制poly I:C (上海源叶生物科技有限公司)母液, 浓度为25 mg/ml。按照低、中、高浓度(50、100、200 μg/mL), 配制含有poly I:C的L-15培养基(北京索莱宝生物科技

有限公司), 加入培养板中, 每个浓度3个重复。对照组加入与高浓度组相同体积的PBS。在刺激6 h后, 吸出培养基, 加入Trizol (TaKaRa)收集细胞, 保存于-80℃冰箱待用。细胞实验重复3次。

1.3 总RNA提取与cDNA合成

使用Trizol对所有健康以及感染后样品提取总RNA, 提取后使用Pultron核酸浓度仪测定浓度及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值, 使用琼脂糖凝胶电泳检测所提RNA的质量。利用合格的RNA, 使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(TaKaRa)合成cDNA。

1.4 *Opirf7* 基因 ORF 区验证

根据测序结果, 获得*Opirf7*基因的ORF区序列, 使用Primer 5.0软件设计引物*Opirf7*-F/*Opirf7*-R, 使用不同组织混合cDNA模板进行PCR扩增。总体系为15 μL: PCR Mix (TaKaRa) 7.5 μL, *Opirf7*-F 1 μL, *Opirf7*-R 1 μL, cDNA模板1 μL, ddH₂O 4.5 μL。PCR扩增程序: 95.8℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 59℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 72℃延伸7 min, 4℃保存。

将PCR扩增产物进行凝胶电泳检测, 条带大小与目的片段相一致。将正确目的片段切下, 使用胶回收试剂盒(诺唯赞)对目的片段进行回收纯化。将纯化后的产物连接到T载体中, 转化Trans1-T1感受态细胞(全式金)中, 冰浴30 min后42℃热激30 s, 置于冰上2 min后加入500 μL无抗LB培养基, 37℃摇床摇菌1 h, 取200 μL菌液于超净工作台中涂板, 培养过夜。次日, 挑取单克隆并进行菌液PCR验证。将条带大小正确的样品送青岛擎科生物技术有限公司测序。

1.5 生物信息学分析及构建系统发育树

使用DNASTAR软件的Editseq分析*Opirf7* ORF区, 预测氨基酸序列, 并推测分子量和等电点。使用网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测其信号肽, 使用网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜结构分析。使用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行结构域预测。通过DNAMAN 8软件进行氨基酸同源比对。检索不同生物*irf7*序列(表2), 导入MEGA X软件进行氨基酸多重比对, 采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树。

1.6 *Opirf7* 实时荧光定量检测

使用实时荧光定量(qRT-PCR)检测斑石鲷健康个体、虹彩病毒感染及poly I:C感染细胞后*Opirf7*的表达模式。根据测序所获得的ORF序列设计*Opirf7*和内参

基因的引物(表 1)。实验步骤参照 TaKaRa 荧光定量试剂盒, 采用两步法, 反应程序: 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s, 58°C 30 s, 共 40 个循环; 60°C 30 s, 72°C 30s, 溶解曲线温度 55~95°C。以 β -actin 为内参进行 qRT-PCR 分析。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Opirf7* 基因的相对表达量。实验数据采用 SPSS 软件进行方差分析 (one-way ANOVA), 设定 P 值 < 0.05 时为差异显著。使用 GraphPad Prism 作图。

2 结果与分析

2.1 *Opirf7* ORF 区序列分析

以斑石鲷组织 cDNA 为模板, 获得斑石鲷 *Opirf7*

基因 ORF 区全长为 1332 bp, 编码 443 个氨基酸。通过氨基酸序列分析, 预测其分子量为 50.5 kDa, 等电点为 5.546 (图 1)。通过蛋白结构域预测, 发现其含有 IRF 家族保守结构域, 包括 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)、IRF 相关结构域(IRF-associated domain, IAD)和 SRD 结构域 (Serine-rich domain, SRD) (图 2)。其中, DBD 位于多肽 N 末端, 由第 4~112 个氨基酸组成, 该区域包含 4 个色氨酸重复区域; IAD 位于多肽中间部分(第 222~395 个氨基酸); 丝氨酸富含区位于多肽末端。

2.2 氨基酸多序列比对及系统进化树分析

经 BLAST 比对发现, 斑石鲷 *irf7* 氨基酸序列与

表 1 本研究中所使用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>Opirf7</i> -ORF-F	ATGTTCCCTCCCAGCCTTCCC	ORF verification
<i>Opirf7</i> -ORF-R	TCAGATCGGGTGTAGAAAAGGCGC	ORF verification
<i>Opirf7</i> -qRT-F	TTGCCAGCACCAGTGACCC	qPCR
<i>Opirf7</i> -qRT-R	GACCACCTTGACAACGATAA	qPCR
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGT	qPCR
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	qPCR

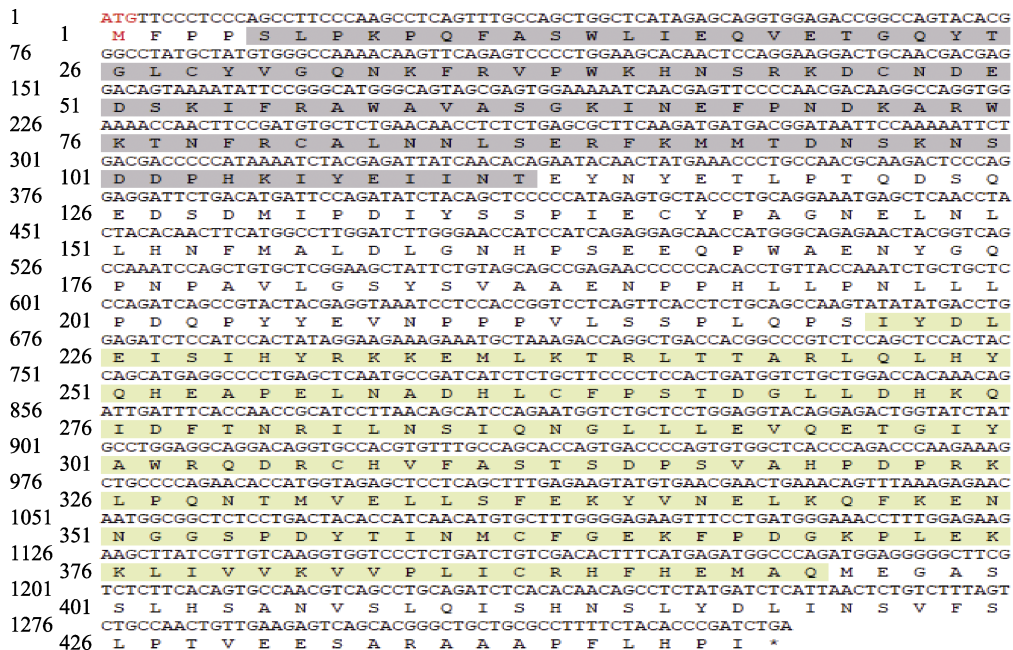


图 1 *Opirf7* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 *Opirf7* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence

氨基酸序列在核苷酸序列下方, 起始密码子“ATG”用红色标明, 终止密码子“TAG”用星号标明。

DBD 结构域用灰色阴影标识, IAD 结构域用黄色阴影标识。

The amino acid sequence is below the nucleotide sequence, the start codon “ATG” is marked with red, and the stop codon “TAG” is marked with an asterisk. The IRF domain is indicated by gray shading, and the IRF3 domain is indicated by yellow shading.

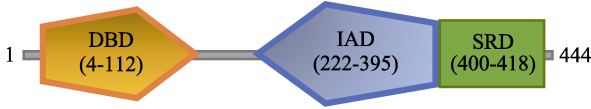


图 2 斑石鲷 Opif7 蛋白结构域预测

Fig.2 Protein domain prediction of Opif7 in *O. punctatus*

其他硬骨鱼类的 *irf7* 具有较高同源性。斑石鲷 *irf7* 与尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的相似性为 82.92%，与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、牙鲆、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的相似性分别为 81.99%、79.95%、73.74%，与哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)

的相似性较低，分别为 31.00%和 30.00%(图 3)。

通过 MEGA X 软件采用 Neighbor-joining 法构建了 Opif7 的系统进化树(图 4)。发育分析显示，斑石鲷 Opif7 与其他硬骨鱼类的 *irf7* 聚为一支，鸡(*Gallus gallus*)、小鼠猕猴(*Macaca mulatta*)和人类的 *irf7* 聚为另一大支。斑石鲷 Opif7 在进化上与大黄鱼、鲑鱼(*Miichthys miiuy*)的亲缘关系较近，而与哺乳类、爬行类、鸟类等动物的 *irf7* 亲缘关系较远。

2.3 *Opif7* 基因在正常斑石鲷各组织中的表达

Opif7 在健康斑石鲷个体 11 个组织中均有表达。

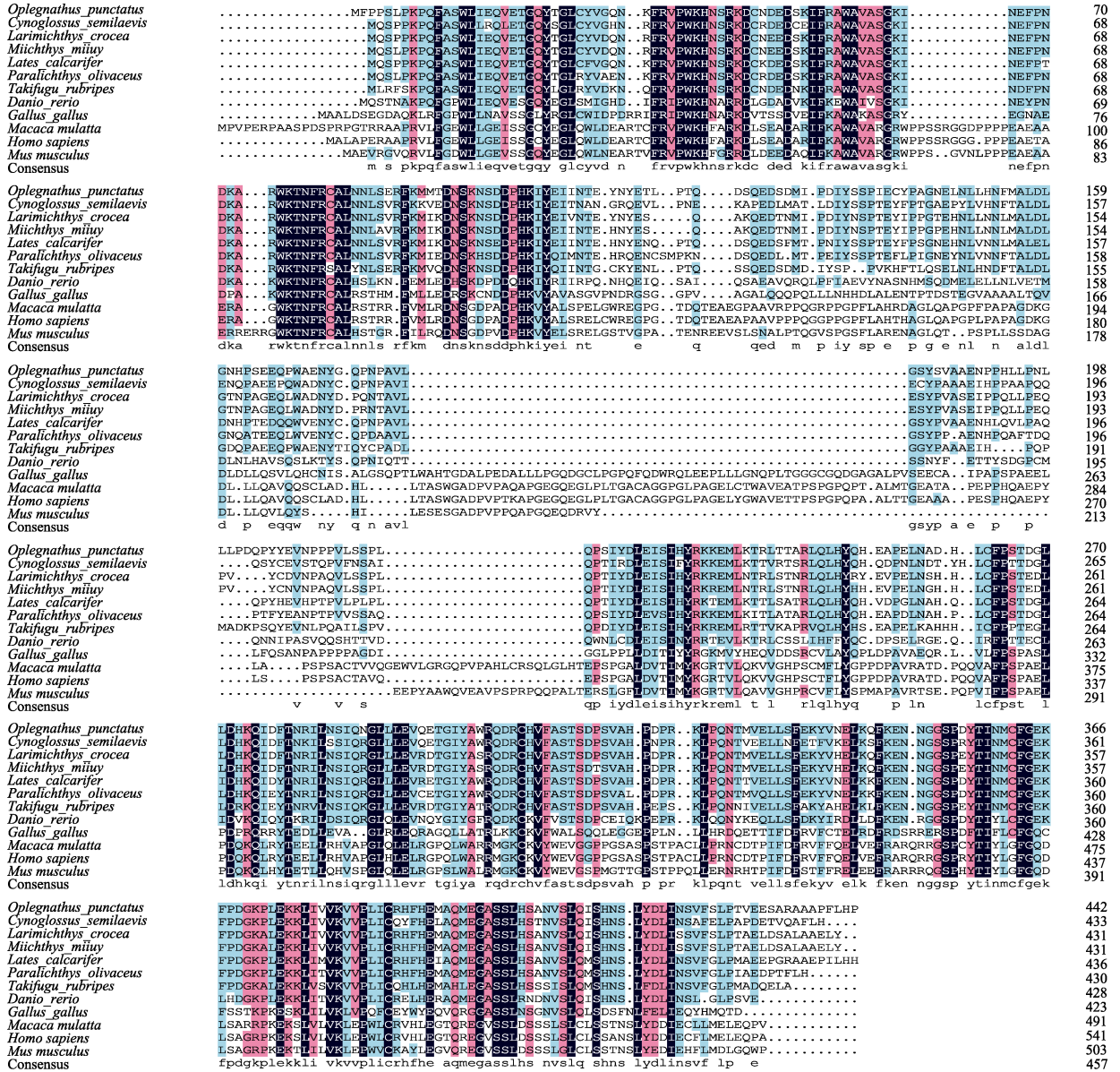


图 3 斑石鲷与其他物种 *irf7* 氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acids of *irf7* among *O. punctatus* and other different species

物种间氨基酸相似度 100%、75%以上和 50%以上分别用黑色、玫红色和蓝色阴影表示。

The color scheme for amino acid similarity among species: black, 100%; pink, >75%; blue, >50%.

表2 本研究用于序列比对和进化树分析的 *irf7* 蛋白信息Tab.2 The species information used in the *irf7* for sequence alignment and phylogenetic tree analysis in this study

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank access No.	相似性 Similarity /%
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_001563.2	30.00
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	XP_028688388.1	32.71
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_058546.1	31.00
鸡 <i>Gallus gallus</i>	QDO67136.1	47.17
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	NP_001281157.1	73.74
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ACY69214.1	79.95
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	NP_001290279.1	81.99
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAH65902.1	46.77
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	XP_018519912.1	82.92
鲢鱼 <i>Miichthys miiuy</i>	AUD11407.1	81.91
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	XP_003967453.2	73.00

其中,在肝脏中表达量最高,在皮肤、肌肉、脑、肠等组织中表达量较低,在头肾中表达量最低(图5)。

2.4 虹彩病毒刺激后 *Opirf7* 基因的表达变化

虹彩病毒刺激斑石鲷后, *Opirf7* 的表达量在脾脏、肾脏中显著上调。脾脏中, *Opirf7* 的表达量在第4天升高至对照组的15倍,在第7天表达量最高,约为对照组的37倍,在第10天表达量降低。在肾脏中,第4天升高2.5倍,第7天时达到表达峰值,为对照组的4倍。在肝脏组织中, *Opirf7* 表达量稍有变化,但差异并不显著。

2.5 poly I:C 刺激斑石鲷脑细胞系 *Opirf7* 的表达

在病毒类似物 poly I:C 感染的斑石鲷脑细胞系中, *irf7* 的表达呈现先升高后降低的趋势,在 50 $\mu\text{g/mL}$ poly I:C (低浓度)刺激时表达量显著升高(13~14倍),在 100 $\mu\text{g/mL}$ poly I:C (中浓度)刺激时表达量也显著升高(14~17倍),而在 200 $\mu\text{g/mL}$ poly I:C (高浓度)刺激时, *irf7* 的表达量仍显著高于对照组(8~9倍),推测 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度较高,对细胞造成一定的损伤,因而表达水平有所下降。

3 讨论

本研究通过 PCR 技术获得了斑石鲷 *Opirf7* 基因 CDS 区序列,并对其序列进行分析。预测其编码蛋白的分子量为 50.5 kDa,无信号肽及跨膜区。氨基酸序列比对结果发现,斑石鲷 *Opirf7* 基因编码的多肽具有典型的 DNA 结合域(DBD)、干扰素相关区(IAD)和丝氨酸富含区(SRD)。在哺乳动物中,所有 IRF 家族成员中的 DBD 通常包含一个 5-色氨酸重复序列,而在硬骨鱼类的 DBD 则只有 4 个间隔的色氨酸重复序列。

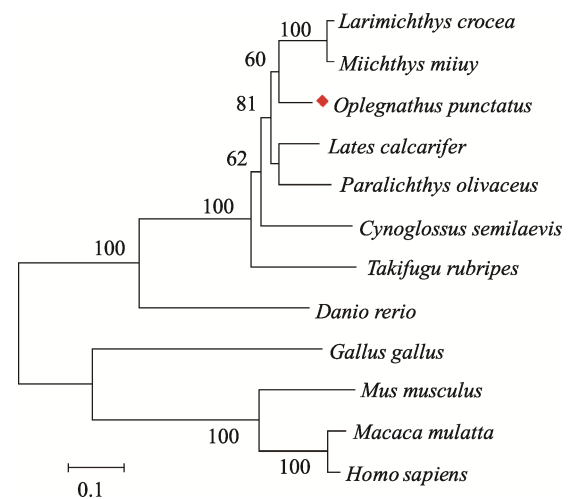


图4 斑石鲷 *Opirf7* 与其他物种系统进化分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of *Opirf7* and other species

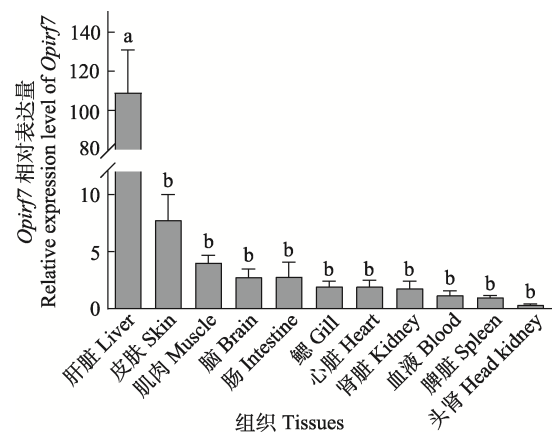


图5 *Opirf7* 基因在健康斑石鲷组织中的相对表达量
Fig.5 The relative expression of the *Opirf7* gene in different tissues of *O. punctatus*

不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$).

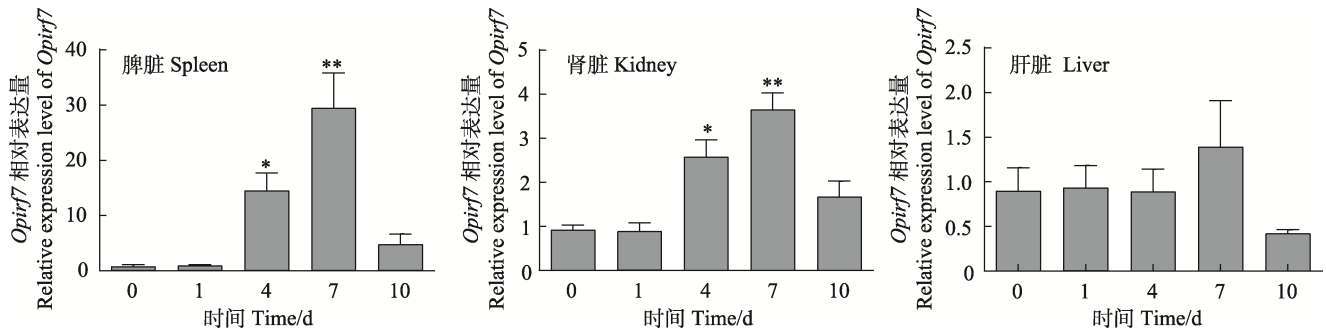


图 6 斑石鲷感染虹彩病毒后 *Opirf7* 基因在免疫组织中的实时定量表达分析

Fig.6 Real-time quantitative expression analysis of *Opirf7* gene in immune tissues of *O. punctatus* infected with Iridovirus

* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

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

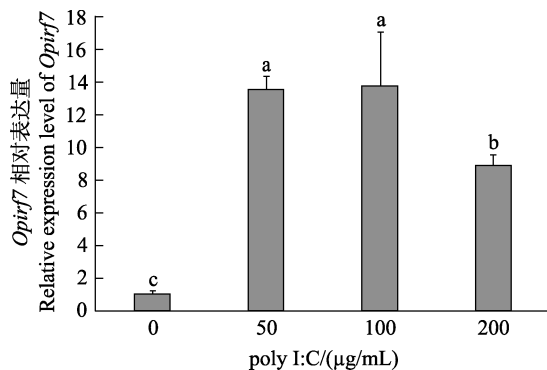


图 7 斑石鲷脑细胞系感染 poly I:C 后 *Opirf7* 基因表达分析

Fig.7 Real-time quantitative expression analysis of *Opirf7* gene in brain cell line infected with poly I: C

这些间隔的色氨酸重复序列通过形成螺旋-转角-螺旋结构与靶基因启动子中的 IFN 刺激反应元件 (ISRE) 和 IRF 调节元件 (IRFE) 共有序列结合 (Escalante *et al.*, 1998; Paun *et al.*, 2007)。IAD 是除 IRF-1 和 IRF-2 以外的所有 IRF 家族成员均具有的结构域。在哺乳动物中, IAD 可通过形成 IRF 同源/异源二聚体与其他转录因子结合以激活干扰素 (Eroshkin *et al.*, 1999)。SRD 仅存在于 IRF-3/5/7 中 (Holland *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010), 与病毒诱导的磷酸化有关。通过氨基酸多重序列比对发现, 斑石鲷 *Opirf7* 与哺乳类、鸟类及其他硬骨鱼类 *irf7* 的结构域特征高度保守。*Opirf7* 与硬骨鱼类相似性较高, 与尖吻鲈的相似性为 82.92%, 而与哺乳类、鸟类相似性较低。系统进化结果表明, 斑石鲷与硬骨鱼类的 *irf7* 聚为一大支, 而与鸟类、哺乳类进化关系较远。

在鱼类中, *irf7* 基因在各物种中表达量最高的组织并不完全一致。在尖吻鲈中, 相对表达量较高组织为鳃和后肠 (Krishnan *et al.*, 2019); 在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的脾和肠中表达量较高 (Cui *et al.*,

2011); 在赤眼鲮 (*Squaliobarbus curriculus*) 的脾中表达量最高, 而在肝脏中表达量最低 (Zhao *et al.*, 2017)。本研究中, 对健康斑石鲷组织中 *Opirf7* 的相对表达量分析发现, *Opirf7* 在肝脏中的表达量远高于其他组织, 说明肝脏可能在抗病毒免疫防御中也发挥一定的作用。

研究表明, *irf7* 在硬骨鱼类中参与细菌、病毒感染后的免疫应答。欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 感染迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 后, 其免疫组织中的 *irf7* 表达量显著上调; 迟缓爱德华氏菌或细胞肿大虹彩病毒 (Megalocytivirus) 刺激都能导致半滑舌鲷各免疫组织 *irf7* 表达量显著上调 (Zhang *et al.*, 2015)。在本研究中, 虹彩病毒感染斑石鲷后, 脾脏、肾脏组织中 *Opirf7* 的表达量显著上调, 总体趋势表现为先升高至峰值, 随后逐渐恢复至正常水平。在细胞水平中也发现了相似的表达趋势, 说明 *Opirf7* 对病毒刺激的反应非常迅速, 有可能参与斑石鲷抗病毒感染机制。

综上所述, 本研究通过对 *Opirf7* 基因克隆、序列特征及表达模式分析, 初步表明 *Opirf7* 参与斑石鲷免疫应答过程, 为进一步研究 *Opirf7* 在斑石鲷抗病免疫中的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- BARNES B, LUBYOVA B, PITHA P M. On the role of IRF in host defense. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2002, 22(1): 59-71
- CUI H, YANG Y, WEI J, *et al.* Identification and functional characterization of an interferon regulatory factor 7-like (IRF7-like) gene from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(6): 672-684
- EROSHKIN A, MUSHEGIAN A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad

- morphogens. *Journal of Molecular Medicine*, 1999, 77(5): 403–405
- ESCALANTE C R, YIE J, THANOS D, AGGARWAL A K. Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, 1998, 391(6662): 103–106
- FITZGERALD K A, ROWE D C, BARNES B J, *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(7): 1043–1055
- HOLLAND J W, BIRD S, WILLIAMSON B, *et al.* Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation. *Molecular Immunology*, 2009, 46(2): 269–285
- HONDA K, TANIGUCHI T. IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(9): 644–658
- HU G, YIN X, XIA J, *et al.* Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 7 (irf7) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 963–971
- KRISHNAN R, KURCHETI P P, MUSHTAQ Z, *et al.* Interferon-regulatory factors, IRF3 and IRF7 in Asian seabass, *Lates calcarifer*: Characterization, ontogeny and transcriptional modulation upon challenge with nervous necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 89: 468–476
- NGUYEN H, HISCOTT J, PITHA P M. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 1997, 8(4): 293–312
- PAUN A, PITHA P M. The IRF family, revisited. *Biochimie*, 2007, 89(6/7): 744–753
- STEIN C, CACCAMO M, LAIRD G, *et al.* Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biology*, 2007, 8(11): R251
- SUN B J, CHANG M X, SONG Y, *et al.* Gene structure and transcription of IRF-1 and irf7 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 116(1/2): 26–36
- TANAKA N, TANIGUCHI T. The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 2000, 10(2): 73–81
- TANIGUCHI T, OGASAWARA K, TAKAOKA A, *et al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19: 623–655
- VEALS S A, SCHINDLER C, LEONARD D, *et al.* Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12(8): 3315–3324
- XIANG Z, DONG C, QI L, *et al.* Characteristics of the interferon regulatory factor pairs zIFRF5/7 and their stimulation expression by ISKNV infection in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34(12): 1263–1273
- XU Q Q, CHANG M X, XIAO F S, *et al.* The gene and virus-induced expression of IRF-5 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 134(3/4): 269–278
- ZHANG J, LI Y X, HU Y H. Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 272–282
- ZHANG L, PAGANO J S. IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(10): 5748–5757
- ZHANG R, KANG C, PENG L, *et al.* Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members. *Immunologic Research*, 2012, 54(1/2/3): 169–176
- ZHAO X, WANG R, LI Y, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of interferon regulatory factor 7 of the barbel chub, *Squaliobarbus curriculus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 69: 185–194

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression of *irf7* Gene in Spotted Knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) Under Virus Infection

SONG Yu¹, LI Kaimin^{1,2}, XU Wenteng¹, CHEN Songlin¹, WANG Lei^{1①}

(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; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract Interferon regulatory factor (*irf7*) is an immune regulatory factor that plays an important role in the antiviral process. To explore the role of *irf7* in *Oplegnathus punctatus* (Temminck & Schlegel, 1844) under viral infection, we cloned the coding DNA sequence (CDS) region of *irf7* through PCR and analyzed the expression patterns at both tissue and cell levels. The results showed that the CDS region of *Opirf7* was 1 332 bp and encoded a peptide with 443 amino acids. The predicted molecular weight was 50.5 kDa and the theoretical isoelectric point was 5.546. Protein structure analysis showed that *Opirf7* has three conserved domains: the DNA binding domain (DBD), IRF-associated domain (IAD), and serine-rich domain (SRD). Amino acid similarity analysis showed that *Opirf7* had the highest similarity to the IRF7 of *Lates calcarifer*, which was 82.92%. The similarity of *Opirf7* with the IRF7 of *Larimichthys crocea*, *Paralichthys olivaceus*, and *Cynoglossus semilaevis* were 81.99%, 79.95%, and 73.74%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *Opirf7* and other fish *irf7* genes were clustered into one branch, and *irf7*s from *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Macaca mulatta*, and *Homo sapiens* were clustered into another. Tissues from healthy *O. punctatus* were collected, including the liver, spleen, kidney, head kidney, intestine, gill, skin, muscle, brain, heart, and blood. After RNA extraction and cDNA synthesis, real-time PCR (qPCR) was performed to detect the expression level of *Opirf7* using the comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method). The results of qPCR showed that *Opirf7* was expressed in different tissues of healthy individuals and its expression was highest in the liver, followed by the skin and intestines. The lowest expression was observed in the head kidney. In this study, the expression profiles of *Opirf7* before and after viral infection were determined at the tissue and cell levels. For the *in vivo* challenge study, fish were intraperitoneally injected with spotted knifejaw iridovirus, and the expression level of *Opirf7* was tested in the spleen, kidney, and liver. Compared with the control group at 0 h, the expression level of *Opirf7* was 15-fold in the spleen and 3-fold in the kidney 4 days after infection, and the expression peak was at 7 days after infection. However, the expression of *Opirf7* was not significantly altered in the liver. A poly I:C-infected *O. punctatus* brain cell model was established, and the expression profiles of *Opirf7* mRNA were detected before and after infection. The expression of *Opirf7* mRNA in the low and medium concentration groups (50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively) increased by 13 to 17 times, and the expression level of *Opirf7* mRNA in the high concentration group (200 $\mu\text{g/mL}$) increased by approximately 8 times. It was speculated that the high concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ caused some damage to the cells and that the expression level in the high concentration group was lower than that in the low and medium groups. In this study, the full-length open reading frame sequence of *Opirf7* was cloned and characterized for the first time. The deduced amino acid sequence displayed a structure similar to those of other vertebrates. Further functional analysis showed that *Opirf7* has a significant response to viral infection at both tissue and cell levels. This study demonstrated that the *Opirf7* gene might play an important role in the antiviral response of *O. punctatus* and provide a potential molecular marker for antiviral breeding of *O. punctatus*.

Key words Spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*); Interferon regulatory factor-7; Anti-virus gene; Immune response

① Corresponding author: WANG Lei, E-mail: leileiwan@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210930003

http://www.yykxjz.cn/

刘志峰, 马爱军, 孙建华, 朱理光, 包玉龙, 张涛, 俞兰良. 红鳍东方鲀 AFP、CIRP、HMGB1 和 YB-1 基因对低温胁迫的响应. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 58-67

LIU Z F, MA A J, SUN J H, ZHU L G, BAO Y L, ZHANG T, YU L L. Response of AFP, CIRP, HMGB1 and YB-1 gene of *Takifugu rubripes* to low-temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 58-67

红鳍东方鲀 AFP、CIRP、HMGB1 和 YB-1 基因对低温胁迫的响应*



刘志峰^{1,2} 马爱军^{1,2①} 孙建华¹ 朱理光^{1,2} 包玉龙³ 张涛³ 俞兰良⁴

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 大连天正实业有限公司 辽宁 大连 116600; 4. 威海银泽生物科技有限公司 山东 威海 264404)

摘要 鱼类的生长和繁殖受环境条件的调节, 冬季的低温会给红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)产业带来不利影响。为研究红鳍东方鲀耐低温机制, 本研究利用实时荧光定量 PCR 技术, 分析抗冻蛋白(AFP)基因、冷诱导 RNA 结合蛋白(CIRP)基因、高速迁移蛋白家族蛋白(HMGB1)基因、Y-box 结合蛋白(YB-1)基因在不同温度条件下(18℃、13℃、8℃和 5℃), 在红鳍东方鲀的肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、性腺和皮肤中的表达情况。结果显示, AFP 基因呈广泛性表达, 在肌肉中表达量最高($P<0.05$), 随着温度的降低, 各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势, 在 5℃组达到最高值, 显著高于对照组($P<0.05$)。CIRP 基因在肌肉中表达量最高($P<0.05$), 随着温度的降低, 各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同, 在肝、肾、脑、心、肠、皮肤中的表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在脾、肌肉和性腺中表达量呈上升趋势。HMGB1 基因在肌肉中表达量最高($P<0.05$), 在脑、心、肝和皮肤中也有较高的表达量; 随着温度的降低, 除肝脏外, 各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势, 并在 8℃组达到最大值, 显著高于其他各组($P<0.05$)。YB-1 基因在肌肉中表达量最高($P<0.05$), 在其他组织中表达量较低; 随着温度的降低, 大部分组织中(脑、心、肠、肾、肝、肌肉和脾)表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在 8℃组达到最小值($P<0.05$)。以上结果表明, 4 种基因表达水平因组织、温度的不同而不同, 反映了这 4 种基因的功能特异性; 在低温胁迫下, 4 种基因积极响应, 表达量均发生不同程度的变化, 表明 4 种基因在红鳍东方鲀低温环境适应中可能具有潜在的重要作用。另外, 从表达变化规律来看, 8℃可能是红鳍东方鲀应对低温胁迫的关键调控点, 过低的温度会造成其调控紊乱, 这可为研究红鳍东方鲀低温应答调控机制提供相关依据。

关键词 红鳍东方鲀; 低温胁迫; AFP; CIRP; HMGB1; YB-1; 荧光定量 PCR

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0058-10

* 国家重点研发计划子课题(2018YFD0900301-12)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47-01)、国家自然科学基金项目(32002362)、山东省自然科学基金(ZR2019BC089)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD25)共同资助。刘志峰, E-mail: liuzf@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-10-25

鱼类的生长和繁殖受环境条件的调节,气候的变化可能给海水网箱养殖鱼类带来不利影响。已有大量研究表明,冬季的低温易导致鱼类生长性能降低,甚至大量死亡(Abdel-Tawwab *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2019、2020)。红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)主要分布在我国沿海地区、朝鲜半岛和日本海域,其肉质鲜美、营养丰富,已成为我国重要的经济型海水养殖鱼类之一。红鳍东方鲀作为暖温性鱼类,其适宜的生长温度为 16~25℃,然而,冬季水温的下降严重影响其生长性能,需要采用室内加热水进行养殖,但由于加热升温的方法会带来成本上升、环境压力等问题,养殖水温仍只能维持在较低水平。因此,研究该物种冷适应的分子机制及培育具有耐寒特性的品种,有助于减少因低温而出现大面积死亡的情况发生,从而提高养殖产量,提升经济效益。

受益于分子生物学手段的不断提升,针对鱼类低温耐受分子机制的研究越来越深入,一些与鱼类低温耐受相关的基因得以被发现及应用。本课题组前期通过分析红鳍东方鲀的低温转录组差异基因,筛选得到 4 个与低温耐受相关的基因。抗冻蛋白(AFP)基因作为研究较为深入的抗寒基因,普遍存在于鱼类、植物、昆虫、细菌和真菌中(Duman *et al.*, 1993; 崔杰等, 2019; 徐凯等, 2019; 张俊芳等, 2020)。AFP 对冰晶具有较高的亲和力,能够附着到冰晶表面,阻止冰晶长大,从而达到抗寒的目的(Raymond *et al.*, 1977; 汪少芸等, 2012)。在鱼类中,已有大量的相关研究,鱼源抗冻蛋白也得到了广泛应用(钟其旺等, 2002; 蔡路昀等, 2018)。冷诱导 RNA 结合蛋白(CIRP)是一种进化上保守的 RNA 结合蛋白, CIRP 基因作为一种分布广泛、作用性强的功能基因,参与机体抵御外界低温的过程,通过提高 mRNA 的稳定性,介导多种基因的转录翻译,从而保护机体免受低温损伤(Al-Fageeh *et al.*, 2006)。近年来,研究发现, CIRP 参与了一些鱼类的低温胁迫应答过程,包括黄姑鱼(*Nibea albiflora*) (Xu *et al.*, 2018)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (胡金伟等, 2015)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (苗亮等, 2017)等。高速迁移蛋白家族蛋白(HMGB1)作为一种高度保守的非组蛋白染色质相关蛋白,其功能是稳定核小体的形成(Lange *et al.*, 2009),并充当转录因子样蛋白,通过弯曲 DNA 和促进获得特定 DNA 靶点上的转录蛋白来调控基因的表达(Park *et al.*, 2003),包括一些与低温相关的基因(Vornanen *et al.*, 2005)。Y-box 结合蛋白 1 (YB-1)属于冷休克蛋白家族成员,在进化上高度

保守(Swamynathan *et al.*, 1998),是一类重要的功能蛋白。其可以作为转录因子与 DNA、mRNA 结合,也可以与其他转录因子发生蛋白互作,来完成基因转录与翻译的调控,进而参与机体的生理调控作用(Kloks *et al.*, 2002; Eliseeva *et al.*, 2011)。YB-1 基因作为一种胁迫响应基因,对不同物种的多种胁迫都会产生响应,包括冷胁迫、氧化应激、缺氧等(Rauen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018)。关于 HMGB1 基因和 YB-1 基因的相关报道在海洋生物中较少,且集中在鱼类免疫方面(Cai *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019)。

本文以红鳍东方鲀为研究对象,采用荧光定量 PCR 的方法研究上述 4 种抗寒基因在不同温度、不同组织中的响应情况,从分子水平理解红鳍东方鲀的低温适应性,初步分析红鳍东方鲀幼鱼的抗寒分子机制,以期筛选抗寒分子标记提供候选基因,进而为红鳍东方鲀耐低温育种研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用红鳍东方鲀取自大连天正实业有限公司,挑选体长为(15.0±0.5) cm、体格健壮、无损伤、活力好的 360 尾幼鱼,于 12 个实验桶(500 L)暂养,静水充气方式饲养,每日换水 1 次,暂养 2 周。设置 4 个温度梯度(18℃、13℃、8℃和 5℃),18℃作为对照组,每个温度梯度设置 3 个平行,每个平行 30 尾幼鱼。暂养结束后,采用急性换水降温的方法,排掉海水的同时加入事先调至实验温度的海水,直到温度达到实验温度,使用亚美光 411-H 钛质加热器,控制温度在实验温度范围内,每隔 2 h 观察水温。实验过程中不投喂饵料,溶解氧为(6.80±0.12) mg/L,自然光照,胁迫 24 h 后结束实验。每个养殖桶取 3 尾,使用 200 mg/L MS-222 麻醉后,迅速在冰上完成解剖,每尾鱼分别取肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、皮肤和性腺,浸入 10 倍体积的 RNA 保存液中(TIANGEN),4℃静置 24 h 后于-80℃保存。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成

使用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒(DP419)进行 RNA 提取,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,使用紫外分光光度仪检测浓度。取 1 μg 总 RNA,按照 TransScript 反转录试剂盒(AT311-03)说明书合成 cDNA 第一链,将产物于-80℃冰箱保存,待下一步实验。

1.3 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)的方法检测目的基因的表达情况,使用 Primer express 3.0 设计定量引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。参照 TransStart 说明书,在96孔板中配制20 μ L体系:2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L,50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ L,RNase-free ddH₂O 7.4 μ L,上、下游引物各0.6 μ L,cDNA模板1 μ L。RT-qPCR反应在ABI StepOne plus平台进行,PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性30 s,二步法PCR(94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环),反应结束后绘制熔解曲线以确保扩增的特异性和准确性。

表1 RT-qPCR用到的引物序列
Tab.1 Primers used for RT-qPCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
β -actin F	ATCGTTGGTCGCCCCAGGCACC
β -actin R	CTCCTTGATGTCAGCACGATTC
AFP-F	TCACGAACGGAGGTCTTTCT
AFP-R	TGCCACTTGTTGGCTTGTA
CIRP-F	ATGGCGACAGGAGTTATGGT
CIRP-R	GTTTCGTATCCACCCTGCATC
HMGB1-F	GACAAGGACATCGTTGCGTA
HMGB1-R	ATCCTCGTCGTCATCGTCTT
YB-1-F	AGAGGCTTCCGACCAAGATT
YB-1-R	GTTGGTTCTGACCACCTTCG

1.4 数据处理与分析

β -actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 检验比较各实验组之间的差异, $P<0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果

2.1 低温胁迫下 AFP 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 AFP 基因在 18 $^{\circ}$ C 的表达情况如图 1 所示,在所检测的组织中,该基因呈现广泛性表达,在肌肉中表达量最高($P<0.05$),皮肤、肾脏次之,在性腺中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 2 所示,随着温度降低,各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势,在 5 $^{\circ}$ C 组达到最高值,相比对照组表达量升高且差异显著($P<0.05$),增幅较大,增幅最低的肾脏也在 18 倍以

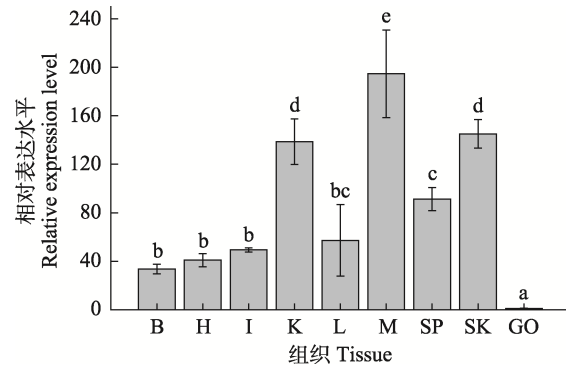


图1 AFP基因的组织表达

Fig.1 Tissue-specific expressions of AFP gene

B: 脑; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉;
SP: 脾; SK: 皮; GO: 性腺。

不同字母代表差异显著($P<0.05$)。下同。

B: Brain; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver;
M: Muscle; SP: Spleen; SK: Skin; GO: Gonad.

Different letters represent significant differences ($P<0.05$).
The same as below.

上;在脑、心、肝、肌肉、性腺和皮肤中,5 $^{\circ}$ C组表达量显著高于8 $^{\circ}$ C组($P<0.05$),在肾、肠、脾中8 $^{\circ}$ C组和5 $^{\circ}$ C组之间无显著差异。

2.2 低温胁迫下 CIRP 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 CIRP 基因在 18 $^{\circ}$ C 的表达情况如图 3 所示,在所检测的组织中该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高($P<0.05$),在肠中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 4 所示,随着温度的降低,各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同,肝、肾、脑的表达量呈先升高后降低再升高的趋势,在 13 $^{\circ}$ C 组表达量显著高于对照组;心、肠和皮的表达量呈先升高后降低的趋势,在 8 $^{\circ}$ C 组达到最大值,且 8 $^{\circ}$ C 组和 5 $^{\circ}$ C 组都显著高于对照组($P<0.05$);在脾、肌肉和性腺中表达量呈上升趋势,在 5 $^{\circ}$ C 组达到最高值,显著高于对照组($P<0.05$)。

2.3 低温胁迫下 HMGB1 基因在各组织中的表达

红鳍东方鲀 HMGB1 基因在 18 $^{\circ}$ C 的表达情况如图 5 所示,在所检测的组织中该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高($P<0.05$),在脑、心、肝和皮肤中也有较高的表达量,在其他组织中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的结果如图 6 所示,随着温度的降低,除肝脏外各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势,并在 8 $^{\circ}$ C 组达到最大值,显著高于其他各组($P<0.05$),其中,最小的增幅出现在肌肉组织,增幅 3 倍以上;最大增幅出现

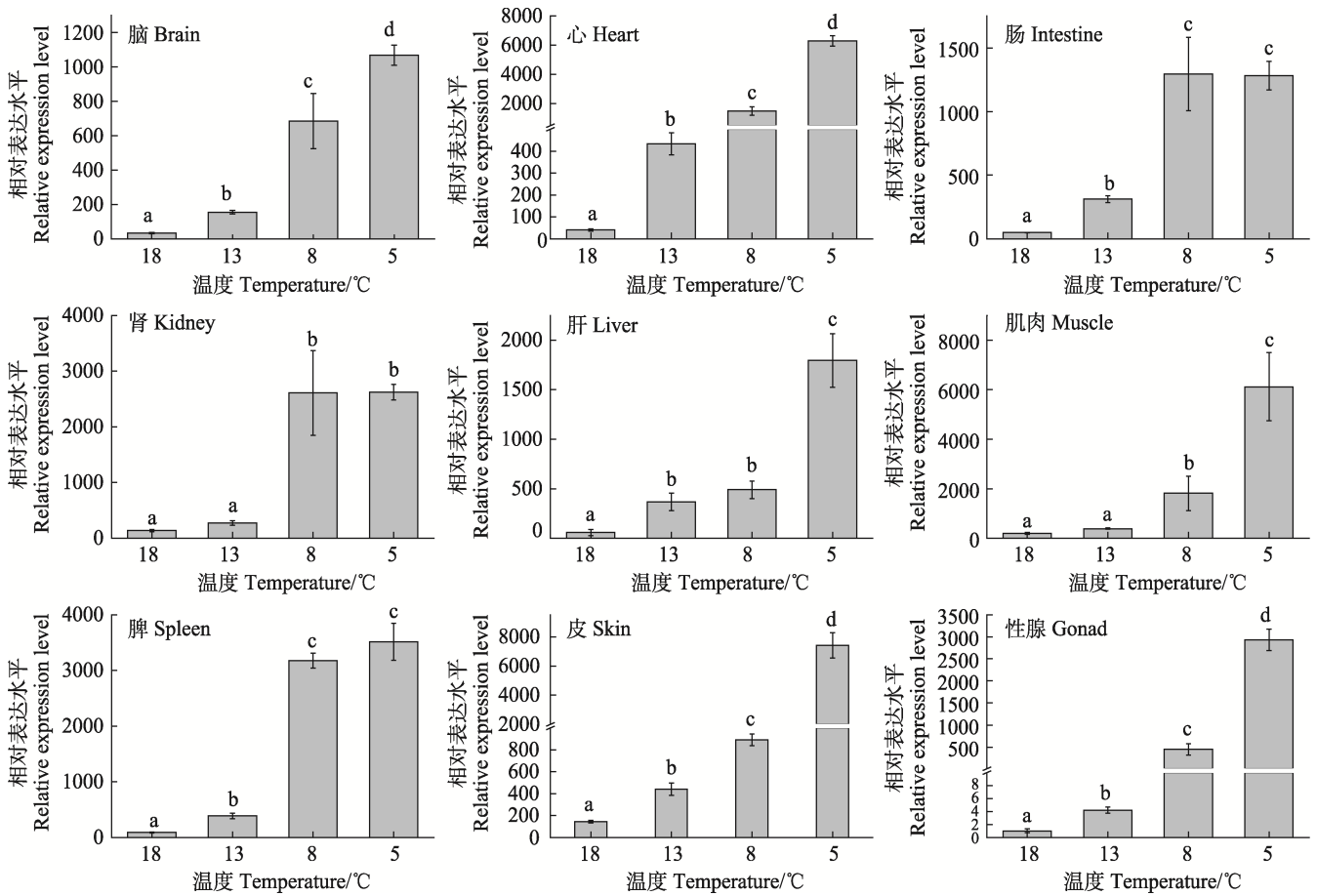


图 2 不同温度条件下 AFP 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达
Fig.2 Expression of AFP gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

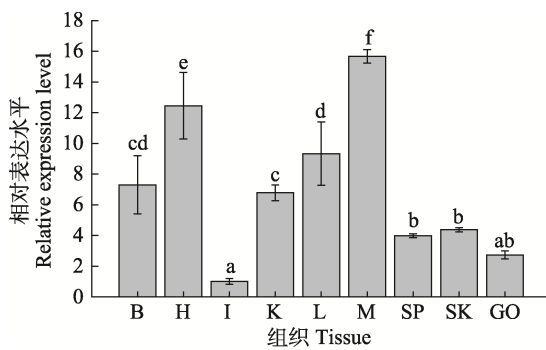


图 3 CIRP 基因组织表达
Fig.3 Tissue-specific expressions of CIRP gene

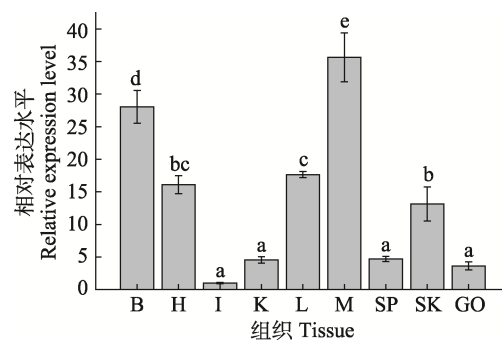


图 5 HMGB1 基因组织表达
Fig.5 Tissue-specific expressions of HMGB1 gene

在肠组织中, 增幅 70 倍以上; 肝脏中 HMGB1 基因的表达量在 13°C 组和 8°C 组表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 两组间无显著差异。

2.4 低温胁迫下 YB-1 基因在各组织中的表达情况

红鳍东方鲀 YB-1 基因在 18°C 的表达情况如图 7 所示, 该基因在肌肉中表达量最高 ($P < 0.05$), 在其他组织中表达量较低。各组织不同温度处理 24 h 后的

结果如图 8 所示, 随着温度的降低, 各组织中 YB-1 基因的表达量的升降程度有所不同, 在大部分组织中 (脑、心、肠、肾、肝、肌肉和脾) 表达量呈先升高后降低再升高的趋势, 在 8°C 组达到最小值, 其中, 主要表达组织 (肌肉) 中的表达量降幅超过 5 倍; 除肠外, 其他各组织在 8°C 组的基因表达量都显著低于其他各组 ($P < 0.05$); 在皮肤和性腺中, 该基因的表达量在 5°C 组达到最大值, 显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。

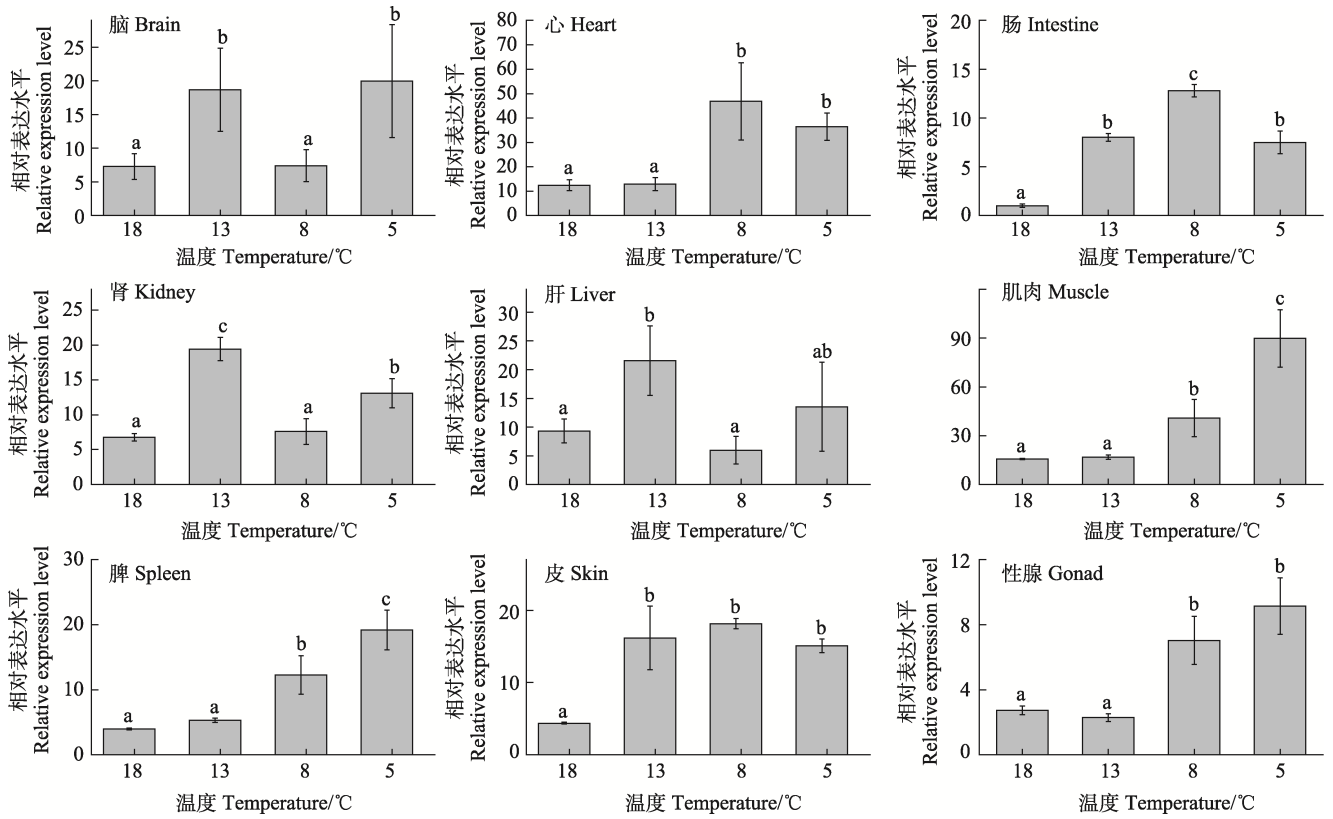


图4 不同温度条件下CIRP基因在红鳍东方鲀各组织中的表达

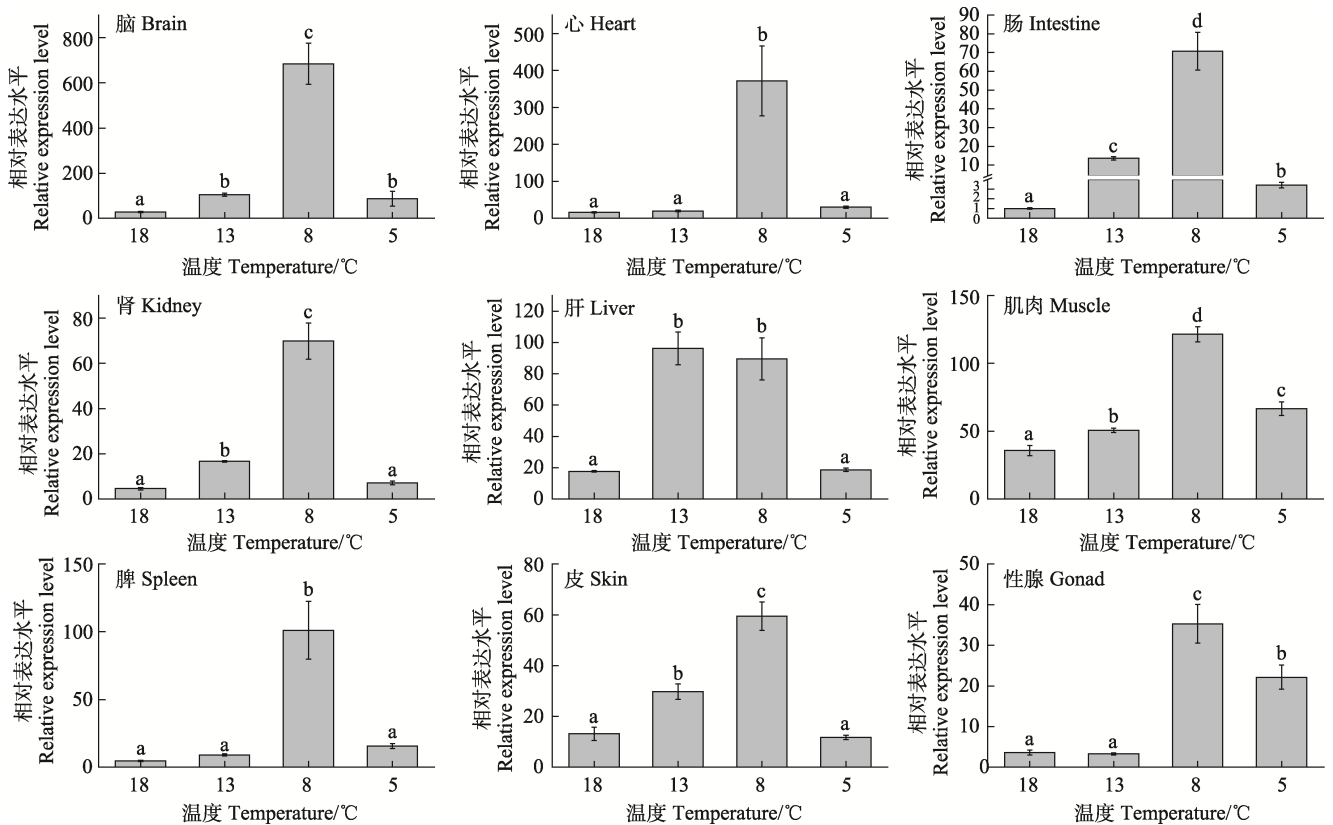
Fig.4 Expression of CIRP gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

图6 不同温度条件下HMGB1基因在红鳍东方鲀各组织中的表达

Fig.6 Expression of HMGB1 gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

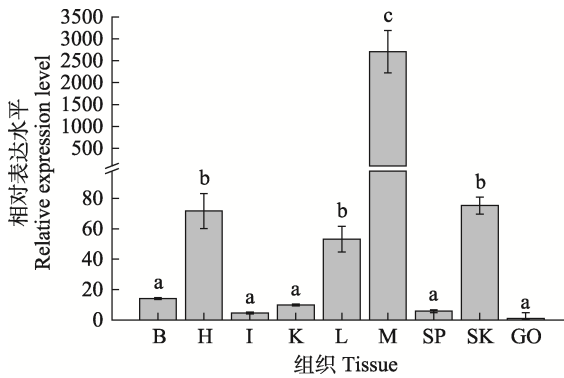


图 7 YB-1 基因组织表达
Fig.7 Tissue-specific expressions of YB-1 gene

3 讨论

3.1 低温胁迫下红鳍东方鲀 AFP 基因在各组织中的表达情况分析

抗冻蛋白具有控制冰晶的形成以及调节冰晶状态的作用, 分布比较广泛, 在动物、植物以及微生物中均可以发现 AFP 的存在(Duman *et al.*, 2001; Bale

et al., 2002; Davies *et al.*, 2016)。在抗寒应用方面, 转基因烟草、马铃薯获得了更高的抗冻能力(黄永芬等, 1997; 沈立晓等, 1998)。在斑马鱼胚胎的早期阶段, 将 AFPs 导入斑马鱼胚胎可增强细胞的冷冻保护(Martínez-Páramo *et al.*, 2009)。在红鳍东方鲀中, 关于 AFP 基因与抗寒性关系的研究尚未见报道。本研究发现, 在所检测的组织中(肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉和性腺), 该基因呈现广泛性表达模式, 这与 Low 等(1998)在杜父鱼(*Myoxocephalus scorpius*)中的研究结果相一致。同时, 随着温度的降低, 各组织中 AFP 基因的表达量基本呈显著升高的趋势, 这可能是由于鱼类作为变温动物, 当环境温度降低时, 内部各组织都需面临低温的风险, AFP 基因在应对低温胁迫时具有组织广适性, 对各个组织都具有保护功能, 其广泛分布以及低温诱导表达有利于对各组织的保护。另外, 在本研究中, 低温胁迫下 AFP 基因表达在各组织中的变化趋势一致, 且都在最低温度 5℃ 组达到最高值, 据此推测, 红鳍东方鲀 AFP 基因更多是通过直接保护组织免受冻害的方式来完成其抗寒性能。

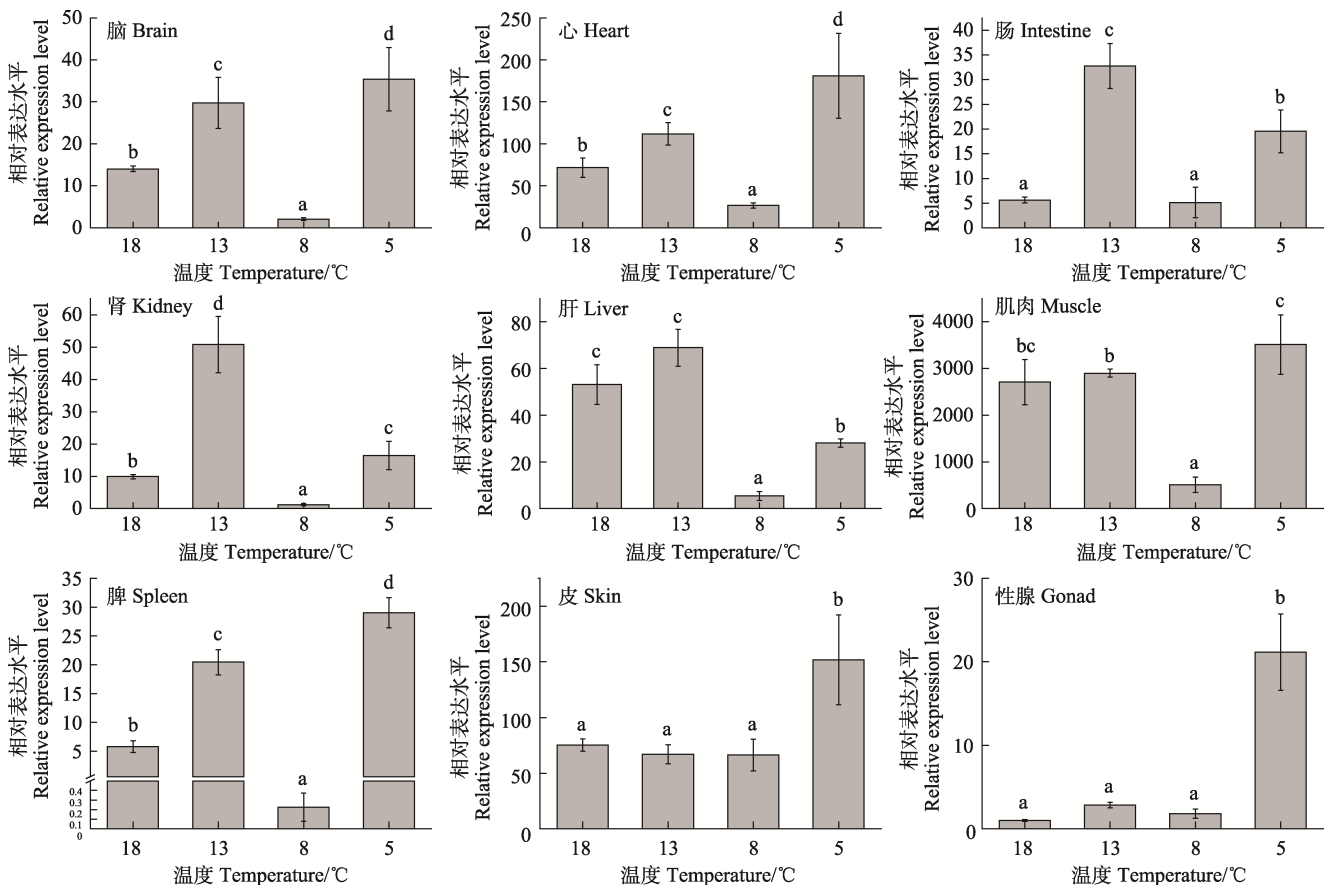


图 8 不同温度条件下 YB1 基因在红鳍东方鲀各组织中的表达
Fig.8 Expression of YB-1 gene in different tissues of *T. rubripes* at different temperatures

3.2 低温胁迫下 CIRP 基因在各组织的表达分析

冷诱导 RNA 结合蛋白 CIRP 最早在哺乳动物中发现,是一种参与机体应激调节的蛋白(Nishiyama *et al*, 1997),其基因表达量在冷刺激下急剧增加,具有介导冷诱导细胞生长抑制作用,因此,被视为冷诱导的标记基因(Nishiyama *et al*, 1998)。本研究中,CIRP 基因在所检测的组织中均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高。这种广泛性表达的模式在多种鱼类的研究中都有发现,如牙鲆 CIRP 基因在脑、鳃、心、肌肉、肝、肠等组织都有不同程度的表达,具有较广的表达谱(胡金伟等, 2015);大黄鱼 CIRP 基因在肝脏中表达量最高,在肌肉、肾、鳃、皮肤、肠、脑、脾和心等组织中也有一定的表达(苗亮等, 2017),大西洋鲑(*Salmo salar*)肝、肾、心中也都能检测到 CIRP 基因表达,且组织间不存在显著差异(Feng *et al*, 2004)。以上结果表明,CIRP 基因的组织分布呈现广泛性,又具有物种特异性。另外,本研究还发现,随着温度的降低,各组织中 CIRP 基因的表达量的升降程度有所不同,呈现出不同的表达谱,这可能与不同组织的生理特性、行使的生物学功能不同等因素有关。皮肤和肌肉中 CIRP 基因在低温下都呈现升高的趋势,且 3 个低温组都显著高于对照组,这与大黄鱼(苗亮等, 2017)的研究结果相类似,大黄鱼皮肤和肌肉 CIRP 基因在整个降温过程中呈持续升高趋势,且在最低温度组中表达量最高。另外,苗亮等(2017)发现,脾和肠中 CIRP 基因的表达量较低,且表达量随温度降低而降低,与本研究的结果有所不同,其原因可能是 2 种鱼类的抗寒性能不同。本研究涉及到的低温过程并未超越红鳍东方鲀的耐受能力,在实验期间,CIRP 基因在大多组织中仍然能够发挥正常的调控作用。

3.3 低温胁迫下 HMGB1 基因在各组织的表达分析

HMGB1 是一种染色质相关的非组蛋白,对核小体形成、转录调控和炎症反应具有重要作用。在哺乳动物中,核 HMGB1 在核小体结构稳定性、DNA 错配修复和基因表达调控中发挥重要作用(Bustin *et al*, 1999; Stros *et al*, 2010; Tang *et al*, 2010)。在硬骨鱼中也有报道,其在鱼类早期发育以及免疫应答方面起到重要作用(Zhao *et al*, 2011; Cai *et al*, 2014)。本研究发现,在所检测的组织中,该基因均有不同程度的表达,在肌肉中表达量最高,在脑、心、肝和皮肤中也有较高表达量,在其他组织中表达量较低。类似表达模式在多种鱼类中有报道,如牙鲆(胡金伟等, 2015)、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*) (Cai *et al*, 2014)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

idella) (Yang *et al*, 2013)、金鱼(*Carassius auratus*) (Xie *et al*, 2014)等。本研究还发现,随着温度的降低,除肝脏外,各组织中 HMGB1 基因的表达量基本呈先升高后降低的趋势,并在 8℃组达到最大值,显著高于其他各组;在肝脏中也呈现相同的趋势,最高值出现在 13℃组且与 8℃组无显著差异。一方面,说明在低温胁迫下 HMGB1 基因发挥了调控功能(Vornanen *et al*, 2005);另一方面,5℃对红鳍东方鲀来说已经是难于生存的温度,因此, HMGB1 基因在 5℃组的低表达可能超越了该基因的调控极限。目前,在低温胁迫下鱼类 HMGB1 基因的研究报道仍然较少,更多的反应调节机制需要进一步研究。

3.4 低温胁迫下 YB-1 基因在各组织的表达分析

YB-1 基因作为一个胁迫响应基因,不同种类的应激,如冷休克、氧化剂应激、重金属应激、缺氧和紫外线照射等都能触发 YB-1 基因的响应(Koike *et al*, 1997; Kohno *et al*, 2003; Rauert *et al*, 2016; Li *et al*, 2018),在这些过程中,YB-1 基因可以作为转录因子调节应激反应基因的转录,也可以同 mRNA 结合调节翻译过程。本研究中,YB-1 基因在肌肉中表达量最高,显著高于在其他组织中的表达量。这种表达模式同其他物种的结果有所不同,如红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*) Y-box 基因转录活性最强的组织是神经,在心、肠和肌肉中的表达量很低(孟庆国等, 2012); Y-box 基因在中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液、管足、围口膜、雄性性腺、雌性性腺、肌肉和肠 7 个不同组织中均有表达,但差异不显著(田毅等, 2013);小鼠的 YB-1 基因在性腺中表达量最高,其次是肾、心、肌肉、肝等。以上结果表明,不同物种 Y-box 基因应对环境变化的方式有所不同,红鳍东方鲀 YB-1 基因可能在肌肉中发挥重要的环境调控作用。本研究还发现,在大多数组织中(其中包括主要的表达组织肌肉),8℃组的表达量最低,显著低于对照组,并且这些组织中 5℃组 YB-1 基因表达又有不同程度的回升,这些结果一方面说明 YB-1 基因在红鳍东方鲀中受冷诱导,在肌肉中以降低表达的方式应对低温胁迫;另一方面,8℃时该基因发挥主要的调节作用。

4 结论

本研究通过荧光定量 PCR 技术对红鳍东方鲀肝、脾、肾、脑、心、肠、肌肉、性腺和皮肤中 4 个与低温相关基因的表达量进行检测,结果显示,4 个基因在不同温度条件下、不同组织中均有不同程度的表

达, 其中, 皮肤和肌肉普遍呈现高表达, 且在低温胁迫下存在显著性变化, 这说明皮肤和肌肉作为外界环境的密切接触者, 在应对温度变化方面发挥重要的作用。另外, 从不同温度下 4 个基因的表达变化规律来看, 8℃可能是红鳍东方鲀应对低温胁迫的关键调控点, 过低的温度会造成其调控紊乱, 此结果可为研究红鳍东方鲀低温应答调控机制提供相关依据。

参 考 文 献

- ABDEL-TAWWAB M, WAFEEK M. Influence of water temperature and waterborne cadmium toxicity on growth performance and metallothionein-cadmium distribution in different organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Thermal Biology*, 2014, 45: 157–162
- AL-FAGEEH M B, SMALES C M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, 2006, 397(2): 247–259
- BALE J S. Insects and low temperatures: From molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2002, 357(1423): 849–862
- BUSTIN M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Molecular Cell Biology*, 1999, 19: 5237–5246
- CAI J, XIA H, HUANG Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of high mobility group box1 (Ls-HMGB1) from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 539–544
- CAI L Y, NIAN L Y, CAO A L, *et al.* Research progress in the structure-function relationship of aquatic antifreeze proteins and its application in food processing and storage. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 346–352 [蔡路鸣, 年琳玉, 曹爱玲, 等. 水产源抗冻蛋白构效关系及在食品加工储藏中应用的研究进展. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 346–352]
- CAI X, GAO C, SU B, *et al.* Expression profiling and microbial ligand binding analysis of high-mobility group box-1 (HMGB1) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 100–108
- CUI J, LI J L, WANG Z Y, *et al.* Cloning of gene of carrot antifreeze protein and its transformation to sugar beet. *China Beet and Sugar*, 2019(3): 18–22 [崔杰, 李俊良, 王琮玉, 等. 胡萝卜抗冻蛋白基因克隆及对甜菜遗传转化的研究. *中国甜菜糖业*, 2019(3): 18–22]
- DAVIES P L. Antarctic moss is home to many epiphytic bacteria that secrete antifreeze proteins. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(1): 1–2
- DUMAN J G, OLSEN T M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*, 1993, 30(3): 322–328
- DUMAN J G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*, 2001, 63: 327–357
- ELISEEVA I A, KIM E R, GURYANOV S G, *et al.* Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(13): 1402–1433
- FENG P, ZARATE J, CHOUDHURY A, *et al.* Osmotic stress of salmon stimulates upregulation of a cold inducible RNA binding protein (CIRP) similar to that of mammals and amphibians. *Biochimie*, 2004, 86(7): 451–461
- HE J, XIE T L, LI X, *et al.* Molecular cloning of Y-box binding protein-1 from mandarin fish and its roles in stress-response and antiviral immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 93: 406–415
- HU J W, YOU F, WANG Q, *et al.* Cloning and expression analysis of cold-tolerance related genes, CIRP and HMGB1, in *Paralichthys olivaceus*. *Marine Sciences*, 2015, 39(1): 29–38 [胡金伟, 尤锋, 王倩, 等. 牙鲆耐寒相关基因 CIRP、HMGB1 的克隆及表达特征分析. *海洋科学*, 2015, 39(1): 29–38]
- HUANG Y F, WANG Q Y, FU G R, *et al.* The research on introducing flounder antifreeze protein gene (*afp*) into tomato. *Chinese Biochemical Journal*, 1997, 13(4): 418–422 [黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲽抗冻蛋白基因(*afp*)导入番茄的研究. *生物化学杂志*, 1997, 13(4): 418–422]
- ISLAM M A, UDDIN M H, UDDIN M J, *et al.* Temperature changes influenced the growth performance and physiological functions of Thai pangas *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Reports*, 2019, 13: 100179
- ISLAM M J, SLATER M J, BÖGNER M, *et al.* Extreme ambient temperature effects in European seabass, *Dicentrarchus labrax*: Growth performance and hemato-biochemical parameters. *Aquaculture*, 2020, 522: 735093
- KLOKS C P A M, SPRONK C, LASONDER E, *et al.* The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 316(2): 317–326
- KOHNO K, IZUMI H, UCHIUMI T, *et al.* The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, 2003, 25(7): 691–698
- KOIKE K, UCHIUMI T, OHGA T, *et al.* Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*, 1997, 417(3): 390–394
- LANGE S S, VASQUEZ K M. HMGB1: The jack of all trades protein is a master DNA repair mechanic. *Molecular Carcinogenesis*: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 2009, 48(7): 571–580
- LI G, WANG L, WANG Y, *et al.* Developmental characterization and environmental stress responses of Y-box binding protein 1 gene (*AccYB-1*) from *Apis cerana cerana*. *Gene*, 2018, 674: 37–48
- LOW W K, MIAO M, EWART K V, *et al.* Skin-type antifreeze protein from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*. Expression and characterization of am r9, 700 recombinant

- protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36): 23098–23103
- MARTÍNEZ-PÁRAMO S, BARBOSA V, PÉREZ-CEREZALES S, *et al.* Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, 2009, 58(2): 128–133
- MENG Q G, CHEN J, HUANG Y Q, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the cold shock protein Y-box coding gene of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Freshwater Fisheries*, 2012(6): 16–22 [孟庆国, 陈静, 黄艳青, 等. 红螯螯虾冷休克蛋白 Y-box 编码基因的克隆及表达分析. *淡水渔业*, 2012(6): 16–22]
- MIAO L, LI M Y, CHEN Y Y, *et al.* Cloning of cold inducible RNA-binding protein(CIRP) gene in *Larimichthys crocea* and its expression analysis under cold treatments. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 481–489 [苗亮, 李明月, 陈莹莹, 等. 大黄鱼冷诱导结合蛋白(CIRP)基因 cDNA 克隆及低温胁迫对其时空表达的影响. *水产学报*, 2017, 41(4): 481–489]
- NISHIYAMA H, ITOH K, KANEKO Y, *et al.* A glycine-rich rna-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *Journal of Cell Biology*, 1997, 137(4): 899–908
- NISHIYAMA H, XUE J H, SATO T, *et al.* Diurnal change of the cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) expression in mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 245(2): 534–538
- PARK J S, ARCAROLI J, YUM H K, *et al.* Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2003, 284(4): C870–C879
- RAUEN T, FRYE B C, WANG J, *et al.* Cold shock protein YB-1 is involved in hypoxia-dependent gene transcription. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 478(2): 982–987
- RAYMOND J A, DEVRIES A L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(6): 2589–2593
- SHEN L X, CHEN L G. Research progress of cold resistance genetic engineering of plant. *Journal of Biology*, 1998, 15(6): 2–4 [沈立晓, 陈力耕. 植物抗寒基因工程的研究进展. *生物学杂志*, 1998, 15(6): 2–4]
- STROS M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1799(1/2): 101–113
- SWAMYNATHAN S K, NAMBIAR A, GUNTAKA R V. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB Journal*, 1998, 12(7): 515–522
- TANG D, KANG R, ZEH H J, *et al.* High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2010, 14(7): 1315–1335
- TIAN Y, ZHANG B L, CHANG Y Q, *et al.* Molecular characteristics and expression analysis of Y-box gene from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 376–389 [田隸, 张丙龙, 常亚青, 等. 中间球海胆 Y-box 基因分子特性和表达分析. *水产学报*, 2013, 37(3): 376–389]
- VORNANEN M, HASSINEN M, KOSKINEN H, *et al.* Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 289(4): R1177–R1184
- WANG S Y, LI X K, ZHOU Y F, *et al.* Research progress in antifreeze mechanism and genetic engineering of antifreeze protein. *Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science)*, 2012, 30(2): 58–63 [汪少芸, 李晓坤, 周焱富, 等. 抗冻蛋白的作用机制及基因工程研究进展. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(2): 58–63]
- WEN B, JIN S R, CHEN Z Z, *et al.* Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. *Aquaculture*, 2017, 481: 169–176
- XIE J, HODGKINSON J W, LI C, *et al.* Identification and functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) high mobility group box 1 (HMGB1) chromatin-binding protein. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 245–253
- XU D, YOU Q, CHI C, *et al.* Transcriptional response to low temperature in the yellow drum (*Nibea albiflora*) and identification of genes related to cold stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2018, 28: 80–89
- XU K, CHEN D H, WANG Z, *et al.* Sequencing analysis and expression characteristics of AFP gene in *Bombus terrestris*. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science)*, 2019, 39(5): 74–81 [徐凯, 陈东海, 王志, 等. 熊蜂抗冻蛋白基因序列分析及表达特性研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5): 74–81]
- YANG C, PENG L, SU J. Two HMGB1 genes from grass carp *Ctenopharyngodon idella* mediate immune responses to viral/bacterial PAMPs and GCRV challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 133–146
- ZHANG J F, TAO X F, HAN B S. Function, evolution, and application of antifreeze proteins in Antarctic fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 355–361 [张俊芳, 陶筱帆, 韩兵社. 南极鱼抗冻蛋白功能和进化及其应用研究进展. *中国水产科学*, 2020, 27(3): 355–361]
- ZHAO X, KUJA-PANULA J, ROUHIAINEN A, *et al.* High mobility group box-1 (HMGB1; amphoterin) is required for zebrafish brain development. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(26): 23200–23213
- ZHONG Q W, FAN Q J. Advances in fish antifreeze protein research. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(2): 124–130 [钟其旺, 樊廷俊. 鱼类抗冻蛋白的研究进展. *生物化学与生物物理学报(英文版)*, 2002, 34(2): 124–130]

Response of AFP, CIRP, HMGB1 and YB-1 Gene of *Takifugu rubripes* to Low-Temperature Stress

LIU Zhifeng^{1,2}, MA Aijun^{1,2①}, SUN Jianhua¹, ZHU Liguang^{1,2}, BAO Yulong³, ZHANG Tao³, YU Lanliang⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Dalian Tianzheng Aquaculture Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116600, China; 4. Weihai Yinze Biological Co., Ltd, Yantai, Shandong 264404, China)

Abstract Environmental conditions regulate the growth and reproduction of fish. The increase in sea temperature during winter may have adverse effects on *Takifugu rubripes*. To study the mechanism of low-temperature tolerance of *T. rubripes*, the expression of antifreeze protein (AFP) gene, cold-induced RNA binding protein (CIRP) gene, high mobility group protein box-1 (HMGB1) gene, and Y-box binding protein (YB-1) gene in the liver, spleen, kidney, brain, heart, intestine, muscle, gonad, and skin tissues of *T. rubripes* obtained from different temperatures [0](18°C, 13°C, 8°C, and 5°C) was analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the AFP gene was widely expressed in tissues, with the highest expression in the muscle ($P<0.05$). With the decrease in temperature, the expression of the AFP gene in each tissue showed a significant increasing trend, reaching the highest value in the 5°C group. The expression of the CIRP gene was the highest in the muscle ($P<0.05$). With a decrease in temperature, the trend of CIRP gene expression in various tissues was different. The CIRP gene expression levels of liver, kidney, brain, heart, intestine, and skin showed a trend of initial increase, followed by a decrease, and then an increase. The expression levels in the spleen, muscle, and gonads showed an upward trend, reaching the highest value in the 5°C group. The expression of the HMGB1 gene was the highest in muscle ($P<0.05$), followed by that in the brain, liver, heart and skin. As the temperature decreased, the expression of the HMGB1 gene in all tissues except the liver increased first and then decreased, and reached the maximum value in the 8°C group, which was significantly higher than that of the other groups ($P<0.05$). The expression of the YB-1 gene was the highest in the muscle ($P<0.05$), with the lowest expression level in other tissues. As the temperature decreased, the expression level of most tissues (brain, heart, intestine, kidney, liver, muscle, and spleen) increased first, then decreased, and then increased, reaching the minimum value in the 8°C group ($P<0.05$). These results show that the expression levels of the four genes are different at different temperature, reflecting the functional specificity of these four genes. Under low-temperature stress, these genes responded positively. Their expression changed to varying degrees, suggesting that the four genes may have potentially important roles in the adaptation of *T. rubripes* to low temperatures. In addition, by analyzing the law of gene expression, 8°C may be the key regulatory point for *T. rubripes* to deal with low-temperature stress. Too low temperature may cause its regulation disorder. The results of this study can provide a relevant basis for studying the regulation mechanism of the low-temperature response of *T. rubripes*.

Key words *Takifugu rubripes*; Low-temperature stress; AFP; CIRP; HMGB1; YB-1; Quantitative real-time PCR

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210813001

http://www.yykxjz.cn/

谢婷, 高云涛, 李明月, 高云红, 贾玉东, 闫冬春. 3种抗凝剂对大菱鲂血液抗凝效果、血细胞形态和血液生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 68-76

XIE T, GAO Y T, LI M Y, GAO Y H, JIA Y D, YAN D C. Effects of three different anticoagulants on blood cell morphology, anticoagulation, and hematological parameters in turbot (*Scophthalmus maximus*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 68-76

3种抗凝剂对大菱鲂血液抗凝效果、 血细胞形态和血液生理生化指标的影响*



谢婷^{1,2} 高云涛^{2,3} 李明月² 高云红² 贾玉东^{2①} 闫冬春^{1①}

(1. 鲁东大学农学院 山东 烟台 264025; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 鱼类血液极易凝结,经抗凝剂处理后的血液可充分满足各项生理指标检测,为衡量鱼体各项生理机能提供重要参考,同时,鱼类种属多样,在抗凝剂的选择和使用上存在一定差异。基于此,本研究以欧亚养殖良种大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为研究对象,选用乙二胺四乙酸二钾、肝素钠和柠檬酸钠3种抗凝剂,通过对大菱鲂正常状态和急性低氧胁迫条件下[溶解氧浓度为(1.2±0.3) mg/L]抗凝效果评价、血细胞形态观察和血液生理生化指标分析,筛选急性低氧胁迫条件下最佳血液抗凝剂。结果显示,正常溶解氧状态下,乙二胺四乙酸二钾抗凝效果显著,急性低氧胁迫下静置6 h和12 h后,抗凝效果显著抗凝剂分别为乙二胺四乙酸二钾和肝素钠。正常溶解氧状态肝素钠抗凝剂下血细胞出现双核现象,柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾抗凝剂下分别出现嗜酸性、嗜碱性粒细胞和嗜碱性粒细胞,急性低氧胁迫导致乙二胺四乙酸二钾、肝素钠、柠檬酸钠抗凝剂均观察到双核血细胞,其中,肝素钠和柠檬酸钠抗凝剂还分别出现微核和无核血细胞。急性低氧胁迫处理后,3种抗凝剂作用下血液白细胞数目均显著增高($P<0.05$),乙二胺四乙酸二钾和肝素钠抗凝剂作用下,红细胞数目和血红蛋白含量显著升高($P<0.05$),而柠檬酸钠抗凝剂作用下,红细胞数目和血红蛋白含量显著降低($P<0.05$)。3种抗凝剂作用下血浆葡萄糖和皮质醇浓度显著增高($P<0.05$),但肝素钠抗凝剂作用下,葡萄糖和皮质醇浓度显著低于柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾($P<0.05$)。综上所述,乙二胺四乙酸二钾可作为急性低氧胁迫条件下大菱鲂血液学分析的首选抗凝剂。

关键词 大菱鲂; 抗凝剂; 抗凝效果; 血细胞形态; 血液生理生化

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0068-09

血液是鱼类血液学研究及诊断的重要材料,由于鱼体血液中血小板含量高,极易凝结,因此,抗凝剂在研究过程中起到不可或缺的作用(Gholipourkanani *et al*, 2018)。鱼类血液会因不同抗凝剂的处理对抗凝效果和后续血液指标检测产生不同

的影响,而正确使用抗凝剂会将影响降到最小(Weinert *et al*, 2015)。柠檬酸盐、乙二胺四乙酸盐、草酸盐和肝素等是目前鱼类血液学研究中通常采用的抗凝剂(Walencik *et al*, 2007)。鱼类种属多样,血液抗凝剂选择也不尽相同,研究表明,肝素是鲤鱼

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(20603022020008, 2020TD51)资助。谢婷, E-mail: xieting626626@163.com

① 通信作者: 贾玉东, 研究员, E-mail: jiayd@ysfri.ac.cn; 闫冬春, 教授, E-mail: yandchdongzh@hotmail.com

收稿日期: 2021-08-13, 收修稿日期: 2021-11-28

(*Cyprinus carpio*)、褐鳟(*Salmo trutta*)的血液抗凝剂优选(Walencik *et al.*, 2007; Ciepliński *et al.*, 2019); 也有研究表明, 乙二胺四乙酸盐对褐鳟、白斑狗鱼(*Esox lucius*)和鲮鱼(*Mugil cephalus*)血液抗凝效果更佳(Blaxhall *et al.*, 1973; Mulcahy, 2010; Faggio *et al.*, 2014)。张峰等(2006)研究发现, 不同浓度的肝素钠、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸钠和草酸钠 4 种抗凝剂中, 1.0~1.5 mg/mL 的乙二胺四乙酸二钠对刺参(*Stichopus japonicus*)体腔细胞的抗凝效果最好, 即使长时间作用, 仍能使细胞保持伸展状态。Ahmed 等(2014)和 Sheikh 等(2020)认为, 肝素钠和乙二胺四乙酸二钾 2 种抗凝剂中, 肝素钠对全唇裂腹鱼(*Schizothorax labiatus*)和雪鳟(*Schizopyge plagiostomus*)的血液生理指标、血细胞形态影响最小, 推荐其作为首选抗凝剂。因此, 抗凝剂对不同鱼类血液抗性效果存在显著种属间差异(Walencik *et al.*, 2007)。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、菱鲆科(Scophthalmidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 是冷水性深海底层鱼类, 原产于欧洲, 自 1992 年引进中国以来, 经过近 30 年发展, 养殖年产量稳定在 5 万 t 左右, 占世界养殖大菱鲆产量 80%以上, 同时, 形成较为完善的上下游产业链, 成为我国海水鱼类养殖的重要优良品种之一(雷霖霖等, 2012)。国内外在大菱鲆苗种繁育、养殖模式、饲料营养、疾病防控、产品质量安全与加工技术等方面进行了较为系统性的研究(Qiang *et al.*, 2004; 马爱军等, 2003; Pyanov, 2021)。目前, 陆基工厂化循环水养殖是大菱鲆主要养殖模式, 养殖水体温度和溶解氧是养殖过程中 2 个重要环境因子, 特别是在高密度养殖条件下, 保证养殖水体中充足的溶解氧是维持大菱鲆正常生理代谢的关键(吴志昊, 2011; 乔玮, 2014)。低氧环境对大菱鲆生理状态产生显著影响, 已有研究表明, 低氧环境可导致大菱鲆血液 RBC、Hb 和 Hct 显著上调, 而不同抗凝剂下血液抗凝效果也会产生显著不同(刘伟东, 2009; Jia *et al.*, 2021), 上述研究过程中都涉及到对大菱鲆相关生理生化指标检测, 特别是对血液样品采集和检测更是广泛应用, 但急性低氧胁迫下使用抗凝剂对大菱鲆血液产生的影响还未可知。刘伟东等(2009)使用乙二胺四乙酸作为抗凝剂, 研究了低温条件下大菱鲆保活过程中血液生理生化变化, 发现抽血过程中血液较正常状态黏稠, 流动性也不如正常状态好。纪利芹(2014)使用肝素钠作为血液抗凝剂, 研究了连续降温对大菱鲆血液生理生化指标的影响。目前涉及大菱鲆血液生理生化指标检测的研究中, 抗凝剂选择上存在显著不同。本研究通过选用柠檬酸钠、

肝素钠、乙二胺四乙酸二钾 3 种常用抗凝剂, 对正常溶解氧和急性低氧胁迫条件下, 上述抗凝剂的抗凝效果进行对比分析, 以期筛选出急性低氧胁迫条件下大菱鲆血液研究的最适抗凝剂, 为急性低氧环境中大菱鲆血液学研究及健康养殖提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验鱼由山东省烟台市经济开发区天源水产有限公司提供, 共 54 尾, 体质健康活泼, 外观无损伤, 平均体质量为(200.21±23.17) g, 平均体长为(14.25±3.75) cm, 实验前将全部实验鱼在循环水养殖系统中暂养 2 周, 保持水温范围为(18.0±0.5)℃, 水中溶解氧浓度为(8.5±0.5) mg/L, pH 为 7.6±0.4, NH₃-N<0.1 mg/L, 每日饱食投喂商品饲料(海童, 潍坊三通生物工程有限公司) 2 次, 实验前 24 h 禁食。实验中所用 3 种一次性负压静脉采血管购于山东鸿海医疗器械有限公司, 抗凝管内添加剂浓度分别为肝素钠 12~30 IU, 柠檬酸钠 105~109 mmol/L, 乙二胺四乙酸二钾 15~22 mg/mL。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计和样品采集 实验分为对照组和处理组(急性低氧胁迫), 每组设置 3 个平行, 每个平行选用 9 尾大菱鲆。对照组将所需实验鱼(循环水中暂养)放入含有 200 mg/L MS-222 的海水溶液中, 至深度麻醉后迅速捞起, 将含有 3 种抗凝剂(肝素钠、柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾)的一次性负压静脉采血管连接一次性静脉采血针从大菱鲆尾静脉处抽取 5 mL 静脉血后, 将采血管静置。处理组则将实验鱼放入预先充入氮气实验桶中溶解氧含量为(1.2±0.3) mg/L, 实验期间使用溶氧仪(AZ8603 型台湾衡欣)实时监测水体溶解氧变化, 维持 2 h 后进行麻醉采血, 采血方法同对照组。

1.2.2 凝血观察与血涂片制作 自血液注入采血管内开始计时, 将采血管静置 6 h 和 12 h 后, 观察采血管内血液凝结程度, 记录管内血液凝结核比例。血涂片的制作采用姬姆萨染色法, 姬姆萨原液购于北京索莱宝科技有限公司(G1015), 使用方法参照说明书。血涂片制作时, 先将载玻片清洗干净, 用移液枪取 5 μL 血液滴在载玻片一侧, 将盖玻片一端接触血液, 匀速推出, 晾干后, 甲醇固定 10~15 min, 再放入充满染色液的染色缸中着色 15~30 min, 着色完毕取出载玻片用蒸馏水洗净后晾干, 显微镜下观察血细胞形态。

1.2.3 血液生理生化指标测定 将血液样本分为2份,置于1.5 mL离心管中,1份在4℃、3500 r/min条件下离心10 min,取上清液,保存于-80℃,用于检测血浆葡萄糖和皮质醇浓度,另1份于4℃冰箱保存,使用迈瑞全自动血液细胞分析仪(BC-2800 vet)检测血液红细胞数目($10^{12}/L$)、白细胞数目($10^9/L$)、血红蛋白含量(g/L)和红细胞积压(%)。血浆皮质醇含量采用放射性同位素免疫法(RIA),试剂盒(KIPI28000)购自北京北方生物技术研究所;血浆葡萄糖含量测定试剂盒(F006-1-1)购于南京建成生物工程研究所,操作步骤参见说明书。

1.3 数据处理

实验结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),使用Duncan多重比较分析3种抗凝剂在两种状态下的组间差异, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 3种抗凝剂对大菱鲆血液抗凝效果的影响

由图1可见,正常溶解氧状态下乙二胺四乙酸二钾抗凝效果显著,急性低氧胁迫下静置6 h和12 h后,抗凝效果显著,抗凝剂分别为乙二胺四乙酸二钾和肝素钠。

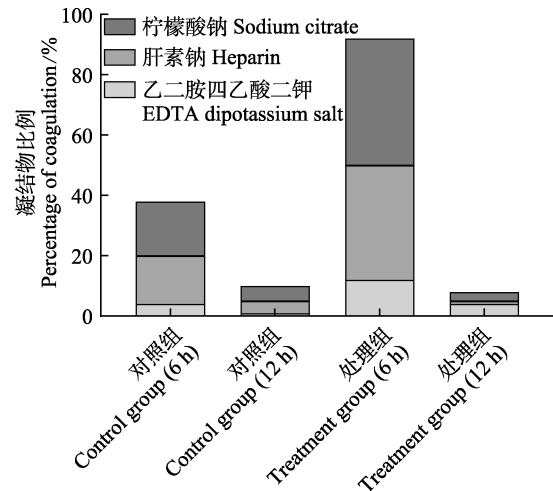


图1 不同作用时间下3种抗凝剂对大菱鲆血液抗凝效果的影响

Fig.1 Effects of three anticoagulants on turbot blood cells during different treatment time

2.2 3种抗凝剂处理下大菱鲆血细胞涂片的显微观察

图2中为对照组和处理组乙二胺四乙酸二钾、肝素钠、柠檬酸钠3种抗凝剂下细胞显微图。对照组在3种抗凝剂作用下,分别出现嗜碱性粒细胞(图2A),中性粒细胞和双核细胞(图2B),嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞(图2C)。处理组3种抗凝剂(图2D、E、F)作用下均出现双核细胞,处理组肝素钠(图2E)和柠檬酸钠(图2F)抗凝作用

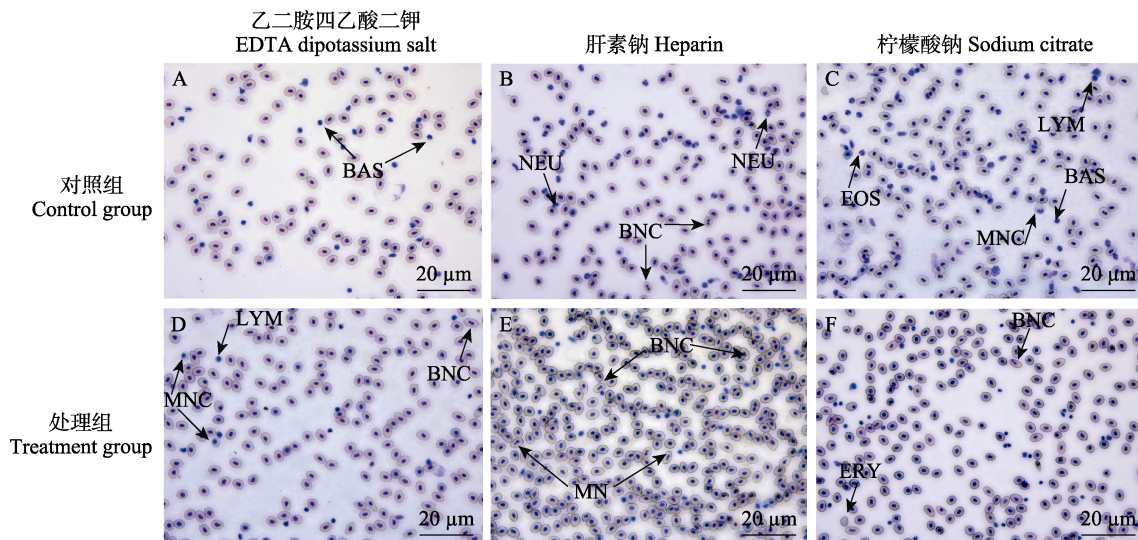


图2 不同抗凝剂下大菱鲆血细胞显微结构

Fig.2 Microstructure of blood cells of turbot under different anticoagulants

- A: 嗜碱性粒细胞(BAS); B: 中性粒细胞(NEU); C: 嗜酸性粒细胞(EOS), 淋巴细胞(LYM), 单核细胞(MNC), 嗜碱性粒细胞(BAS); D: 单核细胞(MNC), 淋巴细胞(LYM), 双核细胞(BNC); E: 双核细胞(BNC), 微核细胞(MN); F: 双核细胞(BNC), 无核细胞(ERY)。
A: Basophil (BAS); B: Neutrophils (NEU); C: Eosinophils (EOS), Lymphocytes (LYM), Monocytes (MNC), Basophil (BAS); D: Monocytes (MNC), Lymphocytes (LYM), Binucleate cells (BNC); E: Binucleate cells (BNC), Micronucleus cells (MN); F: Binucleate cells (BNC), Erythroplastid (ERY).

下还分别出现微核细胞和无核红细胞。

2.3 3 种抗凝剂对急性低氧胁迫下大菱鲂血液生理生化指标的影响

2.3.1 3 种抗凝剂对急性低氧胁迫下大菱鲂血液生理指标的影响 急性低氧胁迫处理后, 3 种抗凝剂作用下大菱鲂血液白细胞数目均显著增多(图 3A) ($P < 0.05$), 肝素钠和乙二胺四乙酸二钾抗凝作用下,

大菱鲂血液红细胞数目(图 3B)和血红蛋白含量显著增加(图 3D), 但柠檬酸钠抗凝作用下大菱鲂红细胞数目和血红蛋白含量显著降低($P < 0.05$)。处理组中 3 种抗凝剂作用下大菱鲂红细胞积压变化均不显著(图 3C) ($P > 0.05$)。

2.3.2 3 种抗凝剂对急性低氧胁迫下大菱鲂血液生化指标的影响 急性低氧胁迫处理后大菱鲂血浆葡萄糖浓度均显著增加(图 4A) ($P < 0.05$), 但肝素钠抗凝

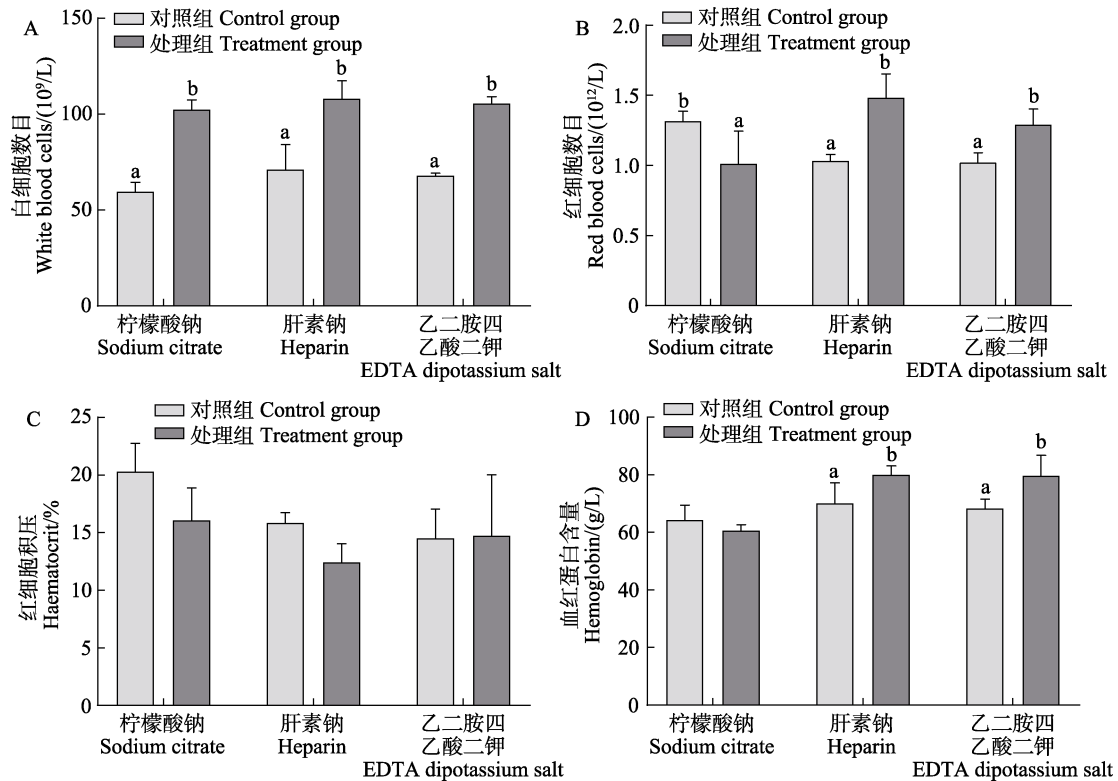


图 3 3 种抗凝剂对急性低氧胁迫下大菱鲂白细胞数目、红细胞数目、红细胞积压和血红蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of three anticoagulants on white blood cell numbers, red blood cell numbers, hematocrit and hemoglobin content under acute hypoxia stress in turbot

不同字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。下同。

Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$. The same as below.

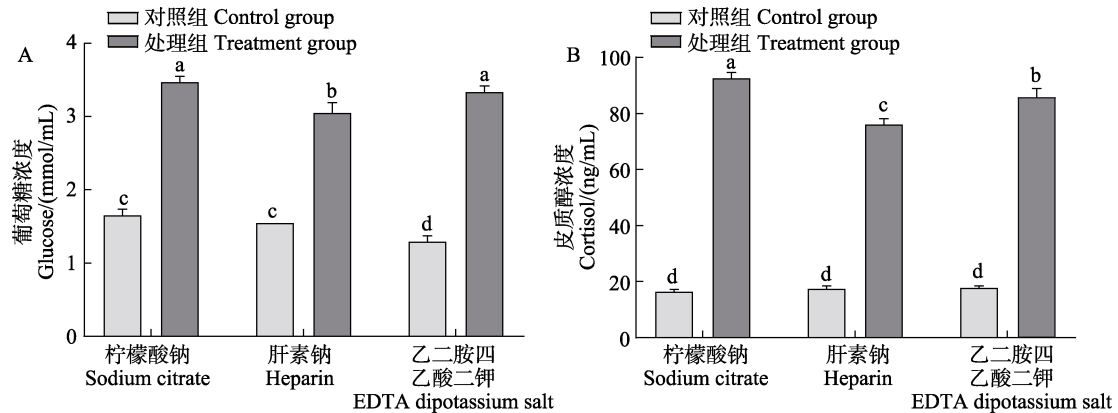


图 4 3 种抗凝剂对急性低氧胁迫下大菱鲂血浆葡萄糖和皮质醇浓度的影响

Fig.4 Effects of three anticoagulants on turbot plasma glucose and cortisol content under acute hypoxia stress

作用下,葡萄糖浓度显著低于柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾($P<0.05$)。同时,大菱鲆血浆皮质醇浓度也出现类似变化趋势,急性低氧胁迫处理后,其浓度均显著增加,肝素钠抗凝作用下,皮质醇浓度显著低于柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾(图 4B) ($P<0.05$)。

3 讨论

鱼类血液采集经抗凝剂作用后可分离出血浆,用于后续指标检测。其中,肝素钠主要是通过结合血浆中的抗凝蛋白阻止血液凝固,而柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾能抑制血小板聚集和螯合 Ca^{2+} 形成不易解离但可溶解的络合物,从而减少血液中 Ca^{2+} 浓度,阻止血液凝固(Faggio *et al*, 2014)。刘凯等(2017)研究发现,肝素钠、柠檬酸钠、草酸钾和乙二胺四乙酸二钾均可延长鲫鱼(*Carassius auratus*)外周血的凝固时间。本研究中,柠檬酸钠和肝素钠在短时间内抗凝效果不显著,可能是柠檬酸钠与大菱鲆血液中 Ca^{2+} 存在特异性结合,而肝素钠可能无法与大菱鲆血浆中的抗凝蛋白结合,从而不能减轻血液凝固现象,这种现象在鲮鱼、刺参中也有类似报道(张峰等, 2006; Faggio *et al*, 2014)。

目前,鱼类血细胞涂片制作是通过尾静脉采血后加入抗凝剂,抗凝剂可抑制血小板聚集,选用正确的抗凝剂对血细胞形态影响较小(曹文芝等, 2014)。周雪莹等(2007)研究表明,大菱鲆血细胞分为红细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和血栓细胞 5 种类型,未发现嗜酸性和嗜碱性粒细胞。本研究中,对照组柠檬酸钠抗凝作用下出现嗜酸性和嗜碱性粒细胞,乙二胺四乙酸二钾抗凝剂下未出现嗜酸性粒细胞,这与上述大菱鲆血细胞类型研究相悖。吴志昊等(2011)研究表明,高氧可导致大菱鲆出现核异常现象,极低氧则因大菱鲆在较短时间内死亡,无法观察到核异常情况出现。核异常现象包括核质外凸、核质内凹、双核等。此外,制药工厂及医院排放的污水、银和铜的氧化物毒性等不利因素也会导致尖齿胡鲶(*Clarias gariepinus*)出现核异常细胞(Alimba *et al*, 2017、2019; Ogunsuyi *et al*, 2019)。在本研究中,对照组肝素钠抗凝作用下血涂片中出现双核细胞,可能是肝素钠作为一种不利因子参与大菱鲆血液抗凝。急性低氧胁迫处理后,乙二胺四乙酸二钾、肝素钠和柠檬酸钠抗凝剂下均观察到双核血细胞,其中,肝素钠和柠檬酸钠抗凝剂下还分别出现微核和无核血细胞。

血液白细胞是鱼类机体细胞免疫和体液免疫的主要组成部分,主要功能是保护机体免受内外因素的

侵害(常志成等, 2018); 红细胞是鱼类血液中最多的细胞,同哺乳动物类似,主要功能就是运输 O_2 和 CO_2 (高泽霞等, 2008); 血红蛋白的主要功能是储存和运输 O_2 (王跃群等, 1998)。影响全血黏度的因子为红细胞压积和血红蛋白(Bao *et al*, 2018)。因此,上述血液指标可以反映鱼类在不同状况下的生理状态,也经常作为评价鱼类生理状态的重要血液学参数(Ahmed *et al*, 2019)。所以,本研究将正常和低氧胁迫条件下抗凝剂对大菱鲆血液指标的影响进行对比分析发现,低氧胁迫条件下白细胞数目均显著增高($P<0.05$),在吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)幼鱼中均有发现(陈德举等, 2019; 常志成等, 2018)。低氧胁迫条件下,肝素钠、乙二胺四乙酸二钾抗凝剂作用下大菱鲆红细胞数目显著增多($P<0.05$),在暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)、鲫鱼幼鱼、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中均有研究(李欣茹, 2018; 王晓雯等, 2016; 张曦等, 2011)。张国松(2017)研究表明,在低氧条件下,鱼类会通过增加红细胞数目从而增加血红蛋白含量来提高携氧能力,使机体应对低氧环境下的应激反应。但在本研究中,柠檬酸钠抗凝作用下红细胞数目和血红蛋白含量显著降低($P<0.05$),这可能是由于柠檬酸钠会导致红细胞出现溶血,从而造成红细胞减少(李双安等, 2005)。研究表明,乙二胺四乙酸二钾和肝素对褐鳟、横口裂腹鱼(*Schizopyge plagiostomus*)、全唇裂腹鱼(*Schizothorax labiatus*)血红蛋白含量无影响(Ciepliński *et al*, 2019; Sheikh *et al*, 2020; Ahmed *et al*, 2014),与对照组结果相似。上述报道中,乙二胺四乙酸二钾与肝素钠相比,横口裂腹鱼、全唇裂腹鱼血液红细胞数目较低,但在本研究中,二者红细胞数目无显著差异。研究发现,乙二胺四乙酸和肝素会使横口裂腹鱼、波斯鲟(*Persian sturgeon*)血液红细胞积压较高(Sheikh *et al*, 2020; Gholipourkanani *et al*, 2018)。本研究表明,柠檬酸钠与乙二胺四乙酸二钾相比红细胞积压显著升高($P<0.05$),这可能与柠檬酸钠会导致红细胞肿胀有关(Faggio *et al*, 2014),上述报道与本研究结果不一致。

鱼类血液中的葡萄糖主要为机体提供能量,以确保各组织器官的正常运行。葡萄糖浓度会因环境因素应激而发生改变,军曹鱼(*Rachycentron canadum*)经急性低氧胁迫后,血浆葡萄糖浓度明显升高(黄建盛等, 2019)。在本研究中,急性低氧胁迫处理后,葡萄糖浓度显著增高($P<0.05$),肝素钠与其他 2 种抗凝剂相比,葡萄糖浓度显著降低($P<0.05$)。研究表明,血液

离体后, 常温下血液中的葡萄糖会被分解代谢, 从而导致葡萄糖含量降低(代胜奇, 2012)。鱼类的应激反应类似于高等脊椎动物, 快速释放儿茶酚胺, 随后释放皮质醇(Clauss *et al*, 2008)。皮质醇为一种稳定的应激激素, 在低氧条件下, 刺参的皮质醇浓度显著增加(周晓梦等, 2018)。Vijayan 等(1997)研究表明, 皮质醇浓度会随葡萄糖浓度的增加而增加。本研究中, 急性低氧胁迫处理后, 肝素钠抗凝剂作用下皮质醇含量与其他 2 种抗凝剂相比显著降低($P < 0.05$), 同上述结果描述一致。

综上, 本研究发现, 体质量为(200.21±23.17) g 的大菱鲃在乙二胺四乙酸二钾、肝素钠和柠檬酸钠 3 种抗凝剂作用下, 正常溶解氧状态下乙二胺四乙酸二钾抗凝效果显著, 急性低氧胁迫下静置 6 h 和 12 h 后, 抗凝效果显著的抗凝剂分别为乙二胺四乙酸二钾和肝素钠。肝素钠抗凝剂下出现双核血细胞, 柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾抗凝剂下分别出现嗜酸性、嗜碱性粒细胞和嗜碱性粒细胞。急性低氧胁迫处理后, 肝素钠、柠檬酸钠抗凝剂下出现微核和无核血细胞, 同时, 肝素钠抗凝作用下葡萄糖和皮质醇浓度显著低于柠檬酸钠和乙二胺四乙酸二钾。此外, 柠檬酸钠在急性低氧条件下红细胞数目和血红蛋白含量显著降低。综上, 乙二胺四乙酸二钾可作为急性低氧胁迫条件下大菱鲃血液学分析的首选抗凝剂。

参 考 文 献

- AHMED I, MAQBOOL A. Effects of sodium-heparin and dipotassium EDTA on the haematological parameters and blood cell morphology of freshwater fish *Schizothorax labiatus* (McClelland, 1842). *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 2014, 14(3): 121–126
- AHMED I, SHEIKH Z A. Hematological and serum biochemical parameters of five freshwater snow trout fish species from river Jhelum of Kashmir Himalaya, India. *Comparative Clinical Pathology*, 2019, 28(3): 771–782
- ALIMBA C G, ADEKOYA K O, SOYINKA O O. Exposure to effluent from pharmaceutical industry induced cytogenotoxicity, hematological and histopathological alterations in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *EXCLI Journal*, 2019, 18: 63–78
- ALIMBA C G, AJIBOYE R D, FAGBENRO O S. Dietary ascorbic acid reduced micronucleus and nuclear abnormalities in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) exposed to hospital effluent. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(5): 1325–1335
- BAO J W, QIANG J, TAO Y F, *et al*. Responses of blood biochemistry, fatty acid composition and expression of microRNAs to heat stress in genetically improved farmed tilapia. *Journal of Thermal Biology*, 2018, 73: 91–97
- BLAXHALL P C, DAISLEY K W. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 1973, 5(6): 771–781
- CAO W Z, LIU Y, LIANG B, *et al*. Development of haemocytes in peripheral blood and hematopoietic organs of zebra fish, *Danio rerio*. *Fisheries Science*, 2014, 33(7): 403–409 [曹文芝, 刘云, 梁冰, 等. 斑马鱼外周血液及造血器官血细胞发生的观察. *水产科学*, 2014, 33(7): 403–409]
- CHANG Z C, WEN H S, ZHANG M Z, *et al*. Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(7): 20–28 [常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(7): 20–28]
- CHEN D J, QIANG J, TAO Y F, *et al*. Effects of different dissolved oxygen levels on the growth, blood biochemistry, fatty acid composition and against *Streptococcus iniae* infection of GIFT juvenile (*Oreochromis niloticus*). *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(4): 83–89 [陈德举, 强俊, 陶易凡, 等. 不同溶氧水平对吉富罗非鱼幼鱼生长、血液生化、脂肪酸组成及其抗海豚链球菌病的影响. *淡水渔业*, 2019, 49(4): 83–89]
- CIEPLIŃSKI M, KASPRZAK M, GRANDTKE M, *et al*. The effect of dipotassium EDTA and lithium heparin on hematologic values of farmed brown trout *Salmo trutta* (L.) spawners. *Aquaculture International*, 2019, 27(1): 79–87
- CLAUSS T M, DOVE A D, ARNOLD J E. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice*, 2008, 11(3): 445–462
- DAI S Q. Influence and evaluation of different anticoagulants on the assays for serum glucose. *Jilin Medical Journal*, 2012, 33(17): 3739–3740 [代胜奇. 不同抗凝剂对血清葡萄糖测定的影响及评价. *吉林医学*, 2012, 33(17): 3739–3740]
- FAGGIO C, ARFUSO F, PICCIONE G, *et al*. Effect of three different anticoagulants and storage time on haematological parameters of *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2014, 14: 615–621
- GAO Z X, WANG W M. Research progress of fish peripheral blood erythrocytes. *Journal of Hydroecology*, 2008, 28(2): 1–3 [高泽霞, 王卫民. 鱼类外周血红细胞研究进展. *水生生态学杂志*, 2008, 28(2): 1–3]
- GHOLIPOURKANANI H, RANJDOOST M, JAFARYAN H, *et al*. Comparative study of hematological and blood chemistry of Persian sturgeon (*Asipencer persicus*) exposed to two common anticoagulants. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2018, 68(2): 225–230
- HUANG J S, LU Z, CHEN G, *et al*. Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes of large-sized juvenile cobia

- (*Rachycentron canadum*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, 41(6): 76–84 [黄建盛, 陆枝, 陈刚, 等. 急性低氧胁迫对军曹鱼大规格幼鱼血液生化指标的影响. *海洋学报*, 2019, 41(6): 76–84]
- JI L Q. Effect of continuous cooling on serum physiological, biochemical index and molecular mechanism of adult *Scophthalmus maximus* L. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [纪利芹. 连续降温对大菱鲆血液生理生化指标的影响及分子机制. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- JIA Y D, WANG J W, GAO Y T, *et al.* Hypoxia tolerance, hematological, and biochemical response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 2021, 535(3): 736380
- LEI J L, LIU X F, GUAN C T. Turbot culture in China for two decades: Achievements and prospect. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 123–130 [雷霖霖, 刘新富, 关长涛. 中国大菱鲆养殖 20 年成就和展望—庆祝大菱鲆引进中国 20 周年. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 123–130]
- LI S A, LI Y R, GAO M, *et al.* Effects of different blood cells on plasma coagulation in carp *Cyprinus carpio*. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(S): 146–510 [李双安, 李玉荣, 高明, 等. 鲤鱼血细胞对血液凝固的影响. *动物学报*, 2005, 51(S): 146–510]
- LI X R. Effects of hypoxic stress on energy metabolism, blood indexes and gene expression of *Takifugu fasciatus*. Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2018 [李欣茹. 低氧胁迫对暗纹东方鲀能量代谢、血液指标及基因表达的影响. 南京师范大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LIU K, XIE N, MA H J, *et al.* Study on the anticoagulation effect of different anticoagulants on peripheral blood of crucian carp. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 115–116 [刘凯, 谢楠, 马恒甲, 等. 不同抗凝剂对鲫鱼外周血的抗凝效果研究. *安徽农业科学*, 2017, 45(8): 115–116]
- LIU W D, XUE C H, YIN B Z, *et al.* Physiological and biochemical change of *Scophthalmus maximus* kept alive at low temperature with or without water. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(5): 69–74 [刘伟东, 薛长湖, 殷邦忠, 等. 低温下大菱鲆有水和无水保活过程中生理生化变化的研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 69–74]
- LIU W D. Basic research on keep-alive of tubots (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [刘伟东. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)保活的基础研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- MA A J, LEI J L, CHEN S Q, *et al.* Proceedings on the study of nutrition requirement and feed for turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(4): 450–459 [马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 等. 大菱鲆营养需求与饲料研究进展. *海洋与湖沼*, 2003, 34(4): 450–459]
- MULCAHY M F. Blood values in the pike *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology*, 2010, 2(3): 203–209
- OGUNSUYI O I, FADOJU O M, AKANNI O O, *et al.* Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(26): 27470–27481
- PYANOV D. A review of the cultivation potential of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in the Baltic Sea region: A promising candidate species for marine aquaculture in Russia. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2021, 689(1): 012040
- QIANG M, LEI J L, WANG Y G. Biology and critical breeding techniques of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Sciences*, 2004, 28(3): 1–4
- QIAO W. Effect of stocking density on adult turbot is growth, physiology and water quality in recirculating aquaculture system. Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 [乔玮. 养殖密度对循环水养殖大菱鲆生长、生理特性及水质的影响研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- SHEIKH Z A, AHMED I. Comparative evaluation of two anticoagulants used for the analysis of haematological, biochemical parameters and blood cell morphology of himalayan snow trout, *Schizopyge plagiostomus*. *Tissue Cell*, 2020, 67: 101398
- VIJAYAN M M, PEREIRA C, GRAU E G, *et al.* Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, 1997, 116(1): 89–95
- WALENCIK J, WITESKA M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2007, 146(3): 331–335
- WANG X W, ZHU H, HU H X, *et al.* Effects of hypoxia on physiological status of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* juveniles. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 459–465 [王晓雯, 朱华, 胡红霞, 等. 低氧胁迫对西伯利亚鲟幼鱼生理状态的影响. *水产科学*, 2016, 35(5): 459–465]
- WANG Y Q, LIU S J, WANG G, *et al.* Comparative hematological studies in *Cyprinus carpio* Xiangyunnensis and *Cyprinus carpio* Xiangjiangensis. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 1998, 21(1): 71–75 [王跃群, 刘少军, 王刚, 等. 湘云鲤和湘江野鲤血液指标的比较. *湖南师范大学自然科学学报*, 1998, 21(1): 71–75]
- WEINERT N C, VOLPATO J, COSTA Á, *et al.* Hematology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) subjected to anesthesia and anticoagulation protocols. *Semina Ciências Agrárias*, 2015, 36(6): 4237–4250
- WU Z H, YOU F, WANG Y F, *et al.* The effect of hypoxia and hyperoxia on nucleus anomaly, SOD, CAT activities and MDA content in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*.

- Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(6): 808–813 [吴志昊, 尤锋, 王英芳, 等. 低氧和高氧对大菱鲆幼鱼红细胞核异常及氧化抗氧化平衡的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(6): 808–813]
- WU Z H. Physiology effect of Fe (II) and DO on juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2011 [吴志昊. Fe(II)、DO含量对养殖大菱鲆幼鱼生理学性状影响的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2011]
- ZHANG F, SONG Z D, LIU H W, *et al.* Effects of four anticoagulants on anticoagulation of coelomocytes in sea cucumber *Stichopus japonicus*. Journal of Dalian Fisheries University, 2006, 21(1): 87–89 [张峰, 宋志东, 刘洪伟, 等. 4种抗凝剂对刺参体腔细胞的抗凝效果. 大连海洋大学学报, 2006, 21(1): 87–89]
- ZHANG G S. Molecular mechanism of response to hypoxia stress in *Pelteobagrus vachelli*. Doctoral Dissertation of Nanjing Normal University, 2017 [张国松. 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)应对低氧胁迫的分子机制研究. 北京师范大学博士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG X, FU S J, PENG J L, *et al.* The effect of acute hypoxia on blood parameters of juvenile crucian carp. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2011, 28(4): 19–22 [张曦, 付世建, 彭姜岚, 等. 急性低氧对鲫鱼幼鱼血液基础指标的影响. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2011, 28(4): 19–22]
- ZHOU X M, ZHANG X M, LI W T. Effect of high temperature and hypoxia on median lethal time and physiological function in sea cucumber *Apostichopus japonicus* of two sizes. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 60–73 [周晓梦, 张秀梅, 李文涛. 高温和低氧胁迫对两种规格刺参半致死时间及生理机能的影响. 中国水产科学, 2018, 25(1): 60–73]
- ZHOU X Y, CUI L B, LIU D, *et al.* Studies on blood cell morphology and relevant physiological indices of *Scophthalmus maximus* L. Ludong University Journal (Natural Science), 2007, 23(4): 366–370 [周雪莹, 崔龙波, 刘冬, 等. 养殖大菱鲆血细胞形态和相关生理指标的测定. 鲁东大学学报(自然科学版), 2007, 23(4): 366–370]

(编辑 陈辉)

Effects of Three Different Anticoagulants on Blood Cell Morphology, Anticoagulation, and Hematological Parameters in Turbot (*Scophthalmus maximus*)

XIE Ting^{1,2}, GAO Yuntao^{2,3}, LI Mingyue², GAO Yunhong², JIA Yudong^{2①}, YAN Dongchun^{1①}

(1. School of Agriculture, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China;

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

Abstract Fish blood tends to coagulate due to its specialized characteristics. In general, the detection of blood physiological indices using anticoagulants reflects normal physiological status. However, the selection and application of anticoagulants have no uniform standards because of the specificity and diversity of fish species. In the present study, the effects of three different anticoagulants (sodium heparin, K₂EDTA, and sodium citrate) were investigated on coagulation, blood cell type, hematological parameters (white blood cells, red blood cells, hematocrit, and hemoglobin), and plasma cortisol and glucose contents in turbot during acute hypoxic stress. The choice of anticoagulants may result in significant differences in turbot blood physiology and chemistry. To supply technological support in turbot hematological research and best-practice aquaculture, this study compared the effects of three common anticoagulants between normal dissolved oxygen and acute hypoxic states. The recirculating aquaculture system is the main culture model for turbot; water temperature and dissolved oxygen levels are important environmental factors, especially in high-density industrial systems. Sufficient oxygen is key to maintaining normal metabolism in turbot. Experimental procedures were designed for control and treatment groups, each group had three parallels, and

① Corresponding author: JIA Yudong, E-mail: jiajd@ysfri.ac.cn; YAN Dongchun, E-mail: yandchdongzh@hotmail.com

54 turbot were studied in all. In the control group, 200 mg/L MS-222 was used to anesthetize a specimen before collecting 5 mL of blood from the caudal vein; the blood was transferred through a needle and vacuum tubes containing three different anticoagulants, then the vacuum tubes were stored for evaluation after 6 h and 12 h. In the treatment group, nitrogen gas was used to rapidly reduce the concentration of dissolved oxygen in the container to (1.2 ± 0.3) mg/L (measured with a dissolved oxygen meter), after which the same procedure of anesthesia and blood collection was conducted. For blood cell type and morphology studies, the Giemsa staining method was used to make blood smears. The original solution of Giemsa was diluted before use. The slide was sterilized before a drop of blood was placed on one side of the slide; one edge of a cover glass was placed in contact with the drop of blood and pushed to the opposite side of the slide at a constant velocity; the slide was then fixed with methanol for 10~15 min and stained for 15~30 min. The smears were washed and dried after staining. Finally, the stained smears were observed under a Leica microscope to determine blood cell morphology, and images were taken. Blood samples were divided into two parts for detecting physiological and biochemical indices: one was centrifuged at 3500 r/min for 10 min, and the supernatant was stored at -80°C for the detection of plasma glucose and cortisol content using commercial kits. The residual blood samples were stored in a refrigerator at 4°C for the detection of physiological indices using an automatic blood cell analyzer. The anticoagulant effect of K_2EDTA was most effective under a normal dissolved oxygen state, and the anticoagulant effect of K_2EDTA and heparin sodium were most effective after 6 h and 12 h of exposure to acute hypoxia stress, respectively. In addition to coagulation, blood cell morphology showed that binucleate cells occurred through sodium heparin, eosinophils, and basophils through sodium citrate and basophils through K_2EDTA in the control. Three nucleus abnormality types were identified in the smears: micronucleus cells, binucleate cells, and erythroplastids. Binucleate cells were found using sodium heparin in the control group. In addition, binucleate cells were observed under three different anticoagulants in the treatment group, and micronucleus cells and erythroplastids were observed in the treatment group. The hematological index showed that the number of white blood cells was significantly increased by treatment with three anticoagulants during acute hypoxic stress ($P<0.05$), and the number of red blood cells and hemoglobin content was significantly increased by treatment with K_2EDTA and sodium heparin ($P<0.05$). However, they were significantly reduced after treatment with sodium citrate. In addition, the plasma glucose and cortisol content were significantly increased when subjected to acute hypoxic stress, but the content of sodium heparin was significantly lower than that of both sodium citrate and K_2EDTA . In summary, K_2EDTA showed less blood coagulation than other anticoagulants, sodium heparin caused binucleate cells and decreased plasma glucose and cortisol, and sodium citrate affected the number of red blood cells and hemoglobin content. K_2EDTA is the more promising anticoagulant compared to sodium heparin and sodium citrate for blood analysis of turbot and promotes the precision of turbot hematological studies under acute hypoxic conditions.

Key words *Scophthalmus maximus*; Anticoagulants; Anticoagulant effect; Blood cell morphology; Blood physiology and biochemistry

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210908003

http://www.yykxjz.cn/

李琳, 张斐然, 刘长琳, 刘宝良, 李杰, 多吉欧珠, 热旦, 德吉措姆, 措姆, 卫育良, 梁萌青, 徐后国. 养殖和野生亚东鲑机体成分比较分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 77-86

LI L, ZHANG F R, LIU C L, LIU B L, LI J, DUOJI O Z, RE D, DEJI C M, CUO M, WEI Y L, LIANG M Q, XU H G. Composition analysis of farmed and wild Yadong trout (*Salmo trutta fario*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 77-86

养殖和野生亚东鲑机体成分比较分析*



李琳^{1,2} 张斐然^{1,2} 刘长琳² 刘宝良² 李杰² 多吉欧珠³
热旦³ 德吉措姆³ 措姆³ 卫育良² 梁萌青² 徐后国^{2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东青岛 266071; 3. 西藏自治区日喀则市亚东县农牧综合服务中心 西藏 日喀则 857600)

摘要 亚东鲑(*Salmo trutta fario*)是鲑属鱼类在青藏高原仅有的鱼类种群,是亚东地区全国农产品地理标志产品。本研究对西藏亚东地区野生和养殖亚东鲑的常规营养成分及各组织氨基酸和脂肪酸组成进行分析,旨在比较野生和养殖亚东鲑营养成分的异同,为养殖亚东鲑的品质评价和饲料配方的完善提供参考信息。实验采集亚东河中野生亚东鲑和亚东渔业产业园中使用配合饲料养殖的亚东鲑各 10 尾用于相关成分分析,每尾为一个独立样本。结果显示,野生组肥满度显著低于养殖组,而全鱼水分和灰分显著高于养殖组。全鱼粗蛋白、粗脂肪以及肝脏常规成分在野生组和养殖组间无显著差异。野生组肌肉粗脂肪显著低于养殖组,而水分含量显著高于养殖组。野生组全鱼必需氨基酸总量显著高于养殖组,且野生组肌肉中苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和甘氨酸含量显著高于养殖组。野生组全鱼、肌肉和肝脏中饱和脂肪酸、n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)总量、EPA、C20:4n-6 以及肌肉中 DHA 含量高于养殖组,而全鱼和组织中单不饱和脂肪酸和 n-6 PUFA 总量低于养殖组。综上所述,目前养殖亚东鲑和野生亚东鲑在机体成分上存在较大差异。由于养殖鱼类成分很大程度上反映了饲料组成,因此,亚东鲑养殖中饲料营养组成可能有待进一步优化。

关键词 亚东鲑; 野生; 养殖; 营养成分; 氨基酸; 脂肪酸

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0077-010

亚东鲑 (*Salmo trutta fario*) 属于鲑形目 (Salmoniformes)、鲑科 (Salmonidae)、鲑属 (*Salmon*), 原产于欧洲、西亚和非洲北部地区(当地名为“褐鳟”), 在我国自然水域中仅西藏自治区亚东县有分布。亚东鲑生存空间较为狭窄, 数量有限, 而其肉质鲜美、营养丰富, 具有较高的经济价值。在西藏各级政府和水产科研单位的技术支持下, 养殖亚东鲑产业正成为西藏亚东县培育的支柱产业之一。目前, 有关亚东鲑的研究主要集中在形态学(蒲德永等, 2006)、胚胎发育(豪富华等, 2006)、生物学和遗传学(豪富华等, 2006;

王芳, 2015)、分子生物学(郭秀明等, 2014; 李福贵等, 2014)、生长(豪富华等, 2007; 王常安等, 2017; 王万良等, 2019; 张弛等, 2019; 王且鲁等, 2020)和病害防治方法(王且鲁等, 2021)等方面。在上海海洋大学相关专家的技术援助下, 亚东鲑已实现全人工繁育, 并依托当地渔业产业园和养殖合作社实现了中小规模养殖, 目前正全力推进规模化养殖。亚东鲑养殖产业的发展对乡村振兴和守边固边具有重要意义。

目前, 亚东鲑的养殖全程使用配合饲料, 但对其营养需求参数却缺乏深入细致的研究。虽然世界其他

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022021003)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD48)共同资助。李琳, E-mail: 936839674@qq.com

① 通信作者: 徐后国, 研究员, E-mail: xuhg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-09-08, 收修改稿日期: 2021-10-09

区域“褐鳟”甚至其他鲑科鱼类的饲料营养学数据可以为亚东鲑配合饲料的开发提供依据,但亚东地区具有青藏高原独特的水文和养殖条件,相关参考资料是否能够适合本地区亚东鲑的养殖值得商榷。因此,为加快亚东鲑规模化养殖,其专用配合饲料的开发显得十分必要。

鱼类机体的营养组成大体上能够体现其饵料或饲料的营养组成。当某种鱼基础营养学数据缺乏时,其机体营养组成是非常重要的参考资料。关于野生与养殖亚东鲑机体成分、肌肉常规成分、各组织氨基酸和脂肪酸组成等信息,目前尚未见报道,无法给亚东鲑配合饲料的配制提供基础参考信息。本研究旨在分析对比野生和人工养殖亚东鲑的常规成分及各组织氨基酸和脂肪酸组成,了解二者的营养成分差异,以为亚东鲑人工配合饲料配方的改进提供基础资料和理论依据。同时,相关营养成分还能够为养殖亚东鲑肉质品质的评估和改进提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与样品处理

本实验野生亚东鲑样本于2021年4月采集于西藏亚东河,体长为13.4~28.7 cm,体重为38.48~346.85 g,共10尾,每尾鱼作为一个独立样本;养殖亚东鲑样本采集于西藏亚东县产业园亚东鲑繁育养殖基地,体长为16.4~24.5 cm,体重为78.39~275.29 g,共10尾,每尾鱼作为一个独立样本。养殖亚东鲑为以野生亲本人工繁育的子一代,养殖过程投喂人工配合饲料,饲料平均水分含量为7.84%,粗蛋白和粗脂肪含量分别为46.33%和19.43%(均为占饲料鲜重)。根据性腺发育情况确定了野生组3尾雌鱼、养殖组3尾雌鱼、4尾雄鱼,其他个体尚无法辨别雌雄。将上述鲜鱼在冷冻保存下由实验人员乘飞机带回中国水产科学研究院黄海水产研究所并及时送达实验室后取样,将样品放入-20℃低温冰箱中冷冻保存备测。

各组10尾鱼准确测量体长、称量体重,计算肥满度。每组各取7尾鱼(野生116.01~346.85 g、养殖119.17~275.29 g)解剖,称量肝脏、内脏重量,计算肝体比、脏体比。取肌肉(背鳍正下方10~15 g)、肝脏等组织放入冻干机干燥,各组剩余3尾鱼进行全鱼冻干,测定营养成分及氨基酸和脂肪酸组成。

1.2 测定方法

1.2.1 常规营养成分的测定 常规营养成分包括水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分。水分采用冷冻干燥法,

粗蛋白含量测定采用凯氏定氮法,粗脂肪含量测定采用氯仿-甲醇法,灰分含量测定采用马弗炉550℃高温灼烧法。

1.2.2 脂肪酸的测定 脂肪酸的测定采用气相色谱法。先把样品进行冷冻干燥处理,再将冻干后的样品先后用KOH-甲醇和HCl-甲醇酯化(75℃水浴),然后用正己烷萃取6 h,用气相色谱仪(GC-2010 Pro,岛津,日本)进行测定。气相色谱仪条件:石英毛细管柱(SH-RT-2560, 100.00 m×0.25 mm×0.20 μm)、火焰电离探测器。升温程序:以15℃/min的速率从150℃升高至200℃;然后以2℃/min速率从200℃升高至250℃。进样器和探测器的温度为250℃。结果以每种脂肪酸相对于总脂肪酸的百分比表示。

1.2.3 氨基酸的测定 氨基酸采用盐酸水解法。将称量后的样品先在6 mol/L的盐酸中110℃水解22~24 h,再利用氨基酸分析仪(Hitachi L-8900 automatic amino acid analyzer, Hitachi, 日本)测定。

1.3 统计方法

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用SPSS 16.0进行独立样本*t*检验(independent-samples *t* test)分析,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 形态学指标

由表1可知,野生与养殖亚东鲑的肝体比和脏体比差异不显著($P>0.05$),但养殖亚东鲑脏体比在数值上高于野生群体27.5%。野生组亚东鲑的肥满度显著低于养殖组($P<0.05$)。

表1 野生与养殖亚东鲑的形体指标
Tab.1 Somatic indices of wild and farmed Yadong trout

指标 Parameter	野生 Wild	养殖 Farmed
肝体比 Hepatosomatic index /%	1.18±0.15	1.06±0.08
脏体比 Viscerosomatic index /%	7.09±0.55	9.04±0.86
肥满度 Condition factor	1.65±0.05	1.92±0.03*

注: *为显著差异($P<0.05$)。下同。

Note: * Significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2 常规营养成分

由表2可知,野生组亚东鲑全鱼的水分和灰分含量显著高于养殖组($P<0.05$),全鱼粗蛋白和粗脂肪在野生组含量略低,但差异不显著($P>0.05$)。野生组亚东鲑肌肉水分显著高于养殖组($P<0.05$),而肌肉粗脂

肪显著低于养殖组($P < 0.05$), 野生组和养殖组肌肉粗蛋白和灰分含量差异不显著($P > 0.05$)。野生组和养殖组亚东鲑肝脏水分、粗蛋白和粗脂肪含量差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 野生与养殖亚东鲑全鱼、肌肉及肝脏常规营养成分含量(%鲜重)

Tab.2 Proximate nutritional components in whole body, muscle and liver of wild and farmed Yadong trout (% wet weight)

指标 Parameter	野生 Wild	养殖 Farmed
全鱼 Whole fish		
水分 Moisture	75.67±0.61	70.97±0.38*
粗蛋白 Crude protein	17.69±0.20	17.83±0.34
粗脂肪 Crude lipid	15.78±1.28	16.92±1.12
灰分 Ash	2.67±0.14	2.10±0.03*
肌肉 Muscle		
水分 Moisture	78.08±0.63	75.26±0.73*
粗蛋白 Crude protein	19.80±0.51	20.04±0.39
粗脂肪 Crude lipid	2.05±0.35	3.62±0.43*
灰分 Ash	1.25±0.02	1.24±0.02
肝脏 Liver		
水分 Moisture	77.14±1.56	74.74±1.64
粗蛋白 Crude protein	15.80±1.11	13.91±0.40
粗脂肪 Crude lipid	4.52±0.76	5.58±0.72

2.3 脂肪酸组成

由表 3 可知, 野生组亚东鲑全鱼的饱和脂肪酸(SFA)总量(包括 C16:0 和 C18:0 单体)和 n-3PUFA 总量显著高于养殖组($P < 0.05$), 而单不饱和脂肪酸(MUFA)总量(包括 C16:1n-7 和 C18:1n-9 单体)和 C18:2n-6 显著低于养殖组($P < 0.05$)。野生组全鱼 C20:5n-3(EPA)、C20:4n-6(ARA)显著高于养殖组($P < 0.05$), 但 C22:6n-3(DHA)差异不显著($P > 0.05$)。

野生组肌肉中 MUFA 总量(包括 C16:1n-7 和 C18:1n-9)和 C18:2n-6 显著低于养殖组($P < 0.05$), n-3PUFA 含量和 $\sum n-3/\sum n-6$ 比例显著高于养殖组($P < 0.05$), 而 SFA 含量差异不显著($P > 0.05$)。野生组肌肉中 EPA、DHA 和 ARA 都显著高于养殖组($P < 0.05$)。

野生组亚东鲑肝脏中 SFA 总量(包括 C16:0 和 C18:0 单体)、n-3PUFA 总量和 $\sum n-3/\sum n-6$ 比例均显著高于养殖组($P < 0.05$), MUFA 总量(包括 C16:1n-7、C18:1n-9 和 C20:1n-9 单体)和 n-6PUFA 总量(包括 C18:2n-6 和 C20:2n-6 单体)显著低于养殖组($P < 0.05$)。野生组亚东鲑肝脏中 EPA 和 ARA 显著高于养殖组($P < 0.05$), 但 DHA 差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 氨基酸组成

由表 4 可知, 共检测氨基酸 17 种, 其中, 必需氨基酸 9 种, 非必需氨基酸 8 种。野生组和养殖组亚东鲑的氨基酸含量存在一些差异。野生组亚东鲑必需氨基酸总量(ΣEAA)和非必需氨基酸总量($\Sigma NEAA$)显著高于养殖组($P < 0.05$), $\Sigma EAA/\Sigma NEAA$ 比例差异不显著($P > 0.05$)。在 17 种氨基酸中, 除精氨酸和甘氨酸差异不显著($P > 0.05$)外, 其他氨基酸含量均为野生组显著高于养殖组($P < 0.05$)。野生组肌肉中必需氨基酸总量、非必需氨基酸总量和 $\Sigma EAA/\Sigma NEAA$ 均与养殖组差异不显著($P > 0.05$), 但野生组肌肉中苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和甘氨酸显著高于养殖组($P < 0.05$)。野生组亚东鲑肝脏中必需氨基酸总量、非必需氨基酸总量、 $\Sigma EAA/\Sigma NEAA$ 和 17 种氨基酸均高于养殖组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 养殖和野生亚东鲑常规成分的比较

鱼类常规成分是其营养品质的重要指标, 也是配合饲料配方的重要参考。从亚东鲑全鱼、肌肉和肝脏常规成分来看, 其肌肉蛋白含量高(鲜重 20%左右), 具有较高的营养价值。整体上来看, 跟其他的鲑鳟鱼类一样, 亚东鲑全鱼具有较高的脂肪含量, 其全鱼脂肪含量高达 15%~17%, 但考虑到其肌肉脂肪含量在 4%以内且肝脏脂肪含量只有 6%以内, 由此可见, 其腹部脂肪组织较为发达。跟其他的鲑鳟鱼类一样, 亚东鲑的烹饪方式以食用生鱼片为主, 因此, 其肌肉脂肪含量对其口感影响甚大。肌肉脂肪含量的增加通常会降低肌肉硬度。亚东鲑肌肉脂肪含量在 4%以内, 低于大西洋鲑(*Salmo salar*) (满庆利等, 2014)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (朱龙等, 2018)、金鳟(张殿福等, 2020)等其他鲑鳟鱼类。在一些富脂型鲑鳟鱼类中, 肌肉脂肪含量可高达 15%~20% (张殿福等, 2020)。虽然低于其他鲑鳟鱼类, 但亚东鲑肌肉脂肪含量仍高于鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大口鲶(*Psettoodes erumei*) 和草鱼(*Ctenopharyngodon idellu*)等鱼类(程汉良等, 2013; Ren *et al*, 2018; Khieokhajokhet *et al*, 2019)。尤其远远高于大西洋鳕(*Gadus morhua*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)及大菱鲆等一些瘦肌型鱼类, 这些瘦肌型鱼类的肌肉脂肪含量通常仅有 1%左右(Xu *et al*, 2021)。

表3 野生与养殖亚东鲑全鱼、肌肉和肝脏脂肪酸组成(%总脂肪酸)

Tab.3 Fatty acid composition in whole fish, muscle and liver of wild and farmed Yadong trout (% total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acid	全鱼 Whole fish		肌肉 Muscle		肝脏 Liver	
	野生 Wild	养殖 Farmed	野生 Wild	养殖 Farmed	野生 Wild	养殖 Farmed
C14:0	2.21±0.24	1.33±0.05*	1.18±0.30	1.10±0.07	1.03±0.09	1.09±0.08
C16:0	17.67±0.71	10.54±0.18*	15.16±2.65	12.23±0.69	15.01±0.56	13.18±0.95
C18:0	5.61±0.19	2.28±0.04*	5.16±0.78	3.73±0.76	7.36±0.15	4.79±0.49*
C20:0	0.25±0.05	0.26±0.00	0.14±0.06	0.28±0.01*	0.25±0.03	0.30±0.03
∑SFA	25.75±0.95	14.41±0.23*	21.65±3.70	17.35±1.35	23.66±0.53	19.35±1.32*
C16:1n-7	7.98±0.96	1.48±0.05*	3.62±1.05	1.36±0.09*	3.01±0.36	1.27±0.17*
C18:1n-9	14.01±1.33	45.61±0.28*	12.15±2.28	39.89±1.40*	11.48±1.51	28.29±2.50*
C20:1n-9	4.75±0.44	2.51±0.03*	3.04±0.78	3.55±0.22	1.36±0.12	3.53±0.43*
C22:1n-9	0.29±0.03	1.29±0.12*	0.09±0.06	0.28±0.02	0.26±0.03	0.32±0.03
C24:1n-9	0.29±0.19	0.38±0.02	3.69±0.63	0.50±0.03*	1.98±0.36	1.12±0.22
∑MUFA	27.32±2.17	51.27±0.21*	22.6±3.55	45.58±1.65*	18.08±1.56	34.53±2.78*
C18:2n-6	4.98±0.49	14.47±0.21*	4.38±0.96	12.96±0.56*	2.71±0.28	7.40±0.62*
C20:2n-6	1.06±0.15	0.73±0.04	0.51±0.16	0.72±0.04	0.65±0.07	1.57±0.22*
C20:4n-6	0.83±0.03	0.26±0.00*	1.00±0.20	0.35±0.02*	3.32±0.25	1.84±0.21*
n-6∑PUFA	6.87±0.46	15.45±0.24*	5.89±1.04	14.03±0.58*	6.67±0.36	10.81±0.55*
C18:3n-3	0.26±0.26	3.74±0.10*			0.67±0.09	1.66±0.19*
C20:5n-3	7.79±0.46	1.01±0.03*	6.67±1.42	1.19±0.06*	8.60±0.41	2.54±0.16*
C22:5n-3	2.67±0.13	0.41±0.02*	3.69±0.63	0.50±0.03*	3.60±0.37	0.72±0.03*
C22:6n-3	6.21±0.25	5.69±0.04	17.24±2.83	10.58±1.20	16.79±0.92	17.67±1.70
n-3∑PUFA	16.94±0.66	10.85±0.08*	27.61±3.93	12.27±1.27*	29.67±1.11	22.59±1.77*
∑n-3/∑n-6	2.48±0.15	0.70±0.01*	6.13±2.13	0.90±0.13*	4.47±0.17	2.14±0.21*

注: SFA: 饱和脂肪酸; MUFA: 单不饱和脂肪酸; PUFA: 多不饱和脂肪酸。

Note: SFA: Saturated fatty acid; MUFA: Monounsaturated fatty acid; PUFA: Polyunsaturated fatty acid.

野生和养殖亚东鲑的机体成分差异主要集中在全鱼水分、全鱼灰分、肌肉水分和肌肉脂肪4个方面。在这些组分差异中,肌肉脂肪含量对品质影响较大,养殖组粗脂肪含量显著高于野生组。在马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*) (魏凯等, 2020)、半刺厚唇鱼(*Acrossocheilus hemispinus*) (林建斌等, 2017)和鳃鱼(*Elopichthys bambusa*) (戴阳军等, 2012)等鱼类中也有类似的结果,而在鳙鱼(*Aristichthys nobilis*) (王金娜等, 2013)中养殖和野生组粗脂肪差异不明显。导致野生组和养殖组粗脂肪差异的原因,一方面是由于养殖亚东鲑摄食配合饲料,饲料中脂肪含量较高,而野生亚东鲑在自然环境中以甲壳动物和水生昆虫为食,食物中脂肪含量相对较低;另一方面,养殖亚东鲑生存空间较小,食物充足,运动量较少,而野生亚东鲑生活在河川的山间河段,水流湍急,捕食和游泳运动消耗大量能量,所以脂肪含量相对较少。然而,从另一方面来看,在目前的市场需求中,肌肉脂肪含量的升高有助于提高鱼片的柔顺口感,因此,养殖亚东鲑肌肉脂肪的升高在一定程度上可以视为正面影

响。而且,在亚东鲑中仍存在通过饲料进一步提高肌肉脂肪含量的空间和潜力。

3.2 养殖和野生亚东鲑脂肪酸的比较

整体上,亚东鲑的脂肪酸组成同其他鱼类类似(Xu *et al.*, 2021)。SFA以C16:0为主(野生含量在17.67%左右),MUFA以C18:1n-9为主(野生含量在14.01%左右),n-6脂肪酸以C18:2n-6为主(野生含量在4.98%左右),n-3脂肪酸以C20:5n-3为主(野生含量在7.79%左右)。在表征肌肉脂肪酸营养品质的脂肪酸方面,肌肉DHA和EPA含量分别为17.24%和6.67%(占总脂肪酸比例),与其他鱼类相比,DHA相对含量高于乌鳢(*Channa argus*)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、草鱼,低于红鳍东方鲀、茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)和莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*)等;而EPA相对含量高于草鱼和大麻哈鱼,低于红鳍东方鲀、茎柔鱼、莱氏拟乌贼和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)等(程汉良等, 2013; 赵立等, 2015; 于久翔等, 2016; 王继隆等, 2019; 贡艺等, 2018; 王峥等, 2020; 周剑等, 2021)。

表 4 野生与养殖亚东鲑全鱼、肌肉和肝脏氨基酸组成(%干物质基础)

Tab.4 Amino acid composition in whole fish, muscle and liver of wild and farmed Yadong trout (% dry matter basis)

氨基酸 Amino acid	全鱼 whole fish		肌肉 Muscle		肝脏 Liver	
	野生 Wild	养殖 Farmed	野生 Wild	养殖 Farmed	野生 Wild	养殖 Farmed
必需氨基酸 EAA						
苏氨酸 Thr	2.90±0.08	2.46±0.05*	3.95±0.10	3.66±0.08*	3.17±0.07	2.17±0.09*
缬氨酸 Val	3.29±0.06	2.81±0.08*	4.69±0.10	4.35±0.09*	4.27±0.13	2.88±0.10*
蛋氨酸 Met	1.95±0.14	1.40±0.09*	2.55±0.12	2.39±0.10	1.99±0.10	1.22±0.04*
异亮氨酸 Ile	2.83±0.06	2.40±0.07*	4.05±0.11	3.79±0.07	3.32±0.13	2.23±0.08*
亮氨酸 Leu	4.72±0.11	4.12±0.11*	6.77±0.16	6.37±0.14	5.89±0.15	3.95±0.14*
苯丙氨酸 Phe	3.01±0.05	2.73±0.06*	4.27±0.08	4.01±0.07*	3.73±0.11	2.64±0.13*
赖氨酸 Lys	5.30±0.11	4.60±0.11*	7.87±0.17	7.25±0.14*	5.27±0.12	3.53±0.12*
组氨酸 His	1.66±0.01	1.38±0.06*	2.42±0.06	2.30±0.06	2.24±0.05	1.46±0.05*
精氨酸 Arg	3.90±0.07	3.40±0.19	4.98±0.15	4.86±0.14	4.63±0.22	3.04±0.10*
非必需氨基酸 NEAA						
牛磺酸 Tau	0.90±0.04	0.51±0.03*	0.55±0.05	0.45±0.05	1.38±0.09	1.13±0.04*
天冬氨酸 Asp	6.34±0.22	5.57±0.16*	8.63±0.23	8.14±0.19	6.09±0.14	4.28±0.18*
丝氨酸 Ser	2.71±0.10	2.26±0.03*	3.23±0.09	3.06±0.08	3.05±0.06	2.07±0.09*
谷氨酸 Glu	9.78±0.23	8.35±0.12*	13.56±0.36	12.56±0.30	8.15±0.16	6.18±0.23*
甘氨酸 Gly	4.83±0.34	4.21±0.31	4.13±0.08	3.78±0.11*	3.48±0.10	2.60±0.13*
丙氨酸 Ala	4.09±0.15	3.57±0.10*	5.02±0.12	4.76±0.10	4.33±0.10	2.90±0.10*
半胱氨酸 Cys	0.64±0.01	0.47±0.02*	0.79±0.04	0.76±0.05	0.89±0.04	0.59±0.04*
酪氨酸 Tyr	2.25±0.07	1.91±0.07*	3.27±0.10	3.16±0.07	2.95±0.09	1.91±0.06*
总必需氨基酸 Σ EAA	29.60±0.55	25.30±0.62*	41.60±0.95	39.00±0.69	34.50±0.82	23.10±0.75*
总非必需氨基酸 Σ NEAA	31.50±1.00	26.80±0.57*	39.2±1.01	36.7±0.88	30.3±0.69	21.70±0.82*
Σ EAA/ Σ NEAA	0.94±0.02	0.94±0.02	1.06±0.01	1.06±0.01	1.14±0.02	1.07±0.01*
总氨基酸 TAA	61.09±1.52	52.13±1.01*	80.73±1.94	75.64±1.56	60.8±4.20	44.77±1.54*

本研究发现,野生和养殖亚东鲑肌肉脂肪酸组成差异较大。整体上,与野生亚东鲑相比,养殖亚东鲑具有更低的 C16:0 等 SFA 和 DHA、EPA 等 n-3PUFA,更高的 C18:1n-9 等 MUFA 和 C18:2n-6。鱼体脂肪酸具有很高的可塑性,很大程度上体现了饲料的脂肪酸组成(Xu *et al.*, 2020)。在其他鱼种中进行的养殖和野生脂肪酸对比实验中发现,在白鲟(*Diplodus sargus*)肌肉中,与野生个体相比,养殖的白鲟具有更低的 ARA 等 n-6PUFA,更高的 C14:0 等 SFA 和 EPA 等 n-3PUFA (Cejas *et al.*, 2004); 在高体鲷(*Seriola dumerili*)肌肉中,与野生个体相比,养殖的高体鲷具有更低的 C16:0 等 SFA 和 ARA 等 n-6PUFA,更高的 C14:0 等 SFA 和 EPA 等 n-3PUFA (Rodríguez-Barreto *et al.*, 2012); 在章鱼(*Octopus vulgaris*)肌肉中,与野生个体相比,养殖的章鱼有更低的 C18:1n-9 等 MUFA 和 EPA 等 n-3PUFA,更高的 ARA 等 n-6PUFA (Estefanell *et al.*,

2015)。从本研究的野生和养殖差异对比来看,目前的亚东鲑配合饲料中具有更高的 C18:1n-9 和 C18:2n-6,而更低的 C16:0、EPA 和 DHA 等。推测这主要是因为配合饲料中使用了较多的豆油(以 C18:2n-6 为特征性脂肪酸)和菜籽油(以 C18:1n-9 为特征性脂肪酸)。SFA 和 MUFA 对 n-3PUFA 的节约效应在已有很多报道,尤其是在一些肉食性鱼类中效果较好(Bendiksen *et al.*, 2003; Salini *et al.*, 2015、2017; Rombenso *et al.*, 2018)。在如今豆油价格较高的情况下,拓宽脂肪源的供应渠道,如使用 SFA 和 MUFA 含量较高的动物脂肪或者棕榈油可能会同时满足降低饲料成本和提高动物生长性能的需求。

从肌肉脂肪酸品质来看,野生组 n-3PUFA 显著高于养殖组,而 SFA 和 MUFA 等影响要小一些。类似的结果在草鱼(程汉良等, 2013)、光唇鱼(*Acrossocheilus yunnanensis*) (李正友等, 2016)等鱼类

中也有报道。有许多研究表明,环境和饲料中的脂肪酸组成对鱼体中不饱和脂肪酸影响较明显,但对饱和脂肪酸影响较小。但无论如何,如果仅从 n-3PUFA 含量来看,养殖亚东鲑的脂肪酸品质是下降的,这也是所有养殖鱼类中普遍存在的问题。目前,常采用投喂高 n-3PUFA 含量的油类(如藻油和单细胞发酵的油类)或改变投喂策略(鱼油和替代油源交替投喂或者替代油源投喂后重新投喂鱼油)等方式来重新提高养殖鱼类肌肉中的 n-3PUFA 含量(Osmond *et al.*, 2019; Bi *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021)。

3.3 养殖和野生亚东鲑氨基酸的比较

野生亚东鲑和养殖亚东鲑肌肉中氨基酸总量(干物质)分别为 80.73%和 75.64%。与其他鱼类相比,肌肉氨基酸总量高于齐尔白鲑(*Coregonus nasus*) (张钰等, 2020)、梭鲈(*Sander lucioperca*) (孙志鹏等, 2020)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) (马爱军等, 2006)、菊黄东方鲀(*Takifug flavidu*) (周裕华等, 2021)和草鱼(程汉良等, 2013)等种类。肌肉中谷氨酸含量最高,其次是天冬氨酸,牛磺酸含量最低。众所周知,谷氨酸和天冬氨酸是呈味氨基酸,呈味氨基酸使肉质更鲜美,这可能也是亚东鲑鱼肉味道鲜美的原因之一。

鱼类的生长主要是靠体内蛋白质的积累,而蛋白质是由氨基酸组成。养殖亚东鲑与野生亚东鲑相比,其氨基酸总量和必需氨基酸总量均明显低于野生亚东鲑。对鱼类而言,组成蛋白质的必需氨基酸有 10 种:赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、组氨酸和精氨酸。本研究检测了除色氨酸外其他的 9 种必需氨基酸,这些必需氨基酸除精氨酸外,养殖组其他必需氨基酸均低于野生亚东鲑,在银鲟(*Pampus argenteus*)幼鱼(彭士明等, 2008)中也有类似的结果,推测原因可能饲料中氨基酸含量并没有达到所需的平衡状态。

4 结论

从机体成分来看,亚东鲑机体蛋白含量较高,肌肉脂肪含量在鲑鳟鱼类中处于偏低水平。与野生种群相比,养殖亚东鲑具有更高的肥满度、脏器比和肌肉脂肪含量,更低的全鱼水分和灰分。在脂肪酸组成方面,与野生群体相比,养殖亚东鲑具有更高的 C18:1n-9 和 C18:2n-6 含量,而具有更低的饱和脂肪酸和 n-3 长链多不饱和脂肪酸。养殖亚东鲑必需氨基酸含量普遍低于野生群体。成分分析研究表明,目前的亚东鲑配合饲料在营养组成上仍需进一步完善,尤

其是饱和脂肪酸和 n-3 长链多不饱和脂肪酸的供应及氨基酸平衡方面。

参 考 文 献

- BENDIKSEN E A, OBLING M J. Effects of temperature and feed composition on essential fatty acid (n-3 and n-6) retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 29(2): 133–140
- BI Q Z, LIAO Z B, WEI Y L, *et al.* Effects of alternate feeding between fish oil- and terrestrially sourced oil-based diets on fatty acid composition of different tissues of turbot. *Aquaculture Research*, 2021, 52: 3475–3482
- CEJAS J R, ALMANSA E, JÉREZ S, *et al.* Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 138(1): 91–102
- CHENG H L, JIANG F, PENG Y X, *et al.* Comparison of nutrient composition of muscles of wild and farmed grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Food Science*, 2013, 34(13): 266–270 [程汉良, 蒋飞, 彭永兴, 等. 野生与养殖草鱼肌肉营养成分比较分析. *食品科学*, 2013, 34(13): 266–270]
- DAI Y J, LIU Z Z, WANG X F, *et al.* Comparison of nutrient composition in muscles of wild and farmed yellowcheek carp. *Food Science*, 2012, 33(17): 258–262 [戴阳军, 刘峥兆, 王雪峰, 等. 野生与养殖鳊鱼肌肉的营养成分比较. *食品科学*, 2012, 33(17): 258–262]
- ESTEFANELL J, SOCORRO J, IZQUIERDO M, *et al.* Effect of two fresh diets and sexual maturation on the proximate and fatty acid profile of several tissues in *Octopus vulgaris*: Specific retention of arachidonic acid in the gonads. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(3): 274–285
- GONG Y, LI Y K, CHEN L, *et al.* A comparative analysis of fatty acid profiles in muscle of *Dosidicus gigas* from different harvest locations in the Eastern Pacific Ocean. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 147–154 [贡艺, 李云凯, 陈玲, 等. 东太平洋不同海区茎柔鱼肌肉脂肪酸组成分析与比较. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 147–154]
- GUO X M, LI F G, JIANG X Y, *et al.* Evolution analysis of Tc1-like transposon in *Salmo trutta fario*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 15–21 [郭秀明, 李福贵, 蒋霞云, 等. 亚东鲑基因组中 Tc1-like 转座子的序列歧化特征分析. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(1): 15–21]
- HAO F H, CHEN Y F, CAI B. Embryonic development of *Salmo trutta fario* from Yadong River, Tibet. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(3): 289–296 [豪富华, 陈毅峰, 蔡斌. 西藏亚东鲑的胚胎发育. *水产学报*, 2006, 30(3): 289–296]
- HAO F H, CHEN Y F, TANG W X, *et al.* Age and growth of

- Salmo trutta fario* L. from Yadong River, Tibet. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(5): 731–737 [豪富华, 陈毅峰, 唐卫星, 等. 亚东鲑的年龄与生长的研究. 水生生物学报, 2007, 31(5): 731–737]
- HAO F H. Studies on the biology and genetic diversity of *Salmo trutta fario* L., from Yadong River, Tibet. Doctor Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006 [豪富华. 亚东鲑的生物学和遗传多样性研究. 中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2006]
- KHIEOKHAJONKHET A, KLONGCHAI S, MAPHUM O, et al. Lipid distribution patterns of nine commercial fish in Thailand. Aquaculture Research, 2019, 50(4): 1348–1360
- LI F G, ZOU S M. Genetic diversity analysis of *Salmo trutta fario* based on CO I and CO II. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(23): 7710–7713 [李福贵, 邹曙明. 亚东鲑线粒体 CO I 与 CO II 基因遗传多样性分析. 安徽农业科学, 2014, 42(23): 7710–7713]
- LI Z Y, WANG Y Y, ZHAN H X, et al. Comparison of nutrient components in muscles of cultured and wild groups of *Acrossocheilus yunnanensis*. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(11): 104–107 [李正友, 王艳艳, 詹会祥, 等. 人工养殖与野生云南光唇鱼肌肉的营养成分测定及比较. 贵州农业科学, 2016, 44(11): 104–107]
- LIAO Z B, SUN Z Y, BI Q Z, et al. Application of the fish oil-finishing strategy in a lean marine teleost, tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Aquaculture, 2021, 534(1/2): 736306
- LIN J B, LIANG P, QIN Z Q, et al. Analysis of nutrition in the muscle of wild and cultured *Acrossocheilus hemispinus*. China Feed, 2017(22): 27–30 [林建斌, 梁萍, 秦志清, 等. 野生与养殖半刺厚唇鱼肌肉营养成分比较分析. 中国饲料, 2017(22): 27–30]
- MA A J, LIU X F, ZHAI Y X, et al. Biochemical composition in muscle of wild and cultivated tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther). Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 49–54 [马爱军, 刘新富, 翟毓秀, 等. 野生及人工养殖半滑舌鲷肌肉营养成分分析研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 49–54]
- MAN Q L, CAO Y F, YANG Z N, et al. Analysis on nutritional composition of muscle of *Salmo salar*. Hebei Fisheries, 2014(1): 12–14 [满庆利, 曹永芬, 杨质楠, 等. 大西洋鲑肌肉营养成分分析. 河北渔业, 2014(1): 12–14]
- OSMOND A T Y, COLOMBO S M. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. Journal of the World Aquaculture Society, 2019, 50(3): 490–509
- PENG S M, HUANG X X, ZHAO F, et al. Comparison on the contents of the somatic aminoacid both in wild and cultured young fish of silvery pomfret *Pampus argenteus*. Marine Fisheries, 2008(1): 26–30 [彭士明, 黄旭雄, 赵峰, 等. 野生与养殖银鲳幼鱼氨基酸含量的比较. 海洋渔业, 2008(1): 26–30]
- PU D Y, WANG Z J, ZHAO H P, et al. Morphological and histological observation of digestive system in *Salmo trutta fario* Linne. Sichuan Journal of Zoology, 2006, 25(4): 825–828 [蒲德永, 王志坚, 赵海鹏, 等. 亚东鲑消化系统的形态学和组织学观察. 四川动物, 2006, 25(4): 825–828]
- REN W, LI J Q, TIAN P, et al. Lipid deposition patterns among different sizes of three commercial fish species. Aquaculture Research, 2018, 49(2): 1046–1052
- RODRÍGUEZ-BARRETO D, JEREZ S, CEJAS J R, et al. Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*). Aquaculture, 2012, 360/361: 1–9
- ROMBENSO A N, TRUSHENSKI J T, DRAWBRIDGE M. Saturated lipids are more effective than others in juvenile California yellowtail feeds—Understanding and harnessing LC-PUFA sparing for fish oil replacement. Aquaculture, 2018, 493: 192–203
- SALINI M J, TURCHINI G M, GLENCROSS B D. Effect of dietary saturated and monounsaturated fatty acids in juvenile barramundi *Lates calcarifer*. Aquaculture Nutrition, 2017, 23(2): 264–275
- SALINI M, IRVIN S, BOURNE N, et al. Marginal efficiencies of long chain-polyunsaturated fatty acid use by barramundi (*Lates calcarifer*) when fed diets with varying blends of fish oil and poultry fat. Aquaculture, 2015, 449: 48–57
- SUN Z P, CAO D C, PEI Y, et al. Analysis and evaluation of nutritional composition in muscle of wild and farmed pikeperch *Sander lucioperca*. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(4): 15–22 [孙志鹏, 曹顶臣, 裴玥, 等. 野生和养殖梭鲈肌肉营养组成分析与评价. 水产学杂志, 2020, 33(4): 15–22]
- WANG C A, HU G, SUN P, et al. Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance, digestive enzyme activities and serum indices of *Salmo trutta fario* broodstock. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(2): 571–582 [王常安, 户国, 孙鹏, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对亚东鲑亲鱼生长性能、消化酶活性和血清指标的影响. 动物营养学报, 2017, 29(2): 571–582]
- WANG F. Studies on several culture biology characteristics of *Salmo trutta*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [王芳. 亚东鲑若干养殖生物学特性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- WANG J L, LIU W, LI P L, et al. Evaluation of nutritive quality and nutrient components in the muscles of wild and farmed chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(2): 126–132 [王继隆, 刘伟, 李培伦, 等. 野生和养殖大麻哈鱼肌肉营养成分与品质评价. 广东海洋大学学报, 2019, 39(2): 126–132]
- WANG J N, TANG L, LIU K Q, et al. Analysis of nutritions in the muscle between cultured and wild variegated carp. Hebei Fisheries, 2013(2): 8–14 [王金娜, 唐黎, 刘科强, 等.

- 人工养殖与野生鳙鱼肌肉营养成分的比较分析. 河北渔业, 2013(2): 8–14]
- WANG Q L, WANG J L, LIU F, *et al.* Effect of different stocking density on growth performance of sub-adult of *Salmo trutta*. Journal of Aquaculture, 2020, 41(4): 8–10 [王且鲁, 王金林, 刘飞, 等. 不同养殖密度对亚东鲑亚成鱼生长性能的影响. 水产养殖, 2020, 41(4): 8–10]
- WANG Q L, ZHOU J S, WANG W L, *et al.* Disease diagnosis and common diseases control methods of cultured trout in Tibet. Tibet Journal of Agricultural Sciences, 2021, 43(2): 43–45 [王且鲁, 周建设, 王万良, 等. 西藏人工养殖鲑鳟鱼病害诊断及常见病害防治方法. 西藏农业科技, 2021, 43(2): 43–45]
- WANG W L, ZHANG B B, ZHOU J S, *et al.* Effects of different water temperature on growth and survival of juvenile *Salmo trutta*. Fisheries Science and Technology Information, 2019, 46(1): 24–27 [王万良, 张怵怵, 周建设, 等. 不同水温对亚东鲑幼鱼生长及存活的影响. 水产科技情报, 2019, 46(1): 24–27]
- WANG Z, LIU C L, ZHAI J M, *et al.* Analysis and evaluation of muscle nutrition of *Sepioteuthis lessoniana*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 102–109 [王峥, 刘长琳, 翟介明, 等. 莱氏拟乌贼肌肉营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 102–109]
- WEI K, ZHENG W, GENG Y, *et al.* Comparative analysis of nutritional composition in muscles between wild and cultured masu salmon *Oncorhynchus masou*. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(6): 1–6 [魏凯, 郑伟, 耿琰, 等. 野生与养殖苏大麻哈鱼肌肉营养成分的比较. 水产学杂志, 2020, 33(6): 1–6]
- XU H G, BI Q Z, LIAO Z B, *et al.* Long-term alternate feeding between fish oil- and terrestrially sourced oil-based diets mitigated the adverse effects of terrestrially sourced oils on turbot fillet quality. Aquaculture, 2020, 531: 735974
- XU H G, BI Q Z, PRIBYTKOVA E, *et al.* Different lipid scenarios in three lean marine teleosts having different lipid storage patterns. Aquaculture, 2021, 536(1): 736448
- XU H G, TURCHINI G M, FRANCIS D S, *et al.* Are fish what they eat? A fatty acid's perspective. Progress in Lipid Research, 2020, 80: 101064
- YU J X, GAO X Q, HAN C, *et al.* Comparative analysis on nutritional quality between wild and cultured *Takifugu rubripes*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(9): 2987–2997 [于久翔, 高小强, 韩岑, 等. 野生和养殖红鳍东方鲀营养品质的比较分析. 动物营养学报, 2016, 28(9): 2987–2997]
- ZHANG C, ZHANG B B, MOU Z B, *et al.* Effects of salinity on growth and survival of *Salmo trutta*. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(7): 1659–1663 [张驰, 张怵怵, 牟振波, 等. 盐度对亚东鲑鱼苗生长及存活的影响. 西南农业学报, 2019, 32(7): 1659–1663]
- ZHANG D F, WU L, ZHANG X Z, *et al.* Nutrient components and texture profiles in the flesh of Atlantic salmon, triploid rainbow trout, and golden trout. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(2): 186–194 [张殿福, 吴雷, 张学振, 等. 大西洋鲑、三倍体虹鳟和金鳟的肌肉营养成分与品质特性. 中国水产科学, 2020, 27(2): 186–194]
- ZHANG Y, CAI L G, CHENG X Y, *et al.* Comparative analysis of nutrient composition in muscles between wild and flowing-water farmed broad whitefish *Coregonus nasus*. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(6): 7–13 [张钰, 蔡林钢, 程先友, 等. 野生与流水养殖齐尔白鲑肌肉营养成分比较分析. 水产学杂志, 2020, 33(6): 7–13]
- ZHAO L, CHEN J, ZHAO C G, *et al.* Composition analysis and nutritional evaluation of wild and farmed *Channa argus*. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(9): 244–249 [赵立, 陈军, 赵春刚, 等. 野生和养殖乌鳢肌肉的成分分析及营养评价. 现代食品科技, 2015, 31(9): 244–249]
- ZHOU J, ZHAO Z M, HUANG Z P, *et al.* Comparison of nutrient components in muscles and hepatopancreas of pond-and paddy field-cultured *Procambarus clarkii*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 162–169 [周剑, 赵仲孟, 黄志鹏, 等. 池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝脏营养成分比较. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 162–169]
- ZHOU Y H, ZHOU W Y, PAN G P, *et al.* Comparison of muscle characteristics between wild and cultured *Takifugu flavidus*. Fisheries Science and Technology Information, 2021, 48(4): 210–213 [周裕华, 周文玉, 潘桂平, 等. 野生菊黄东方鲀与养殖菊黄东方鲀肌肉品质比较. 水产科技情报, 2021, 48(4): 210–213]
- ZHU L, YUAN C, ZHU C K, *et al.* Comparison of nutritional compositions in muscles of diploid and triploid rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Nutrimenta Sinica, 2018, 40(2): 206–208 [朱龙, 袁聪, 朱成科, 等. 二倍体和三倍体虹鳟肌肉营养成分比较及分析. 营养学报, 2018, 40(2): 206–208]

(编辑 陈 辉)

Composition Analysis of Farmed and Wild Yadong Trout (*Salmo trutta fario*)

LI Lin^{1,2}, ZHANG Feiran^{1,2}, LIU Changlin², LIU Baoliang², LI Jie², DUOJI Ouzhu³, RE Dan³,
DEJI Cuomu³, CUO Mu³, WEI Yuliang², LIANG Mengqing², XU Houguo^{2,1}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Agro-Pastoral Integrated Service Centre, Shigatse, Xizang 857600, China)

Abstract Yadong trout (*Salmo trutta fario*), the only salmonid fish in the Tibetan Plateau, is a national agricultural product with geographical indications in Yadong. The development of Yadong trout aquaculture has significant implications for local farmers. However, no study has yet investigated the nutrient requirements of this fish. This study aimed to analyze the proximate amino acid, and fatty acid composition of various tissues of wild and farmed Yadong trout, in order to provide a reference for the evaluation of fish fillets and the formulation of optimal feed. Ten wild fish captured in the Yadong River, and 10 fish farmed with formulated feed in Yadong Industry Park were used in this study. The farmed fish were F₁ generation wild broodstock captured in the Yadong River and fed formulated feeds throughout their lifetime. The body length of wild Yadong trout was in the range of 13.4~28.7 cm, and the body weight was in the range of 38.48~346.85 g. The body length and body weight of farmed Yadong trout were in the range of 16.4~24.5 cm and 78.39~275.29 g, respectively. Frozen samples were transported to the laboratory by flight. The proximate composition of whole fish, muscle, and liver; fatty acid composition of whole fish and various tissues including muscle, liver, intestine, brain, and eye; as well as amino acid composition of whole fish, muscle, and liver were analyzed. The fatty acid composition (expressed as % total fatty acids) and amino acid composition (expressed as % dry matter basis) were assayed using gas chromatography and an automatic amino acid analyzer, respectively. In addition, *t*-tests were performed for independent samples; results are expressed as the mean ± standard deviation. The results showed that wild fish had lower condition factors but higher moisture and ash content than farmed fish. Wild fish muscle had lower crude lipid content but higher moisture content than farmed fish. The whole-body protein and lipid contents, as well as the proximate composition of the liver, were not significantly different between wild and farmed fish ($P>0.05$). The contents of saturated fatty acids (mainly C16:0 and C18:0) and n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) in whole fish, muscle, and liver were significantly higher ($P<0.05$), whereas contents of monounsaturated fatty acids (MUFA) (mainly C16:1n-7 and C18:1n-9) and n-6 PUFA (mainly C18:2n-6) were significantly lower in wild Yadong trout than in farmed Yadong trout ($P<0.05$). EPA and C20:4n-6 in whole fish, muscle, and liver, as well as DHA in the muscle of wild Yadong trout were significantly higher than those in farmed Yadong trout ($P<0.05$). In the intestine of wild Yadong trout, the contents of C14:0, C16:0, C18:0, C16:1n-7, C20:5n-3, and C22:5n-3 were significantly higher ($P<0.05$), while those of C18:1n-9 and C18:2n-6 were significantly lower ($P<0.05$) than in the farmed fish. In the brain of wild Yadong trout, the contents of C16:1n-7, C20:5n-3, and C22:5n-3 were significantly higher ($P<0.05$), while the contents of C18:1n-9 and C20:2n-6 were significantly lower ($P<0.05$) than those of farmed fish. In the eyes of wild Yadong trout, the contents of C14:0, C16:0, and C18:0, C16:1n-7, C20:1n-9, C20:2n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, and C22:5n-3 were significantly higher ($P<0.05$), while the contents of C18:1n-9, C22:1n-9, C24:1n-9, C18:2n-6, and

① Corresponding author: XU Houguo, E-mail: xuhg@ysfri.ac.cn

C18:3n-3 were significantly lower ($P<0.05$) than those of farmed Yadong trout. The total essential amino acid content in wild fish was significantly higher than that in farmed fish. The contents of threonine, valine, phenylalanine, lysine, and glycine in the muscle of wild fish were significantly higher ($P<0.05$) than those in farmed fish, while no significant difference ($P>0.05$) was observed in other amino acids. These results indicate that wild Yadong trout were leaner than farmed trout in terms of muscle lipid content. For trout, which are mainly consumed fresh, this trait may make farmed Yadong trout more acceptable than wild trout. However, in terms of fatty acid composition and amino acids, the wild Yadong trout seemed to be more acceptable than farmed trout. In particular, n-3 PUFA content is an important nutritional trait in fish fillets. The wild Yadong trout had higher n-3 PUFA contents than the farmed trout. Thus, the fish oil in the feeds of Yadong trout should not be omitted, considering that fish chemical composition generally reflects that of their diets. In addition, the price of alternative oils such as soybean oil is no longer low; the use of lipid sources in the diets of Yadong trout should be reviewed. Similarly, the essential amino acid content in wild Yadong trout was higher than that in the farmed trout, suggesting that the protein sources should be reviewed, and a certain level of fish meal should be guaranteed. In conclusion, the results of this study indicate that the formulated feeds of Yadong trout need to be further optimized.

Key words *Salmo trutta fario*; Wild; Farmed; Nutrient composition; Amino acid; Fatty acid

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211027002

http://www.yykxjz.cn/

程琳, 李旭鹏, 曹宝祥, 盖超伟, 栾生, 孔杰, 孟宪红. 温度渐变和骤变下凡纳滨对虾 *ddit4l* 基因的表达分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 87-97

CHENG L, LI X P, CAO B X, GAI C W, LUAN S, KONG J, MENG X H. Expression analysis of the *ddit4l* gene in *Litopenaeus vannamei* under sudden and gradual change of temperature. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 87-97

温度渐变和骤变下凡纳滨对虾 *ddit4l* 基因的表达分析*



程琳^{1,3} 李旭鹏^{2,3} 曹宝祥^{2,3} 盖超伟^{1,3}
栾生^{2,3} 孔杰^{2,3} 孟宪红^{2,3①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 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 山东 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 青岛 266071)

摘要 为探索凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) DNA 损伤诱导因子-4 (DNA damage inducible transcript 4-like, *ddit4l*)的结构及功能,以转录组测序获得的 unigene 序列为基础,采用直接 PCR 扩增方法,获得 *ddit4l* 完整的 ORF 序列(*Lv-ddit4l*)。该基因的 ORF 长 495 bp, 编码 164 个氨基酸, 分子量为 18.51 kDa, 理论等电点为 5.35, 包含 1 个 RTP801C 超基因家族功能结构域。多序列比对结果和系统进化树显示, *Lv-ddit4l* 与北太平洋雪蟹(*Chionoecetes opilio*)的同源性最高,为 59.76%, 且与北太平洋雪蟹先聚为一支。组织表达结果显示, *Lv-ddit4l* 在眼柄、鳃、肝胰腺、神经、肌肉 5 种组织中均表达,且表达量基本相同。在温度渐变和温度骤变条件下, *Lv-ddit4l* 在不同组织中表达变化模式有较大差别。与 26℃ 水温(对照组)相比,水温渐变至 32℃ 时,眼柄中 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调($P<0.05$)。之后水温缓慢升至最高温 38℃ 再以同样的速度回温。回温至 32℃ 时,鳃、肝胰腺中 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调($P<0.05$)。在环境水温从 26℃ 骤变至 36℃ 后 10 min 时,鳃、肝胰腺、神经中 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调($P<0.05$); 24 h 时,肌肉中 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调($P<0.05$)。当环境温度分别从 38℃、36℃ 恢复回 26℃ 后,凡纳滨对虾体内原先上调表达的 *Lv-ddit4l* 表达量呈下调恢复趋势。研究表明, *Lv-ddit4l* 可能与凡纳滨对虾响应高温胁迫过程相关。

关键词 凡纳滨对虾; 高温; *Lv-ddit4l*; 基因表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0087-11

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾,原产于太平洋西岸水域秘鲁北部至墨西哥桑诺拉一带,是当今世界上养殖产量最高的对虾种类,也是我国主要养殖的对虾种类(陈昌生等, 2001)。水温

是影响对虾生长、发育及代谢强度的重要环境因子之一。对虾为变温动物,其体温随着环境温度的变化而变化,而环境温度的不同会影响机体的新陈代谢和生理调节机制(景福涛等, 2006)。凡纳滨对虾幼体的最

* 国家自然科学基金联合基金项目(U1706203)、山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019YY001)、山东省农业良种工程项目(2019LZGC014)和中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD26; 2021CG01)共同资助。程琳, E-mail: chengmumua@outlook.com

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

收稿日期: 2021-10-27, 收修改稿日期: 2021-11-29

适生长温度为 30~33℃(陈昌生等, 2001; 欧黄思, 2015), 虾苗生长的最适温度为 28~32℃(杨锋等, 2001), 成虾的适宜温度为 23~33℃(景福涛等, 2006)。长期生活在低温或高温环境中的凡纳滨对虾始终处于胁迫状态, 导致其免疫适应不良(李强等, 2008)。高温易造成对虾的免疫力和生产性能下降, 导致对虾患病及死亡率明显增加(胡利杰等, 2020)。在夏季高温期, 对虾病毒病发病严重, 该现象主要与环境温度相关(Cheng *et al.*, 2000; 丁志起等, 2005)。但目前对凡纳滨对虾温度胁迫的调控关键基因尚无确切的研究结果。

DNA 损伤诱导因子-4 (DNA damage inducible transcript-4 like, *ddit4l*), 也称为 REDD2 或 RTP801L, 是首次发现于白血病细胞系 THP-1 的一种应激诱导蛋白, 主要存在于细胞浆、肌动蛋白微丝与核浆中(张少校等, 2017)。*ddit4l* 受到 DNA 损伤、缺氧、缺血、氧化应激等刺激时, 通过影响 DNA 损伤修复因子、缺氧诱导因子等信号通路来参与调节细胞生存、增殖与凋亡(Shoshani *et al.*, 2002; Cuaz-Pérolin *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 2009; Simonson *et al.*, 2017)。细胞自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 在维持蛋白代谢平衡与细胞内环境稳定、促进细胞的生长发育等方面发挥重要作用(李国东等, 2009; 马骊等, 2018)。饥饿、活性氧自由基(ROS)的氧化应激、生长因子缺乏、蛋白质折叠错误或聚集以及 DNA 损伤等刺激均会诱导细胞发生自噬(焦寒伟等, 2019)。自噬的一个重要调节因子是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR), 对生长因子、氧浓度、压力等刺激做出反应, 以控制细胞的代谢和生长。*ddit4l* 被证明是 mTOR 的上游抑制剂(Corradetti *et al.*, 2005), 能够通过抑制 mTOR 介导的蛋白质来降低细胞增殖和分化(Polman *et al.*, 2012)。目前, 关于 *ddit4l* 基因在甲壳动物免疫防御方面的研究较少, 在对虾中的研究更为缺乏。本研究对在不同温度胁迫下凡纳滨对虾 *ddit4l* (*Lv-ddit4l*) 的应激表达特性进行分析, 可为进一步探究凡纳滨对虾高温胁迫应答机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾样品及胁迫处理

实验动物选取于 2020 年构建的同一个凡纳滨对虾家系, 平均体长为(10.0±0.5) cm, 平均体重为(6.5±0.5) g。实验地点为中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心。在规格为 130 cm×80 cm×60 cm

的水箱中暂养 5 d, 水温为 26℃, 保持连续充气; 每日投喂 3 次饲料, 日换水量 1/2。

高温胁迫实验分为温度渐变实验和温度骤变实验, 均设置 3 个平行实验, 整个实验过程无对虾死亡。

温度渐变实验组: 暂养结束后, 采用静水法, 在 130 cm×80 cm×60 cm 的水箱中, 自动恒温加热器调整水温。在 26℃(对照)恒温之后, 以每 12 h 升高 2℃ 的速度从 26℃ 升至 38℃, 38℃ 维持 12 h 后, 再以每 12 h 降低 2℃ 的速度回温至 26℃。取样时间点见图 1。

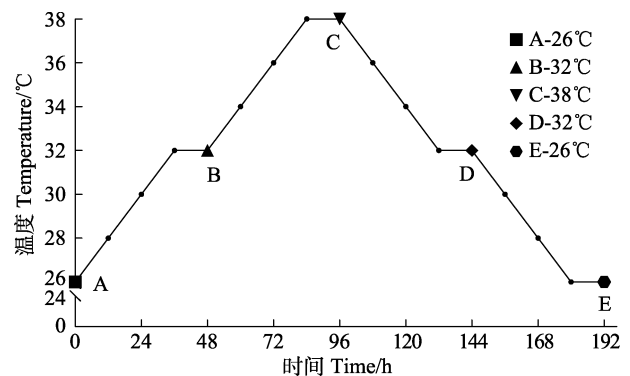


图 1 温度渐变取样时间点示意图

Fig.1 Schematic diagram of sample collection under gradual change of temperature

温度骤变实验组: 凡纳滨对虾在 56 cm×44 cm×36 cm 水箱中养殖。在 26℃(对照)恒温之后, 将凡纳滨对虾直接从 26℃ 海水中移至 36℃ 海水中养殖 24 h, 再将凡纳滨对虾直接从 36℃ 海水中移至 26℃ 海水中养殖 48 h。分别在 3 个时间点取样, 设置骤变早期和晚期, 取样时间点见图 2。

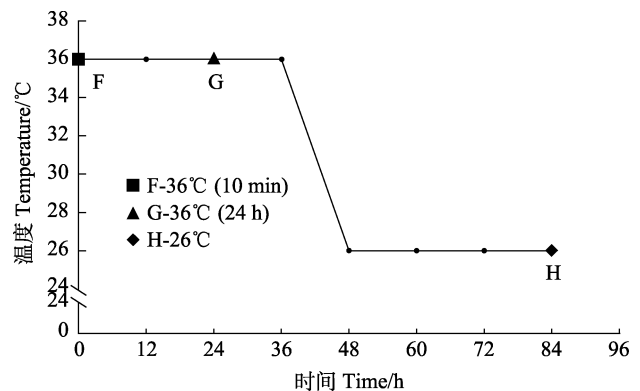


图 2 温度骤变取样时间点示意图

Fig.2 Schematic diagram of sample collection under acute change of temperature

每个时间点分别从实验组 3 个平行实验中随机抽取 2 尾, 共计 6 尾凡纳滨对虾。每尾凡纳滨对虾取

眼柄、鳃、肝胰腺、神经和肌肉 5 种组织, 神经取腹神经索部分, 共计 48 尾虾的 240 份组织保存于 RNastore reagent (TIANGEN) 中, 用于后续的 RNA 提取和基因表达定量实验。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 RNA-easy™ isolation reagent (Vazyme) 提取眼柄、肝胰腺、鳃和肌肉组织的总 RNA, 使用 RNAPrep pure micro kit (TIANGEN) 提取凡纳滨对虾神经的总 RNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。使用 NanoDrop 2000 UV/Vis 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific) 在 260 nm 和 280 nm 下定量总 RNA。使用试剂盒 ReverTra Ace® qPCR RT master mix with gDNA remover (TOYOBO) 反转录获得 cDNA。

1.3 *Lv-ddit4l* 基因序列的验证

基于高温胁迫实验样品转录组测序获得的 *ddit4l* 基因的参考序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 cDNA 序列扩增和基因表达定量所用引物, 引物信息见表 1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

以反转录获得的 cDNA 为模板, 利用上游引物 *ddit4l*-F 和下游引物 *ddit4l*-R 通过 PCR 扩增 cDNA 序列。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 68℃ 5 min。反应后进行琼脂糖凝胶电泳确定扩增产物特异性和片段大小。PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。将测序结果与转录组中序列进行对比, 验证 *Lv-ddit4l* 的 cDNA 序列。

表 1 引物名称及序列

Tab.1 The name and sequence of the primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>ddit4l</i> -F	GCTTCTCGCCGTGCAATTGTAGTGT	序列扩增 Sequence amplification
<i>ddit4l</i> -R	TGAAAACGGTCCGAACTATGCTC	序列扩增 Sequence amplification
<i>qddit4l</i> -F	TGCTGTCACCATCTTCATCACC	<i>ddit4l</i> 表达定量 <i>ddit4l</i> expression quantitation
<i>qddit4l</i> -R	TTCTTCCTCCACTCGCCCAC	<i>ddit4l</i> 表达定量 <i>ddit4l</i> expression quantitation
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	内参表达定量 Internal reference expression quantitation
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	内参表达定量 Internal reference expression quantitation

1.4 *Lv-ddit4l* 基因的生物信息学分析

使用 EditSeq 软件分析该基因开放阅读框(ORF)及推导其氨基酸序列。使用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 软件预测蛋白质分子质量、理论等电点、不稳定系数等。使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件分析蛋白质的跨膜区。使用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件进行信号肽预测。使用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 软件进行糖基化位点分析。使用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 软件进行磷酸化位点分析。使用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) 软件进行蛋白质功能结构域预测分析。使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 软件进行二级结构预测。基于 BLAST 搜索结果, 对 *ddit4l* 在氨基酸水平上进行同源比较和进化树分析, 使用 DNAMAN 6.0 软件进行同源多序列比对, 使用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(neighbour-joining method, NJ)进行 *Lv-ddit4l* 基因进化树构建。

1.5 *Lv-ddit4l* 基因的表达定量分析

以凡纳滨对虾 5 种组织的 cDNA 为模板, 使用 SYBR Green Real time PCR Master Mix(TOYOBO), 使用 Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR instrument 定量仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法进行荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR), 分析 *ddit4l* 在不同温度时 5 种组织中的表达水平。反应体系为 25 μ L: 12.5 μ L SYBR Real time PCR Master Mix, 2.5 μ L 样品溶液, 8 μ L 蒸馏水, 1 μ L 上游引物和 1 μ L 下游引物。每个样品实验设置 3 个平行重复以及内参对照。反应条件: 95℃ 60 s; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 45 s, 共 40 个循环。

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件对计算结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著, 并通过 prism 将统计结果整理成柱状图。

2 结果与分析

2.1 *Lv-ddit4l* 基因 ORF 序列的验证及特征分析结果

Lv-ddit4l 基因扩增产物凝胶电泳结果如图 3 所示, 产物单一, 且长度在 750 bp 左右, 符合序列扩增引物设计的预计产物大小。

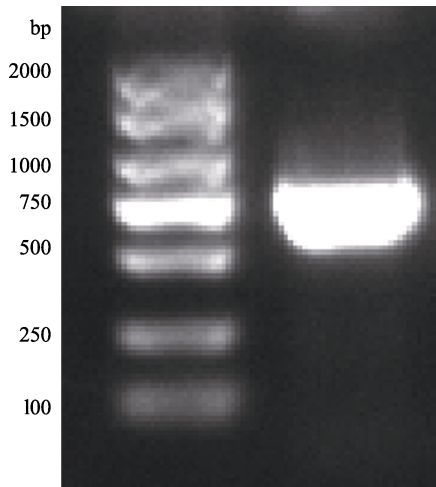


图 3 *Lv-ddit4l* 基因扩增产物凝胶电泳结果
Fig.3 Gel electrophoresis of *Lv-ddit4l* gene amplification products

Lv-ddit4l 序列包含 1 个 495 bp 的 ORF, 编码 164 个氨基酸, 预测其带负电荷的氨基酸残基为 24 个 (Asp+Glu), 带正电荷的氨基酸残基为 18 个 (Arg+Lys), 分子量为 18.51 kDa, 理论等电点为 5.35, 不稳定性系数为 65.83, 归类为不稳定性蛋白, 脂肪族指数为 96.28, 亲水性总平均值为 -0.307, 无跨膜蛋白和信号肽结构, 预测无糖基化位点, 磷酸化位点分

```

1           M A H L K V L P S S
1  cggtgcaattg tagtgtgact gttatagact gtaaagtgag gagaa ATC GCT CAT CTC AAG GTG CTG TCA CCA TCT TCA TCA

13 P L D L L G P L P T E E D V Q M P L E D P T E
82 CCC CTC AGT GAT CTC CTT GGA CCT TTA CCC ACA GAA GAA GAC GTC CAG ATG CCC ACG TTA GAA GAC CCT ACA GAA

38 A L T R A V L R G R V E E E V R A A Q N N M V L
157 GCC CTG ACG CGA GCG GTG CTC CGT GGG CGA GTG GAG GAA GAA GTG AGA GCA GCT AGT CAA AAT AAT ATG GTA TTG

63 P P T L L D Q V A D H V L Y L A K D E P C G L R G
232 CCG CCC ACG CTG CTG GAC CAA GTC GCT GAT CAC GTC CTT TAC CTC GCC AAG GAT GAA CCC TGT GGT CTG AGA GGG

88 C V L T V L W A D V E E E E Q Q L A Q V K A D A H
307 TGT GTG CTA ACG GTT CTC TGG GCT GAT GTC GAG GAG GAG GAA CAG CAA CTC GCT CAG GTC AAA GCT GAC GCC CAT

113 P T H H L V L L R P D P A W T K M A R I
382 ACT CCC ACC ACC CAC CAC CTC GTC CTC ACT CTA CGG CCG GAC CCC GCC TCA TGG TAC ACC AAG ATG GCT AGA ATA

138 F R L G K R R M V V P Q Y D L I K R R L Y N F
457 TTT AGG TCA CTC GGC AAG AGG GCG ATG GTC GTT TCA CCT CAG TAT GAC CTC ATC AAG AGG AGA CTG TAC AAC TTC

163 E D *
532 GAG GAT TAG gttatagatagaggctccccactcttgaagcggttcgcctgaagtccatcaggagaattctggacgcagagacacgttagccccggcg

629 tgaacagagaaggaagtataaattatttatttcccaagaagtgagcgcgcttttagccaatctagaagtgctgagcatagttcggaccgttttcaa

```

图 4 *Lv-ddit4l* 基因 cDNA 序列和对应的氨基酸序列

Fig.4 cDNA and amino acid sequence of *Lv-ddit4l*

启动子和终止子用红色字体表示, “□”表示磷酸化位点, “-”表示结构域
The start and stop codons are indicated in red, “□” for phosphorylation site, “-” for domain

析预测有 8 个 Ser、4 个 Thr 和 1 个 Tyr, 在 62~160 氨基酸位置处包含 1 个 RTP801C 超基因家族功能结构域, 且该结构域在物种间相当保守(图 4、图 5)。预测的二级结构中, α -螺旋(62 个氨基酸)占 37.80%, β -折叠(33 个氨基酸)占 20.12%, β -转角(7 个氨基酸)占 4.27%, 无规卷曲(62 个氨基酸)占 37.80%, 说明 *Lv-ddit4l* 基因编码的蛋白以 α -螺旋、延伸链和无规卷曲为主, 含少量的 β -折叠, 间或有 β -转角。*Lv-ddit4l* 蛋白质的三维结构如下(图 6)。

2.2 *Lv-ddit4l* 基因的同源性分析

利用 NCBI BLASTP 对 *Lv-ddit4l* 基因编码的氨基酸序列进行同源序列比对(图 7), 发现 *Lv-ddit4l* 与北太平洋雪蟹(*Chionoecetes opilio*)的同源性较高, 为 59.76%, 与其他物种同源性为: 人(*Homo sapiens*) (23.20%)、家鼠(*Mus musculus*) (23.59%)、牛(*Bos taurus*) (23.71%)、黑猩猩(*Pan troglodytes*) (23.20%)、野猪(*Sus scrofa*) (21.65%)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*) (20.11%)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) (25.13%)、斑马鱼(*Danio rerio*) (17.96%)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*) (24.74%)、眼斑鳗狼鱼(*Anarrhichthys ocellatus*) (24.23%)、海龟(*Chelonia mydas*) (21.88%)、鹑鹑(*Dromaius novaehollandiae*) (19.44%)、鲸鲨

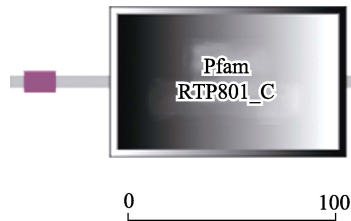


图 5 *Lv-ddit4l* 基因的功能结构域
Fig.5 Functional domain of *Lv-ddit4l*

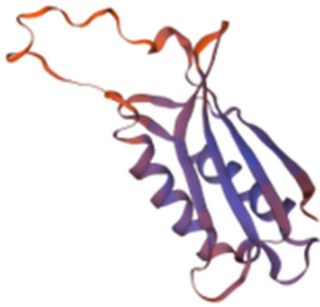


图 6 *Lv-ddit4l* 蛋白质的三维结构
Fig.6 Three-dimensional structure of the *Lv-ddit4l* protein

(*Rhincodon typus*) (21.35%)、豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*) (29.65%)、佛州文昌鱼(*Branchiostoma floridae*) (20.48%)、大型蚤(*Daphnia magna*) (27.33%)、紫色海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) (19.13%)、日本刺参(*Apostichopus japonicus*) (22.22%)、马蹄蟹(*Limulus polyphemus*) (23.39%)、美国龙虾(*Homarus americanus*) (34.12%)。

2.3 *Lv-ddit4l* 基因的系统进化树分析

对 *ddit4l* 编码的蛋白序列进行系统进化树分析, 结果如图 8 所示, 凡纳滨对虾先与北太平洋雪蟹紧密聚为一支, 再与美国龙虾相聚, 它们的亲缘关系最近, 形成一个独立的分支。接着与日本刺参、紫色海胆、佛州文昌鱼、马蹄蟹、大型蚤、豌豆蚜聚为一支。

2.4 *Lv-ddit4l* 基因在正常凡纳滨对虾组织中的表达

qRT-PCR 分析表明, 在 26℃ 水温环境中, *Lv-ddit4l* 在凡纳滨对虾 5 种组织中均有表达, 且表达量基本相同, 没有显著差异($P>0.05$) (图 9)。

2.5 不同温度胁迫下 *Lv-ddit4l* 基因在不同组织中的表达

在温度渐变实验中, *Lv-ddit4l* 基因在凡纳滨对虾 5 种组织中的相对表达量如图 10 所示。眼柄中的 *Lv-ddit4l* 表达量在水温升至 32℃ 时(B-32℃)显著上调($P<0.05$), 是对照组(A-26℃)表达量的 10.37 倍。与对

照组(A-26℃)相比, 鳃、肝胰腺中 *Lv-ddit4l* 的表达量回温至 32℃ 时显著上调($P<0.05$), 表达量分别是对照组(A-26℃)的 3.37 倍和 2.03 倍。回温至 26℃ 时(E-26℃), 眼柄、鳃、肝胰腺、神经和肌肉中的 *Lv-ddit4l* 表达量与对照组(A-26℃)无显著差异($P>0.05$)。在神经和肌肉中, 不同温度胁迫下的 *Lv-ddit4l* 表达量没有显著变化($P>0.05$)。

在温度骤变实验中, *Lv-ddit4l* 在凡纳滨对虾 5 种组织中的相对表达量见图 11。与对照组(A-26℃)相比, 鳃、肝胰腺、神经中的 *Lv-ddit4l* 表达量在水温骤变至 36℃ 后 10 min 时(F-36℃)显著上调($P<0.05$); 其中, 肝胰腺的表达量变化显著, 为对照组的 24.06 倍, 鳃、神经中的表达量分别为对照组(A-26℃)表达量的 1.22 倍和 3.67 倍。肌肉中的 *Lv-ddit4l* 表达量在水温维持在 36℃ 24 h (G-36℃)时显著上调($P<0.05$), 是对照组(A-26℃)的 2.71 倍。回温至 26℃ 时(H-26℃), 鳃、肝胰腺、神经和肌肉中的 *Lv-ddit4l* 表达量与对照组无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

目前, 已知 *ddit4l* 在维持单核细胞氧化还原状态以及在骨骼肌代谢方面发挥作用(Cuaz-Pérolin *et al*, 2004; Pisani *et al*, 2005; Imen *et al*, 2009; Suzuki *et al*, 2011)。*ddit4l* 表达具有很强的特异性, 通常见于纤维细胞、肌细胞以及巨噬细胞, 在医学上的大多数恶性肿瘤组织中低表达甚至不表达(Cuaz-Pérolin *et al*, 2004; Simonson *et al*, 2017); *ddit4l* mRNA 在成人的骨骼肌中特异性高表达, 遇到压力应激时可以抑制 mTOR 的活性(Drummond *et al*, 2008); 大鼠(*Rattus norvegicus*) *ddit4l* mRNA 也在骨骼肌、心脏和精巢中特异性表达(Pisani *et al*, 2005); 小鼠(*Mus musculus*) *ddit4l* 基因在肌肉组织中特异性表达(Miyazaki *et al*, 2009); 在斑马鱼成鱼中, *ddit4l* 基因在脑、眼睛、心脏、肝脏、肾脏、卵巢、鳃、肠道、肌肉、脾脏和精巢中均有表达, 但在肝脏、肾脏和卵巢中的表达量较高(冯强, 2012)。对斑马鱼胚胎进行热激处理, *ddit4l* 的表达量显著上调; 对斑马鱼稚鱼和成鱼进行饥饿处理, *ddit4l* 的表达量显著上调(冯强, 2012)。Cuaz-Pérolin 等(2004)筛选出 *ddit4l* 基因, 发现 *ddit4l* 是一种低氧反应基因, 在化学缺氧的条件下, *ddit4l* 基因的表达量呈剂量依赖性上调。Pisani 等(2005)研究证明, *ddit4l* 在大鼠肌肉无氧代谢中表达量也显著上调, 它还与导致细胞死亡的应激反应有关(Cuaz-Pérolin *et al*, 2004; Imen *et al*, 2009)。

<i>Litopenaeus vannamei</i>	NAHLKVLSPSSSPLSDLLG.....PLPTEFFVCMPT.....LF	33
<i>Homo sapiens</i>	MVATGSLSSKNPASTSELLCCGYHPESLISDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	46
<i>Mus musculus</i>	MVATGSLSSKNPASTSELLCCGYHPESLISDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	46
<i>Chionoecetes opilio</i>	MAHLKVI TPVFAKLSCLLG.....PIPI FEGLL FEE.....LF	33
<i>Bos taurus</i>	MVATGSLSSKNPASTSELLCCGYHPESLISDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	46
<i>Pan troglodytes</i>	MVATGSLSSKNPASTSELLCCGYHPESLISDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	46
<i>Sus scrofa</i>	MVATGSLSSKNPASTSELLCCGYHPESLISDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	46
<i>Xenopus tropicalis</i>	MEPAGS.....NSL EYFSNANT.....VO	19
<i>Ictalurus punctatus</i>	MVFTMVAISTCKNKSSFFI SDFVCCGYDCSCI DNFLDFWBRCLTEP.....VLSA	50
<i>Danio rerio</i>	MVYTQALVFGMSVRNFPENITLAFELSLI PGLRGDGEPI CCHGRI NKACSSFSLSGSA.....CSLFEF	62
<i>Lates calcarifer</i>	MVATSTI KTKSGFCSI SFLVRRYDCACT EKEFLDFWDHCTAEP.....CRNA	46
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	MVATSTI KTKSSFCI SFLVRRYDCACT EKEFLDFWDHCTAEP.....CRNA	46
<i>Chelonia mydas</i>	MVATSNSSKSTACI SFLVHCGFHHAN I SDFEYWDVYVVPPEP.....NLNF	45
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	MVATASLSSFSAPARVSWI CGGFQCPD I ADI GYWDVCTGKPP.....NISF	45
<i>Rhincodon typus</i>	MVASCS KRKSPCCFPAAE.....I NYWDEHVAAN.....NVNE	34
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	MEVPPYVI CPSYVPHSTIG.....I LKLEFI ES.....29	29
<i>Branchiostoma floridae</i>	MCKCDVANGNPNVPSRECEQEVSVREEVVTDSGDGFFAALQKLFKLGDI FDPKTSPPISVVFERRDCKRKCVDRENYPCVRYKSTENAEELSLRLDVCAC	100
<i>Daphnia magna</i>	MFVMI PVALDFSFVWN.....LSL EDAFECT.....AR	30
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	MLDVCDFPPI HSRNI I FSVRN.....N NVI DCRGLDFC.....GNHFD	40
<i>Apostichopus japonicus</i>	MKVFLAKVI CKTELPSMFVP.....VI EST GCV.....DNPII GNPI EN.....GLNJD	46
<i>Limulus polyphemus</i>	MKI HDI HNSGVI RSSAFG.....FNDVADAFWCP.....NE	32
<i>Homarus americanus</i>	MAYQVKMDRQVWRPNLYDLG.....S I DATTDLLEVE.....VE	36

<i>Litopenaeus vannamei</i>	DP TEALTRAVLRGRVFFVRAASC.....NNMVL PPTLLCVAADHVL YLAKDFPCCGRCCVLTVLVADVFE.....EECCI ACVKADAHPTTHHLLVT	122
<i>Homo sapiens</i>	VI FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLCCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VCTSSVVPTEFELTV	139
<i>Mus musculus</i>	VV FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLCCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VCTASVVPTEFELTV	139
<i>Chionoecetes opilio</i>	DP VETRAVWV RRRVFFVRCNTH.....NSI VFPPHLLCVAAFHVL ELSTDFPCGRCCVLFVYVYDFPEL.....GFCCL AKLKTCKMNPSTHLLVJK	122
<i>Bos taurus</i>	VV FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLCCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VCTSSVVPTEFELTV	139
<i>Pan troglodytes</i>	VI FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLCCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VCTSSVVPTEFELTV	139
<i>Sus scrofa</i>	VV FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLCCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VCTSSVVPTEFELTV	139
<i>Xenopus tropicalis</i>	DA FTVMRTYHIASM ENCLYNAKCTLHCTKLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....HIALCTI AYDSTVPEPTEFELTV	112
<i>Ictalurus punctatus</i>	FA CFWFAACCCVRI LECCLARAKTSTLHCTRVLVPEPITL TRRARVIRI RI AAGFPCCGRCCVLDVRI ELFECKRQR.....RCAKRI VCTASVVPTEFELTV	148
<i>Danio rerio</i>	DFGFEVCLCLDI SKRI EKCTVFAKAGASTLCCSFLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....L I N I C T V I P D C S S V P T E F E L T V	156
<i>Lates calcarifer</i>	IV TDFRTCCCI AKMFENCL SRAKKTTLHCSAVI VPEKLTORI AREVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VYESTVVPTEFELTV	139
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	IV TDFRTCCCI AKMFENCL SRAKKTTLHCSAVI VPEKLTORI AREVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VYESTVVPTEFELTV	139
<i>Chelonia mydas</i>	VV FFEFTCCNLVKML ENCLSKSKCTKLHCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VYESTVVPTEFELTV	138
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	AV FERCPVM YLRCVR SI SRSKCAKLFCSKVLVPEKLTORI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VYESTVVPTEFELTV	137
<i>Rhincodon typus</i>EFECTI YI TKI FESSI SRAKKTTLNCSFVLPETI I RKI ACEVIRLSSSTFPCGRCCVHVHNL EI ENV.....CKKLTIRI VYESTVVPTEFELTV	124
<i>Acyrtosiphon pisum</i>ETSFAFMAI HCRI EEFELRAAKRAQLSCGFVLPETI I RHI AHVIV KVAESFPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....CRK I C T I K C T I N T V S T P T E F E L T V	119
<i>Branchiostoma floridae</i>	ITLAVDFHACFRISNKI CTAARARCR YI CCNLYVDPNLTCOI ARVIV RVSINFPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....VSRCKVCTVYPTVNTPEFELTV	194
<i>Daphnia magna</i>	ITVLAFLI AAFI RCARARYRI SNGCCCR APNFI I LPACT I CSI ARVI I NASADFPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....GAVKCHPYVNTPEFELTV	129
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	CF CFTKMACFVSHI I FHTLRAKTRVE NGKLI I PSNI PCHVARVILI NARFEPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....CRR I C R V A V E P T V T P T E F E L T V	132
<i>Apostichopus japonicus</i>	DI CDFPKI TFIY SGLI I LTTI RAARNKTS HI CI LVPNSI TKHLAKTI SFASTRNFPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....CTR I C K C V D P I T V T P T E F E L T V	138
<i>Limulus polyphemus</i>	DE FFEI DCKYLAFLKIFNSLRADAKI KLH CDFVE FPTNI NHRI ARVI NARSVDFPCCGRCCVHVHNL EI ENV.....RRH I C K V C K D P I A V A T F F V I V	124
<i>Homarus americanus</i>	GE VAAKVSVMQCLTCEVTSRADALG.....CCQVMVPEGLI DEVTACVLRALAESEPCGRCCVHVHNL EI ENV.....GECEL TRVLDPTMPNTPEFELTV	127

<i>Litopenaeus vannamei</i>	LRPDPASVYT.....KVARI FRSLGKRR NVVSPCYTI I KRRI YNFED.....	164
<i>Homo sapiens</i>	FKFCNCSVTSFRDFFFSRGRFSSGFRRTLI I SSGFRL VKKKI YSLI GTTVI EGS.....	193
<i>Mus musculus</i>	FKFCNCSVTSFRDFFFSRGRFSSGFRRTLI I SSGFRL VKKKI YSLI GTTVI EEC.....	193
<i>Chionoecetes opilio</i>	LKADPTSVFT.....KVARI FRSLGKRR NVVSSRYFLI LKKNFVDFPCLMVC.....	169
<i>Bos taurus</i>	FKFCNCSVTSFRDFFFSRGRFSSGFRRTLI I SSGFRL VKKKI YSLI GTTVI EFC.....	193
<i>Pan troglodytes</i>	FKFCNCSVTSFRDFFFSRGRFSSGFRRTLI I SSGFRL VKKKI YSLI GTTVI EGS.....	193
<i>Sus scrofa</i>	FKFCNCSVTSFRDFFFSRGRFSSGFRRTLI I SSGFRL VKKKI YSLI GTTVI EFC.....	193
<i>Xenopus tropicalis</i>	LKRFSCIL CHFSDFLI PGTVPFSLFRGI I KI SPKFL I TKNSI YFSVGG.....SEDC	164
<i>Ictalurus punctatus</i>	FKFCNCSVSNLRDFLRI CTCFS.....RRTIKLCPGFRVVKKKI YSSAAGTVVEFC.....	199
<i>Danio rerio</i>	LCAELCCVPP.....IKI LFCGG.....KVI SI RREYRI I KRKLYSSATPTVIEFY.....	202
<i>Lates calcarifer</i>	FKFCNCTAVPSI REFFFMCTCFAPAFRHVI KI SPGFRI VKKKI YSSSAGTVVEFC.....	193
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	FKFCNCTAVPSI REFFFMCTCFAPAFRHVI KI SPGFRI VKKKI YSSSAGTVVEFC.....	193
<i>Chelonia mydas</i>	FKFCNCSVSPREFFFRTRACFASGSKRTLI I SPGFRL I KKKI YSLI ETI VI EEC.....	191
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	FRDCNCSVSSI REFFTHACPTSSI SRESCAI SSGR.....	172
<i>Rhincodon typus</i>	FRDCNCSVSPSLDFFFI CTCCTAGFRCAIKLSPGFCL I KKKI YSSSARTVI EC.....	177
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	LKCNPRNAVS.....LI PI FI RNFSTCGTI VI CHEFTI FKRRI YRSFL E.....	163
<i>Branchiostoma floridae</i>	LRDRRAAVLN.....ALCAL I PFSGCCGCKTIVLSSGYRI VKKKI YRLSKRSEVI EYP	248
<i>Daphnia magna</i>	LRP HTTVTS.....K I P I C I C N I EYRSTVI SCEYSI VKKKI E.....	167
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	VCRVSPKVFIT.....KVC SVI RNSVECT.....VLKSSYKI VKNKI YRRNCSVCI KECS.....	182
<i>Apostichopus japonicus</i>	LKCFITPKVFP.....KI CMM RNNFRT.....VI KPTVKI I KRKI YRKFSRVI VQESS.....	187
<i>Limulus polyphemus</i>	LKTEVSSVFS.....MKCKI KVRMGRKSAVVI SFGYTI NKNKI YRSSSLH.....	169
<i>Homarus americanus</i>	LTPETITVYH.....KVSRI I KPLRKSPLLSTRFKLEKRKLPPEE.....	169

图 7 Lv-ddit4l 氨基酸序列比对

Fig.7 The alignment of Lv-ddit4l amino acid sequence

ddit4l 序列 GenBank 登录号: 人(NP_660287.1)、家鼠(NP_084419.2)、北太平洋雪蟹(KAG0695771.1)、牛(NP_001074988.1)、黑猩猩(XP_001168002.1)、野猪(XP_013834460.1)、热带爪蟾(XP_004911505.2)、斑点叉尾鲷(XP_017326609.1)、斑马鱼(NP_001245246.1)、尖吻鲈(XP_018546478.1)、眼斑鳗狼鱼(XP_031707148.1)、海龟(XP_027681253.1)、鹈鹕(XP_025965069.1)、鲸鲨(XP_020378872.1)、豌豆蚜(NP_001155726.1)、佛州文昌鱼(XP_035668797.1)、大型蚤(JAL45518.1)、紫色海胆(XP_787042.1)、日本刺参(PIK42874.1)、马蹄蟹(XP_022254613.1)、美国龙虾(XP_042214560.1)。

The GenBank accession numbers of ddit4l amino acid sequences are as follows: *Homo sapiens* (NP_660287.1), *Mus musculus* (NP_084419.2), *Chionoecetes opilio* (KAG0695771.1), *Bos taurus* (NP_001074988.1), *Pan troglodytes* (XP_001168002.1), *Sus scrofa* (XP_013834460.1), *Xenopus tropicalis* (XP_004911505.2), *Ictalurus punctatus* (XP_017326609.1), *Danio rerio* (NP_001245246.1), *Lates calcarifer* (XP_018546478.1), *Anarrhichthys ocellatus* (XP_031707148.1), *Chelonia mydas* (XP_027681253.1), *Dromaius novaehollandiae* (XP_025965069.1), *Rhincodon typus* (XP_020378872.1), *Acyrtosiphon pisum* (NP_001155726.1), *Branchiostoma floridae* (XP_035668797.1), *Daphnia magna* (JAL45518.1), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP_787042.1), *Apostichopus japonicus* (PIK42874.1), *Limulus polyphemus* (XP_022254613.1), *Homarus americanus* (XP_042214560.1).

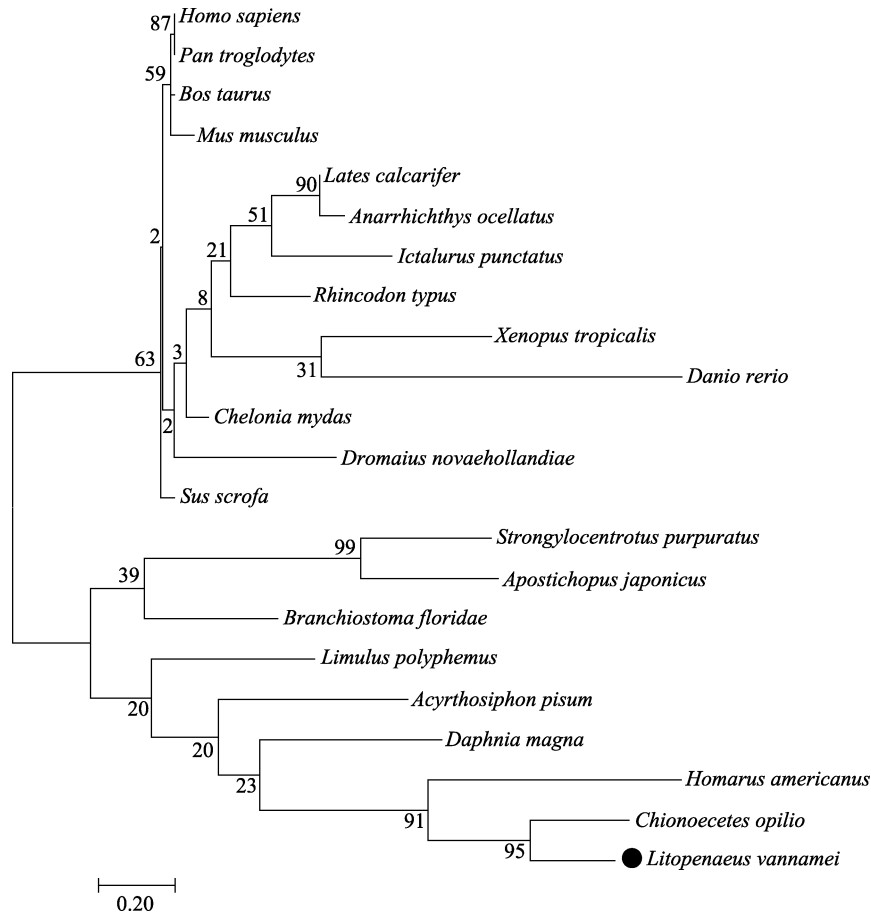


图 8 *ddit4l* 系统进化发育树分析

Fig.8 The analysis of phylogenetic tree for *ddit4l*

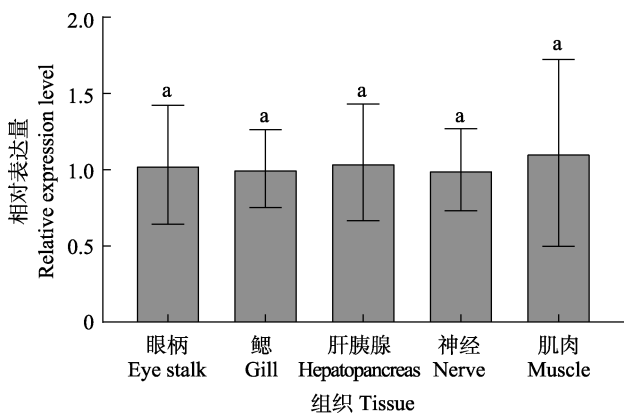


图 9 26°C 时凡纳滨对虾 *Lv-ddit4l* 在 5 种组织中的表达
Fig.9 Expression of *Lv-ddit4l* in five tissues of *L. vannamei* at 26°C

标有不同字母的值之间差异显著($P < 0.05$)。下同。
Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$). The same as below.

本研究采用 qRT-PCR 技术检测了 *Lv-ddit4l* 在温度渐变和温度骤变胁迫时 5 种组织表达水平变化。结果表明, 该基因在所有检测的组织中都有表达,

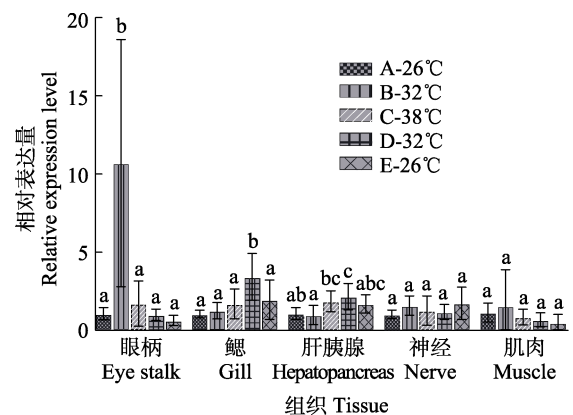


图 10 温度渐变下 *Lv-ddit4l* 在 5 种组织中的表达
Fig.10 Expression of *Lv-ddit4l* in five tissues under gradual change of temperature

且 5 种组织总体的表达水平比较一致。与 *ddit4l* 在斑马鱼和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)不同组织中普遍表达的特点(冯强, 2012; 阎德平等, 2021)相一致。与 26°C 水温相比, 在水缓慢升至 32°C 的凡纳滨对虾眼柄中 *Lv-ddit4l* 的表达量显著上调($P < 0.05$), 是对照组表达量的 10.37 倍, 推测凡纳滨对虾眼柄中

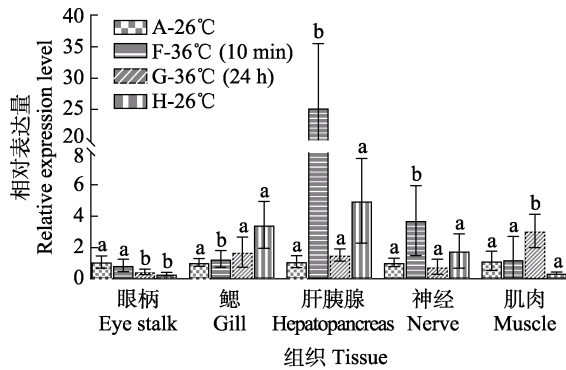


图 11 温度骤变下 *Lv-ddit4l* 在 5 种组织中的表达
Fig.11 Distribution of *Lv-ddit4l* in five tissues under acute change of temperature

该基因对温度变化较先做出响应。在水温升至 38℃ 时,眼柄、鳃、肝胰腺、神经和肌肉中 *Lv-ddit4l* 的表达量均无显著变化,推测该基因可能在热应激的前期发挥作用。在水温从 38℃ 缓慢回至 32℃ 时,凡纳滨对虾鳃、肝胰腺中的 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调 ($P < 0.05$),分别是对照组的 3.37 倍和 2.03 倍。在 32~38℃ 范围内的整个温度渐变的过程中, *Lv-ddit4l* 在眼柄、鳃和肝胰腺中表达量均显著上调,说明该基因可能在凡纳滨对虾的温度渐变胁迫中发挥作用。在环境水温从 26℃ 骤变至 36℃ 后 10 min 时,凡纳滨对虾鳃、肝胰腺和神经中的 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调 ($P < 0.05$),其中,肝胰腺中的表达量为对照组的 24.06 倍,鳃和神经中的表达量分别为对照组的 1.22 倍和 3.67 倍。肝胰腺是凡纳滨对虾重要的免疫器官(张月等, 2017),推测在应对温度骤变中,肝胰腺中的 *ddit4l* 基因可能发挥重要的功能。在环境水温从 26℃ 骤变至 36℃ 后 24 h 时,凡纳滨对虾肌肉中 *Lv-ddit4l* 表达量显著上调 ($P < 0.05$),是对照组的 2.71 倍。在 36℃ 范围内的整个温度骤变过程中, *Lv-ddit4l* 在鳃、肝胰腺、神经和肌肉中表达量均显著上调,说明该基因可能在凡纳滨对虾的高温骤变胁迫中发挥作用。当环境温度分别从 38℃、36℃ 恢复至 26℃,凡纳滨对虾体内上调表达的 *Lv-ddit4l* 表达量呈下调趋势。*Lv-ddit4l* 在凡纳滨对虾遭遇热胁迫时表达量上调,与 *ddit4l* 基因在斑马鱼胚胎遭受热刺激时表达量上调的结果一致(冯强, 2012)。同时,凡纳滨对虾的神经和肌肉在温度渐变过程中以及眼柄在温度骤变过程表达量变化差异不显著也说明 *ddit4l* 基因的表达具有很强的特异性,与前人的研究结果(Pisani *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2009; 冯强, 2012; Simonson *et al.*, 2017)一致。相对于温度渐变,温度骤变下凡纳滨对虾的 *Lv-ddit4l* 表达量上调表达更为明显,说明温度骤变对该基因的影响更大,

Lv-ddit4l 应对高温胁迫中的具体功能值得深入研究。

研究表明,温度与凡纳滨对虾的氧代谢密切相关(Zhou *et al.*, 2010),温度升高会导致溶解氧浓度下降,缺氧严重影响对虾的代谢过程(朱孟凯等, 2015)。动物体有一定的氧和热耐受极限,一旦温度超过这个极限,动物体就可能从有氧代谢转变为无氧代谢(Anestis *et al.*, 2008),影响机体的多种生理活动(Yao *et al.*, 2014)。研究表明, *ddit4l* 基因在体内缺氧时表达量上调,促进细胞自噬(Simonson *et al.*, 2017),能够参与大鼠肌肉的无氧代谢(Pisani *et al.*, 2005)。本研究发现, *Lv-ddit4l* 在高温渐变及高温骤变中均出现差异表达,即该基因能够参与高温胁迫的应激应答。在遭受高温胁迫时, *Lv-ddit4l* 能快速响应以适应外界环境。推测其可能促进细胞自噬来应对外界刺激。但目前 *Lv-ddit4l* 发挥作用的具体机制尚不明确,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- ANESTIS A, PORTNER H O, LAZOU A, *et al.* Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: Implications for vertical zonation. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(17): 2889–2898
- CHEN C S, HUANG B, YE Z H, *et al.* Effect of temperature on growth, food intake and survival rate in *Penaeus vannamei* under different temperature conditions. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2001, 6(4): 296–300 [陈昌生, 黄标, 叶兆弘, 等. 南美白对虾摄食、生长及存活与温度的关系. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(4): 296–300]
- CHENG W, CHEN J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2000, 10(4): 387–391
- CORRADETTI M N, INOKI K, GUAN K L. The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(11): 9769–9772
- CUAZ-PÉROLIN C, FURMAN C, LARIGAUDERIE G, *et al.* REDD2 gene is upregulated by modified LDL or hypoxia and mediates human macrophage cell death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24(10): 1830–1835
- DING Z Q, FENG Y P. Discussion on occurrence and prevention and cure countermeasures of *Penaeus monodon*. *Shandong Fisheries*, 2005, 22(6): 9 [丁志起, 冯艳萍. 对虾发病规律与防治对策的探讨. 科学养鱼, 2005, 22(6): 9]
- DRUMMOND M J, FUJITA S, TAKASHI A, *et al.* Human

- muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2008, 40(4): 691–698
- FENG Q. Preliminary study of zebrafish *redd1* and *redd2* genes *in vivo*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 [冯强. 对斑马鱼 *redd1* 和 *redd2* 基因在体功能及其作用机理的初步研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012]
- HU L J, LI X P, MENG X H, *et al.* Expression characteristics of trehalose-6-phosphate synthase in *Litopenaeus vannamei* under high-temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 159–167 [胡利杰, 李旭鹏, 孟宪红, 等. 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. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 159–167]
- IMEN J S, BILLIET L, CUAZ-PêROLIN C, *et al.* The regulated in development and DNA damage response 2 (REDD2) gene mediates human monocyte cell death through a reduction in thioredoxin-1 expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 46(10): 1404–1410
- JIAO H W, WANG H J, ZHAO Y, *et al.* Research progress of the autophagy and disease. *Anhui Agriculture. Science*, 2019, 47(2): 10–14 [焦寒伟, 王红均, 赵宇, 等. 细胞自噬与疾病的研究进展. *安徽农业科学*, 2019, 47(2): 10–14]
- JING F T, PAN L Q, HU F W. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to the change of temperature. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(S1): 40–44 [景福涛, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾对温度变化的免疫响应. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(S1): 40–44]
- LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132(1): 27–42
- LI G D, WU D Q, LI B Y. Research progresses on the role of cell autophagy in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2009, 28(4): 445–448 [李国东, 吴德全, 李本义. 细胞自噬在肿瘤中作用的研究进展. *癌症*, 2009, 28(4): 445–448]
- LI Q, LI H, JIANG C J, *et al.* Comparison of immune parameters in the haemolymph of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(2): 132–135 [李强, 李华, 姜传俊, 等. 温度对凡纳滨对虾血淋巴免疫指标的影响. *大连水产学院学报*, 2008, 23(2): 132–135]
- MA L, GE Q Q, XU Y, *et al.* Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (TCTP) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 101–109 [马骊, 葛倩倩, 许杨, 等. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 TCTP 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 101–109]
- MIYAZAKI M, ESSER K A. REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2009, 296(3): C583–C592
- OU H S. Effects of light, temperature and density on the growth, resistance and antioxidant enzyme activity of *Litopenaeus vannamei* larvae. Master's Thesis of Guangdong Marine University, 2015 [欧黄思. 光照、温度及密度对凡纳滨对虾幼体生长、抗逆性和抗氧化酶活性的影响. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- PISANI D F, LECLERC L, JARRETOU G, *et al.* SMHS1 is involved in oxidative/glycolytic-energy metabolism balance of muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326(4): 788–793
- POLMAN J, HUNTER R G, NIELS S, *et al.* Glucocorticoids modulate the mTOR pathway in the hippocampus: Differential effects depending on stress history. *Endocrinology*, 2012, 153(9): 4317–4327
- SHOSHANI T, FAERMAN A, METT I, *et al.* Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 2002, 22(7): 2283–2293
- SIMONSON B, SUBRAMANYA V, CHAN M C, *et al.* DDIT4L promotes autophagy and inhibits pathological cardiac hypertrophy in response to stress. *Science Signaling*, 2017, 10(468): eaaf5967
- SUZUKI N, ANDO S, SUMIDA K, *et al.* Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 2011, 36(5): 569–585
- YAN D P, LÜ J J, LU X, *et al.* Cloning and expression analysis of Pt-*ditt4l* in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(2): 334–340 [阎德平, 吕建建, 陆璇, 等. 三疣梭子蟹 Pt-*ddit4l* 基因的克隆及表达分析. *水生生物学报*, 2021, 45(2): 334–340]
- YANG F, CAI Q, YE F X, *et al.* A demonstration of closed-type ecological farming of *Penaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2001(11): 56–59 [杨锋, 蔡强, 叶妃轩, 等. 关于南美白对虾的养殖技术之一南美白对虾封闭式生态养殖试验示范. *中国水产*, 2001(11): 56–59]
- YAO C L, SOMERO G N. The impact of ocean warming on marine organisms. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59(5/6): 468–479
- ZHANG S X, WU Y. Clinical significance of DNA damage-inducible transcript 4-like in glioblastoma multiforme analyzed using internet datasets. *Clinical Journal of Medical Officer*, 2017, 45(10): 1018–1021 [张少校, 吴瑛. 高通量数据分析 DNA 损伤诱导转录样蛋白 4 在脑多形性胶质母细胞瘤中表达及临床意义. *临床军医杂志*, 2017, 45(10): 1018–1021]
- ZHANG Y, DUAN Y F, DONG H B, *et al.* Effects of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on immune and digestive indicators in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. *South China Fisheries Science* 2017, 13(5): 78–84 [张月, 段亚飞,

- 董宏标, 等. 聚 β -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾肝胰腺免疫和消化指标的影响. 南方水产科学, 2017, 13(5): 78–84]
- ZHU M K, YAO C L. The impact of temperature stress on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 669–678 [朱孟凯, 姚翠鸾. 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的影响. 水产学报, 2015, 39(5): 669–678]
- ZHOU J, WANG L, XIN Y, *et al.* Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of Thermal Biology, 2010, 35(6): 284–289

(编辑 冯小花)

Expression Analysis of the *ddit4l* Gene in *Litopenaeus vannamei* Under Sudden and Gradual Change of Temperature

CHENG Lin^{1,3}, LI Xupeng^{2,3}, CAO Baoxiang^{2,3}, GAI Chaowei^{1,3},
LUAN Sheng^{2,3}, KONG Jie^{2,3}, MENG Xianhong^{2,3}^①

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University Shanghai 201306, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Temperature is an important environmental factor that affects the growth, development, and metabolism of shrimp. High temperatures tend to cause a decrease in the immunity and production performance of shrimp, resulting in a significant increase in shrimp disease and mortality. Based on transcriptome sequencing data, we screened for the involvement of DNA damage-inducible transcript 4 like (*ddit4l*) in the temperature stress process of *Litopenaeus vannamei*. *Ddit4l* (also known as *Redd2* and *Rtp801L*) is involved in regulating cell survival, proliferation, and apoptosis by affecting DNA damage repair factors, hypoxia-inducible factors, and other signaling pathways when stimulated by DNA damage, hypoxia, ischemia, and oxidative stress, among others. *Ddit4l* may be an important transducer of pathological stress in autophagy through mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. Autophagy is a process in which cells use lysosomes to degrade their own damaged organelles and macromolecules, and the process plays an important role in maintaining the balance of protein metabolism and the stability of the intracellular environment, promoting cell growth and development. An important regulator of autophagy is the mTOR, which responds to various stimuli, such as growth factors, cellular energy status, oxygen concentrations, and stress, to regulate cell metabolism and growth. *Ddit4l* and its homolog *ddit4* are upstream mTOR inhibitors in several tissues and cell models. We set up sudden temperature change and gradual temperature change experiments to induce a stress response in *L. vannamei*. In the gradual change experiment, the water temperature was increased from 26°C to 38°C at a rate of 4°C per day, and cooled back to 26°C at the same rate. Two individuals were randomly selected from each of the three parallel experiments in the experimental group at each time point. The eyestalk, gill, hepatopancreas, nerve, and muscle were used for subsequent RNA extraction and gene expression quantification. RNA quality and concentration were also examined. The partial *ddit4l* cDNA (complete ORF and partial UTR) of *L. vannamei* was obtained directly by PCR amplification to evaluate the structure and function of the *Lv-ddit4l* gene. The *Lv-ddit4l* sequence contained a 495 bp open reading frame, encoding 164 amino acids,

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

with a molecular weight of 18.51 kDa, and an isoelectric point of 5.35. The instability index was 65.83, which classifies the protein as unstable. Lv-*ddit4l* contains a highly conserved RTP801-C domain. BLAST alignment and phylogenetic tree analysis showed that the Lv-*ddit4l* gene had 59.76% similarity with the *Chionoecetes opilio ddit4l* gene, and first clustered with *C. opilio*. A real-time RT-PCR confirmatory experiment considered three parallel groups for each sample with 18S rRNA as the reference gene. Relative gene expression was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Quantitative analysis of gene expression levels showed that Lv-*ddit4l* was widely expressed in all of the examined tissues, with similar expression levels at 26°C. When the temperature was increased gradually from 26°C to 32°C, the Lv-*ddit4l* gene in the eyestalk was significantly increased ($P<0.05$), and was 10.37 times higher than that in the control (A-26°C). Therefore, this gene is hypothesized to respond to temperature changes in the eyestalk of *L. vannamei*. The expression of Lv-*ddit4l* in the eyestalk, gills, hepatopancreas, nerves, and muscles did not change significantly when the water temperature was gradually increased to the highest temperature of 38°C; it is speculated that this gene may play a role in pre-heat stress. When the temperature was gradually cooled from 38°C to 32°C, the expression of Lv-*ddit4l* increased significantly in the gill and hepatopancreas ($P<0.05$), which were respectively 3.37 and 2.03 times higher than that of the control group (A-26°C). There was no significant difference in gene expression under different levels of gradual changes in temperature stress in the nerve and muscle. The expression in the gill, hepatopancreas, and nerve was significantly up-regulated ($P<0.05$) at a sudden change in water temperature to 36°C for 10 min, and the change in expression in the hepatopancreas was 24.06 times higher than that in the control group (A-26°C). Gene expression in the gills and nerves was 1.22-fold and 3.67-fold higher than that in the control (A-26°C), respectively. When the water temperature was increased to 36°C suddenly for 24 h, Lv-*ddit4l* gene expression increased significantly in the muscle ($P<0.05$). Lv-*ddit4l* showed significant up-regulation of expression in the gill, hepatopancreas, nerve, and muscle with sudden changes in temperature, suggesting that this gene may play a role in the stress induced by sudden increases in temperature. When the temperature was restored from 38°C and 36°C to 26°C, the expression of the Lv-*ddit4l* gene was downregulated in *L. vannamei*. The above results indicate that Lv-*ddit4l* is associated with the response to high-temperature stress.

Key words *Litopenaeus vannamei*; High temperature stress; Lv-*ddit4l*; Gene expression

DOI: 10.19663/j.2095-9869.20210930002

http://www.yykxjz.cn/

吴丽娜, 吴彪, 刘志鸿, 于涛, 孙秀俊, 周丽青, 郑言鑫, 王振原. 低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 98-106

WU L N, WU B, LIU Z H, YU T, SUN X J, ZHOU L Q, ZHENG Y X, WANG Z Y. Effects of hypoxic preconditioning on the physiological and biochemical characteristics of *Scapharca broughtonii* under hypoxia stress. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 98-106

低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下 生理生化指标的影响*



吴丽娜^{1,2,3} 吴彪^{2,3①} 刘志鸿^{2,3} 于涛⁴
孙秀俊^{2,3} 周丽青^{2,3} 郑言鑫⁴ 王振原^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 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 山东 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 山东 青岛 266071; 4. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 山东 烟台 265800)

摘要 本研究以未进行低氧预适应的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)为对照组(C组), 分析了2次低氧预适应(H₂组)和4次低氧预适应(H₄组)的魁蚶在溶解氧(DO)约为2.0 mg/L低氧胁迫48 h内的摄食、呼吸代谢和酶活力的变化规律。结果显示, 3组魁蚶的摄食率(IR)在胁迫初期急剧下降, 后期均随时间的延长逐渐恢复, 至48 h时, H组恢复程度显著高于C组($P < 0.05$); C组、H₂组和H₄组魁蚶的耗氧率(OR)随时间变化呈逐渐升高的趋势, 48 h比0 h分别提高了1.15、1.08、0.73倍; 3组排氮率(NR)表现出不同的变化趋势, 至48 h时, C组、H₂组和H₄组分别为0 h的1.67、1.30、0.97倍; C组的氧氮比(O/N)相对平稳, H组的变化范围相对较大。3组的细胞色素C氧化酶(COX)随着低氧胁迫时间的延长呈逐渐降低的趋势, 乳酸脱氢酶(LDH)活力和还原型谷胱甘肽酶(GSH)含量整体呈上升趋势, 与对照组相比, 预低氧组的酶活力在低氧胁迫期间变化相对平稳, 应激反应小。研究表明, 魁蚶经低氧预适应后再次受到低氧胁迫时, IR升高, OR降低, 酶活性相对稳定, 低氧预适应能提高魁蚶的耐低氧能力。本研究丰富了魁蚶低氧耐受相关研究的基础数据, 为进一步探讨魁蚶低氧耐受机制和创制耐低氧新种质提供了参考资料。

关键词 魁蚶; 低氧预适应; 低氧胁迫; 生理生化指标

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0098-09

溶解氧(DO)是水生生物赖以生存的必要条件之一, 影响其生长存活、繁殖、发育等生理过程。水体中DO含量常随环境变化发生波动, 近年来, 随着全球环境变化和人类活动的影响, 水体低氧现象频发,

给水产养殖产业造成严重影响。研究表明, 鱼类、甲壳类、贝类、棘皮类等许多水产养殖动物的暴发性死亡均与低氧环境相关(Wilhelm *et al.*, 2005; 周作强等, 2013; 刘国山等, 2014; 孙盛明等, 2020)。当DO浓度 < 2 mg/L

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900304-4)和山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020706)共同资助。

吴丽娜, E-mail: 905261379@qq.com

① 通信作者: 吴彪, 研究员, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-11-11

时,水生生物即处于低氧环境,其活动行为、呼吸和能量代谢、生理生化等会因低氧胁迫发生一系列复杂的改变,甚至死亡(Wannamaker *et al.*, 2000; 徐贺等, 2016; 宋银都等, 2021; 吴碧银等, 2022)。当虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)受到低氧环境刺激时,会紧闭双壳,适应一段时间后,双壳慢慢打开,在 DO 浓度 ≤ 2 mg/L 时,随着胁迫时间的延长,会出现外套膜萎缩、鳃丝黏连等现象,导致死亡率显著升高(夏玉莹等, 2021);当 DO 浓度 < 2 mg/L 时,厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)可能仅以蛋白质代谢提供能量,当 DO 浓度 < 1 mg/L 时,厚壳贻贝无法再维持正常的代谢水平,会通过关闭贝壳、降低滤水率来减少摄食活动的能量消耗,维持机体的基础能量代谢水平(江天棋等, 2021)。在低氧胁迫下,酶活力的研究多集中在呼吸代谢酶以及抗氧化酶。呼吸代谢酶包括琥珀酸脱氢酶(SDH)、细胞色素 C 氧化酶(COX)、乳酸脱氢酶(LDH)等,其活性的变化是代谢能力变化的直接反映;抗氧化酶的研究多为能在保护细胞免受氧化应激中发挥重要作用的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等(王盼等, 2021)。

低氧预适应(hypoxic preconditioning)是指机体受到多次短暂、非致死性的低氧刺激后产生内源性保护机制,适度的低氧胁迫训练可以降低动物机体对低氧或缺氧的应激反应,对机体组织产生保护作用,进而提高机体耐受能力(张世纪等, 2021)。目前,低氧预适应的研究多集中在对小鼠(*Mus musculus*)等高等动物的研究,低氧预适应可有效提高小鼠有氧运动能力及心肌丙二醛(MDA)水平,而且对长期低氧暴露的小鼠心肌损伤有一定的保护作用(孔海军等, 2020);还可以通过激活 BDNF/TrkB 信号通路对小鼠产生神经保护作用(吴晓东等, 2019)。低氧预适应在水产中的报道相对较少,主要集中于鱼类、虾类和蟹类的低氧-复氧对机体生理生化指标的影响方面。Volodymyr 等(2001)研究发现,低氧胁迫能够使金鱼(*Carassius auratus*)通过抗氧化系统调节机体获得一定的适应性,进而构成一种生化保护机制,使得复氧后的金鱼低氧应激最小。在贝类中,除了头足类可以利用较强的游泳能力躲避低氧环境外,移动能力差的种类只能通过机体调节来适应低氧环境的胁迫(陈峰等, 2021)。因此,探讨低氧预适应对贝类机体生理生化特性、组织等方面的影响,对贝类耐低氧研究、耐低氧新品种培育等方面的工作均具有重要意义。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、血贝、大毛蛤,是具有较高经济价值的大型蚶科贝类,因个体

大,富含蛋白质、维生素、血红素等物质,在中国、韩国、日本等市场上深受欢迎(吴彪等, 2010; 赵庆等, 2019; 周建聪等, 2021)。目前,魁蚶已成为我国北方贝类苗种繁育、池塘养殖的重要种类之一,但低氧仍是魁蚶面临的一个重要胁迫。当自然海水中 DO 浓度 < 2.5 mg/L 时,魁蚶即会出现大量死亡(Senbokuya *et al.*, 2019)。赵庆等(2018)、张高伟等(2019)分别研究了低氧胁迫下魁蚶的存活、酶活变化以及 *HIF-1 α* 基因的变化特征,发现魁蚶对于短暂的低氧胁迫具有较强的耐受能力。然而,经过低氧预适应的魁蚶再次受低氧胁迫后,其机体在生理生化指标的变化特征有待研究。本研究对低氧预适应魁蚶的摄食率(ingestion rate, IR)、耗氧率(oxygen rate, OR)、排氨率(ammonia excretion rate, NR)、酶活等生理生化指标进行比较分析,以期对魁蚶低氧适应机制研究提供资料,同时为产业中提高魁蚶耐低氧能力策略的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验魁蚶于 2021 年 4 月取自山东东营养殖池塘,选择壳形完整的健康个体用于实验,壳长为 (38.13 ± 1.13) mm。实验前,魁蚶于温度为 (17.6 ± 1.0) °C 的充气过滤海水中暂养 7 d,实验期间,每 24 h 换 1/2 体积海水,并投喂小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)。

1.2 低氧预适应魁蚶模型的建立及实验组设置

魁蚶低氧预适应模型建立:将纯度为 99.9%的 N_2 通入养殖槽的海水中,通过调整充气量,将海水 DO 浓度维持在 (2.5 ± 0.3) mg/L。将魁蚶置于此环境中 24 h 后转移至常氧[DO 浓度为 (7.5 ± 0.3) mg/L]海水中恢复 48 h,此为低氧预适应 1 次的魁蚶模型。

实验共设置 3 组:未进行低氧预适应的为对照组(C 组),低氧预适应 2 次为 H_2 组,低氧预适应 4 次为 H_4 组,每组设置 3 个平行。魁蚶低氧预适应模型建立后,测定低氧胁迫(DO 约为 2.0 mg/L) C 组、 H_2 组和 H_4 组 3 组魁蚶在 0、8、16、24 和 48 h 时的 IR、OR、NR 以及酶活力,分析其变化特征。

1.3 摄食实验

摄食实验在直径为 10.5 cm、高为 12.0 cm 的养殖桶中进行。低氧预处理后,分别从 C 组、 H_2 组和 H_4 组中随机取 3 只魁蚶置于盛有海水(DO 约为 2.0 mg/L)的养殖桶中,10 min 后向桶内投入球等鞭金藻

(*Isochrysis galbana*)(终浓度为 65×10^4 cells/L), 最终海水体积为 1 L, 摄食时间为 2 h。摄食结束后, 利用血球计数板测定实验前后水体中球等鞭金藻的密度, 同时, 取魁蚶软体部于 60°C 烘干 48 h 至恒重, 称重。每组设置 3 个平行, 不加魁蚶的为空白组。参照薛素燕等(2020)的方法:

$$\text{IR} = V(C_0 - C_t) / (N \times t \times W)$$

式中, V 为实验海水体积, C_0 和 C_t 分别为实验开始和结束时的饵料浓度, N 为实验魁蚶数量, t 为实验时间(h), W 为软组织干重(g)。

1.4 呼吸实验

实验前停食 24 h, 从 C 组、 H_2 组和 H_4 组中随机取 3 只魁蚶放入盛有 3 L 海水的呼吸瓶中, 放入魁蚶 10 min 后为实验起始时间, 实验持续 2 h。分别采用碘量法和次溴酸钠氧化法测定实验前后海水中的 DO 和氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$), 计算 OR 和 NR。每组设 3 个平行, 不加魁蚶的为空白组。实验结束后, 同 1.3 方法获取魁蚶软体部干重。OR、NR 以及氧氮比(O/N)计算参照薛素燕等(2020)的方法。

$$\text{OR} = (D_0 - D_t) \times V / (W \times t)$$

式中, D_0 和 D_t 为实验空白对照组和实验组水中 DO 的含量(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

$$\text{NR} = [(N_t - N_0) \times V] / (1000 \times W \times t)$$

式中, N_0 和 N_t 为实验空白对照组和实验组水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浓度(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

$$\text{O/N} = (\text{OR}/16) / (\text{NR}/14)$$

式中, O/N 为魁蚶 OR 和 NR 之间的比值; 16 为氧原子的摩尔质量(g/mol); 14 为氮原子的摩尔质量(g/mol)。

1.5 酶活力实验

分别于低氧胁迫 0、8、16、24 和 48 h 后各取 C 组、 H_2 组和 H_4 组的 3 个个体的鳃组织, 液氮冻存后放入 -80°C 冰箱保存, 用于后续酶活力的测定。按 1:9 质量体积比混合鳃组织和 0.9% NaCl 溶液, 于冰浴下匀浆, 离心后取上清液, 用于酶活力测定。酶活力单位以 U/mg prot 表示, 代表每毫克蛋白含有的酶活力单位数。测定方法参照试剂盒使用说明书, 蛋白质浓度测定试剂盒、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒均购于南京建成生物公司; 细胞色素 C 氧化酶(COX)试剂盒购于上海纪宁生物公司。

1.6 数据分析

使用 SPSS 统计软件进行数据分析, 结果使用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用 GraphPad Prism 软件作图, 采用单因素方差分析(one-way, ANOVA)比较不同数据之间的差异性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 摄食率的变化

C 组、 H_2 组、 H_4 组魁蚶受低氧胁迫不同时间的 IR 见图 1。从图 1 可以看出, 3 组魁蚶受到低氧胁迫后, 其 IR 的变化趋势基本一致, 总体上呈先下降后恢复的变化过程。C 组、 H_2 组、 H_4 组魁蚶的 IR 均在受低氧胁迫 8 h 最低, 分别为 0 h 的 39.51%、36.31% 和 45.96%; 16 和 24 h 时, 3 组魁蚶 IR 都逐渐提高; 至 48 h 时, C 组和 H_2 组与 24 h 相比有所回落, 但未达到显著水平($P > 0.05$), 而 H_4 组则继续升高; 但在实验取样时间点内, 3 组魁蚶的 IR 都没有恢复到低氧胁迫处理前的水平。在多数的取样点, H_2 组和 H_4 组的 IR 比 C 组更高, 且其恢复程度也普遍高于 C 组, 说明低氧预适应提高了魁蚶的 IR。

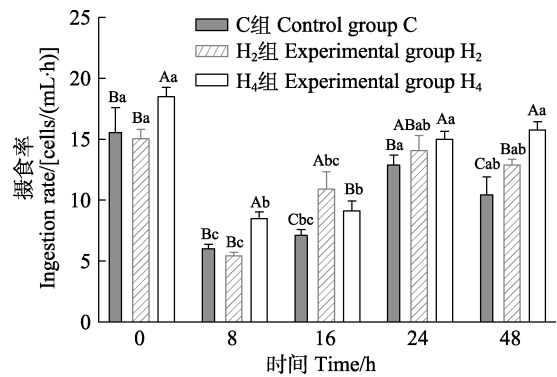


图 1 低氧预适应对魁蚶 IR 的影响

Fig.1 Effects of hypoxic preconditioning on the IR of *S. broughtonii*

不同大写字母表示同一时间不同实验组间的差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示同一实验组不同时间的差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different uppercase letters represent significant differences between different groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters represent significant differences of the same group at different time ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 耗氧率和排氨率的变化

在低氧胁迫阶段, C 组、 H_2 组、 H_4 组 OR 变化趋势见图 2a。从图 2a 可以看出, C 组和 H_2 组的魁蚶

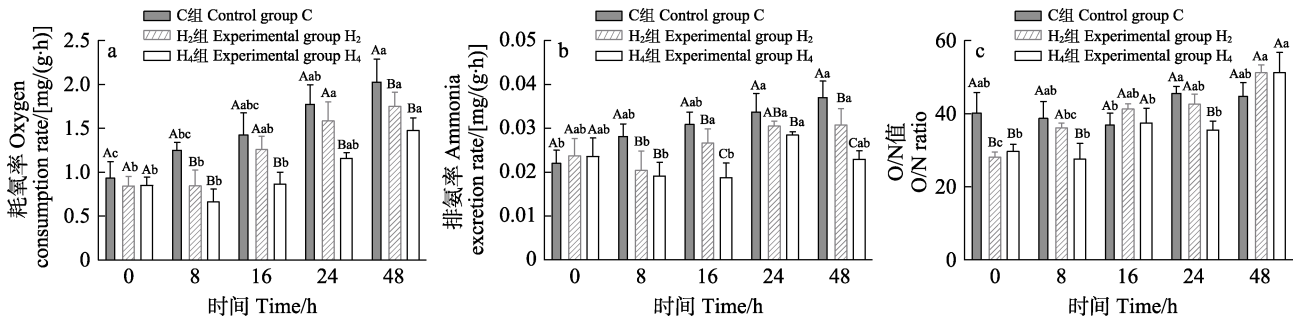


图2 低氧预适应对魁蚶 OR、NR 和 O/N 值的影响

Fig.2 Effects of hypoxic preconditioning on the OR, NR and O/N of *S. broughtonii*

受低氧胁迫后,其 OR 均表现出逐渐升高的趋势,而 H₄ 组受低氧胁迫 8 h 时呈先下降而后逐渐升高的趋势;3 组魁蚶在低氧胁迫 48 h 时达到最大值,分别为 (2.04±0.22)、(1.75±0.18)和(1.48±0.09) mg/(g·h)。低氧胁迫 0~16 h 时,3 组的 OR 相对平稳,未达到显著水平($P>0.05$)。48 h 时,H₂ 组、H₄ 组的 OR 与 C 组相比升高趋势较小,与低氧胁迫 0 h 时相比分别提高了 1.15、1.08、0.73 倍。在低氧胁迫后的各时间点,3 组魁蚶的 OR 呈相同的趋势,即 C 组>H₂ 组>H₄ 组。在 8 和 48 h 时,C 组和 H₂ 组 OR 相比差异显著($P<0.05$),H₂ 组和 H₄ 组 OR 相比无显著差异($P>0.05$);16 和 24 h 时,C 组和 H₂ 组 OR 相比差异不显著($P>0.05$),而 H₂ 组显著高于 H₄ 组。结果表明,低氧预适应降低了魁蚶在受低氧胁迫时的 OR。

3 组魁蚶受低氧胁迫后,NR 的变化特征见图 2b。从图 2b 可以看出,C 组受低氧胁迫后,其 NR 的变化规律呈逐步升高的趋势,至 48 h 时,其 NR 是 0 h 的 1.67 倍,而 H₂ 组表现出先下降再升高的趋势,H₄ 组则呈先下降再升高再降低的趋势;至 48 h 时,H₂ 组和 H₄ 组的 NR 分别为 0 h 的 1.30 倍和 0.97 倍;在各取样时间点,H₂ 组和 H₄ 组魁蚶的 NR 均低于 C 组,其中,除 24 h 时,H₂ 组与 C 组差异未达到显著水平外,其余时间其差异均达到显著水平($P<0.05$);与 H₂ 组相比,H₄ 组在 16 和 48 h 均显著低于 H₂ 组($P<0.05$),8 和 24 h 时也低于 H₂ 组,但两组相比差异不显著($P>0.05$)。这说明经过低氧预适应后的魁蚶,再次受到低氧胁迫时其 NR 有所降低。

O/N 值是体现生物对环境适应程度以及确定适宜条件的重要指标之一,与环境对机体的压力密切相关。低氧胁迫 48 h 内,C 组、H₂ 组、H₄ 组的 O/N 值范围在 27.61~51.28 之间(图 2c)。C 组的 O/N 值在低氧胁迫期间变化平稳,最小值为 16 h 的 37.34,最大值为 24 h 的 46.02,只有这 2 个时间点具有显著差异($P<0.05$),其他时间点均无显著差异($P>0.05$);与 C

组相比,H 组的变化范围相对较大,基本表现出随胁迫时间延长而升高的趋势,H₂ 组和 H₄ 组的 O/N 最小值分别在 0 和 8 h,为 28.17 和 27.61,最大值均在 48 h,分别为 51.28 和 51.30。

2.3 低氧预适应对魁蚶酶活力的影响

C 组、H₂ 组、H₄ 组的 COX、LDH 酶活力和 GSH 含量变化趋势见图 3。从图 3 可以看出,在低氧条件下,3 组魁蚶的酶活力均随着胁迫时间的延长发生了变化,其中,COX 活力呈逐渐降低的趋势,GSH 含量逐渐升高;而 LDH 活力在胁迫初期极低,8 h 时酶活力突增。

从图 3a 可以看出,3 组魁蚶的 COX 活力呈逐渐降低的趋势,最大值均出现在胁迫初期的 0 h,至受低氧胁迫 48 h 时最低,分别为 0 h 的 18.96%、26.52% 和 41.58%。在各取样点内,C 组的 COX 活力均<H 组,且在 16 h 后,C 组与 H₄ 组 COX 活力相比差异显著($P<0.05$)。H₂ 组除 0 h 外,在其余取样点的 COX 活力均<H₄ 组,且在 16 h 后,H₂ 组 COX 活力显著<H₄ 组($P<0.05$)。48 h 内,3 组魁蚶的 COX 活力的变化趋势为 C 组>H₂ 组>H₄ 组。

LDH 活力变化见图 3b。从图 3b 可以看出,0 h 时,3 组魁蚶的 LDH 活力显著低于其他时间点($P<0.05$),低氧胁迫 8 h,3 组 LDH 活力突然升高。C 组 LDH 活力除 24 h 时略有下降,整体呈逐渐升高的趋势,且 48 h 时达到最大值,此时 LDH 活力为 0 h 的 12.17 倍。H 组的最大值出现在 16 h,其中,H₂ 组 LDH 活力在 16 h 后趋于稳定,变化范围极小;H₄ 组 LDH 活力在 16 h 后逐渐下降并低于 H₂ 组,且在 48 h 时与 H₂ 组相比差异显著($P<0.05$)。到 48 h 时,H₂ 组与 H₄ 组的 LDH 活力分别为 0 h 的 8.25 倍和 6.34 倍。

3 组魁蚶低氧胁迫后,GSH 含量的变化趋势见图 3c。从图 3c 可以看出,总体表现出逐渐升高的变化过程。H 组的 GSH 含量在各取样点内均高于 C 组;H₄ 组的 GSH

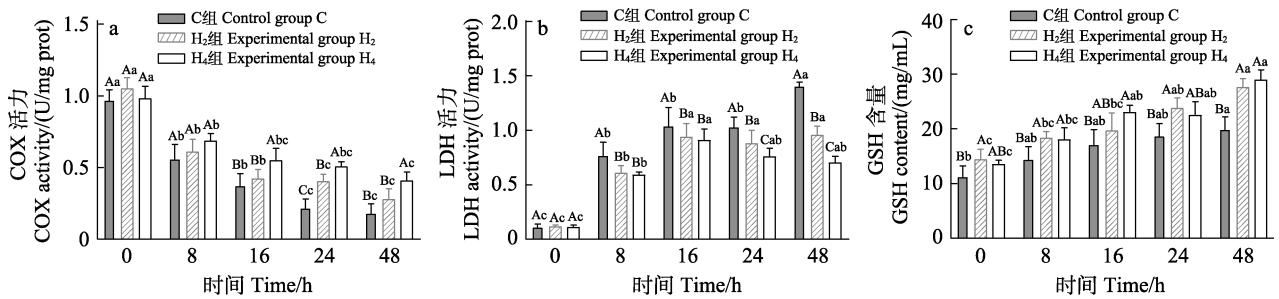


图3 低氧预适应对低氧胁迫下魁蚶酶活力的影响

Fig.3 Effects of hypoxic preconditioning on activity of *S. broughtonii* under hypoxia stress

含量在 16 h 和 48 h 时高于 H₂ 组。低氧胁迫进行到 48 h 时,为各组的最大值。此时,C 组、H₂ 组和 H₄ 组的 GSH 含量分别为 0 h 的 1.76、1.92 和 2.15 倍。48 h 内,3 组魁蚶的 GSH 含量变化趋势为 H₄ 组 > H₂ 组 > C 组。

3 讨论与结论

低氧是一种严重的环境胁迫(夏丹阳等, 2020),水生生物的生存和生长发育均与水体中的 DO 息息相关。水体中 DO 含量只有空气的 3%,相比之下,水生生物对 O₂ 的利用率比陆地生物更重要(Rytkonen *et al.*, 2007)。动物可以通过进行一系列训练来对自身机体进行调节,继而适应环境带来的胁迫。刘云(2009)通过对瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)幼鱼进行 14 d 力竭性追赶训练,发现该训练能显著提高黄颡鱼幼鱼的游泳能力。适当强度的运动训练对紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)鱼体内的抗氧化能力和免疫水平有提高作用,其酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、溶菌酶(LZY)等在训练后与未训练组相比均差异显著(范雯等, 2020)。而关于低氧预适应相关的研究在水产动物的研究中较少见。本研究首次对魁蚶进行低氧预适应训练,训练过程中的 DO 浓度为(2.5±0.3) mg/L,预低氧次数分别为 0、2 和 4 次,结果表明,进行预低氧 4 次的魁蚶其耐低氧能力更强。

在胁迫初期,3 组魁蚶的 IR 均显著下降,这可能是魁蚶对外界环境的骤变而做出的应激反应。随着低氧胁迫时间的延长,魁蚶对胁迫环境逐渐产生了一定的适应性,3 组魁蚶的 IR 均有所回升;胁迫后期,随着对低氧的进一步适应,魁蚶壳口张开并主动摄食以获取食物来维持机体行使功能。另外,动物可以通过相关训练来调节自身摄食能力,马壮等(2019)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼进行游泳训练,发现适当训练可以一定程度上提高鱼体的摄食能力。本研究中,经过低氧预适应的魁蚶在低氧胁迫后期,其 IR 明显高于未进行预适应的魁蚶,且恢复能力更高,这

说明低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下的摄食能力具有积极促进作用,增强了魁蚶对低氧胁迫的适应性,且预适应 4 次的魁蚶 IR 更高,适应性更强。

代谢活动反映的是贝类在一定生理水平下的特定状态,在胁迫条件下,因应激反应需要消耗更多的能量来维持内环境的稳态,从而影响贝类的摄食、代谢及免疫等功能(魏伟, 2016)。美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)长期固着于潮间带的礁石上,涨潮期与低潮期的交替造成美洲牡蛎间断性地暴露于空气中形成 O₂ 差,类似于多次“训练”,这可能驯化出了牡蛎更强的低氧耐受能力(Greenway *et al.*, 2000)。本研究中,3 组魁蚶在低氧胁迫下,OR 和 NR 都有显著变化。随着低氧胁迫时间的延长,各组魁蚶的 OR 逐渐升高,对 O₂ 需求增大,其中,对照组 OR 升高趋势尤为明显。预适应组与对照组的 NR 也表现出显著差异(P < 0.05),其变化趋势与 OR 一致。预适应组经过低氧训练后,呼吸代谢变化较为平稳,且低氧预适应 4 次比低氧预适应 2 次更为稳定,表现出对低氧胁迫更强的适应性。

O/N 值是研究水产动物生长代谢的一个重要参数,其大小表示该生物体内蛋白质、脂肪和碳水化合物分解代谢的比率(周建聪等, 2021)。O/N 值 < 7 时,生物体内的能量完全由蛋白质提供;O/N 值约为 7~24 时,生物体所需要的能量由蛋白质和脂肪提供;当供能物质主要为碳水化合物或脂肪时,O/N 值将会无穷大(Conover *et al.*, 1968; Mayzald *et al.*, 1976; Ikeda, 1974)。本研究中,3 组魁蚶在低氧胁迫下,O/N 平均值为 39.5, H₄ 组在 8 h 的 O/N 值最小,为 27.61,此时的 O/N 值大于由蛋白质和脂肪提供生物体所需要能量的 O/N 值,说明本研究中的魁蚶耗能主要由碳水化合物和脂肪提供,48 h 的低氧胁迫在魁蚶的承受范围之内,表明魁蚶的耐低氧能力较强。

当水生生物受到低氧胁迫后,机体会产生过量的活性氧(ROS),并产生超氧自由基(O₂⁻),同时,机体也会启动抗氧化防御体系来清除 O₂ 以减少氧化损

伤, 酶活力是体现机体生理状态的重要指标。其中, COX 活性是评价不同组织有氧呼吸产生能量的重要指标(Hu *et al.*, 2018); LDH 活力是生物体内参加无氧代谢的关键酶(杨明等, 2019); GSH 含量在维持细胞生理功能方面起到重要作用。本研究中, 低氧胁迫使魁蚶的生理生化指标发生改变, 整体趋势表现为 COX 活力逐渐降低, LDH 活力逐渐升高, GSH 含量逐渐升高, 表明魁蚶的有氧呼吸能力逐渐降低, 无氧呼吸能力逐渐升高。从 COX 与 LDH 活力实验可以看出, 相对低氧预适应组, 对照组的酶活力变化趋势明显, 存在更强烈的应激反应; 经过低氧预适应, 机体酶活力变化趋势相对较小, 同时, 与呼吸代谢趋势一致, 低氧预适应 4 次比预适应 2 次变化小, 表明低氧预适应降低了机体内一些酶的应激反应。GSH 含量作为维持细胞生理功能的重要酶, 随着低氧胁迫时间延长, 实验组 GSH 含量显著高于对照组($P < 0.05$), 体现出更强的维持机体稳定的能力。王定康等(2021)研究表明, 经过高盐预适应的鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)在高盐胁迫下的存活率、pH、酶活力及多种游离氨基酸含量显著提高, 与本研究结果相似, 表明生物机体抗性在预适应后可以得到提高。

本研究分析了低氧预适应对魁蚶的 IR、呼吸代谢和酶活力等生理生化指标的影响, 发现预适应可有效提高魁蚶在低氧胁迫时机体的反应能力, 研究结果丰富了低氧适应相关的研究资料, 为探讨魁蚶逆境适应机制提供了数据。

参 考 文 献

- CHEN F, LI N, FANG Z, *et al.* Habitat distribution change pattern of *Uroteuthis edulis* during spring and summer in the coastal waters of Zhejiang Province. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(5): 847–855 [陈峰, 李楠, 方舟, 等. 浙江近岸海域春夏季剑尖枪乌贼栖息地分布变化规律. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(5): 847–855]
- CONOVER R J, CORNER E D S. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *Marine Biology*, 1968, 48: 49–75
- FAN W, LIU Y, WEI X L, *et al.* Effects of exercise intensity and time on the serology of juvenile *Lutjanus argentimaculatus*. *Marine Fisheries*, 2020, 42(5): 618–633 [范雯, 刘永, 魏小岚, 等. 不同运动强度和训练时间对紫红笛鲷幼鱼血清生理生化指标的影响. *海洋渔业*, 2020, 42(5): 618–633]
- GREENWAY S C, STOREY K B. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *Journal of Comparative Physiology*, 2000, 170(4): 285–293
- HU Y C, CHUNG M H, LEE T H. An assay of optimal cytochrome c oxidase activity in fish gills. *Analytical Biochemistry*, 2018, 38: 553
- IKEDA T. Nutrition ecology of marine zooplankton. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1974, 22:1–97
- JIANG T Q, ZHANG Y, JIANG Y Z, *et al.* Shell valve opening behavior and metabolism of *Mytilus coruscus* under different oxygen concentrations. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1329–1336 [江天祺, 张扬, 姜亚洲, 等. 不同溶解氧水平下厚壳贻贝的贝壳开放行为和呼吸代谢. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1329–1333]
- KONG H J, LI Z Y, ZHOU X, *et al.* Hypoxic preconditioning alleviates myocardial injury in hypoxic-exhaustive exercise mice by regulating PKA/CREB and AK1/STAT3 signaling pathway. *Space Medicine and Medical Engineering*, 2020, 33(6): 484–490 [孔海军, 李赵越, 周霞, 等. 低氧预处理通过调控 PKA/CREB 及 JAK1/STAT3 信号通路减轻低氧暴露力竭运动小鼠心肌损伤. *航天医学与医学工程*, 2020, 33(6): 484–490]
- LIU G S, CAI X Y, TONG F, *et al.* Investigation of massive death of sea cucumber in artificial reef zone of Shuangdao Bay, Weihai. *Fishery Information and Strategy*, 2014, 29(2): 122–129 [刘国山, 蔡星媛, 佟飞, 等. 威海双岛湾人工鱼礁区刺参大面积死亡原因初探. *渔业信息与战略*, 2014, 29(2): 122–129]
- LIU Y. Effects of exercise intensity and time on the serology of juvenile *Lutjanus argentimaculatus*. Master's Thesis of Chongqing Normal University, 2009 [刘云. 力竭性追赶训练和停训对瓦氏黄颡鱼幼鱼游泳能力的影响. 重庆师范大学硕士研究生学位论文, 2009]
- MA Z, XI Y, ZHANG Z P, *et al.* Effects of swimming training on the growth, feeding, respiratory excretion and non-specific immunity of juvenile larvae. *Chinese Fisheries Association: Marine Pasture Research Association of Chinese Fisheries Association*, 2019, 1 [马壮, 席杨, 张泽鹏, 等. 游泳训练对牙鲆幼鱼生长、摄食、呼吸排泄及非特异性免疫的影响. *中国水产学会. 第三届现代海洋(淡水)牧场学术研讨会摘要集. 中国水产学会: 中国水产学会海洋牧场研究会*, 2019, 1]
- MAYZALLD P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton IV: The influence of starvation on the metabolism and biochemical composition of some species. *Marine Biology*, 1976, 37: 47–58
- RYTKONEN K T, VUORI K A M, PRIMMER C R, *et al.* Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(2): 177–186
- SENBOKUYA K, KOBAYASHI S, OOKI N, *et al.* Impact of nighttime hypoxia on ark shell *Scapharca broughtonii* mortality on a semi-enclosed embayment seabed. *Fisheries*

- Science, 2019, 85(2): 369–377
- SONG Y D, ZENG M D, ZHOU H T, *et al.* Effects of respiratory metabolism and related gene expression in *Siniperca chuatsi* under different dissolved oxygen levels. *Fisheries Science*, 2021, 37(5): 1–8 [宋银都, 曾萌冬, 周昊天, 等. 不同溶解氧水平对鳊呼吸代谢酶及其基因表达量的影响. *水产科学*, 2021, 37(5): 1–8]
- SUN S M, ZHU M R, PAN F Y, *et al.* Research progress on the effects of hypoxia stress on crustacean and its molecular regulation. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 690–704 [孙盛明, 祝孟茹, 潘方艳, 等. 低氧对甲壳动物的影响及其分子调控研究进展. *水产学报*, 2020, 44(4): 690–704]
- VOLODYMYR, LUDMYLA P, ALICE A, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative*, 2001, 280: 100–107
- WANG D K, ZHANG L, ZOU J P, *et al.* Effect of salt preadaptation on high salinity stress resistance of *Zygosaccharomyces rouxi*. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(3): 73–79 [王定康, 张良, 邹江鹏, 等. 盐预适应对鲁氏酵母菌高盐胁迫抗性的影响. *食品科学技术学报*, 2021, 39(3): 73–79]
- WANG P, SHI W J, WAN X H, *et al.* Effects of hypoxia and reoxygenation on respiratory metabolism enzyme and antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 106–115 [王盼, 史文军, 万夕和, 等. 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 106–115]
- WANNAMAKER C M, RICK J A. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the south eastern United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 249(2): 145–163
- WEI W. Study on feeding and metabolism of *Meretrix meretrix* under environmental stress. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [魏伟. 环境胁迫对文蛤摄食和代谢的影响研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- WILHELM D, FILHOA M. A, TORRESA E, *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 2005, 244(1/2/3/4): 349–357
- WU B Y, XU J, CAO D C, *et al.* Genome-wide association analysis of hypoxia adaptation traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 1–10 [吴碧银, 许建, 曹顶臣, 等. 鲤低氧适应性状的全基因组关联分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 1–10]
- WU B, YANG A G, LIU Z H, *et al.* The relationship between morphometric traits and body weight of *Scapharca broughtonii* in two different populations. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 54–59 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 54–59]
- WU X D, YANG J, JIA X E, *et al.* The expression and function of BDNF and its receptor TrkB in hypoxic preconditioned mice. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2019, 29(1): 47–53 [吴晓东, 杨锦, 贾小娥, 等. BDNF 及其受体 TrkB 在低氧预适应小鼠中的表达变化和作用. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 47–53]
- XIA D Y. The relationship between metabolic characteristics and swimming performance, hypoxia tolerance and growth performance in common carp. Master's Thesis of Southwest University, 2020 [夏丹阳. 鲤的代谢特征与游泳能力、低氧耐受及生长性能的关联. 西南大学硕士研究生学位论文, 2020]
- XIA Y Y, ZHANG J H, LIU Y, *et al.* Behavioral characteristics and physiological responses to hypoxic stress in *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1319–1328 [夏玉莹, 张继红, 刘毅, 等. 低氧胁迫下虾夷扇贝的行为特征及生理生化响应. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1319–1328]
- XU H, CHEN X M, WANG G Q, *et al.* Research progress of hypoxia on aquaculture. *Feed Industry*, 2016, 37(2): 33–37 [徐贺, 陈秀梅, 王桂芹, 等. 低氧胁迫在水产养殖中的研究进展. *饲料工业*, 2016, 37(2): 33–37]
- XUE S Y, LI J Q, LI Y, *et al.* Effects of short-term acidification on feeding, respiratory metabolism, and energy budget of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 127–133 [薛素燕, 李加琦, 李阳, 等. 短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢及能量收支的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 127–133]
- YANG M, SUN S M, FU H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 493–503 [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 493–503]
- ZHANG G W, WU B, LIU Z H, *et al.* Structural characteristics of *HIF-1 α* from *Scapharca broughtonii* and expression analysis under hypoxia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 646–656 [张高伟, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶 *HIF-1 α* 基因结构特征及对低氧胁迫的响应. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 646–656]
- ZHANG S J, FU W, XIE Y B, *et al.* Advances in DNA methylation regulating BDNF and TrkB receptor under hypoxic preconditioning. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2021, 37(5): 951–955 [张世纪, 付翁, 谢雅彬, 等. 低氧预适应下 DNA 甲基化调控 BDNF 和 TrkB 受体的研究进展. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(5): 951–955]
- ZHAO Q, WU B, LIU Z H, *et al.* Cloning and expression analysis of hemoglobin gene I of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 84–91 [赵庆, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)血红蛋白 I 基因克隆及表达特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 84–91]

ZHAO Q. Molecular cloning and functional analysis of hemoglobin genes from ark shell *Scapharca broughtonii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [赵庆. 魁蚶血红蛋白基因的克隆及功能分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]

ZHOU J C, CAI L, YANG J R, *et al.* Effects of temperature and ammonia on oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Cherax quadricarinatus* with different sizes. Progress

in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 1–9 [周建聪, 蔡利, 杨静茹, 等. 温度和氨氮对不同规格红螯螯虾耗氧率与排氮率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 1–9]

ZHOU Z Q, DING Q Q, LIU Q G, *et al.* Stresses of hypoxia and its effects on immune system of bivalve. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 324–330 [周作强, 丁晴晴, 刘其根, 等. 缺氧对贝类的胁迫效应及其免疫系统的影响. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 324–330]

(编辑 陈 严)

Effects of Hypoxic Preconditioning on the Physiological and Biochemical Characteristics of *Scapharca broughtonii* under Hypoxia Stress

WU Li'na^{1,2,3}, WU Biao^{2,3}①, LIU Zhihong^{2,3}, YU Tao⁴, SUN Xiujun^{2,3},
ZHOU Liqing^{2,3}, ZHENG Yanxin⁴, WANG Zhenyuan^{1,2,3}

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306, China; 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, Shandong 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract Dissolved oxygen (DO) is one of essential factor for the survival of aquatic organisms, affecting many physiological processes including growth, survival, reproduction and development. Due to the change of global environment and the influence of human activities, hypoxia often occurs in both natural and cultured water bodies. Studies showed that water is in a hypoxic state when DO is lower than 2 mg/L, and aquatic animals in this condition may often suffer from hypoxic stress. The blood clam *Scapharca broughtonii* is an important economic bivalve because of its delicious taste and rich protein, vitamins and hemoglobin. At present, the *S. broughtonii* has become an important species in Northern China, and the better economic benefit of breeding drives the rapid development of seedling production and culture. However, hypoxia often threatens the cultivation of *S. broughtonii*. Hypoxic preconditioning refers to the endogenous protective mechanism generated after the body is stimulated by multiple transient and non-fatal hypoxic stimuli, which can protect the body tissues and improve the tolerance of the body. To explore the effects of hypoxic preconditioning on the physiological and biochemical characteristics of *S. broughtonii* under hypoxia stress, the clams were divided into three groups containing H₂ (hypoxic preconditioning for two times), H₄ (hypoxic preconditioning for four times) and C (no hypoxic preconditioning, as control group). And then, we analyzed the feeding rate (IR), energy metabolism and three enzymes activity of three groups during the process of hypoxia stress for 48 hours with DO concentration of ~2.0 mg/L. The first item we explored was changes in feeding rates. During hypoxia stress, the IR of the three groups showed a tendency of decreasing first and then increasing. At the late stage of stress, the feeding rate of the three groups recovered to some extent, and the recovery degree of groups H₄ and H₂ were better than that of group C. The energy metabolism we studied contains the oxygen consumption rate (OR) and the ammonia excretion rate (NR). The results showed that the OR

① Corresponding author: WU Biao, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

of the three groups increased gradually under hypoxia stress and reached the maximum value at 48 h after treatment. The OR of group C, H₂ and H₄ increased by 1.15, 1.08 and 0.73 times, respectively, after 48 hours of treatment. The trends in NR were that the NR in group C gradually increased during treatment, while that in group H reduced first followed by increasing and then decreased. The NR of group C, H₂ and H₄ showed different trends during the stress period which were 1.67, 1.30 and 0.97 times of 0 h at 48 h, respectively. And the ratio of oxygen to nitrogen in group C was relatively stable, while that in group H was relatively wide. The following are the experimental results of enzyme activity changes, which include cytochrome c oxidase (COX), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione (GSH). The COX of the three groups decreased gradually with the extension of hypoxia stress time. LDH activity and GSH enzyme content all showed an upward tendency. Compared with the control group C, the enzyme activity of the pre-hypoxic group H₂ and H₄ were relatively stable during the hypoxic stress. In total, the results showed that *S. broughtonii* pretreated with hypoxia had higher feeding rate, lower oxygen consumption rate and relatively stable enzyme activity compared with the control group, which revealed hypoxia pretreatment could improve its ability of hypoxia tolerance. It showed that hypoxia preconditioning had a more positive effect on the hypoxia tolerance of *S. broughtonii*. In this study, the effects of hypoxic preconditioning on physiological and biochemical of *S. broughtonii* under hypoxia stress including feeding rate, respiratory metabolism and enzyme activity were studied for the first time. It was found that hypoxic training could effectively improve the body's response to hypoxic stress, enriching the research data related to hypoxic adaptation, and providing data for exploring the stress adaptation mechanism of *S. broughtonii*.

Key words *Scapharca broughtonii*; Hypoxic preconditioning; Hypoxia stress; Physiological and biochemical characteristics

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211228003

http://www.yykxjz.cn/

畅孟阳, 李彬, 荣小军, 王锦锦, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 张正, 范瑞用, 刘清兵. 刺参响应灿烂弧菌感染差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 107-117

CHANG M Y, LI B, RONG X J, WANG J J, YU Y X, WANG Y G, LIAO M J, ZHANG Z, FAN R Y, LIU Q B. Identification of differential expression microRNAs and target genes analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to *Vibrio splendidus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 107-117

刺参响应灿烂弧菌感染 差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析*



畅孟阳^{1,2} 李彬^{2,3} 荣小军^{2,3} 王锦锦^{2,3} 于永翔^{2,3} 王印庚^{2,3}
廖梅杰^{2,3①} 张正^{2,3} 范瑞用⁴ 刘清兵⁴

(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
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 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 山东 青岛 266071;

4. 青岛瑞滋集团有限公司 山东 青岛 266409)

摘要 microRNA 参与基因的转录后调控, 在真核生物的生长发育、细胞分化和免疫防御等过程中发挥重要作用。刺参(*Apostichopus japonicus*)病害问题已成为产业发展的主要限制因素之一, 而其病害发生的分子机制尚待进一步完善。本研究以刺参重大疾病“腐皮综合征”的重要致病原灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)为感染菌株, 通过人工感染实验制备患病刺参样本, 采用 miRNA-seq 技术对感染组(PT16S)和对照组(PT10H)各 3 头刺参的体壁组织进行 miRNA 测序, 通过相关生物信息学软件对 miRNAs 进行鉴定和分析, 筛选差异表达 miRNAs (DEmiRNAs)并预测其靶基因, 构建关键调控途径的 miRNA-mRNA 调控网络。结果显示, PT10H 组平均得到 5 902 588 条有效序列, 194 个已知 miRNA 和 19 个新的 miRNA; PT16S 组平均得到 5 053 529 条有效序列, 182 个已知 miRNA 和 42 个新的 miRNA。对 2 组鉴定到的 miRNA 进行差异表达分析, 共筛选到 2 个上调和 11 个下调的具有显著差异的 DEmiRNAs ($P \leq 0.05$), 上调的 DEmiRNAs 靶基因预测结合到 3010 个靶基因, 注释到 585 个 GO terms 及 24 条信号通路($P \leq 0.05$), 下调的 DEmiRNAs 靶基因预测到 19 072 个靶基因, 注释到 514 个 GO terms 以及 22 条信号通路($P \leq 0.05$)。对筛选到的 DEmiRNAs 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)验证, 显示 miRNA-seq 与 qRT-PCR 的一致率达到 70%。根据 KEGG 分析结果构建泛素介导的蛋白水解途径和 Notch 信号通路的 miRNA-mRNA 调控网络, 结果显示, 13 个 DEmiRNAs 分别靶向结合 134 个与泛素介导的蛋白水解相关的 mRNAs 和 109 个与 Notch 信号通路相关的 mRNAs, Aja-miR-184、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277p 等 DEmiRNAs 可能参与对 Notch 信号通路和对泛素介导的蛋白水解的调控。相关研究结果将为刺参疾病发生调控网络建立和机制解析提供依据。

关键词 刺参; microRNA; 灿烂弧菌; 胁迫应答; 靶基因; miRNA-mRNA 调控网络

中图分类号 S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0107-11

* 国家重点研发计划(2018YFD0900305)、山东省农业良种工程课题(2020LZGC015)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 2021GH05)共同资助。畅孟阳, E-mail: chang1007644237@foxmail.com

① 通信作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-28, 收修改稿日期: 2022-01-19

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又称刺参,是我国第五次海水养殖浪潮的代表性经济物种之一,年产量近20万t。然而,随着养殖产业的迅猛发展,养殖过程中出现的病害频发、养殖成活率降低等一系列问题已经成为限制刺参产业可持续发展的主要瓶颈。解析刺参的抗病机制对于指导良种选育和健康养殖具有重要意义。课题组前期完成的刺参重要疾病的流行病学和病原学研究结果表明,刺参腐皮综合征是刺参养殖中最主要的疾病种类,灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)是该疾病的主要致病原之一(张春云等,2006)。因此,解析刺参响应灿烂弧菌侵染的分子机制可为揭示刺参抗病机制提供重要参考。

microRNA(miRNA)是一类内源性的、进化上高度保守的非编码小RNA单链分子,它作为转录后水平的关键调控因子,通过与靶基因3'端非翻译区(UTR)结合而抑制靶基因的翻译或降解靶基因,在调控真核生物的生长发育、细胞分化和免疫防御等生命活动中发挥了重要作用(Krol *et al.*, 2010)。近年来,水生生物miRNA的鉴定及其对靶基因的调控作用机制逐渐成为水产养殖研究的热点之一。研究表明,miRNA可以参与鱼、虾、蟹、贝、参等水生生物的免疫调控过程(Zhang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Boonchuen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018)。Li等(2012)利用miRNA-seq技术筛选出刺参体腔细胞响应灿烂弧菌的差异表达miRNA,但目前缺乏关于腐皮综合征发病的靶器官——体壁组织miRNA及其调控网络等相关机制的研究报道。因此,本研究以刺参体壁组织为研究对象,采用miRNA-seq技术对健康刺参和灿烂弧菌侵染后患病刺参的体壁组织进行测序,通过生物信息学软件筛选DEmiRNAs并进行验证,构建关键免疫相关通路上miRNA-mRNA的调控网络,以期解析刺参抗病网络调控机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用苗种取自山东青岛瑞滋集团有限公司培育的1龄刺参苗种。本研究选取活力良好、健康无异的刺参苗种,苗种规格为(50.0±2.0)g/只。实验用刺参苗种运回实验室后暂养3d,暂养水温为(13.0±0.5)℃,待苗种状态稳定后用于后续实验。

侵染菌株为本团队水生动物病原库中保存的分离自患腐皮综合征刺参体壁组织的灿烂弧菌菌株(AJ-Vb1801)。对该菌株用胰蛋白胨大豆肉汤固体培养基(TSB固体培养基)复苏,然后用TSB液体培养基

扩大培养。

1.2 实验样品的采集

灿烂弧菌人工侵染与取样:根据实验目的将实验分为2个组,每组设置3个平行,每个平行组中刺参苗种数量为30头,实验水槽容积为30L。对照组(PT10H)刺参苗种使用取自水质良好的自然海域的海水进行健康养殖,侵染组(PT16S)按照水体体积在水槽中投放制备好的灿烂弧菌菌悬液至浓度为 1×10^6 CFU/mL(该浓度为灿烂弧菌对刺参苗种的LD₅₀)。2组实验在温度为(13.0±0.5)℃、盐度为(28.0±0.5)的条件下进行养殖,每天换1/3水,换水后及时添加制备好的灿烂弧菌菌悬液,使其维持在 1×10^6 CFU/mL,每天投喂刺参配合饲料,投喂量为刺参苗种体重的2%,养殖期间保持溶氧充足。实验期间,每天观察刺参苗种的生理状态,及时收集并记录侵染组发生化皮的患病个体。实验开始7d后,分别从侵染组的患病个体和对照组的健康个体中随机挑取3头刺参,剖取刺参样品的体壁组织,置于2mL冻存管后迅速置于液氮中保藏并送回实验室,在-80℃超低温冰箱中保存,用于每个个体组织样品RNA的提取。对照组样品的编号分别为PT10H1、PT10H2和PT10H3,侵染组的编号分别为PT16S1、PT16S2和PT16S3。

1.3 总RNA提取及质量检测

以PT10H组和PT16S组的刺参体壁组织为材料,采用QIAGEN RNeasy mini kit(74106)提取所采集样品的总RNA,以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,用NanoDrop核酸测定仪测定所提取核酸样品的纯度,检测合格的样品(浓度≥200 ng/μL; RIN≥8.0; 28S/18S≥1.5)于-80℃保存备用。

1.4 miRNA文库的建立

对于所提取的总RNA样本,采用15% PAGE进行miRNA(18~30 nt)分离,分离后的miRNA经乙醇沉淀离心富集,然后利用TruSeq Small RNA Sample Preparation kit(Illumina, RS-200-0048)的方法及流程进行文库制备。文库构建完成后,先使用Qubit 2.0进行初步定量,稀释至1 ng/μL,随后使用Agilent 2100对文库的insert size进行检测,使用Bio-Rad CFX 96荧光定量PCR仪和Bio-Rad iQ SYBR Green进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR),对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol/L)。检测合格后,将所构建的文库利用HiSeq2500测序平台进行单端测序(SE50),得到50 bp的序列reads。HiSeq深度测序由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.5 miRNA 测序数据处理

原始数据经过质控处理后得到 clean reads, 去除 3' 接头, 并进行长度筛选, 保留碱基长度在 18~26 nt 的序列。再将剩余序列分别与 mRNA 数据库、Rfam 数据库(包含 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等)和 Rепbase 数据库进行比对和过滤, 最后获得的数据即有效数据, 用于后续 miRNA 数据分析。

1.6 miRNA 鉴定和靶基因预测分析

使用 Bowtie 2 (2.2.3)将高质量的 valid reads 映射到本团队前期测序所得刺参基因组(组装完成, 待发表), 鉴定出相关 miRNA。miRNA 的差异表达分析使用 edgeR 软件, 筛选标准是基因表达差异倍数 >2 且 $FDR \leq 0.05$ 为差异显著的基因(DEmiRNA)。

使用 TargetScan (Nam *et al*, 2014)、miRanda (Betel *et al*, 2008)软件对 DEmiRNA 分别进行靶基因预测。对 2 款软件预测出的靶基因分别按照每款软件的评分标准进行筛选。TargetScan 算法中去除 context score percentile < 50 的靶基因, miRanda 算法中去除最大自由能(max energy) > -10 的靶基因。最后取 2 款软件的交集作为 DEmiRNA 的靶基因。

1.7 DEmiRNAs 靶基因 GO 富集与 KEGG 通路分析

利用 GOseq R 软件包进行 DEmiRNAs 靶基因的 GO (gene ontology)富集分析($P < 0.05$)。利用 KOBAS

软件对差异基因进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>)信号通路富集分析。

1.8 qRT-PCR 验证差异表达 DEmiRNA 表达量

根据上述实验结果, 随机选择 9 个 DEmiRNA 序列, 并用加尾法设计引物(表 1)。参照 Mir-XmiRNA first-strand synthesis 试剂盒(TR201)说明书, 将测序所用样本的总 RNA 反转录为 cDNA。得到的 cDNA 保存于 -20°C , 用于后续荧光定量实验。qRT-PCR 扩增体系为(20 μL): 10 μL 2 \times miRNA qRT-PCR master mix (TaKaRa), 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , cDNA 2 μL , RNase-free water 定容至 20 μL 。以 U6 作为 qRT-PCR 的内参基因, 每个样本 3 个重复, 同时设置不加模板的阴性对照。采取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算所选 DEmiRNAs 的相对表达量。用 3 个重复实验的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)来表示 DEmiRNA 的相对表达值。最后通过 GraphPad 6 软件对 DEmiRNA 的 qRT-PCR 结果和 miRNA-seq 结果进行绘图。

1.9 关键免疫途径的 miRNA-mRNA 调控网络构建

根据 DEmiRNAs 与 mRNAs 的靶向结合关系, 利用联川生物在线分析软件(<https://www.omicstudio.cn/tool/56>)构建基于 KEGG 分析得到的关键免疫途径的 miRNA-mRNA 调控网络。

表 1 用于 DEmiRNA 表达验证的 qRT-PCR 引物
Tab.1 qRT-PCR primers used for validation of selected DEmiRNA

基因名称 Gene ID	基因序列 Gene sequence	引物序列 Primer sequence (5'~3')
Aja-miR-9277	CGAATCCTGCCGACTACGCCA	CGAATCCTGCCGACTACGC
Aja-miR-2478	ATCCCACTTCTGACACCA	CGCATCCCACTTCTGACACCA
Aja-miR-184	TGGACGGAGAAGTATAAGGGCTTT	CCGACCCTGTTGAGCTTGACTC
Novel-217	TGGACCAGGAGTACTATTACG	TGGACGGAGAAGTATAAGGGCTTT
Aja-miR-1559-3p	GTAGTCGTGGCCGAGTGG	GTAGTCGTGGCCGAGTGG
Aja-miR-7550-5p	TTCCGGCTCGAAGGACCA	TTCCGGCTCGAAGGACCA
Aja-miR-11980-5p	AGGGAACGGGCTTGGCAGA	AGGGAACGGGCTTGGCA
Aja-miR-9277-3p	ATCCTGCCGACTACGCCA	ATCCTGCCGACTACGCCA
Aja-miR-940-5p	CCAGGAGTGGAGCCTGCG	CCAGGAGTGGAGCCTGC
Aja-miR-1559-5p	GTAGTCGTGGCCGAGTGA	CGTAGTCGTGGCCGAGTGA
U6 Reverse		TGGAACGCTTACGAATTTGCG
U6 Forward		GGAACGATACAGAGAAGATTAGC

2 结果

2.1 刺参体壁样品 miRNA 测序数据结果

PT10H 和 PT16S 组刺参体壁样品的 miRNA-seq

分别平均产生 11 929 100 和 10 107 557 条原始序列, 过滤后得到的平均有效序列分别为 5 902 588 和 5 053 529 条, 说明本研究的测序数据质量良好。与 miRbase 数据库比对结果显示, PT10H 比对到 194 个已知 miRNA 和 19 个新的 miRNA, PT16S 组比对到

182 个已知 miRNA 和 42 个新的 miRNA (表 2)。对 PT10H 和 PT16S 组内各生物学重复之间的 Pearson 相

关性系数分析结果显示,组内样品的相关性系数均在 0.95 以上,说明各样品的重复性良好(图 1)。

表 2 刺参体壁样品 miRNA-seq 数据概况
Tab.2 Overview of miRNA-seq data of body wall samples from *A. japonicus*

样品 Sample	原始序列数 Number of raw reads	有效序列数(占比) Number of valid reads (Proportion)	已知的 miRNA 数 Number of known miRNA	新的 miRNA 数 Number of novel miRNA
PT10H1	12 903 436	6 739 101 (52.23%)	176	16
PT10H2	9 406 056	4 125 702 (43.86%)	172	14
PT10H3	13 477 809	6 842 961 (50.77%)	185	17
PT16S1	9 342 684	3 968 310 (42.48%)	158	36
PT16S2	12 798 085	6 639 205 (51.88%)	173	15
PT16S3	8 181 902	4 553 071 (55.65%)	117	12

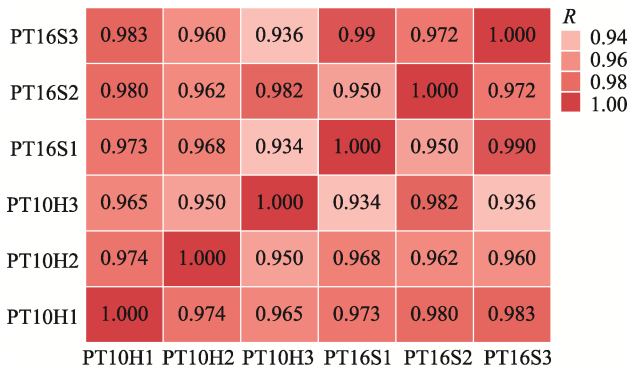


图 1 miRNA 测序结果的各样品间不同生物学重复的 Pearson 相关性分析
Fig.1 Pearson correlations between all the different biological repeats based on the miRNA-seq

2.2 刺参体壁样品 DEmiRNAs 的鉴定与筛选

用 Bowtie 2.2.3 软件将长度筛选后的 RNA 定位

到刺参基因组参考序列上,将定位成功的序列与 Rfam database 数据库进行比对,除去 tRNAs、rRNAs、snRNA、snoRNAs 和重复序列。利用 miRDeep2 软件共鉴定出 PT10H 与 PT16S 之间的差异表达 miRNAs ($P \leq 1$) 299 个,其中包括 Aja-miR-2012、Aja-miR-92a 和 Aja-miR-286 在内的 127 个 miRNAs 上调表达, Aja-miR-2007 和 Aja-miR-9277 在内的 172 个 miRNAs 下调表达。进一步筛选出 PT10H 与 PT16S 之间显著性差异表达的 miRNAs (DEmiRNAs) 13 个,其中上调和下调 DEmiRNAs 的数量分别为 2 个和 11 个(表 3)。筛选出的 13 个 DEmiRNAs 中包含 1 个新的 miRNA (Novel-217)和 12 个已知 miRNAs。根据 13 个显著差异的 DEmiRNAs 在 6 个样品间的表达量构建聚类分析图(图 2),结果显示, Novel-217 和 Aja-miR-184 上调表达幅度较大, Aja-miR-1559-5p、Aja-miR-940-5p 和 Aja-miR-1559-3p 下调幅度较大。

表 3 PT10H 与 PT16S 间差异表达 miRNAs 信息统计
Tab.3 Information of differentially expressed miRNAs between PT10H and PT16S

miRNA 名称 miRNA name	PT10H 组表达量 Expression level of PT10H	PT16S 组表达量 Expression level of PT16S	差异倍数 $\log_2(\text{fold change})$	上调/下调 up/down
Novel-217	1 576.386	4 750.085	1.591	上调 up
Aja-miR-184	1 863.378	3 355.773	0.848	上调 up
Aja-miR-1559-3p	252.878	79.939	-1.661	下调 down
Aja-miR-7550-5p	351.362	153.732	-1.192	下调 down
Aja-miR-2478	624.861	316.081	-0.983	下调 down
Aja-miR-9277-3p	275.360	46.813	-2.556	下调 down
Aja-miR-9001-5p	13.894	3.715	-1.902	下调 down
Aja-miR-9277	28.066	4.044	-2.794	下调 down
Aja-miR-1260	1 785.472	343.361	-2.378	下调 down
Aja-miR-9277-5p	3.834	0.694	-2.466	下调 down
Aja-miR-11980-5p	35.768	5.357	-2.739	下调 down
Aja-miR-1559-5p	8.765	0	-4.266	下调 down
Aja-miR-940-5p	5.081	0	-3.016	下调 down

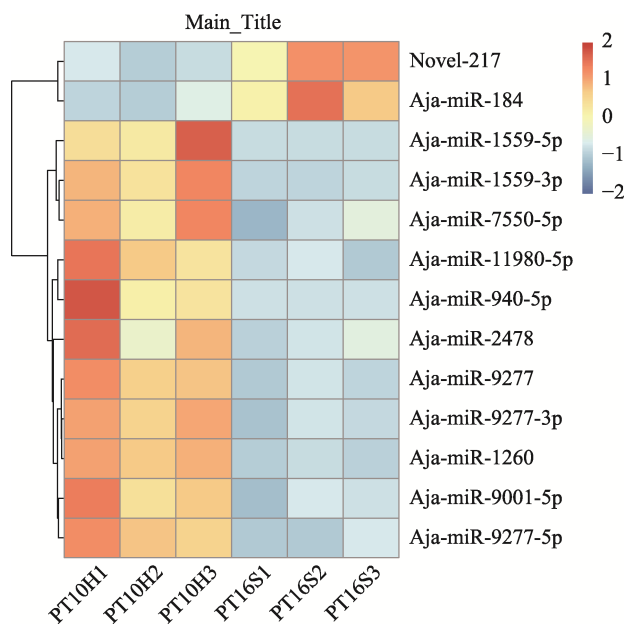


图 2 PT10H 与 PT16S 间差异表达 miRNAs 聚类分析热图
Fig.2 Cluster analysis heatmap of differentially expressed miRNAs between PT10H and PT16S

2.3 DEmiRNA 靶基因预测与功能分析

采用 TargetScan 和 miRanda 软件对上述 13 个 DEmiRNAs 进行靶基因预测, 共预测出 22 082 个靶基因。其中, 上调的 DEmiRNA 共 3010 个靶基因, 下调的 DEmiRNA 共 19 072 个靶基因。

GO 数据库注释结果显示, 上调 DEmiRNAs 的 2119 个靶基因共注释到了 585 个 GO terms ($P \leq 0.05$), 包括生物进程 368 个 terms, 细胞成分 79 个 terms, 分子功能 138 个 terms。分别选取 3 个本体显著性排名前 10 的 GO terms 构建 GO 富集柱状图(图 3a), 结果显示, 富集到生物进程的 GO terms 主要包括多细胞生物发育(GO: 0007275)、肽酰酪氨酸去磷酸化(GO: 0035335)和细胞粘附(GO: 0007155); 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分(GO: 0016021)、核(GO: 0005634)和细胞膜(GO: 0016020); 富集到分子功能的 GO terms 主要包括 ATP 结合(GO: 0005524)、钙离子结合(GO: 0005509)和泛素蛋白转移酶活性(GO: 0004842)。下调 DEmiRNAs 的 8652 个靶基因共注释到 514 个 GO terms ($P \leq 0.05$), 包括生物进程 285 个 terms, 细胞成分 83 个 terms, 分子功能 146 个 terms。分别选取 3 个本体显著性排名前 10 的 GO terms 构建 GO 富集柱状图(图 3b)。结果显示, 富集到生物进程的 GO terms 主要包括多蛋白质磷酸化(GO: 0006468)、细胞内信号转导(GO: 0035556)和多细胞生物发育(GO: 0007275); 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分(GO: 0016021)、核(GO:

0005634)和质膜的组成部分(GO: 0005887); 富集到分子功能的 GO terms 主要包括 ATP 结合(GO: 0005524)、钙离子结合(GO: 0005509)和泛素蛋白转移酶活性(GO: 0004842)。

进一步对 DEmiRNAs 的靶基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示, 上调 DEmiRNAs 的 829 个靶基因注释到 24 条代谢通路($P \leq 0.05$), 其中富集基因数较多的是 ECM 受体相互作用(43 个)、泛素介导的蛋白水解(38 个)、FoxO 信号通路(26 个)、Notch 信号通路(26 个)、mRNA 监测通路(23 个)、粘着力(18 个)和 MAPK 信号通路(16 个)(图 4a)。下调 DEmiRNAs 的 3499 个靶基因注释到 22 条代谢通路($P \leq 0.05$), 其中, 富集基因数较多的是神经活性配体-受体相互作用(254 个)、嘌呤代谢(141 个)、泛素介导的蛋白水解(115 个)、溶酶体(115 个)、Notch 信号通路(99 个)和 FoxO 信号通路(66 个)(图 4b)。

2.4 DEmiRNAs 表达量的验证

为验证高通量测序数据的准确性, 从筛选到的 13 个 DEmiRNAs 中随机选取 10 个进行 qRT-PCR 验证。结果显示, 2 个上调 DEmiRNAs (Novel-217 和 Aja-miR-184)和 5 个下调 DEmiRNAs (Aja-miR-2478、Aja-miR-9277、Aja-miR-1559-3p、Aja-miR-7550-5p 和 Aja-miR-11980-5p)与测序数据中相应的 DEmiRNAs 的表达量变化趋势一致(图 5), 验证一致率达到 70%, 上述结果说明本研究的测序结果真实可靠。

2.5 miRNA-mRNA 基因共表达网络构建

根据 KEGG 富集分析结果, 使用联川生物在线分析软件对泛素介导的蛋白水解和 Notch 信号通路上的 DEmiRNAs 及其靶基因构建 miRNA-mRNA 基因共表达网络。结果显示, 13 个 DEmiRNAs 共靶向结合 115 个与细胞免疫中泛素介导的蛋白水解相关的 mRNAs (图 6a)。结合 mRNAs 较多的 DEmiRNA 为 Aja-miR-9277-5p、Aja-miR-9277-3p 和 Aja-miR-2478, 分别结合了 31、24 和 23 个 mRNAs。其中, *UBR5*、*UB2G1*、*UBE3C* 和 *XIAP* 作为关键基因靶向结合多个 DEmiRNAs, 可作为后续泛素介导的蛋白水解通路中的重点基因进行研究。共有 108 个与体液免疫中 Notch 信号通路相关的 mRNAs 被 13 个 DEmiRNAs 靶向结合(图 5b)。Aja-miR-9277、Aja-miR-9277-5p 和 Novel-217 靶向结合的 mRNAs 最多, 分别达到 36、34 和 32 个。其中, *NOTC1*、*SVEP1* 和 *FBP1* 作为关键基因靶向结合多个 DEmiRNAs, 可作为后续 Notch 信号通路中的重点基因进行研究。

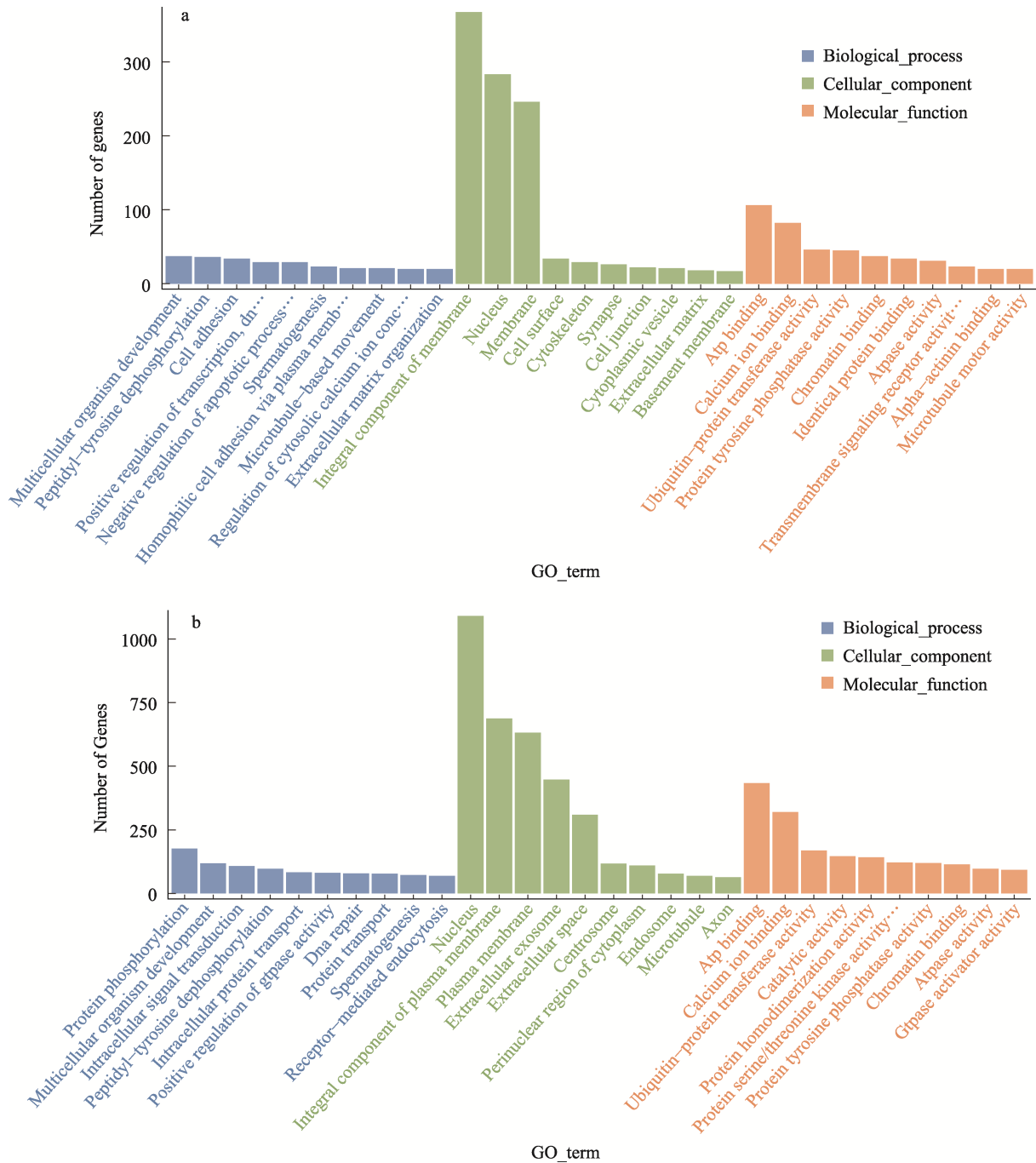


图 3 PT10H 与 PT16S 间 DE miRNAs 靶基因 GO 富集
Fig.3 GO categorization of the target genes of DE miRNAs between PT10H and PT16S

a: 上调 DE miRNAs 靶基因; b: 下调 DE miRNAs 靶基因
a: Target genes of up-regulated DE miRNAs; b: Target genes of down-regulated DE miRNAs

3 讨论

目前, 刺参腐皮综合征是对刺参养殖影响最大的疾病种类之一, 本团队前期研究结果显示, 灿烂弧菌是刺参腐皮综合征的重要致病原(张春云等, 2006)。虽然刺参腐皮综合征的致病原菌已被分离鉴定, 但刺参响应该病原侵染的相关分子机制尚不清晰。Li 等

(2012)运用 Illumina Hiseq2000 平台对健康和患腐皮综合征的刺参体腔细胞进行深度测序后, 在 2 个文库中找到了 40 个共同的保守 miRNA; 该研究还发现, miR-31 和 miR-2008 在 2 个刺参文库中呈显著差异表达。Li 等(2016)通过转染 miR-210 模拟物, 证明 miR-210 能够抑制刺参 *AjToll* 基因, 并且其 ROS 变化与 *AjToll* 基因的表达趋势一致, 这意味着 miR-210 在

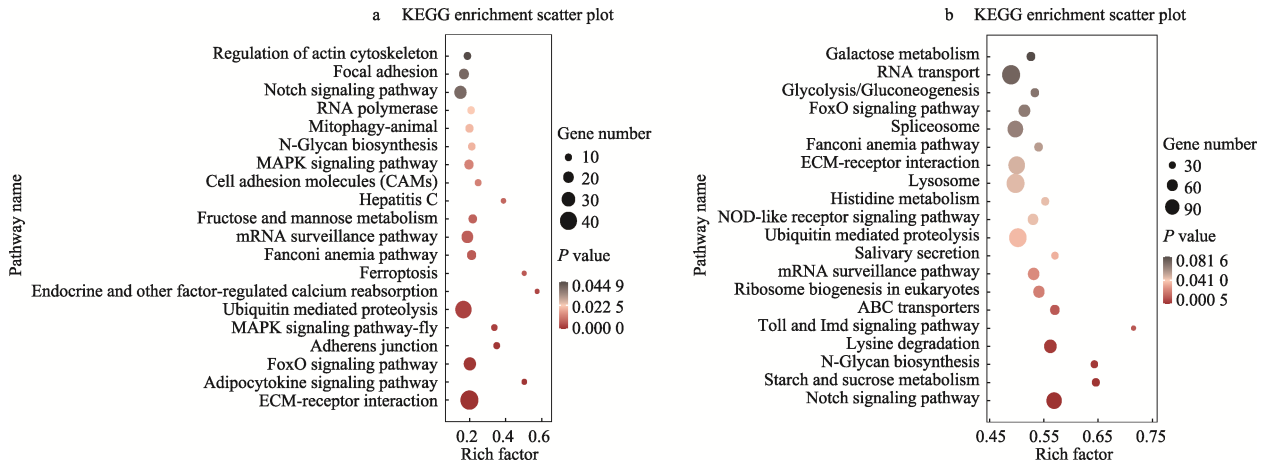


图 4 PT10H 与 PT16S 间 DEmiRNAs 靶基因 KEGG 富集图

Fig.4 KEGG pathway of the target genes of DEmiRNAs between PT10H and PT16S

a: 上调 DEmiRNAs 靶基因; b: 下调 DEmiRNA 靶基因

a: Target genes of up-regulated DEmiRNAs; b: Target genes of down-regulated DEmiRNAs

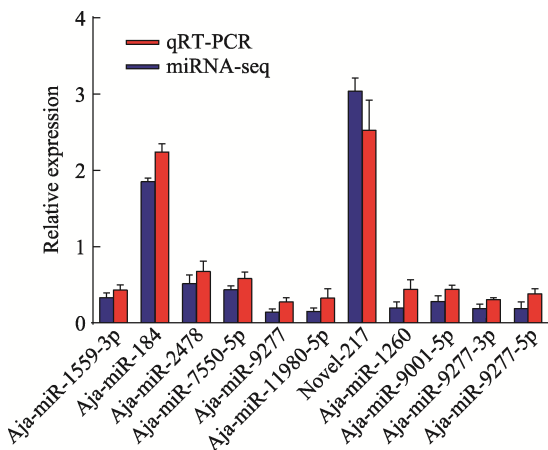


图 5 PT10H 与 PT16S 组间刺参体壁组织 DEmiRNAs 的 qRT-PCR 验证

Fig.5 qRT-PCR validation of DEmiRNAs in body wall of *A. japonicus* between PT10H and PT16S

一种新的免疫途径中起到了关键作用。Lv 等(2017)研究发现, miR-137 在刺参发病机制中具有调节免疫功能的作用。Lu 等(2015a)发现, miR-31 通过靶向作用于 *Ajp105* 来调节呼吸爆发。Shao 等(2017)研究证明, 在灿烂弧菌和刺参相互作用期间, miR-31 负向调节肿瘤坏死因子的表达, 使得半胱氨酸蛋白酶-3 和半胱氨酸蛋白酶-8 依赖性细胞凋亡。Lv 等(2015)通过转染 miR-200 的模拟物验证其靶基因 *AjTollip* 下游分子的表达情况, 表明 miR-200 能增强刺参体腔细胞的抗菌活性。Lu 等(2015b)通过转染 miR-133 模拟物和 si-*AjIRAK-1*, 表明 miR-133 参与刺参 TLR 联级调节, 并通过双荧光素酶报告基因实验确定了 miR-133 和 *AjIRAK-1* 的靶向关系。以上研究成果都是基于刺参体腔细胞测序, 进而对差异 miRNAs 的表

达及功能进行分析, 本研究以刺参患病的病灶组织作为研究对象, 通过高通量测序从转录组学角度筛选差异表达 miRNAs, 对其靶基因进行富集分析, 可为刺参与病原菌互作关系和发病机制解析提供新思路。

miRNAs 具有高度保守性、组织特异性和表达时序性。本研究通过生物信息学分析筛选到与免疫相关的 3 个 DEmiRNAs, 包括 Aja-miR-184、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277。在其他水产动物中, 梁金荣(2017)研究发现, 在经过副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肠道、心脏、肌肉等组织中 miR-184 的表达量显著升高, 并进一步证实 miR-184 可以通过增强对虾体内抗菌肽的合成参与宿主的免疫调控, 从而达到提高机体免疫活力的效果; Ou 等(2013)研究发现, 克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)的 miR-184 在受到蟹螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)刺激后表达量显著上调; Xu 等(2019)研究发现, 河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)在应对镉(Cd)诱导的氧化应激反应中 miR-184 显著上调。同源 miRNAs 在不同水产动物中可能发挥类似的调控作用。本研究发现, 刺参体壁在灿烂弧菌胁迫后 Aja-miR-184 表达量显著上调, 推测刺参通过上调 Aja-miR-184 的表达来激活相关免疫通路, 以应对灿烂弧菌的侵染。林锋(2018)从罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)野田村病毒(*Macrobrachium rosenbergii nodavirus*, MrNV)的致病性出发, 确定了 bta-miR-2478 参与罗氏沼虾体液免疫, 并可作为免疫增强剂在对虾野田村病毒的诊断和治疗上应用。林德麟(2017)在对牛乳清进行高通量测序后发现, miR-2478 在乳清中显著表达, 并靶向多种免疫球蛋白的合成。本研究

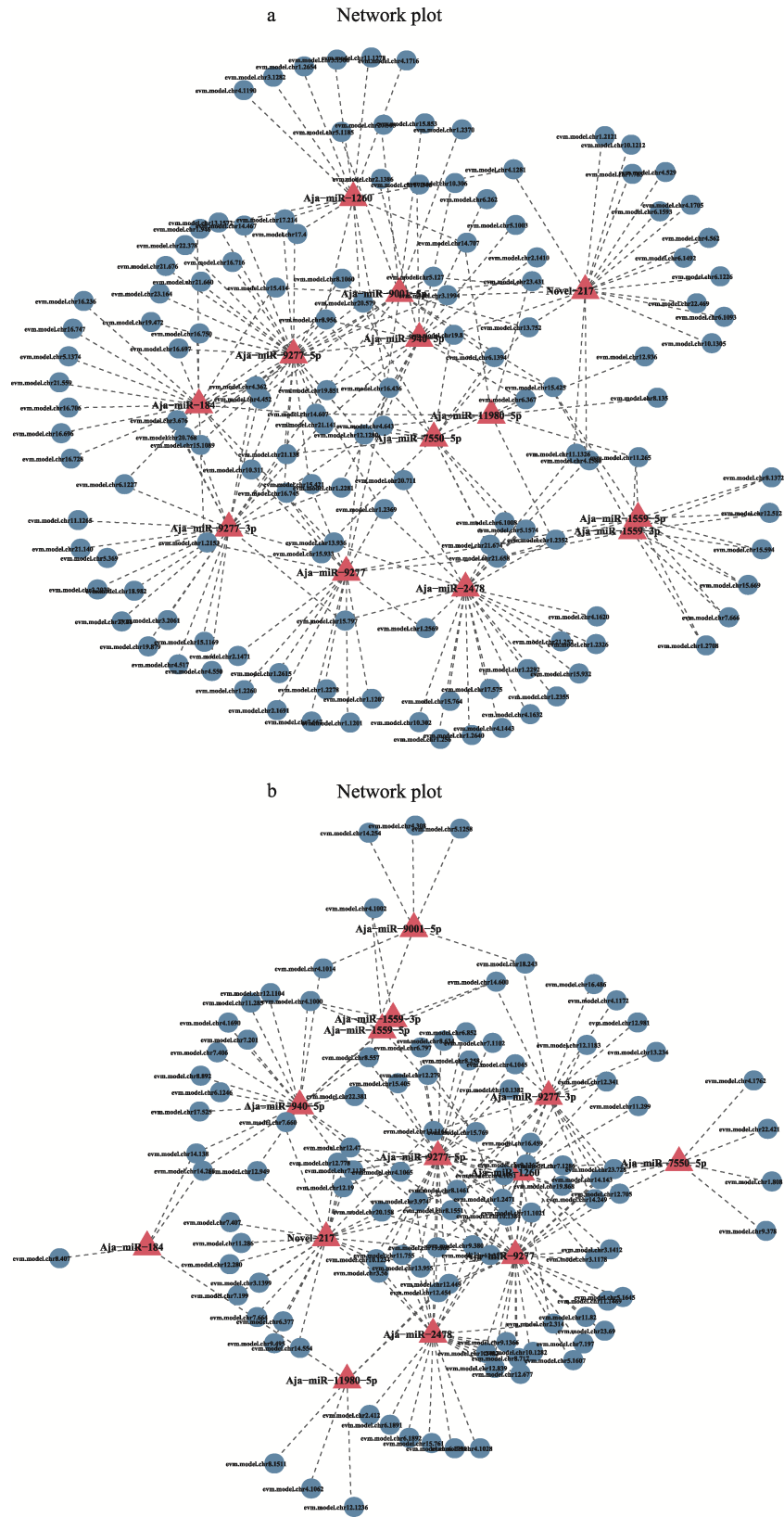


图 6 富集在刺参体壁免疫相关通路上的差异表达 miRNA-mRNA 的调控网络
 Fig.6 Regulation networks of miRNA-mRNA enriched in immune-related pathways in the body wall of *A. japonicus*
 a: 泛素介导蛋白水解; b: Notch 信号通路
 a: Ubiquitin-mediated proteolysis; b: Notch signaling pathway

发现, 刺参体壁的 Aja-miR-2478 在灿烂弧菌胁迫后显著下调, 表明 Aja-miR-2478 参与了刺参对灿烂弧菌的胁迫应答, 推测 Aja-miR-2478 通过下调其表达量以解除对部分免疫相关基因的限制, 从而增强刺参抵抗灿烂弧菌感染的能力。相关结果表明, 在水产动物中, Aja-miR-184 和 Aja-miR-2478 在响应细菌感染过程中有着相似的表达趋势。郭睿等(2019)研究发现, 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)幼虫经蜜蜂球囊菌(*Ascospaera apis*)胁迫后, 肠道中 miR-9277 显著上调表达, 其靶基因富集分析结果显示, miR-9277 主要参与了丝氨酸蛋白酶和泛素介导的蛋白水解的调控。本研究发现, 刺参体壁在灿烂弧菌胁迫后, Aja-miR-9277 显著下调表达, 并参与了促丝裂原活化蛋白激酶和泛素介导的蛋白水解的调控。然而, Aja-miR-9277 与意大利蜜蜂中的同源 miRNA 表达趋势相反, 推测同源 miRNAs 在不同物种中可能发挥不同的作用, 但这种差异产生的分子机制仍需进一步研究。

本研究中, 筛选到的上调 miRNA 数目及其靶基因的数目都显著低于下调 miRNA 及其靶基因的数目, 同时, 靶基因的 GO 富集显示, 靶基因主要富集在蛋白质磷酸化、膜的组成部分、泛素蛋白转移酶活性等 GO terms 上, 表明刺参体壁的新陈代谢和细胞生命活动在受到灿烂弧菌胁迫后受到了一定程度的抑制。FOXO 信号通路可以直接参与黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)胰岛素调控脂肪代谢的合成(卓梅琴, 2018), 其下游的靶基因 *FOXO1* 对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)的生长发育起着重要的调控作用(谢淑媚, 2018)。Toll 和 IMD 信号通路在调控抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)的表达中占主导地位(Vallet-Gely *et al*, 2008; Aggarwal *et al*, 2008)。真菌和革兰氏阳性菌的感染会激活 Toll 信号通路, 从而调控一系列抗菌肽的表达; 革兰氏阴性菌和病毒的感染会激活 IMD 信号通路, 从而参与调控多种抗菌肽的表达(Lan *et al*, 2013)。促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号转导系统, 对细胞生长、分化、凋亡和程序性死亡等多种生理过程具有重要调控作用(Sigoillot *et al*, 2002)。Notch 信号通路可调控细胞的分化、增殖和凋亡, 对于细胞生长发育具有重要意义, Notch 信号的异常表达会诱发乳腺癌等多种癌症(Shimizu *et al*, 2011)。本研究发现, 在 FOXO 信号通路、Toll 和 IMD 信号通路、MAPK 信号通路和 Notch 信号通路分别富集了 66、15、15 和 99 个下调 miRNAs 的靶基因, 推测这些下调 miRNAs 通过下调其表达量, 以解除对部分免疫相关基因的抑制, 从

而增强刺参对灿烂弧菌的抵抗能力。同时, 分别有 38 和 26 个上调 miRNA 的靶基因注释到了泛素介导的蛋白水解和 Notch 信号通路等细胞免疫相关通路, 推测这些 miRNA 及其靶基因广泛参与了上述信号通路的负调控过程, 从而使刺参体壁组织免疫活性和新陈代谢过程受到灿烂弧菌的抑制。He 等(2014)对灿烂弧菌感染的刺参体腔细胞的研究表明, miRNAs 对刺参先天免疫防御的调控主要是通过调控刺参体内补体系统(complement system)和 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)信号通路中的相关因子而实现的。本研究中, TLR 信号通路富集程度较高, 但富集靶基因数较少, 其中大部分靶基因也富集在泛素介导的蛋白水解通路和 Notch 信号通路, 推测可能与所研究的样本组织差异相关, 其具体的作用机制尚需进一步的研究。

本研究通过 miRNA-mRNA 共表达网络分析发现, 泛素介导的蛋白水解是富集基因数最多的通路, 13 个 DE miRNAs 在刺参响应灿烂弧菌胁迫过程中全部参与调控泛素介导的蛋白水解, 其中 11 个下调的 DE miRNAs (Aja-miR-1559-3p、Aja-miR-7550-5p、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277-3p 等)靶向结合 115 个 mRNAs, 2 个上调的 DE miRNAs (Aja-miR-184 和 Novel-217)靶向结合 19 个 mRNAs; 多数 miRNAs 下调表达以减弱对 mRNAs 的抑制作用, 从而增强相关免疫基因的表达, 少数 miRNAs 上调表达以增强对 mRNAs 的抑制。泛素介导的蛋白水解是重要的细胞免疫通路, 可以通过降解关键的调节蛋白来控制细胞的基本生命活动, 调节细胞应激反应和对病原微生物的免疫反应(陈科等, 2012), 例如, 在青虾(*Macrobrachium nipponensis*)遭受霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)感染时, 体内的泛素化蛋白可以介导机体细胞免疫以应对霍乱弧菌的感染(李席席, 2020)。上述实验结果表明, 灿烂弧菌在参与胁迫时对泛素介导的蛋白水解通路产生影响, 二者之间存在复杂的互动, 但背后的分子机制仍需进一步探明。

综上所述, 本研究对正常及灿烂弧菌胁迫的刺参体壁样品进行高通量测序, 筛选到 13 个与病原胁迫相关的 DE miRNA, 并对其靶基因进行分析, 进而对 2 条关键通路进行了基因共表达分析。研究结果不仅为刺参响应灿烂弧菌胁迫的关键调控 miRNAs 的筛选及功能研究提供了重要的信息和线索, 也为刺参-灿烂弧菌互作机制的阐明打下了基础。

参 考 文 献

AGGARWAL K, SILVERMAN N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB*

- Reports, 2008, 41(4): 267–277
- BETEL D, WILSON M, GABOW A, *et al.* The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(suppl 1): D149–D153
- BOONCHUEN P, MARALIT B A, JAREE P, *et al.* MicroRNA and mRNA interactions coordinate the immune response in non-lethal heat stressed *Litopenaeus vannamei* against AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 787
- CHEN H, XIN L, SONG X, *et al.* A norepinephrine-responsive miRNA directly promotes CgHSP90AA1 expression in oyster haemocytes during desiccation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 64: 297–307
- CHEN K, CHENG H H, ZHOU R J. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. *Hereditas*, 2012, 34(1): 7–20 [陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能. *遗传*, 2012, 34(1): 7–20]
- GUO R, DU Y, ZHOU N H, *et al.* Comprehensive analysis of differentially expressed microRNAs and their target genes in the larval gut of *Apis mellifera ligustica* during the late stage of *Ascosphaera apis* stress. *Acta Entomologica Sinica* 2019, 62(1): 49–60 [郭睿, 杜宇, 周倪虹, 等. 意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌胁迫后期的差异表达微小 RNA 及其靶基因分析. *昆虫学报*, 2019, 62(1): 49–60]
- HE X B, JING Z Z, CHENG G F. MicroRNAs: New regulators of toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*, 2014: 945169
- KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 597–610
- LAN J F, ZHOU J, ZHANG X W, *et al.* Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 608–617
- LI C H, FENG W, QIU L, *et al.* Characterization of skin ulceration syndrome associated microRNAs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* by deep sequencing. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 436–441
- LI C, XU D X. Understanding microRNAs regulation in heat shock response in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 81: 214–220
- LI C, ZHAO M, ZHANG C, *et al.* miR210 modulates respiratory burst in *Apostichopus japonicus* coelomocytes via targeting toll-like receptor. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 65: 377–381
- LI X X. Study on pathogenicity of non-O1 *Vibrio cholerae* to *Macrobrachium nipponensis*, host immune response and probiotic effect of antagonistic bacteria. Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2020 [李席席. 非 O1 霍乱弧菌对青虾的致病性、宿主的免疫反应及拮抗菌的益生效果研究. 扬州大学博士研究生学位论文, 2020]
- LIANG J R. Cloning and functional analysis of immune related microRNAs in *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Guangdong Ocean University, 2020 [梁金荣. 凡纳滨对虾免疫相关 microRNA 的克隆与功能分析. 广东海洋大学博士学位研究生学位论文, 2020]
- LIN D L. Absorption of milk-derived miRNAs in animals and effects of milk-derived exosomes on mice immune function. Doctoral Dissertation of Southern China Agriculture University, 2017 [林德麟. 乳源 miRNAs 在动物体内的吸收规律及乳 exosome 对小鼠免疫功能的影响. 华南农业大学博士研究生学位论文, 2017]
- LIN F. Study on the rapid detection technology and characterization of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus isolated in China. Doctoral Dissertation of Jiangsu University, 2018 [林锋. 罗氏沼虾野田村病毒致病性及其快速检测技术研究. 江苏大学博士研究生学位论文, 2018]
- LU M, ZHANG P J, LI C H, *et al.* MiR-31 modulates coelomocytes ROS production via targeting p105 in *Vibrio splendidus* challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* *in vitro* and *in vivo*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015a, 45(2): 293–299
- LU M, ZHANG P J, LI C H, *et al.* miRNA-133 augments coelomocyte phagocytosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting the TLR component of IRAK-1 *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*, 2015b, 5: 12608
- LV M, CHEN H H, SHAO Y N, *et al.* miR-137 modulates coelomocyte apoptosis by targeting 14-3-3 ζ in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 86–96
- LV Z, LI C H, ZHANG P J, *et al.* miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 431–436
- NAM J W, RISSLAND O S, KOPPSTEIN D, *et al.* Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Molecular Cell*, 2014, 53(6): 1031–1043
- OU J, LI Y, DING Z F, *et al.* Transcriptome-wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013: 35(2): 607–617
- SHAO Y N, LI C H, XU W, *et al.* miR-31 links lipid metabolism and cell apoptosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting CTRP9. *Front Immunology*, 2017, 8: 263
- SHIMIZU T, TANAKA T, ISO T, *et al.* Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of *Msx2* gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(21): 19138–19148
- SIGOILLOT F D, EVANS DR, GUY H I. Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 15745–15751
- VALLET-GELY I, LEMAITRE B, BOCCARD F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(4): 302–313
- XIE S M. Expression characteristics and preliminary functional analysis of three genes in the lin-like growth factor system of razor clam *Simonovacula constricta*. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2018 [谢淑媚. 缢蛏类胰岛素生长因子系统 3 个基因表达特征及功能初步分析. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2018]
- XU P, GUO H, WANG H, *et al.* Identification and profiling of

microRNAs responsive to cadmium toxicity in hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Hereditas*, 2019, 156(1): 34

ZHANG C F, TONG C, TIAN F, *et al.* Integrated mRNA and microRNA transcriptome analyses reveal regulation of thermal acclimation in *Gymnocypris przewalskii*: A case study in Tibetan Schizothoracine fish. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186433

ZHANG C Y, WANG Y G, RONG X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative

syndrome in *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. *水产学报*, 2006, 30(1): 118–123]

ZHUO M Q. Functional analysis of PI3Ks and its related signal pathway in insulin regulating lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 [卓梅琴. 黄颡鱼 PI3Ks 功能解析及其通路在胰岛素调控脂类代谢中的作用机制. 华中农业大学博士学位研究生学位论文, 2018]

(编辑 冯小花)

Identification of Differential Expression microRNAs and Target Genes Analysis of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Response to *Vibrio splendidus* Infection

CHANG Mengyang^{1,2}, LI Bin^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, WANG Jinjin^{2,3}, YU Yongxiang^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3}, LIAO Meijie^{2,3①}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, LIU Qingbing⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Qingdao Ruizi Company, Qingdao, Shandong 266409, China)

Abstract microRNAs (miRNAs), involved in post-transcriptional gene regulation, play important roles in the growth, development, cell differentiation, and immune defense of eukaryotes. *Apostichopus japonicus* has become an economically important species for marine aquaculture in China; however, the outbreak of diseases, such as skin ulcer syndrome (SUS), has led to great losses in aquaculture development. Therefore, molecular mechanisms underlying disease occurrence must be further elucidated. In the present study, *Vibrio splendidus*, an important causative pathogen of SUS, was used as the stress strain (1×10^6 CFU/mL) in an artificial infection experiment. Body wall of the diseased (PT16S) and healthy (PT10H) samples was subjected to miRNA-Seq. Differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) were screened using bioinformatics. The target genes of DEmiRNAs were predicted and used for constructing miRNA-mRNA regulatory networks. Through miRNA-Seq, respectively 5 902 588 and 5 053 529 valid reads were generated for the PT10H and PT16S samples. A total of 13 DEmiRNAs ($P \leq 0.05$) were screened between PT10H and PT16S, of which two were upregulated and 11 downregulated. Target gene prediction revealed that the two upregulated DEmiRNAs bound to 3010 target genes, which were annotated to 585 GO terms and 24 signaling pathways ($P \leq 0.05$), while the 11 downregulated DEmiRNAs bound to 19 072 target genes, which were annotated to 514 GO terms and 22 signaling pathways ($P \leq 0.05$). In the validation test, the consistency rate of the sequencing and qRT-PCR data reached 70%. Two immune-related pathways (ubiquitin-mediated proteolysis and Notch signaling) were selected and used to construct the miRNA-mRNA regulatory networks. The 13 DEmiRNAs could bind 134 ubiquitin-mediated proteolytic mRNAs and 109 Notch signaling mRNAs. Specifically, Aja-miR-1559-3p, Aja-miR-7550-5p, Aja-miR-2478, and Aja-miR-9277-3p may be involved in the regulation of ubiquitin-mediated proteolysis and Notch signaling. Our results provide primary data for understanding the post-transcriptional regulatory mechanisms of diseases in sea cucumber.

Key words *Apostichopus japonicus*; microRNA; *Vibrio splendidus*; Stress response; Target genes; miRNA-mRNA network

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211214002

http://www.yykxjz.cn/

李宝贤, 李国梁, 姚海芹, 申欣, 鲁晓萍, 梁洲瑞, 刘福利, 张朋艳, 汪文俊. 基于 MaxEnt 模型和 ArcGIS 对巨藻在我国适生情况的分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 118-126

LI B X, LI G L, YAO H Q, SHEN X, LU X P, LIANG Z R, LIU F L, ZHANG P Y, WANG W J. Potential geographic distribution of *Macrocystis pyrifera* in China based on MaxEnt model and ArcGIS. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 118-126

基于 MaxEnt 模型和 ArcGIS 对巨藻 在我国适生情况的分析*



李宝贤^{1,2} 李国梁² 姚海芹² 申欣¹ 鲁晓萍² 梁洲瑞²
刘福利² 张朋艳² 汪文俊^{2①}

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005;

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 山东 青岛 266071)

摘要 发展新养殖对象及异地栽培需首先掌握物种的生态适应性。有关巨藻(*Macrocystis pyrifera*)在我国海区适应性的研究甚少, 海区养殖效果不理想, 我国巨藻养殖业发展欠佳。本研究采用 MaxEnt 构建了巨藻的物种分布模型, 当特征组合为乘积型特征(product features)、二次型特征(quadratic features)和片段化特征(hinge features), 正则化参数为 0.8 时, 模型预测性能最佳; 综合考虑环境因子的相关性及对模型的贡献率, 筛选出 6 项环境因子用于模型构建, 其中, 光强与温度对巨藻自然分布的影响最大, 在光强不低于 2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、年均温度范围 10.5~17.0 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 巨藻的适生概率较高。采用所构模型结合 ArcGIS 预测巨藻在我国的适生区: 主要分布于黄渤海, 约占该海域面积的 13.17%, 其中, 边缘适生区为 5.46%, 低适生区为 2.85%, 中适生区为 1.20%, 高适生区为 3.66%, 表明辽东湾、渤海湾是巨藻引种养殖和藻场建设的适宜海域。

关键词 巨藻; MaxEnt; ArcGIS; 适生区域

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0118-09

巨藻(*Macrocystis pyrifera*)属于褐藻门、海带目、巨藻科、巨藻属(刘永定等, 2001), 分布于美洲太平洋沿岸, 自阿拉斯加州经加拿大、加利福尼亚州沿海至墨西哥, 据报道, 澳大利亚、新西兰、秘鲁、智利等地也有分布(Mansilla *et al*, 2011)。巨藻为多年生大型海藻, 生长速度快, 在美国西海岸附近海域中盛产的一种巨藻的日生长率可达 0.6 m (Mateus *et al*, 1976)。巨藻具有重要的经济价值, 含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质, 可作为食品添加剂, 用于家禽、

家畜、鲍鱼养殖饲料, 国内外大量使用巨藻生产褐藻胶, 提炼甘露醇(Hernan *et al*, 1977)。相比石油和煤炭, 甲烷为更清洁低碳的能源, 而巨藻经微生物分解可以产生大量甲烷, 因此, 它又是一种极具潜力的生物能源海藻(Ghosh *et al*, 1981; 朱永良, 1984)。近年来, 山东及辽东半岛的藻场修复取得一定进展, 但海藻场的建设需要更加注重其生态功能和实际效果。目前, 我国藻场建设中多使用一年生海藻, 而巨藻是多年生海藻, 增殖成功后可以长期维持。巨藻作为“海底森林”

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0901500)、国家藻类产业技术体系(CARS-50)、国家海洋水产种质资源库项目、中国水产科学研究院基本科研业务费“创新团队”项目(2020TD27)和江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX20_1276)共同资助。李宝贤, E-mail: 15251281535@163.com

① 通信作者: 汪文俊, 研究员, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-14, 收修改稿日期: 2022-01-13

的主要海洋植物之一,其在海洋生态系统中具有饵料、栖息地、净化水体和碳汇等多个功能。

目前,对巨藻资源的利用还处于自然资源阶段,全球尚未建立成熟的巨藻栽培产业。我国海藻栽培规模大、物种丰富,在发展巨藻栽培产业中进行了一定的尝试。自1978年从墨西哥引进巨藻幼苗和配子体(刘恬敬等,1981;索如瑛等,1986)以来,建立了巨藻潜筏式养殖技术(王飞久等,1999),研究了光强和光时对巨藻配子体发育和幼孢子体生长的影响(胡敦清,1984;胡敦清等,1986),解析了巨藻幼苗的光合生理特征(凌晶宇等,2014),在保种、繁育和养殖技术上取得了一定的突破。但发展养殖新对象以及异地栽培要考虑物种的海区适应性,目前对巨藻在我国海区的适应性知之甚少,海区养殖效果并不理想。

生态位模型(ecological niche models, ENMs)是一种重要的定量分析工具,被广泛用于预测物种潜在的栖息适生区。目前主要采用的 ENMs 有 BIOCLIM、CLIMEX、DOMAIN、GARP 和 MaxEnt 等。基于生态位理论,用最大熵原理作为统计分析工具,以物种在已知分布区的信息以及目标区的环境变量为基础,通过比较该物种在已知分布区的生态环境变量来预测其占有的生态位,使用 Java 语言编写了 ENMs 程序 MaxEnt (Phillips *et al*, 2008)。MaxEnt 仅考虑目标物种在所在区域的“出现”情况(presence-only),综合考虑各种给定环境因子下物种出现的最大熵,从而对物种在预测区域的适生情况进行分析,是一种利用已知部分信息对未知信息进行预测或推断的通用方法。MaxEnt 模型是与 ArcGIS 结合效果最好、具有较高预测精度且应用最为广泛的 ENMs (张华纬等,2020),常用于动物、林草等适生区的预测,如黑麂等濒危动物保护区预测(陈智强等,2021)、不同时期的柃木分布格局(孟影等,2020)、气候变化对西南地区高山植被分布的影响(熊巧利等,2019)。生态位模型在海藻中的应用主要集中在入侵风险方面(Martín-García *et al*, 2017),基于发展养殖新对象的研究较少。

巨藻作为一种优质的大型经济褐藻,其商业化开发利用具有重要的经济价值和生态意义,作为外来物种,巨藻在我国海区栽培的生态安全性、是否会成为入侵物种的风险也有待明确。本研究采用 MaxEnt 软件对巨藻在我国海区的适生情况进行预测,初步评价其生态入侵风险,以期能为发展巨藻增养殖提供支撑。

1 材料与方法

1.1 数据获取及筛选

1.1.1 环境数据

本研究环境数据来源于全球海

洋生物扩散模型环境数据库 Bio-ORACLE (<http://bio-oracle.org/>)中的 2000—2014 年期间月平均值的气候数据编制的图层,其空间分辨率为 5 arcmin (约为 9.2 km),下载格式为栅格格式(*.tif)。选取对巨藻生长产生影响的环境因子用于适生模型预测,共计 21 项,分别为 bio1-最大海流流速(currents velocity. Max)、bio2-年均海流流速(currents velocity. Mean)、bio3-最小海流流速(currents velocity. Min)、bio4-最大铁浓度(iron. Max)、bio5-年均铁浓度(iron. Mean)、bio6-最小铁浓度(iron. Min)、bio7-最大光照强度(light at bottom. Max)、bio8-年均光照强度(light at bottom. Mean)、bio9-最小光照强度(light at bottom. Min)、bio10-最大氮浓度(nitrate. Max)、bio11-年均氮浓度(nitrate. Mean)、bio12-最小氮浓度(nitrate. Min)、bio13-最大磷浓度(phosphate. Max)、bio14-年均磷浓度(phosphate. Mean)、bio15-最小磷浓度(phosphate. Min)、bio16-最大盐度(salinity. Max)、bio17-年均盐度(salinity. Mean)、bio18-最小盐度(salinity. Min)、bio19-最大温度(temperature. Max)、bio20-年均温度(temperature. Mean)、bio21-最小温度(temperature. Min)。

将栅格格式(*.tif)的环境数据导入 ArcGIS 10.2 转换成*.asc 格式,使用 MaxEnt (V 3.4.1)进行贡献率分析,去除对巨藻生长贡献率为 0 的环境因素,将剩余的因素使用 ENMTools (V 1.3)进行相关性分析。相关性分析是研究变量间密切程度的一种统计方法(Tran *et al*, 2010)。在线性相关分析中,相关系数是描述线性关系程度和方向的量,一般用 r 表示,根据本研究实际情况,对环境变量进行相关性分析,相关系数 $|r| > 0.8$ 定义为高度相关。本课题组对随机法和最大贡献率法与相关性结合的方法进行比对,发现采用最大贡献率结果的假阳性更低(李国梁等,2021)。

1.1.2 巨藻分布位点 本研究使用的巨藻分布数据在全球生物多样性信息网络 GBIF (<http://www.gbif.org/>)中下载。收集 1901—2020 年巨藻分布位点共 6379 处,去除馆藏标本位点,获得巨藻有效自然分布位点共计 5682 处的经纬度数据。按照 MaxEnt 要求的文件格式,将巨藻的实际分布地点按照物种名、经度和纬度的顺序储存为*.csv 格式的文件并导入 Excel 中去除错误、记录重复位点数据。为防止预测结果过拟合,使用 ENMTools 去除冗余位点。

1.2 MaxEnt 参数优化

通过 ENMTools 来调整 MaxEnt 模型正则化参数(regularization multiplier, RM)和特征组合(feature combination, FC)参数,分析不同参数下模型的复杂

度,选择复杂度最小的模型参数,最后比较分析 MaxEnt 模型默认参数和调整参数预测结果,讨论 MaxEnt 模型复杂度对预测结果的影响(朱耿平等,2016)。RM 和 FC 参数对 MaxEnt 模型复杂度有较大影响。在 MaxEnt 默认设置中,RM=1; FC 有 5 种,即:线性特征(linear features)、二次型特征(quadratic features)、片段化特征(hinge features)、乘积型特征(product features)和阈值性特征(threshold features)。

赤池信息量准则(Akaike information criterion correction, AIC)是衡量统计模型拟合优良性的一种标准,可以评估模型的复杂度和此模型拟合数据的优良性,信息量准则优先考虑 AIC 值(即 AICc)最小的模型(Akaike *et al.*, 1973)。ENMTools 通过计算 MaxEnt 模型不同参数条件下的 AIC 值来评价模型的复杂度。本研究将 RM 设置为 0~4,每次增加 0.1,采用 31 个特征组合(FC),共计 1240 项参数组合。

1.3 预测模型构建运行

将筛选处理后的分布数据、环境数据分别导入 MaxEnt 模型,随机选取 25%的巨藻分布点作为测试集(test data),剩余 75%作为训练集(training data),根据优化结果设置 RM 和 FC,构建环境变量响应曲线,并采用刀切法检测环境变量的重要性,以 Logistic 格式输出概率分布预测图。

采用接受者操作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析法对预测结果进行精度检验。AUC 是 ROC 曲线与横坐标围成的面积,AUC 值越接近 1,说明环境变量与预测的物种地理分布模型之间的相关性越大,即模型预测的结果越准确(王运生等,2007)。

1.4 预测适生区划分

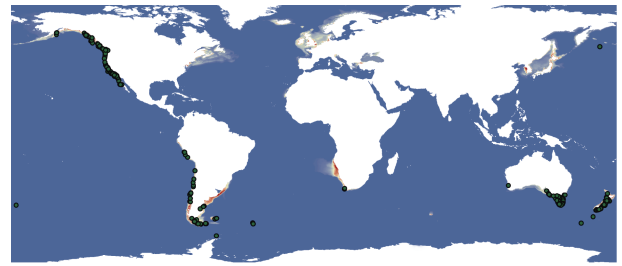
利用 ArcGIS 的格式转换工具(conversion tools)将 *.asc 格式转化为栅格格式,再利用分析工具(analysis tools)的再分类(reclassify)功能对其进行适生等级的划分,选定合适的阈值,将巨藻的适生等级划分为高度适生区(>0.5)、中适生区(0.3~0.5)、低适生区(0.1~0.3)、边缘适生区(0.05~0.1)、非适生区(<0.05),最终获得巨藻在中国的潜在适生分布范围。

2 结果与分析

2.1 分布位点筛选结果

将分布数据导入 ENMTools 软件中,与 *.asc 格式的环境数据相结合,筛选去除同一栅格中的冗余位

点,最后筛选出共计 368 项分布数据,如图 1 所示,将其保存为 *.csv 格式的文件并导入 MaxEnt 模型。



• 巨藻分布位点 Distribution of *Macrocyctis pyrifera*

图 1 巨藻全球分布

Fig.1 Global distribution of *Macrocyctis pyrifera*

2.2 环境因子筛选结果

根据实际情况,使用 MaxEnt 进行贡献率分析,去除对巨藻生长贡献率为 0 的环境因素,将剩余因素使用基于 R 语言开发的 ENMTools 进行相关系数分析。环境变量的相关系数 $|r| > 0.8$ 定义为高度相关(图 2),从中筛选贡献率最高的用于后续建模,共筛选 6 个环境因子(bio4、bio9、bio10、bio14、bio16 和 bio20),即最大铁浓度、最小光照强度、最大氮浓度、年均磷浓度、最大盐度、年均温度用于建立模型。

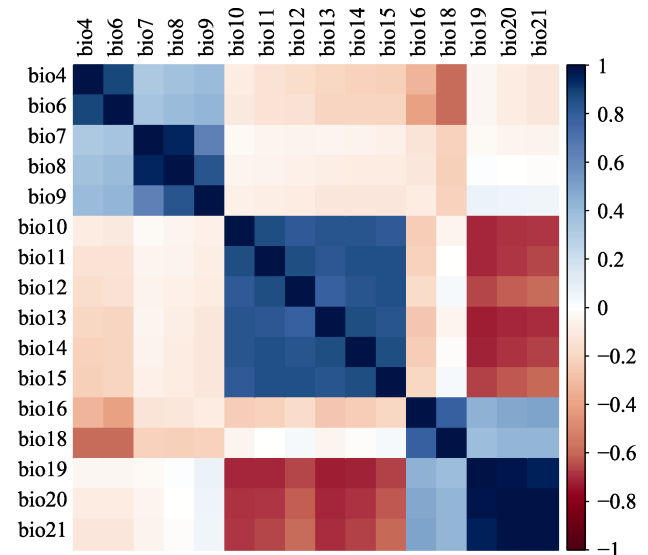


图 2 环境因子相关系数热图

Fig.2 Heat map of correlation coefficient of environmental factors

2.3 MaxEnt 参数优化结果

利用 R 语言对 RM 和 FC 参数组合进行优化,比较所得 1240 项组合的 AIC 值大小(图 3),筛选出最优参数组合为 RM—乘积型特征、二次型特征和片段化特征,FC—0.8,确定 MaxEnt 各优化参数设置见表 1。

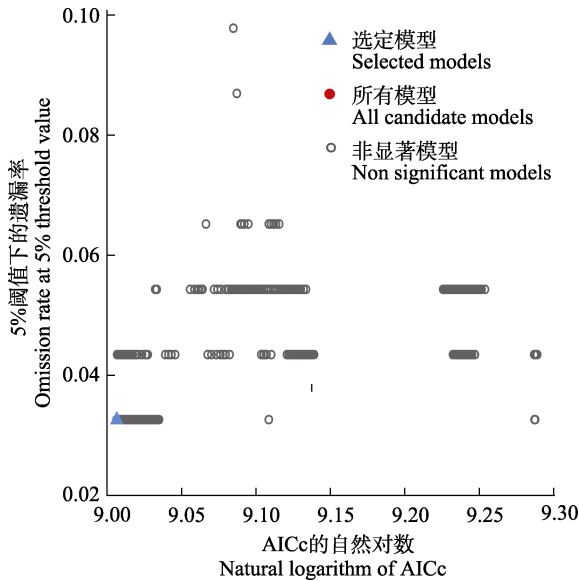


图 3 MaxEnt 参数设置 AICc 大小
Fig.3 Parameter setting values of MaxEnt

表 1 MaxEnt 参数设置值

Tab.1 Parameter setting values of MaxEnt

选项 Option	参数 Parameter	
	默认值 Default value	设置值 Setting value
特征组合 Feature combination	Auto features	Product features Quadratic features Hinge features
正则化参数 Regularization multiplier	1	0.8
随机选取测试集比例 Randomly selected test set percentage	0	25.0
重复迭代次数 Number of iterations repeated	1	10.0

2.4 MaxEnt 模型预测结果的检验

采用 ROC 曲线对巨藻在中国适生区预测结果进行精度检验, 高贡献率环境因子组模型预测结果的平均 AUC 值为 0.980, 标准差为 0.002 (图 4)。检测值远远大于随机模型的 AUC 值 0.5, 表明该模型预测性能比随机模型好, 即所构建的模型预测巨藻分布区结果可信度高。

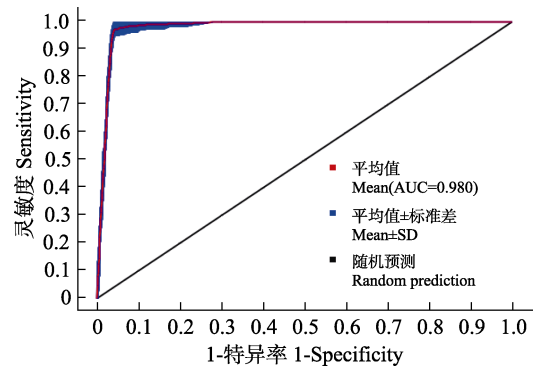


图 4 MaxEnt 模型对巨藻预测结果 ROC 曲线检验
Fig.4 ROC curve verification of prediction for *M. pyrifera* by MaxEnt model

刀切法(Jackknife)检验了环境变量对 MaxEnt 模型的影响(图 5), 当单个环境因子时, 最小光照强度(bio9)训练正态化增益超过 2.0, 为重要性最大的环境因子, 其次为年均温度(bio20)、最大铁浓度(bio4)对模型的影响较高, 训练正态化增益均超过 1.0。该检验结果显示, 环境因子中的光温对巨藻的生长分布具有较大影响, 这与巨藻目前的生长环境相符。

2.5 巨藻预测适生区与环境因子的关系

将筛选过后的巨藻分布数据(*csv)和环境数据(*asc)导入 MaxEnt 预测软件, 随机选取 25%的巨藻

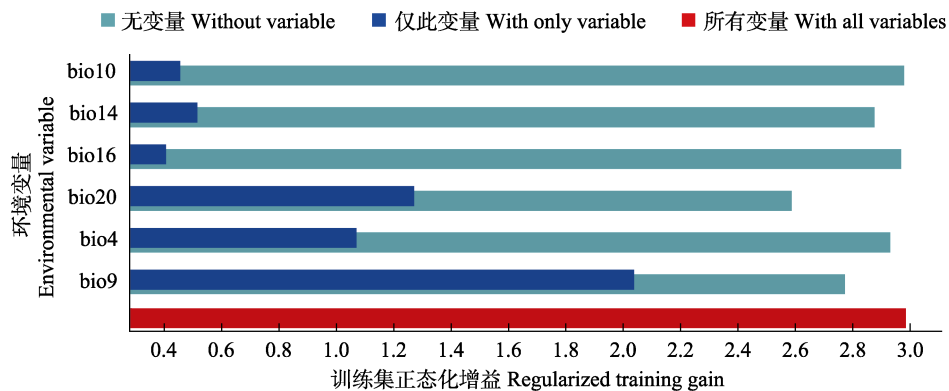


图 5 刀切法对环境因子重要性检验
Fig.5 Test of AUC based on environmental factors importance by Jackknife method

分布点作为测试集，剩余 75%作为训练集，根据默认参数、优化参数结果分别设置 RM 和 FC，构建环境变量响应曲线，以 Logistic 格式输出概率分布预测图，上述过程重复 10 次，主要环境因子的响应曲线见图 6。

以分布概率 0.5 为阈值，划分巨藻生态适应性环境因子的范围。结果显示，巨藻适宜分布的条件为：年均温度的适宜范围为 10.5~17.0℃，最适温度为 15.0℃；最小光照强度适宜范围为 2.0~20 μmol/(m²·s)；最大盐度在 26~34 时适宜巨藻分布，盐度为 30 时分布概率最大；最大氮浓度范围为 6.0~18.0 mg/L，海水中氮浓度为 9.0 mg/L 时最适宜巨藻分布；巨藻可在平均

磷浓度为 0.5~1.1 mg/L 范围内分布，0.7 mg/L 时最适宜巨藻分布；最大铁浓度为 0.021 mg/L 时巨藻分布概率最大。

2.6 巨藻在我国北方海域潜在适生区

将筛选过的巨藻分布数据(*csv)和环境数据(*asc)导入 MaxEnt 预测软件，随机选取 25%的巨藻分布点作为测试集，剩余 75%作为训练集，根据默认参数、优化参数结果分别设置 RM 和 FC，构建环境变量响应曲线，以 Logistic 格式输出概率分布预测图，上述过程重复 10 次。

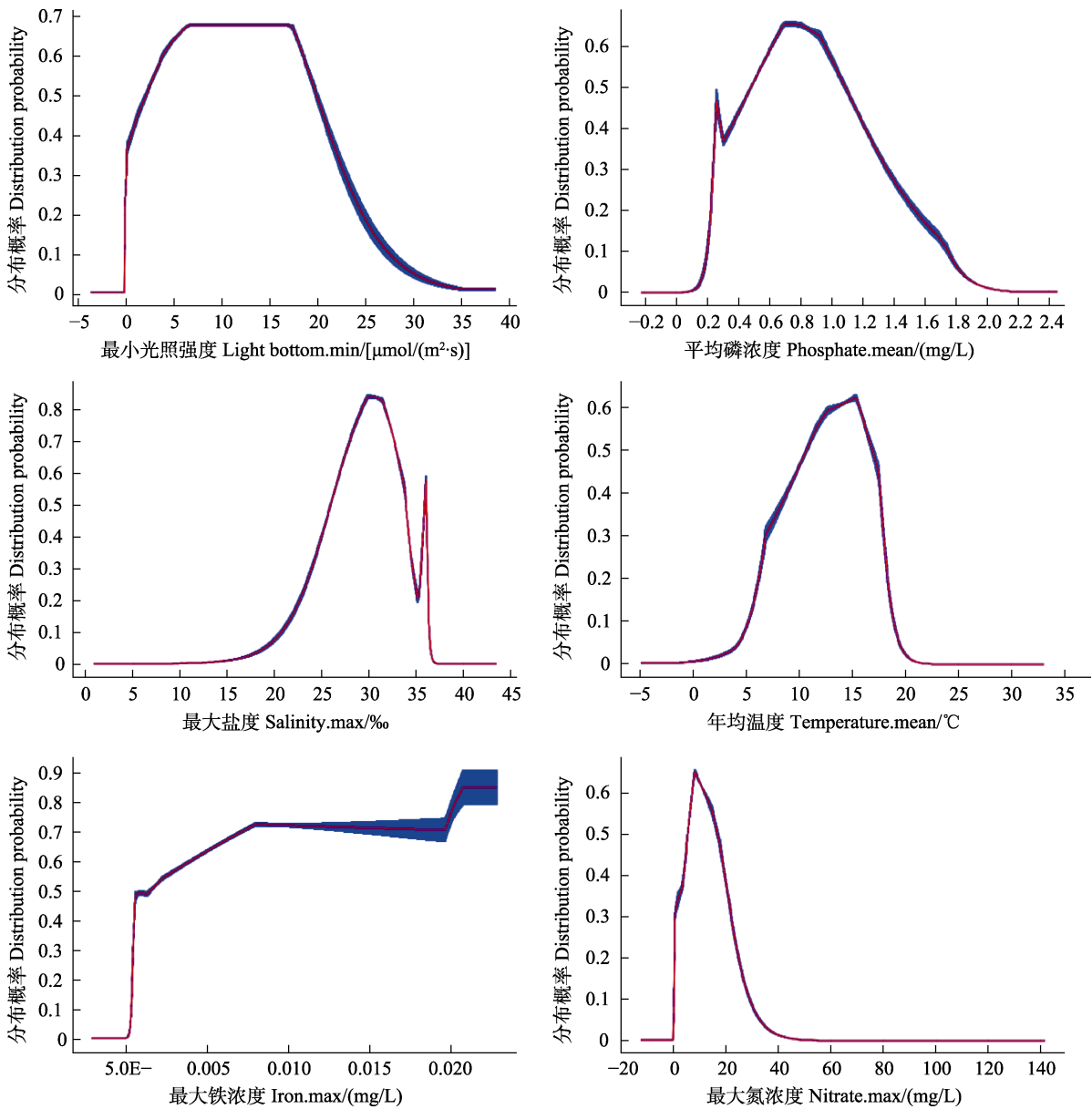


图 6 环境因子的响应曲线
Fig.6 Response curve of environmental factors

MaxEnt 预测结合 ArcGIS 结果见图 7, 预测适生区域为辽东湾、渤海湾及滨海湾, 其中, 非适生区面积占比为 86.83%, 边缘适生区为 5.46%, 低适生区为 2.85%, 中适生区为 1.20%, 高适生区为 3.66% (表 2)。

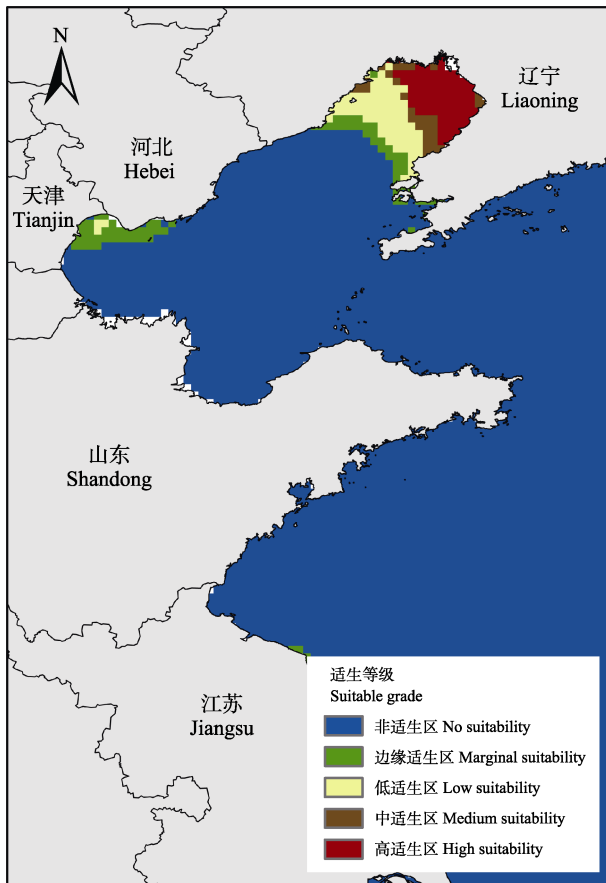


图 7 预测适生区结果

Fig.7 Prediction results of suitabilities

3 讨论

MaxEnt 默认参数的设置是对 6 个不同地理区域的 266 个物种数据进行模拟测试所得出的(Phillips *et al.*, 2008)。模型所模拟的分布范围介于潜在分布和现实分布之间, 使用时需从研究者目的出发调整模拟方案。本研究采用 AIC 值大小来评定统计模型拟合优良性, 衡量模型的复杂度, 优先考虑 AIC 值最小的模型。当参数组合为 RM—乘积型特征、二次型特征和片段化特征, FC 设置为 0.8 时 AIC 值最小, 且此时 AUC 值为 0.980, 远大于随机值 0.5, 表明本优化参数比默认参数更加准确。

使用缓冲区筛选数据会导致缓冲区相交, 从而把原本位于不同栅格的两个位点删除, 造成部分数据误删、部分冗余数据删除不彻底的现象(Dan *et al.*, 2010)。本研究为解决这一问题, 采用 ENMTools 处理巨藻在全球的分布位点数据, 将环境因子与分布数据相结合, 匹配分析环境因子的栅格大小, 删除同一栅格内的冗余分布数据。该方法较缓冲区筛选数据更准确快捷, 分析结果更加合理。

筛选过的分布数据显示, 巨藻自然分布主要集中在加拿大、美国和智利西海岸, 澳大利亚东南部海岸和新西兰东海岸。加拿大西海岸、新西兰东海岸以及智利西海岸南部的气候特征为温带海洋性气候, 美国西海岸为地中海气候, 澳大利亚东南角大陆地中海气候和温带海洋性气候。地中海气候和温带海洋性气候的地区温度适宜, 降水量充沛, 适宜巨藻生长。上述地区在 MaxEnt 模型的预测结果中皆有显示, 说明本研究筛选出用于模型构建的环境因子合适。

表 2 MaxEnt 预测巨藻在中国黄渤海的适生区分布情况

Tab.2 MaxEnt predicts the distribution of *M. pyrifera* in the Yellow Sea and Bohai Sea of China

适生区等级 Suitable grade	适生概率范围 Probability range	频数 Frequency	占比 Percentage %
非适生区 No suitability	0~0.05	6804	86.83
边缘适生区 Marginal suitability	0.05~0.1	428	5.46
低适生区 Low suitability	0.1~0.3	223	2.85
中适生区 Medium suitability	0.3~0.5	94	1.20
高适生区 High suitability	0.5~1	287	3.66
合计 Total		7836	

模型预测结果显示, 年均温度 10.5~17.0℃适宜巨藻分布, 15℃时最佳; 适宜巨藻自然分布的盐度范围为 26~34, 盐度为 30 时分布概率最大, 这与室内实验结果一致(芦薇薇, 2015)。同时, 本预测结果也与巨藻引种地的水温条件相符, 中国水产科学研究院

黄海水产研究所 1978 年从墨西哥引进巨藻(刘恬敬等, 1981), 引种地圣托马斯藻场冬季最低水温为 10~12℃, 夏季最高水温为 18~19℃, 说明本研究所构模型的预测结果准确。本预测结果显示, 适宜巨藻自然分布的最小光强为 2.0~20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 说明巨藻对

低光强具有较好的适应性。海水光强与水深和透明度具有相关性。目前常用的海洋环境数据库 WOD2009、OceanColor、Hexacoral、AquaMaps、Halpern 均未收录海水深度数据。Bio-ORACLE 是收录环境参数最为齐全的,也是目前与 MaxEnt 模型适配度最高的海洋环境数据库(Tyberghein *et al.*, 2012),因此,本研究选用了 Bio-ORACLE。通过对巨藻分布区海洋数据的调查,巨藻一般垂直分布于低潮线下 5~20 m 水深处(Gerard, 1984; Graham, 1996)。我国 1978 年巨藻的引种地墨西哥圣托马斯水深在 10 m 左右,所取的成熟藻体长 24 m 以上(刘恬敬等, 1981)。可见,因藻体在海水中漂浮生长,藻体可生长的长度与垂直栖息水深并不呈正相关关系。渤海湾平均水深为 18 m (李原仪, 2017),与巨藻自然栖息地的水深相当,适宜底播增殖巨藻。目前,我国海藻筏式栽培的水深多在几米到二三十米之间,因此,在该区域筏式栽培巨藻也是合适的,说明所构模型虽未考虑水深参数,对预测结果的影响不大。适宜的海水流速(丁刚等, 2015)对于藻类生长具有促进作用,巨藻适宜生长在氮营养盐含量丰富、水急的水域(Zimmerman *et al.*, 1986),我国渤海湾氮浓度为 0.21 mg/L (徐菡悦, 2020),营养盐较为充足。此外,铁也是影响藻类生长的重要因素(王潇等, 2020),本研究发现,在众多环境参数中,铁离子浓度是影响模型的关键参数之一,最大铁离子浓度在 0.021 mg/L 时巨藻的分布概率最高。

MaxEnt 模型预测结果显示,巨藻在我国的适应区域较少,仅辽东湾存在一定的中高适生区,其余地区均为低适生区、边缘适生区和非适生区,说明巨藻能够自然扩散的海域受限。我国自 20 世纪 80 年代在青岛、荣成、长岛多地开展巨藻养殖试验,至今未见巨藻自然资源的形成,可见养殖巨藻在我国形成自然群体的几率较低。巨藻营底栖生活,以礁岩作为附着基。高适生区辽东湾、渤海湾底质以砂质粉砂、粉砂、砂质泥和淤泥为主(徐东浩等, 2012; 宫少军, 2017; 裘奕斐等, 2021),不利于巨藻自然生长,底质类型不利于巨藻附着。如果在高适生区建设巨藻藻场,必须依靠人造藻礁,其自然扩散风险非常有限。可通过控制海洋牧场附着基质的投放区域,控制巨藻生长的范围。

本研究通过分布位点和环境数据筛选及 MaxEnt 参数优化等将预测结果出现假阳性的可能降到最低,与相关实验结果进行验证,证明了预测分析的准确性。预测结果显示,巨藻在我国的适生区主要分布于辽东湾、渤海湾的部分区域,说明在该区域发展巨藻养殖和藻场建设具有较高可行性,同时,由于受到该

海区环境因子的限制,在当前气候条件下,巨藻成为入侵物种的风险较低。但随着气候环境变化,在中高适生区增殖巨藻仍应保持谨慎,需同时开展生态安全性监测和评价工作。

参 考 文 献

- AKAIKE H, PETROV B N, CZAKI F. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. 2nd International Symposium on Information Theory, 1973
- CHEN Z Q, ZHAO Z H, WANG Y F, *et al.* Activity rhythm analysis and potential suitable area prediction of *Muntiacus crinifrons* based on infrared camera technology and MaxEnt model. *Journal of Ecology*, 2021, 41(9): 3535–3547 [陈智强, 赵增辉, 王远飞, 等. 基于红外相机技术和 MaxEnt 模型的黑鹿(*Muntiacus crinifrons*)活动节律分析和潜在适生区预测. *生态学报*, 2021, 41(9): 3535–3547]
- DAN L W, RICHARD E G, MICHAEL T. ENMTools: A toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 2010, 33(3): 607–611
- DING G, WU H Y, XIN M L, *et al.* Effects of hydrodynamic conditions on the growth of *Sargassum thunbergii* seedlings. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2015, 31(4): 233–238 [丁刚, 吴海一, 辛美丽, 等. 水动力条件对鼠尾藻幼苗生长的影响. *广西科学院学报*, 2015, 31(4): 233–238]
- GERARD V A. The light environment in a giant kelp forest: Influence of *Macrocystis pyrifera* on spatial and temporal variability. *Marine Biology*, 1984, 84(2): 189–195
- GHOSH S, KLASS D L, CHYNOWETH D P. Bioconversion of *Macrocystis pyrifera* to methane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1981, 31(3): 791–807
- GONG S J, ZHAO W, QIAO J G, *et al.* Analysis of sediment characteristics and sedimentary environment in the Western Bohai Bay. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2017, 32(3): 50–57 [宫少军, 赵卫, 乔吉果, 等. 渤海湾西部海域底质特征及其沉积环境分析. *天津科技大学学报*, 2017, 32(3): 50–57]
- GRAHAM M H. Effect of high irradiance on recruitment of the giant kelp *Macracystis* (*Phaeophyta*) in shallow water. *Journal of Phycology*, 1996, 32(6): 903–906
- HERNAN M, JOE M R, ROBERT C B. Studies to improve the extraction of mannitol and alginic acid from *Macrocystis pyrifera* a marine brown alga. *Economic Botany*, 1977, 31(1): 24–27
- HU D Q, WANG F J. Study on the relationship between light time and the growth of gametophytes and young sporophytes of *Macrocystis pyrifera*. *Marine Fisheries Research*, 1986, 7: 17–26 [胡敦清, 王飞久. 光照时间与巨藻配子体和幼孢子体生长关系的研究. *海洋水产研究*, 1986, 7: 17–26]
- HU D Q. Effect of light intensity on gametophyte growth and development of *Macrocystis pyrifera*. *Marine Fisheries*

- Research, 1984, 5: 21–26 [胡敦清. 光照强度对巨藻配子体生长发育的影响. 海洋水产研究, 1984, 5: 21–26]
- LI G L, WANG W J, LI B X, *et al.* Prediction of the suitable distribution of *Costaria costata* in Chinese waters based on MaxEnt model and ArcGIS. Chinese Fisheries Science, 2021, 28(12): 1588–1601 [李国梁, 汪文俊, 李宝贤, 等. 基于 MaxEnt 模型和 ArcGIS 预测多肋藻在中国海域的适生分布. 中国水产科学, 2021, 28(12): 1588–1601]
- LI Y Y. Numerical simulation of hydrodynamic environment in the Bohai Sea. Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2017 [李原仪. 渤海水动力环境的数值模拟研究. 天津大学博士研究生学位论文, 2017]
- LING J Y, LIANG Z R, SUN X T, *et al.* Preliminary study on photosynthesis and respiration of giant algae seedlings. Journal of Fisheries, 2014, 38(6): 820–828 [凌晶宇, 梁洲瑞, 孙修涛, 等. 巨藻幼苗光合、呼吸作用的初步研究. 水产学报, 2014, 38(6): 820–828]
- LIU T J, SUO R Y, LIU X Y, *et al.* Introduction and artificial seedling raising of *Macrocystis pyrifera*. Marine Fisheries Research, 1981, 2: 69–79 [刘恬敬, 索如瑛, 刘绪炎, 等. 巨藻(*Macrocystis pyrifera*)引进与人工育苗. 海洋水产研究, 1981, 2: 69–79]
- LIU Y D, FAN X, HU Z Y. Research on algae in China. Wuhan: Wuhan Publishing House, 2001, 125 [刘永定, 范晓, 胡征宇. 中国藻类学研究. 武汉: 武汉出版社, 2001, 125]
- LU W W. Effects of temperature, light intensity and salinity on the growth and biochemical composition of juvenile sporophytes of *Macrocystis pyrifera*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015 [芦薇薇. 温度、光照强度和盐度对巨藻(*Macrocystis pyrifera*)幼孢子体生长和生化组成的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- MANSILLA A, AVILA M. Using *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh from southern Chile as a source of applied biological compounds. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2011, 21(2): 262–267
- MARTÍN-GARCÍA L, HERRERA R, MORO-ABAD L, *et al.* Predicting the potential habitat of the harmful cyanobacteria: Ecological niche model of invasive seaweeds. Harmful Algae, 2014, 34: 76–86
- MATEUS H, REGENSTEIN J M, BAKER R C. The amino acid composition of the marine brown alga *Macrocystis pyrifera* from Baja California, Mexico. Botanica Marina, 1976, 19(3): 155–159
- MENG Y, MA J M, WANG Y Q, *et al.* Simulation of *Loropetalum chinense* distribution pattern based on MaxEnt model. Journal of Ecology, 2020, 40(22): 8287–8296 [孟影, 马姜明, 王永琪, 等. 基于 MaxEnt 模型的榿木分布格局模拟. 生态学报, 2020, 40(22): 8287–8296]
- PHILLIPS S J, DUDÍK M. Modeling of species distributions with MaxEnt: New extensions and a comprehensive evaluation. Ecography, 2008, 31(2): 161–175
- QIU Y F, WANG J, XU M. distribution and health risk assessment of heavy metals in seawater, sediments and organisms in coastal waters of Binhai County, Jiangsu Province. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 2021, 44(1): 71–78 [裘奕斐, 王静, 徐敏. 江苏滨海县近岸海域海水、沉积物和生物体重金属分布及健康风险评价. 南京师大学报(自然科学版), 2021, 44(1): 71–78]
- SUN X, LIU F L, LIANG Z R, *et al.* Prediction of the suitability of Arctic kelp in the Yellow Sea and Bohai Sea in China based on MaxEnt model. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(5): 71–77 [孙昕, 刘福利, 梁洲瑞, 等. 基于 MaxEnt 模型预测极北海带在我国黄渤海的适生情况. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 71–77]
- SUO R Y, LIU G Y, SHI Z J, *et al.* Submerged culture experiment of *Macrocystis pyrifera* in the coastal waters of Nan Huang Cheng. Marine Fisheries Research, 1986, 7: 1–7 [索如瑛, 刘光涌, 史致基, 等. 南隍城近海巨藻悬绳潜养实验. 海洋水产研究, 1986, 7: 1–7]
- TRAN P, SHAW R, CHANTRY G, *et al.* GIS and local knowledge in disaster management: A case study of flood risk mapping in Vietnam. Disasters, 2010, 33(1): 152–169
- TYBERGHEIN L, VERBRUGGEN H, PAULY K, *et al.* Bio-ORACLE: A global environmental dataset for marine species distribution modelling. Global Ecology and Biogeography, 2012, 21(2): 272–281
- WANG F J, LIU G Y, ZHANG S, *et al.* Research on submerged raft culture technology of *Macrocystis pyrifera*. Progress in Fishery Sciences, 1999, 20(1): 64–68 [王飞久, 刘光涌, 张遂, 等. 巨藻筏式养殖技术的研究. 渔业科学进展, 1999, 20(1): 64–68]
- WANG X, LIU F L, LIANG Z R, *et al.* Effects of iron ions on the growth and development of kelp gametophyte clone lines. China Fisheries Science, 2020, 27(9): 1052–1061 [王潇, 刘福利, 梁洲瑞, 等. 铁离子对海带配子体克隆系生长发育的影响. 中国水产科学, 2020, 27(9): 1052–1061]
- WANG Y S, XIE B Y, WAN F H, *et al.* Application of ROC curve analysis in evaluating invasive species distribution model. Biodiversity, 2007, 15(4): 365–372 [王运生, 谢丙炎, 万方浩, 等. ROC 曲线分析在评价入侵物种分布模型中的应用. 生物多样性, 2007, 15(4): 365–372]
- XIONG Q L, HE Y L, DENG F Y, *et al.* Response assessment of alpine vegetation to climate change in Southwest China based on MaxEnt model. Journal of Ecology, 2019, 39(24): 9033–9043 [熊巧利, 何云玲, 邓福英, 等. 基于 MaxEnt 模型西南地区高山植被对气候变化的响应评估. 生态学报, 2019, 39(24): 9033–9043]
- XU D H, LI J, ZHAO J T, *et al.* Grain size distribution characteristics of surface sediments in Liaodong Bay and its geological significance. Marine Geology and Quaternary Geology, 2012, 32(5): 35–42 [徐东浩, 李军, 赵京涛, 等. 辽东湾表层沉积物粒度分布特征及其地质意义. 海洋地质与第四纪地质, 2012, 32(5): 35–42]
- XU H Y. Study on the transformation of nutritional status and nutrient benchmark in the Bohai Sea. Master's Thesis of the First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, 2020 [徐菡悦. 渤海营养状态转变及营养盐基

- 准研究. 自然资源部第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2020]
- ZHANG H W, ZHAO J, YAN B J, *et al.* Prediction of suitable habitat of *Lantana camara* in China based on MaxEnt model and GIS. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2020, 36(11): 1420–1427 [张华伟, 赵健, 阎波杰, 等. 基于 MaxEnt 模型和 GIS 的马缨丹在中国的适生区预测. *生态与农村环境学报*, 2020, 36(11): 1420–1427]
- ZHU G P, QIAO H J. Impact of MaxEnt model complexity on prediction of potential distribution areas of species. *Biodiversity*, 2016, 24(10): 1189–1199 [朱耿平, 乔慧捷. MaxEnt 模型复杂度对物种潜在分布区预测的影响. *生物多样性*, 2016, 24(10): 1189–1196]
- ZHU Y L. American research on marine farms. *Fishery Modernization*, 1984(3): 16–17, 48 [朱永良. 美国对海洋农场的研究. *渔业现代化*, 1984(3): 16–17, 48]
- ZIMMERMAN R C, KREMER J N. In situ growth and chemical composition of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*: Response to temporal changes in ambient nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series*, 1986, 27: 277–285

(编辑 冯小花)

Potential Geographic Distribution of *Macrocystis pyrifera* in China Based on MaxEnt Model and ArcGIS

LI Baoxian^{1,2}, LI Guoliang², YAO Haiqin², SHEN Xin¹, LU Xiaoping², LIANG Zhouhui²,
LIU Fuli², ZHANG Pengyan², WANG Wenjun^{2①}

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 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, Shandong 266071, China)

Abstract *Macrocystis pyrifera* is a large perennial brown alga used as a raw material in the chemical, energy, and medicine industries. It is also a high-quality material for the construction of seaweed beds with extremely high economic and ecological value. In the 1980s, *M. pyrifera* was introduced to China, and many experiments on its seedling and cultivation technologies were undertaken. However, research on its ecological adaptability is relatively challenging, and the aquaculture industry has not yet developed due to bottleneck problems. In the present study, the MaxEnt model was used to predict the suitability and potential invasion risk of *M. pyrifera* in China to lay a foundation for *M. pyrifera* culture industry development and marine ecological construction. Parameter optimization showed that the predictive performance of the model was the best when the feature combination was product, quadratic, and hinge features and the regularization multiplier was 0.8. Considering the correlation between environmental attributes and their contribution to the model, six environmental factors were selected to construct a prediction model for the suitability of *M. pyrifera*. Among these, light intensity and temperature produced the greatest impact on the natural distribution of *M. pyrifera*. For high suitable growth probability, the optimal light intensity was $> 2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and the optimum temperature range was 10.5–17°C. Combined with ArcGIS, the modeling results showed that the suitable habitats for *M. pyrifera* in China are mainly distributed in the Yellow Sea and Bohai Sea, accounting for approximately 13.17% of the sea area, with a marginal suitability of 5.46%, low suitability of 2.85%, moderate suitability of 1.20%, and high suitability of 3.66%. Furthermore, Liaodong Bay and Bohai Bay are suitable sea areas for the introduction and cultivation of *M. pyrifera* as well as the construction of *M. pyrifera* farms. Some areas in Liaodong Bay are highly suitable, indicating a certain risk of invasion. Therefore, ecological safety evaluations should be strengthened if *M. pyrifera* cultivation is promoted near this area.

Key words *Macrocystis pyrifera*; MaxEnt; ArcGIS; Potential suitable area

① Corresponding author: WANG Wenjun, E-mail: wjwang@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211129001

http://www.yykxjz.cn/

顾梓鹏, 任玉东, 程芬, 张晓雯, 徐东, 叶乃好, 梁成伟. 巨藻中谷胱甘肽 S 转移酶基因对细长聚球藻 PCC7942 耐镉性的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 127-136

GU Z P, REN Y D, CHENG F, ZHANG X W, XU D, YE N H, LIANG C W. Effects of the glutathione S-transferase gene extracted from giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) on the cadmium tolerance of *Synechococcus elongatus* PCC7942. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 127-136

巨藻中谷胱甘肽 S 转移酶基因 对细长聚球藻 PCC7942 耐镉性的影响*



顾梓鹏¹ 任玉东¹ 程芬² 张晓雯^{3,4}
徐东^{3,4} 叶乃好^{3,4} 梁成伟^{1①}

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院 山东 青岛 266042; 2. 海南省海洋与渔业科学院 海南省热带海水养殖技术重点实验室 海南 海口 571126; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071; 4. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase, GST)是一个较大的基因家族,在生物体生长发育和对环境变化响应中发挥重要的调控作用。本研究从巨藻(*Macrocystis pyrifera*)配子体中克隆了 6 个完整的 GST 基因(*mpgst1*、*mpgst2*、*mpgst3*、*mpgst4*、*mpgst5* 和 *mpgst6*)。随后将 6 个巨藻 GST 基因分别转化至细长聚球藻(*Synechococcus elongatus* PCC7942)中,提取细长聚球藻转化株基因组 DNA 作为模板进行 PCR 验证及测定转化株 GST 酶活进行基因功能验证,结果显示,6 个 *mpgst* 基因都分别成功整合到细长聚球藻的基因组中,但只有含 *mpgst1*、*mpgst4* 和 *mpgst6* 基因的细长聚球藻转化株(MG1、MG4 和 MG6)具有耐镉性。在镉离子胁迫下,细长聚球藻转化株 MG1、MG4 和 MG6 的生长、光合色素含量和叶绿素荧光参数 F_v/F_m 值均显著高于野生株($P<0.05$)。本研究结果为进一步研究巨藻 GST 基因的抗重金属胁迫功能奠定了基础。

关键词 谷胱甘肽 S 转移酶基因; 转基因; 镉离子胁迫; 巨藻; 细长聚球藻 PCC7942

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0127-10

褐藻(Phaeophyta)具有重要的经济价值,在工农业生产中得到广泛应用(Khan *et al*, 2009; Rassweiler *et al*, 2018)。大多数褐藻生活在潮间带和潮下带,受盐度、温度和光照胁迫的波动水平影响(Hurd *et al*, 2014)。巨藻(*Macrocystis pyrifera*)是褐藻中较为常见的一种,因其体积大和生长速度快的特点,长期以来被认为是最有希望用于生物量产的大型藻类物种之一(Navarrete *et al*, 2021)。巨藻在潮下带形成了密集

的海藻床和海藻林,产生了大量的生物量,决定了生态系统的结构(Bolton, 2021)。巨藻分布广泛,暴露在各种环境条件下,能够适应各种非生物和生物胁迫(Shukla *et al*, 2017; Wiencke *et al*, 2012)。

随着现代工农业的快速发展和矿产资源的开发利用,生态环境,特别是水生环境中的重金属污染日益严重。虽然海水中适量的重金属元素不会对海洋生物产生有害影响,有些重金属甚至可以作为藻类正常

* 海南省热带海水养殖技术重点实验室开放基金(TMTOF202105)、国家自然科学基金(31770393)和泰山学者青年专家项目(tsqn202103136)共同资助。顾梓鹏, E-mail: gzp17712231677@163.com

① 通信作者: 梁成伟, 教授, E-mail: liangchw117@126.com

收稿日期: 2021-11-29, 收修改稿日期: 2021-12-29

生长和代谢所必需的微量营养物质, 但当其含量过高时, 就会对藻类造成伤害, 产生污染(Maxwell *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2003; Plekhanov *et al.*, 2003)。目前, 重金属对藻类的毒性已成为污染生态学的研究热点之一(Collén *et al.*, 2003)。研究表明, 高浓度的金属通过抑制生长、触发氧化损伤、影响基因表达以及破坏光合细胞和线粒体, 从而对硅藻(Diatom)产生有害影响(Stauber *et al.*, 1989; Cid *et al.*, 1995; Rijstenbil *et al.*, 2002; Herzi *et al.*, 2013)。在各种金属中, 镉(Cd)的毒性特别强, 很容易在许多海洋生物中积累, 为应优先关注的污染物之一(Blackmore, 1998; Olivier *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2015; 徐莞媛等, 2020)。通常情况下, 沉积物和开放海水中的 Cd 浓度很低(Blackmore, 1998), 但由于泄漏或人为排放, 在一些近海和河口地区 Cd 浓度会变高(Simpson, 1981; Villanueva *et al.*, 1992)。Cd 可以通过与蛋白质中氨基酸的羟基进行非特异性结合, 取代金属酶中的必需金属并造成细胞氧化损伤来发挥生物毒性(Mostofa *et al.*, 2015)。虽然 Cd 在大型藻类中没有明确的代谢功能, 但有研究证明, Cd 是威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)碳酸酐酶的辅助因子(Lane *et al.*, 2000)。

谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase, GSTs, EC2.5.1.18)普遍存在于所有生物体中, 是由一个大的基因家族编码的多功能蛋白(Han *et al.*, 2018)。GSTs 主要通过催化还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)与广泛的疏水和亲电底物结合来解毒外来物质(Frova, 2003)。除了其解毒功能外, GSTs 还在其他生理和发育过程中发挥重要作用, 包括次级代谢、信号转导、抗紫外线辐射、抗氧化损伤及对重金属的解毒作用(Dixon *et al.*, 2010; Edwards *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2004)。目前, 关于 GSTs 对重金属解毒作用的研究较多, 研究表明 GST 酶活的增加与重金属耐受性的提高呈正相关, 说明 GSTs 在提高植物重金属耐受性方面发挥了重要作用(Canado *et al.*, 2005; Darko *et al.*, 2004; Dawood *et al.*, 2012)。例如, 有报道称, 南极冰藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)在 Cd 胁迫下, GST 酶活增加(Contreras-Porcía *et al.*, 2011)。

由于目前大型藻类缺乏稳定的遗传转化操作系统, 利用大型藻类验证功能尚不明确的基因和蛋白存在较大的困难。本研究克隆巨藻的 GST 基因, 将其构建到细长聚球藻(*Synechococcus elongatus* PCC7942)的表达载体中并在细长聚球藻中表达, 旨在研究巨藻 GST 在 Cd²⁺耐受中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料培养

巨藻配子体由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。使用前, 所有样品用过滤海水进行冲洗, 去除可见的附生异物。然后将样品在 10℃ 的无菌海水中培养 24 h。

细长聚球藻 PCC7942 来自 GeneArt™ 聚球藻蛋白表达试剂盒(ThermoFisher Scientific, 美国), 并在 Blue-Green (BG11)培养基中培养 7 d, 培养温度为 (25±2)℃, 光照强度为 100 μmol photons/(m²·s)。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 100 mg 巨藻配子体样品, 将水分吸干, 用液氮冷冻处理后进行研磨。采用 E.Z.N.A.植物 RNA 提取试剂盒(Omega, 美国)进行 RNA 的提取。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, 美国)分别检测 RNA 的完整性和浓度。

使用 *Evo M-MLV Plus* 第一链 cDNA 合成试剂盒(艾科瑞, 中国)反转录 RNA, 合成 cDNA。

1.3 巨藻 GST 基因 cDNA 的克隆

根据巨藻转录组序列(国家基因库登录号 CNP0001061)选取 6 个 GST 基因的 cDNA 序列, 设计两端含有酶切位点的基因特异性引物(睿博, 中国)(表 1)用于构建表达载体。以 cDNA 为模板, 添加 2×Pro *Taq* Master Mix(含染料)(艾科瑞, 中国)扩增 GST 基因。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 扩增 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 2 min。对 PCR 产物进行测序。

1.4 巨藻 GST 基因在细长聚球藻中的异源表达

为了研究巨藻 GST 基因的功能, 根据 GeneArt™ 聚球藻蛋白表达试剂盒(ThermoFisher Scientific, 美国)的操作说明, 构建分别含有 6 个巨藻 GST 基因(*mpgst1*~*mpgst6*)的重组表达载体, 转化至细长聚球藻细胞, 并将含 *mpgst1*~*mpgst6* 的转化株分别命名为 MG1~MG6。

使用 E.Z.N.A. HP 植物 DNA 提取试剂盒(Omega, 美国)提取转化株的基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 添加特异性引物(表 1), 使用 2×Pro *Taq* Master Mix(含染料)(艾科瑞, 中国)扩增靶基因。然后对 PCR 产物进行测序验证。

表 1 本研究使用的引物序列
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	酶切位点 Restriction site
G1-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGGCTCCC GTGTT	Hind III
G1-R	CGCGGATCCG GCCTCGAAGCGTA	BamH I
G2-F	CCGGAATTCATGGCTTCCACCA	EcoR I
G2-R	CGGGGTACCCTTGGTGCTGAT	Kpn I
G3-F	CCGGAATTCATGCCGATTCGGT	EcoR I
G3-R	CGGGGTACC GGAGCTGTAGTTC	Kpn I
G4-F	CCGGAATTCATGGCCCCCGTATT	EcoR I
G4-R	CGGGGTACC GCCTTGGAAGCGTA	Kpn I
G5-F	CCCA <u>AAGCTT</u> ATGAGCCCCAAGCTT	Hind III
G5-R	CGCGGATCC TGCCCTCGACTCCA	BamH I
G6-F	CCGGAATTCATGGCTCCC GTATT	EcoR I
G6-R	CGGGGTACCCTAGGCCTTGGATG	Kpn I

注: 限制性内切酶作用位点用下划线标出。

Note: The restriction endonuclease action sites are underlined.

1.5 转化株酶活的测定

取培养至对数期的细长聚球藻藻液, 用 GST 检测试剂盒(科铭, 中国)分析转化株的 GST 酶活性, 以不含酶提取物的混合液作为对照。

1.6 Cd²⁺胁迫下细长聚球藻生理指标的变化

将野生株和转化株用 BG11 培养基培养至对数期, 稀释藻液, 使得每个样品 750 nm 处吸光度值(OD_{750 nm})为 0.01。然后加入 CdCl₂ 溶液, 使得每个样品中 Cd²⁺的浓度为 0.2 mg/L, 将等量的处理后的藻液加入到多孔板中(包括未添加 Cd²⁺的对照样品), 所有处理重复 3 次。将多孔板置于恒温培养箱中观察细长聚球藻的生长情况, 筛选出有抗性的转化株, 培养温度为 (25±2)°C, 光照强度为 100 μmol photons/(m²·s)。

将藻液转移至三角瓶中并重复之前的胁迫处理, 然后在恒温培养箱中培养, 检测 Cd²⁺胁迫下细长聚球藻的生长、光合色素含量和叶绿素荧光参数。用分光光度计每隔 2 d 检测细长聚球藻的 OD_{750 nm} 值, 持续 12 d, 测定其生长情况。按照肖丽等(2008)和 Wang 等(2020)提到的方法, 在培养第 12 天时从细长聚球藻中提取色素, 并按照 Lichtenthaler 等(2001)提出的方法计算叶绿素 a (Chlorophyll a, Chl-a)和类胡萝卜素 (Carotenoid, Car)的含量。使用 Maxi-Imaging- PAM (Walz, 德国)测量了光系统 II (photosystem II complex, PS II)的最大量子产率(F_v/F_m), 采用 Zhang 等(2021)的方法进行叶绿素荧光参数测定前藻液的处理。最大量子产率(F_v/F_m)的计算遵循 Genty 等(1989)中的方法。所有实验均重复进行 3 次。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)和双因素方差分析(two-way ANOVA)来分析实验处理组和对照组之间的差异显著性。使用 R(3.5.3)和 Adobe Illustrator CS6 软件来绘制和修改图形。 $P < 0.05$ 表示存在显著差异(Zar, 1996)。

2 结果与分析

2.1 巨藻 GST 基因克隆

采用 RT-PCR 方法从巨藻中克隆出 6 个 GST 基因的 cDNA, 琼脂糖凝胶电泳的检测结果如图 1 所示。结果显示, *mpgst3* 基因大小约 800 bp, 其余 5 个基因片段的大小约为 700 bp, 与目的基因的大小大致相同。这 6 个 *mpgst* 的 cDNA 序列已储存到 GenBank 中, 登录号为 OL362284~OL362289。

2.2 转 *mpgst* 细长聚球藻阳性克隆子鉴定及 GST 酶活性测定

本研究选择细长聚球藻 PCC7942 来验证巨藻 GST 基因功能。对细长聚球藻转化株进行基因组 DNA 的提取, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 验证。琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 2), 所有转化株都检测到阳性 PCR 产物, 并且经过测序分析, 其序列没有错误, 表明 *mpgst* 已成功整合到细长聚球藻基因组中。

为了进一步证实 *mpgst* 的异源表达, 测定了生长至对数期的野生株和转化株的 GST 酶活性, 结果如图 3 所示。除 MG6 外, 其他转化株的酶活性与野生

株均有显著差异($P<0.05$), 而 MG6 的酶活性也略有上升($P>0.05$)。转化株酶活性的增加进一步证实了巨藻 GST 基因在细长聚球藻中成功表达, 为后续检测生理指标提供了依据。

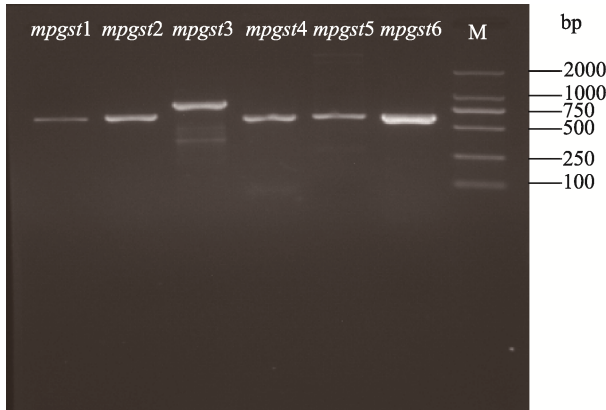


图1 巨藻 GST 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the GST genes of *M. pyrifera*

M: DL2000 DNA Marker

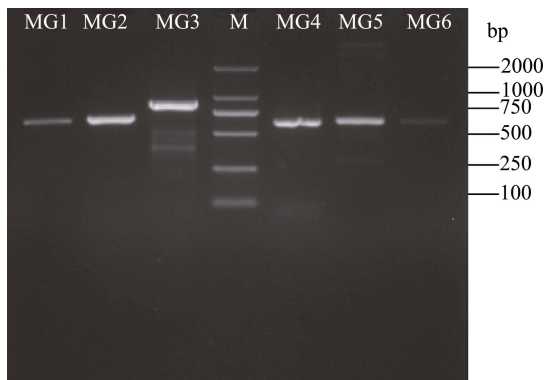


图2 *mpgst* 的转基因验证

Fig.2 Transgenic verification of *mpgst*

MG1~MG6 表示分别以转化株 MG1~MG6 基因组 DNA 为模板扩增得到 *mpgst*, M 表示 DL2000 DNA 标记。

MG1~MG6 represent the *mpgst* amplified by using genomic DNA of transformed strains MG1~MG6 as the template, respectively. M represents the DL2000 DNA Marker.

2.3 Cd²⁺胁迫下转化株的生理指标分析

经过几天的观察, MG1、MG4、MG6 在 Cd²⁺胁迫下正常生长, 而野生株和 MG2、MG3、MG5 不能生长(图 4)。这证明 *mpgst1*、*mpgst4*、*mpgst6* 能够改善 Cd²⁺对细长聚球藻的不良影响, 然而其他 3 个基因未表现出相应的抗性。为了进一步验证巨藻 GST 基因对 Cd²⁺的耐受性, 选择 MG1、MG4、MG6 及野生株的生长、光合色素、光合参数等生理指标进行进一步分析。

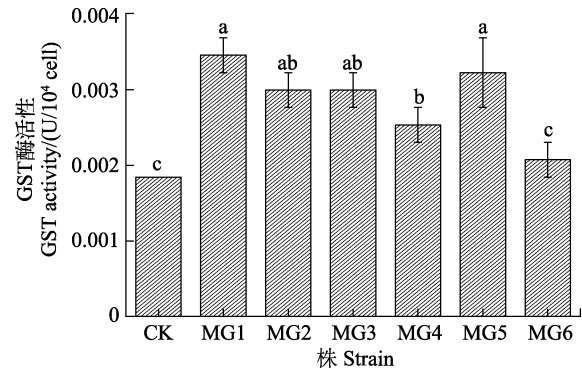


图3 转基因细长聚球藻的 GST 酶活性

Fig.3 GST activity of genetically modified *S. elongatus* PCC7942

CK 表示野生株, MG1~MG6 表示含有 *mpgst* 的转化株。误差条表示标准差(SD), $n=3$, 具有不同字母上标的数据间差异显著($P<0.05$), 下同。

CK represents the wild strain, MG1~MG6 represent the transformed strains containing *mpgst*.

The error bars indicate standard deviations (SD), $n=3$. Bar of each column with different small letters mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

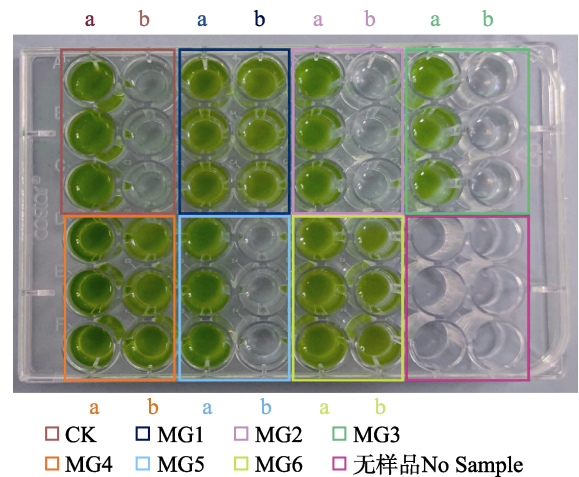


图4 Cd²⁺胁迫下细长聚球藻的多孔板培养实验

Fig.4 Multi-well plate culture experiment of *S. elongatus* PCC7942 under Cd²⁺ stress

a: 正常生长的细长聚球藻;

b: 加入 0.2 mg/L Cd²⁺的细长聚球藻

a: Normally growing *S. elongatus* PCC7942;

b: *S. elongatus* PCC7942 with 0.2 mg/L Cd²⁺ added

2.4 Cd²⁺胁迫下生物量分析

本研究中, 除对照组外, 所有转化株的吸光度值一直随时间增长, 且 6 d 后转化株吸光度值的增长速度普遍提高, 而 CK 的吸光度值在缓慢增长 8 d 后开始出现下降(图 5)。结果显示, Cd²⁺对野生株具有很强的毒性, 而对 MG1、MG4 和 MG6 转化株的毒性

不受暴露时间的影响。MG4 生长最好($P < 0.05$), 这与其表现出的较高的 GST 酶活性相吻合(图 3), 虽然 MG1 的酶活最高, 但 MG1 的其他生理指标却不是最好, 这可能与每一种 GST 酶的作用机制不同有关。

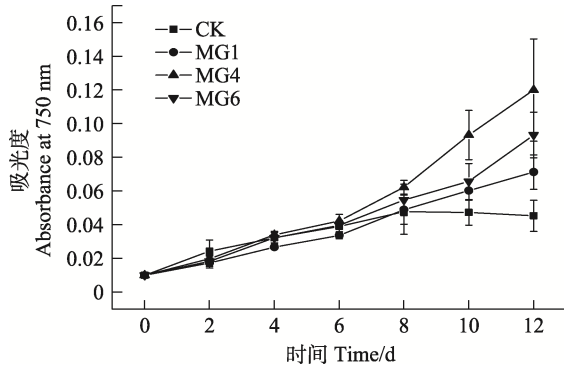


图 5 野生型和转基因细长聚球藻 PCC7942 在 Cd²⁺胁迫下的生长曲线

Fig.5 The growth curves of wild-type and transformed *S. elongatus* PCC7942 under Cd²⁺ stress

2.5 Cd²⁺胁迫下光合色素含量分析

叶绿素 a (Chl-a)是主要的光合色素, Chl-a 含量的降低会直接导致光合效率的降低。图 6 为正常培养和 Cd²⁺胁迫处理下第 12 天野生株和转化株 Chl-a 含量的变化。从图 6 可以看出, Cd²⁺处理后, 对照组中 Chl-a 含量下降最为明显, 藻体几乎不含 Chl-a ($P < 0.05$), 但所有转化株在处理前后的 Chl-a 含量差异不显著($P > 0.05$), 这之前生物量(图 5)及 GST 酶活性(图 4)的测量所表现出的结果相吻合。转化株 MG6 的 Chl-a 含量最高, 但都相对于野生株而言显著降低, 这可能是因为转化株获得了外源基因, 影响了细胞内的代谢, 具体原因需要进一步实验进行验证。

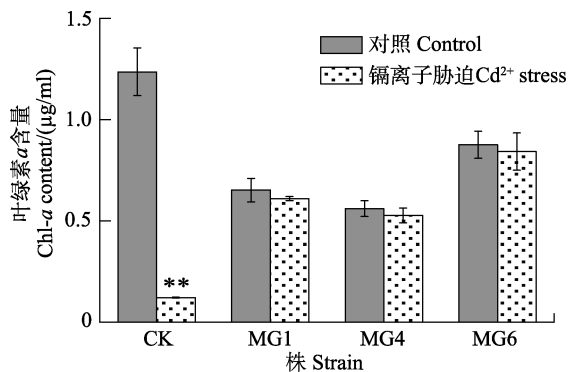


图 6 Cd²⁺胁迫下野生型和转基因细长聚球藻叶绿素 a 含量

Fig.6 The chlorophyll a content of wild-type and transformed *S. elongatus* PCC7942 under Cd²⁺ stress

有星号上标的 2 组数据间差异显著($P < 0.05$), 下同。

There was a significant difference between the two groups with asterisks ($P < 0.05$). The same as below.

类胡萝卜素(Car)是最重要的捕光色素之一。图 7 为正常培养和 Cd²⁺胁迫处理下第 12 天野生株和转化株 Car 含量的变化。从图 7 可以看出, Cd²⁺处理后, 大部分细长聚球藻的 Car 含量下降, 以对照组表现最明显, 藻体几乎不含 Car ($P < 0.05$), 这与之前测定的生物量(图 7)和 Chl-a 含量(图 8)的结果一致。

2.6 Cd²⁺胁迫下叶绿素荧光参数(F_v/F_m)分析

叶绿素荧光参数(F_v/F_m)与光合作用密切相关, 是判断胁迫对植物光合作用影响的真实指标(冯力霞, 2006)。图 8 为野生株和转化株在正常培养和 Cd²⁺胁迫处理下第 12 天 F_v/F_m 的变化。如图 8 所示, Cd²⁺处理后, 细长聚球藻的 F_v/F_m 均明显下降($P < 0.05$), 对照组最为明显, F_v/F_m 为 0, 藻类已经不显荧光, 几乎死亡。这与之前对生物量(图 5)及色素含量(图 6 和图 7)的测量结果一致。此外, MG6 的 F_v/F_m 与 Chl-a 含量变化趋势相同, 数值较高且 Cd²⁺胁迫前后差异不大, 生长效果较好。光合参数与光合色素含量的结果高度一致。

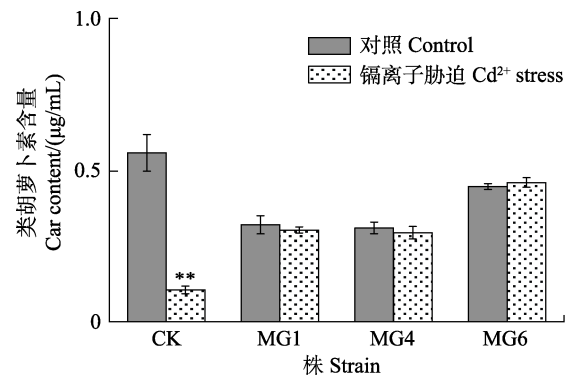


图 7 Cd²⁺胁迫下野生型和转基因细长聚球藻 PCC7942 的类胡萝卜素含量

Fig.7 The carotenoid content of the wild-type and transformed *S. elongatus* PCC7942 under Cd²⁺ stress

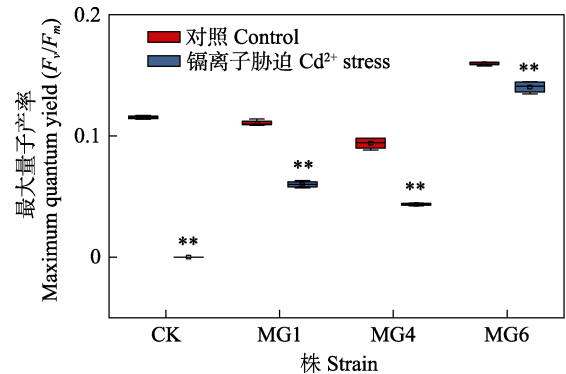


图 8 Cd²⁺胁迫下野生型和转基因细长聚球藻的最大量子产率(F_v/F_m)

Fig.8 The maximum quantum yield (F_v/F_m) of wild-type and transformed *S. elongatus* PCC7942 under Cd²⁺ stress

3 讨论

对于海洋藻类来说,非生物胁迫可能是来自光过量或不足、紫外线辐射、温度不适宜、营养限制、厌氧条件、盐度不适宜、干燥或者无机碳的限制(Davison *et al.*, 1996)。此外,还来源于接触汞、镉、铅和铜等重金属物质(Collén *et al.*, 2003)。在高等植物中, Cd^{2+} 通过和硫醇基团之间的反应,干扰生长、光合作用、离子和水的运输,以及降低酶活性(Prasad, 1995)。虽然 Cd^{2+} 可能不是大型藻类生长所必需的,但它很容易被吸收,研究表明,江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*)在光照条件下增强了对 Cd^{2+} 的吸收(Hu *et al.*, 1996)。相比其他金属离子, Cd^{2+} 不会直接影响植物的光合作用,而是干扰植物的其他代谢过程,具有更广泛的毒性作用,引起氧化应激。谷胱甘肽转移酶(GSTs)是一类具有多种功能的超家族蛋白,植物 GSTs 根据其免疫交叉反应性、蛋白序列相似性、基因结构、底物特异性和特异性残基的保守性可分为 14 类。由于其功能和种类的多样性,在多种外源性和内源性化合物的细胞解毒过程中发挥着重要作用。GST 既具有过氧化物酶的活性,同时,可以直接清除分子结构里带有亲电基团的化合物(孙小雨等, 2021)。因此,研究 GST 有助于阐明植物生长和抵御胁迫的分子机制,对提高胁迫条件下植物的生存能力具有实际意义(梁志乐等, 2019)。

由于细长聚球藻 PCC7942 易于培养,基因组较小,易于通过自然转化或接合转移进行基因操作(Atsumi *et al.*, 2009; Ducat *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2000)。本研究中,选择细长聚球藻来验证巨藻 GST 基因的功能。金属离子对藻类细胞生长的影响因其浓度的不同而有所差异。用不同浓度的 Cd^{2+} 处理小球藻(*Chlorella vulgaris*)时,0.5 mg/L 浓度的 Cd^{2+} 使藻的生长提高了 7%,而更高的 Cd^{2+} 浓度则降低了藻的生长(El-Nagga *et al.*, 2014)。本研究中,预实验确定 0.2 mg/L 的实验浓度作为能使野生株死亡但使部分转化株正常生长的 Cd^{2+} 浓度,之后筛选出具有抗性的转化株 MG1、MG4、MG6 进行后续实验。预实验中部分转化株不具有抗性,可能是因为转入的这些巨藻 GST 基因属于不同的 GST 基因家族从而具有不同的生物学功能。金属胁迫下藻类 GST 酶活性的增加通常伴随着生长的差异。用 Cd^{2+} 胁迫处理南极冰藻(*Chlamydomonas sp.* ICE-L),其 GST 酶活性增加,生长曲线发生相应的变化(Ding *et al.*, 2005)。本研究分别测定了细长聚球藻的 GST 酶活性和 $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$ 值的

变化,以检测转化株对 Cd^{2+} 的耐受性。结果表明,转化株的 GST 酶活性均高于野生株,这也解释了为什么 Cd^{2+} 处理后野生株的生长在第 8 天开始下降,而转化株的生长则呈稳定上升趋势。然而,野生株在 Cd^{2+} 处理初期生长缓慢上升,可能与 Cd^{2+} 作为辅助因子的作用有关,具体的内在调控机制还需要进一步研究。

叶绿素 *a* (Chl-*a*)和类胡萝卜素(Car)是大型海藻光合作用的主要色素,Chl-*a* 含量的变化是衡量藻细胞生理状况的重要指标,Car 作为一种重要捕光色素的同时也发挥着抗氧化剂的作用。较低的重金属浓度可促进色素含量的增加,而较高的重金属浓度会抑制叶绿素的合成,导致叶绿素含量降低、光合效率降低(Brown *et al.*, 2003)。朱喜锋(2010)研究表明, Cd^{2+} 通过损害光合作用器官和结合生物大分子的活性位点(如 Cd^{2+} 取代叶绿素分子中心的 Mg^{2+} 从而破坏叶绿素结构)来影响光合作用。对江蓠进行了高浓度的 Cd^{2+} 处理,发现胁迫处理下江蓠的 Chl-*a* 含量明显低于对照组,但 Car 含量略高于对照组(Collén *et al.*, 2003)。本研究中,测量了 Cd^{2+} 处理下转化株和野生株的 Chl-*a* 及 Car 含量,并分别设置了转化株的对照组(未添加 Cd^{2+}),发现野生株的色素含量在处理前后差异显著,其处理组几乎不含色素,接近死亡,而转化株生长正常,这与生长曲线所表现出的结果一致。

PS II 最大光能转化效率(F_v/F_m)又称 PS II 的光化学最大量子产量,是暗适应下 PS II 的最大光化学效率,反映了光合自养生物潜在的最大光合作用能力,常作为植物光合性能是否受损的敏感性指标(Kuma *et al.*, 2014)。1 mmol/L 的 Cd^{2+} 可在短期(0.5~2 h)内迅速降低蛋白核小球藻 S-39 (*Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39)的光合放氧速率和 F_v/F_m 值,使 PS II 光合电子传递过程受到抑制(Plekhanov *et al.*, 2003)。本研究在 Cd^{2+} 处理下测量转化株和野生株的 F_v/F_m 值,结果与 Chl-*a* 的测定结果基本一致。在 Cd^{2+} 胁迫下,野生株不显叶绿素荧光,而转化株正常生长,进一步验证了巨藻 GST 在提高 Cd^{2+} 的耐受性中的作用。

4 结论

本研究从巨藻中获得 6 个谷胱甘肽 S 转移酶(GST)基因,并且将其构建到细长聚球藻表达载体,成功将巨藻的 *gst* 基因转化到细长聚球藻中,在细长聚球藻 PCC7942 中验证了它们的功能。结果表明,虽然在 6 个转化株中 GST 酶活性都增加,但有 3 个 *mpgst* 基因显著提高了细长聚球藻对 Cd^{2+} 胁迫的耐受性,说明巨藻中不同的 GST 具有不同的功能。本研

究初步探索了巨藻中 GSTs 的生理功能, 为今后镉污染条件下藻类耐受品系的培养奠定了理论基础。

参 考 文 献

- ATSUMI S, HIGASHIDE W, LIAO J C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1177–1180
- BLACKMORE G. An overview of trace metal pollution in the coastal waters of Hong Kong. *Science of the Total Environment*, 1998, 214(1/2/3): 21–48
- BOLTON J J. The biogeography of kelps (Laminariales, Phaeophyceae): A global analysis with new insights from recent advances in molecular phylogenetics. *Helgoland Marine Research*, 2021, 64(4): 263–279
- BROWN M T, NEWMAN J E. Physiological responses of *Gracilariopsis longissima* (S.G. Gmelin) Steentoft L. M. Iryine and Farnham (Rhodophyceae) to sub-lethal copper concentrations. *Aquatic Toxicology*, 2003, 64(2): 201–213
- CANADO G M A, DE ROSA V E, FERNANDEZ J H, *et al.* Glutathione S-transferase and aluminum toxicity in maize. *Functional Plant Biology*, 2005, 32(11): 1045–1055
- CHAKRABORTY P, RAMTEKE D, CHAKRABORTY S, *et al.* Relationship between the lability of sediment-bound Cd and its bioaccumulation in edible oyster. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 100(1): 344–351
- CID A, HERRERO C, TORRES E, *et al.* Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: Effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 1995, 31(2): 165–174
- COLLÉN J, PIOTO E, PEDERSÉN M, *et al.* Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 45(3): 337–342
- CONTRERAS-PORCIA L, DENNETT G, GONZÁLEZ A, *et al.* Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Marine Biotechnology*, 2011, 13(3): 544–556
- DARKO E, AMBRUS H, STEFANOVITS-BANYAI E, *et al.* Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, 2004, 166(3): 583–591
- DAVISON I R, PEARSON G A. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology*, 1996, 32(2): 197–211
- DAWOOD M, CAO F, JAHANGIR M M, *et al.* Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, s209/210(1): 121–128
- DING Y, MIAO J L, LI G Y, *et al.* Effect of Cd on GSH and GSH-related enzymes of *Chlamydomonas* sp. ICE-L existing in Antarctic ice. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(4): 667–671
- DIXON D P, EDWARDS R. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(47): 36322–36329
- DUCAT D C, SACHDEVA G, SILVER P A. Rewiring hydrogenase-dependent redox circuits in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 3941–3946
- EDWARDS R, DIXON D P, CUMMINS I, *et al.* Springer-organic xenobiotics and plants. In: Schröder P and Collins C D (ed) *New perspectives on the metabolism and detoxification of synthetic compounds in plants*. *Plant Ecophysiology*, 2011, 125–148
- EL-NAGGAR A H, SHEIKH H M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals. *Life Science Journal*, 2014, 11(10): 1349–1357
- FENG L X. Effects of environmental stress on the chlorophyll fluorescence of 4 microalgal strains. Master's Thesis of Ocean University of China, 2006 [冯力霞. 环境胁迫对 4 株微藻叶绿素荧光特性的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006]
- FROVA C. The plant glutathione transferase gene family: Genomic structure, functions, expression and evolution. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2003, 119(4): 469–479
- GENTY B, BRIANTAIS J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1989, 990(1): 87–92
- HAN X M, YANG Z L, LIU Y J, *et al.* Genome-wide profiling of expression and biochemical functions of the *Medicago* glutathione S-transferase gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 126(1): 126–133
- HERZI F, JEAN N, ZHAO H, *et al.* Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Chemosphere*, 2013, 93(6): 1230–1239
- HU S, TANG C H, WU M. Cadmium accumulation by several seaweeds. *Science of the Total Environment*, 1996, 187(2): 65–71
- HURD C L, HARRISON P J, BISCHOF K, *et al.* Seaweed ecology and physiology: Physico-chemical factors as environmental stressors in seaweed biology. 2nd edn. Cambridge University Press, 2014, 294–348
- JIANG C, GAO H, ZOU Q. Changes of donor and acceptor side in photosystem II complex induced by iron deficiency in attached-soybean and maize leaves. *Photosynthetica*, 2003, 41: 267–271

- KHAN W, RAYIRATH U P, SUBRAMANIAN S, *et al.* Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Plant Growth Regulation*, 2019, 28(4): 386–399
- KUMA K S, DAHMS H U, LEE J S, *et al.* Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104(2): 51–71
- LANE T W, MOREL F M M. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(9): 4627–4631
- LICHTENTHALER H K, BUSCHMANN C. Chlorophylls and carotenoids: Measurements and characterization by UV-Vis spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, F4.3.1–F4.3.8
- LIANG Z L, SHANG K H, WANG L H, *et al.* Cloning and expression analysis of the *AsGST* gene in garlic exposed to salinity stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(6): 1088–1095 [梁志乐, 尚珂含, 王立辉, 等. 大蒜谷胱甘肽硫转移酶基因 *AsGST* 的克隆及其对盐胁迫的响应. *核农学报*, 2019, 33(6): 1088–1095]
- MAXWELL K, JOHNSON G N. Chlorophyll fluorescence: A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659–668
- MIN H, GOLDEN S S. A new circadian class 2 gene, *opcA*, whose product is important for reductant production at night in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(21): 6214–6221
- MOSTOFA M G, RAHMAN A, ANSARY M M U, *et al.* Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14078
- NAVARRETE I A, KIM D Y, WILCOX C, *et al.* Effects of depth-cycling on nutrient uptake and biomass production in the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 141: 110747
- OLIVIER F, RIDD M, KLUMPP D. The use of transplanted cultured tropical oysters (*Saccostrea commercialis*) to monitor Cd levels in North Queensland coastal waters (Australia). *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(10): 1051–1062
- PLEKHANOV S E, CHERMERIS Y K. Early toxic effects of zinc, cobalt, and cadmium on photosynthetic activity of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* chick S-39. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2003, 30(5): 506–511
- PRASAD M N V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1995, 35(4): 525–545
- RASSWEILER A, REED D C, HARRER S L, *et al.* Improved estimates of net primary production, growth, and standing crop of *Macrocystis pyrifera* in Southern California. *Ecology*, 2018, 99(9): 2132
- RIJSTENBIL J W, GERRINGA L J A. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 2002, 56(2): 115–131
- SHARMA R, BROWN D, AWASTHI S, *et al.* Transfection with 4-hydroxynonenal-metabolizing glutathione S-transferase isozymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(9): 1690–1701
- SHUKLA P, EDWARDS M S. Elevated pCO₂ is less detrimental than increased temperature to early development of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae, Laminariales). *Phycologia*, 2017, 56(6): 638–648
- SIMPSON W R. A critical review of cadmium in the marine environment. *Progress in Oceanography*, 1981, 10(1): 1–70
- STAUBER J L, FLORENCE T M. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Research*, 1989, 23(7): 907–911
- SUN X Y, WANG Y Z, LI Y, *et al.* Effects of polychlorinated biphenyls (PCB₁₅₃) on the physiological ecology and ultrastructure of *Dicrateria zhanjiangensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 158–167 [孙小雨, 王祎哲, 李旸, 等. 多氯联苯(PCB₁₅₃)对湛江叉鞭金藻生理生态和超微结构的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 158–167]
- VILLANUEVA S, BOTELLO A V. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano: una revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 1992, 8(1): 47–61
- WANG Y, FAN X, GAO G, *et al.* Decreased motility of flagellated microalgae long-term acclimated to CO₂-induced acidified waters. *Nature Climate Change*, 2020, 10(6): 561–567
- WIENCKE C, BISCHOF K. *Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization*. Springer, 2012
- XIAO L, GAO R F, SUI F G. Effects of chloride stress on the photosynthesis and chlorophyll content of Chinese cabbage seedlings. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2008, 2(2): 44–47 [肖丽, 高瑞凤, 隋方功. 氯胁迫对大白菜幼苗叶绿素含量及光合作用的影响. *中国土壤与肥料*, 2008, 2(2): 44–47]
- XU W Y, MA H K, SUN J Q, *et al.* Biological functional analysis of MBL gene in resistance to cadmium stress in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 174–180 [徐莞媛, 马杭柯, 孙金秋, 等. 脊尾白虾甘露糖结合凝集素(MBL)基因在抗镉胁迫中的生物学功能分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 174–180]
- ZAR J. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 1996
- ZHANG Y, GU Z, REN Y, *et al.* Integrating transcriptomics and metabolomics to characterize metabolic regulation to elevated CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(2): 255–275
- ZHU X F. Studies on the toxic effects of mercury, copper and

cadmium to three economic marine algae. Master's Thesis of Shantou University, 2010 [朱喜锋. 重金属汞、铜和镉对

三种大型经济海藻毒性效应的研究. 汕头大学硕士研究生学位论文, 2010]

(编辑 冯小花)

Effects of the Glutathione S-Transferase Gene Extracted from Giant Kelp (*Macrocystis pyrifera*) on the Cadmium Tolerance of *Synechococcus elongatus* PCC7942

GU Zipeng¹, REN Yudong¹, CHENG Fen², ZHANG Xiaowen^{3,4}, XU Dong^{3,4},
YE Naihao^{3,4}, LIANG Chengwei¹①

(1. College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou, Hainan 571126, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Laminariales), has long been considered one of the most promising macroalgal species for biomass production because of its large size, rapid growth rate, and dynamic life history strategies. Brown seaweeds are economically important and commonly used for agricultural and industrial purposes. Intertidal and subtidal habitats, which most brown algae inhabit, are shaped by fluctuating levels of salinity-, temperature-, and light-related stresses. The responses of brown algae to abiotic stress have been comparatively well studied. With the rapid development of modern industry and agriculture as well as the exploitation of mineral resources, the pollution of ecological environments, particularly heavy-metal contamination of water, is becoming increasingly serious. Natural quantities of heavy metals in seawater do not adversely affect marine life, and some heavy metals even serve as trace nutrients essential for the normal growth and metabolism of algae. However, at excess concentrations, heavy metals act as pollutants and harm algae, and the magnitude of their impact varies depending on the degree of pollution. High metal concentrations negatively affect diatoms by inhibiting growth, triggering oxidative damage, modifying gene expression, damaging photosynthetic cells and mitochondria, and disrupting various cellular processes. Among the various metals, cadmium is particularly toxic and can easily accumulate in many marine organisms. Usually, cadmium concentrations in the sediment and open seawater are low, although these values may increase in some offshore and estuarine areas due to leakage or anthropogenic emissions. Glutathione S-transferase (GST) is a phase II enzyme in cells that catalyzes the formation of chelates between reduced glutathione and metal ions as well as the binding of sulfur atoms of reduced glutathione to phase I electrophilic groups, thereby reducing the levels of intracellular toxic substances, such as reactive oxygen species, and accelerating their exogenous release. GST belongs to a large gene family that plays important regulatory roles in growth, development, and responses to environmental fluctuations. Owing to the lack of a stable genetic operating system in *M. pyrifera*, the functions of some genes and proteins remain unclear. To date, there has been no successful genetic transformation of *M. pyrifera*. *Synechococcus elongatus* PCC7942 is easy to culture, has a small genome size, and can easily be genetically manipulated through natural

① Corresponding author: LIANG Chengwei, E-mail: liangchw117@126.com

transformation or conjugation with *Escherichia coli*, making it a good protein expression system for studying prokaryotic circadian rhythms, nutrient regulation, environmental responses, and lipid metabolism. In the present study, *S. elongatus* PCC7942 was selected to verify the functions of the GST gene in *M. pyrifera* under Cd stress. Total RNA was extracted from *M. pyrifera* gametophytes frozen in liquid nitrogen and reverse-transcribed to cDNA. Gene-specific primers containing enzyme restriction sites at both ends were designed to construct an expression vector based on the transcriptome sequence of *M. pyrifera* (accession number CNP0001061 in China National GenBank). Six complete GST genes (*mpgst1*, *mpgst2*, *mpgst3*, *mpgst4*, *mpgst5*, and *mpgst6*) were cloned using RT-PCR. Subsequently, the six MPGST genes were transformed into *S. elongatus* PCC7942, and the transformed strains containing *mpgst1*–*mpgst6* were labelled MG1–MG6, respectively. Transformation was verified by genomic DNA extraction and GST enzyme activity assays. In this study, 0.2 mg/L was determined as the Cd²⁺ concentration that was lethal to the wild strain but enabled normal growth of some transformed strains. Some of the transformed strains did not exhibit resistance, which may be due to differences in the GST gene sequences of *M. pyrifera* or because they may belong to different GST gene families, serving different functions. The selected resistant transformed strains MG1, MG4, and MG6 were tested for growth, photosynthetic pigment content, and photosynthetic parameters at 0.2 mg/L cadmium ion stress to verify their functions. The transformed strains showed an upward trend of light absorbance, but most of the wild type strains died. Furthermore, the transformed strains presented values for photosynthetic pigment content and photosynthetic parameters even under stress, but the wild strain died, which was consistent with the growth curve. In particular, the carotenoid content of MG6 slightly increased following Cd²⁺ stress, indicating elevated antioxidant activity. However, differences in the physiological indices of different genes before and after stress may be related to their specific mechanisms of action, which warrants further study. Our findings laid a foundation for further research into the stress resistance function of GST genes in *M. pyrifera* and for the future breeding of pollution-tolerant algal strains.

Key words Glutathione S-transferase genes; Transgenesis; Cadmium ion stress; *Macrocystis pyrifera*; *Synechococcus elongatus* PCC7942

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220301001

http://www.yykxjz.cn/

张亦弛, 王文磊, 徐燕, 许凯, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 坛紫菜诱变及 F₁ 代叶状体表型性状分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 137-148

ZHANG Y C, WANG W L, XU Y, XU K, JI D H, CHEN C S, XIE C T. Mutagenesis and blade phenotypic traits of *Neoporphyra haitanensis* F₁ lines. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 137-148

坛紫菜诱变及 F₁ 代叶状体表型性状分析*

张亦弛^{1,2,3} 王文磊^{1,2,3} 徐燕^{1,2,3} 许凯^{1,2,3}
纪德华^{1,2,3} 陈昌生^{1,2,3} 谢潮添^{1,2,3}①



(1. 集美大学水产学院 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心 福建省发展和改革委员会 福建 厦门 361021; 3. 农业农村部东海健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021)

摘要 突变体是开展坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)良种选育和性状遗传调控机理研究的重要材料。为获得坛紫菜突变体,本研究利用不同强度的 γ 射线辐照(辐射剂量梯度:700、900、1100、1300、1500 Gy)处理野生品系 NSD35 的幼苗,恢复培养结果显示, γ 射线照射导致叶状体部分细胞死亡,且藻体细胞的死亡量随着诱变剂量的增加而升高;同时,突变的细胞数量随着辐射剂量增加呈先增后降的趋势。其中,经 1300 Gy 处理后藻体的突变细胞最多。之后利用体细胞酶解技术和单克隆技术获得了突变体的纯系藻体,从中初步筛选出性状各异的株系 67 个,并利用 14 个表型性状对其中 21 个株系的 F₁ 代进行相关性分析和聚类分析。结果显示,相较于对照组,突变体 F₁ 代群体中大部分性状的变异系数增加。突变体的多个性状间存在显著相关性,其中,藻体长度与宽度、鲜重没有显著相关性($P>0.05$);宽度与鲜重、叶形态呈极显著正相关($P<0.01$);鲜重与颜色呈显著负相关($P<0.05$);藻体不同部位的厚度之间存在极显著正相关;叶型与藻体中部、尖端的厚度呈显著负相关。进一步采用系统聚类的方法(遗传距离为 20),将 21 份材料分成 4 个主要类群,分别为颜色偏红的藻体组、宽而生物量大的藻体组、薄而日均增长快的藻体组和长而窄的藻体组。综上所述, γ 射线对坛紫菜叶状体具有良好的诱变效果,本研究为开展坛紫菜经济性状的遗传调控机理研究以及优良新品种选育提供了基础材料。

关键词 坛紫菜; γ 射线; 酶解; 突变体; 聚类分析

中图分类号 S917.3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0137-12

紫菜(*Neoporphyra* 或 *Neopyropia*)是我国沿海传统的大宗水产养殖种类,富含人体必需的氨基酸、矿物质及维生素等营养物质(Cao *et al.*, 2016)。2020 年全国紫菜养殖总产量约为 22.2 万 t,其中,坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)产量占 70%以上(中国渔业统计年鉴, 2021)。由于丰富的营养价值和生态效益,

坛紫菜的市场需求持续增加。然而,随着栽培规模的扩大,良种匮乏的问题日益凸显。目前,大部分栽培品系是由岩礁上采集的野生坛紫菜驯化而来,加之多年自养自留,使得坛紫菜种质质量下降,抗逆性减弱(Yan *et al.*, 2010)。通过国家审定的坛紫菜新品种虽然已有 5 个,但仍不足以满足多变的海域环境和市场的

* 国家重点研发项目(2018YFD0901500)、福建省重大科技专项(2019NZ0803)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系共同资助。张亦弛, E-mail: 252256361@qq.com

① 通信作者: 谢潮添, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-01, 收修改稿日期: 2022-04-07

需求。因此, 培育出更多符合生产需求的新品系仍是当前坛紫菜育种的重要任务。

目前, 紫菜新品种的选育技术主要包括选择育种、杂交育种、诱变育种等, 其中, 选择育种和杂交育种存在周期长、效率低等难题(丁洪昌等, 2019), 而诱变育种操作简易、方便处理大批量的样品, 且有利于筛选出一些具有重要研究价值和应用价值的材料(常金华等, 2002)。诱变育种在紫菜遗传育种中已被广泛应用, Lee 等(2019)通过 γ 射线诱变得到的甘紫菜(*Pyropia tenera*)色素突变体, 不仅生长性状优于野生型, 还具有较强的耐高温能力。Ding 等(2019)利用 ^{60}Co - γ 诱变处理紫菜新品系 HR-5 后, 成功筛选出一株长度、重量、耐高温性等性状优于 HR-5 的突变株。除此之外, 我国研究人员利用诱变育种等方法培育出了 4 个坛紫菜新品种(“申福 1 号”、“申福 2 号”、“闽丰 1 号”和“闽丰 2 号”)(梁志强, 2004; 王长青等, 2011; 梁艳, 2009; 梁艳等, 2009)。由此可见, 诱变育种是选育紫菜优良新品种(系)的重要手段。

随着坛紫菜基因组测序的完成(Chen *et al.*, 2021), 对坛紫菜重要性状调控基因的功能解析越来越迫切。但是, 由于遗传操作技术体系不成熟、特异突变体缺乏等原因, 坛紫菜关键农艺性状的遗传调控机理尚不明确。通过诱变方法构建突变体库是研究基因功能、发现新基因以及解析目标性状调控机制的有效方法(梁英等, 2020)。研究人员已在模式植物拟南芥(*Arabidopsis*)(Greene *et al.*, 2003)、小麦(袁凯等, 2021; 张婷等, 2021)、大豆(张小明等, 2016; 齐波等, 2019)、水稻(*Oryza sativa* L.) (叶俊, 2006)中构建了具有丰富性状的突变体库, 并通过正向遗传学, 从特定表型性状变化的个体中找到对应的突变基因, 并揭示其功能(Zhang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2021)。因此, 为了满足紫菜遗传学和育种学的需要, 实现对基因功能的深入研究, 开展紫菜诱变和突变体性状研究具有重要意义。

表型性状鉴定是紫菜育种工作中最基础的工作, 紫菜的表型性状主要有数量性状和质量性状 2 种类型, 数量性状主要受多个微效基因调控, 极易受环境影响(孔繁玲, 2006), 比如紫菜的长度、宽度、重量、厚度等性状(Xu *et al.*, 2015)。而紫菜的扭曲、叶型等属于质量性状, 主要受单基因控制, 不易受环境影响(邵元健, 2006)。因而, 考察藻体各类性状, 分析其遗传多样性, 有利于改良紫菜性状。通过计算表型变异系数和遗传多样性指数, 可为今后挖掘优质坛紫菜资源及选配杂交亲本提供理论参考。

本研究以纯化的坛紫菜野生品系 NSD35 为实验材料, 利用 γ 射线诱变获得不同类型突变体, 经过体

细胞克隆技术获得各突变体的纯系, 对子代叶状体进行培育、观察和鉴定, 以期解析坛紫菜经济性状的遗传调控机理以及选育优良品种提供基础材料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料与培养

本实验所用材料均来自福建省坛紫菜种质资源库的 NSD35 品系, 该品系采自福建牛山岛, 并通过酶解纯化获得纯系, 以自由丝状体形式保存。取一定量 NSD35 丝状体在温度为 27~29 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 10~30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 9 L : 15 D 的条件下促熟, 每隔 10 d 更换 1/3 丝状体培养液。当丝状体形成壳孢子囊枝时, 挑选状态良好的藻丝, 放入 500 mL 的锥形瓶中充气培养, 在温度为(21.0 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、光强度为 40~50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 12 L : 12 D 的条件下培养。每 2 d 更换 2/3 培养液。培养促放出的壳孢子至小苗, 待藻体长至 3~4 cm 时, 挑选形态完整的叶状体进行人工诱变处理。

1.2 诱变处理

于 2019 年 11 月在浙江省辐照中心利用岛津 UV-1800 进行诱变, γ 射线放射源为铯-137, 采用重铬酸钾(银)剂量计测定辐照处理实际计量值。设置 5 个梯度的辐射剂量分别为 700、900、1100、1300 和 1500 Gy, 剂量率分别为 35、45、55、65 和 75 Gy/h。

1.3 诱变后的细胞显微观察及突变体分离

1.3.1 诱变后细胞的显微观察 将辐射后的藻体进行黑暗恢复培养 24 h, 之后观察细胞死亡率。24 h 后将光照强度恢复至 20~30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 并弱充气培养藻体 7 d, 显微观察统计叶状体变异细胞的种类和数量(20 倍镜下, 每 1 cm 随机取 10~15 个视野)。

1.3.2 突变体分离 分别选取诱变后的藻体基部、中部和尖端各 2 cm^2 , 利用海螺酶进行酶解。

1.3.3 突变体初步筛选 对颜色、形态等性状有所变异的单克隆苗或细胞团进行筛选。

测量单色突变体色色度值: 将藻体平摊置于白色湿润磁盘上, 利用分光测色剂(CM-700d), 垂直于藻体随机测量藻体 3 个点, 取色度值 a 值和 b 值, a 值越大藻体偏红色, a 值越小藻体偏绿; b 值越大表示藻体偏黄色, b 值越小表示偏蓝色。

1.3.4 突变体 F_1 代叶状体获取 对初筛出的突变株(色块)进行第 2 次酶解, 获得它们的遗传纯合丝状体, 诱导丝状体成熟放散壳孢子, 培养放散出的壳孢子至小苗, 用于后续 F_1 代叶状体的性状测定。

1.4 突变株 F₁ 代叶状体数量性状的测定

生长相关参数测定: 随机筛选 30 株 3.8~4.2 cm 健康完整的幼苗, 每 2 株分别置于 1000 mL 的锥形瓶中充气培养, 培养条件: 温度为(21.0±0.5)°C, 光强为 40~50 μmol/(m²·s), 光周期 12 L : 12 D。培养期间, 每 3 d 更换 1 次培养液, 培养 15 d 后观察并测量其长(L)、宽(W)和鲜重(FW)。

厚度测定: 随机取 12 株(25±5) cm 藻体, 用刀片横向切取藻体 1/4 (基部)、1/2 (中部)和 3/4 (尖端)处的单层细胞, 在 40 倍镜下进行观察测量, 并将其测量结果与对照组进行对比, 数值显著大于对照组的为厚叶型突变体, 反之则为薄叶型突变体。

生长速率测定: 根据以上测量结果计算长度特定生长率(LGR)、宽度特定生长率(WGR)和鲜重特定生长率(FWGR), 计算公式如下:

$$LGR=(\ln L_n-\ln L_0)/n\times 100\%$$

$$WGR=(\ln W_n-\ln W_0)/n\times 100\%$$

$$FWGR=[\ln(FW_n)-\ln(FW_0)]/n\times 100\%$$

式中, n 为培养天数; L_n 为培养 n 天藻体长度(cm); L_0 为初始藻体长度(cm); W_n 为培养 n 天藻体宽度(cm); W_0 为初始藻体宽度(cm); FW_n 为培养 n 天藻体鲜重(g); FW_0 为初始藻体鲜重(g)。

1.5 突变株 F₁ 代叶状体质量性状的赋值情况

对于坛紫菜叶状体颜色、藻体叶形、藻体基部形态、藻体锯齿等质量性状采用目测法, 观察其形态特征, 并按照谢小雪(2014)中的方法, 将质量性状数字化。其中, 参照颜色色谱表将叶状体颜色分为 12 个等级; 参照张学成等(2005)编著的《海藻遗传学》, 将叶型、基部形状分别划分为 2 个和 3 个等级; 将培养 15 d 的叶状体按基部锯齿大小分为 4 个等级, 按叶状体扭曲比例大小分为 4 个等级, 按藻体老化程度分为 2 个等级。具体赋值情况见表 1。

表 1 质量性状的赋值情况
Tab.1 The assignment value of quality traits

性状 Trait	分级赋值 Grading assignment											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
颜色 Color	野生色 少于 1/7	野生色 1/5~1/7	野生色 1/4~1/5	野生色 1/3~1/4	野生色 1/2~1/3	野生 偏红	深绿色	翠绿色	苹果绿	棕红色	黄色	紫色
叶型 Leaf form	披针形	亚披针形										
基部形状 Base section form	脐形	楔形	圆形									
锯齿程度 Size of saw tooth	无锯齿	波浪形	0.05 cm 以下	0.05~ 0.1 cm								
扭曲程度 Twist	无扭曲	扭曲部分 小于 1/4	扭曲部分大于 1/4 小于 1/2	扭曲部分 大于 1/2								
老化程度 Maturity	无老化	开始老化										

1.6 突变体 F₁ 代叶状体性状聚类分析

获得的原始数据先用 Excel 2016 计算平均值(mean)和标准差(SD)等, 将 21 个突变株系 F₁ 代叶状体的 14 个性状数据导入 SPSS 22 软件进行聚类分析。其中, 性状表型值以平均值表示, 将各性状的数值进行 Z 得分标准化, 并转换度量为绝对值, 采用间连接组间连接法, 区间为欧式距离进行聚类。

1.7 数据分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 22 软件进行实验数据的统计分析, F₁ 代藻体的性状数值均与对照组(未经诱变的 NSD35 藻体)的性状数值作进行对比。其中, 假

定判断方法采用单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验; 性状相关性分析采用 Pearson 分析方法; 根据变异系数(CV)和变异系数差判定突变体变异情况, 计算公式:

$$CV=\text{标准差}/\text{平均值}\times 100\%$$

$$\text{变异系数差}=\text{F}_1\text{代变异系数}-\text{对照组变异系数}$$

2 结果与分析

2.1 诱变对藻体成活率的影响

γ 射线辐照对坛紫菜的叶状体存活影响较大, 不同剂量的 γ 射线均造成坛紫菜叶状体细胞一定程度的死亡, 且藻体细胞的死亡量随着诱变剂量的增加而升高。在 700~900 Gy 辐照强度下, NSD35 叶状体只

有少量细胞死亡,细胞存活率为90%以上;当诱变剂量增加至1100 Gy时,NSD35品系叶状体细胞间隙增大,中部少部分细胞开始出现死亡,尖端细胞无明显变化。经高剂量(1300 Gy以上)辐照后,藻体中部细胞间隙变大,细胞受损严重,大部分细胞形态由不规则形变为球形,细胞死亡率约为40%,尖端细胞色素析出(图1A)。就叶状体不同部位而言,基部细胞死亡率最高,尖端细胞死亡率次之,中部细胞死亡率最低(图1B)。

2.2 诱变对藻体细胞的影响

与未辐照的叶状体相比,经辐照后的叶状体颜色变深、生长速度变慢。恢复培养7 d后,变异细胞与周围细胞出现明显的分界线,变异细胞块主要有橙色、橙红色、红色、绿色和紫色等色块(图2A)。以辐照剂量1100 Gy为界,辐照低于1100 Gy剂量的藻体色素突变的细胞较少,存活率高;而辐照高于1100 Gy剂量的藻体细胞出现多个形态接近球形的细胞,部分色素突变细胞濒临死亡。随着诱变剂量的增加,NSD35色素突变细胞个数呈先上升后下降的趋势,在1300 Gy时达到峰值(图2B)。

2.3 突变株的分离及性状分析

将诱变叶状体的中部藻块进行酶解获得单离体细胞,进行个体再生培养,通过对再生体的颜色、形态、生长等特性进行筛选和鉴定。NSD35品系初选获得67个突变株系。突变株包含色素突变体45个,形态突变体51个,其他类型突变11个,部分突变株有2个及2个以上的突变性状,表型突变具体情况见表2。

2.3.1 色素突变体分离及性状分析 未经诱变处理的坛紫菜叶状体为野生色(图3A),基部呈绿色,逐渐过渡成红棕色。在单克隆苗中,色素突变较为丰富,主要包括黄色、红色、浅绿色、褐绿色、紫色、野生红色、野生绿色等突变(图3B~F)。进一步检测突变体的色度值,结果显示,不同颜色藻体的色度值差异显著(图3G)。

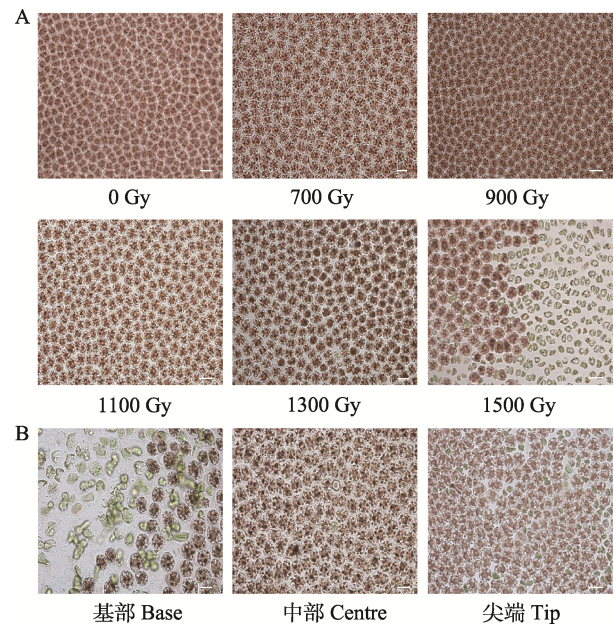


图1 γ 射线辐照坛紫菜叶状体显微观察图(标尺=20 μm)
Fig.1 The microscopic observation of leaf shape of *N. haitanensis* irradiated by γ ray (bar =20 μm)

A: 不同剂量处理后的细胞状态;

B: 叶状体不同部位细胞状态

A: Status of cell after treatment with different doses of NSD35; B: Status of cell in different parts of blade

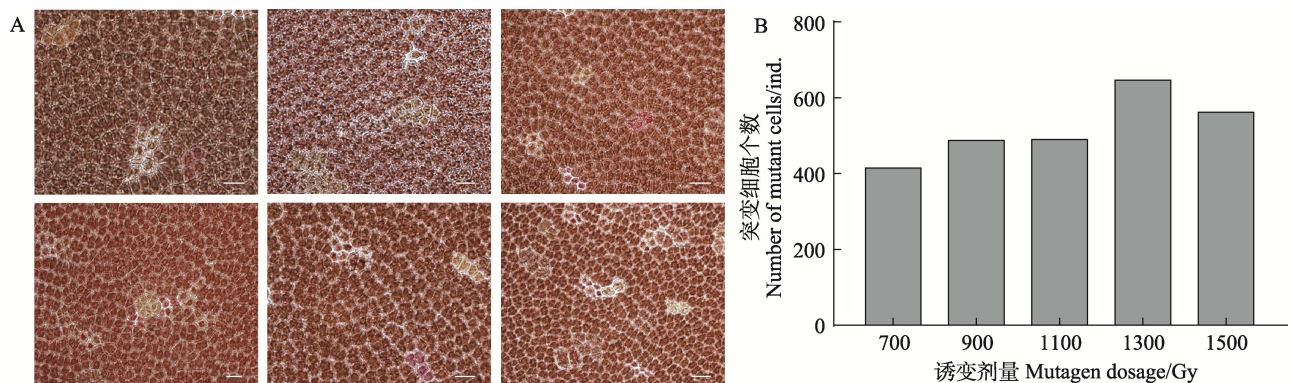


图2 γ 射线辐照过的NSD35叶状体上形成的变异细胞块

Fig.2 The color-mutated cell-clusters formed on the γ ray irradiated blades of NSD35

A: NSD35不同颜色的细胞(标尺=20 μm); B: 经不同剂量辐照后色素变异的细胞数目

A: Cells of different colors of and NSD35 (bar = 20 μm); B: The number of cells with pigment variation after irradiation at different doses

表 2 初步筛选坛紫菜突变体的表型统计
Tab.2 Phenotypic statistics of mutation types of *N. haitanensis*

突变类型 Mutation type	性状特征 Trait	突变株数 Number of mutant plant
颜色 Color	红 Red	26
	翠绿色 Green	1
	深绿色 Deep green	2
	紫色 Purple	1
	黄色 Yellow	1
	褐绿色 Brownish green	1
	苹果绿 Apple green	1
	偏红 Slight red	12
	形态 Form	窄型叶 Narrow leaf
	宽型叶 Wide leaf	16
	薄 Thin	17
	厚 Thickness	4
	锯齿 Saw tooth	5
	扭曲 Twist	3
其他类型 Other types	生长速度 Growth rate	6

2.3.2 形态突变体分离及性状分析 形态突变体有宽度突变体、锯齿突变体、基部形状突变体、厚度突变体等, 共 51 份突变体。其中, 厚度突变体 21 个, 包括薄叶型藻体 17 个、厚叶型藻体 4 个。未经诱变的 NSD35 藻体中部厚度为(23.54±1.39) μm (图 4C、D), 而经过诱变处理后获得的薄叶型突变体的叶状体中部厚度减少了 4~8 μm (图 4E、F), 但厚叶型突变体的叶状体中部厚度增加了 4~10 μm (图 4A、B)。由于藻体是单层细胞, 所以可以通过测定细胞厚度判断藻体厚度, 如图 4B、D、F 所示, 依次为厚叶型突变体、对照组 NSD35、薄叶型突变体。

宽度突变体有 22 个, 包括宽叶型藻体 16 个、窄叶型藻体有 6 个, 宽叶和窄叶的藻体表型对比明显(图 5)。未经处理的 NSD35 藻体宽度可达 1 cm, 经过诱变后宽叶型突变体的宽度为 2~3 cm (图 5A、B、C), 而极端窄叶型突变体的宽度不足 0.1 cm (图 5D)。

2.4 诱变群体 F₁ 叶状体的表型性状

2.4.1 F₁ 叶状体表型性状的平均表现 如表 3 所示, 从叶状体表型性状的平均值来看, F₁ 代的长、宽、鲜重和厚度数值均小于对照组, 偏向于负向变异, 而长宽比、颜色、基部形状和扭曲程度均大于对照组, 偏向于正向变异。变异系数在 8.74%~59.49%之间, 其中, 变异系数最小的是尖端厚度, 仅有 8.74%; 而

颜色、宽度、基部形状和锯齿变异系数较大, 并依次递减, F₁ 代藻体的上述 4 项表型性状的变异系数分别为 59.49%、44.45%、43.03%和 40.83%。此外, 老化程度的变异系数差为负值, 这说明 F₁ 代的老化程度小于对照组, 突变株不易老化。从最大值和最小值来看, F₁ 代藻体的变异幅度大于对照组。

2.4.2 F₁ 叶状体表型性状相关性分析 通过相关性分析发现, F₁ 代藻体的长度和日增长率、日增宽率、日增重率、长宽比呈极显著正相关(P<0.01), 相关系数分别为 0.982、0.536、0.688 和 0.695。宽度与鲜重、日增宽率、叶型呈现极显著正相关, 相关系数分别为

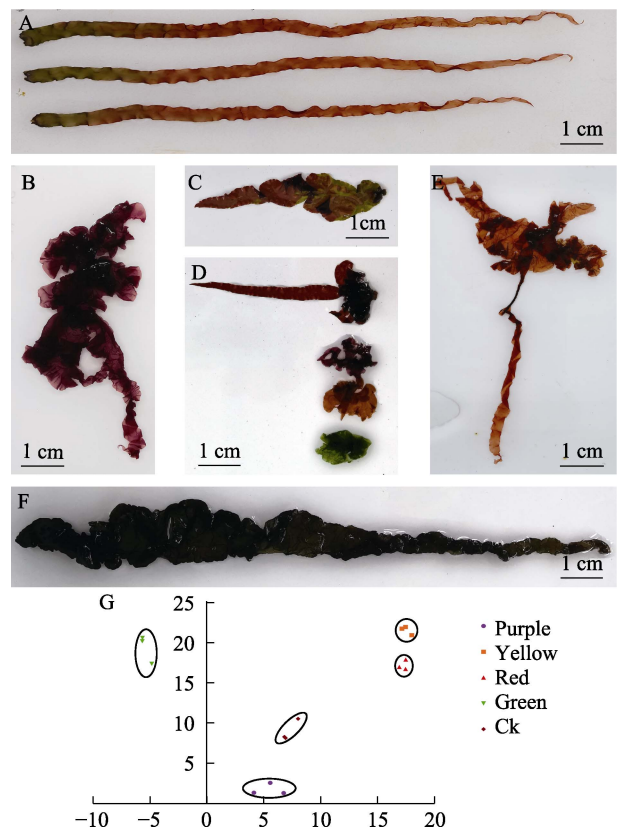


图 3 色素突变体藻体
Fig.3 Gametophytic blades of pigmentation mutant strains

A: 未经诱变处理的 NSD35 叶状体; B: 紫色的叶状体; C: 红色和绿色相嵌合的叶状体; D: 从上往下: 翠绿色的叶状体、黄色的叶状体、紫色的叶状体、红色的叶状体; E: 黄色的叶状体; F: 褐绿色的叶状体; G: 色素突变体的色度值(横坐标为 a 值; 纵坐标为 b 值)。

A: Gametophytic blades of NSD35 without treatment; B: Gametophytic blades of purple; C: Gametophytic blades of red and green. D: From top to bottom: Gametophytic blades of emerald green, yellow, purple, red; E: Gametophytic blades of yellow; F: Gametophytic blades of brownish green; G: Value of chroma between the pigment mutants (Abscissa represent the a value; Ordinate represents the b value).

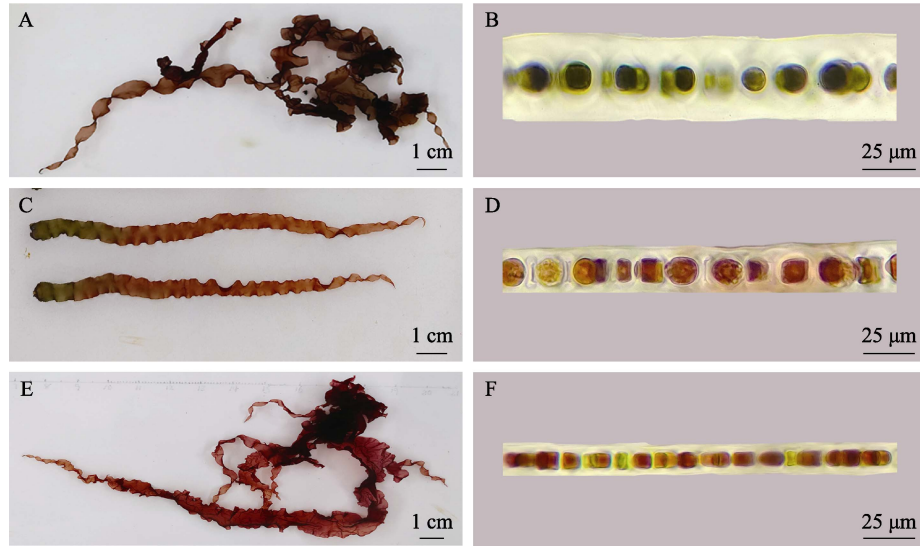


图4 厚度突变体藻体

Fig.4 Gametophytic blades of thickness mutant strains isolated from NSD35

A: 厚叶型突变体叶状体; B: 厚叶型突变体单层细胞厚度; C: 对照组叶状体;

D: 对照组单层细胞厚度; E: 薄叶型突变体叶状体; F: 薄叶型突变体单层细胞厚度。

A: Blade of thick leaf mutant; B: Thickness of cell from thick leaf mutant; C: Blade without mutagenic treatment; D: Thickness of cell without mutagenic treatment; E: Blade of thin leaf mutant. F: Thickness of cell from thin leaf mutant.

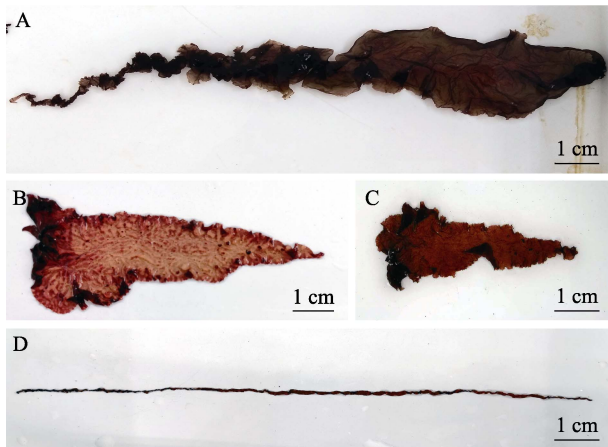


图5 宽度突变体藻体

Fig.5 Gametophytic blades of width mutant strains isolated from NSD35

A~C: 宽叶型突变体; D: 窄叶型突变体

A~C: Wide leaf mutant; D: Narrow leaf mutant

0.834、0.595 和 0.561; 宽度与日增重率呈显著正相关($P < 0.05$), 相关系数为 0.489; 而宽度与长宽比呈极显著负相关, 相关系数为 0.743。鲜重与日增宽率、日增重率呈极显著正相关, 相关系数分别为 0.739 和 0.724; 与颜色的相关系数为 0.520, 呈显著负相关。日增长率与日增宽率、日增重率及长宽比呈极显著正相关, 相关系数分别为 0.572、0.712 和 0.675。日增宽率与日增重率相关系数为 0.908, 呈极显著正相关。

日增宽率与叶形态呈显著正相关, 与叶状体中部厚度呈显著负相关。日增重率与藻体叶型呈显著正相关。叶状体不同部位之间的厚度呈极显著正相关, 尖端厚度与叶形态呈显著负相关; 而藻体尖端厚度与锯齿、扭曲呈显著相关, 相关系数分别为 0.364 和 0.464。藻体的叶型与藻体质量性状中的锯齿程度呈极显著负相关, 相关系数为 0.553。藻体的扭曲程度与藻体老化程度呈正相关, 相关系数为 0.457。藻体的基部形状与各性状间均没有显著相关性(图 6)。总体而言, 质量性状与数量性状之间的显著相关性较低, 数量性状之间显著相关性较高。

2.4.3 单株藻体的聚类分析 对 F_1 代藻体表型性状进行 z-score 标准化处理后, 采用组间连接法, 区间欧式距离进行系统聚类。由图 7 可知, 坛紫菜叶状体 F_1 代在遗传距离为 20 处, 可将 21 个单株聚类为 4 个类群。第 I 类有 5 株, 其特点是藻体颜色偏红; 第 II 类有 6 株, 特点是叶状体较宽、生物量大; 第 III 类有 2 株, 特点是日均增长快、藻体较薄; 第 IV 类有 8 株, 特点是长而窄的叶状体。

3 讨论

人工诱变育种可以快速获得大量突变体, 是新种质创制的有效途径之一。其中, γ 射线诱变方法易操作、安全, 已被广泛应用于紫菜育种中(付峰等, 2018)。

表 3 坛紫菜表型性状及 Kolmogorov-Smirnov 检验结果
Tab.3 Phenotypic character and Kolmogorov-Smirnov test results of *N. haitanensis*

指标 Index	处理组 Treatment	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min	最大值 Max	变异系数 CV/%	变异系数差 Difference of variation coefficient /%
长度 Length /cm	F ₁	46.86	9.80	21.38	60.75	20.91	7.10
	CK	54.08	7.47	47.00	63.50	13.81	
宽度 Width /cm	F ₁	0.72	0.32	0.49	1.84	44.45	29.25
	CK	0.79	0.12	0.65	1.00	15.20	
鲜重 Fresh weight /g	F ₁	0.186	0.070	0.074	0.376	37.77	16.24
	CK	0.232	0.050	0.176	0.294	21.53	
日增长率 LGR /%	F ₁	16.13	1.63	10.94	18.02	10.12	4.04
	CK	17.11	1.04	15.44	18.55	6.08	
日增宽率 WRG /%	F ₁	8.72	1.27	5.80	11.03	14.58	5.85
	CK	8.56	0.75	7.32	9.24	8.73	
日增重率 FWGR /%	F ₁	26.73	2.87	19.92	31.47	10.73	5.54
	CK	29.11	1.51	27.32	31.61	5.19	
长宽比 Length-breadth ratio	F ₁	71.24	22.85	20.49	109.81	32.08	21.02
	CK	65.74	7.27	56.67	78.75	11.06	
基部厚度 Thickness of the base	F ₁	30.96	6.22	21.63	41.25	20.10	16.26
	CK	31.79	1.22	30.00	32.50	3.84	
中部厚度 Thickness of the centre	F ₁	21.78	2.56	16.83	27.60	11.74	7.61
	CK	22.86	0.94	22.50	25.00	4.13	
尖端厚度 Thickness of the tip	F ₁	19.28	1.68	16.56	21.83	8.74	4.22
	CK	20.89	0.94	20.00	22.50	4.52	
颜色 Color	F ₁	5.38	3.20	1.00	11.00	59.49	28.89
	CK	2.57	0.79	1.00	3.00	30.60	
基部形状 Form of base section	F ₁	1.57	0.68	1.00	3.00	43.03	43.03
	CK	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	
叶型 Leaf form	F ₁	1.19	0.40	1.00	2.00	33.80	33.80
	CK	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	
锯齿 Size of saw tooth	F ₁	2.52	1.03	1.00	4.00	40.83	27.60
	CK	2.86	0.38	2.00	3.00	13.23	
扭曲 Twist	F ₁	1.24	0.44	1.00	2.00	35.25	2.18
	CK	1.14	0.38	1.00	2.00	33.07	
老化 Maturity	F ₁	1.24	0.44	1.00	2.00	35.25	-2.70
	CK	1.29	0.49	1.00	2.00	37.95	

选择最佳诱变条件是利用 γ 射线诱变从而成功获得突变体的关键。本研究以 5 个辐照强度(700、900、1100、1300 和 1500 Gy), 对坛紫菜不同藻体进行诱变, 通过对细胞死亡率及细胞突变率进行综合分析, 以确定最适诱变剂量。结果显示, 色素变异细胞的数量随诱变剂量的增加呈先增加后降低的趋势(图 2), 与严兴洪等(2005)的研究结果相似。此外, 突变体 F₁ 代变异幅度大于对照组, 且除尖端厚度以外, F₁ 代其他性状的变异系数均大于 10%而小于 90%, 属于中度变异(刘继龙等, 2018), 这说明 γ 射线诱变能获得较好的诱变效果, 且诱变效果强于紫外线诱变(Chen *et al*,

2016)和化学诱变(李勇斌, 2006), 且无需添加任何化学品、无二次污染, 具有高效、清洁、低成本、操作方便等优点, 因此, γ 射线诱变方法在紫菜未来的诱变育种中仍有较广阔的应用前景(丁洪昌等, 2019)。

通过诱变进行育种的首要目标是获得差异明显的表型性状, 表型性状鉴定是育种工作中的基础工作(张丰收等, 2020)。相较高等植物而言, 紫菜叶状体外形简单, 其形态特征主要包括叶长、叶宽、叶厚及叶色(童冠文, 2010; Xu *et al*, 2012; 黄林彬等, 2017; 仵燕青等, 2016; 柳佩娟等, 2008)。藻体长度、宽度和厚度等性状和紫菜的产量密切相关, 而藻体颜色是影

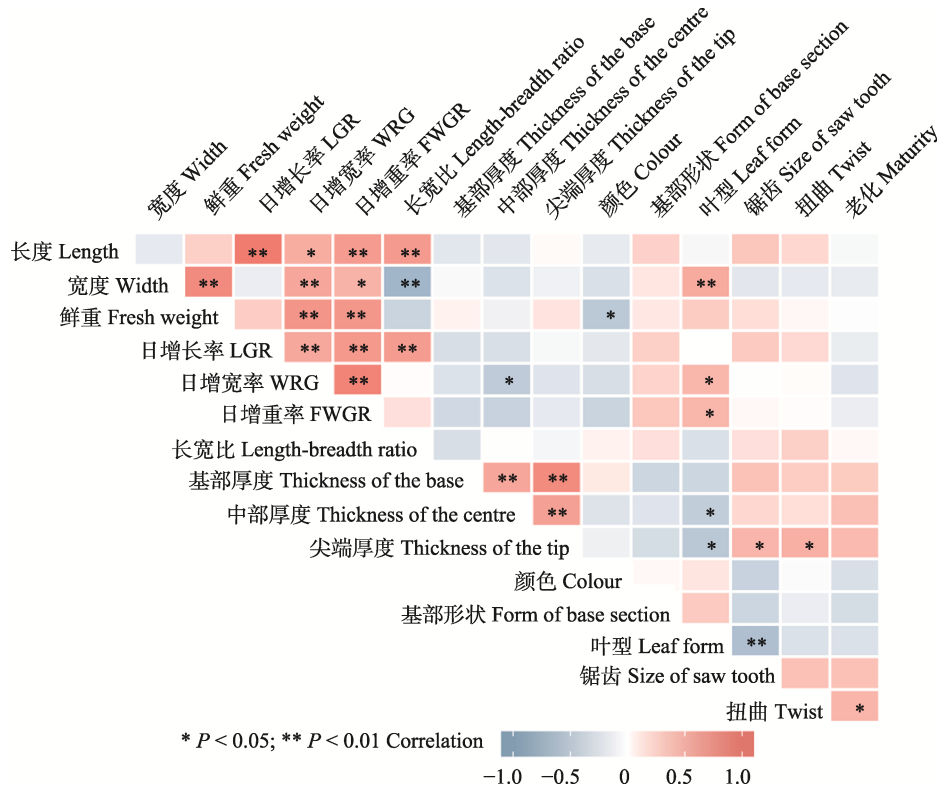


图 6 坛紫菜突变体叶状体表型性状的相关性分析
Fig.6 Correlation of phenotypic character of blades of *N. haitanensis*

*表示差异显著($P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$)
* indicates significant difference at $P < 0.05$; ** indicates significant difference at $P < 0.01$

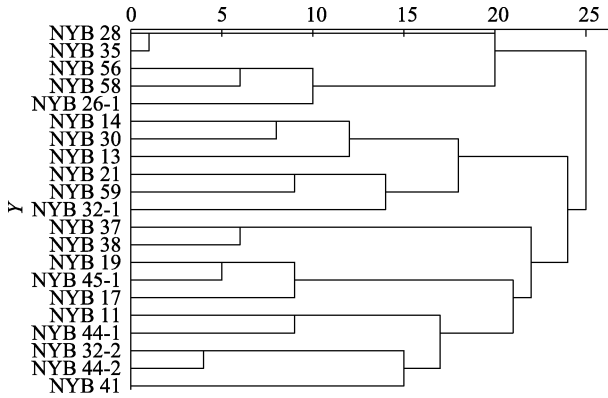


图 7 坛紫菜突变体 F₁ 代单株聚类分析树状图
Fig.7 Cluster analysis of F₁ generation of *N. haitanensis*

响其品质的主要指标之一(Hwang *et al*, 2019)。本研究通过对坛紫菜突变体 F₁ 代中 21 个株系的长、宽、鲜重、厚度、颜色等 14 个表型性状进行分析发现, 突变群体中诱变效应最为明显的性状是颜色, 其变异系数达 59.49%。这与以往研究结果一致, 多个研究组利用不同的诱变方式获得的紫菜突变体大多都是色素突变体(赵爽等, 2019; 张倩等, 2019; 李琳等, 2006), 紫菜易产生色素突变体, 说明调控藻体颜色

的基因经过诱变后最易发生突变。而紫菜的叶状体颜色主要与藻红蛋白、藻蓝蛋白和叶绿素 *a* 的含量及比例相关(Zhang *et al*, 2014), 往往藻胆蛋白含量高的藻体颜色深、鲜亮, 符合市场需求(羌玺等, 2021)。此外, 由于坛紫菜的减数分裂发生在壳孢子的前 2 次分裂期间, 之后最初 4 个细胞发育成了线性四分体, 导致形成嵌合叶片, 而不同色素突变体可以作为遗传标记来区分嵌合叶片的每个部分, 从而便于获得纯系藻体。

与颜色性状突变不同, 坛紫菜 F₁ 代的长、宽、鲜重和厚度数值均小于对照组, 偏向于负向变异。例如, 经过诱变后共获得薄叶型藻体 17 个、厚叶型藻体 4 个。紫菜藻体的厚度影响其口感, 并限制其加工方法, 进而影响紫菜附加值的提升(Ding *et al*, 2019; 全汉锋等, 2012)。条斑紫菜藻体薄, 更适合自动化加工, 其初级产品可进行附加值更高的二次加工(如寿司), 而坛紫菜藻体厚而宽, 一般用于半机械化或手工生产附加值低的产品, 如紫菜饼(何培民等, 2018)。因此, 选育藻体薄的坛紫菜新品系是育种的主要目标之一(Ding *et al*, 2020)。本研究获得的突变体中, 藻体薄的品系的中部厚度仅有 16 μm 左右, 相较于新品

种“闽丰 2 号”(藻体中部厚度约为 21 μm)更薄(梁艳等, 2009)。作为对比, 一些传统养殖品种在第 3 次采收时藻体厚度已达到 60 μm, 严重影响其口感和后期加工(何培民等, 2018)。研究发现, 藻体的厚度性状遗传较稳定, 藻体的厚度主要与细胞壁厚度和胶质腔厚度相关(Gao *et al.*, 2021; 童冠文等, 2010)。魏鹏华(2021)研究表明, NAD 糖依赖性差向异构酶(GME)基因的表达量与琼胶含量显著相关, 进而调控坛紫菜藻体的厚度, 但其具体调控机制仍有待深入研究。而本研究筛选的厚度突变体为坛紫菜厚度性状的遗传调控机制解析提供了难得的实验材料。此外, 不同突变体表型性状之间具有非常紧密的关联性, 对不同性状进行相关性分析, 从中找出变异规律, 可辅助坛紫菜的育种工作, 例如, 选择长和薄的藻体就有可能选育出高产、优质的坛紫菜新品系。

4 结论

本研究通过 γ 射线照射处理坛紫菜叶状体获得不同突变体, 之后利用酶解单克隆技术获得再生突变体, 最终筛选出 67 个突变体株系。并基于 14 个表型性状, 对其中 21 个株系的 F₁ 代进行了相关性和聚类分析, 以期为坛紫菜遗传育种研究以及优良新品种选育提供材料支撑。

参 考 文 献

- CAO J, WANG J P, WANG S C, *et al.* *Porphyra* species: A mini-review of its pharmacological and nutritional properties. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(2): 111–119
- CHANG J H, LI Y H. The applying the technology of artificial induced mutation in plant improvement. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2002, 25(S1): 14–16 [常金华, 李玉华. 诱变技术在植物遗传改良中的应用. *河北农业大学学报*, 2002, 25(S1): 14–16]
- CHEN H M, CHU J S, CHEN J J, *et al.* Insights into the ancient adaptation to intertidal environments by red algae based on a genomic and multiomics investigation of *Neoporphyra haitanensis*. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 39(1): msab315
- CHEN S S, DING H C, YAN X H. Isolation and characterization of an improved strain of *Porphyra chauhanii* (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature resistance. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 3031–3041
- DING H C, LIU C J, YAN X H. Selection and characterization of an improved strain (ST-2) of *Pyropia haitanensis* by ⁶⁰Co-γ ray irradiation. *Aquaculture Research*, 2019, 50(9): 2388–2397
- DING H C, WANG T G, ZHANG P, *et al.* High-temperature resistance of the thin-blade strain of *Pyropia haitanensis* and its pilot cultivation in mariculture farm. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(4): 2261–2270
- DING H C, YAN X H. Advances in *Pyropia* (formerly *Porphyra*) genetics and breeding. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 592–603 [丁洪昌, 严兴洪. 紫菜遗传育种研究进展. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 592–603]
- Fishery administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *China Fishery Statistics Yearbook 2021*. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [农业农村部渔业渔政管理局. 2021 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- FU F, SUI Z H, SUN L Q, *et al.* Research advance on the algal mutation breeding technologies. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(10): 58–63 [付峰, 隋正红, 孙利芹, 等. 藻类诱变育种技术研究进展. *生物技术通报*, 2018, 34(10): 58–63]
- GAO J, YANG S, TANG K, *et al.* GmCCD4 controls carotenoid content in soybeans. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4): 801–813
- GREENE E A, CODOMO C A, TAYLOR N E, *et al.* Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, 2003, 164(2): 731–740
- HE P M, ZHANG Z Y, ZHANG X C, *et al.* *Seaweed cultivation*. Beijing: Science Press, 2018 [何培民, 张泽宇, 张学成, 等. 海藻栽培学. 北京: 科学出版社, 2018]
- HUANG L B, YAN X H. Genetic analysis of major economic traits in *Pyropia yezoensis* using double haploid population. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1847–1857 [黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜双单倍体群体主要经济性状的遗传分析. *水产学报*, 2017, 41(12): 1847–1857]
- HWANG E K, YOTSUKURA N, PANG S J, *et al.* Seaweed breeding programs and progress in eastern Asian countries. *Phycologia*, 2019, 58(5): 484–495
- KONG F L. *Plant quantitative genetics*. China Agricultural University Press, 2006 [孔繁玲. 植物数量遗传学. 北京: 中国农业大学出版社, 2006]
- LEE H J, CHOI J I. Enhancing temperature tolerance of *Pyropia tenera* (Bangiales) by inducing mutation. *Phycologia*, 2019, 58(5): 496–503
- LI L, YAN X H. Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 30–35 [李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 30–35]
- LI Y B. Effects of MNNG on growth and development in thalli of *Porphyra haitanensis* and analysis of the different protein expression in the mutants. Master's Thesis of Xiamen University, 2006 [李勇斌. MNNG 对坛紫菜叶状体细胞生长发育的影响与坛紫菜突变品系间的差异蛋白质研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2006]

- LIANG Y, XU Y, CHEN C S, *et al.* Research on the main economic traits of the new strain of high quality *Porphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(4): 108–116 [梁艳, 徐燕, 陈昌生, 等. 坛紫菜优质新品系(Q-1)主要经济性状的研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(4): 108–116]
- LIANG Y, YAN Y Y, LAI Q X, *et al.* Researching advances in microalgal mutation breeding. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2020, 50(6): 19–32 [梁英, 闫译允, 赖秋璇, 等. 微藻诱变育种研究进展. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(6): 19–32]
- LIANG Y. Research on main economic traits and DNA sequence analysis of the new pure *Porphyra haitanensis* Lines. Master's Thesis of Jimei University, 2009 [梁艳. 坛紫菜新品系纯系主要经济性状的研究及DNA序列分析. 集美大学硕士研究生学位论文, 2009]
- LIANG Z Q. Preliminary study on genetic breeding of *Porphyra haitanensis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2004 [梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]
- LIU J L, LIU L, MA X Y, *et al.* Spatial variability of soil salt in different soil layers at different scales. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2018, 26(2): 305–312 [刘继龙, 刘璐, 马孝义, 等. 不同尺度不同土层土壤盐分的空间变异性研究. *应用基础与工程科学学报*, 2018, 26(2): 305–312]
- LIU P J, XIE C T, CHEN C S, *et al.* Preliminary study on different pigment mutants of *Porphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2008, 29(4): 78–83 [柳佩娟, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜不同色素突变体的初步研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 78–83]
- QI B, RU X X, JIA Z Z, *et al.* Radiation intensities affect important agronomic characters of soybean M₁ generation. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(12): 40–45 [齐波, 汝玄玄, 贾召召, 等. 不同辐射强度对大豆 M₁ 代重要农艺性状的影响. *中国农学通报*, 2019, 35(12): 40–45]
- QIANG X, WANG L J, NIU J F, *et al.* Research progress of phycobiliproteins from seaweed. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080019 [羌玺, 王立军, 牛建峰, 等. 海藻来源藻胆蛋白研究进展. *食品工业科技*, 2021, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080019]
- QUAN H F, WANG X C, ZHAN Z Y, *et al.* Studies on the improvement of full-automatic *Prophyra haitanensis* processing equipment and its technology optimization. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 122–128 [全汉锋, 王兴春, 詹照雅, 等. 坛紫菜全自动加工设备及工艺的改进. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 122–128]
- SHAO Y J. Analysis of definitions about qualitative and quantitative trait. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2006(4): 55–57 [邵元健. 质量性状和数量性状含义的辨析. *生物学杂志*, 2006(4): 55–57]
- TONG G W. Research progress on economic traits of *Porphyra yezoensis*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2010(11): 343–345 [童冠文. 条斑紫菜经济性状研究进展. *现代农业科技*, 2010(11): 343–345]
- WANG C Q, YAN X H, HUANG L B, *et al.* Characterization of an improved strain (SF-2) of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and its pilot cultivation in mariculture farm. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1658–1667 [王长青, 严兴洪, 黄林彬, 等. 坛紫菜优良品系“申福2号”的特性分析与海区中试. *水产学报*, 2011, 35(11): 1658–1667]
- WEI P H. Preliminary study on regulation mechanism of algal thickness in *Pyropia haitanensis*. Master's Thesis of Jimei University, 2021 [魏鹏华. 坛紫菜藻体厚度调控机理的初步研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2021]
- WU Y Q, XIE C T, XIE X X, *et al.* Analysis on the variation patter of phenotypic traits of *Pyropia haitanensis* germplasm. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(3): 173–180 [仵燕青, 谢潮添, 谢小雪, 等. 坛紫菜种质品系表型性状的变异规律分析. *渔业研究*, 2016, 38(3): 173–180]
- XIE X X. Construction of *Pyropia haitanensis* core germplasm repositories. Master's Thesis of Jimei University, 2014 [谢小雪. 坛紫菜核心种质库的构建. 集美大学硕士研究生学位论文, 2014]
- XU Y, HUANG L, JI D H, *et al.* Construction of a dense genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for economic traits of a doubled haploid population of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 228
- XU Y, XIE C T, CHEN C S, *et al.* Genetic analyses of six quantitative traits of a doubled haploid population of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(1): 89–96
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, *et al.* Induction and isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 166–172 [严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离. *水产学报*, 2005, 29(2): 166–172]
- YAN X H, LV F, LIU C J, *et al.* Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4): 511–516
- YE J. The screening of mutants and construction of rice mutant population for variety '9311' of Rice (*Oryza sativa* L.). Master's Thesis of Zhejiang University, 2006 [叶俊. 水稻“9311”突变体的筛选和突变体库的构建. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2006]
- YUAN K, ZHANG W, WEN H W, *et al.* EMS-induced mutagenesis and phenotypic variation analysis in wheat variety Jimai 22. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 979–988 [袁凯, 张伟, 温宏伟, 等. EMS诱导济麦22突变体库的构建及表型变异分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4): 979–988]

- ZHANG F S, WANG Q. Research progresses in the plant breeding of radiation mutation. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2020, 48(6): 39–49 [张丰收, 王青. 植物辐射诱变育种的研究进展. 河南师范大学学报(自然科学版), 2020, 48(6): 39–49]
- ZHANG Q, DING H C, YAN X H, *et al.* Isolation and characterization of pigmentation mutants of *Pyropia crispata* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 526–534 [张倩, 丁洪昌, 严兴洪, 等. 皱紫菜色素突变体的分离与特性分析. 上海海洋大学学报, 2019, 28(4): 526–534]
- ZHANG T, LI J F, MA F, *et al.* Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* Thallus during the cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 859–865
- ZHANG T, LI Y F, MA L, *et al.* Lateral floret 1 induced the three-florets spikelet in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(37): 9984–9989
- ZHANG T, WEN H W, YUAN K, *et al.* Construction of ethyl methane sulfonate mutant library of Jinmai 47 and preliminary analysis of quality characteristics of high generation mutants. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*. 2021, 35(8): 1731–1739 [张婷, 温宏伟, 袁凯, 等. 晋麦 47 EMS 突变体库的构建及高代突变材料品质性状的初步分析. 核农学报, 2021, 35(8): 1731–1739]
- ZHANG X M, XUE Y G. Research progress of soybean mutant library construction. *Soybean Science*, 2016, 35(2): 345–350 [张小明, 薛永国. 大豆突变体库构建研究进展. 大豆科学, 2016, 35(2): 345–350]
- ZHANG X C, QIN S, MA J H, *et al.* The genetics of marine algae. Beijing: China Agriculture Press, 2005 [张学成, 秦松, 马家海, 等. 海藻遗传学. 北京: 中国农业出版社, 2005]
- ZHAO S, DING H C, LIU Z J, *et al.* Induction and isolation of pigmentation mutant in *Pyropia suborbiculata kjellman* (Bangiales, Rhodophyta). *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(2): 114–122 [赵爽, 丁洪昌, 刘长军, 等. 圆紫菜人工色素突变体的诱导与分离. 海洋学报, 2019, 41(2): 114–122]

(编辑 冯小花)

Mutagenesis and Blade Phenotypic Traits of *Neoporphyra haitanensis* F₁ Lines

ZHANG Yichi^{1,2,3}, WANG Wenlei^{1,2,3}, XU Yan^{1,2,3}, XU Kai^{1,2,3}, JI Dehua^{1,2,3},
CHEN Changsheng^{1,2,3}, XIE Chaotian^{1,2,3}①

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 2. Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture; Fujian Provincial Development and Reform Commission, Xiamen, Fujian 361021, China; 3. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract *Neoporphyra haitanensis* is a traditional coastal aquaculture species in China; it is rich in essential amino acids, minerals, and vitamins. It is not only beneficial economically, but also adjusts the ecosystem. However, fine varieties of *N. haitanensis* are lacking even with the enlargement and extension of the *N. haitanensis* growing area. Since humans began breeding *N. haitanensis*, most produced strains have been domesticated from wild *N. haitanensis* collected from rocks. The germplasm collection and usage is considered the bottleneck issue that often causes *N. haitanensis* quality degradation. Therefore, it is important to breed new varieties. Selective breeding, cross-breeding, and mutation breeding are among the most common methods used to breed new *N. haitanensis* varieties. Mutation breeding is a quick, simple, and convenient genetic tools. For several decades, natural means to induce genetic diversity have been exploited to breed new varieties, as the naturally occurring mutations are insufficient. One of the most important genetic breakthroughs was the invention of artificial methods to induce mutations. Physical mutagenesis is a safer and more efficient procedure than chemical mutagenesis. To obtain artificial mutants, *N. haitanensis* (NSD35) gametophytes were treated with different γ -ray irradiation intensities (700 Gy, 900 Gy, 1100 Gy, 1300 Gy, and 1500 Gy). After culture recovery, the results showed

① Corresponding author: XIE Chaotian, ctxie@jmu.edu.cn

that gametophytic cell death increased with the irradiation escalation, with more than 90% cell viability after low radiation dose treatment (700 Gy and 900 Gy). With doses more than 1100 Gy, the cell viability decreased, in which the NSD35 cellular space became larger and a few middle cells died, although no obvious change was observed in tip cells. After induction, the cell morphology changed with higher radiation doses (1300 Gy and 1500 Gy). Some cells exhibited microscopic features, such as enlarged size and alternation from irregular cell shape to circular for some cells. Notably, the cell death rate decreased systematically from the blade base to its tip and from that to its center. Microscopic examination revealed that the number of mutant cells increased and then decreased with the radiation dose rise. The pigmented mutant cells frequency was higher in low radiation doses, further increasing with the rise in irradiation from 700 Gy to 1300 Gy. Nonetheless, the pigmented mutant cells frequency decreased with the highest dose of 1500 Gy. The best mutagenic effect was observed in gametophytes treated with 1300 Gy as they had the largest number of pigmented mutant cells. Cells cultured *in vitro* were obtained by enzymatic hydrolysis and individual regeneration. Preliminary screening of 67 mutants was performed to construct the mutant library, and 45 pigmented mutant strains, 51 morphological mutants, and 11 other mutants were obtained. Most of the mutants showed two or more mutations of phenotypic character. Twenty-one F₁ generation cell lines were screened, and 14 traits (length, width, fresh weight, daily length growth rate, daily width growth rate, daily weight growth rate, length-breadth ratio, base thickness, center thickness, tip thickness, color, base section form, leaf form, saw tooth size, twist, and maturity) were analyzed by correlation analysis and system analysis. The coefficients of variation results showed significant phenotypic differences between F₁ and control cells. The F₁ coefficients of variation ranged from 8.74% to 59.49%, revealing a moderate variability. Correlation analysis also showed that most of the traits had significant correlations. There was no significant correlation between the length and width or fresh weight, while a significant positive correlation was observed between the width and leaf fresh weight ($P < 0.01$). Significant positive correlations were also found between quantitative traits, while there was no correlation between qualitative and quantitative traits. These allow indirect selection to improve breeding efficiency. Cluster analysis showed that at the Euclidean distance of 20, all 21 individuals analyzed were clustered into four groups. Overall, the phenotypic traits of different groups were significantly different. Mutants are critical materials for studying the genetic regulation of mechanisms involved in the control of economically important *N. haitanensis* traits. Pigmented mutants are a dominant-marker trait used for breeding that have high value for theoretical research and practical applications. Our study identified many pigmented mutants that can be used to study relevant biological mechanisms. Nevertheless, the variation coefficients of four quantitative characters (length, width, fresh weight, and thickness) of the F₁ *N. haitanensis* generation were less than those of the control group and were biased towards negative variation. For example, more thin leaf mutants were obtained after the gamma rays' treatment. It is interesting as a thin *N. haitanensis* is more suitable for automatic processing, and its primary products can be reprocessed with higher added value. In conclusion, after being treated with γ -ray, the *N. haitanensis* blades were guided to variation enabling the selection and cultivation of new strains, from which strains with improved traits strains were selected. This study provides interesting materials for accelerating the *N. haitanensis* breeding research and the selection of excellent varieties.

Key words *Neoporphyra haitanensis*; Gamma ray; Enzymolysis; Mutant; Clustering analysis

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211210001

http://www.yykxjz.cn/

袁艳敏, 刘福利, 梁洲瑞, 张朋艳, 刘义, 郑言鑫, 张海宁. 干露胁迫对鼠尾藻生理生化影响的研究. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 149-160

YUAN Y M, LIU F L, LIANG Z R, ZHANG P Y, LIU Y, ZHENG Y X, ZHANG H N. Study on the physiological and biochemical influence of *Sargassum thunbergii* under dehydration. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 149-160

干露胁迫对鼠尾藻生理生化影响的研究*

袁艳敏¹ 刘福利^{1,2①} 梁洲瑞¹ 张朋艳¹
刘义^{1,3} 郑言鑫⁴ 张海宁⁵

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071;
2. 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 山东 青岛 266003;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站
山东 烟台 265800; 5. 国家海洋局北海信息中心 山东 青岛 266061)

摘要 鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)集生于中潮带和低潮带岩石上,在高、中潮带的水陆或石沼中,有的甚至在低潮时较长时间暴露于日光下。低潮露空下的干露胁迫是影响鼠尾藻生存的关键因子。本研究采集野生鼠尾藻为实验材料,在培养箱中分别失水干露0、1、3、6 h,并在海水中恢复培养,测定不同胁迫时间下藻体的失水率、叶绿素荧光参数和生化参数。结果显示,不同大小的鼠尾藻干露胁迫不同时间后的失水率显著不同,胁迫时间越短,藻体越大,失水率越低,大藻体鼠尾藻的保水能力高于小藻体;干露胁迫使鼠尾藻的叶绿素荧光值显著降低,同株鼠尾藻不同部位对干露胁迫的耐受程度显著不同,梢部耐受能力较差,基部耐受能力较强,小藻体和大藻体的梢部伤害较大,不能恢复,鼠尾藻基部可恢复正常生理状态,干露胁迫时,鼠尾藻以非调节性能量耗散机制为主;干露胁迫时,藻体梢部通过抗氧化酶类[抗超氧阴离子自由基(ASAFR)、超氧化物歧化酶(SOD)]和非抗氧化物质(可溶性糖、脯氨酸)共同作用来应对胁迫,藻体基部主要是通过上调蛋白、可溶性糖和脯氨酸等含量抵抗胁迫。高中潮带的鼠尾藻较易处于高温、强光和干露失水叠加的胁迫状态,同时,又因外部形态和生活环境的不同,藻体各部分的生理生化特性也有一定的差异。本研究探讨了鼠尾藻干露胁迫下的生理生化状态,对研究鼠尾藻抵抗环境胁迫的生态适应性具有重要的指导意义。

关键词 鼠尾藻;干露胁迫;失水率;叶绿素荧光参数;生化特性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0149-12

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)隶属于褐藻门(Phaeophyta)、圆子纲(Cyclosporeae)、墨角藻目(Fucales)、马尾藻科(Sargassaceae)、马尾藻属(*Sargassum*)(曾呈奎, 2009),是北太平洋西部特有的暖温带海藻,在我国北至辽东半岛、南至雷州半岛均有分布。鼠尾藻可与

增殖型鱼礁结合进行海洋生态修复(吴海一等, 2010a),对水体中的营养盐如N、P等的吸收能力较强(王翔宇等, 2011; 包杰等, 2008),并对重金属Pb、Cu、Zn、Cd和As等具有富集和吸附效应(崔大练等, 2013; 范彩彩, 2013; 吴海一等, 2010b; 杨承虎, 2012),是藻

* 国家重点研发计划(2018YFD0900305; 2018YFD0901505)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系和自然资源部北海局海洋科技项目(202007)共同资助。袁艳敏, E-mail: yuanym2991@163.com

① 通信作者:刘福利,研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-10, 收修改稿日期: 2022-01-18

场建设、生态修复的优良藻种。鼠尾藻中甘氨酸和丙氨酸含量较高,被认为是贝类、海参及鲍鱼养殖的优质饵料(谭杰等, 2020; 韩晓弟等, 2005; 何平等, 2011; 王吉桥等, 2008; 周玮等, 2010)。另外,在医药(抗菌、抗肿瘤)和工业原料等方面具有重要的应用潜力(郭奇等, 2010; Park *et al.*, 2005; 李敬等, 2007)。

研究表明,低潮露空下的干露胁迫是影响鼠尾藻生存的关键因素(Chu *et al.*, 2012a、b)。不同环境胁迫条件下,海藻受到的胁迫程度及应答机制也不同。目前,关于鼠尾藻在强光、高温及失水环境下的胁迫及应答的研究较多。如高温、强光和干露失水叠加胁迫对海藻光合器官(PS II 反应中心)造成严重的氧化胁迫,导致其光合活性下降(Takahashi *et al.*, 2011)。鼠尾藻遭受失水和强光胁迫时,分别通过抗氧化系统和依赖叶黄素循环的热耗散机制发挥主导作用(Nan *et al.*, 2016)。干露胁迫引起的失水是影响鼠尾藻光合活性的主要胁迫因子(Yu *et al.*, 2013),是仅次于强光胁迫的第二大影响因素(盛子彤等, 2017)。另外,鼠尾藻通过上调热休克蛋白家族、超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、泛素连接酶、谷氧还蛋白、谷硫还蛋白等基因表达,下调光捕获复合蛋白、叶绿素 *a* 结合蛋白基因表达来应对干露胁迫(刘福利等, 2014)。但关于鼠尾藻在不同干露时间胁迫下的保水能力及恢复不同时间下的生理生化变化未见研究。本研究通过分析不同干露胁迫时间和不同恢复时间条件下藻体重量、叶绿素荧光和生理指标的变化差异,研究鼠尾藻保水能力,解析在干露胁迫条件下鼠尾藻的抗胁迫及恢复能力,为鼠尾藻资源的保护、开发和利用,藻场建设评估提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在山东省青岛太平角海边礁石上采集鼠尾藻样品,以藻体长度约为 3~5 cm 的幼苗为实验材料,用灭菌过滤海水充分清洗后暂养于温度为 15℃、光强约为 40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的低温室中。

1.2 实验方法

将暂养后的鼠尾藻藻体从海水中取出至无连续滴水,测定初始鲜重,然后进行自然干露胁迫。实验条件:温度为 20℃,光强为 200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,平均湿度为 45%。设置 4 个干露处理时间,分别为 0 (对照组)、1、3 和 6 h,每组处理均进行 3 次平行实验,

分别进行如下实验。

1.2.1 干露处理后鼠尾藻的失水情况 按照单株藻体鲜重将鼠尾藻分为 3 组,分别为 0.5~0.9 g 组、1~1.4 g 组、1.5~2.5 g 组。干露处理结束后,立即测定重量,计算相对失水率,并拍照观察表观形态的变化,评价干露胁迫条件下的保水能力,失水率公式如下:

$$D = (W_0 - W_t) / (W_0 - W_d) \times 100$$

式中, D 为失水率(%), W_0 为初始藻体鲜重(g), W_t 为经过一段失水时间后的藻体鲜重(g), W_d 为干重(即实验结束后,于 75℃ 烘箱中烘干 24 h 后的重量)。 t 为实验持续时间(d)。

1.2.2 干露处理后鼠尾藻光合生理指标的变化

干露处理结束后,立即进行暗处理 0.5 h,将暗处理后的样品放在调制叶绿素荧光成像系统(Imaging-Multi Color Pam, WALZ, 德国) MAX 探头下 10 cm \times 13 cm 的黑盒子中,进行光系统 II 最大荧光产量(maximal photochemical efficiency of PS II, F_v/F_m)、荧光诱导动力学曲线(chlorophyll *a* fluorescence transient)和快速光曲线(rapid light curve, RLC)的第 1 次测定;分别恢复培养 1、3 和 6 h 后,对藻体进行第 2 次 F_v/F_m 、荧光诱导动力学曲线、RLC 的测定;根据藻体情况进行恢复 24 h 的第 3 次测定,测定结束后保存所有的图片和数据。

1.2.3 干露处理后鼠尾藻生化参数的变化 每组藻体鲜重约为 0.3 g,干露处理结束后,立刻用液氮把藻体冷冻并于 -80℃ 保存。测定指标包括总蛋白(total protein, TP)浓度,丙二醛(MDA)、叶绿素 *a*、可溶性糖、维生素 C、脯氨酸含量,抗超氧阴离子自由基(anti-superoxide anion free radical, ASAFR)活性, CAT、POD、SOD 的比活力。按照王丽梅等(2011)和 Chouhan 等(2011)的方法测定叶绿素 *a* 和可溶性糖含量,其他生化成分均采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定,试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司,主要试剂盒为植物总蛋白 ELISA 试剂盒、植物丙二醛 ELISA 试剂盒、植物维生素 C ELISA 试剂盒、植物脯氨酸 ELISA 试剂盒、植物抗超氧阴离子 ELISA 试剂盒、植物过氧化氢酶 ELISA 试剂盒、植物过氧化物酶 ELISA 试剂盒、植物超氧化物歧化酶 ELISA 试剂盒。主要仪器为 352 型酶标仪(Labsystems Multiskan MS, 芬兰)、AC8 洗板机(Thermo Labsystems, 芬兰),按照试剂盒说明书进行测定。SOD、POD 和 CAT 的比活力单位为酶单位每毫克蛋白(U/mg prot)。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 数据统计软件进行单因素方差分

析(one-way ANOVA)、Duncan 多重比较及 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。根据荧光诱导动力学曲线数据分析光系统 II 调节性能量耗散的量子产量 $[Y(NPQ)]$ 、光系统 II 非调节性能量耗散的量子产量 $[Y(NO)]$ 和光系统 II 的实际量子产量 $[Y(II)]$ 。利用 RLC 数据和叶子飘等(Ye *et al.*, 2013)机理模型拟合光合-光响应曲线, 求出幼苗的最大电子传递速率(maximum electron transport rate, J_{max})、饱和光强(saturation irradiance, I_{sat})和光响应曲线初始斜率 α 。

2 结果

2.1 干露处理不同时间下鼠尾藻的失水情况

从图 1 可以看出, 干露 1 h 时, 藻体叶片表面少量失水, 叶片萎靡; 恢复 1 h 后, 叶片伸展。干露 3 h

时, 叶片颜色加深, 为深褐色, 叶片萎靡、不伸展、围绕于柄、失水严重; 恢复 3 h 后, 叶片为深褐色、叶片饱满且向外伸张。干露 6 h 时, 叶片为黑褐色, 叶片干燥且严重缩小, 枝条干燥且直径明显变小, 放入水中后为绿褐色, 叶片舒展、直径变大; 恢复 24 h 后, 藻体基部和枝条较粗, 叶片较多的部位颜色恢复正常, 鼠尾藻的小枝条和较细部分的颜色未恢复, 仍为黑褐色, 且叶片韧性较低、较软。

不同鲜重的鼠尾藻干露胁迫不同时间下的失水率变化显著(图 2)。干露 1 h 时, 不同鲜重鼠尾藻的失水率无明显变化, 此时, 水分的减少多为藻体叶片外部的水分。干露 3 h 和 6 h 时, 鲜重低于 0.9 g 的小藻体的失水率最高, 分别达到 55% 和 89%, 且随着藻体鲜重的增大, 失水率显著降低, 即随着胁迫时间的延长, 大藻体鼠尾藻的保水能力高于小藻体。

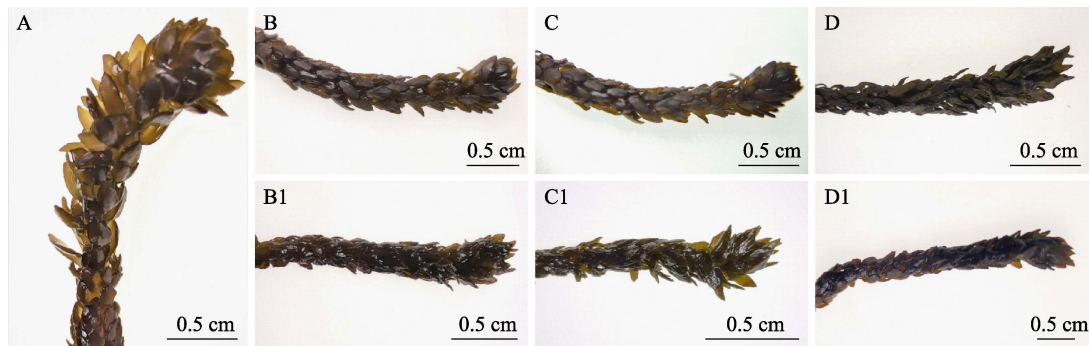


图 1 不同干露和恢复时间下鼠尾藻的外观形态变化

Fig.1 Morphology of *S. thunbergii* under different dehydration and rehydration durations

A: 干露 0 h; B: 干露 1 h, B1: 干露 1 h 后恢复 1 h;

C: 干露 3 h, C1: 干露 3 h 后恢复 3 h; D: 干露 6 h, D1: 干露 6 h 后恢复 24 h

A: Control; B: Dehydration for 1 h; B1: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h;

C: Dehydration for 3 h; C1: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h;

D: Dehydration for 6 h; D1: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h

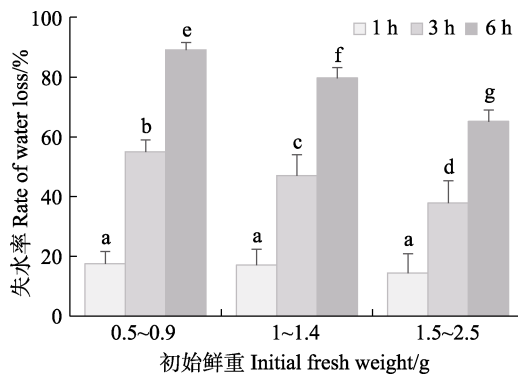


图 2 不同干露时间下鼠尾藻的失水率

Fig.2 Water loss rate of *S. thunbergii* under different dehydration durations

不同小写字母表示组间差异显著, 下同。

Different lowercase letters indicated significant different, the same as below.

2.2 干露处理不同时间对鼠尾藻光合生理的影响

由图 3 和图 4 可知, 同株鼠尾藻不同部位对干露胁迫的耐受程度显著不同。图 3 为干露胁迫不同时间条件下鼠尾藻 F_v/F_m 值的变化, 颜色越蓝, 表明藻体状态越好。干露 1、3 和 6 h 时(分别为图 3B1、C1、D1), 藻体梢部分别为蓝绿、绿色和红褐色, 表明胁迫时间越长藻体生理状态越差。干露处理过程中, 藻体基部颜色变化较小, 即生理状态变化较小。较小的鼠尾藻干露耐受能力差, 同株鼠尾藻中梢部干露耐受能力最差, 基部耐受能力最强。1 h 干露对鼠尾藻基本无影响, 3 h 干露对鼠尾藻的梢部和中部影响较大, 但正常条件下培养 3 h 后有一定程度的恢复; 6 h 干露对鼠尾藻的影响最大, 鼠尾藻的小枝条和梢部的荧光值最低,

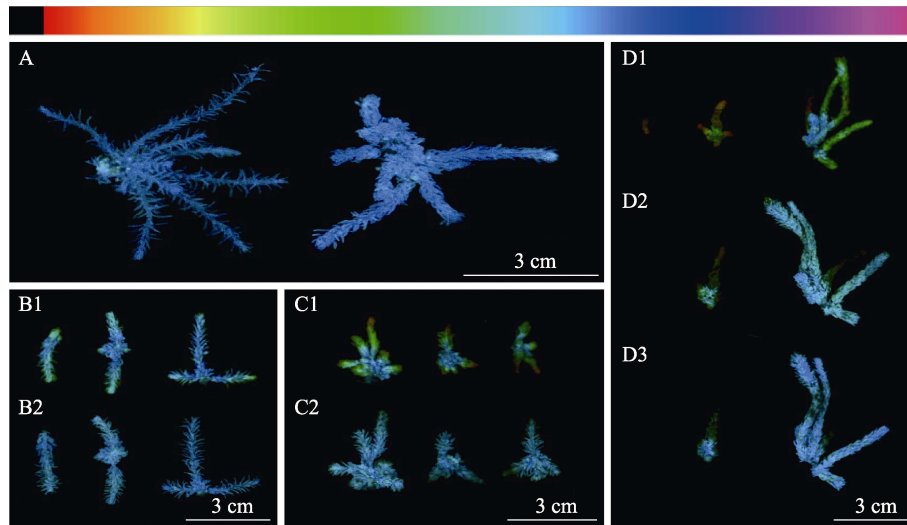


图3 干露处理及恢复不同时间后鼠尾藻的光合生理状态(颜色条越往右表示 F_v/F_m 值越高)
 Fig.3 Photosynthetic physiological state of *S. thunbergii* after dehydration and rehydration (the color bar toward the right indicates the higher F_v/F_m value)

A: 干露 0 h; B1: 干露 1 h, B2: 干露 1 h 恢复 1 h; C1: 干露 3 h, C2: 干露 3 h 恢复 3 h;
 D1: 干露 6 h; D2: 干露 6 h 恢复 3 h; D3: 干露 6 h 恢复 24 h
 A: Control; B1: Dehydration for 1 h; B2: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h; C1: Dehydration for 3 h;
 C2: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h; D1: Dehydration for 6 h; D2: Dehydration for 6 h
 followed by rehydration for 3 h; D3: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h

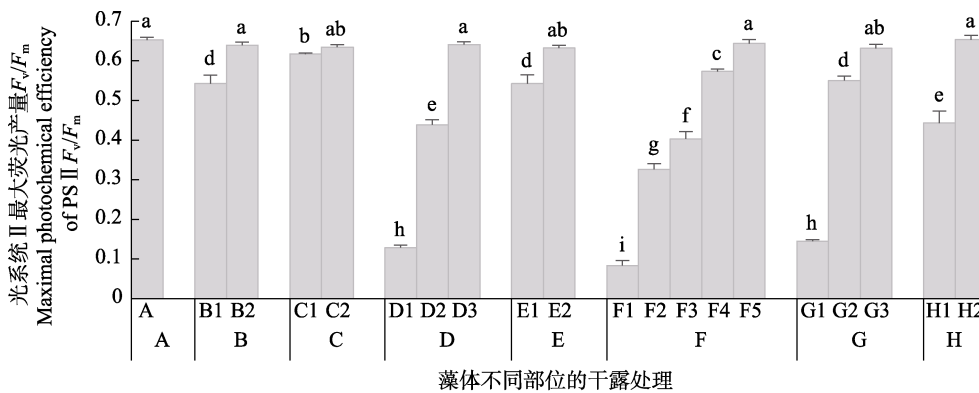


图4 干露处理及恢复不同时间后鼠尾藻的 F_v/F_m
 Fig.4 F_v/F_m of *S. thunbergii* after dehydration and rehydration

A: 干露 0 h (蓝色); B: 干露 1 h, B1: 顶部和叶片(荧绿色), B2: 基部(蓝色); C: 干露 1 h 恢复 1 h, C1: 顶部和叶片(蓝绿色), C2: 基部和柄(蓝色); D: 干露 3 h, D1: 梢部(橙黄色), D2: 中部(绿色), D3: 基部(蓝色); E: 干露 3 h 恢复 3 h, E1: 边缘(蓝绿色), E2: 基部(蓝色); F: 干露 6 h, F1: 梢部(橙红色), F2: 中部(黄绿色), F3: 中部(绿色), F4: 基部(蓝绿色), F5: 基部(蓝色); G: 干露 6 h 恢复 3 h, G1: 梢部(橙黄色), G2: 中部(蓝绿色), G3: 基部(蓝色); H: 干露 6 h 恢复 24 h, H1: 中部(浅蓝绿色), H2: 基部(蓝色)
 横坐标中不同颜色指的是图3干露处理及恢复后鼠尾藻的光合生理状态所呈现的颜色, 下同。

A: Control (blue); B: Dehydration for 1h, B1: Top and leaf (fluorescent green), B2: Base (blue);
 C: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h, C1: Top and leaf (blue-green), C2: Base and handle (blue);
 D: Dehydration for 3 h, D1: Slightly (orange-yellow), D2: Central (green), D3: Base (blue);
 E: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h, E1: Edge (blue-green), E2: Base (blue);
 F: Dehydration for 6 h, F1: Slightly (orange red), F2: Central (yellow-green), F3: Central (green), F4: Base (blue-green), F5: Base (blue);
 G: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 3 h, G1: Slightly (orange-yellow), G2: Central (blue-green), G3: Base (blue);
 H: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h, H1: Middle (light blue-green), H2: Base (blue).
 The different colors in the abscissa refer to the colors of the photosynthetic physiological state of *S. thunbergii* after dehydration and rehydration in Fig.3, the same as below.

接近死亡, 且 24 h 后不能恢复正常, 鼠尾藻的大枝条可恢复。

由图 5 可知, 干露胁迫对鼠尾藻的叶绿素荧光参数有显著影响。干露胁迫后, 鼠尾藻藻体的 $Y(NPQ)$ 显著降低, 恢复正常条件培养后逐渐升高。胁迫后藻体的 $Y(NO)$ 值显著升高, 恢复培养后数值降低。胁迫后藻体的实际量子产率 $Y(II)$ 降低, 恢复培养后有所增高。结果表明, 干露胁迫时, 鼠尾藻以非调节性能

量耗散机制为主, 主动光保护能力降低, 说明干露胁迫会降低鼠尾藻对过剩光强的适应能力。

由图 6 可知, 干露胁迫对鼠尾藻不同部位藻体的饱和光强(I_{sat})影响显著。干露 1 h 后, 鼠尾藻的 I_{sat} 与对照组相比无显著变化; 干露 3 h 后, 鼠尾藻的梢部和中部 I_{sat} 显著降低, 对基部影响较小, 3 h 后可恢复; 干露 6 h 后, 鼠尾藻的 I_{sat} 显著低于对照组, 干露对小藻体伤害较大, 不能恢复正常, 大藻体可恢复正常。

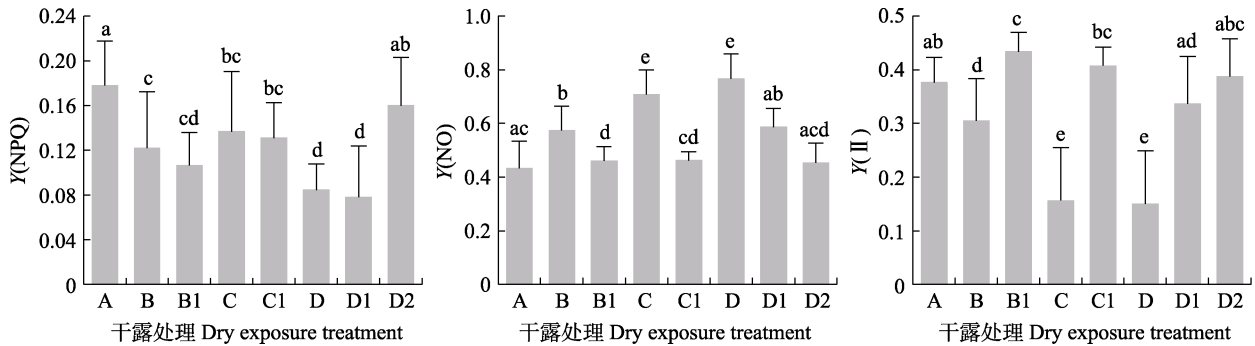


图 5 干露处理及恢复后鼠尾藻的 $Y(NPQ)$ 、 $Y(NO)$ 和 $Y(II)$

Fig.5 $Y(NPQ)$, $Y(NO)$ and $Y(II)$ of *S. thunbergii* after dehydration and rehydration

A: 干露 0 h; B: 干露 1 h, B1: 干露 1 h 恢复 1 h;
 C: 干露 3 h, C1: 干露 3 h 恢复 3 h; D: 干露 6 h 恢复 3 h, D1: 干露 6 h 恢复 3 h, D2: 干露 6 h 恢复 24 h
 A: Control; B: Dehydration for 1 h, B1: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h; C: Dehydration for 3 h,
 C1: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h; D: Dehydration for 6 h, D1: Dehydration for 6 h
 followed by rehydration for 3 h, D2: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h

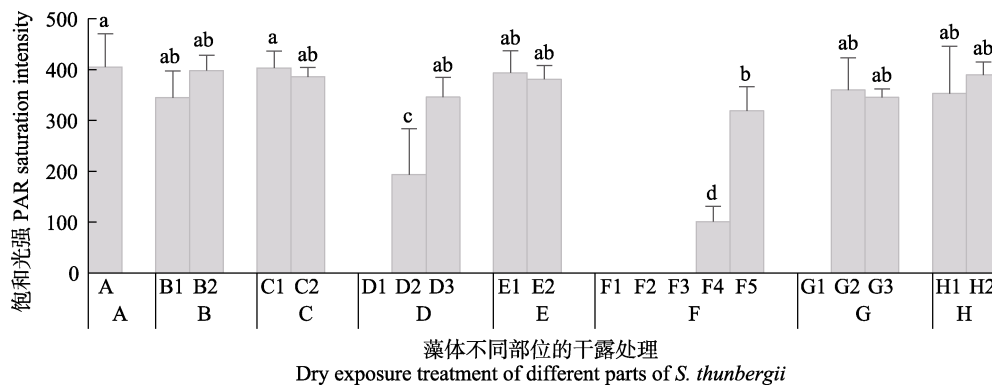


图 6 不同干露时间对鼠尾藻饱和光强(I_{sat})的影响

Fig.6 Effect of dehydration on the saturated light intensity of *S. thunbergii*

A: 干露 0 h (蓝色); B: 干露 1 h, B1: 顶部和叶片(荧绿色), B2: 基部(蓝色); C: 干露 1 h 恢复 1 h,
 C1: 顶部和叶片(蓝绿色), C2: 基部和柄(蓝色); D: 干露 3 h, D1: 梢部(橙黄色), D2: 中部(绿色),
 D3: 基部(蓝色); E: 干露 3 h 恢复 3 h, E1: 边缘(蓝绿色), E2: 基部(蓝色); F: 干露 6 h, F1: 梢部(橙红色),
 F2: 中部(黄绿色), F3: 中部(绿色), F4: 基部(蓝绿色), F5: 基部(蓝色); G: 干露 6 h 恢复 3 h, G1: 梢部(橙黄色),
 G2: 中部(蓝绿色), G3: 基部(蓝色); H: 干露 6 h 恢复 24 h, H1: 中部(浅蓝绿色), H2: 基部(蓝色)
 A: Control (blue); B: Dehydration for 1h, B1: Top and leaf (fluorescent green), B2: Base (blue);
 C: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h, C1: Top and leaf (blue-green), C2: Base and handle (blue);
 D: Dehydration for 3 h, D1: Slightly (orange-yellow), D2: Central (green), D3: Base (blue);
 E: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h, E1: Edge (blue-green), E2: Base (blue);
 F: Dehydration for 6 h, F1: Slightly (orange red), F2: Central (yellow-green), F3: Central (green), F4: Base (blue-green), F5: Base (blue);
 G: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 3 h, G1: Slightly (orange-yellow), G2: Central (blue-green), G3: Base (blue);
 H: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h, H1: Middle (light blue-green), H2: Base (blue)

由图 7 可知,干露胁迫对鼠尾藻快速光曲线的初始斜率 α 有显著影响。干露胁迫后,鼠尾藻藻体各部分的快速光曲线初始斜率 α 均显著降低,且在海水中恢复培养后不能恢复到正常水平。结果表明,干露胁迫后鼠尾藻对光能的利用效率显著降低。

由图 8 可知,干露胁迫对鼠尾藻藻体不同部位的光系统最大电子传递速率(J_{\max})影响显著。干露 1 h 后,鼠尾藻的 J_{\max} 降低,恢复 1 h 后可恢复正常。干露 3 h 后,鼠尾藻的 J_{\max} 显著降低,恢复培养 3 h 后,可恢复正常。干露 6 h 时,鼠尾藻的 J_{\max} 显著低于对照组,干露对小藻体和大藻体的基部、梢部伤害较大,不能恢复正常,而基部可恢复正常。

2.3 干露处理不同时间条件下鼠尾藻的生化参数

从图 9 可以看出,干露处理显著影响鼠尾藻的蛋白浓度和 MDA 含量。干露处理时,鼠尾藻藻体梢部的蛋白含量先增高后降低,但各组间无显著性差异,藻体基部蛋白含量随着干露时间的增加逐渐增高,且均显著高于无胁迫组。藻体梢部干露处理 6 h 的 MDA 含量显著高于其他处理组,0 h 时藻体基部的 MDA 含量显著高于其他干露组,其他组间无显著性差异。

从图 10 可以看出,干露处理不同时间对藻体的叶绿素 a 和可溶性糖含量无显著影响。随着干露时间的增加,藻体梢部叶绿素 a 含量呈逐渐升高的趋势,基部的叶绿素 a 含量无显著变化,但藻体基部叶绿素 a 含量均高于藻体梢部。随干露时间的增加,藻体梢部和基部的可溶性糖含量呈逐渐升高的趋势,且藻体基部可溶性糖含量均高于藻体梢部。

从图 11 可以看出,干露处理显著影响鼠尾藻的维生素 C 和脯氨酸含量。干露处理时,藻体梢部的维生素 C 含量在 6 h 时最高,藻体基部在 0 h 时最高,显著高于其他处理组。藻体梢部和基部的脯氨酸含量随干露时间的增加呈逐渐增高的趋势,干露胁迫 6 h 后,基部含量增加到 1 h 处理组的约 5 倍,梢部含量比干露 1 h 时增加 3 倍多,且在实验时间内,基部脯氨酸含量均高于梢部,结合基部的耐干露胁迫能力更强,这可能说明脯氨酸在鼠尾藻耐受干露胁迫过程中具有重要作用。

从图 12 可以看出,干露处理对鼠尾藻 CAT 和 ASAFR 比活力影响较小。藻体基部的 CAT 比活力在 0 h 时最高,显著高于其他处理组,各处理组梢部 CAT 比活力无显著变化。藻体梢部的 ASAFR 活性随干露

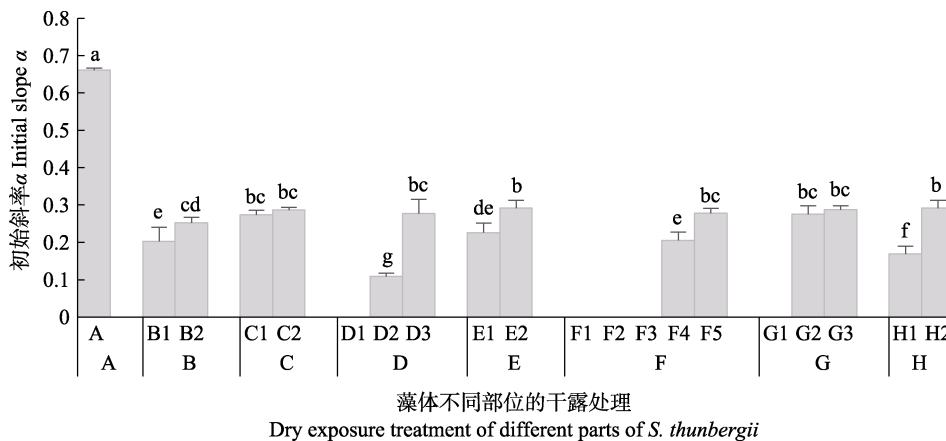


图 7 不同干露时间对鼠尾藻初始斜率 α 的影响

Fig.7 Effect of dehydration on the initial slope α of *S. thunbergii*

- A: 干露 0 h (蓝色); B: 干露 1 h, B1: 顶部和叶片(荧绿色), B2: 基部(蓝色); C: 干露 1 h 恢复 1 h, C1: 顶部和叶片(蓝绿色), C2: 基部和柄(蓝色); D: 干露 3 h, D1: 梢部(橙黄色), D2: 中部(绿色), D3: 基部(蓝色); E: 干露 3 h 恢复 3 h, E1: 边缘(蓝绿色), E2: 基部(蓝色); F: 干露 6 h, F1: 梢部(橙红色), F2: 中部(黄绿色), F3: 中部(绿色), F4: 基部(蓝绿色), F5: 基部(蓝色); G: 干露 6 h 恢复 3 h, G1: 梢部(橙黄色), G2: 中部(蓝绿色), G3: 基部(蓝色); H: 干露 6 h 恢复 24 h, H1: 中部(浅蓝绿色), H2: 基部(蓝色)
- A: Control (blue); B: Dehydration for 1h, B1: Top and leaf (fluorescent green), B2: Base (blue);
 C: Dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h, C1: Top and leaf (blue-green), C2: Base and handle (blue);
 D: Dehydration for 3 h, D1: Slightly (orange-yellow), D2: Central (green), D3: Base (blue);
 E: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h, E1: Edge (blue-green), E2: Base (blue);
 F: Dehydration for 6 h, F1: Slightly (orange red), F2: Central (yellow-green), F3: Central (green), F4: Base (blue-green), F5: Base (blue);
 G: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 3 h, G1: Slightly (orange-yellow), G2: Central (blue-green), G3: Base (blue);
 H: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h, H1: Middle (light blue-green), H2: Base (blue)

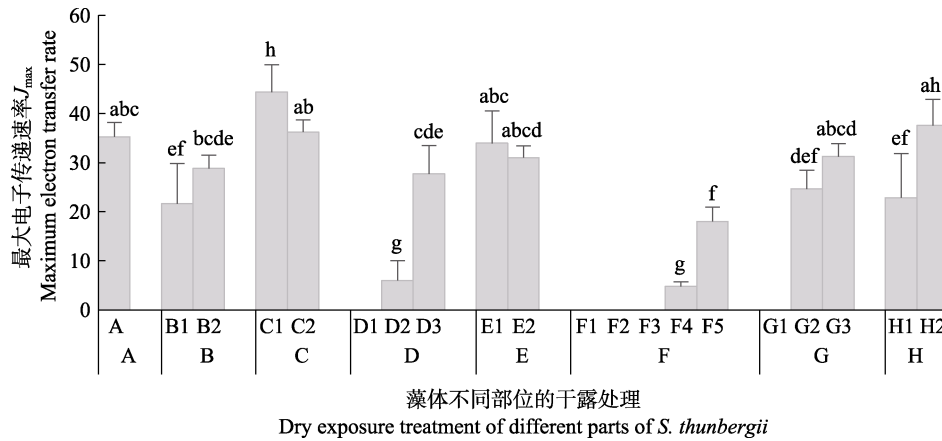


图 8 不同干露时间对鼠尾藻最大电子传递速率(J_{max})的影响

Fig.8 Effect of dehydration on the maximum electron transfer rate of *S. thunbergii*

A: 干露 0 h (蓝色); B: 干露 1 h, B1: 顶部和叶片(荧绿色), B2: 基部(蓝色); C: 干露 1 h 恢复 1 h, C1: 顶部和叶片(蓝绿色), C2: 基部和柄(蓝色); D: 干露 3 h, D1: 梢部(橙黄色), D2: 中部(绿色), D3: 基部(蓝色); E: 干露 3 h 恢复 3 h, E1: 边缘(蓝绿色), E2: 基部(蓝色); F: 干露 6 h, F1: 梢部(橙红色), F2: 中部(黄绿色), F3: 中部(绿色), F4: 基部(蓝绿色), F5: 基部(蓝色); G: 干露 6 h 恢复 3 h, G1: 梢部(橙黄色), G2: 中部(蓝绿色), G3: 基部(蓝色); H: 干露 6 h 恢复 24 h, H1: 中部(浅蓝绿色), H2: 基部(蓝色)

A: Control (blue); B: dehydration for 1h, B1: Top and leaf (fluorescent green), B2: Base (blue); C: dehydration for 1 h followed by rehydration for 1 h, C1: Top and leaf (blue-green), C2: Base and handle (blue), D: dehydration for 3 h, D1: Slightly (orange-yellow), D2: Central (green), D3: Base (blue); E: Dehydration for 3 h followed by rehydration for 3 h, E1: Edge (blue-green), E2: Base (blue), F: Dehydration for 6 h, F1: Slightly (orange red), F2: Central (yellow-green), F3: Central (green), F4: Base (blue-green), F5: Base (blue); G: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 3 h, G1: Slightly (orange-yellow), G2: Central (blue-green), G3: Base (blue); H: Dehydration for 6 h followed by rehydration for 24 h, H1: Middle (light blue-green), H2: Base (blue)

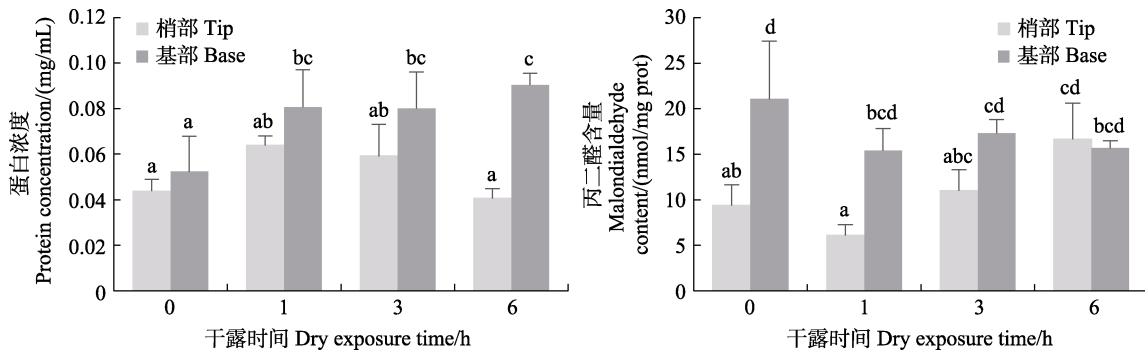


图 9 鼠尾藻在不同干露时间下的蛋白浓度和 MDA 含量

Fig.9 Protein concentration and malondialdehyde content of *S. thunbergii* under dehydration durations

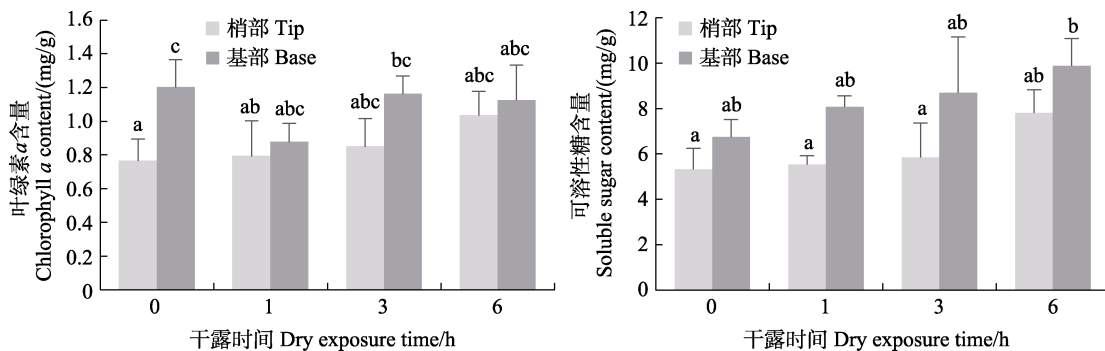


图 10 鼠尾藻在不同干露时间下的叶绿素 a 和可溶性糖含量

Fig.10 Chlorophyll a and soluble sugar content of *S. thunbergii* under dehydration durations

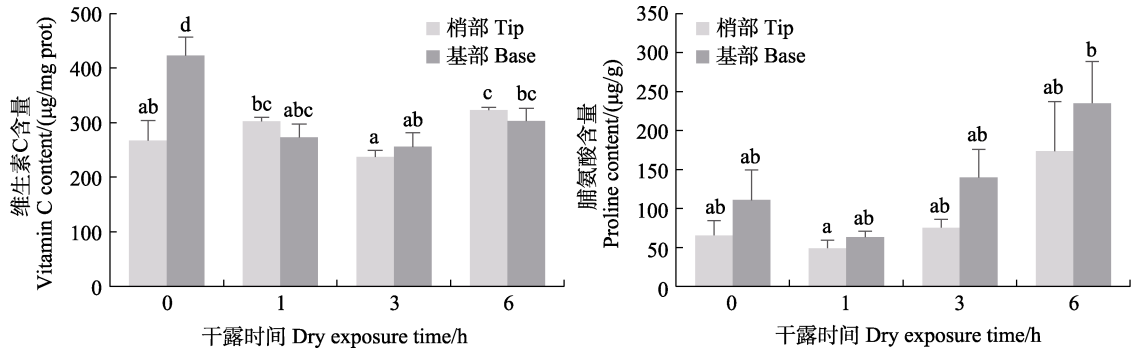


图 11 鼠尾藻在不同干露时间下的维生素 C 和脯氨酸含量
Fig.11 Vitamin C and proline content of *S. thunbergii* under dehydration durations

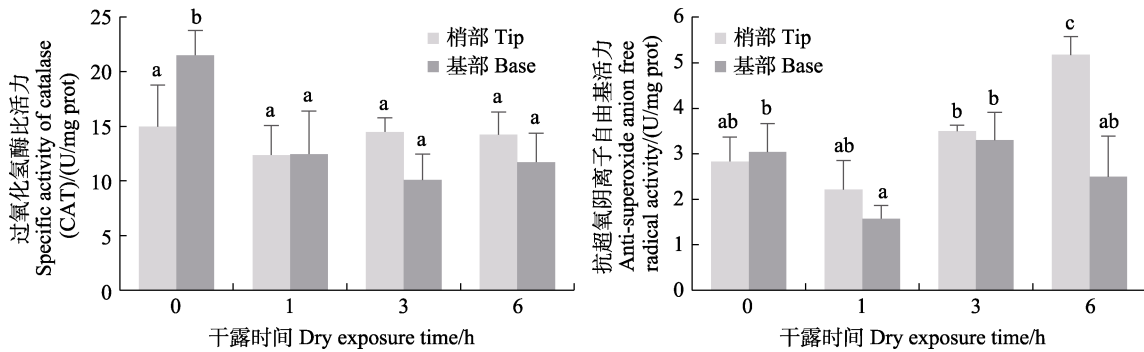


图 12 鼠尾藻在不同干露时间下的 CAT 比活力和抗超氧阴离子自由基(ASA FR)活性
Fig.12 CAT specific activity and anti-superoxide anion free radical (ASA FR) activity under dehydration durations of *S. thunbergii*

时间的增加呈增高的趋势,干露 6 h 后显著高于其他处理组,藻体基部 ASA FR 在 1 h 时最低,显著低于 3 h 处理组,其他组间无显著性差异。

从图 13 可以看出,干露处理不同时间对藻体的 POD 比活力无显著影响,藻体梢部的 POD 比活力高

于基部。干露处理显著影响藻体的 SOD 比活力,藻体梢部 SOD 比活力随干露时间的增加呈逐渐增高的趋势,干露 6 h 后显著高于其他处理组,藻体基部 SOD 比活力在 1 h 时最低,显著低于 0 h 和 3 h 处理组,其他组间无显著性差异。

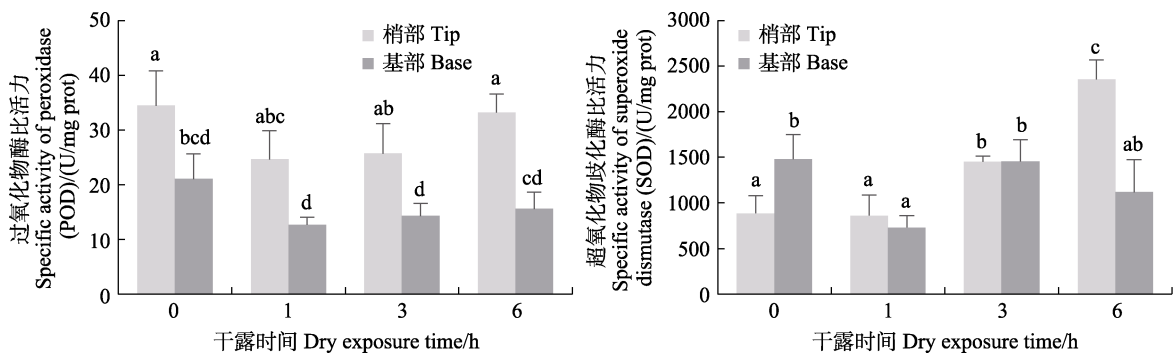


图 13 鼠尾藻在不同干露条件下的过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)比活力
Fig.13 Specific activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in *S. thunbergii* under different dehydration conditions

3 讨论

随着潮汐作用,潮间带海藻生长于 2 种不同环境中:低潮时暴露于空气中,高潮时沉没于海水中。在这 2 种环境条件下,海藻光合能力和作用机理不同。

沉没于海水时,海藻利用水体中的溶解性无机碳进行光合作用;在干露状态下,主要利用空气中的 CO₂ 进行光合作用(邹定辉等, 2001)。鼠尾藻是分布在潮间带及潮下带礁石上的一种重要的经济海藻,伴随着淹没和露空 2 种环境动态交替出现(Helmuth *et al*,

2002; Martínez *et al.*, 2012), 不同潮间带的海藻对环境胁迫的耐受能力和恢复能力不同(Davison *et al.*, 1996; Zardi *et al.*, 2011; Colvard *et al.*, 2014)。生长环境的不同会引起鼠尾藻生态结构和生化组分的差异, 低潮时的高温、强光和失水是对潮间带固着型的鼠尾藻形成严重环境胁迫的主要因子, 会引起鼠尾藻出现显著的生理学变化。

本研究发现, 鼠尾藻耐干露的能力与干露时间和藻体大小显著相关。干露 1 h 时, 大、小藻体失水率约为 16%, 无显著性差异, 此时, 水分的减少多为藻体叶片外部的水分蒸发。鼠尾藻多于潮间带岩礁固着生长, 幼期鳞片状小叶密密的排列在主干上, 初生分枝的幼期也覆盖螺旋状重叠的鳞片叶, 其后, 次生分枝自鳞片叶腋间生出。低潮时, 密集排列的鳞状叶片减少了暴露于空气中的面积, 同时叶片间隙可储存少量的海水, 短时间的干露胁迫仅使藻体表面水分蒸发, 对藻体本身的伤害相对较小。随着藻体干露时间逐渐增加, 在干露 6 h 时, 小藻体的失水率达到了 89%, 而相对较大藻体的失水率为 65%, 随着藻体质量的增加, 失水率显著降低, 即随着胁迫时间的延长, 大藻体鼠尾藻的保水能力高于小藻体。

光合能力的强弱与光合器官 PS II 活性及电子传递有关, 叶绿素荧光参数是反映光合生理状态的重要参数。经过充足暗适应后, 测出的 F_v/F_m 反映了当时所有的 PS II 反应中心均处于开放态时的量子产量, 即植物的潜在最大光合能力, 是衡量植物光能转换效率的指标(张守仁, 1999)。随着鼠尾藻失水程度的加大, F_v/F_m 显著降低, 推测是失水抑制了光合链的电子传递和相关酶的活性。由于植物组织分化的空间差异性, 经同一种胁迫条件产生的伤害在同一藻体不同部位也可能是不同的; 随着干露胁迫时间增加, 同一藻体不同部位呈现不同的荧光值, 叶缘荧光值下降, 而叶片中部仍呈现规律性的光合活性。随着干露时间增加, 胁迫程度增强, 鼠尾藻藻体的 $Y(II)$ 、 $Y(NPQ)$ 、初始斜率 α 、 I_{sat} 和 J_{max} 均逐渐降低, $Y(NO)$ 值逐渐升高, 说明水分缺失使藻体的光能转换效率和光保护能力显著降低, 光合损伤程度较高。胁迫下的藻体由调节性的光保护机制转换到非调节性能量耗散机制, 恢复适宜条件培养后, 荧光值上调, 藻体可恢复调节性光保护机制。这些结果表明, 干露胁迫会降低鼠尾藻对光照的适应性, 自然界中, 干露和强光的协同作用可能对鼠尾藻造成严重胁迫。另外, 本研究还发现, 鼠尾藻不同部位对于干露胁迫的响应不同, 梢部的光合生理状态更容易受到干露胁迫的影响。

抗氧化系统包括还原物质和抗氧化酶类, 在经历失水和复水的过程中, 海藻体内不同氧化还原物质的含量与活性的变化也不尽相同。植物体内可溶性蛋白质大多是酶类, 参与细胞的各种代谢活动, 其含量是反映植物体总代谢的一个重要指标(詹冬梅等, 2013)。干露胁迫时, 鼠尾藻藻体边缘和中部表现出不同的蛋白含量变化。轻度胁迫(即 1~3 h)时, 梢部蛋白浓度增高, 可能是藻体内的应激蛋白发挥抵抗胁迫作用, 随着胁迫强度增大, 超出鼠尾藻的主动调节范围, 导致蛋白浓度降低, 可能失去了活性。藻体基部叶片生长状态较好, 承受干露胁迫的能力也较大, 干露胁迫 1~6 h 时, 蛋白浓度呈升高的趋势, 可能是藻体内的应激蛋白一直在发挥作用。

植物体内活性氧(ROS)的积累会导致氧化胁迫, MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一, 常被作为判断膜脂过氧化的主要指标(杜秀敏等, 2001)。本研究发现, 随着胁迫时间延长, 梢部的 MDA 含量不断积累、上升, 而基部的 MDA 含量无显著性变化, 说明, 梢部遭受 ROS 的氧化作用更严重。藻体内抗氧化酶系统如 ASAFR、CAT、SOD 和 POD 等对于清除 ROS 至关重要。干露胁迫下鼠尾藻梢部的 ASAFR、SOD 活性显著升高, 积极消除 ROS 的毒害作用, 重建氧化还原平衡以维持生理代谢活动, 而基部的抗氧化酶类在干露胁迫下活性变化较小, 这说明梢部通过调用抗氧化酶系统来清除 ROS, 而基部可能通过非抗氧化酶类来调控 ROS。对脯氨酸含量变化的研究结果验证了该推测。如图 10 所示, 鼠尾藻藻体梢部和基部的脯氨酸含量随干露时间的增加呈逐渐增高的趋势, 且在实验时间内基部脯氨酸含量均高于梢部。脯氨酸是水溶性最大的氨基酸, 脯氨酸的积累是藻类及高等动植物在胁迫下常见的生理反应, 其可行使渗透调节、抗氧化和分子伴侣等生理功能(Delauney *et al.*, 1993; Szabados *et al.*, 2010)。鼠尾藻在干露胁迫时, 可溶性糖和脯氨酸含量显著增加, 在耐受能力弱的梢部和抗氧化酶系统共同发挥作用抵抗胁迫, 在耐受能力较好的藻体基部主要是上调脯氨酸等抗氧化物质含量抵抗胁迫, 保持藻体活性。糖是参与调节渗透胁迫的小分子物质, 在植物对水分胁迫的适应性调节中是增加渗透性溶质的重要组成成分。研究表明, 干露胁迫条件下, 鼠尾藻的可溶性糖含量上升。这些可溶性糖一部分作为渗透调节物质起作用, 另一部分为新蛋白质的合成提供了碳架, 还有一些可间接转化为脯氨酸, 这样又促进了植物中脯氨酸含量的增加(史玉炜等, 2007)。

参 考 文 献

- BAO J, TIAN X L, DONG S L, *et al.* Effect of temperature, salinity and light intensity on nitrogen and phosphorus uptake by *Sargassum thunbergii*. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 293–300 [包杰, 田相利, 董双林, 等. 温度、盐度和光照强度对鼠尾藻氮、磷吸收的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 293–300]
- CHOUHAN A, IQBAL S, MAHESHWARI R S, *et al.* Study of effect of air pollution on photosynthetic pigment of some plants growing in Pithampur industrial area, Dhar (M.P.). International Journal of Current Scientific Research, 2011, 1(4): 187–190
- CHU S H, ZHANG Q S, LIU S K, *et al.* Tolerance of *Sargassum thunbergii* germlings to thermal, osmotic and desiccation stress. Aquatic Botany, 2012a, 96(1): 1–6
- CHU S H, ZHANG Q S, YONG Z T, *et al.* High tolerance to fluctuating salinity allows *Sargassum thunbergii* germlings to survive and grow in artificial habitat of full immersion in intertidal zone. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2012b, 412: 66–71
- COLVARD N B, CARRINGTON E, HELMUTH B. Temperature-dependent photosynthesis in the intertidal alga *Fucus gardneri* and sensitivity to ongoing climate change. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2014, 458: 6–12
- CUI D L, DENG Y B, MA Y X, *et al.* Study on heavy metal lead ion adsorption by *Sargassum thunbergii*. Marine Environmental Science, 2013, 32(6): 893–895 [崔大练, 邓一兵, 马玉心, 等. 鼠尾藻吸附水体重金属铅离子的研究. 海洋环境科学, 2013, 32(6): 893–895]
- DAVISON I R, PEARSON G A. Stress tolerance in intertidal seaweeds. Journal of Phycology, 1996, 32(2): 197–211
- DELAUNEY A J, HU C A, KISHOR P B, *et al.* Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(25): 18673–18678
- DU X M, YIN W X, ZHAO Y X, *et al.* The production and scavenging of reactive oxygen species in plants. Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(2): 121–125 [杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制. 生物工程学报, 2001, 17(2): 121–125]
- FAN C C. The biological adsorption effect research of rat tail algae on heavy metal lead, copper, zinc, cadmium in water. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2013 [范彩彩. 鼠尾藻对水体重金属铅、铜、锌、镉的生物吸附效应研究. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2013]
- GUO Q, WEI Y X, YIN B Z, *et al.* Study on the antimicrobial activity of different fractions of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* kuntze. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(1): 117–121 [郭奇, 魏玉西, 殷邦忠, 等. 鼠尾藻多酚分级组分的抑菌活性研究. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 117–121]
- HAN X D, LI L P. Characteristics and utilization of *Sargassum thunbergii*. Special Economic Animals and Plants, 2005, 8(1): 27 [韩晓弟, 李岚萍. 鼠尾藻特征特性与利用. 特种经济动植物, 2005, 8(1): 27]
- HE P, XU W D, WANG L M. Research status and development trend of *Sargassum thunbergii*. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(3): 363–367 [何平, 许伟定, 王丽梅. 鼠尾藻研究现状及发展趋势. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 363–367]
- HELMUTH B, HARLEY C D G, HALPIN P M, *et al.* Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. Science, 2002, 298(5595): 1015–1017
- LI J, WEI Y X, DU G C, *et al.* Anticoagulant activities of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* Kuntze. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2007, 18(3): 191–194 [李敬, 魏玉西, 杜桂彩, 等. 鼠尾藻多酚的抗凝血活性研究. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 191–194]
- LIU F L, WANG F J, SUN X T, *et al.* Preliminary study on the response of gene expression to desiccation in *Sargassum thunbergii*. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 282–288 [刘福利, 王飞久, 孙修涛, 等. 鼠尾藻基因表达对于胁迫响应的初步研究. 水产学报, 2014, 38(2): 282–288]
- MARTÍNEZ B, ARENAS F, RUBAL M, *et al.* Physical factors driving intertidal macroalgae distribution: Physiological stress of a dominant fucoid at its southern limit. Oecologia, 2012, 170(2): 341–353
- NAN G N, ZHANG Q S, SHENG Z T, *et al.* Coordination between xanthophyll cycle and antioxidant system in *Sargassum thunbergii* (Sargassaceae, Phaeophyta) in response to high light and dehydration stresses. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(4): 2587–2596
- PARK P J, HEO S J, PARK E J, *et al.* Reactive oxygen scavenging effect of enzymatic extracts from *Sargassum thunbergii*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(17): 6666–6672
- SHENG Z T, NAN G N, ZHANG D, *et al.* Comparison of photosynthesis physiology among different *Sargassum thunbergii* populations in Shandong Peninsula. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering), 2017, 30(1): 17–25 [盛子彤, 南国宁, 张迪, 等. 山东半岛鼠尾藻不同地理种群的光合生理学比较. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2017, 30(1): 17–25]
- SHI Y W, WANG Y L, LI W B, *et al.* Effects of water stress on soluble protein, soluble sugar and proline content in *Tamarix hispida*. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2007, 30(2): 5–8 [史玉炜, 王燕凌, 李文兵, 等. 水分胁迫对刚毛怪柳可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量变化的影响. 新疆农业大学学报, 2007, 30(2): 5–8]
- SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: A multifunctional amino acid. Trends in Plant Science, 2010, 15(2): 89–97

- TAKAHASHI S, BADGER M R. Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 53–60
- TAN J, LI F H, CHEN S Q, *et al.* Effect of temperature and diet on the reproductive condition of sea cucumber *Apostichopus japonicus* broodstock. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 96–103 [谭杰, 李凤辉, 陈四清, 等. 不同培育水温和饲料对刺参人工促熟效果的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 96–103]
- WANG J Q, SUI X N, GU G M, *et al.* Effects of combination of various feeds and feeding rates on growth and survival of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2008, 27(2): 55–58 [王吉桥, 隋晓楠, 顾公明, 等. 不同饲料搭配及投喂量对仿刺参稚、幼参生长和成活的影响. *水产科学*, 2008, 27(2): 55–58]
- WANG L M, LI S G, CHAI Y, *et al.* Indoor culture and sexual reproduction synchronization of *Sargassum thunbergii* young seedlings. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 395–404 [王丽梅, 李世国, 柴雨, 等. 鼠尾藻幼苗的室内培养及有性生殖同步化. *水产学报*, 2011, 35(3): 395–404]
- WANG X Y, ZAN D M, LI M Z, *et al.* Preliminary studies on the nitrogen and phosphorus absorption capability of macroalgae. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 67–71 [王翔宇, 詹冬梅, 李美真, 等. 大型海藻吸收氮磷营养盐能力的初步研究. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 67–71]
- WU H Y, LIU H J, ZHAN D M, *et al.* Research present situation of *Sargassum thunbergii*. *Territory and Natural Resources Study*, 2010a(1): 95–96 [吴海一, 刘洪军, 詹冬梅, 等. 鼠尾藻研究与利用现状. *国土与自然资源研究*, 2010a(1): 95–96]
- WU H Y, ZHAN D M, LIU H J, *et al.* Study on accumulation and degradation of heavy metals by the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Marine Sciences*, 2010b, 34(1): 69–74 [吴海一, 詹冬梅, 刘洪军, 等. 鼠尾藻对重金属锌、镉富集及排放作用的研究. *海洋科学*, 2010b, 34(1): 69–74]
- YANG C H. A Study on heavy metal concentration and adsorption by macroalgae in south coastal area of Zhejiang Province. Master's Thesis of Wenzhou Medical College, 2012 [杨承虎. 浙南海区大型海藻富集和吸附重金属研究. 温州医学院硕士研究生学位论文, 2012]
- YE Z P, SUGGETT D J, ROBAKOWSKI P, *et al.* A mechanistic model for the photosynthesis-light response based on the photosynthetic electron transport of photosystem II in C3 and C4 species. *New Phytologist*, 2013, 199(1): 110–120
- YU Y Q, ZHANG Q S, TANG Y Z, *et al.* Diurnal changes of photosynthetic quantum yield in the intertidal macroalga *Sargassum thunbergii* under simulated tidal emersion conditions. *Journal of Sea Research*, 2013, 80(1): 50–57
- ZARDI G I, NICASTRO K R, CANOVAS F, *et al.* Adaptive traits are maintained on steep selective gradients despite gene flow and hybridization in the intertidal zone. *PLoS One*, 2011, 6(6): e19402
- ZENG C K. *Seaweed in the Yellow Sea and Bohai Seas of China*. Beijing: Science Press, 2009, 395 [曾呈奎. 中国黄渤海海藻. 北京: 科学出版社, 2009, 395]
- ZHAN D M, WU H Y, LIU M X, *et al.* Impact of irradiances on growth and biochemical composition of *Sargassum muticum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 140–144 [詹冬梅, 吴海一, 刘梦侠, 等. 光照强度对海黍子生长及部分生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 140–144]
- ZHANG S R. 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]
- ZHOU W, ZHANG H J, LI Z D, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010, 25(4): 359–364 [周玮, 张慧君, 李赞东, 等. 不同饲料蛋白水平对仿刺参生长的影响. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(4): 359–364]
- ZOU D H, GAO K S. Progress in studies on photosynthetic inorganic carbon utilization in marine macroalgae. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(5): 83–90 [邹定辉, 高坤山. 大型海藻类光合无机碳利用研究进展. *海洋通报*, 2001, 20(5): 83–90]

(编辑 马瑾艳)

Study on the Physiological and Biochemical Influence of *Sargassum thunbergii* Under Dehydration

YUAN Yanmin¹, LIU Fuli^{1,2①}, LIANG Zhouhui¹, ZHANG Pengyan¹,
LIU Yi^{1,3}, ZHENG Yanxin⁴, ZHANG Haining⁵

(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, Shandong 266071, China; 2. Ministry of Education, Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China; 5. North China Sea Data and Information Service of SOA, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract *Sargassum thunbergii* is distributed on reefs and rock marshes in mid- and low-tide zones, and some are periodically exposed to lengthy low tides. Dehydration is a key factor affecting the survival of *S. thunbergii* at low tides. In this study, using wild *S. thunbergii* as experimental material, the water loss rate, chlorophyll fluorescence parameters, and biochemical parameters under different stresses were determined by dehydrating the thalli in an incubator for 0, 1, 3, and 6 h. The results showed that: (1) algae of different sizes have significantly different water loss rates under different stresses. The shorter the stress time and the larger the algae, the lower the water loss rate, indicating that the water retention capacity of *S. thunbergii* with larger thalli is higher. Wild *S. thunbergii* grow in clusters on reefs. The leaves in the lower part of the branches and near the holdfast are wide. The middle and upper leaves are narrow and long, respectively. The lower broad leaves are easily blocked by the upper branches. Therefore, differences in the growth environment cause differences in the ecological structure and biochemical components of *S. thunbergii*. High temperature, strong light, and water loss at low tide are the main factors that cause severe environmental stress to sessile *S. thunbergii* in the intertidal zone. (2) Dehydration significantly reduced the chlorophyll fluorescence value of *S. thunbergii*, and different parts of the same individual of *S. thunbergii* had significantly different tolerance to dehydration, with the lowest tolerance at branch tips and the strongest tolerance at the base. The non-regulatory energy-dissipation mechanism plays a major role in the dehydration response of *S. thunbergii*. Under dry exposure, the light energy utilization efficiency of *S. thunbergii* was significantly reduced. This reduction in active light protection capacity indicates that dehydration reduces the adaptability of *S. thunbergii* to excessive light intensity. Dehydration can damage the tips of small individuals that cannot recover, while the base part of large individuals could return to a normal physiological state. (3) Antioxidant enzymes (ASAFR, SOD) and non-antioxidant substances (soluble sugar and proline) in the tip part responded to dehydration, and the base part mainly responded by upregulation of protein, soluble sugar, and proline content to resist stress. *S. thunbergii*, located in the high and middle tide zones, is more likely to be stressed by high temperatures, strong light, and dehydration, and the physiological and biochemical characteristics of different parts of the thallus are also variable due to differences in external morphology. Algae mainly reduce damage to the photosynthetic system caused by a lack of water through a non-regulatory energy dissipation mechanism. The water retention capacity of the base was better than branch tips during dry exposure, and the damage to algal cells was low. The main roles are as heat shock proteins, soluble sugars, proline, and other small molecules, which can pass stress response, osmotic regulation, and anti-oxidation resists damage to cells caused by stress. The water retention capacity of the top cells was weak, and the stress was relatively strong. Antioxidant enzymes such as ASAFR and SOD in algae and non-antioxidant enzymes such as soluble sugars and proline, work together to resist dry exposure stress, reduce cell damage and maintain cell viability. In summary, under the stress of dry exposure, the antioxidant enzymes, antioxidant substances, and non-regulatory energy dissipation mechanisms of *S. thunbergii* play a role in maintaining cell activity. This study provides important guidance for exploring the ecological adaptability of *S. thunbergii* in resisting environmental stress.

Key words *Sargassum thunbergii*; Dry exposure; Rate of water loss; Chlorophyll fluorescence parameters; Biochemical property

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220517002

http://www.yykxjz.cn/

刘锦帆, 胡晓娟, 曹煜成, 许云娜, 文国樑, 李力, 孙真, 沈斌. 宁夏地区不同模式养殖池塘夏季浮游微藻群落特征. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 161-173

LIU J F, HU X J, CAO Y C, XU Y N, WEN G L, LI L, SUN Z, SHEN B. Community characteristics of planktonic microalgae in aquaculture ponds of different modes in Ningxia in summer. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 161-173

宁夏地区不同模式养殖池塘夏季 浮游微藻群落特征*



刘锦帆^{1,2} 胡晓娟² 曹煜成² 许云娜²
文国樑^{1,2①} 李力³ 孙真⁴ 沈斌¹

- (1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 广东省渔业生态环境重点实验室 广东 广州 510300; 3. 宁夏泰嘉渔业有限公司 宁夏 石嘴山 753000; 4. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 为研究宁夏地区夏季不同模式养殖池塘的浮游微藻群落结构特征, 采集了当地棚塘接力养殖(PT)、稻渔种养(DY)、土池养殖(TC) 3种模式的池塘水体样品, 分析了其浮游微藻群落组成及其与水质因子的相关性。结果显示, 共检出浮游微藻 5 门 27 属, 总数量为 $1.52 \times 10^4 \sim 2.39 \times 10^8$ ind./L, 生物量为 0.16~97.78 mg/L, 数量多样性为 0.03~3.31, 生物量多样性为 0.29~3.58。不同模式池塘的浮游微藻群落结构差异显著。PT 模式池塘的微藻群落无明显共性特征, 蓝藻(Cyanophyta)、绿藻(Chlorophyta)和硅藻(Bacillariophyta)占优势情况均有出现, 如拟鱼腥藻(*Anabaenopsis* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、颤藻(*Oscillatoria* sp.)、盘星藻(*Pediastrum* sp.)、卵囊藻(*Oocystis* sp.)、小环藻(*Cyclotella* sp.)等; TC 模式池塘的微藻优势属单一, 分别以盘星藻、小球藻(*Chlorella* sp.)和微囊藻(*Microcystis* sp.)占优势; DY 模式池塘的微藻多样性丰富, 以小环藻、栅藻(*Scenedesmus* sp.)、盘星藻、卵囊藻、刚毛藻(*Cladophora* sp.)等绿藻和小环藻、菱形藻(*Nitzschia* sp.)等硅藻为优势藻。蓝藻生物量与水体中硝酸盐氮($\text{NO}_3\text{-N}$)、亚硝酸盐氮($\text{NO}_2\text{-N}$)、化学需氧量(COD)浓度呈显著正相关($P < 0.05$)。研究表明, 宁夏地区夏季温度高、光照时间长, 池塘水体中 C、N 营养高, 易形成以微囊藻、拟鱼腥藻等有害蓝藻优势种群; 调控池塘水质时应将其作为关键控制点之一, 防控有害藻华暴发而导致减产降效的不良状况发生。

关键词 微藻群落; 水质; 宁夏; 盐碱水池塘

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0161-13

浮游微藻是养殖池塘生态系统物质循环中不可或缺的重要组成部分之一, 它们可以调节池塘水体的透明度、酸碱度, 吸收水体的营养盐, 增加水中溶解氧(DO), 为养殖生物提供优质活饵料等(Muller-Feuga,

* 国家重点研发计划(2020YFD0900401)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目(2020TD54)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2021SD08)共同资助。刘锦帆, E-mail: fj6abc@163.com

① 通信作者: 文国樑, 研究员, E-mail: wgl610406@163.com

收稿日期: 2022-05-17, 收修改稿日期: 2022-06-06

2000; 彭聪聪等, 2010)。不同地区、不同类型养殖水体的浮游微藻群落组成有所不同。彭聪聪等(2012)研究发现, 珠江河口区的罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 主要以颤藻 (*Oscillatoria* sp.)、平裂藻 (*Merismopedia* sp.) 等蓝藻 (Cyanophyta) 和小球藻 (*Chlorella* sp.)、空星藻 (*Coelastrum* sp.) 等绿藻 (Chlorophyta) 为优势种, 而生物量优势种多为裸藻 (Euglenophyta)、甲藻 (Dinophyta) 和隐藻 (Cryptophyta)。查广才等(2006)、彭聪聪等(2011)研究表明, 低盐度集约化养殖池塘以绿藻和蓝藻为主, 其次是硅藻 (Bacillariophyta), 在养殖中后期, 蓝藻数量和生物量均为绝对优势种。侯兴等(2021)研究发现, 在北方桑沟湾水域中, 浮游植物以硅藻为绝对优势种, 其中, 具槽帕拉藻 (*Paralia sulcata*) 为全年优势种。乔玲等(2021)研究表明, 山东省虾-蟹-鱼混养池和贝养殖池的海水池塘生态养殖系统浮游植物群落组成中, 绿藻和隐藻为主要优势类群。浮游微藻群落结构与养殖水质、养殖生物的健康生长密切相关。Carmichael 等(2001)研究表明, 微囊藻 (*Microcystis*)、鱼腥藻 (*Anabaena*)、颤藻等蓝藻均可分泌毒素, 危害养殖生物。亚历山大藻 (*Alexandrium*)、裸甲藻 (*Gymnodinium*)、盾甲藻 (*Pyrodinium*) 等甲藻可分泌神经毒性生物碱类藻毒素, 经食物链传播积累于鱼类、贝类体内, 影响其生理状态(张海涛等, 2023)。Cao 等(2014)研究发现, 养殖对虾产量与池塘中蓝藻的优势度呈显著的负相关关系, 即在养殖过程中, 如果形成以有害蓝藻为优势的微藻群落结构, 将严重影响对虾养殖产量。马清扬等(2021)研究表明, 蓝藻水华会影响中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 肠道和鳃的菌群结构及其养殖环境。黄翔鸽等(2002)研究表明, 以波吉卵囊藻 (*Oocystis borgei*) 为优势种的浮游微藻藻相可降低水体中氨氮 ($\text{NH}_4\text{-N}$) 和亚硝酸盐氮 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 的浓度, 有效调节水体中的 pH。

宁夏回族自治区位于我国西北部, 其水产养殖主要有土池养殖、稻田养殖、大棚养殖、棚塘接力养殖等养殖模式, 养殖品种主要有鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 等, 近年来, 发展了鲮鱼 (*Leiocassis longirostris*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 等品种(农业农村部渔业渔政管理局, 2022)。位于宁夏北部的石嘴山、银川等地的养殖池塘多为西北硫酸盐型盐碱池塘, 中部地区位于河套平原, 水体中盐碱程度较低。宁夏地区在夏季日照时间长、光照强度高(李茜等, 2007), 该地区夏季养殖池塘浮游微藻藻相少见报道。

本研究选择了宁夏地区棚塘接力 (PT)、土池养殖 (TC)、稻渔种养 (DY) 3 种模式的典型养殖池塘, 分析浮游微藻群落特征和池塘水质因子特征, 以为宁夏地区养殖池塘的浮游微藻调控提供基础数据支持。

1 材料与方法

1.1 采样地点与养殖池塘情况

2021 年 7 月在宁夏回族自治区采集棚塘接力、土池养殖、稻渔种养 3 种模式共 9 口养殖池塘样品, 分别编号为 PT-1、PT-2、PT-3、TC-1、TC-2、TC-3、DY-1、DY-2 和 DY-3。9 口池塘分别位于石嘴山市平罗县、银川市贺兰县、中卫市沙坡头区, 各池塘基本情况详见表 1。

白天光照下的池塘水温为 24.3~29.9℃, pH 在 7.8~9.3 之间, 盐度为 0~2。PT-1、PT-2、PT-3、TC-1、TC-2 和 Y-1 共 6 口池塘位于宁夏西北及北部, 水体碱度相对较高, 为 230~260 mg/L; DY-2、DY-3 和 TC-3 池塘位于宁夏中部河套平原地区, 水体碱度相对较低, 为 160~170 mg/L。PT-1 池塘养殖的凡纳滨对虾于 6 月初由水泥池转至大棚养殖; PT-3 池塘养殖的凡纳滨对虾于 6 月底从大棚转至池塘养殖, 采用生态养殖方式, 未投料; TC-3 池塘水为典型蓝藻水, 肉眼可见微藻密度大。

1.2 浮游微藻样品的采集与处理

2021 年 7 月 28—30 日对养殖池塘微藻进行采样。采样时, 在每个池塘四周及中央使用 2.5 L 采水器各采水样 1 份并充分混匀, 取 1 L 倒入聚乙烯塑料瓶, 加入 5% 甲醛溶液固定, 静置浓缩至 10 mL 后, 在显微镜下于浮游生物计数框中进行藻类鉴定和细胞计数。

1.3 水样的采集与检测

在池塘四周及中央水下 0.5 m 处使用采水器采集水样, 混匀后按不同的理化指标检测要求分装水样, 冷藏样品带回实验室检测。其中, $\text{NH}_4\text{-N}$ 采用纳氏试剂分光光度法测定 (HJ/T535-2009), 硝酸盐氮 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 使用紫外分光光度法测定 (HJ/T346-2007), $\text{NO}_2\text{-N}$ 采用分光光度法测定 (GB/T7493-1987), 总无机氮 (TIN) 为以上无机三氮之和, 总氮 (TN) 采用碱性过硫酸钾消解分光光度法测定 (GB/T11894-1989), 磷酸盐 ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) 采用磷钼蓝分光光度法测定 (《水和废水监测分析方法》), 总磷 (TP) 采用钼酸铵分光光度法测定 (GB/T11893-1989), 化学需氧量 (COD) 采用重铬酸盐法测定 (GB/T11914-1989)。

表 1 池塘基本情况
Tab.1 Basic information of ponds

池号 Pond	PT-1	PT-2	PT-3	TC-1	TC-2	TC-3	DY-1	DY-2	DY-3
养殖模式 Culture model	棚塘接方模 式-大棚水 泥池	棚塘接方模 式-铺膜泥 底池	棚塘接方模 式-大棚水 泥池	土池养鱼	土池养鱼	土池养鱼	稻田种养模式 的养鱼池	稻田种养模式 玻璃钢养鱼池	稻田种养模式 的沉淀池
采样地点 Sampling location	石嘴山市 平罗县	石嘴山市 平罗县	石嘴山市 平罗县	石嘴山市 平罗县	银川市贺兰县	中卫市 沙坡头区	银川市贺兰县	中卫市 沙坡头区	中卫市 沙坡头区
面积 Area/hm ²	0.05	1.07	0.05	0.93	3.67	8.00	3.33	0.14	4.67
养殖生物 Culture species	凡纳滨对虾 (<i>L.vannamei</i>)	凡纳滨对虾 (<i>L.vannamei</i>)	加州鲈鱼 (<i>Micropterus salmoides</i>)	黄河鲤(<i>C. carpio</i>)、鲢鱼 (<i>H. molitrix</i>)	草鱼(<i>C. idella</i>)、鲤 鱼(<i>C. carpio</i>)、 鲫鱼(<i>C. auratus</i>)	草鱼(<i>C. idella</i>)、 鲤鱼(<i>C. carpio</i>)	草鱼(<i>C. idella</i>)、鲤 鱼(<i>C. carpio</i>)、鲢 鱼(<i>H. molitrix</i>)	斑点叉尾 鲰(<i>Ictalurus punctatus</i>)、鲤鱼 (<i>C. carpio</i>)、草 鱼(<i>C. idella</i>)	鲢鱼 (<i>H. molitrix</i>)
放苗时间 Stocking time	2021-05	2021-06	2021-07	2021-07	2020-07	2020-08	2021-07	2021-05	2021-04
有无漂浮物 Floating object	表面浮沫	无	表面浮沫	无	下风口漂有死鱼	蓝藻藻体浮沫	无	无	无
水色 Water color	绿色	深绿色	浅褐色	绿色	黄绿色	墨绿色	褐色	浅褐色	浅褐色
水深 Water depth/m	1.1	1.5	1.5	1.5	2.5	2.0	1.5	1.7	2.0
水温 Water temperature/°C	27.3	26.9	24.3	27.6	29.3	26.7	29.9	26	26.7
pH	8.2	8.8	8.4	8.2	8.2	8.7	9.3	7.8	8.5
盐度 Salinity	2	2	2	2	2	0	2	1	1
碱度 Alkalinity/(mg/L)	260	260	260	260	230	160	260	170	170
溶氧量 Dissolved oxygen/(mg/L)	5.07	10.04	6.85	9.47	7.8	3.35	10.27	5.34	7.09

1.4 浮游微藻样品分析

参考《中国淡水藻类》(胡鸿钧, 1980)、《藻类学》(福迪等, 1980)的方法, 在光学显微镜下, 对浮游微藻进行定性鉴定与定量计数。在多样性分析(沈国英, 2003)中, 采用 Shannon 计算数量多样性指数(Hq'), 公式如下:

$$Hq' = -\sum_{i=1}^s Q_i \log_2 Q_i$$

生物量多样性指数(Hb')的计算公式:

$$Hb' = -\sum_{i=1}^s B_i \log_2 B_i$$

在优势度分析中, 数量优势度 $Y = Q_i \cdot f$, 生物量优势度 $Y_{物} = B_i \cdot f$ 。

式中, $Q_i = n_i / N$ (n_i 为物种 i 的个体数, N 为群落样本个体总数), Q_i 为第 i 种个体数占总个体数的比例; B_i 为第 i 种微藻生物量占总生物量的比例; S 为群落中物种数; f 为该种在该地区出现的频率, 一般视为常数值 1。本研究以属为物种单位计算。

生物量的计算是在显微镜检视中采用目微尺实测藻体长度、宽度、厚度等, 然后依据微藻细胞的形状拟合模型计算出藻体体积, 再乘以微藻的比重 1.1 换算为微藻生物量(孙军等, 2004)。其中, 优势属定义为每次取样中微藻数量或生物量占总量比例在 10% 以上, 常见属在 1%~10% 范围内, 稀有属在 1% 以下或只在个别水样中出现(麦雄伟, 2003)。

1.5 数据分析

采用 SPSS 软件对藻类总数量、总生物量、各门藻类生物量与养殖池塘水质理化因子进行双变量相关性分析, 并计算相关系数。

2 结果与分析

2.1 各池塘浮游微藻属类组成及优势属

共鉴定出浮游微藻 5 门 27 属。其中, 蓝藻 7 属, 绿藻 13 属, 硅藻 5 属, 裸藻 1 属, 甲藻 1 属(图 1)。棚塘接力模式池塘浮游微藻的总数量在 $10^6 \sim 10^7$ ind./L 之间; 土池养殖模式中, 3 口池塘浮游数量变化较大, 在 $10^4 \sim 10^8$ ind./L 之间, 其中, TC-3 池达到 2.39×10^8 ind./L; 稻渔种养模式浮游微藻的总数量在 $10^4 \sim 10^5$ ind./L 之间。从整体来看, 棚塘接力模式养殖池中浮游微藻总数量较土池养殖模式和稻渔种养模式偏多。

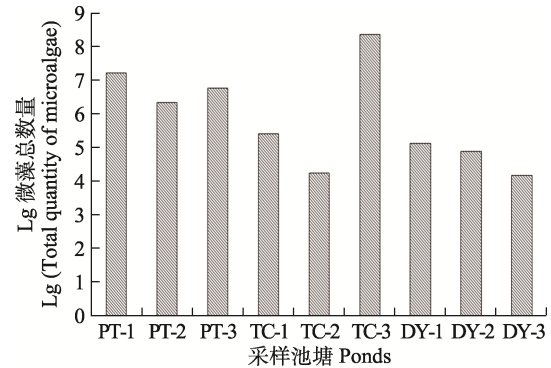


图 1 浮游微藻总数量
Fig.1 Total quantity of planktonic microalgae

各池塘浮游微藻属种类组成以丰富度反映其数量优势度(表 2), 生物量优势属见表 3。在棚塘接力养殖模式中, 各池塘的浮游微藻群落结构没有明显的共同特征, PT-1 的数量优势属为微囊藻属、鱼腥藻属、平裂藻属等蓝藻, 生物量优势属为盘星藻属(*Pediastrum*)、卵囊藻属(*Oocystis*)等绿藻; PT-2 中, 除颤藻属、鱼腥藻属等蓝藻为数量优势属和盘星藻属、实球藻属(*Pandorina*)等绿藻为生物量优势属外, 其数量和生物量优势属还有硅藻门(Bacillariophyta)的小环藻属(*Cyclotella*); PT-3 的数量和生物量优势属均为蓝藻门(Cyanophyta)的拟鱼腥藻属(*Anabaenopsis*)。在土池养殖模式中, 各池塘的浮游微藻优势属较为单一, TC-1 的数量优势属为盘星藻属、小环藻属, 同时, 盘星藻属也是生物量优势属; TC-2 的数量和生物量优势属均为小球藻属; TC-3 的数量和生物量优势属均为微囊藻属。在稻渔种养养殖模式中, 各池塘的数量和生物量优势属均为绿藻或硅藻。DY-1 的数量优势属为小球藻属, 生物量优势属为栅藻属(*Scenedesmus*)、小球藻属和卵囊藻属; DY-2 的数量优势属为小球藻属、小环藻属和菱形藻属(*Nitzschia*), 生物量优势属为小环藻属、盘星藻属和栅藻属; DY-3 的数量优势属为小球藻属和小环藻属, 生物量优势属为盘星藻属和刚毛藻属(*Cladophora*)。研究表明, 优势属和常见属多见于蓝藻门、绿藻门(Chlorophyta)和硅藻门, 甲藻门(Dinophyta)和裸藻门(Euglenophyta)均为稀有属。所有养殖池塘中, 除 PT-3、DY-2 和 TC-3 外, 其余 6 口池塘的生物量优势属均为绿藻。其中, 4 口池塘为盘星藻, 即 3 种不同养殖模式的养殖池塘中绿藻均为主流优势藻。DY-2 池塘中硅藻门小环藻属的数量和生物量优势度较高; 而 PT-3 和 TC-3 池塘则以蓝藻的数量和生物量占绝对优势, 分别为拟鱼腥藻属和微囊藻属。尤其是 TC-3 池塘的微囊藻属大量繁殖, 其数量和生物量优势度均 > 0.95。

表 2 池塘的浮游微藻种类组成
Tab.2 Composition of planktonic microalgae genera in ponds

门 Phylum	属类组成 Genus	丰富度 Abundance								
		PT-1	PT-2	PT-3	TC-1	TC-2	TC-3	DY-1	DY-2	DY-3
蓝藻门 Cyanophyta	微囊藻属 <i>Microcystis</i>	+++		+	++		+++	++		
	颤藻属 <i>Oscillatoria</i>	++	+++	++				++		
	螺旋藻属 <i>Spirulina</i>			+				+		
	鱼腥藻属 <i>Anabaena</i>	+++	+++	+			+	++		
	拟鱼腥藻属 <i>Anabaenopsis</i>			+++				++		
	平裂藻属 <i>Merismopedia</i>	+++	+	+	++	++	+	+		
绿藻门 Chlorophyta	色球藻属 <i>Chroococcus</i>	++	+		++	++		++	+	++
	小球藻属 <i>Chlorella</i>	++	+		++	+++		+++	+++	+++
	实球藻属 <i>Pandorina</i>	+	++	+	+		+			
	卵囊藻属 <i>Oocystis</i>	++	+	+	+	++	+	+		
	盘星藻属 <i>Pediastrum</i>	++	++	+	+++	++	+	+	++	++
	栅藻属 <i>Scenedesmus</i>	++	++	+	++	++	+	++	++	++
	空星藻属 <i>Coelastrum</i>				+	++		+		
	集星藻属 <i>Actinastrum</i>									
	刚毛藻属 <i>Cladophora</i>	+					+			++
	弓形藻属 <i>Schroederia</i>				+	++		+		
	双月藻属 <i>Dicloster</i>				+					++
	四角藻属 <i>Tetraedron</i>					++		++	+	++
	多芒藻属 <i>Golenkinia</i>					++		++	++	++
	月牙藻属 <i>Selenastrum</i>		+					+	+	
硅藻门 Bacillariophyta	小环藻属 <i>Cyclotella</i>	++	+++	+	+++	++	+	++	+++	+++
	舟形藻属 <i>Navicula</i>	++	++	+	++	++	+	++	++	++
	骨条藻属 <i>Skeletonema</i>			+			+			
	菱形藻属 <i>Nitzschia</i>		+	+	++	++	+	++	+++	++
	脆杆藻属 <i>Fragilaria</i>		+							
裸藻门 Euglenophyta	裸藻属 <i>Euglena</i>	+	+	+	+		+	+	+	++
甲藻门 Dinophyta	多甲藻属 <i>Peridinium</i>				+					

注: +为稀有属; ++为常见属; +++为优势属。

Note: +, rare species; ++, common species; +++, dominant species.

表 3 浮游微藻优势属
Tab.3 Dominant genera of planktonic microalgae

PT-1	PT-2	PT-3	TC-1	TC-2	TC-3	DY-1	DY-2	DY-3
盘星藻属 <i>Pediastrum</i> (0.22)	盘星藻属 <i>Pediastrum</i> (0.40)	拟鱼腥藻属# <i>Anabaenopsis</i> (0.75)	盘星藻属# <i>Pediastrum</i> (0.75)	小球藻属# <i>Chlorella</i> (0.78)	微囊藻属# <i>Microcystis</i> (0.97)	栅藻属 <i>Scenedesmus</i> (0.22)	小环藻属# <i>Cyclotella</i> (0.32)	盘星藻属 <i>Pediastrum</i> (0.46)
平裂藻属# <i>Merismopedia</i> (0.21)	实球藻属 <i>Pandorina</i> (0.20)	盘星藻属 <i>Pediastrum</i> (0.16)				小球藻属# <i>Chlorella</i> (0.14)	盘星藻属 <i>Pediastrum</i> (0.23)	刚毛藻属 <i>Cladophora</i> (0.42)
卵囊藻属 <i>Oocystis</i> (0.21)	小环藻属# <i>Cyclotella</i> (0.16)					卵囊藻属 <i>Oocystis</i> (0.13)	栅藻属 <i>Scenedesmus</i> (0.20)	

注: 括号内数值代表微藻生物量优势度; #表示既是数量优势属, 又是生物量优势属。

Note: The data in brackets represent the dominance of microalgae. “#” shows that the microalgae is not only quantity dominant, but also biomass dominant.

2.2 浮游微藻多样性指数

物种多样性包括数量多样性和生物量多样性。物种多样性指数可反映生物群落的异质性与稳定性,其生态信息含量及抗干扰能力与该指数呈正相关关系(孙耀等, 1998)。采用 Shannon 指数对微藻的数量和生物量进行统计(图 2), 根据生物多样性阈值(陈清潮等, 1994)(表 4)进行比对。结果显示, 除 PT-3 和 TC-3 外, 其他样品的数量多样性为 2.1~3.5, 数量多样性较好或丰富(Ⅲ~Ⅳ级)。PT-3 的数量和生物量多样性为 I~II 级; TC-3 的藻类生物多样性尤为单一, 数量和生物量多样性指数仅有 0.03 和 0.29。此外, DY-1 的多样性指数最高, 生物量多样性指数高达 3.58。在

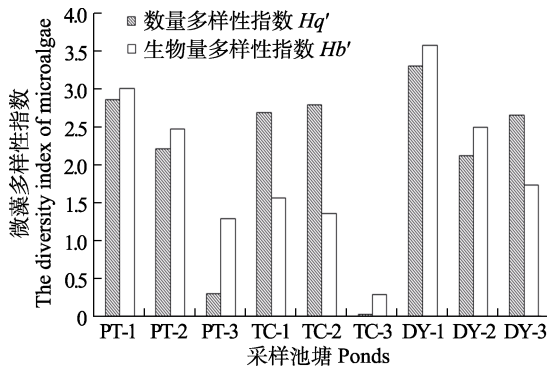


图 2 浮游微藻多样性指数

Fig.2 The diversity index of planktonic microalgae

表 4 生物多样性阈值的分级评价标准

Tab.4 Evaluation standard for biodiversity threshold

评价等级 Evaluation level	阈值 Threshold	等级描述 Level description
I	<0.6	多样性差
II	0.6~1.5	多样性一般
III	1.6~2.5	多样性较好
IV	2.6~3.5	多样性丰富
V	>3.5	多样性非常丰富

蓝藻占优势的养殖池塘中, 浮游微藻的物种多样性会大大降低; 而绿藻或硅藻占优势的养殖池塘中, 微藻多样性较高, 微藻群落结构较为健康。从整体来看, 浮游微藻多样性指数排序: 稻渔种养模式>棚塘接力模式>土池养殖模式。棚塘接力模式和土池养殖模式池塘的微藻数量多样性低于稻渔种养模式养殖池塘; 且土池养殖模式养殖池塘的微藻生物量多样性低于棚塘接力模式和稻渔种养模式养殖池塘。

2.3 养殖池塘水质因子

各池塘水质指标见表 5。从表 5 可以看出, 棚塘接力模式养殖池塘的 TN 浓度在 6.40~8.45 mg/L 之间, 平均值为 7.17 mg/L; TIN 浓度在 1.08~3.20 mg/L 之间, 平均值为 2.12 mg/L; NH_4^+-N 浓度在 0.95~3.07 mg/L 之间, 平均值为 1.96 mg/L; 3 口池塘的 $NO_2^- -N$ 浓度相比无明显差异, 在 0.005~0.007 mg/L 之

表 5 池塘水质指标

Tab.5 Water quality index of ponds

指标 Index/(mg/L)	PT-1	PT-2	PT-3	PT 模式 平均值	TC-1	TC-2	TC-3	TC 模式 平均值	DY-1	DY-2	DY-3	DY 模式 平均值
总氮 TN	6.40	6.65	8.45	7.17±1.12	4.21	2.28	9.71	5.40±3.86	3.03	3.29	3.10	3.14±0.14
总无机氮 TIN	1.08	3.20	2.08	2.12±1.06	0.32	0.55	1.96	0.94±0.89	0.46	1.35	0.70	0.84±0.46
氨氮 NH_4^+-N	0.95	3.07	1.87	1.96±1.06	0.24	0.20	0.75	0.40±0.31	0.37	1.15	0.62	0.71±0.40
亚硝酸盐氮 $NO_2^- -N$	0.007	0.005	0.005	0.006±0.001	0.003L	0.069	0.588	0.220±0.320	0.003	0.068	0.003	0.025±0.038
硝酸盐氮 $NO_3^- -N$	0.12	0.12	0.20	0.15±0.05	0.08L	0.28	0.62	0.33±0.27	0.08	0.13	0.08L	0.10±0.03
总磷 TP	0.98	1.19	0.63	0.93±0.28	0.49	0.38	1.08	0.65±0.38	0.29	0.59	0.39	0.42±0.15
磷酸盐 $PO_4^{3-} -P$	0.25	0.14	0.32	0.24±0.09	0.13	0.03	0.21	0.12±0.09	0.10	0.33	0.22	0.22±0.12
化学需氧量 COD	106.00	73.00	84.00	88.00±17.00	68.00	55.00	195.00	106.00±77.00	68.00	38.00	32.00	46.00±19.00

注: 检测结果小于检出限以“检出限 L”表示。

Note: The detection result is less than the detection limit, which is expressed as "detection limit L".

间, 平均值为 0.006 mg/L; $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度在 0.12~0.20 mg/L 之间, 3 口池塘的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度相比无明显差异, 平均值为 0.15 mg/L; TP 浓度为 0.63~1.19 mg/L, 平均值为 0.93 mg/L; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度在 0.14~0.32 mg/L 之间, 平均值为 0.24 mg/L; COD 在 73.00~106.00 mg/L 之间, 平均值为 88.00 mg/L。

土池养殖模式池塘的 TN 浓度为 2.28~9.71 mg/L, 平均值为 5.40 mg/L; TIN 浓度为 0.32~1.96 mg/L, 平均值为 0.94 mg/L; $\text{NH}_4\text{-N}$ 的浓度为 0.20~0.75 mg/L, 平均值为 0.40 mg/L; $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度为 0.003~0.588 mg/L, 平均值为 0.220 mg/L; $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度在 0.08~0.62 mg/L 之间, 平均值为 0.33 mg/L; TP 浓度在 0.38~1.08 mg/L 之间, 平均值为 0.65 mg/L; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度在 0.03~0.21 mg/L 之间, 平均值为 0.12 mg/L; COD 在 55.00~195.00 mg/L 之间, 平均值为 106.00 mg/L。

稻渔种养模式的 3 口养殖池塘的 TN 浓度相比差异不大, 在 3.03~3.29 mg/L 之间, 平均值为 3.14 mg/L; TIN 浓度为 0.46~1.35 mg/L, 平均值为 0.84 mg/L; $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度为 0.37~1.15 mg/L, 平均值为 0.71 mg/L; $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度为 0.003~0.068 mg/L, 平均值为 0.025 mg/L; 3 口池塘的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度相比无显著差异, 在 0.08~0.13 mg/L 之间, 平均值为 0.10 mg/L; TP 浓度在 0.29~0.59 mg/L 之间, 平均值为 0.42 mg/L; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度在 0.10~0.33 mg/L 之间, 平均值为 0.22 mg/L; COD 在 32.00~68.00 mg/L 之间, 平均值为 46.00 mg/L。

所有池塘中, 棚塘接力模式的 PT-2 的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度最高, 达到 3.07 mg/L。土池养殖模式的 TC-2 的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度显著低于其他池塘, 仅为 0.03 mg/L。土池养殖模式 TC-3 的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 显著高于其他池塘, 分别高达 0.62 和 0.588 mg/L, 其 TN、TP 和 COD 浓度也达到较高水平。从整体来看, 稻渔种养模式养殖池塘的 TN 和 COD 含量相对于棚塘接力模式和土池养殖模式偏低。

2.4 浮游微藻与水质因子的相关性

浮游微藻的群落结构会受到养殖池塘水体各种理化因子的影响, 如温度、光照、盐度、pH 和营养盐浓度等(彭聪聪等, 2010)。藻类总数量、总生物量、各门类藻类生物量与水质理化因子的相关分析发现, 各养殖池塘的温度、pH、碱度与微藻的总量及其群落结构无显著相关关系。藻类总数量、总生物量和蓝藻生物量与盐度存在显著的负相关关系($P < 0.05$)。在营养盐方面, 藻类总数量、总生物量及蓝藻生物量与水体的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、COD 浓度呈极显著正相关关系($P < 0.01$); 绿藻的生物量与各指标浓度均无明显的相关关系; 硅藻的生物量则与 TP 浓度呈显著正相关关系($P < 0.01$)(表 6)。从表 6 可以看出, 在池塘水体中, 藻类总数量和总生物量受蓝藻的影响较大, 一旦蓝藻大量增殖, 将在微藻群落中占绝对优势。蓝藻生物量与水体中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、有机物浓度呈极显著正相关($P < 0.01$)。

表 6 浮游微藻与水质因子的相关性分析

Tab.6 Correlation coefficient between microalgae and water quality factors

项目 Items	藻类总数量 Total quantity of microalgae	藻类总生物量 Total biomass of microalgae	蓝藻生物量 Biomass of Cyanophyta	绿藻生物量 Biomass of Chlorophyta	硅藻生物量 Biomass of Bacillariophyta
总氮 TN	0.663	0.699*	0.666	0.287	0.462
总无机氮 TIN	0.272	0.263	0.264	0.028	0.503
氨氮 $\text{NH}_4\text{-N}$	-0.097	-0.086	-0.104	0.048	0.503
亚硝酸盐氮 $\text{NO}_2\text{-N}$	0.984**	0.932**	0.980**	-0.043	0.055
硝酸盐氮 $\text{NO}_3\text{-N}$	0.924**	0.872**	0.920**	-0.054	0.017
总磷 TP	0.499	0.592	0.509	0.492	0.844**
磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	0.093	0.135	0.100	0.199	0.059
化学需氧量 COD	0.912**	0.949**	0.919**	0.325	0.394
pH	0.204	0.145	0.195	-0.209	-0.204
温度 Temperature	-0.117	-0.125	-0.112	-0.068	-0.486
盐度 Salinity	-0.787*	-0.715*	-0.781*	0.170	0.128
碱度 Alkalinity	-0.517	-0.432	-0.510	0.277	0.306

注: **表示显著水平在 0.01, *表示显著水平在 0.05。

Note: **: Significant correlation at 0.01 level, *: Significant correlation at 0.05 level.

3 讨论

3.1 宁夏地区夏季养殖池塘浮游微藻特征分析

盐碱水属于咸水范畴, 由于其成因与地理环境、地质土壤、气候等有关, 其水化学组成复杂, 类型繁多; 与海水和淡水相比, 盐碱水大都具有高 pH、高碳酸盐碱度、高离子系数的特点(王慧等, 2003)。盐碱水体因高 pH、高碱度的特点, 水质调控成为盐碱养殖的要点和难点。宁夏回族自治区位于我国西北地区, 其养殖池塘多为西北硫酸盐型盐碱池塘。邱小琮等(2011)研究表明, 宁夏沙湖浮游微藻的种类依季节而异, 春季优势种的种类较多, 蓝藻、硅藻和绿藻均有分布, 夏、秋季以蓝藻占绝对优势, 而冬季则以绿藻为主。宁夏地区夏季高温, 日照长, 硫酸盐型盐碱水体等地区特征和养殖生物量、养殖品种等生物因素, 都会成为影响当地养殖池塘浮游微藻群落结构的因素。从生物量优势上来看, 在本次采样的 3 种养殖模式池塘中, 稻渔种养模式养殖池塘的数量和生物量优势种为盘星藻、小球藻、栅藻等绿藻或小环藻等硅藻; 而棚塘接力模式和土池养殖模式均有一口池塘出现蓝藻为数量和生物量优势种的情况, 分别为拟鱼腥藻和微囊藻。这表明尽管大部分池塘中的浮游微藻群落结构以绿藻、硅藻为优势藻, 但部分棚塘接力模式和土池养殖模式池塘仍存在蓝藻过度繁殖并成为单一优势藻的情况。因此, 宁夏地区夏季养殖池塘中形成蓝藻水华的问题仍然需要得到重视。

3.2 蓝藻与水体理化因子及养殖生物的关系

微囊藻、鱼腥藻、颤藻等有害蓝藻在养殖池塘中大量增殖易形成水华, 会对水质环境造成不良影响, 危害养殖生物的生命健康(李媛等, 2015)。首先, 蓝藻大量繁殖时形成的水华散发腥臭, 恶化池塘水体的通风和光照条件, 败坏水质并影响水体的正常功能, 同时, 挤压其他藻类和水生动物的生存空间; 其次, 蓝藻的繁殖及死亡后分解将消耗大量 DO, 水体缺氧则导致鱼类大量死亡的“泛塘”现象(姚雁鸿等, 2007)。蓝藻产生的藻毒素、大量羟胺及 H₂S 等有毒物质, 会直接对水产养殖生物造成生命威胁(Cremen *et al.*, 2007)。简言之, 发生蓝藻水华时, 养殖池塘水体的理化指标往往超出养殖生物的耐受限度而引发大量死亡, 造成经济损失和池塘水体环境污染。Cao 等(2014)研究发现, 养殖对虾产量与池塘中蓝藻的优势度呈显著的负相关关系, 即在养殖过程中, 如果形成以有害蓝藻为优势的微藻群落结构, 将严重影响对虾

养殖产量。因此, 在养殖生产中, 应防控水体形成以有害蓝藻为优势的微藻藻相。在本次取样的池塘中, 蓝藻的数量和生物量均占绝对优势的养殖池塘为棚塘接力模式的 PT-3 和土池养殖模式的 TC-3, 优势属分别为拟鱼腥藻属和微囊藻属。

水温和光照是影响蓝藻水华产生的主要物理因素(姚雁鸿等, 2007)。蓝藻形成水华的最适温度通常是 20~35℃, 其中, 微囊藻属、鱼腥藻属、颤藻属等的最适生长水温在 25℃ 及以上(Reynolds, 1990)。同时, 许多蓝藻种类对强光有较强的忍受力。Huisman 等(1999)研究表明, 蓝藻的光照需求大于绿藻, 且达到一定光照强度时, 绿藻种群减少而蓝藻种群开始增加。在我国西北内陆如宁夏干旱与半干旱地区, 夏季往往干旱高温持续数日, 光照度强和光照时间长, 在棚塘接力模式和土池养殖模式中, 大棚的温室效应和土池直接受长时间强光日照等因素, 易使环境温度保持在较高水平, 因此, 夏季强光、高温的养殖池塘水体状态在一定程度上抑制了其他藻类生长, 蓝藻却恰逢其时大量增殖。

水中营养盐浓度同样影响着藻类的生长繁殖, 如 N、P 营养盐是决定蓝藻是否暴发的重要因素(Edwards *et al.*, 2011; Mellard *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012)。鱼腥藻类可以通过其自身的异形孢进行固氮作用, 因此, 对水环境中的氮浓度要求较低, 磷浓度是显著影响鱼腥藻类生长的营养盐因子(梁恒等, 2010), 高 P 环境有利于其生长, 反之则抑制其生长。在 PT-3 中, 水体中 PO₄³⁻-P 水平达到 0.32 mg/L, 与其他采样池塘相比较, 为拟鱼腥藻大量生长繁殖提供有利条件。富营养化的池塘水体有利于微囊藻的增殖, 较高的 N、P 浓度明显促进微囊藻的生长(孔繁翔, 2011)。在 TC-3 水体中, TN 和 TP 浓度分别为 9.71 和 1.08 mg/L, 显著高于其他采样池塘中的 N、P 水平, 直接引起微囊藻水华的暴发。相关性分析表明, 蓝藻生物量与水体中 NO₃-N、NO₂-N、有机物浓度相比呈显著正相关($P < 0.01$)。由此表明, 水体 N、P 营养高的养殖池塘更易形成微囊藻、拟鱼腥藻等蓝藻优势藻。

盐碱池塘水体较高的 pH 和碱度条件也是影响微藻生长的重要环境因子。黄钰玲等(2008)研究认为, 水体 pH 值与蓝藻水华生消密切相关, 在其他条件适宜的情况下, pH 为 8 左右的偏碱性水体可促进蓝藻水华发生。曹煜成(2014)以温度、盐度、pH 等生态因子作为基本切入点, 分析了蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、条纹小环藻(*Cyclotella striata*)、绿色颤藻(*Oscillatoria chlorina*)和铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 4 种微

藻的生态适应性。结果显示, 绿色颤藻、蛋白核小球藻和条纹小环藻在 $\text{pH}=10$ 时无法生长, 铜绿微囊藻在 $\text{pH}=10$ 时仍可生长, 表明其 pH 适应性更强。许海等(2009)研究了不同初始 pH 和不同固定 pH 对 3 种蓝藻和绿藻生长的影响。结果表明, 藻类可通过自身生命活动改变水体 pH , 不同初始 pH 对藻类生长的影响不明显; 但加 pH 缓冲剂固定初始 pH 后, 藻类的生长反应很明显, 适宜的 pH 范围各不相同, 但蓝藻适宜的 pH 并不都比绿藻高。碱度对浮游植物的生长同样有显著影响(张树林等, 2008)。潘翰等(2017)分析了碱性湖泊呼伦湖地区浮游植物组成及水化学环境因子, 认为碱度会导致水体透明度降低、光照减少, 蓝藻的自身适应能力可以耐受碱度更大的水环境。杨威等(2007)研究表明, 铜绿微囊藻的竞争生长能力在高碱度组中弱于四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*), 但在极低碱度组中强于四尾栅藻。在本研究中, 不同模式养殖池塘的 pH 和碱度与蓝藻生物量暂无显著相关关系。因此, 在错综复杂的自然环境因子及其相互作用下, 高 pH 和碱度的养殖池塘中有害蓝藻是否具有生长优势有待进一步探究。

除环境理化因素外, 影响蓝藻生长的生物因素也不容忽视。水产养殖生物的品种和生物量会影响池塘浮游微藻群落结构。鲢、鳙等滤食性鱼类特有鳃耙、腭皱等器官, 能直接滤食大于鳃孔的藻类, 可有效降低富营养化水体中的蓝藻数量(Xie *et al.*, 2001; 此里能布等, 2012)。而鱼类自身的生理活动及排泄物则会使水体中的营养盐浓度升高, 创造有利于蓝藻生长的水质条件。养殖生物量大, 养殖生物产生的粪便及饵料的投放量相应增多, 更易形成富营养化水体。在本次采样的土池养殖模式 TC-3 池塘中, 鱼类放苗时间较其他 2 种养殖模式池塘更早, 鱼类生物量更大, 可能成为促使其水体中 N、P 浓度更高的原因。

3.3 养殖池塘中优良藻相的构建

在养殖生产中, 池塘中的蓝藻若过度增殖会造成微藻种类过于单一, 打破藻相平衡, 出现不良藻相结构; 而通常以绿藻、硅藻为优势种的池塘水质较稳定, 微藻种类丰富, 水色优良, 养殖生物病害少且生长较好, 为优良藻相(曹煜成等, 2007)。

9 口池塘中, 除 PT-3、TC-3 以外的其余 7 口池塘均以绿藻或硅藻为生物量优势藻, 尽管其中部分池塘中仍有鱼腥藻属、颤藻属为数量优势属, 但并未影响藻类群落结构的多样化, 尤其是以栅藻属、小球藻属和卵囊藻属为生物量优势属的稻渔种养模式 DY-1, 藻类生物多样性极其丰富。在稻渔种

养模式中, 鱼类等水产养殖生物可将氮元素转化为水稻易吸收的氨态氮, 提高了水稻对 N、P 的利用率和对富营养化水体的净化能力, 降低了水中的 N、P 污染(杨玲霞, 2020), 不易形成微囊藻等有害蓝藻生长的适宜环境。因此, 在本次取样的稻渔种养模式养殖池塘中均未发生有害蓝藻大量增殖的情况, 较其他 2 种养殖模式具有更良好的藻相。

在本研究中, 以小球藻、栅藻、盘星藻、卵囊藻等绿藻或以小环藻、菱形藻等硅藻占优势的微藻群落结构为优良藻相, 可增加水体的 DO, 促进水体中营养盐的分解和转化, 保持良好的水体肥度, 减少有机污染物的存在, 为养殖生物提供新鲜的天然饵料等, 有利于养殖生物的健康生长。因此, 养殖户应做好养殖池塘的水质调控, 避免形成以蓝藻占绝对优势的不良藻相, 构建以绿藻和硅藻为优势的优良藻相。

4 结论

在夏季光照强温度高的宁夏地区, 部分养殖池塘会出现以微囊藻、拟鱼腥藻等蓝藻占绝对优势的不良藻相, 形成蓝藻水华, 对养殖生产造成危害; 以小球藻、盘星藻、栅藻、卵囊藻等绿藻或小环藻、菱形藻等硅藻占优势为当地养殖池塘的优良藻相。稻渔种养模式养殖池塘相比于棚塘接力模式和土池养殖模式具有更高的浮游微藻多样性指数和优良藻相。蓝藻生物量与水体中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、有机物浓度呈现显著正相关。水体中 C、N 营养高的养殖池塘更易形成以微囊藻、拟鱼腥藻等蓝藻为优势的藻相; 合理调控养殖池塘水质, 抑制蓝藻成为优势, 形成以绿藻和硅藻为优势藻的优良藻相更有利于养殖生产。

参 考 文 献

- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2022. Beijing: China Agriculture Press, 2022 [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. 2022 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2022]
- CAO Y C, LI Z J, YANG Y Y, *et al.* Research progress on technology of microalgae ecological management in shrimp culture. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(4): 70–73 [曹煜成, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 浮游微藻生态调控技术在对虾养殖应用中的研究进展. *南方水产*, 2007, 3(4): 70–73]
- CAO Y C, WEN G L, LI Z J, *et al.* Effects of dominant microalgae species and bacterial quantity on shrimp production in the final culture season. *Journal of Applied*

- Phycology, 2014, 26(4): 1749–1757
- CAO Y C. Experimental study on the regulatory mechanisms of dominant microalgae population in shrimp culture ponds. Doctoral Dissertation of Sun Yat-sen University, 2014 [曹煜成. 虾池微藻优势种群调控机理. 中山大学博士研究生学位论文, 2014]
- CARMICHAEL W W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 2001, 7(5): 1393–1407
- CHEN Q C, HUANG L M, YIN J Q, *et al.* Zooplankton diversity in water around South China Sea Islands, the multidisciplinary oceanographic expedition team of Chinese Academy of sciences to Nansha Islands. Research on marine biodiversity in the South China Sea Islands and its adjacent sea areas I. Beijing: Ocean Press, 1994, 42–50 [陈清潮, 黄良民, 尹健强, 等. 南海群岛海区浮游动物多样性研究, 中国科学院南沙综合科学考察队. 南海群岛及其邻近海区海洋生物多样性研究 I. 北京: 海洋出版社, 1994, 42–50]
- CI L N B, MAO J Z, HUANG S F. Theory and application of biomanipulation and non-traditional biomanipulation. Ecological Science, 2012, 31(1): 87–91 [此里能布, 毛建忠, 黄少峰. 经典与非经典生物操纵理论及其应用. 生态科学, 2012, 31(1): 87–91]
- CREMEN M C M, MARTINEZ-GOSS M R, CORRE V L, *et al.* Phytoplankton bloom in commercial shrimp ponds using green-water technology. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(6): 615–624
- EDWARDS K F, KLAUSMEIER C A, LITCHMAN E. Evidence for a three-way trade-off between nitrogen and phosphorus competitive abilities and cell size in phytoplankton. Ecology, 2011, 92(11): 2085–2095
- FOTT B, LUO D A. Algenkunde. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1980 [福迪 B, 罗迪安. 藻类学. 上海: 上海科学技术出版社, 1980]
- HOU X, GAO Y P, DU M R, *et al.* Temporal and spatial variation in phytoplankton community structure and their relationship with environmental factors in Sanggou Bay. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 18–27 [侯兴, 高亚平, 杜美荣, 等. 桑沟湾浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 18–27]
- HU H J, WEI Y X. The freshwater algae of China. Beijing: Science Press, 1980 [胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类. 北京: 科学出版社, 1980]
- HUANG X H, LI C L, LIU C W, *et al.* Studies on two microalgae improving environment of shrimp pond and strengthening anti-disease ability of *Penaeus vannamei*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(4): 342–347 [黄翔鹤, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究. 水生生物学报, 2002, 26(4): 342–347]
- HUANG Y L, JI D B, CHEN M X, *et al.* Influence of water pH on cyanobacterial bloom generation and elimination. Yangtze River, 2008(2): 63–65 [黄钰铃, 纪道斌, 陈明曦, 等. 水体 pH 值对蓝藻水华生消的影响. 人民长江, 2008(2): 63–65]
- HUISMAN J, JONKER R R, ZONNEVELD C, *et al.* Competition for light between phytoplankton species: Experimental tests of mechanistic theory. Ecology, 1999, 80(1): 211–222
- KONG F X, SONG L R. Study on the formation process of cyanobacterial bloom and its environmental characteristics. Beijing: Science Press, 2011 [孔繁翔, 宋立荣. 蓝藻水华形成过程及其环境特征研究. 北京: 科学出版社, 2011]
- LI Q, SUN Z J, QIN P. Summary of Ningxia saline status and improved measures. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(33): 10808–10810, 10813 [李茜, 孙兆军, 秦萍. 宁夏盐碱地现状及改良措施综述. 安徽农业科学, 2007, 35(33): 10808–10810, 10813]
- LI Y, ZHANG J W, WEI J, *et al.* Advances in mechanism of the occurrence, hazard, and prevention/control utilization of Cyanophytic blooms in China. Journal of Microbiology, 2015, 35(4): 93–97 [李媛, 张家卫, 魏杰, 等. 我国蓝藻水华的发生机理、危害及防控利用研究进展. 微生物学杂志, 2015, 35(4): 93–97]
- LIANG H, CHEN Z L, QU F S, *et al.* Regression equations between algae propagation and physico-chemical factors under microcosm environment. Journal of Harbin Institute of Technology, 2010, 42(6): 841–844 [梁恒, 陈忠林, 瞿芳术, 等. 微宇宙环境下藻类生长与理化因子回归研究. 哈尔滨工业大学学报, 2010, 42(6): 841–844]
- MA Q Y, WANG Y, LI C B, *et al.* Influence of cyanobacterial bloom dominated by *Planktothrix* sp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* on microflora structure of intestine, gill and culture environment of cultured *Eriocheir sinensis*. Marine Fisheries, 2021, 43(5): 595–606 [马清扬, 王元, 李传步, 等. 以拉氏拟柱胞藻和浮丝藻为主的蓝藻水华对中华绒螯蟹肠道和鳃及其养殖环境微生物群落结构的影响. 海洋渔业, 2021, 43(5): 595–606]
- MAI X W. Aquatic ecological characteristics of *Litopenaeus vannamei* in desalination culture ponds with greenhouse. Master's Thesis of Sun Yat-sen University, 2003 [麦雄伟. 南美白对虾温棚化养殖水体生态特征研究. 中山大学硕士研究生学位论文, 2003]
- MELLARD J P, YOSHIYAMA K, KLAUSMEIER C A, *et al.* Experimental test of phytoplankton competition for nutrients and light in poorly mixed water columns. Ecological Monographs, 2012, 82(2): 239–256
- MULLER-FEUGA A. The role of microalgae in aquaculture: Situation and trends. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(3/4/5): 527–534
- PAN H, LIU Y R, MA C X. Characteristics and physical factors of cyanobacteria outbreak in northern cold region inland

- alkaline water. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45(7): 79–83 [潘翰, 刘琰冉, 马成学. 北方寒冷内陆碱性水体蓝藻暴发特点及影响因子. 东北林业大学学报, 2017, 45(7): 79–83]
- PENG C C, LI Z J, CAO Y C, *et al.* A review of water environment regulation by planktonic microalgae in shrimp ponds. South China Fisheries Science, 2010, 6(5): 74–80 [彭聪聪, 李卓佳, 曹煜成, 等. 虾池浮游微藻与养殖水环境调控的研究概况. 南方水产, 2010, 6(5): 74–80]
- PENG C C, LI Z J, CAO Y C, *et al.* Change of dominant species of planktonic microalgae in *Litopenaeus vannamei*'s semi-intensive culture ponds and its impact on the culture environment. Marine Environmental Science, 2011, 30(2): 193–198 [彭聪聪, 李卓佳, 曹煜成, 等. 凡纳滨对虾半集约化养殖池塘浮游微藻优势种变动规律及其对养殖环境的影响. 海洋环境科学, 2011, 30(2): 193–198]
- PENG C C, LI Z J, CAO Y C, *et al.* The community characteristics of planktonic microalgae in *Tilapia*'s culture ponds near the Pearl River estuary. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(10): 2019–2030 [彭聪聪, 李卓佳, 曹煜成, 等. 珠江河口区罗非鱼养殖池塘中浮游微藻的群落特征. 农业环境科学学报, 2012, 31(10): 2019–2030]
- QIAO L, CHANG Z Q, LI J, *et al.* Comparison of phytoplankton community diversity in the ecological aquaculture system of a marine pond using morphological analysis and high-throughput sequencing. Progress in Fishery Science, 2022, 43(2): 32–43 [乔玲, 常志强, 李健, 等. 基于形态学和高通量测序的海水池塘生态养殖系统中浮游植物多样性比较. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 32–43]
- QIU X C, ZHAO H X. Community structure and biodiversity of phytoplankton in Shahu Lake, Ningxia. Journal of Hydroecology, 2011, 32(1): 20–26 [邱小琼, 赵红雪. 宁夏沙湖浮游植物群落结构及多样性研究. 水生生态学杂志, 2011, 32(1): 20–26]
- REYNOLDS C S. Cyanobacteria in fish ponds. Aquaculture, 1990, 88(1): 1–20
- SHEN G Y, SHI B Z. Marine ecology. Beijing: Science Press, 2003 [沈国英, 施并章. 海洋生态学. 北京: 科学出版社, 2003]
- SUN J, LIU D Y, QIAN S B. Study on phytoplankton biomass I: Phytoplankton measurement biomass from cell volume or plasma volume. Acta Oceanologica Sinica, 2004, 21(2): 75–85 [孙军, 刘东艳, 钱树本. 浮游植物生物量研究 I: 工作浮游植物生物量细胞体积转化法. 海洋学报, 2004, 21(2): 75–85]
- SUN Y, LI F, LI J, *et al.* Phytoplankton community characteristics and their relationship with nutrient salts in shrimp ponds. Marine Fisheries Research, 1998, 19(2): 45–51 [孙耀, 李锋, 李健, 等. 虾塘水体中浮游植物群落特征及其与营养状况的关系. 海洋水产研究, 1998, 19(2): 45–51]
- WANG H, LAI Q F, FANG W H, *et al.* Study on aquaculture in different type of saline-alkali water. Sustainable Aquaculture—Resources, Environment and Quality—2003 Aquatic Technology Forum. Beijing: Ocean Press, 2003, 123–127 [王慧, 来琦芳, 房文红, 等. 不同类型咸水的水产养殖研究, 可持续水产养殖—资源、环境、质量 2003 水产科技论坛论文集. 北京: 海洋出版社, 2003, 123–127]
- WEN Y S, RUI W S, MEI W H, *et al.* Interspecific competition among Cyanophyta, Chlorophyta and Diatom in response to pulse supply of nitrate. International Journal of Environment and Waste Management, 2012, 10(1): 13–24
- XIE P, LIU J K. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: A synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. Scientific World Journal, 2001, 1: 337–356
- XU H, LIU Z P, YUAN L, *et al.* Effect of pH on growth of several freshwater algae. Environmental Science & Technology, 2009, 32(1): 27–30 [许海, 刘兆普, 袁兰, 等. pH 对几种淡水藻类生长的影响. 环境科学与技术, 2009, 32(1): 27–30]
- YANG L X. Study on the effect of rice co-cropping in low-lying saline-alkali land. Master's Thesis of Ningxia University, 2020 [杨玲霞. 低洼盐碱地稻渔共作效应研究. 宁夏大学硕士研究生学位论文, 2020]
- YANG W, SUN L, YUAN Y C, *et al.* Effects of alkalinity on growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. Journal of Agro-Environment Science, 2007(4): 1264–1268 [杨威, 孙凌, 袁有才, 等. 碱度水平对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长和竞争的影响. 农业环境科学学报, 2007(4): 1264–1268]
- YAO Y H, HE W H, YU L N. Mechanism of forming of Cyanobacteria bloom and its effects on aquaculture. Acta Agriculturae Jiangxi, 2007(4): 98–100 [姚雁鸿, 何文辉, 余来宁. 池塘蓝藻水华的产生及对养殖的危害. 江西农业学报, 2007(4): 98–100]
- ZHA G C, MAI X W, ZHOU C Q, *et al.* Study on the planktonic algae community in low salinity culture ponds of *Litopenaeus vannamei*. Marine Fisheries Research, 2006, 27(1): 1–7 [查广才, 麦雄伟, 周昌清, 等. 凡纳滨对虾低盐度养殖池浮游藻类群落研究. 海洋水产研究, 2006, 27(1): 1–7]
- ZHANG H T, WU H Y, ZHENG G C, *et al.* Accumulation and transformation of paralytic shellfish toxin in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Alexandrium catenella*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 181–191 [张海涛, 吴海燕, 郑关超, 等. 链状亚历山大藻暴露下紫贻贝体内麻痹性贝毒蓄积转化规律. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 181–191]
- ZHANG S L, XING K Z, CHEN B. Studies on the relationship between phytoplankton and environmental factors of the

alkalinities composed of HCO_3^- type in shrimp pond. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008(1): 145–148 [张树林, 邢

克智, 陈斌. 重碳酸盐型盐碱虾池浮游植物与理化因子的相关关系. *华北农学报*, 2008(1): 145–148]

(编辑 陈 严)

Community Characteristics of Planktonic Microalgae in Aquaculture Ponds of Different Modes in Ningxia in Summer

LIU Jinfan^{1,2}, HU Xiaojuan², CAO Yucheng², XU Yunna²,
WEN Guoliang^{1,2①}, LI Li³, SUN Zhen⁴, SHEN Bin¹

(1. Zhejiang Ocean University/National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhoushan, Zhejiang 316022, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou, Guangdong 510300, China; 3. Ningxia Taijia Fisheries Limited Company, Shizuishan, Ningxia 753000, China; 4. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract Ningxia Hui Autonomous Region is located in Northwest China. Most of the culture ponds in Shizuishan City and Yinchuan City, in the northern part of Ningxia, are sulfate-type saline-alkali ponds. The central area of Ningxia is located on the Hetao Plain, where the salinity of water bodies is relatively low. Owing to the high pH value of saline-alkali water bodies, which indicates high alkalinity, water quality control has become the main challenge of saline-alkali aquaculture. The community structure of planktonic microalgae is closely related to the water quality of aquaculture ponds and the healthy growth of aquaculture organisms. The planktonic microalgae community structure of culture ponds in summer in Ningxia is rarely reported. To study the community structure characteristics of planktonic microalgae in different culture pond modes in Ningxia in summer, we collected planktonic microalgae samples in July 2021 from Pingluo County in Shizuishan City, Helan County in Yinchuan City, and Shapotou District in Zhongwei City in the Ningxia Hui Autonomous Region. We then analyzed the planktonic microalgae community composition and its correlation with water quality factors. The samples were collected from three typical aquaculture pond modes: the shed-pond relay mode (PT), soil pond mode (TC), and rice-fishing breeding mode (DY). We qualitatively identified and quantitatively counted planktonic microalgae under a light microscope and performed diversity analysis using the Shannon diversity index. SPSS software was used to carry out bivariate correlation analysis between the total number of algae, total biomass, algal biomass of each phylum, and the physical and chemical factors of water quality in aquaculture ponds. A total of 5 phyla and 27 genera of planktonic microalgae were detected, including 7 genera of Cyanophyta, 13 genera of Chlorophyta, 5 genera of Bacillariophyta, 1 genus of Euglenophyta, and 1 genus of Dinophyta. The total number of planktonic microalgae in the 9 ponds ranged from 1.52×10^4 to 2.39×10^8 ind./L, the biomass ranged from 0.16 to 97.78 mg/L, the Shannon-Wiener index as 0.03 to 3.31, and the biomass diversity index was 0.29 to 3.58. There were significant differences in the community structure of planktonic microalgae in different kinds of culture modes. The community structure of planktonic microalgae in PT culture ponds had no obvious common characteristics. Cyanophyta, Chlorophyta, and Bacillariophyta, such as *Anabaenopsis* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp.,

① Corresponding author: WEN Guoliang, E-mail: wgl610406@163.com

Pediastrum sp., *Oocystis* sp., and *Cyclotella* sp., were predominant. A single genus of planktonic microalgae dominated in TC. The three ponds were dominated by *Pediastrum* sp., *Chlorella* sp., and *Microcystis* sp. The diversity of microalgae in DY culture ponds was relatively rich. Chlorophyta such as *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Pediastrum* sp, *Oocystis* sp., and *Cladophora* sp. and Bacillariophyta such as *Cyclotella* sp. and *Nitzschia* sp. were the dominant algae. Although the community structure of planktonic microalgae in most ponds was dominated by Chlorophyta and Bacillariophyta, some ponds in PT and TC still had Cyanophyta overgrowth which became the single dominant algae. Harmful Cyanophyta proliferate in large numbers in aquaculture ponds and easily form algal blooms, which cause significant adverse effects on the water quality and environment and endanger the life and health of cultured organisms. The ponds with Chlorophyta and Bacillariophyta as the dominant species had a relatively stable water quality, were rich in microalgae species, had excellent water color, and experienced less disease and better growth of cultured organisms. The characteristics of high summer temperatures, long sunshine hours, sulfate-type saline-alkali water in Ningxia, and the eutrophication of the culture ponds due to factors such as food and cultured biological excrement affect the structure of planktonic microalgae communities in local culture ponds. The biomass of Cyanophyta had a significant positive correlation with the concentration levels of NO_3^- -N, NO_2^- -N, and chemical oxygen demand (COD) ($P < 0.01$). The total nitrogen and COD contents of the ponds in the DY mode were lower than those in the PT and TC modes, meaning that the water environment was not conducive to the proliferation of harmful Cyanophyta and that the planktonic microalgae biodiversity index was relatively high in the DY mode. In addition, a large number of studies have shown that the adaptability of Cyanophyta to strong light and optimal growth temperature is generally higher than that of other algae. The results indicated that in Ningxia, due to the long hours of light in summer, cyanobacteria blooms dominated by Cyanophyta such as *Microcystis* and *Anabaenopsis* formed easily in aquaculture ponds with high water carbon and nitrogen nutrients. Therefore, this finding indicates that the hours of light should be used as one of the critical control points when regulating pond water quality to prevent and control the occurrence of adverse conditions such as reduced production and efficiency due to the outbreak of harmful algal blooms.

Key words Microalgae community; Water quality; Ningxia; Saline-alkali pond

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210930001

http://www.yykxjz.cn/

张翔, 谷莉, 郑玉东, 李晨, 白昌明, 辛鲁生, 王崇明, 刘金兰. 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)易感宿主调查. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 174-185

ZHANG X, GU L, ZHENG Y D, LI C, BAI C M, XIN L S, WANG C M, LIU J L. Survey of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) susceptible hosts based on *in situ* LAMP technique. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 174-185

基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒 (OsHV-1)易感宿主调查*



张翔^{1,2} 谷莉^{1,2} 郑玉东^{2,3} 李晨²
白昌明² 辛鲁生² 王崇明^{2①} 刘金兰^{1①}

(1. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学水产动物病害与免疫学实验室 山东 青岛 266003)

摘要 牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)给世界双壳贝类养殖业造成了严重的经济损失。10余种双壳贝类陆续被认定为易感宿主,仍有其他几种贝类仅有PCR核酸阳性数据,因确诊证据不足导致其易感性未得到充分评估。原位环介导等温核酸扩增(LAMP)检测技术相对传统原位杂交技术具有灵敏度高、方便快捷、可作为病原微生物感染证据的优点。为了在OsHV-1流行病学调查过程中实现病毒感染的快速检测和确诊,根据已报道的OsHV-1特异性LAMP检测引物,设计内引物,优化反应条件,建立了OsHV-1的原位LAMP检测方法。基于该方法对2019年以来采集的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)样本进行检测。结果显示,毛蚶样本的OsHV-1原位LAMP检测结果呈阳性;其他几种贝类部分样本的实时定量PCR(qPCR)检测呈阳性,但原位LAMP检测呈阴性。对毛蚶样本的原位LAMP检测结果分析发现,病毒杂交信号主要分布在外套膜和肝胰腺等器官的结缔组织,推测感染的细胞为成纤维细胞和血淋巴细胞;在闭壳肌和斧足肌肉组织的肌细胞细胞核中也发现较多杂交信号。鳃丝内和周边偶现阳性信号,推测来自渗出的血淋巴细胞。基于原位LAMP技术的OsHV-1检测结果显示,毛蚶是OsHV-1的一种易感宿主,毛蚶结缔组织、肌肉组织和血淋巴细胞对该病毒有强亲嗜性。

关键词 牡蛎疱疹病毒;原位LAMP;易感性;流行病学调查

中图分类号 S966.12 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0174-12

疱疹样病毒粒子感染贝类的案例首次报道于1972年,引起一批实验用美洲牡蛎(*Crassostrea*

virginica)种贝死亡,这也是此类病毒感染无脊椎动物的首例报道(Farley *et al.*, 1972)。牡蛎疱疹病毒(Ostreid

* 国家自然科学基金(32073014)、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开放课题(2019-BH-A02)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系共同资助。张翔, E-mail: 1010601939@qq.com

① 通信作者:王崇明,研究员, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn;刘金兰,教授, E-mail: ljlan1115@163.com

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-11-19

herpesvirus 1, OsHV-1)感染案例最早发现于1991年,引起育苗场长牡蛎(*Crassostrea gigas*)幼虫的大规模死亡,对这一世界性海洋主养贝类养殖产业造成严重打击(Barbosa-Solomieu *et al.*, 2015; Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992)。目前,尚不清楚1972年病例疱疹样病毒粒子与OsHV-1是否为同一种病毒。产业健康发展的需求刺激多国科研机构围绕OsHV-1开展了病原学、流行病学、病原生态学和防控手段等众多领域的研究(Alfaro *et al.*, 2019; Rodgers *et al.*, 2019; Rosani *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2016; 白昌明等, 2021), OsHV-1为首个被正式命名、系统分类地位明确的无脊椎动物疱疹病毒。与常见脊椎动物疱疹病毒普遍表现较高的宿主特异性不同, OsHV-1宿主范围较广,目前已证实被OsHV-1感染的物种有10余种,分属双壳纲(Bivalvia)、牡蛎目(Osteroidea)、珍珠贝目(Pterioidea)、蚶目(Arcoida)、帘蛤目(Veneroidea)下不同的科和属(白昌明等, 2021)。同时,有多种双壳贝类以及荷兰、挪威等国的养殖贝类仅有PCR检测OsHV-1核酸阳性的结果,不能作为发生病毒感染的直接证据(Barbieri *et al.*, 2019; Gittenberger *et al.*, 2016; Mortensen *et al.*, 2016)。这些易感性存疑的结果为流行病学监测计划的制定、动物检疫和疫病防控措施的实施造成障碍。

目前已开发出多种OsHV-1检测方法,如PCR(Batista *et al.*, 2007)、原位杂交(Lipart *et al.*, 2002)、原位PCR(李亚楠等, 2019)、组织病理、透射电镜、环介导等温核酸扩增(LAMP)(Ren *et al.*, 2009; Zaczek-Moczydlowska *et al.*, 2020)和重组酶聚合酶扩增(RPA)(Gao *et al.*, 2018)等。根据世界动物卫生组织(OIE)水生动物手册的建议, OsHV-1感染的确诊需要核酸特异性检测阳性结果,结合组织病理和透射电镜影像才能做出诊断;单独使用核酸扩增技术对病原进行检测的方法不能用于感染案例的确诊(OIE, 2019)。透射电镜如果直接观察到处于不同时期的疱疹样病毒粒子,也可以作为病毒感染确诊的证据;但透射电镜检测的灵敏度和特异性低,尚需要PCR等特异性检测手段确认观察到的疱疹样病毒粒子是OsHV-1。原位杂交同时具备核酸检测特异性和组织原位观察的优势,是确诊病毒感染的一种重要技术手段(Lipart *et al.*, 2002)。原位杂交虽然特异性强,但存在灵敏度不高、检测程序复杂、步骤繁琐等缺点(Muro-Cacho, 1997)。受限于透射电镜和原位杂交技术的使用限制,PCR仍然是目前最广泛使用的OsHV-1流行病学调查方法,这也导致出现很多核酸阳性病例未得到确诊的物种和地

区。OsHV-1原位PCR检测方法作为原位杂交技术的延伸,提高了原位杂交的灵敏度(李亚楠等, 2019),但仍然存在操作程序复杂、需要高值专用设备(如组织切片PCR工作站等)的问题。本研究拟根据原位LAMP技术原理,建立一套兼具高灵敏度、简便快捷的OsHV-1检测方法,并利用该方法对2019年以来采集的发病贝类样本进行检测,为OsHV-1潜在易感宿主的鉴定提供依据;同时解析该病毒在新宿主中的分布规律和组织嗜性。

1 材料与方法

1.1 样本采集与保存

魁蚶病料采集于2018年9月,用于原位LAMP反应条件的摸索和检测方法的建立。长牡蛎、福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)样本于2019—2021年采集自不同海区和养殖场非正常死亡案例(表1)。采集的发病贝类样本普遍出现沉底(幼虫)、双壳闭合不全、反应迟钝、外套膜萎缩等临床症状。从表现临床症状的群体中选择受刺激时闭壳反应弱、内脏团完好、无异味的个体。现场或低温运回实验室后,分别采集发病贝类外套膜、鳃、肝胰腺和闭壳肌等组织器官,切取约5 mm厚,立即浸入至少10倍于采样组织体积的Davidson's AFA固定液中,固定24~48 h后,直接进行组织切片或将固定的组织块儿移入70%乙醇溶液中室温存放。从各解剖个体剩余组织中剪取约30 mg外套膜组织,置于1.5 mL离心管中,直接用于DNA提取或-40℃保存备用。

1.2 DNA提取与病毒载量测定

使用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(DP324)(北京天根生化科技有限公司)提取各贝类样本组织总DNA,按照试剂盒说明书操作。利用TaqMan实时定量PCR(qPCR)技术对各样本中OsHV-1核酸载量进行定量(Martenot *et al.*, 2010)。反应引物和探针分别为:上游引物BF: 5'-GTCGCATCTTTGGATTTAACA A-3'、下游引物B4: 5'-ACTGGGATCCGACTGACAA C-3',探针及生物素标记B-6FAM-TGCCCTGTTCAT CTTGAGGTATAGACAATC-BHQ-1。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR使用Fast Start Essential DNA Probes Master试剂盒(Roche, Cat. No.06402682001),反应体系:12.5 μL 2×PCR mix,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL,探针(10 μmol/L)0.5 μL,

DNA 模板 2 μL , 添加水(试剂盒配备) 8 μL 至总反应体系为 25 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环, 反应程序在 Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 仪器控制下完成。每批次 qPCR 均使用 10 倍梯度稀释(1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 拷贝/ μL) 的标准品进行定量分析。

1.3 LAMP 反应引物的优化与验证

根据 Zaczek-Moczydlowska 等(2020)研究中的 OsHV-1 LAMP 检测方法, 外侧上、下游引物分别为 OsHV-LP-F: TTTTCAGTTCGTGCTCGGATT, OsHV-LP-B: TCCGGAACAATTGACCAAGC。内侧上、下游引物分别由 2 部分组成, 上游引物 OsHV-LP-FIP 为 F1c (CCAGTTGTATTTGGGCATGCC) 和 F2 (GAGGCACATTCCATTTCCCT), 中间由 4 个 T (Thymine, 胸腺嘧啶) 连接(F1c+TTTT+F2); 下游引物 OsHV-LP-BIP 为 B1c (TCAGGCAGGCATTCAATTTGGC) 和 B2 (CCCCAGAAACAGGTCACAG), 中间由 4 个 T (Thymine, 胸腺嘧啶) 连接(B1c+TTTT+B2)。在借鉴 Zaczek-Moczydlowska 等(2020)研究的内、外引物信息的基础上, 为提高 LAMP 的反应速度和稳定性, 使用 LAMP 引物设计软件 (PrimerExplorer, <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) 设计 4 对环引物, 并筛选得到扩增效果最好的 1 对环引物 OsHV-LP-LF: 5'-AGATA CAGTAGTTGGG AGTCTTACT-3' 和 OsHV-LP-LB: 5'-ATGGTTCACGG GAGTGATCC-3', 以便适应在切片上进行 LAMP 扩增时出现的复杂多变的扩增环境。

为避免开盖导致的气溶胶污染风险, 通过核酸检测试纸条和一次性检测装置, 直接检测 LAMP 扩增效果, 为满足扩增结束后, 直接进行核酸试纸条检测的需求, 分别使用 Biotin 和 6-FAM 标记内引物 OsHV-LP-FIP 和外引物 OsHV-LP-F 的 5' 端。每个 LAMP 反应体系共 25 μL , 包括如下组分: 10 \times Thermopol 反应缓冲液 2.5 μL , MgSO_4 (100 mmol/L) 3.5 μL , 引物 OsHV-LP-FIP、OsHV-LP-BIP (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL 、OsHV-LP-LF、OsHV-LP-LB (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL 、OsHV-LP-F、OsHV-LP-B (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL 、dNTPs (10 mmol/L) 3.5 μL , 甜菜碱(1.2 mol/L) 6 μL , 8 U Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs), 已提取的 DNA 模板 2 μL 。反应在 PCR 仪中进行, 反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间为 60 min, 最后, 85 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。

1.4 OsHV-1 原位 LAMP 检测步骤

常规方法进行切片、展片后, 使用粘附载玻片捞片, 随后在烤片机(Leica HI1220)上烘烤约 12 h, 使

组织牢固地粘附在切片上, 防止缓冲液浸洗等原位 LAMP 复杂操作引起的组织脱片。OsHV-1 原位 LAMP 检测参考 Chen 等(2019)研究中的步骤, 具体操作如下:

1.4.1 脱蜡与水化 首先, 将充分烘烤粘附的切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行常规脱蜡水化: 二甲苯 5 min (3 次), 无水乙醇 5 min (2 次), 95%乙醇 5 min, 85%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 50%乙醇 5 min。

1.4.2 消化与变性 0.2 mol/L HCl 室温浸浴 20 min; 蛋白酶 K (20 $\mu\text{g/mL}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 5 min。

1.4.3 原位 LAMP 扩增 将切片置于湿盒中, 按照上述 1.2 节所述配制 LAMP 反应体系[使用带有地高辛标记的 dNTP (Roche)], 每张切片滴加 LAMP 反应体系 150 μL , 盖上盖玻片, 在杂交炉中 65 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 60 min。杂交完成后移去盖玻片, 按如下步骤依次使用 SSC 梯度缓冲液浸洗: 2 \times SSC 室温 5 min (2 次), 1 \times SSC 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (2 次), 0.5 \times SSC 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 0.1 \times SSC 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 清除非特异性信号。

1.4.4 抗体孵育 向每张切片滴加封闭剂(MAB: 10% BMB: 山羊血清原液=7:2:1) 1 mL, 室温下封闭 1 h。吸去预杂交液, 滴加 500 μL 抗体孵育液[碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体(Roche): 封闭剂=1:1000] 孵育 90 min。孵育完成后, 将切片转移到杂交缸中, 首先使用 Buffer I (Tris-HCl 100 mol/L、NaCl 150 mol/L) 浸洗 10 min (2 次), 随后, 使用 Buffer II (Tris-HCl 100 mol/L、NaCl 100 mol/L、 MgCl_2 250 mol/L) 浸洗 5 min。

1.4.5 显色与复染 吸取 200 μL 配制好的碱性磷酸酶底物显色剂(40 μL 25 \times NBT 加入到 1 mL 1 \times AP 反应缓冲液)滴加在切片组织样本上, 湿盒内室温显色(显色时间优化: 30 min、45 min、60 min), 苯胺棕复染 2 min。复染完成后, 用 Buffer III (Tris-HCl 100 mol/L、EDTA 10 mol/L) 浸洗 30 min 终止反应, 并清洗切片。

1.4.6 脱水与封片 将切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行酒精梯度脱水: 50%乙醇 5 min, 70%乙醇 5 min, 85%乙醇 5 min, 95%乙醇 5 min, 无水乙醇 5 min (2 次), 二甲苯 5 min (3 次), 二甲苯透明, 树脂封片。显微镜(Nikon Eclipse E80i)下观察组织切片的杂交信号并拍照。

1.5 基于原位 LAMP 检测方法的 OsHV-1 易感宿主调查

应用 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法对 2019—2021 年间收集的长牡蛎、福建牡蛎、栉孔扇贝、虾夷扇贝、毛蚶和菲律宾蛤仔的发病贝类样本进行检测(表 1)。

选择这些物种的原则是国内外曾报道过 OsHV-1 核酸检测阳性案例, 但我国近年来在相关物种(特定生物阶段)尚缺乏 OsHV-1 感染确诊的证据。采集样本时已经利用 qPCR 方法对每批次样本感染率以及阳性样本携带 OsHV-1 核酸拷贝数进行测定, 并挑选部分样本进行组织固定、制作石蜡切片和病理检测。为验证本研究所开发 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法的稳定性和特异性, 重新对保存蜡块进行切片、原位 LAMP 扩增、抗体孵育, 最后使用碱性磷酸酶显色剂显色后, 光镜下观察蓝紫色阳性信号在不同组织中的分布情况并拍照。每批原位 LAMP 操作过程中均使用已知感染和未感染 OsHV-1 的魁蚶组织切片作为阳性和阴性对照。使用 Kappa 统计量检验 qPCR 检测方法与原位 LAMP 检测方法对样本检测结果的一致性。

2 结果

2.1 LAMP 反应引物的优化与验证

最终使用的外侧、内侧以及环引物对见表 1。核酸试纸检测结果显示, 感染 OsHV-1 的魁蚶检测结果为阳性(图 1b), 而未感染 OsHV-1 魁蚶的反应结果均为阴性(图 1a), 表明该 LAMP 体系可应用于后续原位 LAMP 测试。

表 1 OsHV-1 原位 LAMP 反应体系所用引物

Tab.1 Primers for the OsHV-1 *in situ* LAMP reaction system

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
OsHV-LP-F	6-FAM-TTTCAGTTCGTGCTCGGATT	外侧引物 Outer primers
OsHV-LP-B	TCCGGAACAATTGACCAAGC	
OsHV-LP-FIP	Biotin-CCAGTTGTA-TTTGGGCATGC CCTTTGAGGCACATTCATTCCCT	内侧引物 Inner primers
OsHV-LP-BIP	TCAGGCAGGCATTCAATTGGCTTTT CCCCAGAAAACAGGTCACAG	
OsHV-LP-LF	AGATACAGTAGTTGGGAGTCTTACT	环引物 Loop primers
OsHV-LP-LB	ATGGTTCACGGGAGTGATCC	

2.2 原位 LAMP 检测方法建立

本研究在建立 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法过程中, 参考 Chen 等(2019)报道的十足目虹彩病毒 1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)原位 LAMP 检测方法, 以及本团队在开发鲍疱疹病毒(Haliotid herpesvirus 1, HaHV-1)原位 LAMP 检测技术过程中积累的经验, 最终形成如前所述的 OsHV-1 原位 LAMP 检测具体步骤。按照该操作流程进行操作, 最终观察到的病毒信

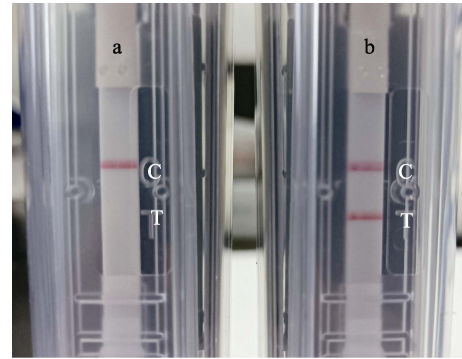


图 1 核酸试纸条测试 LAMP 扩增结果

Fig.1 LAMP amplification results detected by nucleic acid strips

- a: 阴性对照; b: 阳性样本; C: 质控线; T: 测试线。
a: Negative control; b: Positive sample;
C: Quality control line; T: Test line.

号显色清晰、易分辨(图 2B)。不加抗体的阴性对照未出现病毒信号(图 2C)。图 2 为使用已知感染 OsHV-1 的魁蚶组织, 进行原位 LAMP 检测时得到结果的示例。从组织病理 HE 染色结果可以看出, 组织损伤、血淋巴渗出和浸润主要发生在结缔组织(图 2A), 肌肉组织无炎症反应。与病理观察结果相一致, 病毒阳性信号集中出现在发生组织损伤和炎症反应的结缔组织中。根据细胞形态及其分布, 推测出现病毒阳性信号的细胞为血淋巴细胞和成纤维细胞(图 2D)。

2.3 基于原位 LAMP 检测方法的 OsHV-1 易感宿主调查

使用新开发的原位 LAMP 方法对保存的蜡块样本进行检测。结果显示, 几个批次的长牡蛎、福建牡蛎、栉孔扇贝、虾夷扇贝和菲律宾蛤仔样本未检测到病毒感染, 从多个批次的毛蚶样本中检测到 OsHV-1 感染杂交信号(表 2)。原位 LAMP 检测方法 with qPCR 检测方法对样本的检测结果经 Kappa 一致性检验, 具有高度一致性, K 值为 0.638 (表 3)。OsHV-1 杂交信号在毛蚶内脏团多个器官中浸润的血淋巴细胞内被观察到, 说明血淋巴细胞对该病毒非常易感。肝胰腺小管出现不同程度的上皮细胞坏死、组织损伤, 但病毒信号主要出现在结缔组织、肝胰腺小管间浸润的血淋巴细胞中(图 3)。外套膜结缔组织出现损伤和坏死, 肌肉组织偶见损伤和血细胞浸润。根据这些器官原位 LAMP 检测结果, 推测结缔组织中被感染的细胞类型主要为成纤维细胞和浸润血淋巴细胞; 肌肉组织被感染的为肌细胞的细胞核(图 4)。肌细胞携带病毒杂交信号的现象在富含肌肉纤维的斧足和闭壳肌中也经

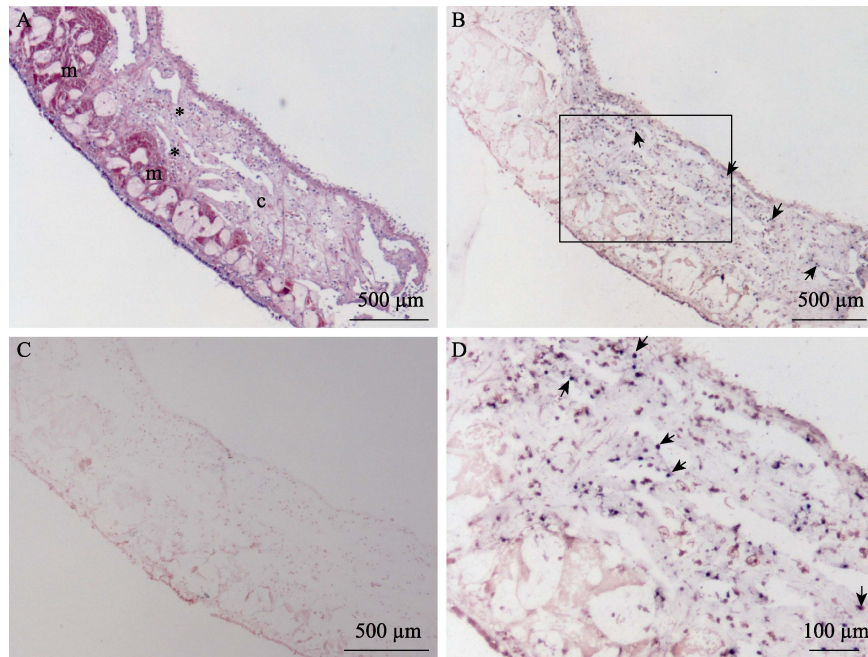


图2 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法开发结果示例

Fig.2 An example of the test results during the development of OsHV-1 *in situ* LAMP method

- A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测; C: 原位 LAMP 检测不加抗体阴性对照; D: 图 B 中黑色方框区域的局部放大
 m: 肌肉组织; c: 结缔组织; *: 血细胞浸润; 黑色箭头示病毒杂交信号。
 A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection; C: Negative control (without antibody) of OsHV-1 *in situ* LAMP tests;
 D: High magnification graphic of regions labeled by rectangular boxes in Fig.2B
 m: Muscle; c: Connective tissue; *: Haemocyte infiltration; Black arrows indicate viral hybridization signals.

表2 OsHV-1 原位 LAMP 检测 2019—2021 年间发病贝类样本列表

Tab.2 Samples collected from 2019 to 2021 for verification of OsHV-1 *in situ* LAMP method

采样时间 Sampling time	采样地点 Sampling site	宿主物种 Host species	死亡率 Mortality rate /%	样本数* Sample number	感染率 Prevalence /%	载量 Load /(copy/ng total DNA)	原位 LAMP <i>in-situ</i> LAMP
2019-05	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	90	15(10)	93.3	4.39×10^6	+
2019-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	95	30(17)	90.0	8.69×10^6	+
2019-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	72	30(14)	96.7	3.84×10^5	+
2019-06	广东潮州 Chaozhou, Guangdong	福建牡蛎 <i>C. angulata</i>	60	60(10)	43.3	3.65×10^2	-
2019-07	山东即墨 Jimo, Shandong	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	35	30(8)	0	/	-
2019-08	山东潍坊 Weifang, Shandong	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	50	30(7)	0	/	-
2020-03	福建宁德 Ningde, Fujian	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	30	22(10)	0	/	-
2020-03	福建宁德 Ningde, Fujian	福建牡蛎 <i>C. angulata</i>	40	38(5)	7.9	8.64×10^1	-
2020-11	山东潍坊 Weifang, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	60	20(10)	40.0	6.24×10^2	-
2020-05	山东长岛 Changdao, Shandong	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	30	30(6)	0	/	-
2020-08	山东长岛 Changdao, Shandong	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	35	30(8)	0	/	-
2020-08	山东烟台 Yantai, Shandong	虾夷扇贝 <i>M. yessoensis</i>	90	20(11)	0	/	-
2021-05	山东乳山 Rushan, Shandong	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	40	30(5)	0	/	-
2021-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	毛蚶 <i>S. subcrenata</i>	90	20(6)	95.0	9.37×10^4	+
2021-06	山东莱州 Laizhou, Shandong	菲律宾蛤仔 <i>R. philippinarum</i>	50	2	100	3.69×10^2	-

: 括号内数字为固定的蜡块样本数。: The number in brackets is the number of wax blocks.

表 3 OsHV-1 原位 LAMP 检测与 qPCR 检测结果 Kappa 一致性分析
Tab.3 Analysis of Kappa concordance between OsHV-1 *in situ* LAMP assay and qPCR results

qPCR	原位 LAMP			Kappa 值
	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	
阳性 Positive	54	8	62	0.638
阴性 Negative	1	11	12	
合计 Total	55	19	74	

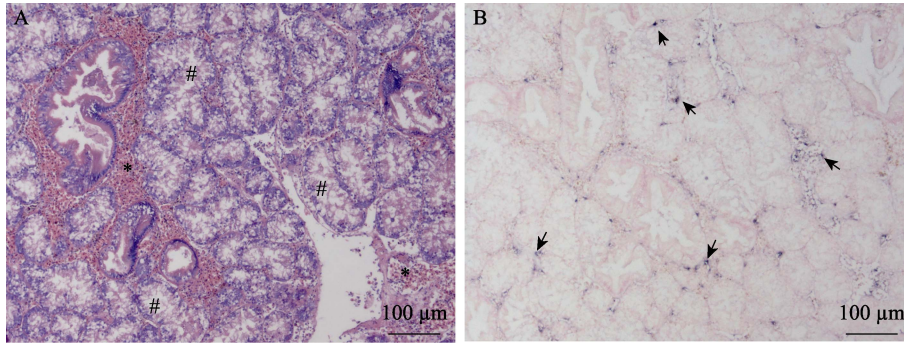


图 3 肝胰腺原位 LAMP 检测结果
Fig.3 *In situ* LAMP detection in the hepatopancreas

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测

*: 血细胞浸润区; #: 肝胰腺小管上皮坏死; 黑色箭头被 OsHV-1 感染的细胞。

A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection

*: Infiltrated haemocytes; #: Epithelial cell and tissue necrosis of the hepatopancreatic tubules; Black arrows show OsHV-1 signals.

常被观察到(图 5 和图 6), 这些结果说明, 毛蚶的肌细胞对 OsHV-1 的亲嗜性较强。部分个体鳃丝样本出现轻度肿胀, 肿胀的鳃丝中有血淋巴细胞浸润, 并观察到病毒阳性信号, 推测杂交信号正是来源于浸润的血淋巴细胞(图 7)。肝胰腺器官的组织病变和病毒杂交信号在各发病个体中稳定出现, 推荐肝胰腺作为毛蚶感染 OsHV-1 组织病理、原位 LAMP 检测的首选目标器官。

3 讨论

贝类养殖产业是我国海水养殖产业的重要组成部分, 特别是 20 世纪 80 年代, 以扇贝养殖为驱动力掀起的我国海水养殖第三次浪潮, 引领了我国海水养殖产业的跨越式发展。自 20 世纪 90 年代以来, 贝类养殖产量在海水养殖总产量中的占比稳居 70%以上

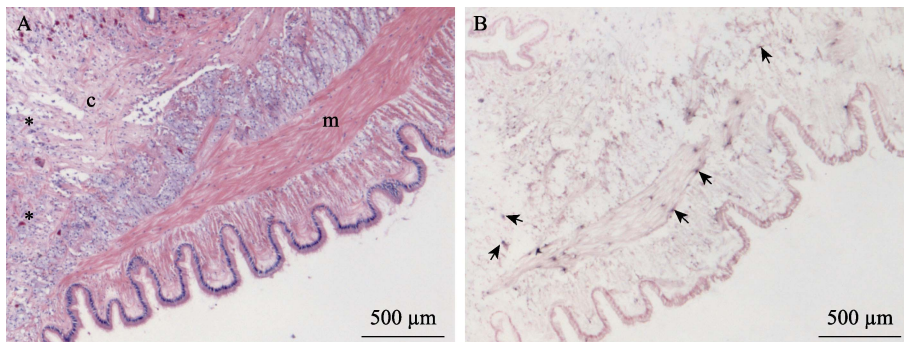


图 4 外套膜原位 LAMP 检测结果
Fig.4 *In situ* LAMP detection in the mantle

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测

m: 肌肉组织; c: 结缔组织; *: 血细胞浸润; 黑色箭头示病毒杂交信号。

A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection

m: Muscle; c: Connective tissue; *: Infiltrated haemocytes; Black arrows show OsHV-1 signals.

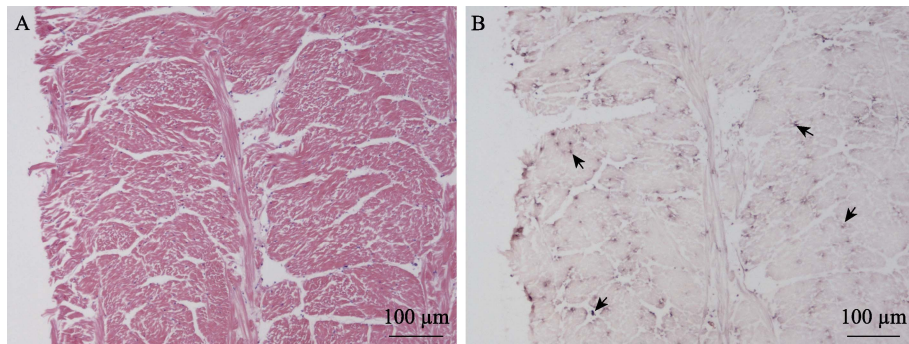


图5 斧足原位 LAMP 检测结果
Fig.5 *In situ* LAMP detection in the axe foot

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测
图 B 中的黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞。
A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection
Black arrows in Fig.B show OsHV-1 signals.

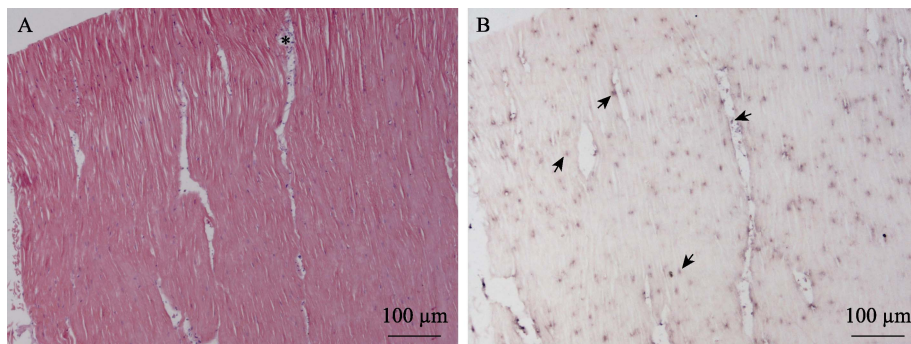


图6 闭壳肌原位 LAMP 检测结果
Fig.6 *In situ* LAMP detection in the muscle

A: HE 染色; B: 原位 LAMP 检测
*: 血细胞浸润; 黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞。
A: HE staining; B: *In situ* LAMP detection
*: Haemocyte infiltration; Black arrows show OsHV-1 signals.

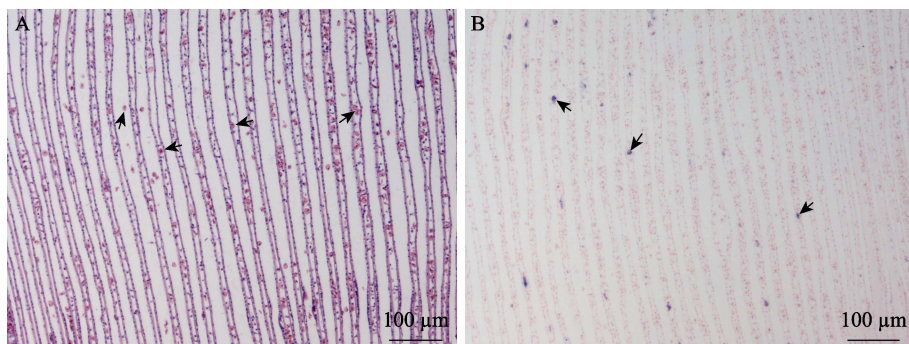


图7 鳃原位 LAMP 检测结果
Fig.7 *In situ* LAMP detection in the gill

A: HE 染色(黑箭头示异常增多的血淋巴细胞); B: 原位 LAMP 检测(黑色箭头示被 OsHV-1 感染的细胞)
A: HE staining (Black Arrows show increased haemocytes); B: *In situ* LAMP detection (Black arrows show OsHV-1 signals)

(阙华勇等, 2016)。随着贝类养殖产业总体规模的不断扩大, 养殖病害问题日益严重。据统计, 2020 年中国贝类养殖产业因疾病造成的经济损失高达 120.0 亿元(中国水生动物卫生状况报告)。OsHV-1 是近年来我国和世界贝类养殖产业面临的一种主要病毒性病原, 其具有宿主范围广、变异株频繁出现等特点(Arzul *et al.*, 2017; 白昌明等, 2021; 张淑敏等, 2020), 这给该病毒的流行病学调查和防控工作带来了极大挑战。对重要病原微生物易感宿主的准确认定, 是制定有效疫病防控措施的前提。2014 年, OIE 对水生动物疾病易感宿主的标准进行了修订, 至少满足以下 3 个原则才能被认定为易感宿主: 病例来源于自然感染或无创人工感染实验(混养、浸浴或投喂), 通过注射等侵害性人工感染方式、浸浴时病原浓度高于自然环境或水体理化条件异于自然水体(如高温)等条件下发生的病例不能用于易感性评估; 病原微生物的种类得到充分鉴定; 有明确证据表明病原微生物在宿主体内发生复制, 或病原微生物寄生部位伴有感染发生(OIE, 2021)。这些原则给 OsHV-1 流行病学调查过程中适宜采用的技术手段提供了参考。原位杂交技术作为一项集 OsHV-1 分子水平种特异性与病毒组织分布原位检测于一体的技术手段, 为 OsHV-1 感染的确诊提供了一个解决方案(Lipart *et al.*, 2002)。但由于该方法操作繁琐、耗时较长, 不适合开展大规模流行病学调查工作。

原位 LAMP 技术自 2003 年被提出以来(Maruyama *et al.*, 2003), 已被应用于包括传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)(Jitrakorn *et al.*, 2016)和十足目虹彩病毒 1(Decapod iridescent virus 1, DIV1)(Chen *et al.*, 2019)等水生动物病原在内的多种病原微生物检测(Hashimoto *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2011)。与传统原位杂交和原位 PCR 检测技术相比, 原位 LAMP 具有核酸扩增反应温度低、对组织破坏小, 恒温扩增不需要特殊实验设备以及实验操作更方便、快捷等优点(Maruyama *et al.*, 2003)。本研究在结合已有 OsHV-1 LAMP 特异性引物的基础上, 补充设计环引物, 构建 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法。应用该方法对 2019 年来本团队收集的非正常死亡贝类样本进行检测, 首次确认毛蚶是 OsHV-1 的易感宿主。在毛蚶外套膜、肝胰腺结缔组织, 以及富含肌肉细胞的斧足和闭壳肌中也发现较多病毒杂交信号, 推测部分肌肉组织中的病毒杂交信号来自肌细胞的细胞核。在毛蚶鳃丝中也发现病毒杂交信号, 根据信号出现的位置和细胞形态推测其来源于血淋巴细胞。

聚合酶链式反应(PCR)与荧光定量(qPCR)检测技

术由于其灵敏度高、特异性强, 并且可以进行定量检测的技术优势, 已被广泛用于 OsHV-1 等多种水生动物病原感染的筛查和确诊研究中。本研究使用的 OsHV-1 qPCR 检测方法的检测灵敏度为 6 病毒拷贝/mg 组织(Martenot *et al.*, 2010), 同时, 液相 PCR 在密闭环境下进行, 具有稳定性强的优势。本研究所使用的 LAMP 检测方法灵敏度为 10^3 病毒拷贝/反应(Zaczek-Moczydlowska *et al.*, 2020), 同时, 反应在开放的载玻片上进行, 稳定性较差。但 qPCR 的检测需要提取病毒 DNA 作为模板, 提取过程破坏了病毒感染的组织, 且易受污染, 造成假阳性。原位 LAMP 检测技术与之相比虽然灵敏度较低, 但规避了 qPCR 无法定位病毒在组织分布的缺点。本研究结果表明, qPCR 适合开展 OsHV-1 的大规模流行病学筛查, 原位 LAMP 适合开展 OsHV-1 感染确诊研究。

20 世纪 90 年代末, 栉孔扇贝曾是我国北方最重要的海水养殖贝类之一, 年产量最高时达 60 万 t 以上, 在海水养殖产业中占有极其重要的地位(张福绥等, 1999)。由于大规模、高密度的单一品种养殖, 海区生态系统失衡, 导致病害暴发, 引起栉孔扇贝发生大规模死亡(宋微波等, 2001; 王崇明等, 2002)。对从死亡栉孔扇贝中纯化的疱疹样病毒粒子的基因组测序和系统发育关系分析的结果显示, 该疱疹病毒与 OsHV-1 为同种病毒的不同变异株, 我国学者根据其致病特点将其命名为扇贝急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV)。AVNV 与 OsHV-1 参考株基因组相似度为 97.0%。受海区生态环境失衡和 AVNV 病害的影响, 我国栉孔扇贝养殖产业迅速萎缩, 年产量最低时跌至不足 20 万 t(Guo *et al.*, 2016)。对非正常死亡栉孔扇贝开展的被动流行病学调查显示, 2001—2007 年 AVNV 感染率(>60%)和感染强度(> 10^4 拷贝/ng 总 DNA)普遍较高(2000 年之前的样本缺失), 2008—2013 年感染率(<50%)和感染强度(< 10^3 拷贝/ng 总 DNA)普遍下降, 2014—2020 年未检测到确诊病例(Bai *et al.*, 2015)。本研究使用新开发的 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法, 对近年来采集的栉孔扇贝样本进行检测的结果也为阴性。

长牡蛎原产于西北太平洋中韩日俄海域, 因其生长快、抗逆性强, 被引进到全球各地广泛养殖(Guo, 2009; 张国范等, 2020)。从全球范围来看, 长牡蛎也是受 OsHV-1 病害影响最严重的物种, 主要引起幼虫和幼贝的大规模死亡(Barbosa Solomieu *et al.*, 2015)。我国长牡蛎感染 OsHV-1 的案例最早报道于 2009 年, 但目前因 OsHV-1 感染引起的大规模死亡案例仅发生于幼虫阶段。福建牡蛎是长牡蛎的暖水姊妹亚种, 在

欧洲又被称为葡萄牙牡蛎(张国范等, 2020)。西班牙和葡萄牙学者从当地福建牡蛎样本中检测到 OsHV-1 核酸(López Sanmartín *et al*, 2016a、2016b), 但尚无确诊案例报道。本研究利用 qPCR 从福建牡蛎种贝中检测到低载量的 OsHV-1 DNA, 但原位 LAMP 检测结果为阴性。2 个批次的福建牡蛎样本采集自育苗场, 同期曾发生过长牡蛎幼虫感染 OsHV-1 死亡案例。推测由于场区未做好生物安保措施, 水体或环境中存在 OsHV-1 污染, 从而导致 qPCR 检测福建牡蛎种贝呈弱阳性。

OsHV-1 病害自 20 世纪 90 年代在我国发生以来, 其宿主范围不断扩大, 并随着海区生态环境等因素发生变化, 给该病毒病的防控造成困难。近年来, 我国长牡蛎三倍体人工育种和养殖规模不断扩大, OsHV-1 感染引起的幼虫死亡案例频繁发生。目前, 我们对我国大宗养殖贝类与常见野生贝类对 OsHV-1 的易感性尚不完全了解, 本研究基于原位 LAMP 技术建立了 OsHV-1 原位 LAMP 检测方法, 并应用到 OsHV-1 的易感宿主调查工作中; 为后续开展 OsHV-1 流行病学、易感宿主调查和组织亲嗜性等研究提供技术支持。

参 考 文 献

- ALFARO A C, NGUYEN T V, MERIEN F. The complex interactions of *Ostreid herpesvirus 1*, *Vibrio* bacteria, environment and host factors in mass mortality outbreaks of *Crassostrea gigas*. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1148–1168
- ARZUL I, CORBEIL S, MORGA B, *et al*. Viruses infecting marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 147: 118–135
- BAI C M, WANG C M, XIA J Y, *et al*. Emerging and endemic types of *Ostreid herpesvirus 1* were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 98–106
- BAI C M, XIN L S, WANG C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 214–226 [白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 214–226]
- BARBIERI E S, MEDINA C D, Vázquez N, *et al*. First detection of *Ostreid herpesvirus 1* in wild *Crassostrea gigas* in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 166: 107222
- BARBOSA SOLOMIEU V, RENAULT T, TRAVERS M A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 2–10
- BATISTA F M, ARZUL I, PEPIN J F, *et al*. Detection of *ostreid herpesvirus 1* DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. *Journal of Virological Methods*, 2007, 139(1): 1–11
- CHEN X, QIU L, WANG H, *et al*. Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of decapod iridescent virus 1 (DIV1). *Viruses*, 2019, 11(4): 387
- FARLEY C A, BANFIELD W G, KASNIC Jr G, *et al*. Oyster herpes-type virus. *Science*, 1972, 178(4062): 759–760
- GAO F, JIANG J Z, WANG J Y, *et al*. Real-time quantitative isothermal detection of *Ostreid herpesvirus-1* DNA in *Scapharca subcrenata* using recombinase polymerase amplification. *Journal of Virological Methods*, 2018, 255: 71–75
- GITTENBERGER A, VOORBERGEN-LAARMAN M A, ENGELSMA M Y. *Ostreid herpesvirus OsHV-1 mu Var* in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(1): 105–109
- GUO X M, FORD S E. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2016, 371: 1689
- GUO X M. Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2009, 1(3/4): 251–259
- HASHIMOTO M, SAKAMOTO H, IDO Y, *et al*. In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Plasmodium* species in wide-range thin blood smears. *Malaria Journal*, 2018, 17: 235
- HINE P, WESNEY B, HAY B. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1992, 12(2): 135–142
- JITRAKORN S, ARUNRUT N, SANGUANRUT P, *et al*. In situ DIG-labeling, loop-mediated DNA Amplification (ISDL) for highly sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Aquaculture*, 2016, 456: 36–43
- LI Y N, BAI C M, LIU J L, *et al*. Establishment and application of indirect *in situ* polymerase chain reaction for detection of *Ostreid herpesvirus-1* (OsHV-1). *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 679–687 [李亚楠, 白昌明, 刘金兰, 等. 牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)间接原位杂交 PCR 检测方法的建立与初步应用. *水产学报*, 2019, 43(3): 679–687]
- LIPART C, RENAULT T. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods*, 2002, 101(1/2): 1–10
- LÓPEZ SANMARTÍN M, LÓPEZ FERNÁNDEZ J R, CUNHA M E, *et al*. *Ostreid herpesvirus* in wild oysters from the Huelva coast (SW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016a, 120(3): 231–240
- LÓPEZ SANMARTÍN M, POWER D M, DE LA HERRÁN R,

- et al.* Evidence of vertical transmission of ostreid herpesvirus 1 in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016b, 140: 39–41
- MARTENOT C, ODEN E, TRAVAILLÉ E, *et al.* Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1/2): 86–89
- MARUYAMA F, KENZAKA T, YAMAGUCHI N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx₂* gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5023–5028
- MORTENSEN S, STRAND A, BODVIN T, *et al.* Summer mortalities and detection of Ostreid herpesvirus microvariant in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sweden and Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 117(3): 171–176
- MURO-CACHO C A. *In situ* PCR. Overview of procedures and applications. *Frontiers in Bioscience*, 1997, 2(3): 15–29
- NICOLAS J, COMPS M, COCHENNEC N. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1992, 12(1): 11–13
- OIE. Criteria for listing species as susceptible to infection with a specific pathogen. In: OIE. Aquatic animal health code. OIE Publications Unit Paris, 2021, 1–4
- OIE. Infection with Ostreid herpesvirus 1 micro variants. In: OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. OIE Publications Unit Paris, 2019, 1–14
- QUE H Y, ZHANG G F. Status and trend of molluscan mariculture techniques in China. *Studia Marina Sinica*, 2016(1): 69–76 [阙华勇, 张国范. 我国贝类产业技术的现状与发展趋势. *海洋科学集刊*, 2016(1): 69–76]
- REN W C, WANG C M, CAI Y Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of acute viral necrobiotic virus in scallop *Chlamys farreri*. *Acta Virologica*, 2009, 53(3): 161–167
- RODGERS C, ARZUL I, CARRASCO N, *et al.* A literature review as an aid to identify strategies for mitigating ostreid herpesvirus 1 in *Crassostrea gigas* hatchery and nursery systems. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 565–585
- ROSANI U, YOUNG T, BAI C M, *et al.* Dual analysis of virus-host interactions: The case of Ostreid herpesvirus 1 and the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Evolutionary Bioinformatics*, 2019, 15: 1–8
- SONG W B, WANG C M, WANG X H, *et al.* New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*. *Marine Science*, 2001, 25(12): 23–26 [宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. *海洋科学*, 2001, 25(12): 23–26]
- WANG C M, WANG X H, SONG X L, *et al.* Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(2): 180–184 [王崇明, 王秀华, 宋晓玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察. *水产学报*, 2002, 26(2): 180–184]
- WHITTINGTON R, HICK P, EVANS O, *et al.* Pacific oyster mortality syndrome: A marine herpesvirus active in Australia. *Microbiology Australia*, 2016, 37(3): 126–128
- YE Y, WANG B, HUANG F, *et al.* Application of *in situ* loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods. *Food Control*, 2011, 22(3/4): 438–444
- ZACZEK-MOCZYDLOWSKA M A, MOHAMED-SMITH L, TOLDRÀ A, *et al.* A single-tube HNB-based loop-mediated isothermal amplification for the robust detection of the Ostreid herpesvirus 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 6605
- ZHANG F S, YANG H S. Analysis of the causes of mass mortality of farming *Chlamys farreri* in summer in coastal areas of Shandong, China. *Marine Science*, 1999(1): 44–47 [张福绥, 杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析. *海洋科学*, 1999(1): 44–47]
- ZHANG G F, LI L, QUE H Y. An evolution of oyster mariculture industry in China: New knowledge, variety and product. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 740–749 [张国范, 李莉, 阙华勇. 中国牡蛎产业的嬗变——新认知、新品种和新产品. *海洋与湖沼*, 2020, 51(4): 740–749]
- ZHANG S M, BAI C M, XIN L S, *et al.* Gene cloning and expression of Ostreid herpesvirus 1 envelope protein (ORF111). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 183–190 [张淑敏, 白昌明, 辛鲁生, 等. 牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白(ORF111)的基因克隆及表达. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 183–190]

(编辑 马瑾艳)

Survey of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) Susceptible Hosts Based on *in situ* LAMP Technique

ZHANG Xiang^{1,2}, GU Li^{1,2}, ZHENG Yudong^{2,3}, LI Chen², BAI Changming²,
XIN Lusheng², WANG Chongming^{2①}, LIU Jinlan^{1①}

(1. College of Fishery, Tianjin Agriculture University, Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) has caused a serious economic loss to the global bivalve aquaculture industry. Given its wide host range and the frequent emergence of mutated strains, OsHV-1 infection threatens mollusk production. Unlike the common vertebrate herpesviruses that generally exhibit high host specificity, more than ten bivalve species have been identified as potentially susceptible to OsHV-1 infection, including members of Ostreoida, Pterioidea, Arcoidea, and Veneroidea. A variety of OsHV-1 detection methods have been developed, such as PCR, *in situ* hybridization, *in situ* PCR, histopathology, transmission electron microscopy, ring-mediated isothermal nucleic acid amplification (LAMP), and recombinase polymerase amplification (RPA). The sensitivity and specificity of transmission electron microscopy detection are low, and specific complementary detection methods such as PCR are needed to confirm the occurrence of OsHV-1. *In situ* hybridization, although highly specific, has the disadvantages of low sensitivity, complicated procedures, and high investment of effort. PCR methods are still the most widely used for epidemiological investigation of OsHV-1. However, PCR cannot alone confirm infection, which has led to the emergence of unconfirmed cases of OsHV-1 infection in many species and regions. According to the World Organization for Animal Health's (OIE) Aquatic Animal Manual, positive nucleic acid-specific detection combined with histopathology and transmission electron microscopy is required for the confirmed diagnosis of OsHV-1 infection. Other detection methods, such as LAMP and RPA, which use nucleic acid amplification alone to detect OsHV-1, can not confirm infection as the presence of nucleic acids is not equivalent to viral infection. As a result, the susceptibility of several bivalve species to OsHV-1 infection has not been evaluated. Instead, several obstacles remain with regards to the development of epidemiological surveillance programs and the implementation of quarantine, prevention, and control measures for OsHV-1 infection. Compared with traditional *in situ* hybridization and *in situ* PCR assays, *in situ* LAMP has the advantages of low nucleic acid amplification reaction temperature, less damage to tissue, constant temperature amplification that does not require special experimental equipment, and more convenient and efficient experimental design. In this study, we selected a set of LAMP primers designed for specific detection of OsHV-1, and a pair of loop primers were designed to improve the specificity and stability of the LAMP reaction on slides. An optimized *in situ* LAMP method for OsHV-1 detection was developed, which provides a rapid diagnostic method with high specificity and sensitivity to identify hosts that are potentially susceptible to OsHV-1 infection, and to characterize the distribution pattern and tissue affinity of the virus in new hosts. The

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn; LIU Jinlan, E-mail: ljlan1115@163.com

optimized protocol and quantitative PCR (qPCR) were then used to detect OsHV-1 infection in bivalve samples (*Crassostrea gigas*, *C. angulata*, *Chlamys farreri*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Ruditapes philippinarum*, and *Scapharca subcrenata*) collected from 2019 to 2021. OsHV-1 hybridization signals were observed in *S. subcrenata* samples alone, although positive qPCR results were obtained in more species. Further investigation of pathological characteristics and associated viral hybridization signals indicated that OsHV-1 infection always occurred in fibroblasts and hemocytes in the connective tissues of the mantle and hepatopancreas, nucleus of muscle cells in the foot, and adductor muscle. Signals were also occasionally observed in infiltrated hemocytes between and within the gill filaments. OsHV-1 hybridization signals were observed within the hemocytes infiltrating several organs of the furcula visceral cluster. The hemocytes of *S. subcrenata* seem to be particularly susceptible to OsHV-1 infection. Histopathological lesions and viral hybridization signals in the hepatopancreas organ were consistently observed in individuals with clinical signs, and we recommend the hepatopancreas as the preferred target organ for histopathological and *in situ* LAMP assays for OsHV-1 infection in *S. subcrenata*. *In situ* LAMP-based detection indicated that *S. subcrenata* was a susceptible host for OsHV-1, and the connective tissue, muscle tissue, and hemolymph cells had a strong affinity for the virus. At present, the susceptibility of many cultured and wild shellfish to OsHV-1 infection is still unknown. Since the emergence of mollusk mortalities associated with OsHV-1 infection occurred in China in the 1990s, its host range has expanded and changed along with the environment, which has complicated its prevention and control. In recent years, the scale of artificial breeding and cultivation of triploid *C. gigas* has expanded in China, and larval mortalities are frequently associated with OsHV-1 infection. The *in situ* LAMP detection method for OsHV-1 infection developed in this study proved to be convenient and fast and could be a valuable tool for the rapid detection and confirmation of OsHV-1 infection.

Key words Ostreid herpesvirus 1; *In situ* LAMP; Susceptibility; Epidemiological study

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220426001

http://www.yykxjz.cn/

翁佩文, 杨慧超, 李杰, 张文彬, 阎永伟, 莫照兰. 紫菜腐霉拮抗菌的筛选和鉴定. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 186-196
WENG P W, YANG H C, LI J, ZHANG W B, YAN Y W, MO Z L. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Pythium* causing red rot disease in *Neopyropia*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 186-196

紫菜腐霉拮抗菌的筛选和鉴定*



翁佩文^{1,2} 杨慧超^{1,3} 李杰¹ 张文彬^{1,3} 阎永伟¹ 莫照兰^{1,4①}

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071;
2. 中国农业科学院研究生院 北京 100081; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;
4. 中国海洋大学三亚海洋研究院 海南省热带水产种质重点实验室 海南 三亚 572000)

摘要 生物防治广泛用于农作物的病害防治,该方法在藻类病害防控方面尚未有相关的报道。腐霉(*Pythium* sp.)是引起紫菜(*Neopyropia*)赤腐病(red rot disease)的主要病原,本研究的目的是筛选和鉴定对紫菜腐霉有拮抗能力的细菌。从养殖藻类及其养殖环境中分离鉴定了385株细菌,通过平板对峙法筛选到9株对腐霉有拮抗作用的细菌,进一步通过含毒介质法筛选到3株胞外产物对腐霉具有抑制活性的细菌(P3、P6和P19)。3株拮抗菌对8株腐霉均有拮抗活性,对腐霉生长的抑制率分别为52.09%~97.95%(P3)、26.81%~78.04%(P6)、10.47%~41.91%(P19)。通过16S rRNA鉴定和多位点序列进化分析(16S rRNA-*dnaA-dnaN-recA*),将P3和P6鉴定为杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*),P19鉴定为解肽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas peptidolytica*)。本研究筛选得到的拮抗菌为下一步建立紫菜赤腐病的生物防治方法奠定了基础。

关键词 腐霉;拮抗菌;假交替单胞菌;生物防治

中图分类号 S946.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0186-10

紫菜(*Neopyropia*)是一类生长于潮间带的大型经济红藻,广泛分布于寒带至热带海域,具有较高的经济价值及生态价值(章守宇等,2019;江涛等,2021)。我国是紫菜生产大国,紫菜的栽培规模及产量均居世界之首,年产值约13亿美元(<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/zh>)。然而,由细菌、卵菌和病毒等引起的病害频繁发生,给养殖户带来了巨大的经济损失(Arasaki,1947;Migita,1969;Saito *et al*,1972;Kim *et al*,2016)。其中,由卵菌病原腐霉(*Pythium* sp.)引起的赤腐病(red rot disease)是紫菜栽培期最主要的病害,常导致紫菜病烂、空帘而绝

收(Arasaki,1947;Takahashi,1970;Lee *et al*,2015)。目前,生产上经常采用干出、冷藏、酸洗的方法来应对紫菜赤腐病(Fujita *et al*,1980;Sakaguch *et al*,2001;Akizuki *et al*,2007)。将患病紫菜干燥至含水量为30%~40%并在-20℃冷藏1~2周,可使紫菜腐霉菌丝大量死亡,但紫菜腐霉的孢子对干燥及冷藏具有较好的耐受性,存活率为10%~30%(Fujita *et al*,1980)。用pH 2.0~5.0的无机酸或有机酸处理患病紫菜,在腐霉孢子浓度较低的情况下可有效抑制赤腐病,但在腐霉孢子浓度较高时处理效果不明显(Sakaguchi *et al*,2001;Akizuki *et al*,2007)。此外,这些物理或化学的

* 财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系和中央高校基本科研业务费专项(202064006)共同资助。

翁佩文, E-mail: wengpw912@163.com

① 通信作者:莫照兰,研究员, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

收稿日期:2022-04-26, 收修改稿日期:2022-05-10

处理方法还存在一系列问题,如冷藏设备及场地会大幅度提高栽培成本;酸性杀菌剂不仅污染栽培海区,长期使用还会提高腐霉的耐酸性而影响防治效果(Hwang *et al.*, 2009)。多年来,研究人员一直尝试选育或培育紫菜抗病品系,到目前为止还未得到对赤腐病完全免疫的品系(Polne-Fuller *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2014、2015)。

在陆地农作物生产中利用有益的拮抗微生物或其代谢产物进行病害防控是一种绿色、安全、有效的方法(王丁等, 2018),这为经济海藻的病害防控提供了新思路。藻类及其生长环境存在多种多样的微生物,且处在动态变化中,这些微生物分泌的多种活性物质具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫等活性(Singh *et al.*, 2014、2015; 阎永伟等, 2022),是筛选生防微生物的良好来源。本研究的目的是从海藻及其生长环境中筛选和鉴定出对紫菜腐霉具有拮抗作用的细菌,为建立紫菜赤腐病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

紫菜赤腐病病原为腐霉 *Pythium porphyrae* 和 *Pyt. chondricola*。本研究所用的 *Pyt. porphyrae* 菌株(NBRC 30800、NBRC 33126、NBRC 100633 和 NBRC 33253)购自日本生物资源库(NITE Biological Resource Center, Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Japan), *Pyt. chondricola* 菌株(JS151205、PYTHT201801-1、RZ201902 和 LS201903)由本实验室分离自患赤腐病紫菜(邱丽萍, 2018; 何礼娟, 2020)。上述菌株保藏于中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物病害控制与分子病理学研究室,在4℃传代保藏。培养紫菜腐霉的培养基为海水玉米培养基(SCM)(玉米粉 2 g/L、酵母粉 1 g/L、琼脂 15 g/L、盐度为 20 的海水、pH 调为 7.0~7.5),常规培养温度为 24℃。培养细菌的培养基为 2216E 海水培养基(MA)(蛋白胨 5 g/L、酵母膏 1 g/L、FePO₄ 0.01 g/L、琼脂 15 g/L、陈海水),常规培养温度 28℃,震荡条件为 150 r/min。

1.2 细菌的分离和纯化

采集紫菜的苗期贝壳丝状体、海区栽培期的叶状体、海带(*Saccharina japonica*)苗及相应的栽培水体进行细菌的分离。采集的样品放入无菌采样袋(海博生物)及水样采集袋(海博生物)带回实验室处理。紫菜贝壳丝状体用灭菌海水清洗表面 3 次,用无菌刮刀刮取

约 1 cm² 贝壳丝状体;紫菜叶状体及海带苗用无菌刷子清除表面附着的杂质,再用灭菌海水清洗 3 次。所得的藻类样品用无菌研磨棒分别匀浆,用灭菌海水分别将匀浆液进行梯度稀释,取稀释度为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 的稀释液 100 μL 涂布于 MA 上。水样也分别稀释至 10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³,取 100 μL 涂布于 MA 上。将所有平板置于 28℃ 培养 2 d,挑取形态不同的单菌落进行纯化,-80℃ 保存在 30% 甘油里。

1.3 拮抗菌初筛

用平板对峙法进行拮抗菌的初筛(Farhaoui *et al.*, 2022)。用接种环挑取细菌菌株在 MA 上划线,在 28℃ 培养活化 2 d 备用。供试紫菜腐霉菌株 NBRC 33253 接种在 SCM 上,在 24℃ 培养 7 d 至长满平板后,用打孔器沿边缘菌丝将紫菜腐霉打成 5 mm 的圆形菌饼,将其接种在新的 SCM 平板中央,于 24℃ 培养 1 d 后,以紫菜腐霉菌饼为中心画“十”字作为定位线,挑取细菌菌落在距离紫菜腐霉菌饼中心 2 cm、垂直于定位线画 1 cm 短线,每平板可划 4 条短线,即接种 4 株菌株,对照组不接种细菌。将平板置于 24℃ 培养,为高效筛得目标菌株,本实验选用腐霉最适生长温度 24℃(何礼娟, 2020),待对照组紫菜腐霉直径长至约为 4 cm 时,观察接种细菌的周围是否出现抑菌圈。选出对紫菜腐霉有拮抗效果的菌株重复上述实验,在同一平板上接种相同菌株,每组 3 个平行,用游标卡尺量取定位线上紫菜腐霉边缘与细菌之间的距离。对具有拮抗能力的菌株重复上述筛选 2 次。

1.4 拮抗菌复筛

用含毒介质法进行拮抗菌的复筛(何碧珀等, 2019)。将初筛得到的细菌单菌落接种到 100 mL MA 液体培养基中,在 28℃、150 r/min 条件下震荡培养 72 h,取 30 mL 菌液于 50 mL 离心管中 5000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 膜过滤获得无菌滤液。将灭菌 SCM 冷却至 40℃ 左右,按无菌滤液:SCM=1:5 的比例充分混匀后制备含无菌滤液平板。将紫菜腐霉 NBRC 33253 制成 5 mm 菌饼接种在含拮抗菌无菌滤液的平板中央,作为实验组;根据初筛结果选择 1 株无拮抗效果的菌株制备无菌滤液,用上述方法制备平板,接种紫菜腐霉菌饼作为阴性对照组;在不含无菌滤液的 SCM 平板上接种紫菜腐霉菌饼作为空白对照组。每组平板设 3 个平行。将平板置于 24℃ 培养,至空白对照组紫菜腐霉长满平板(约 7 d),用菌落分析仪(Symbiosis Protocol 2, 英国)拍摄平板照片,然后用显微镜(OLYMPUS BX53, 日本)的自带软件

AJ-VERT 的“任意多边形”工具圈取腐霉生长面积,计算抑菌率。重复上述实验 2 次。

计算公式: 抑菌率 $=\frac{A_b-A_e}{A_b-A_i}\times 100\%$

式中, A_b 为空白对照组的腐霉面积, A_e 为实验组的腐霉面积, A_i 为菌饼面积。

1.5 拮抗谱的测定

用平板对峙法测定 3 株拮抗菌(P3、P6 和 P19)对 8 株腐霉的拮抗谱及拮抗能力。具体步骤为: 挑取单菌落接种到 MA 液体培养基培养 12 h, 按 10% 的接种量转接至新鲜的 MA 液体培养基继续培养 1~2 h, 将细菌培养液 5000 r/min 离心 10 min 去除上清液, 用灭菌海水悬浮细菌, 重复离心、悬浮步骤 3 次, 最后制成 10^8 CFU/mL 的菌悬液备用。将 5 mm 紫菜腐霉菌饼接种在 SCM 中央, 1 d 后按 1.3 中的定位方法, 在距离菌饼 2 cm 处, 点种菌悬液 2 μ L 作为实验组, 点种 2 μ L 灭菌海水作为空白对照组。每组设 3 个平行, 将所有平板置于 15 $^{\circ}$ C。为筛得具有防治赤腐病潜力的菌株, 本实验选用温度为实验室腐霉侵染紫菜温度 15 $^{\circ}$ C, 待空白组腐霉长满平板(10~15 d), 计算抑制率, 统计方法同 1.4。重复上述实验 2 次。

用打孔器将抑菌圈边缘的腐霉菌丝打成 5 mm 直径的菌饼, 用乳酸酚棉蓝染液(G1600, Solarbio)对腐霉菌饼进行染色, 染色完成后用灭菌海水洗去菌饼表面残余的染液后制片, 以空白对照组腐霉边缘菌丝为对照, 用显微镜观察抑菌圈边缘菌丝的形态变化。

1.6 拮抗细菌的鉴定

对细菌进行菌落形态观察、革兰氏染色(G1060, Solarbio)。用通用引物 27F/1492R 扩增拮抗菌的 16S rRNA 基因进行细菌鉴定(杨慧超, 2019)。对假交替单胞菌属细菌(*Pseudoalteromonas* sp.)进一步扩增管家基因 *dnaA*、*dnaN*、*recA* 基因序列, 进行多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)。根据 GenBank 中假交替单胞菌的 *dnaA*、*dnaN*、*recA* 序列, 利用 BioEdit 软件(Alzohairy, 2011), 识别序列中的高保守区域, 设计引物。*dnaA* 的引物序列为 PdnaAF (5'-TTTAGCATGTGGGTAAGACC-3')和 PdnaAR (5'-TCTTGGTCTAGCAACTGAAC-3'), *dnaN* 为 PdnaNF (5'-TGCAAATAACGATTCCAAGAG-3')和 PdnaNR (T TTGCATCAGAAAGCGTAAA), *recA* 为 recA-F/recA-R (Beurmann *et al.*, 2017)。利用 MEGA-X 软件将 16S rRNA (1499 bp)、*dnaA* (1146 bp)、*dnaN* (955 bp)和 *recA* (811 bp)基因序列按顺序连接, 并进行比对, 构建 N-J 系统发育树。

1.7 数据分析

利用 Excel 和 SPSS 软件对实验数据进行统计分析, 实验结果取平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm SD, n=3$), 利用 Duncan 检验法进行多重比较, 显著性为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 细菌的分离及拮抗菌筛选

从紫菜的贝壳丝状体、叶状体、海带及栽培水体中分离到 385 株细菌用于筛选拮抗菌。用平板对峙法进行初筛时, 得到 9 株对腐霉 NBRC 33253 具有拮抗作用的菌株(图 1)。2 次重复实验显示, 拮抗菌的抑菌带宽度在 1.65~16.54 mm 之间(表 1)。

用含毒介质法对这 9 株细菌进行复筛时, 有 3 株菌株(P3、P6 和 P19)的无菌滤液对腐霉的生长产生了显著的抑制(图 2)。2 次重复实验显示, 这 3 株细菌的抑菌率为 20.04%~30.09% (表 1)。根据这些结果, 选取 P3、P6 和 P19 进行下一步实验。

2.2 拮抗谱

用平板对峙法检测了 P3、P6 和 P19 对 8 株腐霉的拮抗谱和拮抗能力。2 次重复实验结果显示, 15 $^{\circ}$ C 条件下, 3 株拮抗菌对 8 株腐霉均具有拮抗作用(图 3), 其中, P3 的拮抗能力最强, 抑菌率达到(52.09%~97.95%), 其次为 P6 (26.81%~78.04%)和 P19 (10.47%~41.91%) (表 2)。用乳酸棉酚蓝对对峙边缘的腐霉菌丝进行染色观察, 结果显示, 与对照组的腐霉菌丝相比, 与拮抗菌 P3 和 P19 对峙的腐霉菌丝密度变稀疏、着色变浅, 而与拮抗菌 P6 对峙的腐霉菌丝无明显变化(图 4)。

2.3 拮抗菌的鉴定

菌株 P3、P6 和 P19 革兰氏染色均为阴性, 其中, P6 产黄色色素, P19 产棕色色素, P3 无色素产生。16S rRNA 基因序列分析结果显示, 3 株拮抗菌均与假交替单胞菌的相似性最高, P3 和 P6 为 99.93%, P19 为 99.86%。将 P3、P6 和 P19 的 4 个基因串联(16S rRNA-*dnaA*-*dnaN*-*recA*)构建多位点序列的系统进化树, 分析结果显示, P3 和 P6 与杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)聚为一支, P19 与解肽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas peptidolytica*)聚为一支(图 5)。

3 讨论

大型海藻在生长发育过程中会产生多种代谢物质到藻体表面, 为微生物定植提供了适宜的基质和营养(Steinberg *et al.*, 2002; Staufenberger *et al.*, 2008;

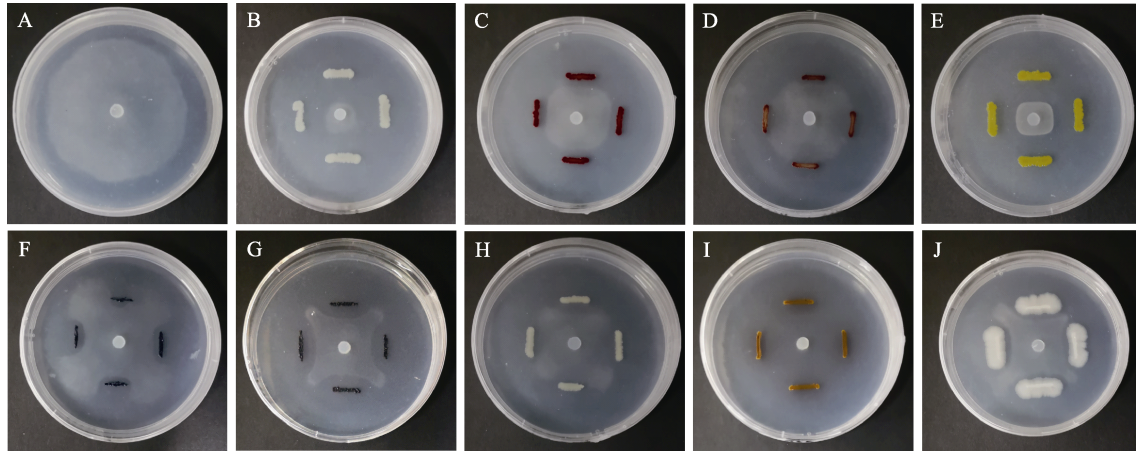


图 1 对峙生长法初筛腐霉拮抗菌

Fig.1 Preliminary screening of *Pyt. porphyrae* antagonistic bacteria by dual culture bioassays

A: 空白对照; B~J: P3(B)、P4(C)、P5(D)、P6(E)、P7(F)、P8(G)、P12(H)、P19(I)、B1(J)与腐霉的对峙生长
 A: Blank control; B~J: Antagonistic growth of P3(B), P4(C), P5(D), P6(E), P7(F), P8(G), P12(H), P19(I), and B1(J) against *Pyt. porphyrae*

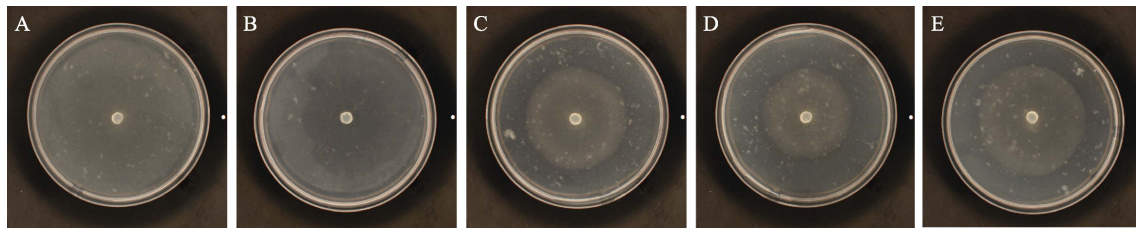


图 2 含毒介质法复筛拮抗菌

Fig.2 Secondary screening of antagonistic bacteria by toxic media method

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C~E: 腐霉在含有 P3(C)、P6(D)、P19(E)无菌滤液的培养基上生长
 A: Blank control; B: Negative control;
 C~E: *Pyt. porphyrae* grew on the medium containing extracellular products from P3(C), P6(D) and P19(E)

表 1 拮抗菌的筛选

Tab.1 Screening of antagonistic bacteria

组别 Group	初筛/(抑菌带/mm) Preliminary screening/(Bacteriostatic zone/mm)		复筛/(抑制率/%) Secondary screening/(inhibition rate/%)	
	第 1 次 Test 1	第 2 次 Test 2	第 1 次 Test 1	第 2 次 Test 2
P3	11.79±0.90 ^f	12.25±1.60 ^f	21.51±2.59 ^a	20.04±1.56 ^a
P4	3.66±0.31 ^c	4.19±0.09 ^c	0	0
P5	1.70±0.39 ^a	1.65±0.37 ^a	0	0
P6	10.58±0.20 ^e	10.95±0.46 ^e	23.12±2.45 ^a	21.56±2.53 ^a
P7	2.87±0.16 ^b	3.11±0.22 ^b	0	0
P8	6.19±0.19 ^d	6.60±0.36 ^d	0	0
P12	2.58±0.67 ^b	2.89±0.42 ^b	0	0
P19	16.37±0.35 ^g	16.54±0.56 ^g	30.09±4.66 ^b	27.66±2.27 ^b
B1	2.80±0.33 ^b	2.79±0.37 ^b	0	0
对照 Control ¹	0	0	/	/
空白对照 Blank control ²	/	/	0	0
阴性对照 Negative control ³	/	/	0	0

注: 1. 初筛实验中仅接种腐霉的平板; 2. 复筛实验中, 在不含菌液的 SCM 平板上接种腐霉; 3. 复筛实验中, 在含有无拮抗作用细菌菌液的 SCM 平板上接种腐霉。同列不同字母上标表示数据存在显著差异, 相同字母表示数据无显著差异。
 Note: 1. The control group in the primary screening experiment; 2. The control group in the secondary screening experiment; 3. Negative control group in the secondary screening experiment. Different superscripts indicate significant differences in the same column, while the same superscripts indicate no significant differences.

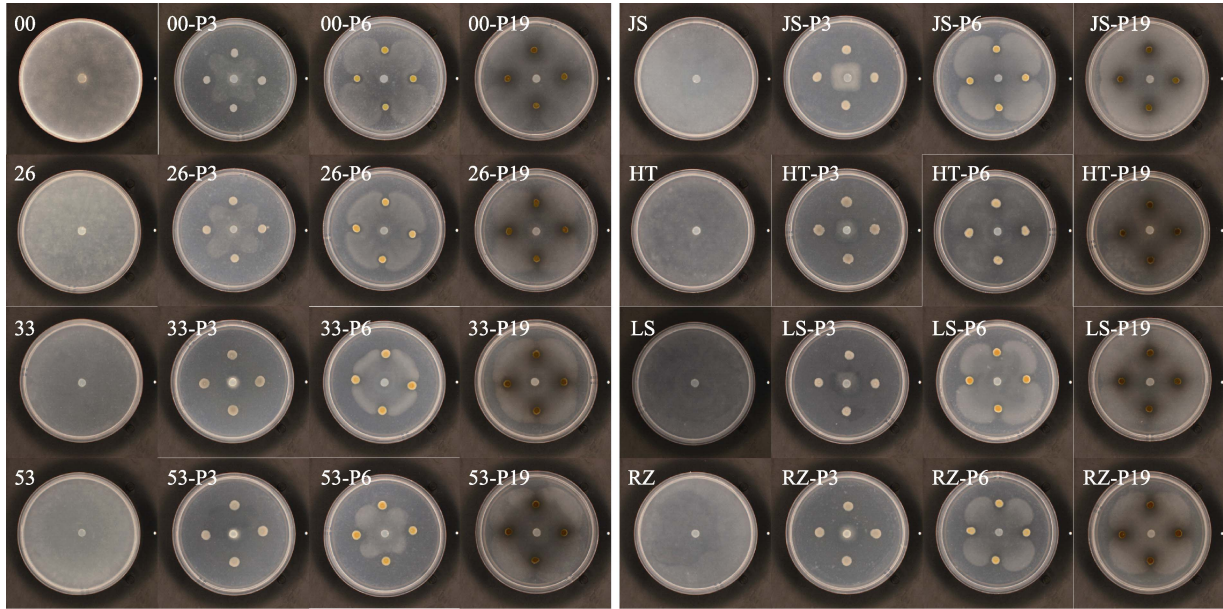


图 3 8 株腐霉与 3 株拮抗菌的对峙生长图

Fig.3 Confrontation growth between *Pythium* and antagonistic bacteria

00、26、33、53、JS、HT、LS、RZ 分别为腐霉 NBRC 30800、NBRC 33126、NBRC 100633、NBRC 33253、JS151205、PYTHT201801-1、LS201903、RZ201902；00-P3、26-P3、33-P3、53-P3、JS-P3、HT-P3、LS-P3、RZ-P3 分别为 P3 与腐霉 NBRC 30800、NBRC 33126、NBRC 100633、NBRC 33253、JS151205、PYTHT201801-1、LS201903、RZ201902 的对峙生长；00-P6、26-P6、33-P6、53-P6、JS-P6、HT-P6、LS-P6、RZ-P6 分别为 P6 与腐霉 NBRC 30800、NBRC 33126、NBRC 100633、NBRC 33253、JS151205、PYTHT201801-1、LS201903、RZ201902 的对峙生长；00-P19、26-P19、33-P19、53-P19、JS-P19、HT-P19、LS-P19、RZ-P19 分别为 P19 与腐霉 NBRC 30800、NBRC 33126、NBRC 100633、NBRC 33253、JS151205、PYTHT201801-1、LS201903、RZ201902 的对峙生长。

00, 26, 33, 53, JS, HT, LS, RZ represent *Pythium* NBRC 30800, NBRC 33126, NBRC 100633, NBRC 33253, JS151205, PYTHT201801-1, LS201903, RZ201902, respectively; 00-P3, 26-P3, 33-P3, 53-P3, JS-P3, HT-P3, LS-P3, RZ-P3 represent antagonistic growth of P3 against *Pythium* NBRC 30800, NBRC 33126, NBRC 100633, NBRC 33253, JS151205, PYTHT201801-1, LS201903, RZ201902, respectively; 00-P6, 26-P6, 33-P6, 53-P6, JS-P6, HT-P6, LS-P6, RZ-P6 represent antagonistic growth of P6 against *Pythium* NBRC 30800, NBRC 33126, NBRC 100633, NBRC 33253, JS151205, PYTHT201801-1, LS201903, RZ201902, respectively; 00-P19, 26-P19, 33-P19, 53-P19, JS-P19, HT-P19, LS-P19, RZ-P19 represent antagonistic growth of P19 against *Pythium* NBRC 30800, NBRC 33126, NBRC 100633, NBRC 33253, JS151205, PYTHT201801-1, LS201903, RZ201902, respectively.

表 2 拮抗菌对腐霉生长的抑菌率

Tab.2 Growth inhibition rate of antagonistic bacteria against *Pythium* strains

编号 No.	抑制率 Inhibition rate /%					
	第 1 次 Test 1			第 2 次 Test 2		
	P3	P6	P19	P3	P6	P19
NBRC 30800(00)	83.57±1.78 ^a	49.66±7.77 ^b	26.74±2.59 ^c	57.58±2.45 ^a	45.37±2.29 ^b	14.38±7.95 ^c
NBRC 33126(26)	86.35±6.39 ^a	47.01±4.10 ^b	35.98±3.15 ^c	52.09±4.28 ^a	39.63±3.35 ^b	31.67±1.89 ^c
NBRC 100633(33)	97.41±0.27 ^a	65.94±0.38 ^b	41.91±4.72 ^c	97.95±0.75 ^a	53.67±7.26 ^b	17.90±2.13 ^c
NBRC 33253(53)	97.92±0.13 ^a	78.04±0.13 ^b	33.16±3.20 ^c	96.31±0.21 ^a	66.23±6.08 ^b	23.03±3.44 ^c
JS151205(JS)	92.23±0.31 ^a	35.84±3.40 ^b	18.67±0.24 ^c	86.27±0.82 ^a	26.81±4.14 ^b	10.47±1.42 ^c
PYTHT201801-1(HT)	95.89±0.54 ^a	30.71±2.28 ^b	19.12±5.30 ^c	94.89±0.34 ^a	45.55±4.17 ^b	20.26±2.93 ^c
LS201903(LS)	95.47±0.56 ^a	48.36±4.32 ^b	16.37±2.56 ^c	96.95±0.57 ^a	35.80±6.32 ^b	21.11±0.89 ^c
RZ201902(RZ)	96.82±0.49 ^a	59.69±0.53 ^b	40.29±3.04 ^c	96.82±0.72 ^a	57.03±5.56 ^b	35.50±7.35 ^c

注：将 3 株拮抗菌对同一腐霉的生长抑制率进行差异显著性分析，同行不同字母上标表示数据存在显著差异，相同字母表示数据无显著差异。

Note: The growth inhibition rates of three antagonistic bacteria against the same *Pythium* strain were analyzed. Different superscripts indicate significant differences in the same row, while the same superscripts indicate no significant differences.

Singh *et al.*, 2013)。附着在海藻表面的微生物群落可产生多种活性物质, 这些物质不仅影响海藻的正常形态及生长发育, 还可保护宿主免受有害生物的伤害。因此, 大型海藻的附着微生物成为生物和医药领域的优选目标(Singh *et al.*, 2014、2015)。本研究从紫菜和海带及其栽培水体分离细菌, 通过平板对峙法筛选出

9 株具有抑制腐霉生长活性的细菌, 并通过含毒介质法检测出 3 株细菌(P3、P6 和 P19)的胞外产物能够抑制腐霉的生长, 表明这 3 株细菌通过拮抗作用抑制了腐霉的生长。其他 6 株细菌的胞外产物未检测到抑制腐霉生长的情况, 说明这 6 株细菌通过竞争作用抑制了腐霉的生长。

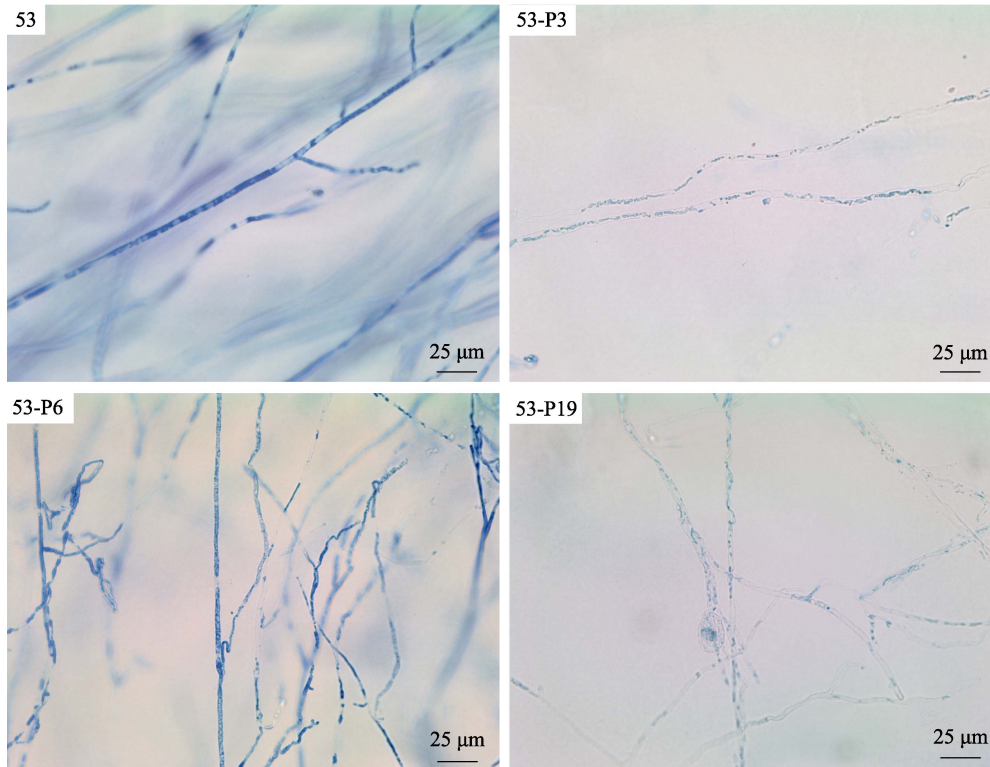


图 4 拮抗菌和腐霉对峙区域的腐霉菌丝显微观察(乳棉酚蓝染色)

Fig.4 Microscopic observation of the *Pythium* mycelia growing in the confrontation area between *Pythium* and antagonistic bacteria (lactophenol cotton blue staining)

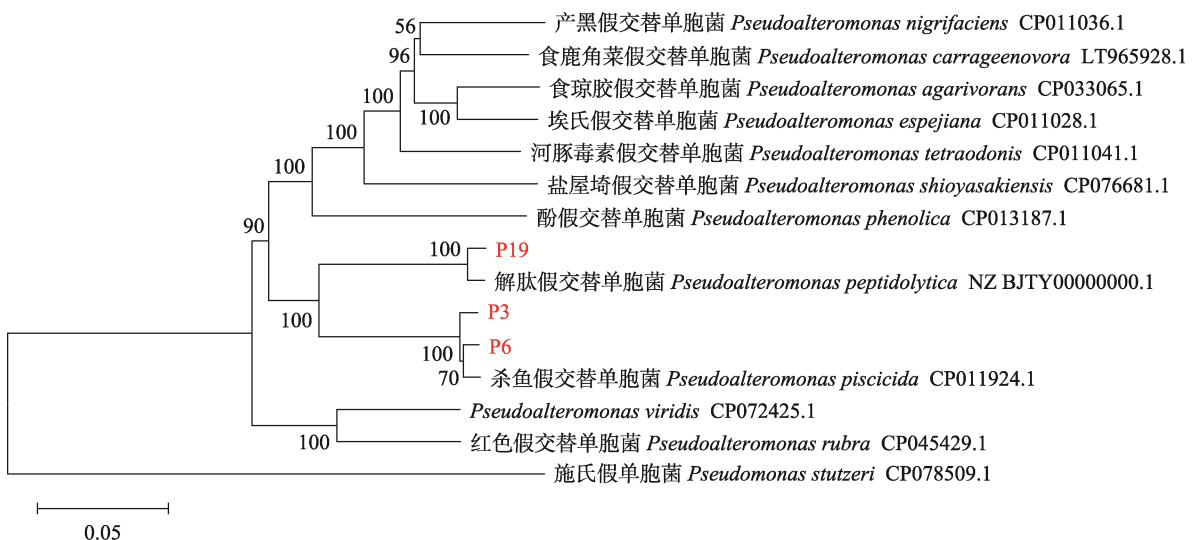


图 5 基于拮抗菌 P3、P6 和 P19 的 16S rRNA-dnaA-dnaN-recA 构建的 N-J 系统发育树

Fig.5 N-J phylogenetic tree based on 16S rRNA-dnaA-dnaN-recA of P3, P6, and P19

通过 16S rRNA 鉴定及多位点序列分析, 将 P3 和 P6 鉴定为杀鱼假交替单胞菌, 将 P19 鉴定为解肽假交替单胞菌。多个研究表明, 从海洋环境分离的假交替单胞菌能分泌具有抗菌、防污、杀藻等作用的活性物质, 包括抗生素、胞外酶类物质和胞外毒素等 (Holmstrom *et al.*, 1999; Egan *et al.*, 2001; Bowman, 2007; 孙星等, 2018; 练小军等, 2020)。大多数的研究报告了抗细菌活性物质的分离和鉴定, 而对抗真菌、抗卵菌的活性物质的报道不多。Moree 等(2014)报道了从健康珊瑚分离的一株假交替单胞菌产生的一种酰胺聚酮具有抗真菌活性; Franks 等(2005)报道了一株 *P. tunicata* 产生的黄色色素具有抗真菌活性, 并鉴定为生物碱。分离自海洋环境的一些杀鱼假交替单胞菌株被证实能够有效拮抗多种病原菌, 包括创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 及枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等 (Richards *et al.*, 2017; Eliseikina *et al.*, 2021); 一些解肽假交替单胞菌具有淀粉酶、几丁质酶、木质纤维素酶活性 (Venkateswaran *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2021)。但这些分离株产生的抑菌物质尚不清楚。在本研究中, 拮抗菌 P3 和 P19 与腐霉相互作用区域的腐霉菌丝出现乳酸棉酚蓝着色浅的情况, 而与 P6 相互作用区域的菌丝无明显变化, 说明 3 株细菌可能通过不同方式抑制腐霉生长。当阳性菌株溶解或死亡时, 乳酸酚棉蓝染色常呈阴性, 说明 P3 和 P19 分泌的活性物质有可能降解了腐霉菌丝或影响菌丝活性, 导致着色变浅。

在水产养殖中, 假交替单胞菌作为益生菌在防治养殖动物的病害中显示了良好的效果 (Fjellheim *et al.*, 2010; Goulden *et al.*, 2012; Offret *et al.*, 2019)。本研究筛选得到的拮抗菌 P3、P6 和 P19, 对引起紫菜赤腐病的致病性腐霉展示了显著的拮抗能力, 显示了其作为益生菌用于防治紫菜赤腐病的生防潜力。在后续的研究中, 我们将开展拮抗菌的安全性评价及其在预防和治疗紫菜赤腐病中的生防效果和应用, 在此基础上探究拮抗菌的活性物质的鉴定及其生防机制。

参 考 文 献

- AKIZUKI A, TABATA M, KAWAMURA Y. Disinfectant effects of lactic acid on *Pythium porphyrae* as acid treatment agent. *Aquaculture Science*, 2007, 55(3): 325–330
- ALZOHAIRY A M. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2011, 2(1): 60–61
- ARASAKI S. Studies on the rot of *Porohyra tenera* by *Pythium*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1947, 13: 74–90
- BEURMANN S, USHIJIMA B, VIDEAU P, *et al.* *Pseudoalteromonas piratica* strain OCN003 is a coral pathogen that causes a switch from chronic to acute *Montipora* white syndrome in *Montipora capitata*. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188319
- BOWMAN J P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 2007, 5(4): 220–241
- EGAN S, HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(4): 1499–1504
- ELISEIKINA M G, BELENEVA I A, KUKHLEVSKY A D, *et al.* Identification and analysis of the biological activity of the new strain of *Pseudoalteromonas piscicida* isolated from the hemal fluid of the bivalve *Modiolus kurilensis* (F. R. Bernard, 1983). *Archives of Microbiology*, 2021, 203(7): 4461–4473
- FARHAOUI A, ADADI A, TAHIRI A, *et al.* Biocontrol potential of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii* diseases on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2022, 119: 101829
- FJELLHEIM A J, KLINKENBERG G, SKJERMO J, *et al.* Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(1/2): 153–159
- FRANKS A, HAYWOOD P, HOLMSTRÖM C, *et al.* Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules*, 2005, 10(10): 1286–1291
- FUJITA Y, MIGITA S. Death of parasitic *Pythium porphyrae* by drying and freeze-preservation of red rot-infected thalli of *Porphyra yezoensis*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Nagasaki University*, 1980, 49: 11–16
- GOULDEN E F, HALL M R, PEREG L L, *et al.* Identification of an antagonistic probiotic combination protecting ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) larvae against *Vibrio owensii* infection. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39667
- HE B P, ZHAO H, LIU H Y, *et al.* Inhibitory effects, growth-promotion evaluation and identification of two biocontrol bacteria against fungal diseases of sesame. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(11): 92–98 [何碧珀, 赵辉, 刘红彦, 等. 2 株芝麻真菌病害生防菌的抑菌特征、促生评价及鉴定. *河南农业科学*, 2019, 48(11): 92–98]
- HE L J. Isolation, identification and detection of two pathogenic oomycetes of *Pyropia*. Master's Thesis of Ocean University

- of China, 2020 [何礼娟. 紫菜两种病原性卵菌的分离鉴定及检测. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30(4): 285–293
- HWANG E K, CHAN S P, KAKINUMA M. Physicochemical responses of *Pythium porphyrae* (Oomycota), the causative organism of red rot disease in *Porphyra* to acidification. *Aquaculture Research*, 2009, 40(15): 1777–1784
- JIANG T, FEI F, FANG T. Research progress on the bioactive components of *Porphyra* and its application. *Food Research and Development*, 2021, 42(21): 162–167 [江涛, 费帆, 方婷. 紫菜生物活性成分及其应用研究进展. 食品研究与开发, 2021, 42(21): 162–167]
- JOHNSON J, CHOI K Y. Enzymatic utilization of oil and lignocellulosic biomass using halophilic marine bacteria *Micrococcus luteus* and *Pseudoalteromonas peptidolytica*. *3 Biotech*, 2021, 11(7): 360
- KIM G H, KLOCHKOVA T A, LEE D J, *et al.* Chloroplast virus causes green-spot disease in cultivated *Pyropia* of Korea. *Algal Research*, 2016, 17: 293–299
- LEE S J, MI S H, PARK M A, *et al.* Molecular identification of the algal pathogen *Pythium chondricola* (Oomycetes) from *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) using ITS and *cox1* markers. *Algae*, 2015, 30(3): 217–222
- LIAN X J, ZHU K L, ZHANG Q Q, *et al.* Effects of probiotics-supplemented diets on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* carrying multiple pathogens. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 121–130 [练小军, 朱开玲, 张庆起, 等. 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. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 121–130]
- MIGITA S. *Olpidiopsis* disease of culture *Porphyra*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Nagasaki University*, 1969, 28: 131–145
- MOREE W J, MCCONNELL O J, NGUYEN D D, *et al.* Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent manner. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(10): 2300–2308
- OFFRET C, ROCHARD V, LAGUERRE H, *et al.* Protective efficacy of a *Pseudoalteromonas* strain in *European Abalone*, *Haliotis tuberculata*, infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 11: 239–247
- PARK C S, HWANG E K. Biochemical characterization of *Pyropia yezoensis*-AP1 strain accompanies the resistance reaction to the red rot disease pathogen, *Pythium porphyrae*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(5): 2149–2156
- PARK C S, HWANG E K. Isolation and evaluation of a strain of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) resistant to red rot disease. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 811–817
- POLNE-FULLER M, GIBOR A. Developmental studies in *Porphyra*. I. blade differentiation in *Porphyra perforate* as expressed by morphology enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *Journal of Phycology*, 1984, 20(4): 609–616
- QIU L P. Isolation, identification and characterization of *Pythium porphyrae* JS151205. Master's Thesis of Ocean University of China, 2018 [邱丽萍. 紫菜腐霉 JS151205 的分离鉴定及生长特性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- RICHARDS G P, WATSON M A, NEEDLEMAN D S, *et al.* Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of vibrios and other bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00175–17
- SAITO Y, MATSUSATO T, YOSHIKAWA K. On the symptoms of "green spot" and "crape" in *Nori (Porphyra)* culture. *Bulletin of Nansei National Fisheries Research Institute*, 1972, 5: 1–9
- SAKAGUCHI K, PARK C S, KAKINUMA M, *et al.* Effects of varying temperature, salinity, and acidity in the treatment of *Porphyra* infected by red rot disease. *Japanese Society for Aquaculture Science*, 2001, 49(1): 77–83
- SINGH R P, KUMARI P, REDDY C R K. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1571–1586
- SINGH R P, MAHENDRA K S, MISHRA A, *et al.* Bacterial extracellular polymeric substances and their effect on settlement of zoospore of *Ulva fasciata*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 103: 223–230
- SINGH R P, REDDY C R K. Seaweed-microbial interactions: Key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(2): 213–230
- STAUFENBERGER T, THIEL V, WIESE J, *et al.* Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(1): 65–77
- STEINBERG P D, DE NYS R, KJELLEBERG S. Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(10): 1935–1951
- SUN X, XIANG Y Y, BEN Z Y, *et al.* Optimization of antimicrobial culture condition of *Pseudoalteromonas*. SW-1. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(33): 96–100 [孙星, 向玉勇, 贲宗友, 等. 假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas*. SW-1 抑菌培养条件的优化. 中国农学通报, 2018, 34(33): 96–100]
- TAKAHASHI M. Identification of genus *Pythium*. *Plant Protection Science*, 1970, 24(8): 339–346
- VENKATESWARAN K, DOHMOTO N. *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(2): 565–574
- WANG D, YANG X, LIU C L, *et al.* Research progress on biological pesticide. *Journal of Green Science and*

- Technology, 2018(24): 179–181 [王丁, 杨雪, 刘春雷, 等. 生物农药研究进展. 绿色科技, 2018(24): 179–181]
- YAN Y W, YANG H C, MO Z L, *et al.* Epiphytic microbial communities associated with *Neopyropia yezoensis* with *Olpidiopsis* disease. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 165–175 [阎永伟, 杨慧超, 莫照兰, 等. 患拟油壶菌病条斑紫菜表面附生菌群分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 165–175]
- YANG H C. Diseases investigation of *Pyropia yezoensis* and development of PCR detection method for *Pyropia yezoensis* green spot disease. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [杨慧超. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)的病害调查及其绿斑病病原的 PCR 检测. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- ZHANG S Y, LIU S R, ZHOU X J, *et al.* Ecological function of seaweed-formed habitat and discussion of its application to sea ranching. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(9): 2004–2014 [章守宇, 刘书荣, 周曦杰, 等. 大型海藻生境的生态功能及其在海洋牧场应用中的探讨. 水产学报, 2019, 43(9): 2004–2014]

(编辑 马璀璨)

Screening and Identification of Antagonistic Bacteria Against *Pythium* Causing Red Rot Disease in *Neopyropia*

WENG Peiwen^{1,2}, YANG Huichao^{1,3}, LI Jie¹, ZHANG Wenbin^{1,3}, YAN Yongwei¹, MO Zhaolan^{1,4}Ⓐ

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Key Laboratory of Tropical Aquatic Germplasm of Hainan Province, Sanya Oceanology Institute, Ocean University of China, Sanya, Hainan 572000, China)

Abstract China is the largest producer of *Neopyropia yezoensis*, ranking first in the world for cultivation area and yield production. In *N. yezoensis* production, diseases occur frequently every year due to increased farming density, environmental deterioration, and germplasm degeneration, resulting in serious economic losses to farmers. Red rot disease is caused by *Pythium* sp. and is one of the most common diseases during *N. yezoensis* farming, leading to empty nets and harvest loss. Air-dry, cold storage, and acid wash are common methods to counteract red rot disease in *N. yezoensis* farming. These physical or chemical disinfection methods, however, are not completely effective, and some have serious consequences. For example, refrigeration equipment and space will greatly increase costs, and acid wash treatments can cause environmental pollution. Although research has attempted to select or cultivate disease-resistant strains of laver, there remains no laver strain completely immune to red rot disease. Biocontrol is an effective method that is widely used in disease control of land crops. Biocontrol is potentially an environment-friendly and effective control method for macroalgal diseases. However, limited information exists on biocontrol in macroalgal diseases. During the growth and development of macroalgae, a variety of metabolites are produced on their surfaces, which provide suitable substrates for microbial colonization. The microbial community attached to the surface of algae is highly diverse and can produce many kinds of biologically active compounds. These compounds not only play a major role in normal morphology, growth, and development of algae, but also have antibacterial, antiviral, antiparasitic, and other activities to protect the host from harmful organisms. Therefore, the epiphytic microorganisms of algae provide good sources of microorganisms for biological screening. This study aimed to screen and identify bacteria with antagonistic ability towards *Pythium* sp.. A total of 385 bacterial strains, isolated from farming algae and their culturing environments, were screened. In the first round of screening, the plate confrontation method was used and repeated twice and confirmed that nine

Ⓐ Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mzl@ouc.edu.cn

strains had antagonistic effects on the growth of *Pythium* sp.. The diameter of the bacteriostatic zone was approximately 1.65–16.54 mm. In the second round of screening, three strains (assigned as P3, P6, and P19) were further investigated using the toxic medium method for inhibitory activities in their extracellular products. Repeated experiments showed that the bacteriostatic rate was approximately 20.04%–30.09%. The antibacterial spectrum was determined by the plate confrontation method. Strains P3, P6, and P19 all had antagonistic effects on the eight tested strains of *Pythium* preserved in our laboratory. The inhibition rates reached 52.09%–97.95% for P3, 26.81%–78.04% for P6, 10.47%–41.91% for P19, respectively. The *Pythium* hyphae on the confrontation edge were further investigated by lactic acid phenol cotton blue staining. When compared with *Pythium* hyphae in a control group, the density and color of *Pythium* hyphae against strains P3 and P19 became sparse and lighter. There were no significant changes in *Pythium* hyphae against strain P6. Strains P3 and P6 were identified as *Pseudoalteromonas piscicida*, and P19 as *P. peptidolytica*, based on 16S rRNA gene identification and multilocus sequences analysis of 16S rRNA-*dnaA-dnaN-recA*. The bacterial strains of P3, P6, and P19 had significant antagonistic capabilities against the pathogenic *Pythium* strains. This indicates they are potential biocontrol probiotics for the control of red rot disease in *N. yezoensis*. The present study provides the foundation for research on the evaluation and application of antagonistic bacterial strains in the biocontrol of red rot disease of *N. yezoensis*.

Key words *Pythium*; Antagonistic bacteria; *Pseudoalteromonas*; Biocontrol

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220207001

http://www.yykxjz.cn/

孙文波, 周明瑞, 侯梦丹, 文露婷, 杜雪松, 翟旭亮, 李虹, 林勇, 罗辉. 稻田和池塘养殖禾花鲤肌肉营养与品质分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 196–204

SUN W B, ZHOU M R, HOU M D, WEN L T, DU X S, ZHAI X L, LI H, LIN Y, LUO H. Comparing the effects of pond and rice field culture methods on muscle quality of rice flower carp. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 196–204

稻田和池塘养殖禾花鲤肌肉营养与品质分析*

孙文波^{1,4} 周明瑞^{1,4} 侯梦丹^{1,4} 文露婷² 杜雪松²
翟旭亮^{3,4} 李虹^{3,4} 林勇^{2①} 罗辉^{1,4①}

(1. 西南大学水产学院 重庆 402460; 2. 广西壮族自治区水产科学研究院 广西 南宁 530021;
3. 重庆市水产技术推广总站 重庆 400020; 4. 重庆市水产科技创新联盟 重庆 400020)

摘要 为评估不同养殖环境对禾花鲤(*Cyprinus carpio*)肌肉营养与品质的影响, 采用国标法检测稻田和池塘 2 种养殖环境下禾花鲤肌肉常规营养成分、质构特性、氨基酸和脂肪酸组成。结果显示, 池塘组禾花鲤肌肉粗蛋白和粗脂肪含量显著高于稻田组($P<0.05$), 水分含量显著低于稻田组($P<0.05$), 灰分含量 2 组差异不显著($P>0.05$); 池塘组肌肉粘性显著高于稻田组($P<0.05$), 内聚性和剪切力显著低于稻田组($P<0.05$), 其他质构指标 2 组间差异不显著($P>0.05$); 肌肉氨基酸测定结果显示, 池塘组氨基酸总量(Σ TAA)、鲜味氨基酸(DAA)、必需氨基酸(EAA)、非必需氨基酸(NEAA)显著高于稻田组($P<0.05$), Σ EAA/TAA 和 Σ EAA/NEAA 显著低于稻田组($P<0.05$), 2 组禾花鲤必需氨基酸构成比例均符合 FAO/WHO 标准; 在鲜味氨基酸含量方面, 池塘组主要的 4 种呈味氨基酸含量均显著高于稻田组($P<0.05$)。根据氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS)标准, 2 组禾花鲤肌肉第一、二限制性氨基酸均分别为色氨酸(Trp)和缬氨酸(Val); 在脂肪酸测定结果中显示, 池塘组单不饱和脂肪酸(Σ MUFA)含量显著高于稻田组($P<0.05$), 但多不饱和脂肪酸(Σ PUFA)、EPA+DHA 和 Σ n-3PUFA/ Σ n-6PUFA 显著低于稻田组($P<0.05$)。综上所述, 池塘和稻田养殖条件下, 禾花鲤均为优质的蛋白质来源, 但不同养殖环境对禾花鲤肌肉营养与品质有显著影响。从常规营养成分、氨基酸评分方面看, 池塘养殖条件下禾花鲤肌肉营养价值更高; 从脂肪酸角度来看, 稻田养殖禾花鲤肌肉具有较高的 EPA+DHA 含量以及 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例, 更适合高血脂和心血管疾病等患者食用, 从质构性来看, 稻田养殖环境下禾花鲤肌肉更具嚼劲。

关键词 禾花鲤; 稻田养殖; 池塘养殖; 肌肉品质

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0196-09

禾花鲤(*Cyprinus carpio*)为鲤科(Cyprinidae)、温水性小型鱼类, 鱼体呈半透明的紫褐色, 鳞细肉嫩, 味道鲜美, 早在乾隆盛世时就成为宫廷“贡品”(蒋云龙等, 2009)。禾花鲤生长快、食性杂、繁殖力和抗病力

强, 常见于广西桂北山区。目前, 普遍认为禾花鲤是一种典型的稻田养殖地方鱼类(汪婷等, 2019), 其主要天然饵料有底栖动物、浮游植物[绿藻(*Chlorophyta*)、金藻(*Chrysophyta*)、硅藻(*Diatom*)、

* 广西科技重大专项(桂科 AA17204095-3)、国家自然科学基金(31960730)、重庆市水产科技创新联盟项目(2022)和生态渔技术体系项目(2020)共同资助。孙文波, E-mail: 2877372196@qq.com

① 通信作者: 林勇, 研究员, E-mail: linnn2005@126.com; 罗辉, 副教授, E-mail: luohui2629@126.com

收稿日期: 2022-02-07, 收修稿日期: 2022-04-07

微藻(Microalgae)等]和浮游动物(卤虫、桡足类无节幼体等)(邱楚雯等, 2018; 彭辉辉, 2019)。

稻田养殖是一种生态循环农业发展的养殖模式, 能有效防治病害、改善水质、改良稻田水体群落, 是国家大力支持发展的一种水产养殖模式(马冬梅等, 2019)。养殖户通过稻田养殖禾花鲤获得了较好的经济效益, 但随着消费者生活水平的不断提高, 稻田养殖禾花鲤已经难以满足市场需求。池塘养殖作为一种传统的人工养殖模式, 也是我国最重要的淡水养殖模式(张婧怡, 2020), 2020年池塘养殖产量占全国淡水养殖鱼的 73.80% (农业农村部渔业渔政管理局, 2020)。改用池塘养殖禾花鲤对其肌肉营养价值是否会产生影响, 目前相关的研究还鲜有报道。另外, 国内外对禾花鲤肌肉品质的研究也较少, 仅有杨四秀等(2009)对全州县稻田禾花鲤的肌肉组分营养价值做了初步分析。因此, 本研究拟通过对稻田和池塘养殖环境下禾花鲤肌肉营养与品质进行科学评估, 以补充常见食用鱼肌肉品质的基础数据, 同时为禾花鲤池塘养殖的推广提供数据资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用禾花鲤由广西农业良种海南南繁育种基地孵化, 选择同一批孵化的禾花鲤幼鱼(2.35 ± 0.08) g 6000 尾, 随机将其分为池塘和稻田(广西绿森生态农业有限公司) 2 个实验组, 密度为 15000 尾/hm², 每组 3 个重复。池塘养殖采用通威饲料有限公司生产的商品饲料(粗蛋白 $\geq 32\%$, 粗脂肪 $\geq 3.0\%$), 日投喂率为体重的 3%, 稻田养殖不投喂, 养殖周期为 12 周。

1.2 样品采集

养殖实验结束后, 禁食 24 h。从稻田养殖组和池塘养殖组中随机捞取 100 尾鱼, 经 MS-222 (Sigma, 美国)麻醉后用干毛巾擦拭鱼体, 测定形体指标, 然后 2 组各随机选取 30 尾剪取背部两侧肌肉。样品保存于 -80°C 冰箱中待测。

1.3 测定方法

采用直接干燥法(GB 5009.3-2016)测定水分含量, 灼烧称量法(GB 5009.4-2016)测定粗灰分含量, 凯氏定氮法(GB 5009.5-2016)测定粗蛋白含量, 索氏提取法(GB 5009.6-2016)测定粗脂肪含量。使用氨基酸自动分析仪(GB/T5009.124-2016)测定氨基酸组成(色氨酸除外), 按照尤晓蒙(2015)所用方法, 碱水解

后用高效液相色谱法测定色氨酸。脂肪酸组成及含量测定参照 GB 5009.168-2016《食品中脂肪酸的测定》的方法进行。

将鱼肉沿肌肉纤维方向切成 $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的块状, 用 TA-XTPlus 质构仪测定肌肉质构指标。测定条件: 探头 P/36R, 模式 TPA, 压缩比 50%, 测前、测中和返回速率均为 1 mm/s, 2 次下压的时间间隔为 5 s, 下压距离 6 mm, 触发力设定 Auto 5 g。每组样品 6 个平行。选取硬度、粘性、弹性、咀嚼性、内聚力、回复性和剪切力 7 个指标进行分析。

1.4 营养价值及肌肉品质的评价方法

根据联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)建议的氨基酸评分标准模式和全鸡蛋蛋白的氨基酸模式进行比较(杨月欣, 2019; 罗辉等, 2021)。蛋白质的氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)和必需氨基酸指数(EAAI)计算公式:

$$\text{AAS} = \text{待评蛋白质氨基酸含量}(\text{mg/g}) / \text{FAO 评分模式氨基酸含量}(\text{mg/g});$$

$$\text{CS} = \text{待评蛋白质氨基酸含量}(\text{mg/g}) / \text{全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量}(\text{mg/g});$$

$$\text{EAAI} = [(100A/AE) \times (100B/BE) \times (100C/CE) \times \dots \times (100H/HE)]^{1/n}$$

式中, n 为比较的必需氨基酸个数, A 、 B 、 C 、 \dots 、 H 为样品中各必需氨基酸含量(mg/g); AE 、 BE 、 CE 、 \dots 、 HE 为全鸡蛋蛋白质相对应的必需氨基酸含量(mg/g)。

1.5 数据处理

所有测定数据采用 Excel 2010 进行整理后用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和独立样本 T 检验, 结果用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。

2 结果与分析

2.1 常规营养成分的比较

本研究选用的实验鱼稻田组体长为(13.56 ± 0.49) cm, 体重为(73.19 ± 7.02) g; 池塘组体长为(14.10 ± 0.23) cm, 体重为(101.20 ± 4.57) g。2 种养殖条件下禾花鲤常规营养成分结果显示(表 1), 2 组禾花鲤肌肉粗蛋白、粗脂肪和水分存在显著差异($P < 0.05$), 粗灰分含量组间差异不显著($P > 0.05$)。其中, 池塘养殖禾花鲤粗蛋白和粗脂肪含量均显著高于稻田养殖禾花鲤($P < 0.05$), 水分含量显著低于稻田养殖组($P < 0.05$)。

表1 2种养殖条件下禾花鲤常规营养成分分析(%湿重)

Tab.1 Analysis of conventional nutrients of rice flower carp in two culture modes (% wet matter)

养殖条件 Breeding mode	水分 Moisture	粗蛋白质 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	粗灰分 Crude ash
稻田养殖 Rice field culture	76.32±0.15 ^b	18.72±0.17 ^a	2.37±0.13 ^a	1.33±0.05
池塘养殖 Pond culture	74.57±0.20 ^a	19.83±0.22 ^b	3.76±0.25 ^b	1.23±0.01

注:小写字母不同代表2种养殖条件存在显著差异($P<0.05$),下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$) between two culture modes. The same as below.

2.2 质构指标的比较

2组禾花鲤肉质构特性显示(表2),池塘禾花鲤肌肉粘性显著高于稻田养殖($P<0.05$),而稻田养殖组内聚性和剪切力显著高于池塘养殖组($P<0.05$)。2种养殖条件下禾花鲤的硬度、弹性、咀嚼性和回复性差异不显著。

2.3 氨基酸组成比较

2种养殖条件下禾花鲤肌肉中18种氨基酸含量测定结果显示(表3),池塘养殖条件下禾花鲤肌肉氨基酸总量(TAA)显著高于稻田禾花鲤。除蛋氨酸、色氨酸无显著差异外,其他6种人体必需氨基酸均为池

塘组显著高于稻田组($P<0.05$)。2种半必需氨基酸、4种鲜味氨基酸均为池塘禾花鲤显著高于稻田禾花鲤($P<0.05$)。但稻田养殖组 $\Sigma EAA/TAA$ 和 $\Sigma EAA/NEAA$ 显著高于池塘养殖组($P<0.05$),而 F 值和 $\Sigma DAA/TAA$ 无显著差异($P>0.05$)。

2.4 肌肉营养价值评估

肌肉营养价值评估结果显示(表4),2种养殖条件下除缬氨酸和色氨酸外,其余必需氨基酸含量均高于FAO/WHO标准;从鸡蛋蛋白标准来看,除赖氨酸外,其余必需氨基酸含量均低于鸡蛋蛋白标准,表明禾花鲤肌肉可作为人体优质的赖氨酸源;根据AAS

表2 2种养殖条件下禾花鲤肉质构指标分析

Tab.2 Analysis of muscle texture indexes of rice flower carp in two culture modes

养殖条件 Breeding mode	硬度 Hardness	粘性 Viscosity	弹性 Elasticity	咀嚼性 Chewiness	内聚性 Cohesion	回复性 Resilience	剪切力 Shear force/gf
稻田养殖 Rice field culture	245.17±16.23	3.67±0.85 ^a	0.42±0.15	64.92±5.44	0.92±0.08 ^b	0.83±0.11	519.33±41.38 ^b
池塘养殖 Pond culture	242.50±17.13	7.93±1.55 ^b	0.48±0.01	64.09±4.72	0.55±0.01 ^a	0.71±0.04	258.01±17.5 ^a

表3 2种养殖条件下禾花鲤肌肉氨基酸组成和含量(%湿重)

Tab.3 Amino acid composition and contents in muscle of Rice flower carp in two culture modes (% wet matter)

氨基酸 Amino acid	稻田养殖 Rice field culture	池塘养殖 Pond culture	氨基酸 Amino acid	稻田养殖 Rice field culture	池塘养殖 Pond culture
天冬氨酸 Asp ^{&}	1.89±0.01 ^a	2.03±0.02 ^b	赖氨酸 Lys [*]	1.75±0.02 ^a	1.85±0.02 ^b
苏氨酸 Thr [*]	0.83±0.02 ^a	0.88±0.01 ^b	精氨酸 Arg [#]	1.04±0.01 ^a	1.18±0.01 ^b
丝氨酸 Ser	0.76±0.01	0.78±0.01	脯氨酸 Pro	0.46±0.01 ^a	0.68±0.01 ^b
谷氨酸 Glu ^{&}	2.77±0.02 ^a	3.07±0.03 ^b	色氨酸 Trp [*]	0.16±0.00	0.16±0.00
甘氨酸 Gly ^{&}	0.82±0.02 ^a	0.94±0.01 ^b	氨基酸总量 TAA	17.19±0.21 ^a	19.00±0.15 ^b
丙氨酸 Ala ^{&}	1.07±0.02 ^a	1.26±0.01 ^b	必需氨基酸 EAA	7.11±0.09 ^a	7.68±0.07 ^b
胱氨酸 Cys	0.16±0.01 ^b	0.11±0.01 ^a	非必需氨基酸 NEAA	8.53±0.10 ^a	9.51±0.07 ^b
缬氨酸 Val ^{*▲}	0.84±0.01 ^a	0.95±0.01 ^b	半必需氨基酸 HEAA	1.55±0.03 ^a	1.81±0.03 ^b
蛋氨酸 Met [*]	0.59±0.02	0.61±0.01	鲜味氨基酸 DAA	6.55±0.07 ^a	7.30±0.05 ^b
异亮氨酸 Ile ^{*▲}	0.79±0.01 ^a	0.86±0.01 ^b	支链氨基酸/芳香族氨基酸 F	1.81±0.01	1.82±0.01
亮氨酸 Leu [*]	1.40±0.02 ^a	1.55±0.01 ^b	$\Sigma EAA/TAA$	0.41 ^b	0.40 ^a
酪氨酸 Tyr [★]	0.60±0.01 ^a	0.65±0.01 ^b	$\Sigma EAA/NEAA$	0.83 ^b	0.81 ^a
苯丙氨酸 Phe ^{*★}	0.76±0.01 ^a	0.83±0.01 ^b	$\Sigma DAA/TAA$	0.38	0.38
组氨酸 His [#]	0.51±0.02 ^a	0.62±0.02 ^b			

注:“*”为必需氨基酸,“#”为半必需氨基酸,“&”为鲜味氨基酸,“▲”为支链氨基酸,“★”为芳香氨基酸。

Note: “*” represents essential amino acids, “#” represents semi-essential amino acids, “&” represents fresh amino acids, “▲” represents branched amino acids, “★” represents aromatic amino acids.

表 4 2 种养殖条件下禾花鲤肌肉必需氨基酸组成评估

Tab.4 Evaluation of essential amino acid composition in muscle of rice flower carp in two culture modes

养殖条件 Breeding mode	指标 Index	苏氨酸 Thr	缬氨酸 Val	蛋氨酸 +胱氨酸 Met+Cys	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	赖氨酸 Lys	苯丙氨酸 +酪氨酸 Phe+Tyr	色氨酸 Trp	必需氨基 酸指数 EAAI	
稻田养殖 Rice field culture	AAS	1.11±0.02	0.91±0.01 ^a	1.13±0.03 ^b	1.05±0.02	1.06±0.02 ^a	1.72±0.02	1.19±0.03	0.91±0.03		
	CS	0.95±0.02	0.68±0.01 ^a	0.64±0.0 ^b	0.79±0.02	0.88±0.01 ^a	1.32±0.02	0.80±0.02	0.55±0.02	79.99±	
	含量 Content	277.60± 5.56	280.93± 4.73 ^a	247.76± 6.24 ^b	262.48± 5.10	468.33± 6.85 ^a	583.49± 7.09	453.29± 9.66	54.26± 1.57	1.29	
	AAS	1.10±0.01	0.96±0.01 ^b	1.03±0.02 ^a	1.09±0.01	1.11±0.01 ^b	1.72±0.02	1.23±0.01	0.85±0.02		
池塘养殖 Pond culture	CS	0.94±0.01	0.73±0.01 ^b	0.59±0.01 ^a	0.82±0.01	0.92±0.01 ^b	1.32±0.02	0.83±0.01	0.52±0.01	80.12±	
	含量 Content	276.14± 3.13	298.54± 3.77 ^b	225.59± 4.46 ^a	272.16± 3.44	489.82± 4.83 ^b	584.34± 7.93	466.18± 4.99	51.02± 1.24	0.86	
	FAO/WHO	/	250.00	310.00	220.00	250.00	440.00	340.00	380.00	60.00	/
	鸡蛋蛋白 Egg protein	/	292.00	411.00	3864.00	331.00	534.00	411.00	565.00	99.00	/

和 CS 评分可知, 2 种养殖条件下禾花鲤第一限制性氨基酸均为色氨酸, 第二限制性氨基酸均为缬氨酸; 2 种养殖条件下禾花鲤肌肉 EAAI 都接近 80。

2.5 脂肪酸成分分析

在禾花鲤肌肉中共检测出 22 种脂肪酸(表 5), 其中, 包含 8 种饱和脂肪酸、5 种单不饱和脂肪酸和 9 种

多不饱和脂肪酸。2 种养殖条件下, 除十三烷酸、十五烷酸、棕榈一烯酸、十七碳一烯酸、二十二碳四烯酸、 $\Sigma n-3PUFA$ 无显著差异($P>0.05$), 其余脂肪酸都存在显著差异($P<0.05$)。池塘养殖禾花鲤肌肉中亚油酸、亚麻酸、花生酸、 $\Sigma n-6PUFA$ 和 $\Sigma PUFA$ 均显著高于稻田养殖组($P<0.05$), 其他脂肪酸则是稻田养殖组显著高于池塘养殖组($P<0.05$)。

表 5 2 种养殖条件下禾花鲤肌肉脂肪酸组成和含量(%)

Tab.5 Fatty acid composition and contents in muscle of rice flower carp in two culture modes (%)

脂肪酸 Fatty acids	稻田养殖 Rice field culture	池塘养殖 Pond culture	脂肪酸 Fatty acids	稻田养殖 Rice field culture	池塘养殖 Pond culture
月桂酸(C12:0)	0.06±0.00 ^b	0.04±0.01 ^a	二十碳二烯酸(C20:2)	0.62±0.00 ^b	0.52±0.01 ^a
十三烷酸(C13:0)	0.24±0.07	0.25±0.02	二十碳三烯酸(C20:3)	0.64±0.01 ^b	0.59±0.01 ^a
豆蔻酸(C14:0)	1.14±0.02 ^b	0.93±0.03 ^a	二十碳四烯酸(C20:4)	0.74±0.01 ^b	0.64±0.03 ^a
豆蔻一烯酸(C14:1)	0.08±0.00 ^b	0.06±0.00 ^a	二十碳五烯酸 EPA (C20:5)	0.17±0.00 ^b	0.13±0.01 ^a
十五烷酸(C15:0)	0.21±0.02	0.16±0.01	二十二碳四烯酸(C22:4)	0.12±0.01	0.14±0.03
棕榈酸(C16:0)	17.75±0.18 ^b	16.06±0.23 ^a	二十二碳五烯酸(C22:5)	0.30±0.01 ^b	0.18±0.01 ^a
棕榈一烯酸(C16:1)	4.12±0.21	3.61±0.14	二十二碳六烯酸 DHA (C22:6)	0.50±0.03 ^b	0.22±0.02 ^a
十七烷酸(C17:0)	0.29±0.01 ^b	0.26±0.01 ^a	饱和脂肪酸总量 ΣSFA	26.48±0.23 ^b	22.52±0.17 ^a
十七碳一烯酸(C17:1)	0.26±0.01	0.26±0.01	单不饱和脂肪酸总量 $\Sigma MUFA$	48.53±0.18 ^b	46.73±0.47 ^a
硬脂酸(C18:0)	6.09±0.14 ^b	4.37±0.12 ^a	多不饱和脂肪酸总量 $\Sigma PUFA$	24.83±0.20 ^a	30.32±0.38 ^b
油酸(C18:1)	42.58±0.10 ^b	41.65±0.44 ^a	EPA+DHA	0.68±0.03 ^b	0.35±0.03 ^a
亚油酸(C18:2)	19.85±0.24 ^a	25.68±0.28 ^b	$\Sigma n-3PUFA$	2.56±0.03	2.56±0.05
亚麻酸(C18:3)	1.88±0.01 ^a	2.21±0.03 ^b	$\Sigma n-6PUFA$	19.85±0.24 ^a	25.68±0.28 ^b
花生酸(C20:0)	0.19±0.00 ^a	0.23±0.01 ^b	$\Sigma n-3PUFA/\Sigma n-6PUFA$	0.13 ^b	0.10 ^a
二十碳一烯酸(C20:1)	1.75±0.03 ^b	1.41±0.07 ^a			

3 讨论

3.1 肌肉基本营养成分

蛋白质和脂肪等营养成分含量对鱼类肌肉营养品质的评价起着重要作用(郑福麟, 1994; 尹洪滨等, 1999)。本研究结果显示, 池塘养殖禾花鲤蛋白质含量(19.83%)、脂肪含量(3.76%)显著高于稻田养殖禾花鲤蛋白含量(18.72%)、脂肪含量(2.37%), 表明禾花鲤是一种低脂蛋白源, 且池塘养殖条件下禾花鲤肌肉营养价值更高。本研究在脂肪含量方面与马冬梅等(2018)对稻田和池塘养殖华南鲤肌肉营养成分比较分析中的结果一致, 但与叶香尘等(2020)对池塘和稻田养殖模式下金边鲤(*Cyprinus carpio* var. Jinbian)和建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)肌肉品质的研究结果不同, 产生差异的原因可能除了与品种有关之外, 还与实验条件有关。本研究中, 稻田养殖禾花鲤脂肪含量低的原因可能是 2 种养殖模式下的饵料组成差异大, 稻田养殖采用粗放式非投喂养殖模式, 主要以藻类等天然饵料为食, 而池塘投喂人工全价饲料, 其营养价值更加丰富, 有利于肌肉沉积脂肪(黄世蕉等, 1992)。另外, 也有可能是稻田养殖环境更接近自然环境, 未进行人工投喂, 需要禾花鲤消耗更多能量寻找食物, 增加运动量, 促进脂肪的代谢, 导致鱼体脂肪含量低(朱志明, 2014; 熊铭等, 2016)。宋红梅等(2020)研究表明, 鱼肉中的脂肪含量在 3.5%~4.5%为宜。稻田养殖的禾花鲤脂肪含量(2.37%)过低, 而池塘养殖禾花鲤脂肪含量(3.76%)适宜, 因此, 池塘养殖禾花鲤在肌肉营养方面更具优势, 同时, 要想提高稻田禾花鲤肌肉营养品质可以适当地在稻田养殖环境中投喂配合饲料。

3.2 质构特性分析

质构是目前用于评价水产品肉质最广泛的方法之一。质构仪模拟食物被咀嚼过程, 把质地感官知觉与力学性能、几何特性相结合, 通过形成一系列数据客观评价食物的品质特性(Cheng *et al.*, 2014; 赵何勇等, 2018)。剪切力主要是模拟牙齿切割肌纤维的方式对样品进行一次切割, 再通过电脑输出测试曲线进行分析, 在一定范围内其剪切力越高, 口感越好。而内聚力反映的是肌肉细胞间结合力大小。粘性是鱼肉在外力作用下流动性的反映, 粘性越低, 则内聚力越高, 其口感更好(王俏仪等, 2011)。研究表明, 鱼肉的质构特性受肌肉脂肪含量和运动情况的影响(董立学等, 2021)。肌肉中粗脂肪含量降低时促使肌束间的摩擦力增大, 从而使肌肉的咀嚼性增强, 肌肉中低脂肪含

量可以促使肌束间的摩擦力增大, 增大咀嚼性(Johnston *et al.*, 2004)。另外, 稻田更接近自然水域环境, 禾花鲤运动强度大, 引起肌纤维直径变小、密度变大, 从而改善禾花鲤口感(刘婧懿等, 2020)。本研究中, 稻田养殖条件下禾花鲤肌肉内聚力和剪切力显著高于池塘组, 而肌肉粘性显著低于池塘养殖, 再结合稻田养殖禾花鲤脂肪含量显著低于池塘养殖, 可以得出稻田养殖环境下禾花鲤肉质更具嚼劲。

3.3 氨基酸组成及其营养价值评估

蛋白质的营养价值由氨基酸种类、组成、比例及必需氨基酸的含量共同决定(Buchtova *et al.*, 2009)。本研究中, 2 种养殖条件下禾花鲤的 Σ EAA/TAA 均高于 40%, Σ EAA/NEAA 都在 80%以上, 均符合 FAO/WHO 建议的优质蛋白质模式标准(陈涛等, 2016)。结合 AAS 和 CS 可以看出, 2 种养殖条件下色氨酸均为第一限制性氨基酸, 缬氨酸为第二限制性氨基酸。但池塘养殖条件下缬氨酸含量显著高于稻田组, 说明池塘养殖可在一定程度上增加限制性氨基酸含量, 提升蛋白质营养价值。EAAI 表示样品中必需氨基酸含量与标准蛋白质的相符程度, 常用于评价食物营养价值高低。本研究中, 禾花鲤在 2 种养殖条件下肌肉 EAAI 都在 80 分左右, 这与鸡蛋蛋白中相对应必需氨基酸的含量相接近, 表明其可以作为一种优质的蛋白质来源, 且不受养殖环境影响。

肌肉中的鲜味氨基酸主要有谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和天冬氨酸等 4 种, 其含量的高低决定了鱼肉的鲜美程度(钟鸿干等, 2017)。本研究中, 池塘养殖下的禾花鲤鲜味氨基酸的总量显著高于稻田组, 而肌肉脂肪含量决定着肌肉的多汁性和风味浓度, 结合池塘养殖环境下禾花鲤肌肉脂肪含量高于稻田养殖环境禾花鲤, 表明池塘养殖禾花鲤的鲜味更好, 但鱼体的鲜美程度除了受呈味氨基酸等风味前体物的影响, 还受其他挥发性风味物质的影响。因此, 全面了解鱼肉品质的鲜美程度需从其他风味物质方面进行进一步研究。

3.4 脂肪酸组成分析

脂肪酸的种类和含量往往决定着鱼肉的营养和商业价值(常玲玲, 2011)。单不饱和脂肪酸具有调节血脂、血压、葡萄糖水平, 增加胰岛素敏感性, 预防肥胖, 降低心血管疾病、胆固醇、代谢综合征风险, 防治冠心病等生理功能(Gillingham *et al.*, 2011)。多不饱和脂肪酸对中枢神经和视神经具有保健作用, 尤其对神经系统的抗肿瘤功能以及对精神疾病的防治具有

很大作用(崔和平等, 2012)。较高的多不饱和脂肪酸可以增加肌肉的鲜香味, 能够反映出肌肉的多汁性(徐革锋等, 2013)。本研究中, 池塘养殖禾花鲤多不饱和脂肪酸(30.32%)显著高于稻田禾花鲤(24.83%), 与池塘养殖禾花鲤肌肉的风味和口感好于稻田养殖的结果一致。多不饱和脂肪酸主要分为 n-3 和 n-6 2 个系列, 二者相互协调、相互制约, 共同调节人体的生命活动。本研究结果显示, 池塘养殖条件下 n-6 系列多不饱和脂肪酸含量显著高于稻田养殖, 可能与池塘养殖的禾花鲤摄食的配合饲料中含有 n-6 多不饱和脂肪酸的植物性油脂(如大豆油)有关。n-3 系列中的 EPA 和 DHA 在促进儿童智力发育、降低血液甘油三酯含量、抗肿瘤等方面具有重要作用(Manson *et al.*, 2019; Mozaffari *et al.*, 2020)。本研究结果发现, 稻田养殖条件下 EPA+DHA 含量显著高于池塘养殖条件, 这可能与禾花鲤主要摄食藻类有关。研究发现, 稻鲤综合种养条件下, 水体含有大量硅藻、金藻, 它们可为禾花鲤提供丰富的 DHA 和 EPA (曾蓓蓓等, 2014; 彭辉辉, 2019; 刘晓璐等, 2022)。较高的 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例更能有效降低血脂、抑制血小板凝集、降低心血管疾病的发病率(Kalscheur *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2014), WHO 推荐日常膳食比为 0.17~0.25 (蒋瑜等, 2016), 稻田养殖条件下 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例(0.13)显著高于池塘养殖(0.1), 但 2 种养殖条件下, n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例均小于 0.17, 饵料组成和养殖条件或许在一定程度上可调节 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例, 因此, 提高禾花鲤肌肉 n-3PUFA 含量是改善禾花鲤肌肉品质的关键。

4 结论

禾花鲤在 2 种养殖环境下肌肉基本营养成分存在显著性差异, 但都可作为优质的低脂蛋白源; 池塘养殖环境下禾花鲤肌肉常规营养成分、总氨基酸含量及鲜味氨基酸含量高于稻田养殖模式, 说明池塘养殖环境下禾花鲤肌肉营养价值更高、鲜味更好。从质构性来看, 稻田养殖禾花鲤肌肉更具嚼劲。从脂肪酸含量角度看, 稻田养殖环境下禾花鲤肌肉 EPA+DHA 含量、单不饱和脂肪酸和 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸比例显著高于池塘养殖, 说明食用稻田养殖禾花鲤能更有效预防心血管疾病的发生。上述结果表明, 池塘养殖环境并不会降低禾花鲤肌肉常规营养成分、氨基酸和脂肪酸等营养价值。为缓解禾花鲤市场需求量大的问题, 可以推广池塘养殖禾花鲤。

参 考 文 献

- BUCHTOVA H, SVOBODOVA Z, KOCOUR M, *et al.* Amino acid composition in fillets of mirror crossbreeds common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). *Acta Veterinaria Brno*, 2009, 78(2): 337-344
- Bureau of Fishery and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Extension Station, China Fisheries Society. 2020 China fisheries statistics yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [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. 2020 年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- CHANG L L. Variation of fatty acids in Chinese Holstein milk and its association analysis with fatty acid synthesis-related genes. Master's Thesis of Yangzhou University, 2011 [常玲玲. 中国荷斯坦牛乳中脂肪酸变化规律及其与脂肪酸合成相关基因的关联分析. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2011]
- CHEN T, LI W F. Analysis of muscle nutrient composition of red snapper. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(6): 67-72 [陈涛, 李伟峰. 红鳍笛鲷肌肉营养成分分析. 海洋湖沼通报, 2016(6): 67-72]
- CHENG J H, SUN D W, HAN Z, *et al.* Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(1): 52-61]
- CUI H P, GUO X F. Research progress of polyunsaturated fatty acids on human nervous system health care. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science)*, 2012, 33(3): 97-102 [崔和平, 郭兴凤. 多不饱和脂肪酸对人体神经系统保健作用研究进展. 河南工业大学学报(自然科学版), 2012, 33(3): 97-102]
- DONG L X, YU Y L, MAO T, *et al.* Analysis of muscle quality variations of *Ictalurus punctatus* reared in internal-circulation pond aquaculture. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(7): 914-924 [董立学, 喻亚丽, 毛涛, 等. 池塘内循环流水养殖斑点叉尾鲷肌肉品质的分析. 中国水产科学, 2021, 28(7): 914-924]
- GILLINGHAM L G, HARRIS J S, JONES P J H. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, 2011, 46(3): 209-228
- HUANG S J, HUANG Q Y. Effects of feeding green feed and additives on growth and fat metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(1/2): 20-26 [黄世蕉, 黄琪琰. 投喂青料和添加剂对草鱼生长和脂肪代谢的影响. 上海水产大学学报, 1992, 1(1/2): 20-26]
- JIANG Y L, YAN X Q. Talking about the history, current situation and industrialization of farming of graminaceae in rice fields in Quanzhou County. *Fisheries Getting Rich*

- Guide, 2009(16): 20–21 [蒋云龙, 闫晓琼. 浅谈全州县稻田养殖禾花鱼的历史、现状及如何向产业化发展. 渔业致富指南, 2009(16): 20–21]
- JIANG Y, XIONG W K, YIN J L, *et al.* Research progress of dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid intake and cardiovascular health. *Crop and Oils*, 2016, 29(11): 1–5 [蒋瑜, 熊文珂, 殷俊玲, 等. 膳食中 ω -3 和 ω -6 多不饱和脂肪酸摄入与心血管健康的研究进展. 粮食与油脂, 2016, 29(11): 1–5]
- JOHNSTON I A, MANTHRI S, BICKERDIKE R. Growth performance, muscle structure and flesh quality in out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts reared under two different photoperiod regimes. *Aquaculture*, 2004, 237(1/2/3/4): 281–300
- KALSCHUR K F, TETER B B, PIPEROVA L S, *et al.* Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C-18: 1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(9): 2104–2114
- LIU J Y, ZHAO Q C, CHENG S F, *et al.* Research progress on the influencing factors and determination methods of fish muscle texture. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(9): 3035–3043 [刘婧懿, 赵前程, 程少峰, 等. 鱼肉质构的影响因素及测定方法研究进展. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(9): 3035–3043]
- LIU X L, SUN Z, ZHOU Z G. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for PUFA production and delivery to *Artemia* sp. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(6): 1373–1381 [刘晓璐, 孙净, 周志刚. 微藻异养/兼养生产多不饱和脂肪酸以及向卤虫的传递. 上海海洋大学学报, 2022, 31(6): 1373–1381]
- LUO H, CHEN L T, JING T S. Muscle nutrition analysis of four snail species. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(11): 2177–2185 [罗辉, 陈李婷, 敬庭森. 田螺科四种螺的肌肉主要营养成分. 水产学报, 2022, 46(11): 2177–2185]
- MA D M, ZHU H P, HUANG Z H, *et al.* Comparative analysis of nutrient composition in the muscles of South China carp cultured in rice fields and ponds. *Southern Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 49(12): 2518–2524 [马冬梅, 朱华平, 黄樟翰, 等. 稻田和池塘养殖华南鲤鱼肌肉营养成分比较分析. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2518–2524]
- MA D M, ZHU H P, Huang Z H, *et al.* Morphological characteristics and genetic analysis of the rice flower carp in the northern region of Guangdong Province. *Progress in Fishery Science*, 2019, 40(2): 33–42 [马冬梅, 黄樟翰, 朱华平, 等. 广东粤北地区禾花鱼的形态特征及遗传学分析. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 33–42]
- MANSON J E, COOK N R, LEE I M, *et al.* Marine n-3 fatty acids and prevention of cardiovascular disease and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 380(1): 23–32
- MONTEIRO J, LESLIE M, MOGHADASIAN M H, *et al.* The role of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Food and Function*, 2014, 5(3): 426
- MOZAFFARI H, DANESHZAD E, LARIJANI B, *et al.* Dietary intake of fish, n-3 polyunsaturated fatty acids, and risk of inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(1): 1–17
- PENG H H. A comparative study of rice-fish ecosystem and rice-monoculture ecosystem. Master's Thesis of Tianjin Agricultural University, 2019 [彭辉辉. 稻田养鱼与常规稻田耕作模式生态系统比较研究. 天津农学院硕士研究生学位论文, 2019]
- QIU C W, WANG H X. Research progress of bait algae. *Aquatic Science and Technology Information*, 2018, 45(3): 127–132 [邱楚雯, 王韩信. 饵料藻类的研究进展. 水产科技情报, 2018, 45(3): 127–132]
- SONG H M, QU Z W, WANG X J, *et al.* Analysis and assessment for nutritional components of the muscle of *Datnioides pulcher*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 41(5): 177–184 [宋红梅, 屈政委, 汪学杰, 等. 印尼拟松鲷肌肉营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 177–184]
- WANG Q Y, DONG Q, LU S X, *et al.* The effect of frozen storage on the texture properties of tilapia muscle. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(4): 86–90 [王俏仪, 董强, 卢水仙, 等. 冷冻贮藏对罗非鱼肌肉质构特性的影响. 广东海洋大学学报, 2011, 31(4): 86–90]
- WANG T, HUANG K, SUN L L, *et al.* Nutrient composition analysis and safety evaluation of Hehua carp muscle. *Southern Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 50(7): 1579–1586 [汪婷, 黄凯, 孙琳琳, 等. 禾花鲤肌肉营养成分分析与安全性评价. 南方农业学报, 2019, 50(7): 1579–1586]
- XIONG M, WU Z L, LIN X D. Analysis of the quality characteristics of the fish meat of different farming models of rock seabream. *Food Science*, 2016, 37(3): 17–21 [熊铭, 吴祖亮, 林向东. 不同养殖模式斑石鲷的鱼肉品质特性分析. 食品科学, 2016, 37(3): 17–21]
- XU G F, WAN Y Y, BAI Q L, *et al.* Analysis of nutritional components and quality evaluation of cod muscle. *Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(12): 3027–3032 [徐革锋, 王裕玉, 白庆利, 等. 江鳕肌肉营养成分分析与品质评价. 动物营养学报, 2013, 25(12): 3027–3032]
- YANG S X, JIANG A Q. Analysis of the meat content and muscle nutrients of *Cyprinus carpio*. *Journal of Hydroecology*, 2009, 30(2): 154–157 [杨四秀, 蒋艾青. 禾花鲤含肉率与肌肉营养成分分析. 水生态学杂志, 2009, 30(2): 154–157]
- YANG Y X. The first two volumes of the 6th edition of the Standard Edition of the Chinese Food Composition Table were published. *Chinese Journal of Nutrition*, 2019, 41(5): 426 [杨月欣. 《中国食物成分表》标准版第 6 版第一二册

- 出版. 营养学报, 2019, 41(5): 426]
- YE X C, ZOU H, LIU K, *et al.* The effect of pond and paddy field culture on the muscle quality of Jinbian carp and Jian carp. *Journal of Fisheries*, 2020, 44(8): 1296–1305 [叶香尘, 邹辉, 刘康, 等. 池塘和稻田养殖模式对金边鲤和建鲤肌肉品质的影响. *水产学报*, 2020, 44(8): 1296–1305]
- YIN H B, SHI L Y, LI L K. An analysis of the nutritive composition in muscle of *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Chinese Journal of Fisheries*, 1999, 12(1): 54–57 [尹洪滨, 石连玉, 李丽坤. 方正银鲫肌肉营养成分分析. *水产学杂志*, 1999, 12(1): 54–57]
- YOU X M. Study on the HPLC method for the determination of amino acids in feed. Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2015 [尤晓蒙. 饲料中氨基酸的 HPLC 检测方法研究. 河北农业大学硕士研究生学位论文, 2015]
- ZENG B B, HUANG X X, WEI L K, *et al.* Suitable culture conditions and cellular biochemical composition of three diatoms from brackish water. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 320–328 [曾蓓蓓, 黄旭雄, 危立坤, 等. 3 种半咸水硅藻的适宜培养条件及其细胞生化成分. *海洋渔业*, 2014, 36(4): 320–328]
- ZHANG J Y. Analysis and study on the gut microbimes of tilapia in different species and culture environment. Master's Thesis of Guangxi University, 2020 [张婧怡. 不同品种及不同养殖环境的罗非鱼肠道微生物分析研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2020]
- ZHAO H Y, CHEN Z, XU H F, *et al.* Analysis of nutrient composition and quality characteristics of Guam red tilapia from seawater and freshwater culture. *Southern Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 49(7): 1396–1402 [赵何勇, 陈诏, 徐鸿飞, 等. 海水和淡水养殖关岛红罗非鱼肌肉营养成分及品质特性分析. *南方农业学报*, 2018, 49(7): 1396–1402]
- ZHENG F L. A study on nutrition and physiological function of aquatic products. *Modern Fisheries Information*, 1994, 9(6): 16–19 [郑福麟. 关于水产品的营养与生理功能的探讨. *现代渔业信息*, 1994, 9(6): 16–19]
- ZHONG H G, MA J, JIANG F Y, *et al.* Comparative study on nutritive components and flesh quality of muscles of *Oplegnathus punctatus* cultivated under two different culture models. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(1): 155–158 [钟鸿干, 马军, 姜芳燕, 等. 2 种养殖模式下斑石鲷肌肉营养成分及品质的比较. *江苏农业科学*, 2017, 45(1): 155–158]
- ZHU Z M. Research of carbohydrate and lipid metabolism in muscles and liver in *Barbodes schwanenfeldi* during exercise training. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2014 [朱志明. 运动训练下多鳞四须鲃(*Barbodes schwanenfeldi*)肌肉和肝脏糖、脂代谢研究. 暨南大学博士研究生学位论文, 2014]

(编辑 陈 辉)

Comparing the Effects of Pond and Rice Field Culture Methods on Muscle Quality of Rice Flower Carp

SUN Wenbo^{1,4}, ZHOU Mingrui^{1,4}, HOU Mengdan^{1,4}, WEN Luting²,
DU Xuesong², ZHAI Xuliang^{3,4}, LI Hong^{3,4}, LIN Yong^{2①}, LUO Hui^{1,4①}

(1. College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 402460, China; 2. Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Chongqing Fishery Technology Extension Station, Chongqing 400020, China; 4. Chongqing Aquatic Science and Technology Innovation Alliance, Chongqing 400020, China)

Abstract Rice flower carp (*Cyprinus carpio rubrofusculus*) has high economic value because of its tender meat. However, a comprehensive scientific evaluation of the meat quality and nutritional value of rice flower carp is still needed. At the same time, because of its fast growth and strong disease resistance, rice flower carp is widely popularized in rice field culture but without any research comparing its quality with the pond culture method. Although rice farming has high ecological value, the fish yield is low and its specifications are abnormal, which cannot guarantee the stability and safety of the commercial fish supply and limit the potential rice flower carp industrial benefits. In addition, some studies have shown that fish muscle quality can be affected by environmental conditions. This study aimed to

① Corresponding author: LIN Yong, E-mail: linnn2005@126.com; LUO Hui, E-mail: luohui2629@126.com

comprehensively evaluate the muscle quality and nutritional value of the rice flower carp and investigate the relationships between the nutritional values and its culture conditions, providing data to increase the rice flower carp yield, economic efficiency, and farmed varieties available. Therefore, 6 000 Quanzhou rice flower carp (2.35 ± 0.08 g) were randomly divided into ponds and rice field groups for the experiment (three replicates per group, with a density of $15\ 000/\text{hm}^2$). The pond culture group was fed with 3% of the commercially established everyday food per fish weight, while the rice field group was not fed. After 12 weeks, the fish were submitted to a 24 h period without food and anesthetized using MS-222 (USA, Sigma). The length and weight of 100 fish were measured for each treatment. For the rice field group and pond group, respectively, the lengths were (13.56 ± 0.49) cm and (14.10 ± 0.23) cm, and the weights were (73.19 ± 7.02) g and (101.20 ± 4.57) g. The muscle quality of 30 fish from each treatment was measured, including basic nutritional components, texture characteristics, and amino acid and fatty acid compositions. The nutritional level was compared between the pond and rice field groups using the FAO/WHO amino acid score, whole egg protein comparison, protein amino acid score (AAS), chemical score (CS), and essential amino acid index (EAAI). Moreover, no significant differences between the two culture methods were observed in relation to the total ash ($P>0.05$). The crude protein and crude fat contents in the rice field group were significantly lower than in the pond group ($P<0.05$), while moisture was significantly higher ($P<0.05$). The viscosity of the rice field group was significantly lower than that of the pond group ($P<0.05$), but the cohesion and shear force were significantly higher than those of the pond group ($P<0.05$). There was no significant difference in the other texture indexes ($P>0.05$). Essential amino acids (EAA) in both groups met the FAO/WHO standard. Among the 18 amino acids measured, the total amino acids (TAA), delicious amino acids (DAA), essential and nonessential amino acids (NEAA) were significantly lower in rice field conditions than in pond ($P<0.05$), while the EAA/TAA and EAA/NEAA ratios were significantly lower in the pond group ($P<0.05$). According to the amino acid score (AAS) and chemical score (CS), glutamic acid (Glu) was the most common amino acid in both groups, while the first and second limiting amino acids were tryptophan (Trp) and valine (Val). Among the 22 fatty acids observed, the contents of tridecanoic, pentadecanoic, palmitoleic, heptadecanoic, and docosatetraenoic acids were not significantly different between the two groups ($P>0.05$). In contrast, the contents of linoleic, linolenic, and arachidonic acids in the pond group were significantly higher than those in the rice field group ($P<0.05$), while 14 other fatty acids showed significantly lower contents in the pond group ($P<0.05$). The monounsaturated fatty acid (MUFA) contents in the pond group were significantly higher ($P<0.05$), while the EPA+DHA and n-3PUFA/n-6PUFA were significantly lower than those in the rice field group ($P<0.05$). Overall, the contents of four main flavor amino acids (glutamic acid, glycine, alanine, and aspartic acid) in the rice field group were significantly lower than those in the pond group ($P<0.05$). In conclusion, rice flower carp reared in both pond and rice field is a high-quality protein source. However, different cultural environments significantly influence the rice flower carp muscle nutritional value and quality, wherein a higher nutrient composition and amino acid score were observed in the pond environment. Concerning the fatty acids content, the muscle of rice flower carp reared in rice fields had higher EPA+DHA content and N-3/N-6 polyunsaturated fatty acid ratio, which is more suitable for people with hyperlipidemia and cardiovascular diseases. In addition, in terms of texture, the muscle of rice flower carp is chewier under the rice field rearing condition. Nevertheless, N-3PUFA shortages were observed in both culture conditions. Besides, fish in the pond group had better muscle nutrition than the rice field group. Different culture conditions can change rice flower carp's fatty acid composition and content to a certain extent, but none of the two conditions tested here could completely allay the lower N-3PUFA problem. Therefore, increasing the N-3PUFA content of rice flower carp is the key to improving its nutritional value, and pond culture conditions make this process easier to be manually controlled.

Key words Rice flower carp; Rice field culture; Pond culture; Muscle quality

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210924002

http://www.yykxjz.cn/

苏丽, 李欣, 高瑞昌. 食盐添加对乌鳢鱼头汤熬煮过程营养物质溶出与微纳米颗粒稳定性的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 205-213

SU L, LI X, GAO R C. Effect of the time of NaCl addition on nutrient migration and micro and nanoparticles of *Channa argus* head soup. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 205-213

食盐添加对乌鳢鱼头汤熬煮过程营养物质 溶出与微纳米颗粒稳定性的影响*

苏丽^{1,2} 李欣¹ 高瑞昌¹ 

(1. 江苏大学食品与生物工程学院 江苏 镇江 212013;

2. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒产业园区管理委员会 宁夏 银川 753000)

摘要 在鱼头汤熬制过程中, 食盐添加后会与汤中物质发生相互作用, 进而影响产品品质。本文研究了 NaCl 添加时机对乌鳢(*Channa argus*)鱼头汤中营养物质迁移以及微纳米颗粒(micro and nano particles, MNPs)稳定性的影响。结果表明, 鱼头汤加盐前的熬煮时间和加盐后 Na⁺、Cl⁻与各组分间的相互作用对物质的迁移具有重要影响, 同时还会影响体系中微纳米颗粒形成, 并最终影响体系的稳定性。在熬煮至 60 min 时加盐时机最佳。此条件下制得的汤中营养物质和呈味物质的溶出和迁移达到最大程度, 所形成的微纳米颗粒为大小均匀的双层球状小颗粒, 甘油三酯自组装形成球形颗粒, 蛋白质分子分散在其周围或与之结合附着在表面, 体系呈现出良好的稳定性。研究结果可以为乌鳢鱼头汤制品的生产提供参考。

关键词 乌鳢鱼头汤; 食盐添加时机; 营养物质迁移; 微纳米颗粒

中图分类号 S985.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0205-09

乌鳢(*Channa argus*)是鳢科(Channidae)、鳢属(*Channa*)鱼类, 是一种备受欢迎、市场价值高的淡水鱼(Sahid *et al.*, 2018; Zubaidah *et al.*, 2015)。乌鳢富含优质蛋白质, 目前对其利用以鱼片产品加工为主, 而鱼头、鱼骨等加工副产物利用率较低, 不仅造成了资源的浪费, 还可能污染环境。陈飞东等(2013)研究发现, 乌鳢鱼头富含 Ca、Fe、Cu、P 等矿物质元素, 氨基酸组成丰富, 必需氨基酸比例较高, 还含有丰富的磷脂和不饱和脂肪酸。我国素有熬制鱼头汤的饮食习惯, 其味道鲜美, 深受消费者喜爱。因此, 将乌鳢鱼头加工成鱼头汤制品, 不仅具有较好的营养和食疗作用, 还能满足人们的饮食需求, 市场前景广阔。在鱼汤熬

制工艺方面, 除了加热方式、熬煮时间以外, 在熬制中添加的调味料也是一个重要的因素。食盐是人们饮食中膳食钠摄入的主要来源, 食盐的添加会影响汤在熬煮过程中的各营养物质的含量及产品品质, 而目前对这方面的研究还较少。另外, 随着现代食品胶体研究技术的发展, 汤中微纳米颗粒(micro and nano particles, MNPs)的形成机制与功效成分的生物学效应引起了科研人员的关注。

本研究阐述了乌鳢鱼头汤加工工艺中的食盐添加对各营养物质溶出规律的影响, 并分析了汤中 MNPs 的微观结构及其对体系稳定性的影响, 以为新型鱼汤产品的工业化、标准化生产提供参考。

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-46)资助。苏丽, E-mail: suli198606@163.com

① 通信作者: 高瑞昌, 教授, E-mail: xi yuan2008@ujs.edu.cn

收稿日期: 2021-09-24, 收修改稿日期: 2021-10-29

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜乌鳢购于江苏省镇江市吉麦隆超市,宰杀后取鱼头,捣碎备用;食盐(食品级),江苏省盐业集团公司;核苷酸标准品,上海碧云天生物技术有限公司;福林酚试剂、浓硫酸、NaOH、KOH、三氯乙酸(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;尼罗红,阿拉丁试剂(上海)有限公司;Fast Green FCF,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

UV1601 紫外分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;数显恒温水浴锅,江苏省常州市亿能实验仪器公司;Eppendorf AC22331 Hamburg 离心机,德国艾本德股份公司;激光共聚焦显微镜,德国蔡司股份公司;CR-400 色度计,日本柯尼卡美能达;LC-20AD 高效液相色谱,日本岛津公司;S-433D 全自动氨基酸分析仪,德国 Sykam 公司;手持式数显糖度计 PAL-1,日本 ATAGO 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乌鳢鱼头汤的制备 取 1.1 制备的鱼头原料,用料酒和少量姜块腌制 30 min,沥干备用。锅内放入约 50 mL 大豆油,放入鱼头(250±5) g 煎炸 50 s 至鱼头变色,转入汤锅中加水(料液比为 1:6)大火(98℃)熬煮 30 min,然后转小火(90℃)熬制,分别在熬煮至 0、30、60、90、120 和 150 min 时添加 1% (w/v)的食盐,总熬煮时间为 150 min,起锅后除去上层的油层,选取下层的鱼汤进行后续分析。在整个熬煮过程中由于水分蒸发,最终汤的体积约为最初加水体积的 45%。

1.3.2 水溶性蛋白测定 采用福林酚法进行测定(Lowry *et al.*, 1951)。用牛血清白蛋白标准溶液制作标准曲线,结果以 g/100 mL 表示。

1.3.3 总糖测定 采用苯酚-硫酸法(Cheng *et al.*, 2019),并做适当修改。取 5 mL 样品于离心管,加入 2 mL 10%的苯酚溶液沉淀蛋白质,10 min 后离心(4000 r/min, 15 min)。收集上清液,取 1 mL 加入 1 mL 苯酚(5%),然后缓慢加入浓硫酸,轻轻摇晃,于室温下反应 20 min,冷却后在 470 nm 下测定吸光值。结果以 mg/100 mL 表示。

1.3.4 灰分测定 取 3 mL 鱼头汤样品于坩埚中,用小火烧至无烟后放入马弗炉中加热 4~6 h,冷却后放入干燥器中称重。结果以 g/100 mL 表示。

1.3.5 固形物含量测定 可溶性固形物含量采用手持式数显糖度计测定。

1.3.6 核苷酸测定 参考 Qiu 等(2016)的方法。取 5 mL 样品和 10 mL 高氯酸(10%)混合 2 min,超声 10 min 后离心 30 min (8000 r/min, 4℃)并收集上清液,如此重复 2 次,最后用 NaOH 将上清液 pH 调至 6.0。静置后取上清液并用超纯水稀释至 50 mL,用尼龙注射器过滤,收集于棕色瓶中,用高效液相色谱仪分析。

1.3.7 游离氨基酸测定 参照 Tanimoto 等(2013)的方法。将 2 mL 样品和 15 mL 三氯乙酸混合,超声处理 10 min 后静置 1 h。然后离心 10 min (10 000 r/min, 4℃),取 5 mL 上清液调节 pH 至 2.0,加水定容至 10 mL。过滤后收集到棕色进样瓶中。采用全自动氨基酸分析仪进行检测。

1.3.8 色度的测定 用色度计测定。 L^* 为亮度, a^* 值表示从绿色(-)到红色(+)的变化, b^* 值表示从蓝色(-)到黄色(+)的变化(李钊, 2010; 王楠, 2013)。

1.3.9 微观结构观察 用 80 目漏勺过滤除去汤中的悬浮物,然后取 20 μ L 样品置于灭菌载玻片上,用光学显微镜观察不同样品中胶粒的形态特征。参考 Lopez 等(2011)的方法,用激光扫描共聚焦荧光显微镜(LCSM)观察汤样中 MNPs 的形态结构及分布,采用 63 \times /1.40 油镜成像,氩激光器激发波长为 488 nm,He-Ne 激光器为 543 nm。

1.3.10 鱼头汤胶体颗粒稳定性测定 参照 Lü 等(2020)的方法略有改动,用纳米粒度仪测量各样品中的微纳米胶粒的平均粒径和多分散系数(polydispersity index, PDI)。

1.4 数据分析

所有实验重复 3 次,每个样品设 3 个平行,结果取均值。用 SPSS 软件进行差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 作为标准。采用 Origin 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 食盐添加对鱼头汤中蛋白质和总糖含量的影响

鱼肉中的主要成分肌球蛋白和肌动蛋白以及原肌球蛋白、肌钙蛋白、结缔蛋白等均属于盐溶性蛋白,在一定的离子强度下能被溶解,因此,在熬煮过程中食盐的加入导致蛋白质被溶解向汤中迁移。而肌肉内部的糖类等营养物质也被动迁移到汤中。不同加盐时机对汤中蛋白质和糖含量的影响见图 1。由图 1 可见,熬煮 60 min 时加盐,汤中蛋白质的含量最高,而 90 min 与 60 min 无显著性差异($P > 0.05$)。鱼头在熬煮过程中,蛋白质组织结构被破坏,在 60~90 min 时加入盐使汤

汁中的渗透压增大, 促使结构受到破坏的蛋白质向汤中迁移。NaCl 在水溶液中会以 Na^+ 和 Cl^- 的形式分别与蛋白质链上的带负电和正电的氨基酸残基结合, 静电相互作用使鱼头组织中的蛋白质在汤中的溶解性增大。而在 90 min 以后加盐, 汤中蛋白质含量明显降低, 这可能与长时间熬煮导致蛋白质大量溶出并在汤中发生聚集沉淀有关, 而此时加入 NaCl 已经不足以使其与蛋白发生相互作用而阻止聚集(Cui *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Lanier *et al.*, 2005)。朱琳芳(2012)发现, 在初始阶段加入食盐后, 对鳊鱼(*Aristichthys nobilis*)鱼头进行熬煮, 汤中的氨基态氮和蛋白质含量会随时间延长而增加并趋于稳定, 认为是蛋白质的热降解并不断溶出的结果。

糖是产品风味生成的重要前体物之一。由图 1 可知, 总糖的迁移规律与蛋白质类似, 在 90 min 加盐时鱼汤总糖含量最高, 60 min 加盐时总糖含量次之, 但 2 组的总糖含量无显著性差异($P>0.05$)。而在 120 min 或 150 min 时加盐, 总糖的最终含量明显低于 60 min 加盐组($P<0.05$)。这可能与熬煮后期释放出的糖和氨基酸发生美拉德反应有关。

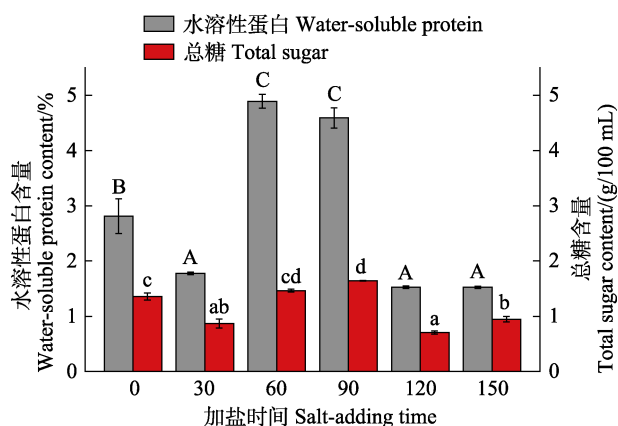


图 1 不同加盐时间对鱼头汤中水溶性蛋白和总糖迁移的影响

Fig.1 The migration of water-soluble protein and total sugar in the soup at different salt-adding time

不同大写字母表示水溶性蛋白含量存在组间差异, 不同小写字母表示总糖含量存在组间差异($P<0.05$)。

Different uppercase letters indicate significant difference in water-soluble protein content between groups, and different lowercase letters indicate significant difference in total sugar content between groups ($P<0.05$).

2.2 食盐添加对鱼头汤中可溶性固形物及灰分含量的影响

汤中的可溶性固形物是衡量产品品质的一个重

要指标(Santos *et al.*, 2012)。从图 2 可以得到, 原料中含有较高的可溶性固形物, 会随熬煮处理迁移到鱼汤中, 且迁移的总量受到加盐时机的影响。本研究, 熬煮 90 min 加盐组的固形物含量最高。朱琳芳(2012)报道的鳊鱼汤在煮沸后随着熬煮时间的延长, 固形物浓度逐渐增加, 分别在沸腾 2.5~3.0 h 之间基本达到平衡。

鱼头汤中的灰分含量也受到熬煮处理的影响, 且加盐时机对其有较大影响, 其变化趋势与可溶性固形物的变化相似。从图 2 可以看出, 在熬煮 90 min 时加盐, 汤中灰分含量明显高于其他各组($P<0.05$)。熬煮过程中, 鱼头骨所附着的肌肉变性而脱离, 同时, 脂肪也随熬煮而析出, 使得鱼骨表面积增加, 加入 NaCl 后, Na^+ 和 Cl^- 通过侵蚀作用使鱼骨原结构进一步被破坏, 内部的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等离子溶出增加, 从而导致灰分含量的增加。而在熬煮 120 min 和 150 min 时再加入 NaCl, 由于作用时间较短, 溶出总量不高。

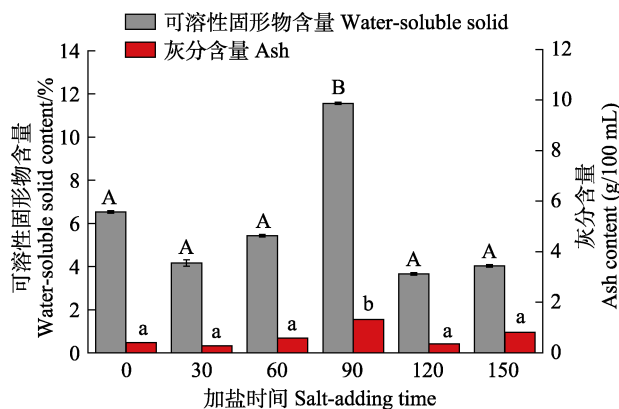


图 2 不同加盐时机对鱼头汤中可溶性固形物及灰分的迁移的影响

Fig.2 The migration of water-soluble solid and ash in the soup at different salt-adding time

不同大写字母表示可溶性固形物含量存在组间差异, 不同小写字母表示灰分含量存在组间差异($P<0.05$)。

Different uppercase letters indicate significant difference in water-soluble solid content between groups, and different lowercase letters indicate significant difference in ash content between groups ($P<0.05$).

2.3 食盐添加对鱼头汤中核苷酸含量的影响

鱼汤中富含 30 多种具有鲜味的核苷酸及其衍生物(于芳珠等, 2020; Moton, 1982), 其中 5'-IMP、5'-GMP 和 5'-AMP 是主要呈鲜味物质(李钊, 2010)。如图 3 所示, 原材料中含有较高的核苷酸, 经熬煮处理, 原料中的核苷酸会不断溶出, 且加盐时机对核苷酸由鱼头向汤中的迁移有显著影响, 随加盐时间的推

迟先上升后下降, 90 min 时的加盐组总核苷酸含量最高。因此, 认为在 90 min 时加盐最为理想, 60 min 时加盐次之。结果显示, 核苷酸为风味的形成提供了必要的物质基础, 但加盐时机对其溶出具有重要影响。

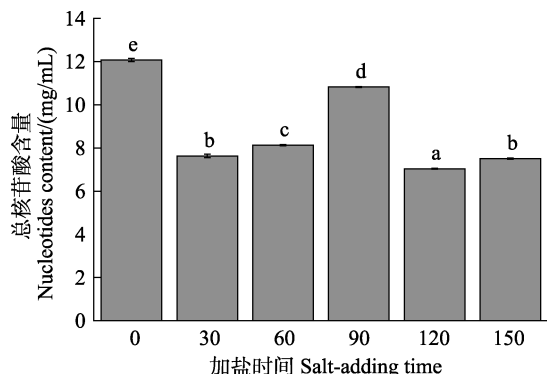


图3 不同加盐时机对汤中核苷酸迁移的影响

Fig.3 The migration of 5'-nucleotide in the soup at different salt-adding time

不同小写字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference between groups ($P<0.05$).

2.4 食盐添加对鱼头汤中游离氨基酸含量的影响

游离氨基酸是影响鱼汤风味的另一个重要因素, 从呈味特征上可分为鲜味、苦味和甜味氨基酸(董萌, 2019; Yu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020; Bermúdez *et al.*, 2014; 胡亚芹等, 2019)。图4显示了各组样品中游离氨基酸含量和组成情况, 鱼头汤中呈味的游离氨基酸主要为苦味和鲜味氨基酸。60 min 加盐组和 90 min 加盐组的呈味游离氨基酸含量显著高于其他组($P<0.05$), 而苦味氨基酸的含量也是在 60 min 加盐组和 90 min 加盐组较高($P<0.05$)。此外, 本研究还重点关注了牛磺酸, 牛磺酸是鱼头中已知的重要活性成

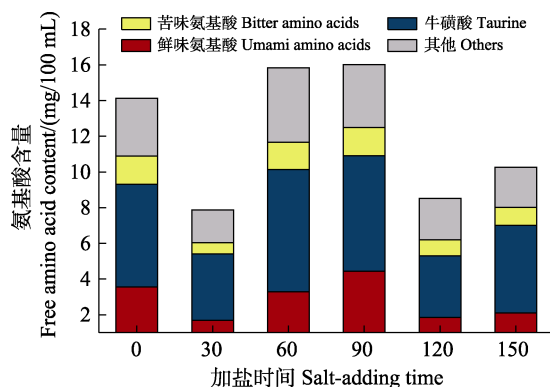


图4 不同加盐时机对汤中游离氨基酸迁移的影响

Fig.4 The migration of free amino acid in the soup at different salt-adding time

分, 能够通过调节细胞内钙含量防止心肌病, 能够降低血压, 具有抗肿瘤活性。结果显示, 60 min 时加盐的样品中牛磺酸含量最高, 90 min 加盐的样品中牛磺酸含量次之。其他氨基酸主要为不具有呈味特性的游离氨基酸, 其含量也受到加盐时机的影响, 变化趋势与苦味、鲜味游离氨基酸相似。熬煮会导致蛋白质变性(梁萌青等, 2009), 一方面会导致肌原纤维蛋白细胞膜被破坏, 细胞内部的游离氨基酸释放而迁移到水相中; 另一方面, 随着 Na^+ 、 Cl^- 的加入, 2 种离子分别和氨基酸残基羧基和氨基相互作用, 导致蛋白质结构进一步改变, 暴露出更多的残基, 在热的作用下, 可能发生热裂解, 从而导致游离氨基酸的迁移增加, 而这种迁移与蛋白质自身结构、成分相互作用等有关(樊馨怡等, 2019)。

2.5 加盐时机对鱼头汤色泽的影响

各组鱼头汤的 L^* 、 a^* 、 b^* 及白度值如表 1 所示。熬煮过程中, 鱼头组织中蛋白质等营养物质的溶出增加, 汤汁变得浓稠, 导致对光的反射、透射及散射发生改变。熬煮前加盐组与 90 min 加盐组的白度值显著高于其他组($P<0.05$), 而 120 min 加盐组和 150 min 加盐组的白度值较低, 可能与颗粒的类型与聚集沉淀有关(钱雪丽等, 2019)。

2.6 微观结构观察结果

利用光学显微镜观察不同组的 MNPs, 结果见图 5, 各组的 MNPs 形态有明显的差异。在 90 min 时加盐, 由于一些大分子物质如蛋白、脂质、糖类等发生聚集, 汤中形成许多大颗粒(图 5d), 而 60 min 时加盐的样品在经过熬制后呈现的是大量稳定的双层球形小颗粒(图 5c)。钱雪丽等(2019)报道金枪鱼(*Thunnus obesus*)头熬煮后, 汤体系中也呈现出大量大小不一的双层球形颗粒, 且尺寸分布范围较广。

选择 60 min 加盐组和 90 min 加盐组进行进一步观察, 结果见图 6。鱼头汤中的胶体颗粒一般是由两性分子如蛋白质、脂类、多糖和核苷酸等组成。禄彦科(2016)发现, 猪骨汤中的微纳米胶粒的主要组成部分是蛋白质(如骨胶原)、多糖、脂类以及核苷酸等两性分子。如图 6A 所示, 作为非极性分子的球状甘油三酯颗粒主要位于 MNPs 的中心, 而蛋白质聚集在一起, 并分布在甘油三酯的周围或附着在其表面。图 6B 表明, 与 90 min 加盐组相比, 60 min 加盐组的甘油三酯和蛋白颗粒更加均匀地分布在鱼头汤中。在熬煮过程中添加的 NaCl 会与部分释放出的盐溶性蛋白结合在一起, 导致蛋白质表面形成一定的静电屏障, 增加了蛋白质间的斥力, 导致这些 MNPs 均匀分散在汤中。而在

表 1 不同加盐时机下鱼头汤的色泽

Tab.1 The color of fish head soups at different salt-adding time

加盐时机 Salt-adding time/min	L^*	a^*	b^*	白度 Whiteness
0	39.12±1.04 ^d	-1.62±0.08 ^c	2.39±0.10 ^b	38.88±0.21 ^c
30	35.12±0.97 ^a	-0.86±0.12 ^d	5.53±0.16 ^d	34.88±0.01 ^{ae}
60	35.25±0.41 ^a	-0.96±0.04 ^a	3.98±0.09 ^a	36.39±0.41 ^d
90	38.64±0.52 ^c	-1.61±0.15 ^c	4.38±0.22 ^c	38.39±0.11 ^b
120	35.51±0.34 ^b	-0.78±0.06 ^b	5.09±0.15 ^c	35.30±0.02 ^a
150	35.15±0.21 ^a	-1.03±0.17 ^e	5.42±0.26 ^d	34.51±0.42 ^e

注: 同列间具有不同字母的数据差异显著($P<0.05$)。

Note: Data with different letters in the same column differ significantly ($P<0.05$).

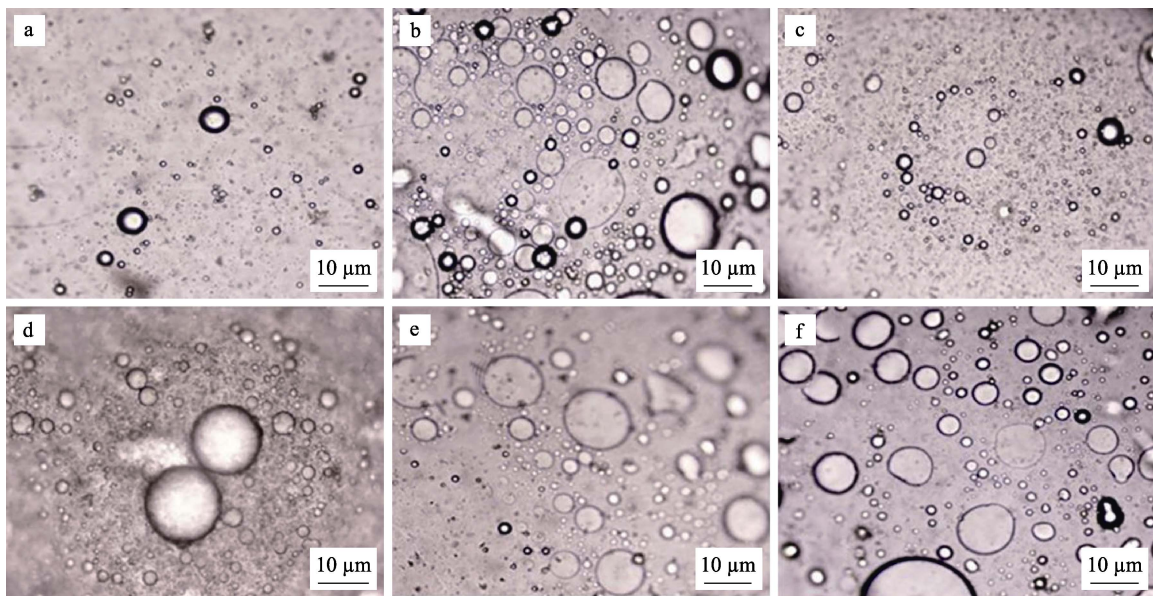


图 5 光学显微镜观察汤中的颗粒形态

Fig.5 Morphology of particles in the soup by optical microscopy

a: 0 min; b: 30 min; c: 60 min; d: 90 min; e: 120 min; f: 150 min

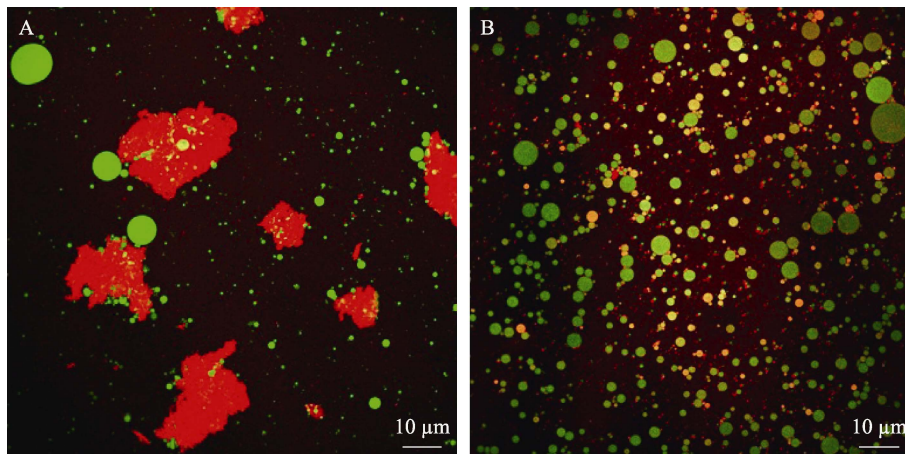


图 6 激光共聚焦观察甘油三酯和蛋白的分布

Fig.6 Distribution of triglycerides and proteins of MNPs in the soup at different salt-adding time

A: 90 min; B: 60 min

熬煮至 90 min 时再加盐并不是一个合适的选择,因为在熬煮的前期,汤中各营养物质就通过分子间的次级键作用开始自组装成颗粒,一段时间之后不断聚集成大颗粒物质,而此时加入的 NaCl 不能和蛋白质等物质进行充分的相互作用,不足以将聚集的大分子物质分散开。由此,鱼头汤在熬制过程中,由于组织内各营养物质的溶出和迁移,最终汤中会形成复杂的胶体体系,而 Na^+ 和 Cl^- 所带来的静电屏蔽作用起到了重要作用(樊馨怡, 2020)。在熬煮至 60 min 时加入 NaCl, 鱼头汤中的 MNPs 体系具有更强的稳定性。

2.7 鱼头汤胶体颗粒稳定性分析结果

胶粒的粒径及多分散指数(PDI 值)可反映鱼头汤

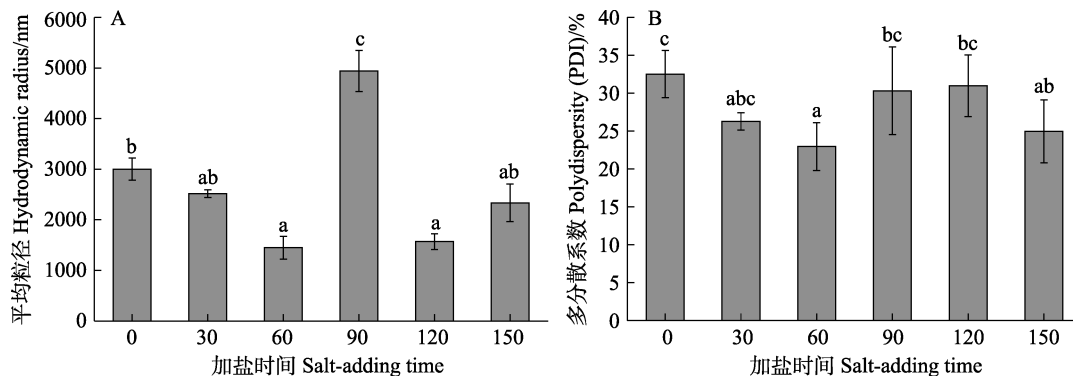


图 7 加盐时机对汤中 MNPs 稳定性的影响

Fig.7 Effect of salt-adding time on the stability of the MNPs in the soup

A: 平均粒径; B: PDI

A: Hydrodynamic radius; B: Polydispersity index

3 结论

乌鳢鱼头熬煮过程中食盐的添加时机对营养物质和风味物质的迁移有显著影响。在煮制至 60 min 时加入食盐,可使鱼头中的营养物质和呈味物质较好地溶出和迁移,汤中所形成的颗粒呈双层球状且大小均匀。MNPs 平均粒径和多分散指数最小,体系较为稳定。研究结果为乌鳢鱼头汤的生产工艺设计奠定了理论基础,为后期冲调式方便鱼头汤的研发提供了参考。

参 考 文 献

- BERMÚDEZ R, FRANCO D, CARBALLO J, *et al.* Influence of muscle type on the evolution of free amino acids and sarcoplasmic and myofibrillar proteins through the manufacturing process of Celta dry-cured ham. *Food Research International*, 2014, 56(2): 226–235
- CHEN F D, YANG L F. *Channa argus* nutritional value and the

中胶体的稳定性。如图 7 显示,各组样品的平均粒径在 1400~5000 nm 范围内。60 min 加盐组的粒径值(1448 nm)相对较小,而 90 min 加盐组的粒径最大。各组样品的 PDI 值在 23%~33%之间,粒径分布较窄。

综上所述,60 min 加盐组的样品粒径和 PDI 值最小,体系相对稳定,这与微观结构观察结果一致。樊馨怡(2020)对不同加盐时间金枪鱼汤熬煮过程中物质迁移以及 MNPs 结构的形成和稳定性的研究表明,不同加盐时间对金枪鱼头汤中营养物质的迁移有较显著的影响,在熬煮 150 min 时加盐,金枪鱼头汤中营养物质的迁移达到最大。说明不同鱼种在熬煮过程中营养物质的迁移以及 MNPs 结构的形成与稳定性不尽相同。

intensive processing development prospect. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2013(4): 51–53 [陈飞东, 杨立锋. 乌鳢营养价值及其深加工开发前景. *农产品加工(学刊)*, 2013(4): 51–53]

- CHEN N, CHASSENIEUX C, NICOLAI T. Kinetics of NaCl induced gelation of soy protein aggregates: Effects of temperature, aggregate size, and protein concentration. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77(4): 66–74
- CHENG H, HUANG G. The antioxidant activities of carboxymethylated garlic polysaccharide and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 1054–1063
- CUI L, FAN J, SUN Y, *et al.* The pro-oxidant activity of salts on the lipid oxidation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 2018, 252(6): 28–32
- DONG M. The mechanisms of tastants produce and release during the storage and processing of fish. Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2019 [董萌. 鱼类贮藏与加工过程中滋味物质的形成与释放机理初探. 大连工业大学硕士研究生学位论文, 2019]

- FAN X Y. Effect of salt addition method on migration of substances and structure stability of micro/nano particles in big eye tuna head soup. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 [樊馨怡. 加盐方式对大眼金枪鱼头汤熬煮过程中物质迁移以及微纳米颗粒结构的形成和稳定性的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- FAN X Y, TAO N P, WANG X C. Research progress on the dissolution, migration of substance and formation of micro/nanoparticles in soup. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 355–359 [樊馨怡, 陶宁萍, 王锡昌. 汤中物质的溶出、迁移以及微纳米颗粒形成的研究进展. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 355–359]
- HU Y Q, GE Y J, BAI Y, *et al.* Effect of heat treatments on the protein structures and meat textural properties. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 175–184 [胡亚芹, 葛雨珺, 白妍, 等. 热处理对肉类蛋白质构的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 175–184]
- LANIER T C, YONGSAWATDIGUL J, CARVAJAL P. Surimi gelation chemistry. Boca Raton: CRC Press, 2005
- LI Z. Study on the color variation of green tea infusion. Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2010 [李钊. 绿茶茶汤色泽变化的机理研究. 安徽农业大学硕士研究生学位论文, 2010]
- LIANG M Q, WANG S W, WANG J L, *et al.* Effects of adding salt in the diet of the shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity and sea water on growth and flavor. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 117–124 [梁萌青, 王士稳, 王家林, 等. 饲料中添加食盐对凡纳滨对虾生长及风味的影响. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 117–124]
- LOPEZ C, MÉNARD O. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 83(1): 29–41
- LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265–275
- LÜ P, WANG D, CHEN Y, *et al.* Pickering emulsion gels stabilized by novel complex particles of high-pressure-induced WPI gel and chitosan: Fabrication, characterization and encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 2020, 108: 105992
- LU Y K. The formation chemistry and primary separation of micro/nano-particles in pig bone broth. Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2016 [禄彦科. 猪骨汤微纳米胶粒的形成、化学性质及其初步分离. 浙江工商大学硕士研究生学位论文, 2016]
- MOTONO M. Flavor nucleotides' usages in foods. In: GEORGE C, GEORGE I. *Chemistry of foods beverages: Recent developments*. New York: Academic Press, 1982, 181–194
- QIAN X L, SU H, FAN X Y, *et al.* Fatty acid composition, vitamin E and microscopic morphology of tuna (*Thunnus obesus*) head soup. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(5): 801–810 [钱雪丽, 苏红, 樊馨怡, 等. 金枪鱼头汤中脂肪酸组成、维生素 E 含量分析及微观形貌观察. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(5): 801–810]
- QIU W Q, CHEN S S, XIE J, *et al.* Analysis of 10 nucleotides and related compounds in *Litopenaeus vannamei* during chilled storage by HPLC-DAD. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 67: 187–193
- SAHID N A, HAYATI F, RAO C V, *et al.* Snakehead consumption enhances wound healing? From tradition to modern clinical practice: A prospective randomized controlled trial. *Evidence-based Complementary Alternative Medicine*, 2018, 3032790
- SANTOS A, REBOUAS T N H, SOUZA J C D, *et al.* Characterization and evaluation of quality of soups dehydrated produced with flour of potatoes during time of storage. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 2010, 28(1): 57–68
- TANIMOTO S, KAWAKAMI K, MORIMOTO S. Original article: Changes in the free amino acid content of the shucked oyster *Crassostrea gigas* stored in salt water at 3 °C. *Fisheries Aquatic Science*, 2013, 16(2): 63–69
- WANG N. Research on the influence of key technology to color and turbidity of black tea beverage. Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2013 [王楠. 关键工艺对红茶饮料色泽及浑浊度研究. 河北农业大学硕士研究生学位论文, 2013]
- YU F Z, BO C M, LIU D Y. Research progress of umami substances in food. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(16): 5554–5561 [于芳珠, 薄存美, 刘登勇. 食品中鲜味物质研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5554–5561]
- YU Z L, JIANG H R, GUO R C, *et al.* Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate. *Food Research International*, 2018, 108: 144–150
- ZHOU C Y, LE Y, ZHENG Y Y, *et al.* Characterizing the effect of free amino acids and volatile compounds on excessive bitterness and sourness in defective dry-cured ham. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 123: 109071
- ZHU L F. research and development on processing technology of convenience fish soup. Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 [朱琳芳. 方便鱼汤加工技术与开发. 江南大学硕士研究生学位论文, 2012]
- ZUBAIDAH A, AZIDAH A K, HAZLINA N, *et al.* The effect of *Channa striatus* (Haruan) extract on pain and wound healing of post-lower segment caesarean section women. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2015, 849647

Effect of the Time of NaCl Addition on Nutrient Migration and Micro and Nanoparticles of *Channa argus* Head Soup

SU Li^{1,2}, LI Xin¹, GAO Ruichang¹①

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Administrative Committee of Grape Industrial Zone of Ningxia Helan Mountain East Foothill, Yinchuan, Ningxia 753000, China)

Abstract *Channa argus* is a bottom-dwelling freshwater fish with high nutritional and economic value and, in China, is known as the "treasure of fish". *C. argus* meat is mainly used to produce fish fillets; however, head and bone are occasionally utilized in food production. The head of *C. argus* is rich in mineral elements, amino acids, and unsaturated fatty acids and is commonly used in China for fish head soup. The preparation of fish head soup is particularly time-consuming and can take several hours. Therefore, a high demand exists for the research and development of instant fish head soup products. With the development of modern food colloid research technology, the formation of micro/nanoparticles (MNPs) in soups and the biological effects of the tissue units as active ingredients have attracted increasing attention. In terms of the cooking process of fish soup, in addition to the heating method and cooking time, the seasoning added during cooking is also an important factor. In particular, salt is a key determinant of soup flavor. Although the content is the same, the addition of salt affects the dissolution and migration of nutrients from the fish head during the cooking process. However, the effect of the addition time of salt on the nutritious flavor during the preparation of fish soup has not been studied clearly. Furthermore, the stability of fish soup has not been adequately evaluated.

In this work, the *C. argus* head was chosen as the base material for the soup and the nutrient migration and particles in the *C. argus* head soup were studied. Water-soluble protein, total sugar, total minerals, solids, nucleotides, free amino acid content, and colloidal particle stability were chosen as indicators to evaluate the transfer of nutrients and flavor. In addition, the morphological structure and distribution of MNPs in the soup were observed using laser scanning confocal microscopy (LSCM). The results showed that the content of water-soluble proteins first increased and then decreased with the delay in salt addition time. The migration trend of total sugars was similar to that of the proteins. Meanwhile, the ash content in the soup generally increased and then decreased. The change in the content of soluble solids could represent changes in various nutrients. The migration of solids and the content of ash peaked when the salting time was at 90 min. The boiled samples with salt added at different times showed significant differences in the migration of nucleotides. It could be concluded that salting was ideal at 60 min or 90 min, based on the changes in the total amount of nucleotides. Furthermore, the contents of total free amino acids and umami-flavored amino acids were also the highest in the samples with salt added at 60 min or 90 min. When the addition time was 60 min, the stability of the MNP system in the fish head soup could effectively be improved by inhibiting the aggregation of macromolecules, which would promote the retention of various nutrients. The particle size and polydispersity (PDI) were lowest in the samples with salt added at 60 min. In addition, the zeta potential value of the sample with salt added at 60 min was higher than that at 90 min. Therefore, the system was relatively stable at 60 min, which was

① Corresponding author: GAO Ruichang, E-mail: xiyuan2008@ujs.edu.cn

conducive to nutrient retention. This is consistent with the results of the microstructure analysis.

The maximum dissolution of nutrients and flavor substances occurred when salt was added after boiling for 60 min. Meanwhile, MNPs in the soup were stable, uniform, double-layer, spherical particles. The results of LSCM showed that nonpolar triglycerides self-assembled into spherical particles, which were located in the center of the particles, and protein molecules dispersed around or were bound to the surface of the particles. The fish head soup system was the most stable under the conditions of particle size, potential, and polydispersion index. Therefore, adding salt after boiling for 60 min was the optimal procedure for making fish soup with high nutritional value, delicious taste, and stable content. This study provides a baseline procedure for *C. argus* head soup with high and stable nutritional content.

The results provide technical support for preparing a convenient and delicious fish head soup. People can enjoy delicious food shortly after a hard day's work. In addition, the results showed that the timing of adding salt had a significant impact on the nutrition of fish head soup, which suggests that attention should be paid to the timing of adding salt when preparing fish head soup at home. *C. argus* head, a by-product of processing, can increase in value and provide a solution for producers to decrease waste and increase profits.

Key words *Channa argus* head soup; Addition time of salt; Nutrient migration; Micro and nano particles

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211123001

http://www.yykxjz.cn/

莫翠琴, 黄凯, 曹鑫盛, 江林源, 于凯, 郭睿婕, 王超男. 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长性能及肌肉品质的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 214–223

MO C Q, HUANG K, CAO X S, JIANG L Y, YU K, GUO R J, WANG C N. Effects of dietary lipid levels on growth performance and muscle quality of juvenile *Procambarus clarkii*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 214–223

饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长性能 及肌肉品质的影响*

莫翠琴¹ 黄 凯^{1①} 曹鑫盛² 江林源^{3①}
于 凯¹ 郭睿婕¹ 王超男¹

(1. 广西大学动物科学技术学院 广西 南宁 530004; 2. 天津赞兰科技有限公司 天津 300000;
3. 广西壮族自治区水产技术推广站 广西 南宁 530000)

摘要 本研究旨在探讨饲料脂肪水平对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)幼虾生长性能和肌肉品质的影响。实验选取 600 尾初始体重为(4.00±1.00) g 的克氏原螯虾幼虾, 随机分为 5 组(L1、L2、L3、L4 和 L5 组), 分别投喂脂肪水平为 2.86%、5.11%、7.67%、10.19%和 13.02%的等氮实验饲料, 养殖周期为 60 d。结果显示, 随着脂肪水平的升高, 特定生长率(SGR)呈先升高后降低的趋势($P<0.05$), 饲料系数(FCR)呈先降低后升高的趋势($P<0.05$), L3 组的 FCR 显著低于其余组($P<0.05$); 对 SGR 进行折线回归分析, 得出最适脂肪含量为 6.82%。饲料脂肪水平对克氏原螯虾肌肉的水分、粗蛋白和粗灰分含量无显著影响($P>0.05$); 随着饲料脂肪水平的增加, 肌肉的蒸煮损失率、粗脂肪含量、总多不饱和脂肪酸(Σ PUFA)和总氨基酸(Σ TAA)含量呈上升趋势, L5 组的二十碳五烯酸(EPA)显著高于其余组, L5 组的二十二碳六烯酸(DHA)含量显著高于 L1 和 L2 组($P<0.05$); 随着饲料脂肪水平的增加, 肌肉硬度、弹性、凝聚性和黏性呈下降趋势, 且 L1~L3 组间均无显著差异($P>0.05$), L5 组的总鲜味氨基酸(Σ FAA)、丙氨酸(Ala)及天门冬氨酸(Asp)的含量显著低于 L1 组($P<0.05$)。综上所述, 适宜的饲料脂肪含量可以提高克氏原螯虾幼虾的生长性能和肌肉的营养品质, 在本实验条件下, 克氏原螯虾幼虾饲料中脂肪的建议添加量为 6.82%~10.19%。

关键词 克氏原螯虾; 脂肪水平; 生长性能; 肌肉品质; 营养成分

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0214-10

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 原产于墨西哥北部和美国南部(蔡凤金等, 2010), 于 20 世纪 90 年代引入我国(唐鑫生, 2001)。因其适应力强、肉质鲜美、味道独特等特点, 成为我国重要的养殖经济虾类(晏明瑶等, 2021), 2020 年小龙虾产业的总产值达 3448.46 亿元, 市场前景广阔。随着小龙虾产业

链的发展, 对其专用配合饲料的需求也逐渐增加(惠文杰等, 2020)。

确定和优化主要营养物质是研发配合饲料的重要前提, 其中, 脂肪是最重要的营养物质之一(Tacon *et al*, 2008; 何先林等, 2021)。脂肪是必需脂肪酸的主要来源(Yun *et al*, 2013), 在克氏原螯虾生长发育及繁

* 广西科技重大专项创新驱动发展基金(桂科 AA20302019-6)资助。莫翠琴, E-mail: 2291434947@qq.com

① 通信作者: 黄 凯, 教授, E-mail: hkai110@163.com; 江林源, 高级工程师, E-mail: 253346541@qq.com

收稿日期: 2021-11-23, 收修改稿日期: 2021-12-23

殖过程中发挥着重要作用(Tocher, 2003; Wen *et al.*, 2021)。适宜的饲料脂肪含量不仅能促进虾的健康生长, 还能节约饲料蛋白质、降低养殖成本(张家宏等, 2012; 斯烈钢等, 2014; 鲁耀鹏等, 2018)。孟晶等(2016)以 1.82%、3.84%、5.79%、7.89%、9.91%和 11.95% 6 种脂肪水平饲料投喂初始体重为(4.76±0.42) g 的克氏原螯虾, 发现 8.74%的饲料脂肪水平可获得最大增重率; 张家宏等(2012)进行饲料蛋白质和脂肪水平双因子试验, 发现蛋白水平为 24%~28%和脂肪水平为 6%时, 克氏原螯虾可得到最佳生长; 此外, 对克氏原螯虾亲虾的研究发现, 适宜的饲料脂肪水平为 7.60%~7.89% (彭迪等, 2019)。迄今为止, 关于克氏原螯虾饲料中脂肪含量的研究主要集中于生长性能、生化指标以及肌肉的常规营养成分方面, 而针对肌肉品质的研究还未见报道。

因此, 本研究从生长性能及肌肉的质构指标、营养成分和食用风味等方面, 比较不同饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾的影响, 旨在为克氏原螯虾幼虾配合饲料的开发及合理评价脂肪对克氏原螯虾肌肉品质的影响提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验饲料以鱼粉、豆粕和菜籽粕为主要蛋白源, 以鱼油与豆油 1:1 比例的混合油为脂肪源, 制备 2.86%、5.11%、7.67%、10.19%和 13.02%脂肪水平的 5 种等氮饲料, 具体营养组成见表 1。主要原料经粉碎过 80 目筛后, 按比例逐级混匀, 加入脂肪与适量水在搅拌机中充分混合, 用小型绞肉机制成直径 3 mm、长度 5 mm 的颗粒饲料, 风干后-20℃保存备用。

1.2 实验虾与饲养管理

实验虾购于广西汇洋科技有限公司, 养殖实验在广西大学水产基地养殖池(方形, 1.0 m×1.0 m×0.6 m)中进行。实验开始前, 在养殖池中驯养 7 d 后, 选取健壮、附肢完好、规格相似的幼虾 600 尾[(4.00±1.00) g], 随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 40 尾虾。每日早晚(06:00 和 19:30)按虾体重的 3%投喂饲料。每日初投喂前清理池内粪便和残饵, 观察并记录水温、摄食及死亡状况, 每 2 天换水 1/3。养殖池内以悬挂网片为遮蔽物, 实验期间池水溶氧高于 5 mg/L, 水温为 25~30℃, pH 为 7.0~7.7, 氨氮低于 0.05 mg/L, 养殖周期为 60 d。

1.3 样品采集

取样前禁食 24 h, 对每组虾进行计数、称重, 用于计算各生长指标。每组随机取 10 尾虾, 解剖分离肝胰腺、肌肉和性腺, 称重后于-80℃冰箱储存备用, 用于计算肝体指数和出肉率, 肌肉样本用于测量其常规成分、质构指标、脂肪酸和氨基酸组成。各生长指标计算公式如下:

$$\text{成活率(survival rate, SR, \%)}=100 \times N_d / N_a;$$

$$\text{特定生长率(specific growth rate, SGR, \% / d)}=$$

$$100 \times (\ln W_d - \ln W_a) / D;$$

$$\text{出肉率(flesh content, FC, \%)}=100 \times W_m / W_d;$$

$$\text{肝体指数(hepatosomatic index, HSI, \%)}=$$

$$100 \times W_h / W_d;$$

$$\text{饲料系数(feed conversion ratio, FCR)}=W_f / W_0;$$

式中, N_a 为初始尾数, N_d 为终末尾数, W_a 为初始体质量, W_d 为终末体质量, D 为实验天数, W_m 为去壳腹部肌肉重, W_h 为虾体肝胰腺重, W_f 为摄入饲料量, W_0 为增重量。

1.4 生化成分分析

常规营养成分测定方法: 水分含量采用 105℃恒温干燥失重法(GB/T5009.3-2016); 粗灰分含量使用 550℃马弗炉灼烧法(GB/T5009.4-2016); 粗蛋白含量用凯氏定氮法(GB/T5009.5-2016); 粗脂肪含量为索氏抽提法(GB/T5009.6-2016)。

肌肉的质构指标测定方法: 采用 TMS-pro 型质构仪质地剖面分析法(texture profile analysis, TPA)测定(Cai *et al.*, 2018)。测定肌肉硬度、咀嚼性、弹性、黏性、凝聚性和回复性。

肌肉蒸煮损失率(cooking loss, CL, %)的测定方法: 取肌肉样品除去表面水分后称量(W_n), 装入自封袋中并于沸腾水中蒸煮 5 min, 去除表面水分后称重(W_p), $CL=(W_n-W_p)/W_n \times 100\%$ 。

脂肪酸测定方法: 参照陈金民等(2010), 采用气质联用法, 使用 GC Smart (GC-2018)气相色谱仪(Shimadzu, 日本)测定肌肉脂肪酸组成和含量。

氨基酸测定方法: 参照 JY/T019-1996, 使用 Biochrom30+型氨基酸自动分析仪(Biochrom, 英国)测定氨基酸组成和含量。

1.5 数据分析

实验数据均用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, ANOVA 法进行单因素分析(one-way ANOVA), Duncan's 法进行多重比较分析, 所有数据值均用平均值±标准差(Mean±SD)表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

表1 实验饲料配方及营养组成(%干物质)

Tab.1 Formula and nutrient composition of experimental feed (% dry matter basis)

原料 Ingredients	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
鱼粉 Fish meal	8.50	8.50	8.50	8.50	8.50
豆粕 Soybean meal	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
菜籽粕 Rapeseed meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
面粉 Flour	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 Choline choride	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质预混料 Mineral mix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素预混料 Vitamin mix ²	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
食盐 NaCl	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
酵母粉 Yeast powder	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
海带粉 Kelp powder	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
羧甲基纤维素 Carboxymethy cellulose	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	10.00	7.50	5.00	2.50	0.00
鱼油 Fish oil	0.00	1.25	2.50	3.75	5.00
豆油 Soybean oil	0.00	1.25	2.50	3.75	5.00
大豆磷脂 Soy lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
虾壳粉 Shrimp shell powder	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱿鱼粉 Squid meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
营养组成 Proximate composition					
粗蛋白 Crude protein	31.70	31.32	31.79	31.40	31.67
粗脂肪 Crude lipid	2.86	5.11	7.67	10.19	13.02
粗纤维 Crude fiber	15.74	12.31	10.03	8.14	6.64
粗灰分 Ash	9.23	8.36	7.62	7.17	6.95

注: 1. 每克维生素预混料: 维生素 A 2500 IU, 维生素 B₁₂ 0.2 mg, 维生素 B₆ 15 mg, 维生素 B₂ 15 mg, 维生素 C 160 mg, 维生素 D 0.05 mg, 维生素 E 10 mg, 维生素 K 35 mg, 叶酸 5 mg, 烟酸 40 mg, 肌醇 155 mg, 泛酸钙 20 mg, 生物素 0.2 mg.
2. 每千克矿物质预混料: 硫酸锌 1.4 g, 硫酸镁 30 g, 硫酸锰 0.3 g, 硫酸亚铁 1.5 g, 氯化钙 280 g, 氯化铜 0.5 g, 氯化钴 0.5 g, 氯化钾 7 g, 碘化钾 0.15 g, 磷酸二氢钾 450 g。

Note: 1. Vitamin premix per gram: Vitamin A 2500 IU, Vitamin B₁₂ 0.2 g, Vitamin B₆ 15 g, Vitamin B₂ 15 g, Vitamin C 160 g, Vitamin D 0.05 g, Vitamin E 10 g, Vitamin K 35 g, Folic acid 5 g, Niacin 40 g, Inositol 155 g, Calcium pantothenate 20 g, Biotin 0.2 g. 2. Per kilogram of mineral premix: ZnSO₄ 1.4 g, MgSO₄ 30 g, MnSO₄·H₂O 0.3 g, FeSO₄ 1.5 g, CaCl₂ 280 g, CuCl₂ 0.5 g, CoCl₂ 0.5 g, KCl 7 g, KI 0.15 g, K(H₂PO₄)₂ 450 g.

2 结果与分析

2.1 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长和饲料利用的影响

表2显示, 饲料脂肪含量显著影响实验虾的终末体质量(FBW)、特定生长率(SGR)、出肉率(FC)、成活率(SR)、肝体指数(HSI)和饲料系数(FCR)($P<0.05$), 其中, FBW、SGR及SR先呈上升趋势, 在L3组达到最高峰后呈下降趋势; HSI呈上升趋势; FC则呈下降趋势, L5组显著低于L1组($P<0.05$); FCR呈

现为先降低后升高的趋势, L3组显著低于其余组($P<0.05$)。

以饲料脂肪水平为自变量(x), 以SGR为因变量(y)作折线回归, 求得2条直线相交值, 即饲料脂肪水平为6.82%时, 克氏原螯虾幼虾获得最大特定生长率(图1)。

2.2 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉的质构特性及蒸煮损失率的影响

饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉质构特性及蒸煮损失率的影响见表3, 肌肉的硬度、弹性、凝

表 2 脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长和饲料利用的影响
Tab.2 Effects of lipid levels on growth performance and feed utilization of juvenile *P. clarkia* (Mean±SD, n=3)

项目 Items	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
初始体质量 IBW/g	4.00±1.00	4.00±1.00	4.00±1.00	4.00±1.00	4.00±1.00
终末体质量 FBW/g	24.58±1.69 ^b	25.14±2.42 ^{ab}	27.64±1.53 ^a	25.51±2.05 ^{ab}	24.40±6.03 ^b
特定生长率 SGR/(%/d)	30.14±0.62 ^b	31.07±0.57 ^{ab}	35.24±0.51 ^a	31.68±0.67 ^{ab}	29.83±0.93 ^b
出肉率 FC/%	12.22±1.45 ^a	11.83±0.97 ^{ab}	11.67±1.25 ^{ab}	11.36±0.96 ^{ab}	10.73±0.78 ^b
成活率 SR/%	77.50±2.19 ^b	85.00±1.97 ^{ab}	90.00±1.4188 ^a	85.83±2.36 ^{ab}	80.83±2.27 ^{ab}
肝体指数 HSI/%	5.35±0.49 ^b	5.96±0.29 ^b	6.23±0.34 ^{ab}	6.47±1.16 ^a	6.77±1.18 ^a
饲料系数 FCR	1.55±0.02 ^a	1.50±0.04 ^a	1.32±0.03 ^b	1.47±0.02 ^a	1.56±0.03 ^a

注: 同行上标注不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different letters on the same line indicate significant differences ($P<0.05$). The same as below.

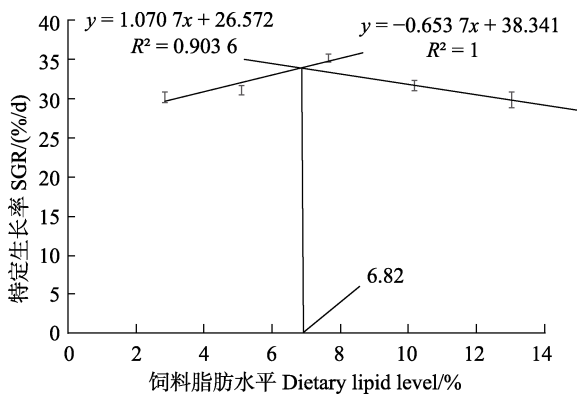


图 1 基于折线回归分析评估最适脂肪水平
Fig.1 The optimal lipid level evaluated by linear regression analysis

聚性、黏性、咀嚼性和回复性均随饲料脂肪水平的增加而下降, 蒸煮损失率则不断上升。其中, L1、L2 和 L3 组之间的硬度、弹性、凝聚性、黏性及蒸煮损失率无显著差异($P>0.05$); 与 L1 组相比, L4、L5 组的硬度、弹性、黏性、咀嚼性和回复性显著降低

($P<0.05$); L5 组的凝聚性最低, 显著低于其余 4 组 ($P<0.05$); 与 L1 组相比, L4、L5 组的蒸煮损失率显著升高($P<0.05$)。

2.3 饲料脂肪水平对克氏原螯虾肌肉常规营养成分的影响

饲料脂肪含量对肌肉水分、粗蛋白以及灰分含量无显著影响($P>0.05$) (表 4), 而对粗脂肪含量有显著影响($P<0.05$), 且二者之间呈正相关, 其中, L5 组显著高于其他组($P<0.05$)。

2.4 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉脂肪酸及氨基酸的影响

克氏原螯虾幼虾肌肉中共检测出 16 种脂肪酸, 其中, 饱和脂肪酸(SFA) 4 种, 单不饱和脂肪酸(MUFA) 4 种, 多不饱和脂肪酸(PUFA) 8 种 (表 5)。饲料脂肪水平对总饱和脂肪酸(Σ SFA)含量和总单不饱和脂肪酸(Σ MUFA)含量无显著影响($P>0.05$); 但显著影响总多不饱和脂肪酸(Σ PUFA)含量($P<0.05$), 随脂肪水平的增

表 3 不同脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉品质的影响
Tab.3 Effects of different lipid levels on muscle quality in muscle of juvenile *P. clarkia* (Mean±SD, n=3)

肌肉品质 Muscle quality	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
硬度 Hardness /gf	421.31±23.21 ^a	413.26±19.78 ^a	391.78±21.36 ^{ab}	366.42±20.10 ^b	342.15±36.87 ^b
弹性 Springiness /mm	66.62±0.04 ^a	63.13±0.04 ^a	60.47±0.06 ^a	54.42±0.07 ^b	52.62±0.11 ^b
凝聚性 Cohesiveness /%	56.35±0.12 ^a	49.76±0.09 ^a	47.10±0.13 ^a	43.13±0.16 ^a	39.27±0.12 ^b
黏性 Gumminess /g	235.93±17.36 ^a	202.50±18.81 ^a	184.41±16.39 ^{ab}	157.56±17.62 ^b	133.44±18.90 ^b
咀嚼性 Chewiness /mJ	157.18±6.02 ^a	127.84±5.64 ^b	111.35±6.21 ^c	85.74±6.73 ^d	70.22±10.90 ^d
回复性 Resilience	36.24±0.12 ^a	28.83±0.11 ^b	26.51±0.12 ^b	17.76±0.13 ^c	12.99±0.15 ^d
蒸煮损失率 Cooking loss /%	8.99±1.10 ^c	9.17±1.07 ^c	9.66±1.15 ^c	11.15±1.46 ^b	14.34±2.36 ^a

表4 脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉营养成分的影响

Tab.4 Effects of lipid levels on muscle composition of juvenile *P. clarkia* (Mean±SD; n=3; %)

项目 Items	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
水分 Moisture	77.65±0.28	78.06±0.42	78.91±0.63	78.36±0.77	78.57±0.75
粗脂肪 Crude lipid	1.21±0.27 ^c	1.77±0.09 ^b	2.01±0.14 ^b	2.26±0.19 ^b	3.13±0.16 ^a
粗蛋白 Crude protein	19.31±0.30	18.16±0.42	18.13±0.31	18.21±0.29	18.15±0.42
灰分 Ash	1.15±0.10	1.19±0.08	1.22±0.19	1.15±0.14	1.20±0.03

表5 脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉脂肪酸组成的影响

Tab.5 Effects of lipid levels on fatty acid composition in muscle of juvenile *P. clarkii* (Mean±SD; n=3; %)

项目 Items	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
C14:0	1.59±0.23	1.64±0.35	1.76±0.37	1.69±0.09	1.55±0.49
C16:0	14.26±1.03 ^a	13.44±1.35 ^a	13.07±1.12 ^{ab}	12.12±1.58 ^b	12.39±1.69 ^b
C17:0	1.27±0.06 ^c	1.49±0.24 ^b	1.72±0.28 ^a	1.32±0.37 ^c	1.66±0.21 ^a
C18:0	6.95±0.59 ^{ab}	5.97±0.88 ^b	6.97±0.39 ^{ab}	7.26±0.86 ^{ab}	8.04±0.44 ^a
ΣSFA	24.07±1.64	22.54±1.37	23.52±1.52	22.39±1.43	23.64±1.09
C16:1	0.27±0.02 ^c	0.44±0.01 ^c	0.69±0.01 ^b	1.86±0.10 ^a	0.65±0.07 ^b
C18:1	24.26±2.87 ^a	22.07±1.96 ^{ab}	23.31±2.09 ^a	20.89±2.37 ^b	19.96±1.28 ^b
C20:1	1.75±0.09	1.88±0.14	1.96±0.07	1.90±0.01	1.97±0.36
C24:1	0.57±0.02 ^b	0.98±0.07 ^{ab}	0.72±0.11 ^b	1.01±0.09 ^a	1.26±0.05 ^a
ΣMUFA	26.85±1.02	25.37±1.06	26.68±0.92	25.66±0.88	23.84±0.97
C18:2	12.97±1.73	13.01±1.51	13.37±2.06	13.41±2.13	13.16±1.91
C18:3	1.15±0.16 ^b	2.20±0.19 ^b	3.01±0.13 ^a	3.11±0.09 ^a	3.00±0.26 ^a
C20:2	1.92±0.05 ^a	1.76±0.16 ^a	1.28±0.09 ^b	1.27±0.18 ^b	1.15±0.21 ^b
C20:3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.10±0.00	0.17±0.03	0.21±0.01
C20:4	13.36±2.31 ^a	13.47±2.37 ^a	12.07±1.63 ^b	12.15±0.96 ^b	11.12±1.15 ^b
C22:2	9.77±0.02 ^b	10.10±0.96 ^b	10.77±0.77 ^b	11.01±0.63 ^b	13.21±0.63 ^a
EPA	0.92±0.15 ^b	0.96±0.03 ^b	0.71±0.07 ^b	0.87±0.12 ^b	1.61±0.19 ^a
DHA	1.26±0.21 ^c	2.37±0.20 ^b	3.36±0.31 ^{ab}	2.96±0.12 ^{ab}	4.31±0.23 ^a
EPA/DHA	0.73±0.13 ^a	0.41±0.12 ^b	0.21±0.11 ^b	0.39±0.05 ^b	0.37±0.09 ^b
ΣPUFA	41.35±1.14 ^c	43.87±1.10 ^b	44.67±1.07 ^b	44.95±0.96 ^b	47.77±1.21 ^a

加不断增加,但 L2、L3 和 L4 组间差异不显著 ($P>0.05$); L5 组的 EPA 含量显著大于其余 4 组 ($P<0.05$), L5 组的 DHA 含量显著大于 L1 和 L2 组 ($P<0.05$), 但与 L3 组和 L4 组无显著差异 ($P>0.05$)。

由表 6 可知,饲料脂肪含量对肌肉的总必需氨基酸(ΣEAA)含量、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)含量无显著影响 ($P>0.05$); 与 L1 组相比, L5 组的总鲜味氨基酸(ΣFAA)含量、丙氨酸(Ala)及天门冬氨酸(Asp)的含量显著降低 ($P<0.05$); 总氨基酸(ΣTAA)含量随脂肪水平的升高呈上升趋势, L5 组显著大于 L1 组 ($P<0.05$); 且 ΣFAA 和 ΣTAA 含量在 L1~L4 组间均差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长性能的影响

本研究中,饲料脂肪含量为 2.86%~7.67%时,脂肪的增加对克氏原螯虾幼虾具有显著的促生长作用,而在脂肪含量为 10.19%~13.02%时,不产生促生长作用。在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(Huo *et al.*, 2014)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)(Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2013)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Xu *et al.*, 2018)等研究中发现,适宜脂肪含量范围内,脂肪含量越多,生长性能越佳,而添加过

表 6 脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉氨基酸的影响

Tab.6 Effects of lipid levels on amino acids composition in muscle of juvenile *P. clarkii* (Mean±SD; n=3; %)

项目 Items	饲料组 Diet group				
	L1	L2	L3	L4	L5
异亮氨酸 Ile*	0.62±0.36	0.66±0.12	0.64±0.76	0.72±0.89	0.68±0.77
亮氨酸 Leu*	1.46±0.06	1.54±0.23	1.29±0.15	1.43±0.21	1.27±0.20
赖氨酸 Lys*	1.23±0.84	1.02±0.71	1.15±0.39	1.07±0.42	1.11±0.24
甲硫氨酸 Met*	0.31±0.09	0.37±0.10	0.33±0.06	0.39±0.09	0.47±0.03
苏氨酸 Thr*	0.65±0.17	0.69±0.11	0.66±0.20	0.61±0.14	0.62±0.12
色氨酸 Try*	0.20±0.03	0.24±0.05	0.14±0.07	0.18±0.01	0.16±0.00
缬氨酸 Val*	0.34±0.12	0.39±0.08	0.37±0.11	0.43±0.13	0.47±0.09
苯丙氨酸 Phe*	0.67±0.11	0.52±0.09	0.59±0.11	0.47±0.15	0.45±0.13
丙氨酸 Ala [^]	1.38±0.21 ^a	0.97±0.42 ^b	1.12±0.12 ^{ab}	0.88±0.14 ^b	0.87±0.09 ^b
酪氨酸 Tyr	0.58±0.03	0.68±0.02	0.43±0.02	0.51±0.03	0.49±0.07
天门冬氨酸 Asp [^]	1.67±0.06 ^a	1.45±0.12 ^a	1.58±0.07 ^a	1.39±0.02 ^{ab}	1.26±0.06 ^b
谷氨酸 Glu [^]	2.16±0.11	2.16±0.13	2.13±0.09	2.12±0.10	2.04±0.08
甘氨酸 Gly [^]	0.91±0.11	0.89±0.11	0.90±0.08	0.94±0.12	0.92±0.10
半胱氨酸 Cys	0.10±0.02	0.13±0.03	0.09±0.01	0.10±0.02	0.11±0.07
脯氨酸 Pro	0.52±0.06 ^a	0.19±0.09 ^b	0.28±0.07 ^b	0.21±0.02 ^b	0.17±0.01 ^b
丝氨酸 Ser	0.64±0.12	0.68±0.14	0.60±0.12	0.63±0.11	0.66±0.13
精氨酸 Arg	1.57±0.22 ^b	1.68±0.12 ^{ab}	1.64±0.16 ^{ab}	1.80±0.09 ^a	1.83±0.11 ^a
组氨酸 His	0.48±0.03	0.36±0.02	0.34±0.01	0.39±0.03	0.40±0.04
总必需氨基酸 ΣEAA	5.48±0.12	5.43±0.23	5.17±0.20	5.30±0.19	5.23±0.10
总鲜味氨基酸 ΣFAA	7.37±0.14 ^a	6.67±0.17 ^{ab}	6.75±0.12 ^{ab}	6.31±0.15 ^{ab}	6.03±0.09 ^b
总氨基酸 ΣTAA	4.71±0.15 ^b	5.26±0.09 ^{ab}	7.72±0.42 ^{ab}	8.12±0.21 ^{ab}	8.14±0.25 ^a

注: EAA*: 必需氨基酸, FAA[^]: 鲜味氨基酸。Notes: EAA*: Essential amino acid, FAA[^]: Flavor amino acid.

量的脂肪则不能促进生长,这与本研究结果相似。本研究中,实验虾的FCR随脂肪含量的增加表现为先下降后上升的趋势,可能是由于饲料中能量随脂肪水平的增加而增加,实验虾根据摄入饲料的能量的不同来调节摄食。

本实验以SGR作为评价依据,采用折线回归分析,得出适宜脂肪含量为6.82%。本实验结果处于徐维娜等(2011)的研究结果范围内,但低于初始体重4.76 g克的克氏原螯虾(养殖水温22~28℃)的研究结果(孟晶等,2016),这可能是由于低温需要较高的脂肪含量来满足生长,而本实验的养殖水温(25~30℃)较高。此外,本结果也低于15.46 g的克氏原螯虾亲虾的研究结果(彭迪等,2019),这可能与虾的生长阶段有关,亲虾需要更多脂肪来维持性腺发育及繁殖能力。

3.2 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉质构特性的影响

克氏原螯虾的去壳腹部肌肉是主要食用部位,其品质与经济价值密切相关,脂肪成分和脂肪沉积对肌肉的质地影响较大(Thakur *et al.*, 2002)。肌肉质构反映

了肌肉的组织状态和食用口感,蒸煮损失率反映了肌肉营养物质的损失率(Johnston *et al.*, 2000; 王靖等, 2021)。本研究表明,当饲料脂肪水平高于10.19%时,会显著降低肌肉的质构指标,增大营养损失,进而降低了其食用口感和营养成分。马睿(2014)对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的研究发现,饲料中适当的脂肪含量可显著提高肌肉硬度和持水力,而过低或过高的脂肪含量则会降低肌肉品质;吴凡等(2018)通过研究不同脂肪水平对中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)肉质的影响,发现高脂饲料会降低肌肉硬度、黏性和咀嚼性,进而降低肌肉嫩度。以上结果均与本结果一致,其原因可能是,不同的饲料脂肪含量通过影响肌肉脂肪的沉积和效率,进而影响肌肉脂肪含量,高脂饲料会降低肌肉的食用口感。

3.3 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾肌肉营养品质的影响

肌肉常规营养成分的含量是评价虾类品质的重要指标(万金娟等, 2020)。本研究表明,饲料脂肪含量的增加可显著增加克氏原螯虾肌肉的粗脂肪含量,

降低肌肉粗蛋白含量,其原因可能是高脂饲料可促进虾体粗脂肪沉积,提高蛋白质利用率,进而降低肌肉蛋白质的沉积(陈伟兴等,2012;何亚丁等,2013),对澳大利亚红螯虾(*Cherax quadricarinatus*)(Zhu *et al.*, 2013)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(Du *et al.*, 2005)、白鲈鱼(*Atractoscion nobilis*)(Lopez *et al.*, 2006)的研究均证实此结果。

克氏原螯虾的风味与脂肪酸和氨基酸的组成和含量密切相关,且不饱和脂肪酸和鲜味氨基酸的含量越高,风味越佳(Wang *et al.*, 2020; 罗雅婷等, 2021)。肌肉脂肪酸受饲料脂肪酸组成的显著影响,肌肉脂肪酸组成是饲料种类和体内代谢的结果(郑建明等, 2019)。本研究中,肌肉的 Σ PUFA、EPA和DHA的含量在L5组最高,均在L2、L3和L4组间无显著差异。这可能是由于饲料中脂肪含量影响虾对不同脂肪酸的消化吸收,影响虾体脂肪酸的沉积及组成,因L5组饲料中鱼油含量最多,EPA和DHA含量高,进而显著增加了肌肉中EPA和DHA含量。结果表明,饲料中适宜的脂肪含量可以有效提高克氏原螯虾幼虾的营养价值,还能增加肌肉风味。

本研究在克氏原螯虾肌肉中均检出18种氨基酸,其中,必需氨基酸8种,非必需氨基酸10种,说明实验虾肌肉氨基酸组成种类齐全。本研究中,当饲料脂肪含量为13.02%时,会显著降低 Σ FAA含量。类延菊等(2020)研究发现,洞庭青鲫(*Carassius auratus* var. *Dongtingking*)肌肉的FAA含量随着脂肪水平增加而降低,降低肌肉风味,与本研究结果相吻合。肉质评价分析中,呈鲜味的谷氨酸和天门冬氨酸,呈甘味的甘氨酸和丙氨酸是主要的鲜味氨基酸,决定了肌肉的鲜美程度和口感(李赵嘉等,2019;周剑等,2021)。本研究中,饲料脂肪水平显著影响Ala和Asp含量,当饲料脂肪水平高于10.19%时,会显著降低Ala含量;当饲料脂肪水平高于13.02%时,会显著降低Asp含量。其原因可能是饲料中一定的脂肪含量对提升肌肉的Asp和Ala含量有所帮助,而高脂饲料反而会有抑制作用。在不影响克氏原螯虾肌肉品质的基础上,克氏原螯虾饲料的脂肪含量应不超过10.19%为宜。

4 结论

本研究条件下,根据特定生长率折线回归分析,得出饲料中适宜脂肪水平为6.82%;当饲料脂肪水平高于10.19%时,会显著降低克氏原螯虾肌肉的营养价值、食用口感、鲜美程度及风味。综合各项因素分析,建议克氏原螯虾幼虾饲料中脂肪含量为6.82%~10.19%。

参 考 文 献

- CAI F J, WU Z J, HE N, *et al.* Research progress in invasion ecology of *Procambarus clarkia*. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(1): 124–132 [蔡凤金, 武正军, 何南, 等. 克氏原螯虾的入侵生态学研究进展. 生态学杂志, 2010, 29(1): 124–132]
- CAI W C, JIANG G Z, LI X F, *et al.* Effects of complete fish meal replacement by rice protein concentrate with or without lysine supplement on growth performance, muscle development and flesh quality of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Aquaculture Nutrition, 2018, 24(1): 481–491
- CHEN J M, WEI H, SHEN H, *et al.* Lipid content and fatty acid composition in hepatopancreas and ovaries of *Procambarus clarkii* during ovarian maturation. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1278–1284 [陈金民, 魏华, 沈竑, 等. 克氏原螯虾卵巢发育时期组织脂肪含量及脂肪酸组成. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1278–1284]
- CHEN W X, LIU Q Z, FAN Z T, *et al.* Recent advances in research on meat quality evaluation and influencing factor of fish. Meat Research, 2012, 26(10): 34–40 [陈伟兴, 刘清振, 范兆廷. 鱼类肉质评价及影响因素研究进展. 肉类研究, 2012, 26(10): 34–40]
- DU Z Y, LIU Y J, TIAN L X, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture Nutrition, 2005, 11(2): 139–146
- HE X L, LIU M M, ZHU S C, *et al.* Effects of dietary protein levels on the growth, ovarian development and biochemical composition of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 158–166 [何先林, 柳梅梅, 朱筛成, 等. 饲料中蛋白水平对三疣梭子蟹雌体生长、卵巢发育和生化组成的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 158–166]
- HE Y D, HUA X M, ZHAO C Y, *et al.* Fat requirement and optimal dietary fat to carbohydrate ratio for red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(5): 1017–1024 [何亚丁, 华雪铭, 赵朝阳, 等. 克氏原螯虾的脂肪需求量及饲料中脂肪与糖类适宜比例的研究. 动物营养学报, 2013, 25(5): 1017–1024]
- HUI W J, CAI M L, WANG A M, *et al.* Effects of feeding frequency on meat content and growth performance of *Procambarus clarkii*. China Feed, 2020(23): 77–80, 106 [惠文杰, 蔡明浪, 王爱民, 等. 不同投饲频率对克氏原螯虾含肉率及生长性能的影响. 中国饲料, 2020(23): 77–80, 106]
- HUO Y W, JIN M, ZHOU P P, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. Aquaculture, 2014, 434: 151–158
- JOHNSTON I A, ALDERSON R, SANDHAM C, *et al.* Muscle

- fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2000, 189(3/4): 335–349
- LEI Y J, YAN J, TANG Z T, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance and flesh quality of juvenile *Carassius auratus* var. Dongtingking. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5839–5849 [类延菊, 晏锦, 唐忠天, 等. 饲料脂肪水平对洞庭青鲫幼鱼生长性能及肉品质的影响. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5839–5849]
- LI Z J, ZHEN Z Y, ZUO Y M, *et al.* Analysis and evaluation on nutritional components in muscle of *Procambarus clarkii* in Rice Area of Eastern Hebei. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(20): 206–209 [李赵嘉, 郑振宇, 左永梅, 等. 冀东稻区克氏原螯虾肌肉营养成分分析及评价. *安徽农业科学*, 2019, 47(20): 206–209]
- LOPEZ L M, TORRES A L, DURAZO E, *et al.* Effects of lipid on growth and feed utilization of white seabass (*Atractoscion nobilis*) fingerlings. *Aquaculture*, 2006, 253(1/2/3/4): 557–563
- LU Y P, WANG L, ZHANG X X, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth, muscle composition, activities of digestive enzyme and immunity of juvenile red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Feed Industry*, 2018, 39(24): 17–23 [鲁耀鹏, 汪蕾, 张秀霞, 等. 饲料脂肪水平对红螯螯虾幼虾生长、肌肉组分、消化酶活力和免疫力的影响. *饲料工业*, 2018, 39(24): 17–23]
- LUO Y T, LIU Y, LIU J M, *et al.* Analysis and evaluation on nutritional components in muscle of *Procambarus clarkii* in Rice Area of Eastern Hebei. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4592–4603 [罗雅婷, 刘益, 刘金梦, 等. 湖南省稻田养殖的不同规格克氏原螯虾的肌肉营养成分分析. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4592–4603]
- MA R. Preliminary study on relationship between nutrition and fish quality of farmed large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 [马睿. 营养与养殖大黄鱼品质之间关系的初步研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014]
- MENG J, WANG Z X, WANG H W. The effects of dietary lipid levels on the growth, body composition and fatty acid composition of *Procambarus clarkii*. *Journal of Aquaculture*, 2016, 37(7): 19–26 [孟晶, 王中霞, 汪海卫. 日粮脂肪水平对克氏原螯虾的生长、体组成及脂肪酸组成的影响. *水产养殖*, 2016, 37(7): 19–26]
- PENG D, CHEN X R, WEN H, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth performance, muscle composition, reproductive performance and hemolymph biochemical indices of *Procambarus clarkii* broodstock. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(10): 2175–2185 [彭迪, 陈效儒, 文华, 等. 饲料脂肪水平对克氏原螯虾亲虾生长性能、肌肉成分、繁殖性能以及血淋巴生化指标的影响. *水产学报*, 2019, 43(10): 2175–2185]
- RODRIGUEZ-GONZALEZ H, HERNANDEZ-LLAMAS A, GARCIA-ULLOA M, *et al.* Effect of dietary protein and lipid levels on gonadal development of female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research*, 2013, 45(1): 80–86
- SI L G, ZOU L C, SHENTU J G, *et al.* Effects on different dietary lipid and protein levels on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of freshwater shrimp *Macrobrachium nipponensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(2): 400–408 [斯烈钢, 邹李昶, 申屠基康, 等. 饲料添加不同脂肪及蛋白质水平对日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)生长性能、体成分及消化酶活力的影响. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 400–408]
- TACON A G J, METIAN M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 2008, 285(1/2/3/4): 146–158
- TANG X S. *Procambarus clarkii*. *Bulletin of Biology*, 2001(9): 19–20 [唐鑫生. 克氏原螯虾. *生物学通报*, 2001(9): 19–20]
- THAKUR D P, MORIOKA K, ITOH Y, *et al.* Influence of muscle biochemical constituents on the meat texture of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) at different anatomical locations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(13): 1541–1550
- TOCHER D R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, 11(2): 107–184
- WAN J J, CHEN Y M, SHAO J J, *et al.* Comparative analysis on muscle quality of red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*) cultured under different aquaculture modes in Xuyi Region. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(2): 965–972 [万金娟, 陈友明, 邵俊杰, 等. 盱眙地区不同养殖模式下克氏原螯虾肌肉品质的比较分析. *动物营养学报*, 2020, 32(2): 965–972]
- WANG J, YAO W X, LI X Q, *et al.* Dietary effects of *Enteromorpha prolifera* on growth performance and flesh quality of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(2): 246–254 [王靖, 姚文祥, 李小勤, 等. 饲料中添加浒苔对凡纳滨对虾生长性能和肌肉品质的影响. *水产学报*, 2021, 45(2): 246–254]
- WANG Z Y, ZU L, LI Q Q, *et al.* A comparative evaluation of the nutritional quality of *Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonica* (Brachyura, Varunidae). *Crustaceana*, 2020, 93(6): 567–585
- WEN B, JIANG Y, YUAN R, *et al.* Effects of dietary lipid sources on the survival, growth, body composition, antioxidant capacity and expression of antioxidant and pro-inflammatory genes in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) reared under three salinities. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11): 5307–5320
- WU F, LU X, WEN H, *et al.* Effects of different protein and lipid

- levels on the growth performance, muscle textural parameters, and genes expression in liver of *Pelodiscus sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(1): 47–54 [吴凡, 陆星, 文华, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对中华鳖生长性能、肌肉质构指标及肝脏相关基因表达的影响. *淡水渔业*, 2018, 48(1): 47–54]
- XU C, LI E, LIU Y, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, lipid metabolism and health status of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two salinities. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 204–214
- XU W N, LIU W B, SHEN M F, *et al.* Effects of different dietary protein and lipid level on growth performance, body composition and digestive enzyme activities of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 521–529 [徐维娜, 刘文斌, 沈美芳, 等. 饲料中不同蛋白质和脂肪水平对克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*) 生长性能、体组成和消化酶活性的影响. *海洋与湖沼*, 2011, 42(4): 521–529]
- YAN M Y, WANG H, HUANG X L, *et al.* Effects of different commercial feed on the growth, intestinal structure and digestive capacity of juvenile red swamp crayfish *Procambarus clarkia*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2021, 39(4): 433–439 [晏明瑶, 王浩, 黄小丽, 等. 不同饲料对克氏原螯虾幼虾生长、肠道结构和消化能力的影响. *四川农业大学学报*, 2021, 39(4): 433–439]
- YUN B A, XUE M, WANG J, *et al.* Effects of lipid sources and lipid peroxidation on feed intake, growth, and tissue fatty acid compositions of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture International*, 2013, 21(1): 97–110
- ZHANG J H, WANG S H, KOU X M, *et al.* Study on effect of dietary protein and lipid levels on growth of *Procambarus clarkii*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2012, 24(8): 88–93 [张家宏, 王守红, 寇祥明, 等. 饲料中蛋白质和脂肪水平对克氏原螯虾生长的影响研究. *江西农业学报*, 2012, 24(8): 88–93]
- ZHENG J M, ZHAO J J, CHEN S Q, *et al.* Growth and fatty acid composition of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*) fed diets with fish oil replaced by soybean oil. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 39–46 [郑建明, 赵捷杰, 陈四清, 等. 豆油替代鱼油对圆斑星鲽幼鱼生长和肌肉脂肪酸的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 39–46]
- ZHOU J, ZHAO Z M, HUANG Z P, *et al.* Comparison of nutrient components in muscles and hepatopancreas of pond- and paddy field-cultured *Procambarus clarkii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 162–169 [周剑, 赵仲孟, 黄志鹏, 等. 池塘和稻田养殖模式下克氏原螯虾肌肉和肝脏营养成分比较. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 162–169]
- ZHU H X, JIANG Q C, WANG Q, *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, hepatic enzyme activities, and digestive enzyme activities of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Journal of the World Aquaculture Society*, 2013, 44(2): 173–186

(编辑 陈 辉)

Effects of Dietary Lipid Levels on Growth Performance and Muscle Quality of Juvenile *Procambarus clarkii*

MO Cuiqin¹, HUANG Kai^{1①}, CAO Xinsheng², JIANG Linyuan^{3①},YU Kai¹, GUO Ruijie¹, WANG Chaonan¹

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China;

2. Tianjin Zanlan Technology Co., LTD., Tianjin 300000, China;

3. Fishery Technology Promotion Station of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China)

Abstract *Procambarus clarkii* Girard is an economically important cultured shrimp in China, and lipids are an important component of its raw feed materials. Studies have shown that adequate lipid content in feed can promote the health of aquatic animals, improve the utilization efficiency of feed protein, save protein, reduce feed costs, and reduce nitrogen emissions. Insufficient lipid content in feed leads to metabolic disorders in breeding animals, reduces the utilization rate of feed protein, and is accompanied by a deficiency of fat-soluble vitamins and essential fatty acids. However, a high fat content inhibits feeding and growth and leads to excessive fat deposition in the fish body, which decreases disease

① Corresponding author: HUANG Kai, E-mail: hkai110@163.com; JIANG Linyuan, E-mail: 253346541@qq.com

resistance and is not conducive to feed processing and storage. At present, studies on the dietary lipid content of *P. clarkii* have mainly focused on growth performance, biochemical indices, and conventional nutritional components of muscle; however, studies on muscle quality, amino acid composition, and content have not yet been reported. This study investigated the growth performance, muscle texture indices, nutritional components, and food flavor of *P. clarkii* by determining the effect of dietary lipid content on the growth performance and muscle quality of juveniles. The aim of this study was to provide a reference for the development of compound feed for juvenile *P. clarkii* and to provide a theoretical and scientific basis for rationally evaluating the effects of fat on the muscle quality of the species.

Five experimental diets with lipid levels of 2.86%, 5.11%, 7.67%, 10.19%, and 13.02% were prepared using fishmeal, soybean meal, and rapeseed meal as the main protein sources, and a mixture of fish oil and soybean oil in a ratio of 1:1 as the lipid source. A total of 600 juvenile *P. clarkii* with an initial body weight of (4.00 ± 1.00) g was randomly divided into five groups (L1, L2, L3, L4, and L5 groups) with three replicates per group and 40 shrimps per replicate. They were fed five groups of experimental diets at 6:00 and 19:30 each day and cultured for 60 days. The experiment was carried out in an aquaculture pond (square, $1.0 \text{ m} \times 1.0 \text{ m} \times 0.6 \text{ m}$) at the Guangxi University.

The results showed that as the dietary lipid level increased, the specific growth rate (SGR) and survival rate (SR) of juvenile *P. clarkii* first increased and then decreased and were the highest when the dietary lipid level was 7.67%. The feed conversion ratio (FCR) at first decreased before increasing again and that of the L3 group was significantly lower than that of the other groups ($P < 0.05$). Using the specific growth rate as an evaluation index, through broken-line analysis, the optimal dietary lipid level of juvenile *P. clarkii* was estimated as 6.82%. Dietary lipid levels had no significant effect on the moisture, crude protein, and ash contents in the muscle ($P > 0.05$). With the increase in dietary lipid levels, the cooking loss (CL) and crude lipid, polyunsaturated fatty acids (Σ PUFA), and total amino acid (Σ TAA) contents of the muscle showed an increasing trend. The content of eicosapentaenoic acid (EPA) in the L5 group was significantly higher than that in the other groups, and the docosahexaenoic acid (DHA) content in the L5 group was significantly higher than that in the L1 and L2 groups ($P < 0.05$). With increasing dietary lipid levels, muscle hardness, elasticity, cohesiveness, and gumminess decreased and there were no significant differences between the L1 and L3 groups ($P > 0.05$), whereas dietary lipid levels showed no significant difference in muscle saturated fatty acid (SFA) and monounsaturated fatty acid (MUFA) contents ($P > 0.05$). The contents of umami amino acids (Σ FAA), alanine (Ala), and aspartate (Asp) in the L5 group were significantly lower than those in the L1 group ($P < 0.05$).

Under the conditions of this study, within a suitable range of fat content, growth performance increased with increased fat content; however, the addition of excessive fat cannot promote growth. According to the broken-line regression analysis of the specific growth rate, the optimal dietary lipid level was 6.82%. When the dietary lipid level was higher than 10.19%, the deposition and efficiency of muscle fat, muscle fat content, and nutrient loss increased, and the muscle texture index and Asp and Ala contents significantly decreased. The nutritional value, taste, delicious degree, and flavor of the muscle of *P. clarkii* were significantly decreased. As it does not affect the muscle quality of the shrimp, the dietary lipid content should not exceed 10.19%.

Based on the analysis of various factors, the optimal dietary lipid content is beneficial to the healthy growth of juvenile *P. clarkii* and improves nutritional value and muscle quality. It is suggested that the dietary lipid supplemental level of juvenile shrimp should be 6.82%~10.19%. This study provides a theoretical basis for the scientific optimization of feed preparation for *P. clarkii* juvenile.

Key words *Procambarus clarkii*; Lipid level; Growth performance; Meat quality; Nutritional content

《渔业科学进展》投稿须知

《渔业科学进展》主要刊载水产领域各学科的基础理论和应用研究成果，设研究论文、研究简报，也刊载反映水产学科发展方向的优秀综述文章，但不接收第一作者为硕士生的综述。对于创新性高的论文，本刊承诺在最短时间内予以优先发表。经本刊审定录用的稿件均可在知网版优先发表，并视同正式发表。

期刊使用在线稿件处理系统 <http://www.yykxjz.cn>。请至本刊主页“作者登录”注册、登录，根据提示提交 Word 稿件。投稿前，请进行以下确认：

1. 该论文为作者原创，享有自主知识产权，无抄袭问题，无学术伪造，不涉及泄密。
2. 该论文的相关内容无一稿多投，也未在其他任何刊物上发表。
3. 该论文作者的署名及顺序经每位作者确认，属实且准确，作者之间无署名及排序纠纷。
4. 该论文的研究符合道德准则及学术伦理，并遵守国家相应的法律法规；该论文用做实验的动物享受了其应有的福利及人道处理。

审稿及发表事项

1. 本刊实行同行专家双盲审，您可推荐相关专家若干名，并列明专家姓名、单位、研究方向及邮箱等。
2. 论文经 2 位以上专家审阅、编委会审定，编辑部在 2 个月内将审稿意见反馈给作者，期间作者不得将该论文投往他刊。
3. 论文出版后将收取版面费，300 元/版(≤10 版)，450 元/版(>10 版)，如印刷彩图，费用另计。稿件刊登后酌付稿酬，并赠送 2~3 本当期期刊。

论文写作要求

1. 在摘要里需明确该论文的创新点 1~2 个。英文摘要的字数应不少于 800 单词，需详细描述研究背景、目的、方法、结果、结论及研究的意义，即将英文摘要撰写为一篇小论文，比中文摘要更详细、更丰富，“拥有与论文同等量的主要信息”。
2. 作者单位的中英文需对应，需写明系或学院全称，请写明各层次的重点实验室名称，并核实其准确性。
3. 在文稿首页的脚注处注明资助项目及编号(请同时提供中文和英文)，并注明第一作者的 E-mail 和通信作者的职称、E-mail。
4. 文章各部分的格式，请参考网站最新发表的文章，无需考虑文章的格式排版。
5. 物种在文中首次出现，应同时写出其拉丁文名。
6. 注意区分蛋白和基因的大小写、正斜体，蛋白用大写、正体，基因用小写、斜体。

7. 图的要求

- (1) 图中不同图例之间要易于区分，如较难区分，可制作彩图。
- (2) 图中所有内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中、英文双语。
- (3) 横、纵坐标需符合规范，包括中英文标目、单位(如有)。如：磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/(mg/L)
- (4) 图中的数据、方程等要与文中的描述一致。
- (5) 图件请插入论文 Word 文档的相应位置，供审稿专家审阅。
- (6) 投稿时，请将所有图的原始图打包，作为附件上传，方便排版时调整图中文字的字体和字号。线条图、柱状图等可提供原始软件制作的矢量图(图中文字可编辑)，如 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件。照片图可提供 ppt 文件，图中的线、点、箭头、文字等可编辑。

8. 表格的要求

- (1) 请制作成三线表(顶线、表头线、底线)。
- (2) 表题、表注等需用中、英文双语标注。
- (3) 表格中的数据精确度(小数点后的位数)保持一致，一般情况下，小数点后的数字不超过 3 位。

9. 参考文献的要求

- (1) 对国内外发表的相关论文，特别是近期的研究成果应充分引用。所有文献按字母顺序排列。
- (2) 中文参考文献需列出对应英文信息，请从数据库查阅其英文题目、期刊名称等。
- (3) 文中提及的文献需和文后列出的文献相对应，请仔细核对：正文中引用的文献，是否在正文后的参考文献部分中列出；参考文献部分中列出的，是否已在正文中引用。

(4) 参考文献的卷、期(如有)、页码均需详细列出。参考文献的作者需列出前 3 位。英文参考文献，请注意区分外国作者的 Last name 和 First name，姓在前，名在后，名用缩写。英文的姓名所有字母均大写，名的两个字母之间空一格。英文刊名请使用全称。

《渔业科学进展》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 包振民 BAO Zhenmin 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	叶乃好 YE Naihao	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰) REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李军(美) LI Jun	李纯厚 LI Chunhou
李健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng	张国范 ZHANG Guofan
陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美) CHEN Yong	邵长伟 SHAO Changwei	林洪 LIN Hong
周永灿 ZHOU Yongcan	单秀娟 SHAN Xiujuan	赵宪勇 ZHAO Xiaoyong	俞志明 YU Zhiming
秦启伟 QIN Qiwei	秦松 QIN Song	徐跑 XU Pao	徐皓 XU Hao
黄健 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	崔利锋 CUI Lifeng	董云伟 DONG Yunwei
解绶启 XIE Shouqi	谭志军 TAN Zhijun	薛长湖 XUE Changhu	薛清刚 XUE Qinggang

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 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44卷 第2期 2023年4月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.44 No.2 Apr. 2023

主管单位	中华人民共和国农业农村部	Administrated	by	Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China
主办单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产学会	Sponsored	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences China Society of Fisheries
出版单位	科学出版社	Published	by	Science Press
	地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717			Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
编辑单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所	Edited	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences
	地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071			Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
	电话: 0532-85833580			http://www.yyqxjz.cn; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn
	http://www.yyqxjz.cn			
	E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn			
主编	金显仕	Editor-in-Chief		Jin Xianshi
印刷	青岛国彩印刷股份有限公司	Printed	by	Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
国内发行	中国邮政集团公司山东省分公司	Domestic Distributed	by	China Post Group Corporation Shandong Branch
订购	全国各地邮政局	Subscription		Post Offices All Over China
国外发行	中国国际图书贸易总公司	Overseas Distributed	by	China International Book Trading Corporation
	地址: 北京399信箱 邮编: 100044			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



中国邮政订阅二维码

ISSN 2095-9869
9 772095 986231 04>