

中国科技核心期刊
中文核心期刊

ISSN 1000-7075
CN 37-1466/S

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第35卷

VOL. 35

第6期 NO. 6

2014

中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会
科学出版社

主办
出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第 35 卷 第 6 期

2014 年 12 月

中国科技核心期刊

中文核心期刊

全国优秀农业期刊

中国水产核心期刊

中文科技期刊数据库来源期刊

中国期刊全文数据库(CJFD)来源期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

中国生物学文献数据库来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学和渔业文摘》(ASFA)收录期刊

目 录

研究论文

- 人工湿地净化海水养殖外排水效果与微生物群落分析.....王加鹏 崔正国 周 强 马绍赛 曲克明 毛成全 (1)
- 东海中部日本鲭(*Scomber japonicus*)产卵群体繁殖力特征.....李建生 胡 芬 严利平 张 辉 (10)
- 海州湾大竹蛏资源保护区海水环境质量评价.....夏 斌 马菲菲 陈碧鹃 崔 毅 孙雪梅 曲克明 (16)
- 青岛陆源排污口邻近海域异养细菌的组成与分布.....刘 霜 李永霞 刘旭东 崔正国 王亚楠 孙蓓蓓 宋 帅 (23)
- 绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)对 4 种大型水母的捕食行为.....刘春胜 庄志猛 陈四清 刘长琳 赵 鹏 陈昭廷 (30)
- 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)生长性状的遗传参数估计.....刘永新 周 勤 张红涛 姜长波 张福崇 (39)
- 鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)生长后期对苏氨酸需要量.....窦秀丽 梁萌青 郑珂珂 王新星 (45)
- 甘露寡糖对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)稚鱼生长、肠道发育和非特异性免疫水平的影响.....于朝磊 常 青 吕云云 (53)
- 罗非鱼源无乳链球菌溶血素基因体外表达及其免疫原性.....王 蓓 李桂欢 王 培 汤菊芬 鲁义善 吴灶和 简纪常 (60)
- 盐度对寄主暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)存活影响及其对车轮虫的杀灭作用.....刘金海 张 正 王印庚 郭正龙 武宁宁 (68)
- 氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性.....葛红星 李 健 陈 萍 梁忠秀 任 海 李东利 (76)
- 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的克隆及 mRNA 表达量的相对定量.....刘 红 崔 俊 颜 婕 蔡生力 (83)
- 拟沼螺(*Assimineia* sp.)营养成分分析与评价.....李 涛 马 牲 徐 涛 (90)
- 马氏珠母贝转录组数据的重新组装.....陈 琼 顾志峰 王爱民 战 欣 石耀华 (97)
- 基于遗传连锁图谱筛选虾夷扇贝性别相关 AFLP 分子标记的方法.....周丽青 杨爱国 刘志鸿 王清印 吴 彪 孙秀俊 郑利兵 郑言鑫 (103)
- 斧文蛤(*Meretrix lamarchii*)形态性状对体质量的影响效果分析.....张嘉丽 王庆恒 邓岳文 杜晓东 (110)
- 两株海洋微生物抗肿瘤代谢产物的筛选及其菌种鉴定.....衣 尧 郑兰红 陈世建 盛 军 孙 谧 (114)
- 海带岩藻聚糖硫酸酯电渗析分离工艺.....姜晓东 汪秋宽 李鹏亮 何云海 宋悦凡 任丹丹 侯 丽 (120)
- 紫菜中六六六、滴滴涕和扑草净的检测.....周明莹 曲克明 陈碧鹃 谢寒冰 王联珠 邵 会 顾晓慧 (128)
- 研究综述
- 最佳遗传贡献理论及其在水产动物选择育种中的应用前景.....栾 生 隋 娟 孟宪红 罗 坤 曹宝祥 孔 杰 (133)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.35 No.6 December 2014

Removal Effect of Mariculture Wastewater and Analysis of Microbial Communities in Constructed Wetlands	
..... WANG Jiapeng, CUI Zhengguo, ZHOU Qiang, MA Shaosai, QU Keming, MAO Chengquan	(1)
The Fecundity of Chub Mackerel (<i>Scomber japonicus</i>) Spawning Stocks in the Central East China Sea	
..... LI Jiansheng, HU Fen, YAN Liping, ZHANG Hui	(10)
Environmental Quality Evaluation of <i>Solen grandis</i> Resources Protection Area in Haizhou Bay	
..... XIA Bin, MA Feifei, CHEN Bijuan, CUI Yi, SUN Xuemei, QU Keming	(16)
Diversity and Distribution of Marine Heterotrophic Bacteria Nearby Qingdao Land-Based Drainage Discharge Outlets	
..... LIU Shuang, LI Yongxia, LIU Xudong, CUI Zhengguo, WANG Yanan, SUN Beibei, SONG Shuai	(23)
<i>Navodon septentrionalis</i> Predation of Four Species of Giant Jellyfish	
..... LIU Chunsheng, ZHUANG Zhimeng, CHEN Siqing, LIU Changlin, ZHAO Peng, CHEN Zhaoting	(30)
Estimation of Genetic Parameters of Growth Traits of Redfin puffer (<i>Takifugu rubripes</i>)	
..... LIU Yongxin, ZHOU Qin, ZHANG Hongtao, JIANG Changbo, ZHANG Fuchong	(39)
Threonine Requirement of Japanese Seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>) in Mature Stages	
..... DOU Xiuli, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, WANG Xinxing	(45)
Effects of Mannan Oligosaccharide on the Growth, Intestinal Development and Non-Specific Immunity of Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i> Günther) Postlarvae	
..... YU Chaolei, CHANG Qing, Lǚ Yunyun	(53)
Expression and Immunogenicity Analysis of Hemolysin Gene in <i>Streptococcus agalactiae</i> Isolated from <i>Oreochromis niloticus</i>	
..... WANG Bei, LI Guihuan, WANG Pei, TANG Jufen, LU Yishan, WU Zaohe, JIAN Jichang	(60)
The Effects of Salinity on the Survival of <i>Takifugu obscurus</i> and Annihilation of Its Parasite, <i>Trichodina</i> sp.	
..... LIU Jinhai, ZHANG Zheng, WANG Yingeng, GUO Zhenglong, WU Ningning	(68)
The Immune Response of <i>Litopenaeus vannamei</i> and Its Susceptibility to <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Under Stress Caused by Ammonia Nitrogen at Different Concentrations	
..... GE Hongxing, LI Jian, CHEN Ping, LIANG Zhongxiu, REN Hai, LI Dongli	(76)
Cloning and Relative Quantification Analysis of Expression of the Partial Vitellogenin Receptor cDNA/mRNA of the Crayfish <i>Procambarus clarkii</i>	
..... LIU Hong, CUI Jun, YAN Jie, CAI Shengli	(83)
Nutritional Analysis and Appraisalment of <i>Assiminea</i> sp.	
..... LI Tao, MA Shen, XU Tao	(90)
Data Reassembling Reveals More Information of Transcriptome for <i>Pinctada fucata martensii</i> Dunker	
..... CHEN Qiong, GU Zhifeng, WANG Aimin, ZHAN Xin, SHI Yaohua	(97)
Screening the Sex-Related AFLP Molecular Markers in <i>Patinopecten yessoensis</i> Based on the Genetic Linkage Map	
..... ZHOU Liqing, YANG Aiguo, LIU Zhihong, WANG Qingyin, WU Biao, SUN Xiujun, ZHENG Libing, ZHENG Yanxin	(103)
Effects of Morphological Traits on the Weight of <i>Meretrix lamarchii</i>	
..... ZHANG Jiali, WANG Qingheng, DENG Yuewen, DU Xiaodong	(110)
Screening of Antitumor Metabolites From Two Marine Microorganisms and Their Strain Identification	
..... YI Yao, ZHENG Lanhong, CHEN Shijian, SHENG Jun, SUN Mi	(114)
Separating Fucoidan From <i>Laminaria japonica</i> Using Electrodialysis Technology	
..... JIANG Xiaodong, WANG Qiukuan, LI Pengliang, HE Yunhai, SONG Yuefan, REN Dandan, HOU Li	(120)
Residual Determination Method of HCHs, DDTs and Prometryn in Porphyra	
..... ZHOU Mingying, QU Keming, CHEN Bijuan, XIE Hanbing, WANG Lianzhu, SHAO Hui, GU Xiaohui	(128)
Optimum Contribution Theory and the Prospect of Its Application in Selective Breeding in Aquaculture	
..... LUAN Sheng, SUI Juan, MENG Xianhong, LUO Kun, CAO Baoxiang, KONG Jie	(133)

人工湿地净化海水养殖外排水效果 与微生物群落分析*



王加鹏^{1,2} 崔正国^{2①} 周强^{1,2} 马绍赛² 曲克明² 毛成全³

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

摘要 利用实验室规模的复合垂直流人工湿地系统来处理海水养殖外排水,探讨了人工湿地对外排水中主要污染物指标氨氮、磷酸盐和 COD 的去除效果,并利用变形梯度凝胶电泳技术(DGGE)分析了人工湿地内部微生物的群落组成和结构特点。结果显示,人工湿地对海水养殖外排水中的氨氮、磷酸盐和 COD 去除效果显著,平均去除率分别为(92.82±3.27)%、(72.53±2.31)%、(66.04±8.23)%;人工湿地系统内微生物组成较为丰富,且不同位置存在着种属相同、数量不同的生态幅广泛的优势种;人工湿地下行流池微生物多样性指数(H')比上行流池高,且沿水流方向呈下降趋势;人工湿地系统中距离越远相似性系数越小;海水养殖外排水人工湿地处理系统微生物种群包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和厚壁菌门(Firmicutes),其中,主要的优势菌群属于变形菌门和拟杆菌门。

关键词 人工湿地; 微生物; 海水养殖外排水; 净化效果; PCR-DGGE 技术

中图分类号 X714 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0001-09

人工湿地污水处理系统源于对自然湿地的模拟,它利用基质、植物和微生物构成的复合系统通过物理、化学和生物三重协同作用来实现对污水的净化作用(王世和, 2007)。由于人工湿地净水技术具有处理效果好、投入少、能耗小、管理方便、生态效益显著的优点,目前已被广泛应用于处理生活污水(宣亚红等, 2008; Kivaisi, 2001)、工业废水(籍国东等, 2002; Comin *et al*, 1997)、农业污水(Rivera *et al*, 1997)、养殖废水(于涛等, 2008)等各种类型的污水,但在处理海水养殖外排水方面的研究较为少见。微生物在净水方面发挥着至关重要的作用。一方面,微生物可直接同化吸收污水中的营养物质供自身生长需要;另一方面,微生物充当着多种营养物质形态转化和矿化的主要执行者的角色(黄德锋等, 2007; Dong *et al*, 2010)。

因此,了解人工湿地中微生物群落的结构组成和分布状况,对深入理解人工湿地系统中污染物的去除机理具有重要意义。

现代分子生物学技术 PCR-DGGE 是一种分析微生物群落的有效工具。PCR-DGGE 技术将 PCR 扩增(聚合酶链式反应)和 DGGE(变性梯度凝胶电泳)结合,利用不同 DNA 片段的溶解性质不同,在胶中不同位置解链分离的原理,在分子生物学方面表征微生物群落的结构组成及分布状况。相对于稀释平板、MPN 等传统的微生物分离培养法,PCR-DGGE 技术具有快速、准确、客观的优点,能更好的反映微生物的种群结构(周元清等, 2011; Ferris *et al*, 1996; 朱砺之等, 2012)。作者在研究海水养殖外排水人工湿地处理系统中氮、磷和 COD 去除效果的基础上,采

* 国家自然科学基金青年基金(31101906)和国家科技支撑计划课题(2011BAD13B04)共同资助。王加鹏, E-mail: wjpeng1989@126.com

① 通讯作者: 崔正国, 副研究员, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-01-01, 收修改稿日期: 2014-03-24

用 PCR-DGGE 技术分析了系统内微生物群落的结构组成、立体分布状况,以期探讨人工湿地中微生物的净化机制奠定理论基础。

1 试验装置与材料

构建了实验室规模的复合垂直流人工湿地系统(图1)。人工湿地装置由 PVC 材料制作,主要包括下行流池和上行流池,长 60 cm、宽 40 cm、高 70 cm,出

水口比进水口低 10 cm。综合考虑对污染物的去除效果、可能引起的堵塞问题及材料价格因素,选用了表面粗糙、粒径较大的珊瑚石和煤渣作为人工湿地基质。装置自下而上依次填充了粒径依次减小的珊瑚石(粒径 3–5 cm)、煤渣(粒径 2–4 cm)和珊瑚石(粒径 0–3 cm)。人工湿地植物为耐盐碱、耐潮汐淹没、繁殖力强、根系发达的互花米草(肖强等,2005),采自烟台海阳市某海区滩涂,种植密度约为 64 株/m²。

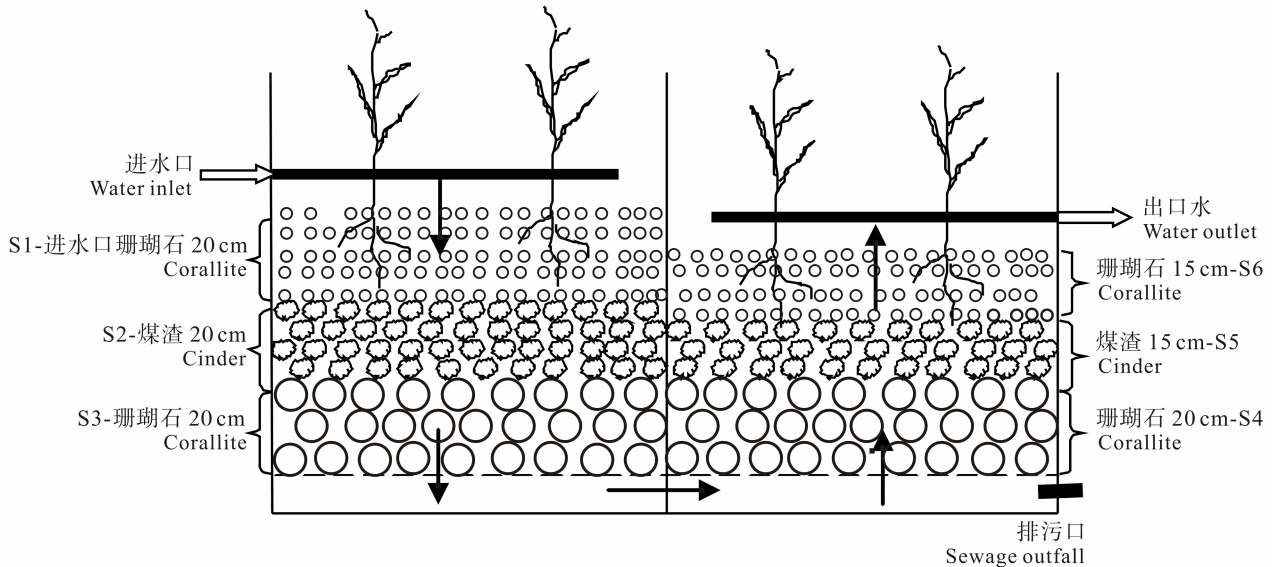


图1 复合垂直流人工湿地系统

Fig.1 Constructed integrated vertical flow wetland

2 试验方法

2.1 人工湿地净化海水养殖外排水效果

2.1.1 试验设计 人工湿地处理的海水养殖外排水系人工配制,主要由海水、粉碎的饵料添加适量氯化铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和葡萄糖混合配置而成。主要水质指标为:氨氮为 0.29–0.35 mg/L;磷酸盐为 0.60–0.70 mg/L;COD 为 7.38–9.42 mg/L。在研究期间,出水理化指标波动范围为:温度为 27.68–29.62℃,平均为(28.70±0.72)℃;盐度为 31.30–33.07,平均为 32.38±0.67; pH 为 7.46–7.67,平均为 7.62±0.03;DO 为 1.67–3.00 mg/L,平均为(2.32±0.61) mg/L。人工配置的模拟海水养殖外排水由人工湿地装置进水口进入,先后经过下行流池和上行流池后依靠重力作用由出水口流出,收集后再经水泵提升进入装置进行循环处理,日循环为 8–10 个量程,水力停留时间约为 1.5 h。装置预运行 60 d 达到稳定后,以 7–8 d 为一循环周期,进行了 5 个周期的处理,期间每天监

测出水各水质指标的变化情况。

2.1.2 水质监测方法及数据分析 依据《海洋监测规范》(GB 12763.4-2007)进行水质指标的检测。氨氮:次溴酸盐氧化法;磷酸盐:磷钼蓝分光光度法;COD:碱性高锰酸钾法。温度、盐度、pH、DO 采用 YSI 多参数水质分析仪进行测定。用 Origin 8.0 软件进行作图和数据分析。

2.2 人工湿地基质的 PCR-DGGE 分析

2.2.1 样品采集 在人工湿地系统净化海水养殖外排水效果试验后,采集系统基质进行 PCR-DGGE 分析,以探究人工湿地内部的微生物群落结构组成及其演替变化情况。从图 1 可以看出,采集下行流池的表层(0–20 cm,样品编号 S1)、中层(20–40 cm,样品编号 S2)、底层(40–60 cm,样品编号 S3)和上行流池的底层(30–50 cm,样品编号 S4)、中层(15–30 cm,样品编号 S5)、表层(0–15 cm,样品编号 S6),采集的各层样品充分混匀。在进行 PCR-DGGE 分析之前,

各层样品置于-20℃的冰箱中贮存。

2.2.2 样品 DNA 的提取与纯化 采集的样品置于灭菌后的锥形瓶中, 加入 200 ml 灭菌后的蒸馏水, 超声波清洗 10 min, 恒温振荡器以 120 r/min 振荡 30 min, 取悬浮液在 8000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀用于 DNA 提取。DNA 提取采用 CTAB 法, 具体方法参照赵兴青等(2006)、Miller 等(1999)文献进行。采用北京天根生化科技有限公司生产的试剂盒对 DNA 粗提取液进行了纯化。

2.2.3 PCR 扩增 以样品基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R(表 1)扩增样品 16S rDNA 高变区序列, 其中 PCR 扩增仪为德国 Biometra 公司生产的 T-gradient 梯度 PCR 仪, 凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司生产的 Gel-Doc 2000 凝胶成像系统, PCR 产物采用 OMEGA 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收。

表 1 引物信息
Tab.1 PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence
338F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
GC338F	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGG GGCGCGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG

PCR 扩增体系(50 μl): 10× PCR Buffer 5 μl; dNTP(2.5 mmol/L) 3.2 μl; rTaq(5 U/μl) 0.4 μl; GC-338F(20 mmol/L) 1 μl; 518R(20 mmol/L) 1 μl; 模板 DNA 50 ng; 补 ddH₂O 至 50 μl。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 55℃复性 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 最终 72℃延伸 10 min。

2.2.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

取 10 μl 扩增后的 PCR 产物进行变形梯度凝胶电泳(DGGE)分析。采用变形梯度为 35%–55%、浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶(100%化学变性剂中含有尿素 7 mol/L 和 40%的丙烯酰胺)在 1×TAE 缓冲液中 150 V、60℃恒温恒压下电泳 5 h。

变形梯度凝胶电泳(DGGE)完毕后, 采用银染法对凝胶进行染色, 染色完成后, 利用 Gel-Doc2000 凝胶成像系统进行成像观察、拍照。利用软件 Quantity one 分析图谱。

2.2.5 DGGE 图谱中优势条带的回收与测序 用灭菌的手术刀切下待回收的 DGGE 条带, 采用 OMEGA 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收目的条带。然后以 2 μl 回收产物为模板, 338F/518R 为引

物进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系(50 μl): 10× PCR Buffer 5 μl; dNTP(2.5 mmol/L) 3.2 μl; rTaq(5 U/μl) 0.4 μl; 338F (20 mmol/L) 1 μl; 518R(20 mmol/L) 1 μl; 模板 DNA 1 μl; 补 ddH₂O 至 50 μl。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 最后, 72℃延伸 10 min。

将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 并转化至 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 进行序列测定。将所测条带的序列在 GenBank 数据库中用 Blast 进行检索分析。

2.2.6 数据分析 DGGE 图谱采用 Quantity one 软件对每个样品的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析。由(1)式计算每个样品中的微生物多样性指数 H' (Shannon-Wiener 指数), 由(2)式计算各个样品间的相似性系数 C_s (Dice coefficient):

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i / N) \ln(N_i / N) \quad (1)$$

式中, p_i 为样品中单一条带的强度在该样品所有条带总强度中所占的比率, N 为泳道中所有条带的光密度和, N_i 为第 i 个条带的光密度值。 S 是某样品中所有条带数目的总和。

$$C_{sAB} = 2L_{AB} / (L_A + L_B) \times 100 \quad (2)$$

式中, C_{sAB} 为泳道 A 和泳道 B 之间的相似性系数; L_{AB} 为泳道 A 与泳道 B 上位置相同的条带数; L_A 为泳道 A 上的条带数; L_B 为泳道 B 上的条带数。

3 结果与讨论

3.1 人工湿地处理海水养殖外排水效果

氮在人工湿地中存在 7 种价态的多种转换, 其迁移和转化过程复杂, 涉及的主要机理有基质吸附、植物吸收、氨的挥发作用、氮的固定、氨化、埋藏及微生物的硝化反硝化作用等(Reddy *et al*, 1997; Sun *et al*, 2007; Tanner *et al*, 2002; Vymazal *et al*, 2007)。人工湿地对氨氮的去除主要是通过微生物的作用, 少部分是通过植物同化吸收、基质吸附作用去除。有机氮可通过微生物的氨化作用转化为氨氮, 氨氮再经硝化作用转化为硝态氮, 硝态氮进一步被反硝化细菌通过反硝化作用还原成气态氮从系统中去除(周群英等, 2000)。本研究运行期间, 进水氨氮浓度范围为 0.29–0.35 mg/L, 平均为(0.33±0.03) mg/L; 在处理 6 d 之后, 出水氨氮浓度基本达到稳定, 范围为 0.008–0.04 mg/L, 平均为

(0.02 ± 0.01) mg/L; 去除率范围为 87.61%–97.76%, 平均为(92.82 ± 3.27)%(图 2), 去除效果极佳。

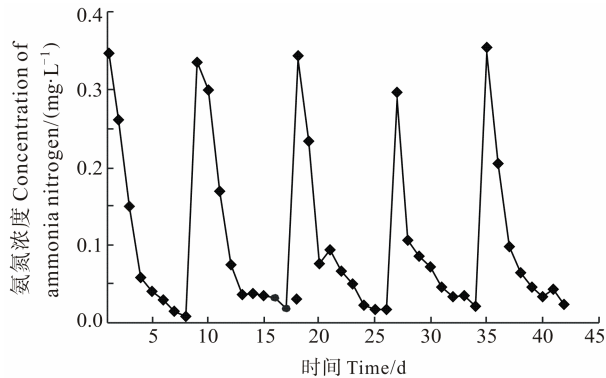


图 2 人工湿地对氨氮净化效果

Fig.2 Effects of the constructed wetland on the removal of ammonia nitrogen

人工湿地对磷的去除主要通过基质吸附沉降、植物同化吸收和微生物降解 3 条途径, 其中基质的吸附和沉降是最主要途径, 70%–87%的磷都是通过这种途径去除的(夏宏生等, 2005; Reddy *et al.*, 1998)。不同的基质对磷的吸附能力不同, 基质含有的 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等金属离子也可与磷酸盐发生化学沉淀作用而将其去除(Al-Omari *et al.*, 2003)。本研究采用对磷酸盐有很好的吸附效果的煤渣(Sakadevan *et al.*, 1998)和含有丰富钙质的珊瑚石作为基质, 显示出很好的去除效果。研究期间, 进水磷酸盐浓度范围为 0.60–0.70 mg/L, 平均为(0.65 ± 0.05) mg/L; 每天出水磷酸盐浓度范围为 0.14–0.24 mg/L, 平均为(0.18 ± 0.02) mg/L; 去除率范围为 65.74%–75.98%, 平均为(72.53 ± 2.31)%(图 3)。有研究表明(Yli-Halla *et al.*, 1995; 赵海洋等, 2006), 土壤对磷的作用过程中存在着吸附–解吸平衡点(EPC_0), 若水中的磷酸盐浓度高于 EPC_0 , 土壤会

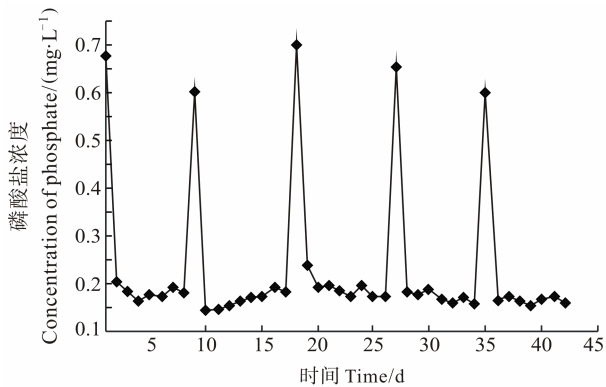


图 3 人工湿地对磷酸盐净化效果

Fig.3 Effects of the constructed wetland on the removal of phosphate

吸附水中的磷; 反之, 土壤则释放磷。因此, 土壤对磷的吸附–解吸是一个动态平衡过程。本研究中人工湿地装置出水磷酸盐浓度稳定在 0.2 mg/L 左右, 可能是人工湿地基质与处理水之间的磷酸盐浓度达到动态平衡状态, 基质无法再吸附沉降水中的磷酸盐。

COD 是衡量水体中好氧有机物多少的一个重要指标, 可直接反映水体的受污染程度(雷衍之等, 2004; 过锋等, 2012; 陈芳等, 2013)。人工湿地对有机物具有较好的去除效果, 水体中的不溶性有机物可通过湿地中基质的过滤沉淀而被截留下来, 进而被部分兼性或厌氧微生物利用; 可溶性有机物则通过基质和植物根系表面形成的生物膜吸附、分解及代谢作用去除(王晖文等, 2010; Zhu *et al.*, 1995)。故微生物的代谢作用是人工湿地去除水体中有机物的主要机制。在本研究期间, 进水 COD 浓度范围为 7.38–9.42 mg/L, 平均为(8.41 ± 0.80) mg/L; 每天出水 COD 浓度范围为 1.83–4.78 mg/L, 平均为(2.86 ± 0.73) mg/L; 去除率范围为 40.84%–77.63%, 平均为(66.04 ± 8.23)%。出水 COD 平均浓度小于 3 mg/L, 达到第二类海水水质标准(图 4)。

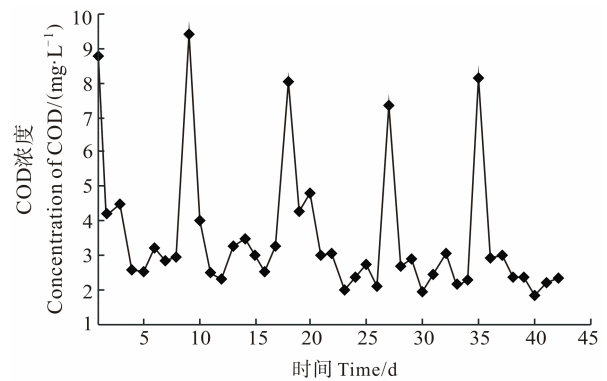


图 4 人工湿地对 COD 净化效果

Fig.4 Effects of the constructed wetland on the removal of COD

3.2 人工湿地基质的 PCR-DGGE 分析

3.2.1 细菌的 16S rDNA V3 区 PCR 扩增 以样品基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列, 得到长度约为 230 bp 的 DNA 片段。从图 5 可以看出, 6 个样品均已扩出, 未出现非特异性扩增, 且阴性对照未有产物出现, 表明 PCR 扩增效果良好。

3.2.2 微生物 DGGE 指纹图谱分析 各样品细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物经变性梯度凝胶电泳后, 获得较为清晰的 DGGE 分离图谱(图 6)。DGGE 图谱中条带数越多说明生物多样性越丰富, 条带染色后的荧光强度则反映该细菌的丰富度, 条带信号越

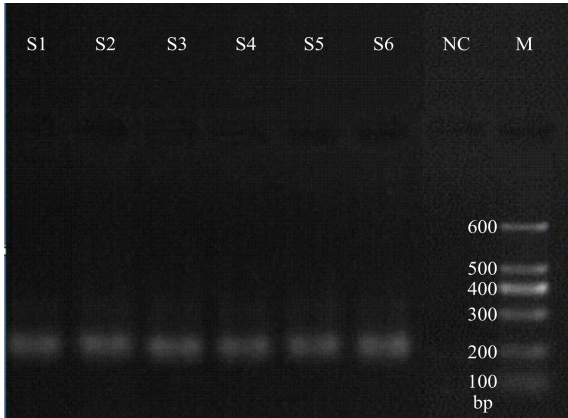


图 5 PCR 扩增产物凝胶电泳图像

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of PCR products
M: 100–600 bp DNA ladder; Nc: 阴性对照 Negative control

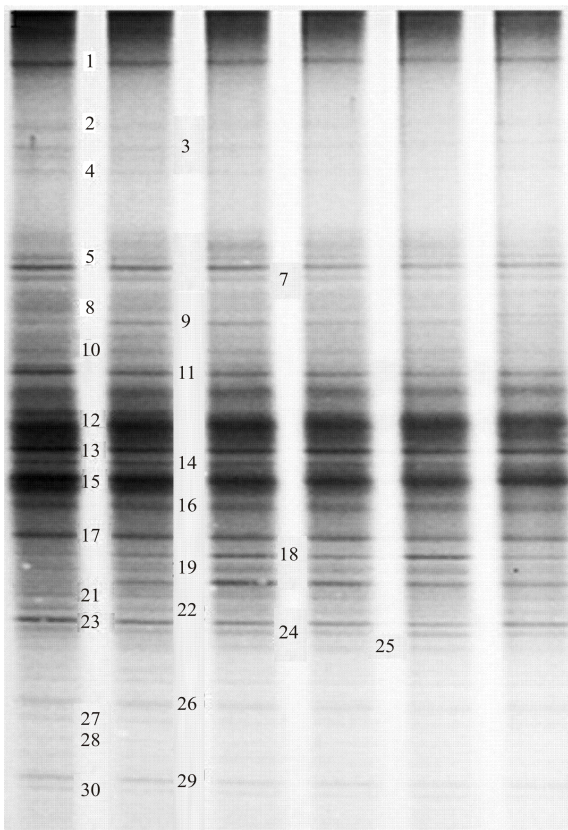


图 6 各样品的 DGGE 凝胶电泳图谱

Fig.6 DGGE fingerprints of different samples

亮, 表示该种属的数量越多(赵兴青等, 2006)。本研究人工湿地基质样品中约有 30 条条带, 并且有几个条带信号较强, 表明人工湿地内部的微生物群落组成较为丰富。条带 1、6、11、12、13、15、16、17、23 在各个样品中都存在, 并且信号较强, 表明人工湿地中存在着优势微生物种群, 这些细菌的生态幅较广, 对环境变化的适应性比较强, 在湿地系统的不同位置

均能稳定存在(黄德锋等, 2007), 只是由于外界营养盐水平和环境条件的不同, 在数量上有所差异。条带 18、20 在样品 S3、S4、S5 中属于数量较多的优势种群, 在其他样品中含量相对较少, 可能与这几个样品位于人工湿地底部而产生的独特的厌氧环境有关。另外, 各个样品并没有产生自己的特有种群, 可能与本研究水处理方式为循环处理有关。

3.2.3 微生物多样性和相似性分析 不同深度基质样品的细菌群落多样性指数 H' 按照式(1)计算后结果见图 7, 各样品的微生物多样性指数都在 2.8 以上。从图 7 可以看出, 下行流池样品(S1、S2、S3)的 H' 值要明显高于上行流池(S4、S5、S6)样品, 主要是由于处理水首先经过下行流池的处理, 再进入上行流池, 而人工湿地对污染物的去除主要发生在下行流(袁林江等, 2008), 进入上行流池的处理水营养盐浓度较下行流池已经显著降低, DO 也由于沿程的消耗而降低, 导致下行流池的条件较上行流池更适于微生物的生长。各样品中, 又以下行流池表层 S1 的 H' 值最高, 达到了 3.177, 沿程逐渐下降, 至上行流池中层 S5 达到 H' 值最低, 仅为 2.804, 上行流池表层 S6 又升至 2.902。虽然处理水流至 S6 层, 碳源、氮源、磷源等营养盐浓度已逐步减少, 但 S6 层有大量的植物根系, 根际效应、植物供氧、植物枯枝落叶的积累以及更接近外界环境产生的复氧作用, 使样品 S6 的微生物多样性指数反而比样品 S5 高。

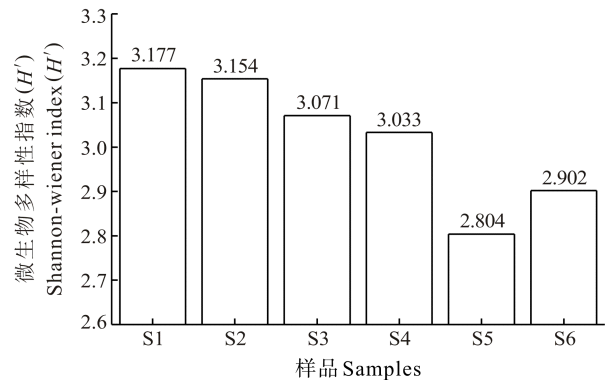


图 7 各样品的微生物多样性指数(H')

Fig.7 Diversity index of microbial communities in different samples

表 2 为根据式(2)所计算的各样品间的微生物群落相似性系数(C_s)。从表 2 可以看出, 各样品间的相似性系数不同, 总体上呈现出各样品沿水流方向相距越远, C_s 越小的趋势。样品 S2、S3、S4、S5、S6 之间的相似性系数较高, 都在 80%以上。而样品 S1 与后 5 个样品之间 C_s 相对较低, 并且沿水流方向随

表2 各样品间的微生物群落相似性系数(C_s , %)
Tab.2 Comparability index of microbial communities in different samples (%)

样品 Samples	S1	S2	S3	S4	S5	S6
S1	100	79.6	78.4	76.6	65.1	69.9
S2	79.6	100	90.1	86.0	81.1	81.1
S3	78.4	90.1	100	89.4	83.5	84.0
S4	76.6	86.0	89.4	100	85.1	88.5
S5	65.1	81.1	83.5	85.1	100	83.6
S6	69.9	81.1	84.0	88.5	83.6	100

距离的增大减小趋势明显,与样品 S5 的 C_s 只有 65.1%,与 S6 的 C_s 又升高到 69.9%,这与两个样品同为植物根部区域有关。人工湿地不同的位置营养水

平和周围的理化条件不同,形成了各自的“小环境”,各自的“小环境”又适宜不同的微生物群落生长,产生不同的优势菌群,所以导致各样品间的 C_s 不同。另外,本研究中各样品间的平均 C_s 达到了 81.47%,远大于黄德锋等(2007)的 64.43%,这与本研究的水处理方式有关。

3.2.4 DGGE 条带基因片段的测序分析 将图 6 中所标记的 30 条条带进行切胶回收、测序后,在 GenBank 数据库中进行比对,比对结果见表 3。从表 3 可以看出,30 条条带所含的 DNA 序列与 GenBank 中的已知序列具有较高的相似度,都在 98%以上,可以认为是同一种。比对结果表明,30 条条带中有 9 个属于变形菌门(Proteobacteria),占 30%,其中 γ -变形菌

表3 测序序列与其 GenBank 比对结果
Tab.3 The comparison of the results of sequence and GenBank

条带 Band	相似菌(登录号)Closest relative bacteria(Accession number)	相似度 Similarity(%)	分类 Classification
1	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium(JX844001)	98	<i>Bacteroidetes</i>
2	Uncultured bacterium clone(U775370)	100	Environmental samples
3	<i>Flavobacterium</i> sp. KN6(HQ231950)	99	<i>Bacteroidetes</i>
4	<i>Flavobacterium</i> sp. H43(HM209363)	99	<i>Bacteroidetes</i>
5	Uncultured bacterium clone(JF745519)	100	Environmental samples
6	Uncultured bacterium clone(EU802122)	99	Environmental samples
7	Uncultured Nitrospirae bacterium(F183020)	99	Nitrospirae
8	Microbacteriaceae bacterium MS244c(JN616364)	100	<i>Actinobacteria</i>
9	<i>Microbacterium</i> sp. Y7(F192059)	99	<i>Actinobacteria</i>
10	<i>Marinobacterium</i> sp. 08XMAC-12(HM565972)	99	γ -Proteobacteria
11	Uncultured <i>Flectobacillus</i> sp.(HQ111157)	100	<i>Bacteroidetes</i>
12	Uncultured bacterium(J534960)	98	Environmental samples
13	<i>Flavobacterium</i> sp. AcJ(KC853132)	100	<i>Bacteroidetes</i>
14	Uncultured <i>delta proteobacterium</i> (F344084)	99	δ -Proteobacteria
15	<i>Bdellovibrio</i> sp. N322(KC836746)	99	δ -Proteobacteria
16	Uncultured Methylobacteriaceae bacterium(JX575912)	100	α -Proteobacteria
17	<i>Acinetobacter</i> sp. P4C7(HF936888)	100	γ -Proteobacteria
18	<i>Alpha proteobacterium</i> 2715(B498881)	100	α -Proteobacteria
19	<i>Glaciecola</i> sp. KJF8-12(Q800127)	100	γ -Proteobacteria
20	<i>Alteromonadales</i> bacterium(AM931132)	100	γ -Proteobacteria
21	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium(JN371677)	99	<i>Firmicutes</i>
22	Uncultured <i>actino bacterium</i> (GQ242437)	99	<i>Actinobacteria</i>
23	Uncultured bacterium(KC787589)	100	Environmental samples
24	<i>Arthrobacter</i> sp. LT37(KF202856)	100	<i>Actinobacteria</i>
25	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium(EF188433)	99	<i>Verrucomicrobia</i>
26	Uncultured <i>actino bacterium</i> (EF471555)	99	<i>Actinobacteria</i>
27	Uncultured bacterium(JQ769588)	99	Environmental samples
28	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium(EF188433)	99	<i>Verrucomicrobia</i>
29	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium(KC917939)	100	α -Proteobacteria
30	Uncultured bacterium(FJ645555)	100	Environmental samples

纲(γ -Proteobacteria) 4 个, α -变形菌纲(α -Proteobacteria) 3 个, δ -变形菌纲(δ -Proteobacteria) 2 个; 5 个属于拟杆菌门(Bacteroidetes), 占 16.7%; 5 个放线菌门(Actinobacteria), 占 16.7%; 2 个疣微菌门 (Verrucomicrobia), 占 6.7%; 1 个厚壁菌门(Firmicutes), 占 3.3%; 1 个硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 占 3.3%; 7 个已被收录的环境样品的未知种群(Environmental samples), 占 23.3%。大部分(18 个, 占 60%)为不可培养的(Uncultured)细菌。信号较强的条带 1、6、11、12、13、15、16、17、23 中, 条带 6、12、23 属于环境样品的未知种群, 条带 1、11、13 属于拟杆菌门, 条带 15、16、17 属于变形菌门。

变形菌门在很多环境的调查中都是主要的微生物类群(罗鹏等, 2009; O'Sullivan *et al*, 2002)。在本研究的人工湿地内部高盐度环境下, 变形菌门也是主要的微生物类群, 其中偏好于高营养盐环境, 并且易于吸收低分子量的溶解性有机物的 γ -变形菌纲(张海耿等, 2012; Naganuma *et al*, 2000)所占比例最大。5 个拟杆菌门中有 3 个是黄杆菌属(*Flavobacterium*), 在低氧或无氧条件下, 它们能利用硝酸盐或亚硝酸盐作为最终电子受体进行无氧呼吸, 同时有机物被氧化(朱砾之等, 2012), 这说明人工湿地内部存在着反硝化作用。放线菌门所占比例也较大, 但放线菌在碳氮源物质循环、能量流动等生态学方面的研究相当滞后, 有待进一步研究(田新朋等, 2011)。另外, 在样品中检测到了属于硝化螺旋菌门的微生物种群。近几年研究表明, 在硝化过程中, 真正起亚硝酸盐氧化作用的可能是硝化螺旋菌属的细菌, 而不是变形菌门的硝化杆菌属(*Nitrobacter*)这一传统硝化菌属的菌种(钦颖英等, 2007; Burrell *et al*, 1999; Lee *et al*, 2002)。

本研究系海水体系人工湿地, 微生物优势种属有拟杆菌门的弯杆菌属(*Flectobacillus* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)和变形菌门的蛭弧菌属(*Bdellovibrio* sp.)、甲基杆菌(*Methylobacteriaceae*)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。Calheiros 等(2010)利用 PCR-DGGE 技术, 分析了处理高盐度制革废水人工湿地的微生物群落组成, 发现主要细菌群落有厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和变形菌门。淡水体系人工湿地中, Calheiros 等(2009)研究表明, 芦苇湿地主要微生物群落有 γ -变形菌、鞘脂杆菌门(Sphingobacteria)、放线菌门和拟杆菌门; Dong 等(2010)利用 PCR-DGGE 技术得出处理畜牧业废水的人工湿地微生物优势种属为 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、放线菌门的节细菌属(*Arthrobacter* sp.)、

厚壁菌门的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。人工湿地内部微生物受湿地类型、湿地植物和基质的组成、运行方式、理化条件、季节等各方面因素的综合影响, 表现出不同的组成和结构特点。

4 结论

(1) 人工湿地循环处理模拟海水养殖外排水效果显著, 对主要的污染物指标氨氮、磷酸盐和 COD 都显现出了较高的处理效果, 平均去除率分别达到了(92.82 \pm 3.27)%、(72.53 \pm 2.31)%和(66.04 \pm 8.23)%。

(2) PCR-DGGE 图谱表明, 在盐胁迫条件下, 人工湿地内部的微生物群落组成较为丰富, 并且在不同位置都存在着一些种属相同、数量不同的生态幅广泛的优势种。

(3) 由于营养水平与环境条件的不同, 人工湿地内部不同位置的生物多样性指数(H')与相似性系数(C_s)也不同。人工湿地下行流池微生物多样性指数要高于上行流池, 并且沿水流方向呈下降趋势; 人工湿地系统中各样品微生物相似性系数(C_s)与样品位置存在一定关系, 沿着水流方向样品距离越远, 相似性系数越小。

(4) 海水养殖外排水人工湿地处理系统中微生物种群分布较为广泛, 与 GenBank 对应的已知微生物种群有变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、硝化螺旋菌门和厚壁菌门, 其中, 主要的优势菌群属于变形菌门和拟杆菌门。这些微生物种群参与了人工湿地对污染物的去除过程, 并且起到了非常重要的作用。

参 考 文 献

- 于涛, 成水平, 贺锋, 等. 基于复合垂直流人工湿地的循环水养殖系统净化养殖效能与参数优化. 农业工程学报, 2008, 24(2): 188-194
- 王世和. 人工湿地污水处理理论与技术. 北京: 科学出版社, 2000, 1-2
- 王晖文, 韩会玲. 人工湿地污水净化处理研究. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 163-164, 167
- 田新朋, 张懿, 李文均. 海洋放线菌研究进展. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- 过锋, 赵俊, 陈聚法, 等. 胶州湾贝类养殖区氮、磷污染现状及动态变化. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 116-122
- 朱砾之, 黄娟, 傅大放, 等. 人工湿地生态系统中的微生物作用及 PCR-DGGE 技术的应用. 安全与环境工程, 2012, 19(2): 26-30
- 张海耿, 崔正国, 马绍赛, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水影响因素与效果实验研究. 海洋环境科学, 2012, 31(1): 20-24, 52

- 肖强, 郑海雷, 陈瑶, 等. 盐度对互花米草生长及脯氨酸、可溶性糖和蛋白质含量的影响. *生态学杂志*, 2005, 24(4): 373-376
- 陈芳, 包慧娟. 崂山水库污染源评价分析及治理对策. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 104-108
- 周元清, 李秀珍, 李淑英, 等. 不同类型人工湿地微生物群落的研究进展. *生态学杂志*, 2011, 30(6): 1251-1257
- 周群英, 高廷耀. *环境工程微生物学*. 北京: 高等教育出版社, 2000, 45-50
- 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 31-38
- 宣亚红, 王小江, 白玉华, 等. 垂直流人工湿地系统在城市生活小区污水处理和回用中的应用. *上海水务*, 2008, 24(3): 34-36
- 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究. *生态学报*, 2006, 26(11): 3610-3616
- 赵海洋, 王国平, 刘景双, 等. 三江平原湿地土壤磷的吸附与解吸研究. *生态环境*, 2006, 15(5): 930-935
- 钦颖英, 李道棠, 杨虹. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(1): 104-107
- 夏宏生, 汤兵. 人工湿地除磷技术. *四川环境*, 2005, 24(1): 83-86, 123
- 袁林江, 韩瑞瑞, 韩玮. 间歇进水复合垂直流人工湿地的净化特性研究. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 40(4): 521-526
- 黄德锋, 李田, 陆斌. 复合垂直流人工湿地污染物去除及微生物群落结构的 PCR-DGGE 分析. *环境科学研究*, 2007, 20(6): 137-141
- 雷衍之. *养殖水环境化学*. 北京: 中国农业出版社, 2004, 76-78
- 籍国东, 孙铁珩, 李顺. 人工湿地及其在工业废水处理中的应用. *应用生态学报*, 2002, 13(2): 224-228
- Al-Omari A, Fayyad M. Treatment of domestic wastewater by subsurface flow constructed wetlands in Jordan. *Desalination*, 2003, 155(1): 27-39
- Burrell P, Keller J, Blackall LL. Characterization of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge. *Water Sci Technol*, 1999, 39(6): 45-52
- Calheiros CSC, Duque AF, Moura A, *et al.* Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 2009, 100(13): 3228-3235
- Calheiros CSC, Teixeira A, Pires C, *et al.* Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. *Water Res*, 2010, 44(17): 5032-5038
- Comin FA, Romero JA, Astorga V, *et al.* Nitrogen removal and cycling in restored wetlands used as filters of nutrients for agricultural runoff. *Water Sci Technol*, 1997, 35(5): 255-261
- Dong XL, Reddy GB. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresour Technol*, 2010, 101(4): 1175-1182
- Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 340-346
- Kivaisi AK. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecol Eng*, 2001, 16(4): 545-560
- Lee HW, Lee SY, Lee JW, *et al.* Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 41(2): 85-94
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(11): 4715-4724
- Naganuma T, Fukai I, Murakami Y, *et al.* Effect of ultraviolet radiation on the bioavailability of marine diatom-derived low-molecular-weight dissolved organic matter. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 2000, 3(1): 163-166
- O'Sullivan LA, Weightman AJ, Fry JC. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 201-210
- Reddy KR, Connor GA, Gale PM. Phosphorus sorption capacities of wetland soils and stream sediments impacted by dairy effluent. *J Environ Qual*, 1998, 27(2): 438-447
- Reddy KR, D'Angelo EM. Biogeochemical indicators to evaluate pollution removal efficiency in constructed wetlands. *Water Sci Technol*, 1997, 35(5): 1-10
- Rivera R, Warren A, Curds CR, *et al.* The application of the root zone method for the treatment and reuse of highstrength abattoir waste in Mexico. *Water Sci Technol*, 1997, 35: 271-278
- Sakadevan K, Bavor HJ. Phosphate adsorption characteristics of soils, slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems. *Water Res*, 1998, 32(2): 393-399
- Sun GZ, Austin D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: evidence from a mass balance study. *Chemosphere*, 2007, 68(6): 1120-1128
- Tanner CC, Kadlec RH, Gibbs MM, *et al.* Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands. *Ecol Eng*, 2002, 18: 499-520
- Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci Total Environ*, 2007, 380(1-3): 48-65
- Yli-Halla M, Hartikainen H, Ekholm P, *et al.* Assessment of soluble phosphorus load in surface runoff by soil analyses. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1995, 56(1): 53-62
- Zhu T, Sikora FJ. Ammonium and nitrate removal in vegetated and unvegetated gravel bed microcosm wetlands. *Water Sci Technol*, 1995, 32(3): 219-228

Removal Effect of Mariculture Wastewater and Analysis of Microbial Communities in Constructed Wetlands

WANG Jiapeng^{1,2}, CUI Zhengguo^{2①}, ZHOU Qiang^{1,2}, MA Shaosai², QU Keming², MAO Chengquan³

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

Abstract Constructed wetland, a new technique of wastewater treatment, has been widely used in fresh aquaculture wastewater treatment but not in mariculture wastewater treatment. In present study, we established a laboratory scale integrated vertical-flow constructed wetland (IVCW) to purify the mariculture wastewater. We examined the removal efficiencies of the main pollutants such as ammonia nitrogen, phosphate and chemical oxygen demand (COD), and explored the composition and structure of the bacteria community in IVCW using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results suggest that the IVCW efficiently removed ammonia nitrogen, phosphate and COD ($92.82\pm 3.27\%$, $(72.53\pm 2.31)\%$ and $(66.04\pm 8.23)\%$, respectively). The results show a variety of bacterial divisions in the IVCW. The quantities of the dominant species were different in each layer of the IVCW. The Shannon-Wiener (H') of the down-flow tank is higher than that of the up-flow tank and it shows a decreasing trend along the water flow. The Dice coefficient (Cs) of microbial community in each layer showed an inverse relationship between the distance along the water flow and Dice coefficient. Six known bacteria groups including *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae* and *Firmicutes* were observed in the IVCW, and *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were the dominant species. This study provide a theoretical reference for elucidating the removal mechanism of constructed wetlands.

Key words Constructed wetlands; Microorganism; Mariculture wastewater; Removal effect; PCR-DGGE

① Corresponding author: CUI Zhengguo, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

东海中部日本鲭(*Scomber japonicus*)产卵 群体繁殖力特征*



李建生 胡 芬 严利平 张 辉

(中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部东海与远洋渔业资源开发重点实验室 上海 200090)

摘要 利用 2010–2012 年春季在东海中部获得的日本鲭产卵群体样品的生物学及繁殖力测定数据,对其群体结构、性腺指数 GSI 和繁殖力特征进行了研究。结果显示,目前东海中部日本鲭产卵群体年龄结构由 1–5 龄组成,以 2–4 龄占优势。日本鲭的个体绝对繁殖力为 24770–734684 粒,平均为 (145575 ± 10067) 粒;纯体重相对繁殖力为 175–1404 grain/g,平均为 (524 ± 24) grain/g;叉长相对繁殖力为 102–2070 grain/mm,平均为 (483 ± 29) grain/mm。ANOVA 分析结果显示,不同叉长组间的性腺指数 GSI ($F=2.34, P<0.05$)、绝对繁殖力 ($F=8.57, P<0.01$) 和叉长相对繁殖力 ($F=5.59, P<0.05$) 均有显著性差异,但体重相对繁殖力差异不明显 ($F=2.03, P>0.05$)。多元逐步线性回归和非线性回归分析显示,绝对繁殖力与体高、肝重关系密切。为了应对高强度的捕捞压力,日本鲭主要采用降低性成熟年龄,减小最小性成熟叉长和卵径、增加繁殖力等策略来维持种群的延续。

关键词 东海;日本鲭;产卵群体;性腺指数;繁殖力

中图分类号 S932 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0010-06

日本鲭 (*Scomber japonicus*) 为暖水性中上层鱼类,隶属鲭科、鲈属,广泛分布于西北太平洋沿海岸海域,在中国及日本、朝鲜半岛等周边海域均有分布,主要由中国(包括台湾省)、日本、韩国和朝鲜等国家利用(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987)。东海中部近海受浙江沿岸水、台湾暖流和东海外海暖水等海流水团的共同影响,浮游生物丰富,是众多游泳生物的产卵场和索饵场,也是多种捕捞网具作业的良好渔场(郑元甲等, 2003)。20 世纪 70 年代,通过对鱼卵、仔鱼的调查,发现东海中部的温台和鱼山渔场是日本鲭的主要产卵场(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987)。该海域的日本鲭产卵群体属于东海群系(或称东海西部种群)(郑元甲等, 2003; 张秋华等, 2007)。该群系日本鲭生长速度较快、个体偏大,通常 2 龄性成熟(日本水产厅西海区水产研究所, 2001); 每年 3–5 月,主要在东海中部近海,由南向北,边洄游、边产卵。此时,中

国大型围网、群众小型灯光围网、灯光敷网和拖网等在该海域捕捞其产卵群体(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987; 郑元甲等, 2003)。

进入 21 世纪,东、黄海近海底层鱼类资源仍然严重衰退(陈云龙等, 2013),而作为中上层鱼类主要种类的日本鲭,虽然群体的年龄组成较简单,但资源量较大,仍能够形成较为稳定的渔业产量(李建生等, 2010; 严利平等, 2010; 郑元甲等, 2014)。20 世纪 50 年代以来,中国学者针对东海群系的日本鲭已经开展了大量的研究工作,主要集中在种群和洄游(邓景耀, 1991; 严利平等, 2012)、年龄与生长(程家骅等, 2004; 刘勇等, 2005、2006)、生殖和摄食习性(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987; 颜尤明, 1997; 郑元甲等, 2003)、资源量评估(陈卫忠等, 1998; 王凯等, 2007; 严利平等, 2010; 周永东等, 2011)等方面,但专门进行其繁殖力特征的研究相对较少。近年来,国外学者主要对东海日本鲭种群的波动(Hiyama *et al*,

* 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303047)资助。李建生, E-mail: jianshengli@sina.com

收稿日期: 2014-03-22, 收修改稿日期: 2014-05-26

2002)、产卵场(Yukami *et al*, 2009)和性成熟年龄的变化(Watanabe *et al*, 2006)进行了研究, 并利用人工养殖的日本鲭来研究其繁殖参数(Shiraishi *et al*, 2005)、性腺发育特征和性别变化(Kobayashi *et al*, 2011)。针对当前东海群系日本鲭的资源现状, 为了解其补充机制及高强度捕捞和环境胁迫压力下的繁殖策略, 本研究利用 2010–2012 年连续 3 年春季在东海中部对日本鲭进行的取样数据, 对其群体结构组成、性腺指数和繁殖力等进行了研究。日本鲭的生命周期短、繁殖力强、生长速度快, 资源的补充受环境因子制约较明显(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987; 郑元甲等, 2003), 因此, 通过对日本鲭产卵群体相关繁殖生物学特征进行研究, 可以了解日本鲭的资源补充和变化的规律, 并且对于进一步准确估算其资源量、制定最佳可捕标准和相关的保护措施等都具有现实意义, 在此基础上可以为海洋中上层鱼类管理政策的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

日本鲭样品的采样时间为 2010–2012 年的 3–4 月, 其中 2010 年获取样品 100 尾, 对 17 尾性腺为 IV–V 期的雌鱼进行繁殖力计数; 2011 年获取样品 127 尾, 对 31 尾性腺为 IV–V 期的雌鱼进行繁殖力计数; 2012 年获取样品 319 尾, 对 54 尾性腺为 IV–V 期的雌鱼进行繁殖力计数。2010 年采样地点为鱼山渔场, 2011 年和 2012 年采样地点为温台渔场。样品是在群众大型灯光围网捕捞船上取样、冷冻保存, 带回实验室进行生物学测定。本研究主要基于上述 102 尾雌鱼样本(合计 IV 期个体 42 尾, V 期个体 60 尾)的数据对该海域日本鲭繁殖力特征进行研究。

1.2 测定方法和标准

测定项目包括叉长(L)、肛长(AL)、体重(W)、纯体重(NW)、肝重(HW)、性别、性腺成熟度、性腺重(GW)、怀卵量(F)、摄食强度; 并对部分样品用游标卡尺精确测量了头长、眼径、体高、体宽等指标。性

别、性腺成熟度和摄食强度采用肉眼观测, 根据海洋调查规范(中华人民共和国质量监督检验检疫总局和中国国家标准化委员会, 2007)的标准进行性腺成熟期和摄食强度等级鉴定。

对雌鱼性腺成熟度为 IV–V 期的个体进行怀卵量计数, 首先在卵巢中取 0.2–0.5 g (前、中、后部卵粒混合)性腺组织, 用精度为 0.001 g 的电子秤称量, 然后用 10% 的福尔马林溶液固定; 卵粒计数时, 先将性腺样品去除卵膜, 把卵粒均匀分散开, 然后在 Zeiss Discovery V20 体式显微镜下使用 10 倍目镜对卵粒进行观察拍照, 在电脑上计数, 最后换算出个体怀卵量, 即绝对繁殖力。

1.3 计算公式

本研究的性腺指数(GSI)、叉长相对繁殖力(r/L)和体重相对繁殖力(r/W)的计算公式如下:

$$GSI (\%) = (\text{性腺重} / \text{纯体重}) \times 100 \quad (1)$$

$$r/L (\text{grain}/\text{mm}) = \text{绝对繁殖力} / \text{叉长} \quad (2)$$

$$r/W (\text{grain}/\text{g}) = \text{绝对繁殖力} / \text{纯体重} \quad (3)$$

其中, 长度单位精确到 1 mm, 重量单位精确到 0.1 g。

利用统计软件 SPSS 18.0 进行数据检验和回归分析, 对统计数据再利用 Microsoft Office Excel 进行图件的绘制。

2 结果

2.1 产卵群体生物学特征

东海中部日本鲭产卵群体的叉长、体重、纯体重、性腺重等生物学特征如表 1 所示。经回归拟合, 日本鲭产卵群体叉长与体重、叉长与纯体重均符合幂函数关系, 其关系式分别为: $W=1.013 \times 10^{-5} L^{3.029}$ ($n=102$, $R^2=0.846$); $NW=0.905 \times 10^{-5} L^{3.021}$ ($n=102$, $R^2=0.894$); 而体重与纯体重之间符合线性相关关系, 其关系式为: $W=0.820NW+9.966$ ($n=102$, $R^2=0.981$)。

2.2 性腺和性腺指数 GSI

东海中部日本鲭卵巢重量见表 1。其中, 性腺发育为 IV 期个体的卵巢重量为 4.16–21.80 g, 平均为

表 1 东海中部日本鲭产卵群体生物学特征

Tab.1 The biological characteristics of *S. japonicus* spawning stocks in the central East China Sea

项目 Items	范围 Range	平均值 Average	优势组 Dominant group
叉长 Fork length(mm)	243–369	293.54±2.80	260–330(80.39%)
体重 Body weight(g)	157.0–654.6	312.64±10.03	离散 Dispersed
纯体重 Net body weight(g)	137.9–523.4	266.30±8.30	离散 Dispersed
性腺重 Gonad weight(g)	4.2–99.6	22.42±1.43	10–35(85.29%)

(12.42±0.63) g; 性腺发育为V期个体的卵巢重量为9.59–99.60 g, 平均为(29.43±1.94) g。性腺指数 *GSI* 为2.94–19.03, 平均为8.05±0.31。其中性腺发育为IV期个体的 *GSI* 为2.94–9.25, 平均为5.81±0.25; 性腺发育为V期个体的 *GSI* 为4.15–19.03, 平均为9.61±0.40。从平均 *GSI* 随叉长变化来看, 301–320 mm 叉长组的平均 *GSI* 最大, 360 mm 以上叉长组次之, 241–260 mm 叉长组最小。叉长组从241–260 mm 到301–320 mm, 平均 *GSI* 表现出快速增加的趋势; 叉长组321–340 mm, 平均 *GSI* 反而大幅下降; 360 mm 以上叉长, 平均 *GSI* 又表现出增加趋势(图1)。ANOVA 分析结果显示, 不同叉长组间的 *GSI* 有显著性差异($F=2.34$, $P=0.047 < 0.05$)。

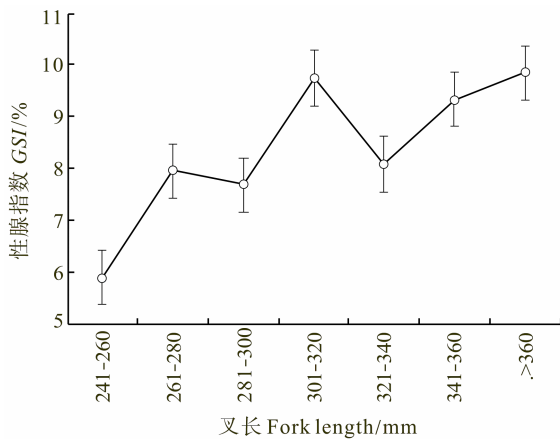


图1 东海中部日本鲭产卵群体 *GSI* 随叉长组的变化
Fig.1 The variation of *GSI* with fork length group of *S. japonicus* spawning stocks in the central East China Sea

2.3 繁殖力

样品计数范围内, 日本鲭个体绝对繁殖力为24770–734684粒, 平均为(145575±10067)粒。其中, 性腺为IV期个体的绝对繁殖力为24770–161890粒, 平均为(88824±5896)粒; 性腺为V期个体的绝对繁殖力为56630–734684粒, 平均为(185301±111516)粒。随着叉长组从241–260 mm 组增大到321–340 mm 组, 绝对繁殖力也从61908粒增加到301763粒, 表现出增加的趋势, 但叉长增大至360 mm 以上, 绝对繁殖力则略有下降(图2)。ANOVA 分析结果显示, 不同叉长组间的绝对繁殖力有极显著性差异($F=8.57$, $P < 0.01$)。

体重相对繁殖力为175–1404 grain/g, 平均为(524±24) grain/g。其中, 性腺为IV期个体的体重相对繁殖力为175–781 grain/g, 平均为(413±25) grain/g; 性腺为V期个体的体重相对繁殖力为187–1404 grain/g,

平均为(602±33) grain/g。体重相对繁殖力随叉长组的变化为: 341–360 mm 最大, 301–320 mm 次之, 241–260 mm 最小(图3)。ANOVA 分析结果显示, 不同叉长组间的体重相对繁殖力差异不明显($F=2.03$, $P=0.081 > 0.05$)。

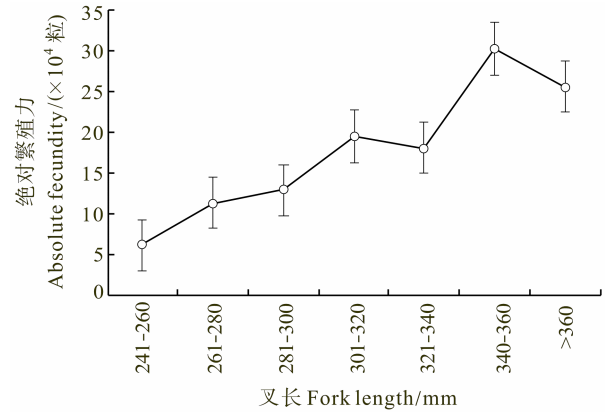


图2 东海中部日本鲭绝对繁殖力随叉长组的变化
Fig.2 The variation of the absolute fecundity with fork length group of *S. japonicus* spawning stocks in the central East China Sea

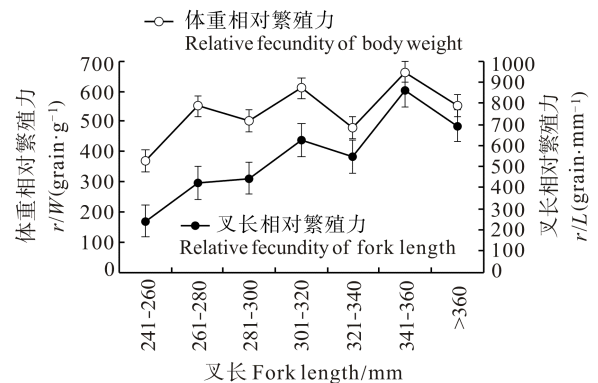


图3 东海中部日本鲭相对繁殖力随叉长组的变化
Fig.3 The variation of the relative fecundity with fork length group of *S. japonicus* spawning stocks in the central East China Sea

叉长相对繁殖力为102–2070 grain/mm, 平均为(483±29) grain/mm。其中, 性腺为IV期个体的叉长相对繁殖力为102–588 grain/mm, 平均为(320±17) grain/mm; 性腺为V期个体的叉长相对繁殖力为192–2070 grain/mm, 平均为(598±42) grain/mm。叉长相对繁殖力随叉长组的变化为: 341–360 mm 最大, 大于360 mm 次之, 241–260 mm 最小。随着叉长组从241–260 mm 增大到301–320 mm, 叉长相对繁殖力逐渐增大; 321–340 mm 略有下降; 341–360 mm 达到最大(图3)。ANOVA 分析结果显示, 不同叉长组间的叉长相对繁殖力有显著性差异($F=5.59$, $P < 0.05$)。

2.4 繁殖力与体征的关系

一般来说, 鱼类的繁殖力与体长呈幂相关, 而与体重呈直线相关。经拟合回归, 东海中部日本鲭的绝对繁殖力(F)与叉长(L)和纯体重的(NW)关系分别为: $F=1.447 \times 10^{-4} L^{3.617}$ ($n=102, R^2=0.345$); $F=635.68NW-28690$ ($n=102, R^2=0.317$)。

通过对 48 尾日本绝对对鲭繁殖力与叉长、肛长、头长、眼径、体高、体宽 6 个长度指标进行多元逐步线性回归分析, 发现模型排除叉长、肛长、头长、眼径、体宽 5 个变量。因此绝对繁殖力(F)仅与体高(BH)呈线性相关, 其关系式为: $F=10757.76BH-439759$ ($n=48, R=0.739$)。相关鱼类繁殖力与肝重的关系研究结果显示, 随着肝重的增加, 繁殖力也相应的增加, 且逐渐趋向于某一渐近线(凌建忠等, 2004)。对日本鲭绝对繁殖力(F)与肝重(HW)数据利用 SPSS 统计软件进行非线性回归分析, 模型参数的初值均设为 0.001, 然后经 999 次迭代运算, 最后得到它们的关系式为: $F=HW(-1.664 \times 10^{-6} HW+4.042 \times 10^{-5})$, $n=48, R^2=0.629, P<0.001$ 。

3 讨论

3.1 东海中部日本鲭产卵群体组成结构分析

东海中部日本鲭产卵群体属于东海群系。20 世纪 80 年代初期, 该海域日本鲭产卵群体的叉长为 260–370 mm, 310–340 mm 为优势组; 年龄结构由 2–5 龄组成, 3–4 龄占优势(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987)。本研究表明, 目前该海域日本鲭产卵群体叉长范围上限不变, 但下限变小, 小个体有所增加; 根据叉长转换成年龄(日本水产厅西海区水产研究所, 2001)组成分析, 年龄结构由 1–5 龄组成, 以 2–4 龄占优势。与历史研究结果相比, 目前东海中部日本鲭产卵群体有部分 1 龄鱼加入。本研究结果表明, 目前该海域日本鲭雌鱼最小性成熟叉长为 243 mm, 与 20 世纪 80 年代(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部, 1987)相比下降了 17 mm。据统计, 20 世纪 80 年代, 东海区鲈鱼类(以日本鲭为主)的平均年产量为 10.59×10^4 t; 进入 21 世纪, 鲈鱼类的年产量呈波动中上升的趋势, 2001–2012 年平均年产量为 25.60×10^4 t, 近 3 年的产量保持在 30×10^4 t 以上(农业部渔业局, 2013)。20 世纪 80 年代, 东海区主捕日本鲭的国有有机轮围网渔船最多时曾达 28 组, 而福建省和浙江省的群众灯光围网合计达 600 余艘(张秋华等, 2007); 进入 21 世纪, 虽然国有有机轮围网大幅萎缩, 但由于群众围网迅速增加, 以捕捞中上层

鱼类为主的渔船数和功率数均达到了较高的水平(郑元甲等, 2014), 2003–2011 年东海区围网渔业平均渔船数和平均功率分别为 1433 艘和 18.08×10^4 kW。由以上分析可以看出, 为了应对高强度的捕捞压力, 日本鲭采用了降低性成熟年龄, 减小最小性成熟叉长等策略来维持种群的延续。

3.2 东海中部日本鲭 GSI 和繁殖力特征

从海域来看, 东海中部日本鲭产卵群体的平均 GSI 高于台湾海峡中部(李建生等, 2014a)而低于黄海北部(李建生等, 2014b)。这种变化的原因可能和不同海域日本鲭的地理种群结构有关, 台湾海峡日本鲭的生长速度比东、黄海的慢, 黄海北部日本鲭的产卵群体明显大于其他两个海域。不同海域日本鲭 GSI 的变化导致了其繁殖力的差异, 二者的变化趋势是一致的。本研究中, 日本鲭的绝对繁殖力和叉长相对繁殖力都表现出: 当叉长小于 360 mm 时, 随着叉长的增大而增加, 这可能是由于年龄组的变化引起的; 当年龄增大到一定程度时, 则表现出下降的趋势。2012 年的样本测定结果表明, 日本鲭的卵径为 0.27–1.22 mm, 平均为 0.86 mm, 优势卵径为 0.7–1.1 mm。与 20 世纪 80 年代(汪伟洋等, 1983; 颜尤明, 1997)相比, 目前的平均卵径明显减小, 而绝对繁殖力(性腺发育为 V 期)呈上升趋势。这说明日本鲭通过减小卵径、增加繁殖力的繁殖策略来应对外界的捕捞压力和环境胁迫来保证种群的延续。日本鲭的体高和肝重与繁殖力关系较为密切。这可能是由于体高越高其腹腔越大, 通过局部特征的扩大能够增加腹腔的容量, 这样就能够容纳数量更多的卵子(殷名称, 2000); 而肝脏是鱼类营养储存、吸收和运输的器官, 肝细胞能够合成卵黄前体物质卵黄蛋白原, 为卵母细胞发育与成熟提供物质基础(张士瑾等, 2002)。

从不同性腺发育阶段来看, 东海中部日本鲭产卵群体的性腺重量、GSI 和繁殖力均表现为性腺发育为 V 期的个体明显大于 IV 期的个体。这可能是由于 IV 期个体的卵还没有完全发育成熟, 表现为卵径相对较小, 卵巢的重量较小, 部分卵粒发育较晚, 造成了部分发育较晚的卵粒在计数时被忽略, 因此导致 IV 期个体的繁殖力计数结果小于 V 期个体。所以, 在繁殖力计数时最好采用性腺发育达 V 期的个体更为准确。

3.3 基于繁殖特征的东海中部日本鲭保护措施

每年 3–5 月, 东海群系日本鲭性腺发育成熟, 并随水温回升, 暖流势力增强, 进入闽东、浙江近海产卵, 产卵盛期为 3–4 月, 在闽东、浙江中南部附近海

域出现产卵群体;当年4-5月出生的幼鱼,主要分布在浙江省的温台沿岸及岛屿周围海域索饵成长(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部,1987;郑元甲等,2003)。因此,东海中部近海同时成为日本鲭的成鱼产卵场和幼鱼索饵场。研究表明,目前该海域日本鲭的最小性成熟年龄为1龄,没有继续提升的空间,卵径与历史研究结果相比也有所减小。因此,面对东海区高强度的捕捞压力,日本鲭自身的调控机制进一步发挥作用的可能性已经不大。但是,日本鲭作为主要的中上层鱼类,个体繁殖力巨大,生长速度较快,通过保护产卵亲鱼能够更加有效地激发其资源潜力。为了保证这一种群的延续并达到可持续利用,渔业管理部门有必要考虑于日本鲭产卵期在温台近海设立亲鱼资源保护区和特别休渔期。该海域同时也是鳀(*Engraulis japonicus*)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)、竹筴鱼(*Trachurus japonicus*)等中上层鱼类的产卵场和索饵场(农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部,1987),设立保护区和特别休渔期不仅可以保护日本鲭,同时也可以保护其他中上层鱼类的产卵群体和幼鱼。

参 考 文 献

- 中华人民共和国质量监督检验检疫总局和中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范(GB/T12763.6-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007
- 日本水产厅西海区水产研究所. 东海、黄海主要水产资源的生物、生态特性. 日本长崎: 日本纸工印刷, 2001, 438-448
- 邓景耀, 赵传纲. 海洋渔业生物学. 北京: 农业出版社, 1991, 413-452
- 王凯, 严利平, 程家骅, 等. 东海鲈鱼资源合理利用的研究. 海洋渔业, 2007, 29(4): 337-343
- 农牧渔业部水产局和农牧渔业部东海区渔业指挥部. 东海区渔业资源调查和区划. 上海: 华东师范大学出版社, 1987, 392-400
- 农业部渔业局. 2013中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013
- 刘勇, 严利平, 胡芬, 等. 东海北部和黄海南部鲈鱼年龄和生长的研究. 海洋渔业, 2005, 27(2): 133-138
- 刘勇, 严利平, 程家骅. 东海北部和黄海南部鲈鱼生长特性及合理利用. 中国水产科学, 2006, 13(5): 814-822
- 李建生, 严利平, 凌建忠, 等. 2009年东黄海机轮围网渔业监测动态分析. 现代渔业信息, 2010, 25(8): 3-5
- 李建生, 胡芬, 严利平. 台湾海峡中部日本鲭产卵群体生物学特征的初步研究. 应用海洋学学报, 2014a, 33(2): 198-203
- 李建生, 严利平, 胡芬. 黄海北部日本鲭繁殖群体生物学特征的年代际变化. 中国水产科学, 2014b, 21(3): 567-573
- 张秋华, 程家骅, 徐汉祥, 等. 东海区渔业资源及其可持续利用. 上海: 复旦大学出版社, 2007, 212-218
- 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展. 海洋科学, 2002, 26(7): 32-35
- 严利平, 李建生, 凌建忠, 等. 应用体长结构VPA评估东海西部日本鲭种群资源量. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 16-22
- 严利平, 张辉, 李圣法, 等. 东、黄海日本鲭种群鉴定和划分的研究进展. 海洋渔业, 2012, 34(2): 217-221
- 汪伟洋, 卢振彬, 颜尤明, 等. 闽中、闽东渔场春汛鲈鱼的生物学特性. 海洋渔业, 1983, 5(2): 51-55
- 陈卫忠, 胡芬, 严利平. 用实际种群分析法评估东海鲈鱼现存资源量. 水产学报, 1998, 22(4): 334-339
- 陈云龙, 单秀娟, 戴芳群, 等. 东海近海带鱼群体相对资源密度、空间分布及其产卵群体的结构特征. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 8-15
- 郑元甲, 陈雪忠, 程家骅, 等. 东海大陆架生物资源与环境. 上海: 上海科学技术出版社, 2003, 348-357
- 郑元甲, 李建生, 张其永, 等. 中国重要海洋中上层经济鱼类生物学研究进展. 水产学报, 2014, 38(1): 149-160
- 周永东, 张洪亮, 徐汉祥, 等. 应用体长股分析法估算东海区日本鲭资源量. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(2): 91-94
- 凌建忠, 程家骅, 任一平, 等. 东海带鱼主要体征与个体繁殖力的关系. 中国水产科学, 2004, 11(2): 116-120
- 殷名称. 鱼类生态学. 北京: 中国农业出版社, 2000, 105-131
- 程家骅, 林龙山. 东海区鲈鱼生物学特征及其渔业现状的分析研究. 海洋渔业, 2004, 26(2): 73-78
- 颜尤明. 福建近海鲈鱼的生物学. 海洋渔业, 1997, 19(2): 69-73
- Hiyama Y, Yoda M, Ohshimo S. Stock size fluctuations in chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Japan/East Sea. Fish Oceanogr, 2002, 11(6): 347-353
- Kobayashi T, Ishibashi R, Yamamoto S, et al. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. Aquacul Res, 2011, 42(2): 230-239
- Shiraishi T, Ohta K, Yamaguchi A, et al. Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. Fish Sci, 2005, 71(3): 531-542
- Watanabe C, Yatsu A. Long-term changes in maturity at age of chub mackerel (*Scomber japonicus*) in relation to population declines in the waters off northeastern Japan. Fish Res, 2006, 78(2-3): 323-332
- Yukami R, Ohshimo S, Yoda M, et al. Estimation of the spawning grounds of chub mackerel *Scomber japonicus* and spotted mackerel *Scomber australasicus* in the East China Sea based on catch statistics and biometric data. Fish Sci, 2009, 75(1): 167-174

(编辑 江润林)

The Fecundity of Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) Spawning Stocks in the Central East China Sea

LI Jiansheng, HU Fen, YAN Liping, ZHANG Hui

(Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract *Scomber japonicus* is one of the main pelagic fish in the East China Sea and Yellow Sea. It has maintained high yield in recent years. The central East China Sea is one of the major spawning grounds of *S. japonicus*. To understand the reproductive strategy of *S. japonicus* under high fishing pressure, we studied the age structure, the gonadosomatic index (*GSI*) and the fecundity of *S. japonicus* spawning stocks that were sampled in the central East China Sea in springs of 2010–2012. The data was analyzed with Microsoft Office Excel and SPSS 18.0 statistical software. The current age structure of *S. japonicus* spawning stocks was from 1 to 5 years, and the dominant age range was from 2 to 4 years. The absolute fecundity varied between 24770 and 734684 grains, with an average of 145575 ± 10067 grains. The relative fecundity to body weight ranged from 175 to 1404 grain/g, with an average of (524 ± 24) grain/g. The relative fecundity to fork length ranged from 102 to 2070 grain/mm, with an average of (483 ± 29) grain/mm. ANOVA analysis showed that there were significant differences in *GSI* ($P < 0.05$), the absolute fecundity ($P < 0.01$), and the relative fecundity to fork length ($P < 0.05$) between different fork length groups, but there was no difference in the relative fecundity to body weight ($P > 0.05$). Multiple stepwise linear and non-linear regression analysis showed that the absolute fecundity was closely related to the body height and liver weight. In response to the high fishing pressure, *S. japonicus* maintain the continuation of stocks by adopting a variety of strategies including earlier sexual maturity age, decrease in the smallest maturity fork length, smaller maturation egg diameter, increase in fertility, etc. In order to have sustainable supply of *S. japonicus* in the future, we suggest that the fishery administrative department should establish protection zones in spawning grounds and non-fishing periods in the central East China Sea.

Key words East China Sea; *Scomber japonicus*; Spawning stocks; Gonadosomatic index; Fecundity

海州湾大竹蛭资源保护区海水环境质量评价*

夏 斌 马菲菲 陈碧鹃 崔 毅^① 孙雪梅 曲克明

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)



摘要 根据 2008–2013 年夏季对海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区表层海水营养盐、重金属以及相关环境因子的连续调查数据,运用综合质量指数法对该海域海水水质状况进行了综合评价,并运用潜在富营养化评价法和主成分分析法从不同方面分析了该海域的海水环境质量。结果显示,近 6 年海州湾调查海域海水环境质量均符合国家一类海水水质标准,属于尚清洁等级。根据营养化评价模式,2008 年海州湾调查海域营养水平属磷限制潜在性富营养,2012 年属贫营养。海水的 N/P 均大于 Redfield 值,表明调查海域受到磷限制。通过主成分分析,COD、As、DIN、Cu 和 Cd 具有较高的正载荷,主要是有机污染、营养盐和重金属。海州湾调查海域核心区海水环境更易于受到污染,应当引起重视。

关键词 海州湾;综合评价;主成分分析;环境质量;保护区

中图分类号 X828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0016-07

水产种质资源保护区,是指为保护水产种质资源及其生存环境,在保护对象的产卵场、索饵场、越冬场、洄游通道等主要生长繁育区域,依法划定并予以特殊保护和管理的海域、滩涂及其毗邻的岛礁、陆域。水产种质资源保护区分为国家级和省级,其中国家级水产种质资源保护区是指在国内国际有重大影响,具有重要经济价值、遗传育种价值或特殊生态保护和科研价值,保护对象为重要的、洄游性的共用水产种质资源或保护对象分布区域跨省(自治区、直辖市)际行政区划或海域管辖权限的、经国务院或农业部批准并公布的水产种质资源保护区。水产种质资源保护区一般位于沿岸、滩涂或河口区域,受人类活动影响较大,尤其是近年来沿岸涉渔(海)工程建设、过度捕捞及水体污染等人类活动,使得中国近海的水产种质资源保护区遭到了不同程度的损害(刘立明,2011)。因此,开展水产种质资源保护区生态环境监测与评价研究显得尤为重要。

大竹蛭是海产珍品之一,近年来,由于海洋污染和过度捕捞,至使全国乃至世界少有的海珍资源——

日照大竹蛭面临绝迹。为保护和挽救海州湾大竹蛭这一濒临绝迹的名贵珍稀物种,国家建立了海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区,需加强对保护区进行监测与保护,及时对海洋环境质量进行调查和评价,以便于可持续的发展海洋经济,合理的利用海洋资源。目前对国家级水产种质资源保护区开展调查监测及进行生态环境质量综合评价越来越受到重视,如夏斌等(2010)和崔毅等(2013)分别于 2008 年和 2011–2013 年对靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质资源保护区生态环境质量进行了综合评价,结果表明,该海域营养水平基本属于富营养化,且有机污染严重。战培荣等(2010)对黑龙江盘古河细鳞和江鳕水产种质资源保护区进行了监测和评价,表明该海域水质优良,处于自然原始状态。徐姗楠等(2012)在现场调查、公众走访以及历史资料分析的基础上,对北部湾二长棘鲷长毛对虾国家级水产种质资源保护区的生态系统服务价值进行评估。但是关于海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区的海水环境质量综合评价的研究尚没有报道。本研究根据 2008–2013 年夏季对海州湾大竹蛭

* 国家海洋局项目[DOME(P)(MEA)-01-01]和国家海洋局项目[DOME(P)(MEA)-02]共同资助。夏 斌, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 崔 毅, 研究员, E-mail: cui@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-12-04, 收修改稿日期: 2014-03-10

国家级水产种质资源保护区的生态环境质量调查数据,运用综合质量指数法对该海域的海水水质状况进行了综合评价,并运用潜在富营养化评价法和主成分分析法从不同方面分析了该海域的海水环境质量,以期及时了解该海域的生态环境质量综合状况及变化趋势,为有效保护和管理大竹蛭国家级水产种质资源保护区提供科学依据。

1 采样与分析方法

1.1 研究区域概况

海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区位于山东省辖区的日照市东港区傅疃河与涛雒河口外的浅海海域,由中华人民共和国农业部 2007 年 12 月 12 日批准建立。保护区总面积为 42.88 km²,整个保护区共划分为核心区 and 实验区,其中核心区面积为 15.20 km²,实验区面积为 27.68 km²。核心区特别保护期为 4-7 月。保护区的北部、西部和南部所面临海域均为浅海养殖区,东部与文昌鱼保护区相距 6 km。保护区的主要保护对象为大竹蛭,栖息的其他物种包括西施舌、带鱼、蓝点马鲛、黄姑鱼、星鳎、马面鲀、鲉鱼、梭鱼、黄鲫鱼、对虾、毛虾、虾蛄等。

1.2 采样站位与时间

调查区域位于日照市东港区的海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区内,共设置 5 个调查站位进行海洋环境调查(图 1),其中,5 号站位位于核心区内,其他站位位于实验区与核心区的交界处。调查时间为 2008-2013 年的 8 月。

1.3 测定参数与分析方法

水样用 Niskin 采水器采集,采样层次为表层。

监测项目包括盐度(S)、pH、化学耗氧量(COD)、溶解无机氮(DIN)、活性磷酸盐(PO₄³⁻-P)、铜(Cu)、锌(Zn)、镉(Cd)、砷(As)。盐度、pH 现场用美国 YSI 多参数仪(556MPS)测定;COD 用重铬酸钾法测定;As 用原子荧光法测定;Cu、Zn、Cd 用原子吸收分光光度法测定;PO₄³⁻-P 用磷钼蓝分光光度法测定;NO₃⁻-N 用镉柱还原法测定;NO₂⁻-N 亚硝酸盐用萘乙二胺分光光度法测定;NH₄⁺-N 用次溴酸盐氧化法测定。DIN 为 NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 和 NH₄⁺-N 浓度之和。样品的采集、现场处理及分析方法等细节均按照《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007)中所规定的方法进行。

1.4 评价方法与标准

1.4.1 综合质量指数法 综合指数法能很好地反映渔场环境综合质量(贾晓平等,2003),评价公式为:

$$Q = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^N P_i$$

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

式中, Q 为综合污染指数, N 为污染物项数, P_i 为污染物的污染指数, C_i 为实际测量值, C_s 为评价因子的评价标准值。本研究采用一类海水水质标准作为评价标准值(GB3097-1997)。综合质量指数与环境分级的关系如表 1 所示。

1.4.2 潜在性富营养化评价方法 参照国家海水水质标准及有关实验结果,选用郭卫东等(1998)提出的潜在性富营养化评价方法及营养分级模式进行评价(表 2)。

1.4.3 主成分分析法 主成分分析法(Principal components analysis, PCA)通过降维技术把多个变量化为少数几个主成分,能够在最大限度地保留原始数

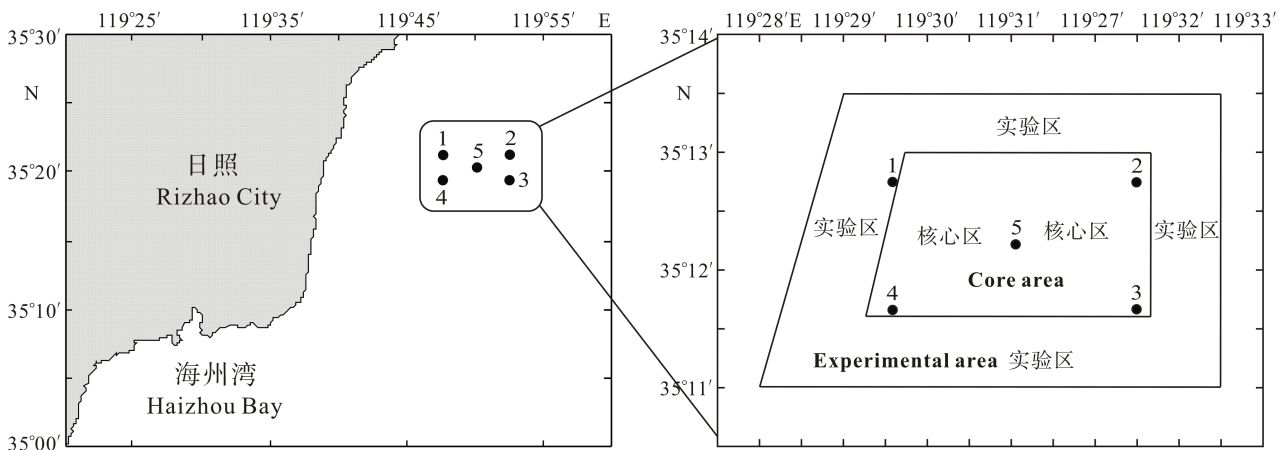


图 1 保护区调查站位

Fig.1 Location of sampling sites in the protected area

表 1 综合质量指数与环境分级关系

Tab.1 Relationship between the comprehensive quality index and the environmental classification

分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index	分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index
清洁 Clean	$Q < 0.3$	污染 Pollution	$2 \leq Q < 3$
尚清洁 Slight clean	$0.3 \leq Q < 0.7$	重污染 Serious pollution	$3 \leq Q < 5$
允许 Permit	$0.7 \leq Q < 1.0$	恶性污染 More serious pollution	$Q \geq 5$
轻污染 Light pollution	$1 < Q < 2$		

表 2 潜在性富营养化评价

Tab.2 The potential eutrophication assessment standards

等级 Grade	营养级 Nutrient level	DIN($\mu\text{g/L}$)	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{g/L}$)	N/P
I	贫营养 Poor nutrient	<200	<30	8-30
II	中度营养 Medium nutrient	200-300	30-45	8-30
III	富营养 Rich nutrient	>300	>45	8-30
IV _P	磷限制中度营养 Medium nutrient with limited phosphorous	200-300	/	>30
V _P	磷中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with medium limited phosphorous	>300	/	30-60
VI _P	磷限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with limited phosphorous	>300	/	>60
IV _N	氮限制中度营养 Medium nutrient with limited nitrogen	/	30-45	<8
V _N	氮中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with medium limited nitrogen	/	>45	4-8
VI _N	氮限制潜在性富营养 Potential rich nutrient with limited nitrogen	/	>45	<4

据信息的基础上, 对高维变量进行综合和简化(高惠璇, 2005)。主成分分析法能够客观地确定各指标的权重, 避免主观随意性, 较其他的方法有一定的优越性, 是环境质量综合评价的一种简单有效的方法, 已广泛运用在重金属污染以及富营养化评价中(Shine *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 2000)。分析步骤如下:

建立原始变量矩阵, 则构成一个 $n \times p$ 阶的水质数据矩阵:

$$x = (x_1, x_1, \dots, x_p) = \begin{bmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1p} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{np} \end{bmatrix}$$

将各变量标准化, 即对同一变量减去其均值再除以标准差, 以消除量纲影响; 在标准化数据矩阵的基础上计算原始指标相关系数矩阵 R ; 解特征方程, 并将其 P 个特征根按大小顺序排列并依据累计方差贡献率 ≥ 0.85 确定一个 m 值; 依据前 m 个特征值对应的单位特征向量即可以写出主成分计算公式; 将各待评样点的标准化数据分别代入各主成分的表达式中, 计算得出采样点的各主成分得分 F_i , 以方差贡献率(d_i)

为权数求和计算综合得分:

$$F = \sum_{i=1}^m d_i \cdot F_i$$

各项得分值即是对水体采样点污染程度的量化描述。

2 结果与讨论

2.1 评价因子的含量水平

2008-2013 年夏季海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区海水评价因子的含量如表 3 所示, 近 6 年盐度的变化范围是 28.49-31.51, 最低值出现在 2013 年, 最高值出现在 2008 年。与国家海水水质标准(GB3097-1997)对比, 2008 年的 DIN 含量全部超出一类海水水质标准, 平均超标率为 37.98%, 2009 年第 4、5 号站超出一类海水水质标准, 超标率分别为 13.04% 和 4.14%, 其他时间的所有调查站位监测因子均符合一类海水水质标准, 这表明海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区调查海域水质比较清洁。但是

表 3 主要水质因子含量
Tab.3 Content of the main water quality factors

年份 Year	指标 Index	盐度 Salinity	pH	COD (mg/L)	DIN(μg/L)	PO ₄ ³⁻ P (μg/L)	Cu(μg/L)	Zn(μg/L)	Cd(μg/L)	As(μg/L)
2008	范围 Range	30.67-31.51	8.05-8.26	0.44-1.97	227.65-399.03	6.95-9.86	0.48-0.72	4.14-6.82	0.25-0.34	2.36-3.01
	平均值 Average	31.14	8.15	1.16	335.81	8.12	0.58	5.29	0.30	2.67
2009	范围 Range	30.89-31.14	8.28-8.36	0.35-0.84	77.51-234.40	4.49-5.89	1.41-5.91	4.56-12.16	0.17-0.36	2.14-4.41
	平均值 Average	31.06	8.32	0.60	180.33	5.35	3.23	8.75	0.25	3.16
2010	范围 Range	30.09-31.10	8.04-8.16	0.30-0.63	81.1-120.7	4.15-6.92	1.97-4.15	7.78-13.56	0.18-0.49	2.14-5.24
	平均值 Average	30.89	8.08	0.48	99.74	5.39	3.06	10.14	0.32	3.51
2011	范围 Range	30.15-30.82	8.06-8.31	0.55-0.75	119.78-139.12	6.91-8.99	2.15-5.65	11.30-22.30	0.12-0.33	3.54-5.61
	平均值 Average	30.40	8.19	0.65	130.77	5.53	3.52	14.48	0.25	4.30
2012	范围 Range	28.49-28.72	7.97-8.03	0.76-1.24	88.90-138.04	12.12-28.38	0.45-0.87	9.87-15.36	0.42-0.77	0.43-0.92
	平均值 Average	28.64	8.01	1.01	118.56	15.96	0.62	12.13	0.56	0.63
2013	范围 Range	28.49-28.72	7.97-8.03	1.84-2.11	109.89-161.16	4.52-14.35	0.65-1.22	10.54-14.36	0.23-0.65	0.87-1.40
	平均值 Average	28.64	8.01	1.95	123.84	11.26	0.84	12.38	0.47	1.08
平均值 Average		30.13	8.13	0.98	164.84	8.60	1.98	10.53	0.36	2.56

2009 年、2010 年和 2011 年 Cu 的含量已超出美国国家海洋与大气管理局(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)推荐的海水中重金属生物慢性安全浓度下限(Long *et al*, 1995), 可能会对生物体产生毒性。将海州湾保护区海水环境质量与靖海湾松江鲈鱼国家级水产种质自然保护区进行比较, DIN 和 PO₄³⁻-P 的含量远低于靖海湾的含量, 但重金属 Cu、Zn、Cd、As 的含量要高于靖海湾的含量(夏斌等, 2010), 这可能是由于陆源径流携带的吸附态重金属离开海岸一定距离后, 被吸附的重金属解析出来, 使部分颗粒态的重金属转换为溶解态(宋金明等, 2004)。

2.2 海水综合质量评价

采用综合质量指数法对表 2 中所列的 9 项环境因子进行综合质量评价, 综合质量指数如图 2 所示, 从年度变化趋势分析, 2008 年综合质量指数范围为 0.42-0.55, 平均值为 0.47; 2009 年综合质量指数范围为 0.39-0.61, 平均值为 0.51; 2010 年综合质量指

数范围为 0.33-0.45, 平均值为 0.40; 2011 年综合质量指数范围为 0.41-0.53, 平均值为 0.47; 2012 年综合质量指数范围为 0.46-0.68, 平均值为 0.52; 2013 年综合质量指数范围为 0.46-0.63, 平均值为 0.54。

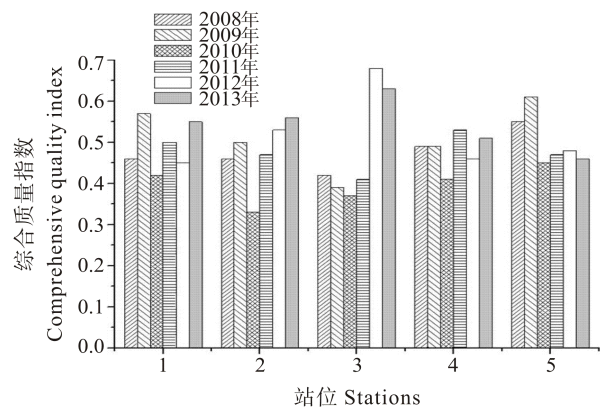


图 2 2008-2013 年夏季海州湾调查站位的综合质量指数
Fig.2 The comprehensive quality index of each station in Haizhou Bay in 2008-2013

整体分析,近年来综合质量指数呈升高-降低-升高的趋势,在 2013 年达到最大值,表明海州湾保护区海水质量近年来有所下降。从调查站位分析,近年来 1 号站综合质量指数范围为 0.42-0.57,平均值为 0.49; 2 号站综合质量指数范围为 0.33-0.56,平均值为 0.48; 3 号站综合质量指数范围为 0.37-0.68,平均值为 0.48; 4 号站综合质量指数范围为 0.41-0.53,平均值为 0.48; 5 号站综合质量指数范围为 0.45-0.61,平均值为 0.50。保护区核心区中央的 2、3、4 号站综合质量指数最低,5 号站综合质量指数最高,但相差较小。根据综合质量指数与环境分级(表 3),2008-2013 年海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区综合质量指数均处于 0.33-0.68 之间,这表明调查海域海水质量等级为尚清洁。

2.3 潜在富营养化评价

氮磷等营养盐是海洋生物生长的必需物质,但是过量的营养盐进入水体可以使水质富营养化,并诱发赤潮。根据郭卫东等(1998)以氮、磷营养盐作为评价参数的潜在性富营养化评价模式对海州湾调查海域营养状况进行评价(表 4),结果表明,海州湾调查水域 2008 年营养水平属磷限制潜在性富营养,2012 年属贫营养。2008-2013 年的 N/P 的范围为 16.44-91.62,平均值为 51.67,其中 2012 年的比值最低,2008 年的比值最高。近 6 年的 N/P 均大于 Redfield 值(Redfield, 1958),这表明调查海域的磷含量缺乏,受到磷限制,并且近 5 年的 $PO_4^{3-}-P$ 含量均低于浮游植物正常生长繁殖所必需的含量($17.98 \mu\text{g/L}$) (郭卫东等, 1998),由此推论,无机磷酸盐为影响该海域浮游植物生长繁殖的限制因子。

表 4 海州湾营养级评价

Tab.4 The trophic level evaluation of Haizhou Bay

年份 Year	DIN ($\mu\text{g/L}$)	$PO_4^{3-}-P$ ($\mu\text{g/L}$)	N/P	营养级别 Nutrient level
2008	335.8	8.12	91.62	VI _p
2009	180.3	5.35	74.66	/
2010	99.7	5.39	40.94	/
2011	130.8	5.53	41.88	/
2012	118.6	15.96	16.44	I
2013	173.0	11.26	45.90	/

2.4 海州湾海水质量的主成分分析

主成分分析法能够简化数据,即通过较少的综合指标代替原来具有一定相关性的较多指标,来反映原来多变量的大部分信息。如李玉等(2006)运用主成分分析法研究了胶州湾表层沉积物中重金属污染来源,

主要有工业排污、有机质降解、岩石的自然风化与侵蚀过程。蔡龙炎(2010)基于主成分分析法研究了泉州湾表层沉积物中重金属污染的可能来源,包括工业排污的点源污染,矿物开采及农业化肥农药的使用残留的非点源污染,岩石自然风化与侵蚀过程和有机质降解矿化的内源污染。代进锋等(2007)采用主成分分析法对乌梁素海水体的污染程度进行定量化评价。通过对海州湾调查海域海水盐度、pH、COD、DIN、DIP、Cu、Zn、Cd、As 进行主成分分析,发现前 3 个主成分的特征值为 8.517,累计贡献率为 94.64%,超过了 85%,故用主成分 F1、F2、F3,这 3 个变量来代替了原始变量(盐度、pH、COD、DIN、DIP、Cu、Zn、Cd、As),反映了原始数据的绝大部分的信息(表 5)。第一主成分的方差贡献率为 40.90%,其特点是因子变量在 COD 和 As 的浓度上有较高的正载荷(图 3),分别为 0.972, 0.970。COD 和 As 为影响水质的主要因子,第一主成分反映了水体中有机污染和 As 污染的情况;第二主成分的方差贡献率为 38.11%,因子变量在 DIN 和 Cu 的浓度上有较高的正载荷(图 3),分别为 0.905、0.827。第三主成分的方差贡献率为 15.63%,因子变量在 Cd 浓度上有较高的正载荷(图 3),为 0.997。在这 3 个主成分分析中,COD、As、DIN、Cu 和 Cd 具有较高的正载荷,其中 Cu 和 As 在自然环境中含量极少,主要以矿物的形式存在,是化肥和农药的重要成分,通过相关性分析,Cu 和 As 具有显著的相关性($R=0.843, P < 0.05$)。这可能是由于保护区西南部为岚山港临时海洋倾倒区海域,海洋倾倒区是具有倾倒疏浚物特殊功能的海域,该海域疏浚物主要来自岚山港日常建设外抛及港池、回旋水域与航道,同时岚山港是鲁东南与苏北交界处的唯一

表 5 主成分分析主要计算结果

Tab.5 The results of the principal component analysis

项目 Items	第一主成分 F ₁	第二主成分 F ₂	第三主成分 F ₃
盐度 Salinity	-0.594	-0.676	-0.360
pH	0.730	-0.559	0.314
COD	0.972	0.088	-0.218
DIN	0.281	0.905	-0.189
DIP	-0.374	-0.800	0.176
Cu	-0.467	0.827	0.040
Zn	-0.691	0.674	0.241
Cd	-0.030	0.044	0.997
As	0.967	0.227	0.106
特征值 Characteristic value	3.681	3.430	1.406
贡献率 Contribution rate(%)	40.90	38.11	15.63
累计贡献率 Cumulative contribution rate(%)	40.90	79.01	94.64

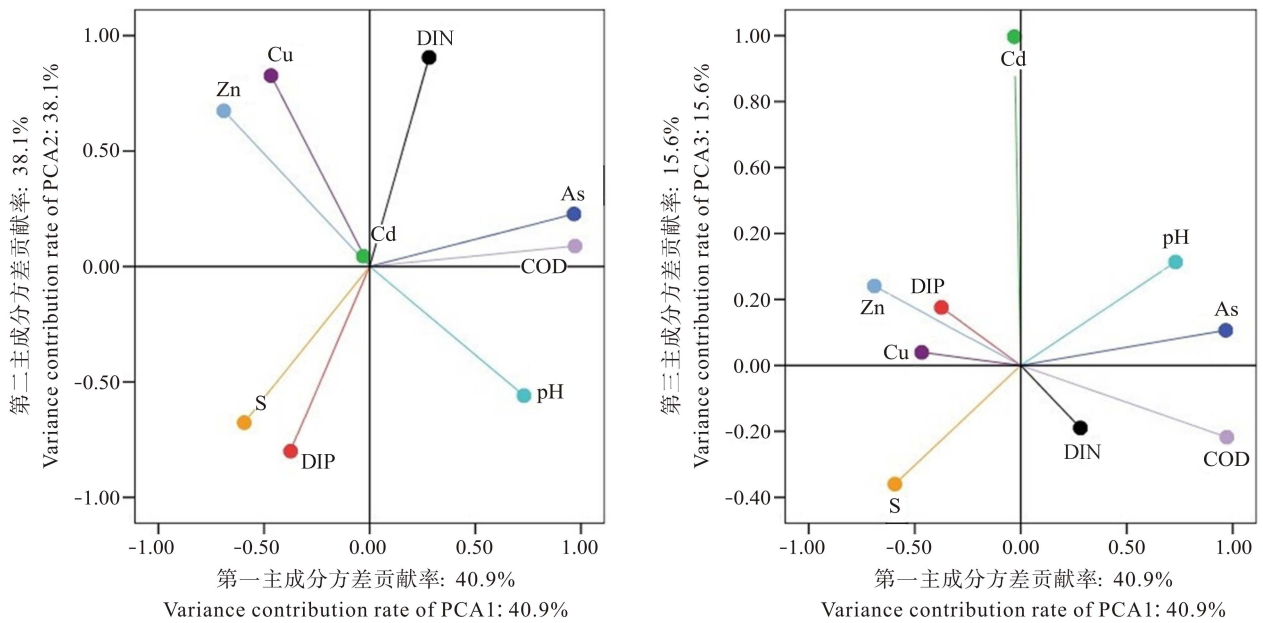


图 3 不同评价因子的二维因子载荷

Fig.3 Loading plots of the evaluation factors in the space defined by two components

表 6 海州湾调查站位水质主成分分析结果

Tab.6 The results of the principal component analysis of Haizhou Bay

站位 Station	第一主成分得分 F_1	第二主成分得分 F_2	第三主成分得分 F_3	综合得分 F	污染综合排名 Pollution comprehensive ranking
1	-2.051	1.380	-1.078	-0.509	4
2	-0.955	0.248	0.030	-0.308	3
3	-1.070	-1.670	1.566	-0.876	5
4	1.755	-2.098	-1.227	-0.289	2
5	2.321	2.138	0.710	1.981	1

港口, 江北重要的液化品集散地, 是全国沿海一类开放口岸和区域性重要港口, 有大量的船舶停泊和通行, 对海州湾保护区海水环境质量产生一定的影响(张亮等, 2012)。综上所述, COD、As、DIN、Cu 和 Cd 可以代表近 6 年来海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区海水的污染状况, 在以后的调查监测中须引起重视。

各主成分得分与对应的方差贡献率乘积的总和即为综合得分, 得分越高, 表明污染程度越严重(周斌等, 2010)。海州湾调查站位的综合得分及污染综合排名结果如表 6 所示, 5 号站位排名第 1, 表明 5 号站的海水环境质量最差, 这主要是由于 5 号站位于海州湾保护区核心区的中央, 不利于污染物的扩散, 更易于受到污染, 在以后的养殖活动中应引起重视。

3 结论

(1) 从海水环境综合质量分析, 2008-2013 年海

州湾保护区水域年平均综合质量指数均处于 0.33-0.68 之间, 海水质量较清洁。2013 年综合质量指数达到最大值, 表明海州湾保护区海水质量近年来有所下降。从站位间的比较分析, 5 号站的海水环境质量最差, 在以后的养殖活动中应引起重视。

(2) 从海域营养状况分析, 2008 年营养水平属磷限制潜在性富营养, 2012 年属贫营养。调查海域整体表现为磷含量缺乏, 无机磷酸盐为影响该海域浮游植物生长繁殖的限制因子。

(3) 从不同监测因子对于海州湾海水环境质量的贡献分析, COD、As、DIN、Cu 和 Cd 可以代表近 6 年来海州湾大竹蛭国家级水产种质资源保护区海水的污染状况, 在以后的调查监测中须引起重视。

致谢: 感谢黄海水产研究所崔正国副研究员、张旭志副研究员、张艳助理研究员、徐勇助理研究员、丁东生博士后在样品采集及检测中给予的帮助。

参 考 文 献

- 代进锋, 李畅游, 张生, 等. 乌梁素海水质指标的主成分分析. 农业环境科学学报, 2007, 26(B10): 400-405
- 刘立明. 水产种质资源保护区建设成效显著. 中国水产, 2011, (1): 28-28
- 李玉, 俞志明, 宋秀贤. 运用主成分分析(PCA)评价海洋沉积物中重金属污染来源. 环境科学, 2006, 27(1): 137-141
- 宋金明. 中国近海生物地球化学. 济南: 山东科技出版社, 2004, 219-230
- 张亮, 吴凤丛, 宋春丽, 等. 海州湾北部海域表层沉积物污染分布特征及环境质量评价. 海岸工程, 2012, 31(2): 54-61
- 周斌, 王悠, 王进河, 等. 山东半岛南部近岸海域富营养化状况的多元评价研究. 海洋学报, 2010, 32(2): 128-138
- 战培荣, 陈中祥, 覃东立, 等. 黑龙江盘古河细鳞和江鲈水产种质资源保护区水环境理化监测与评价. 安全与环境学报, 2010, 10(2): 102-105
- 郭卫东, 章小明, 杨逸萍, 等. 中国近岸海域潜在性富营养化程度的评价. 台湾海峡, 1998, 17(1): 64-70
- 高惠璇. 应用多元统计分析. 北京: 北京大学出版社, 2005, 265-289
- 夏斌, 马绍赛, 崔毅, 等. 2008年夏季靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区生态环境质量综合评价. 海洋环境科学, 2010, 34(2): 476-483
- 徐姗楠, 陈作志, 于杰, 等. 水产种质资源保护区的生态系统服务价值评估——以北部湾为例. 生态学杂志, 2012, 31(11): 2900-2906
- 贾晓平, 杜飞雁, 林钦, 等. 海洋渔场生态环境质量状况综合评价方法探讨. 中国水产科学, 2003, 10(2): 160-164
- 崔毅, 马菲菲, 夏斌, 等. 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区海水环境质量年际变化趋势及综合评价. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 1-8
- 蔡龙炎. 基于主成分分析法的泉州湾表层沉积物中重金属污染可能来源分析. 台湾海峡, 2010, 29(3): 325-331
- Long ER, Macdonald DD, Smith SL, *et al.* Incidence of adverse biological effects within range of chemical concentrations in marine and estuary sediments. Environmental Management, 1995, 19(1): 81-97
- Perkins RG, Underwood GJC. Gradients of chlorophyll a and water chemistry along an eutrophic reservoir with determination of the limiting nutrient by in situ nutrient addition. Water Research, 2000, 34(3): 713-724
- Redfield AC. The biological control of chemical factors in the environment. Am Sci, 1958, 46: 205-221
- Shine JP, Ika RV, Ford TE. Multivariate statistical examination of spatial and temporal patterns of heavy metal contamination in new bedford harbor marine sediments. Environmental Science & Technology, 1995, 29(7): 1781-1788

(编辑 江润林)

Environmental Quality Evaluation of *Solen grandis* Resources Protection Area in Haizhou Bay

XIA Bin, MA Feifei, CHEN Bijuan, CUI Yi^①, SUN Xuemei, QU Keming

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

Abstract Marine pollution and over-fishing have made China's offshore aquatic germ plasm resources suffering from damage in varying degrees, which have attenuated the ecological environment quality. However, the studies on the environmental quality evaluation of the national germ plasm resources protection areas are limited. In this study, we evaluated the water environment quality of the surface waters in *Solen grandis* germ plasm resource protection area of Haizhou Bay from 2008 to 2013. The comprehensive quality index, potential eutrophication assessment method and principal component analysis (PCA) were used to evaluate the water environment quality. Based on eutrophication evaluation model, the nutrients levels of the survey area were phosphorus limiting potential eutrophication in 2008 and poor nutrient in 2012. N/P values were higher than the Redfield ratio. According to the principal component analysis, COD, As, DIN, Cu and Cd had a higher positive load, demonstrating that organic pollution, nutrient and heavy metals were the dominant pollutants. These results suggest that the sea water environment quality in Haizhou Bay was classified as the first class sea water quality standard, and reached the clean level.

Key words Haizhou Bay; Comprehensive evaluation; PCA; Environmental quality; Protection area

① Corresponding author: CUI Yi, E-mail: cui@ysfri.ac.cn

青岛陆源排污口邻近海域异养细菌的组成与分布*

刘 霜^{1,2①} 李永霞³ 刘旭东⁴ 崔正国³ 王亚楠⁵
孙蓓蓓^{1,2} 宋 帅^{1,2}

(1. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033; 2. 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室 青岛 266033; 3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 4. 青岛市环境监测中心站 青岛 266003; 5. 青岛市海洋与渔业局 青岛 266071)

摘要 对青岛近海度假区、港口区、养殖区、工业区 4 类排污口邻近海域异养细菌的组成与分布进行了调查研究,采用海洋异养细菌平板涂布培养法分离细菌,基于 16S rDNA 的扩增性 DNA 限制性酶切片分析(ARDRA)进行聚类筛选并测序鉴定。结果显示,青岛排污口邻近海域可异养培养的菌株分布于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 个细菌类群,变形菌门细菌数量占总测序数量的 68%,其中 γ -变形菌纲的数量在变形菌门中占 88%;不同海域中细菌组成与分布有所不同,放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同,但 γ -变形菌纲的弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)在 4 类海域中均被发现,占总检测量的 18.54%,其中溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)占弧菌总量的 25%。不同海域也检测到 *V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus* 等水产养殖业的潜在致病菌。根据 16S rDNA 系统进化关系和细菌门类聚类分析得到的结论推断,工业区与养殖区海域的细菌组成和分布相似度较高,推断各海域的细菌组成与排污口类型有一定相关性。

关键词 排污口;海洋异养细菌;16S rDNA;弧菌

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0023-07

陆源入海排污口是指将生活、生产污水排入大海的出口。近年来,随着社会生产力的不断发展及人民生活水平的不断提高,排污口对邻近海域的环境压力也日益增大(姜南等, 2013)。海洋环境对污染物的降解处理能力有限,污染物的经常性超标必然对排污口及邻近海域的生态环境及微生物群落构成严重威胁(刘慧慧等, 2013)。

自 19 世纪 30 年代科学家 Ehrenberg 首次分离了第一株海洋细菌以来,随着对海洋科学领域的不断研究和探索,海洋微生物尤其是海洋异养细菌在海洋生态系统物质循环、能量流动及维持海洋生态系统多样性和稳定性方面的重要性被人们广泛认可并深入研究(孙昌魁等, 2001; Fuhrman *et al*, 1980)。分离培养是

微生物学一项传统但不可或缺的研究,虽然近年来非培养手段不断发展并在微生物多样性调查中得到广泛应用,但纯培养仍然是对微生物生理特性和生态功能进行深入分析的基础,因此菌株的分离纯化一直受到微生物学家的高度重视(田甜等, 2009; Erick *et al*, 2008; 王印庚等, 2012; 胡修贵等, 2012)。

不同时期、不同海域的水质环境不同,其微生物群落的组成与结构也不相同。李筠等(2006)研究了 1999–2000 年间青岛近岸养殖密集区、工业区、洁净区的海洋异养细菌分布,分离到的细菌分别属于弧菌属(*Vibrio*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、海单胞菌属(*Oceanimonas*)、噬纤维菌属(*Cellulophaga*)、

* 海洋公益性行业科研专项(201105007)资助

① 通讯作者: 刘 霜, 高级工程师, E-mail: liushuang@bhj.gov.cn

收稿日期: 2013-12-24, 收修改稿日期: 2014-02-19

赤细菌属(*Erythrobacter*)和 *Rhodovirga*。

为了研究近些年青岛近海排污口细菌的种类特征及分布规律,本研究在青岛近海的 4 类功能区(港口区、度假区、养殖区和工业区)的排污口附近海域进行采样,利用扩增性 rDNA 限制性酶切片段多态性分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA),从中选择具有差异性的片段进行测序,探讨青岛近海不同排污口海域海水中细菌的种类组成、优势菌群的群落结构和分布特点,为排污口的科学治理与环境质量评价提供相关依据,也为近海微生物资源及生态环境的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

1.1.1 样品采集 于 2011 年 7-8 月,在青岛近海的 4 类排污口附近海域(图 1)采集了 2-3 次表层海水样品。其中 A 为度假区排污口邻近海域(市南区五四广场),B 为港口区排污口邻近海域(四方区海泊河),C 为养殖区排污口邻近海域(崂山区浦里),D 为工业区排污口邻近海域(李沧区制碱公司排污区)。2011 年青岛市海洋环境公报显示,度假区排污口污水主要为附近居民和酒店的生活污水,污染物主要为有机质、氨氮和磷酸盐等;港口区污水的污染物除了有机质、氨氮、磷酸盐外,还有油类物质;养殖区排污口污水主要来自附近的海水养殖基地,富含铵盐和有机质;工业区排污口污水成分与附近工业生产相关,除了有机质和氮磷元素外,还有重金属离子(砷、汞、铅、镉等)。

海水样品采用无菌采水瓶在表层收集 250 ml,冷藏带回实验室,2 h 内进行处理。方法参照海洋监测规范。

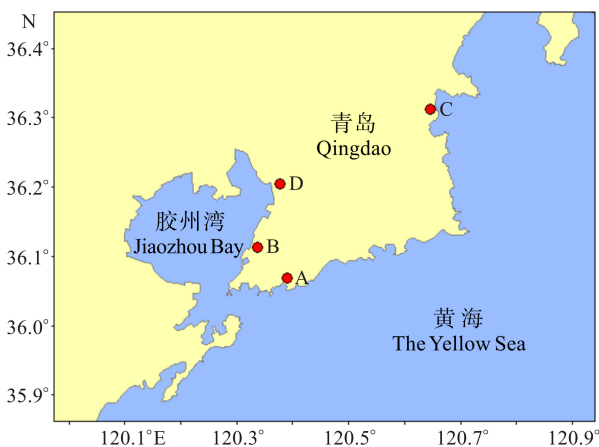


图 1 采样站点

Fig.1 Geographic locations of the sampling sites

1.1.2 样品的处理及细菌的培养 用无菌海水对样品进行 10 倍系列稀释,稀释后的样品涂布于 2216E、TCBS、海水 R2A 培养基平板。每个平板涂布稀释样品 0.1 ml,每个稀释度涂布 3 个平板。28℃ 培养 2 d 后进行计数,从菌落数介于 30-300 之间的平板上,采用随机挑取菌落法,在每个样品中随机挑取至少 20 个表现不同的菌落(细菌菌落的大小、颜色、透明度、干燥或湿润、边缘是否规则、菌落突起、平坦或凹陷等特征指标),再进一步纯化。每个菌落纯化至少两次。纯化后的细菌培养液中加入 20% 无菌甘油, -80℃ 冷冻保存备用。

1.2 16S rDNA 分析

1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取 选取表现具有不同特征的菌株使用煮沸法和酚-氯仿法进行 DNA 提取。优先使用煮沸法提取 DNA,未能扩增出 16S rDNA 片段时,再使用酚-氯仿法。

煮沸法:将培养后用无菌生理盐水洗脱重悬的菌体 0.5 ml,沸水浴 10 min,冰浴 20 min。4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.3 ml,其中所含 DNA 作为 PCR 模板。

酚-氯仿法:优化 Ausubel (1992)所提方法:将活化的菌株 28℃ 培养 24-48 h,用无菌生理盐水洗脱菌体,10000 r/min 离心 10 min,收集菌体。475 μl TE 缓冲液重悬菌体,加入 25 μl 10% SDS、5 μl 蛋白酶 K,混匀后 55℃ 水浴 1 h。加入等体积饱和酚混匀,静置 2 min,10000 r/min 冷冻离心 10 min。取上清液,加等体积氯仿混匀,12000 r/min 离心 10 min。取上清液,加 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH=5.2)、2.5 倍体积无水乙醇,混匀后置 -20℃ 冰箱过夜。次日取出,10000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 70% 乙醇洗两次,置室温干燥 1 h。取 50 μl 无菌蒸馏水溶解,取部分用紫外分光光度计测定 DNA 含量,剩余部分置 -20℃ 冰箱保存。

1.2.2 16S rDNA 片段的扩增 根据设计的引物从总 DNA 中扩增 16S rDNA。引物为细菌 16S rDNA 通用引物,扩增 16S rDNA 基因 8-1510 核苷酸序列。引物选择参照文献(DeLong, 1992),上游引物: 5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',引物由上海生物工程公司合成。

扩增体系的总体积为 50 μl,其中包括 5 μl 10× Buffer(含 Mg²⁺)、5 μl dNTP (2.5 mmol/L)、约 30 ng 总 DNA 溶液、上下游引物各 0.5 μl (20 pmol/L)、0.3 μl *Taq* 聚合酶,双蒸水补齐 50 μl 总体积。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min、55℃ 退火 1 min

30 s、72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

1.2.3 扩增产物的检测及纯化 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测。采用胶回收试剂盒(宝生物, 大连)纯化 PCR 产物。

1.2.4 扩增性 rDNA 限制性酶切片分析(ARDRA)

将 PCR 产物用 *Hha* I 进行酶切。酶切反应体系为 15 μl。其中, *Hha* I 1.5 μl, 10×Buffer 1 μl, 16S rDNA 扩增产物 5 μl, 双蒸水 7.5 μl。

1.3 测序与结果分析

根据酶切结果将菌株归类筛选, PCR 产物送华大基因生物公司进行测序, 将测得的序列与 GenBank 数据库中的基因序列进行相似性比较, 找出相似度最近的细菌, 对测序结果进行分类分析。

测序菌株的系统进化树, 基于 16S rDNA 序列, 以 Mega 5.0 建立的 Neighbor-joining 进化树, 节点自举值为 1000 次重复结果, 标尺长度表示核苷酸序列的替换为 5%。

采用 Primer 5 软件, 根据物种是否出现在各被测群体中进行群落聚类分析(Cluster)。

2 结果与讨论

2.1 各排污口海域细菌的种类组成与分析

从各排污口海域采样, 经分离纯化保种 312 株细菌, 其中度假区、工业区、港口区和养殖区排污口邻近海域分别纯化 77 株、69 株、88 株和 78 株。酶切聚类筛选后的测序结果显示, 151 株菌与 GenBank 中的序列同源性较高, 达到 98%以上。一般认为, 16S rDNA 同源序列超过 99%的细菌为同一个种, 16S rDNA 序列同源性在 97%–99%之间的细菌为同一个属, 16S rDNA 序列同源性小于 97%的则为新种类。因此, 根据这个规则来确定菌株的种属。

经鉴定, 隶属于 62 个属的 151 株细菌分布于 4 大细菌类群: 变形菌门(Proteobacteria) 104 株, 隶属于 29 个属; 厚壁菌门(Firmicutes) 36 株, 隶属于 8 个属; 放线菌门(Actinobacteria) 7 株, 隶属于 5 个属; 拟杆菌门(Bacteroidetes) 4 株, 隶属于 3 个属(表 1)。各大门类的细菌占测序细菌总数的比例见图 2, 变形菌门细菌数量占总测序数量的 68%, 其中 γ -变形菌纲的数量在变形菌门中占 88%; 厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门的数量分别占总测序数量的 24%、5%和 3%。

在度假区、工业区、港口区和养殖区的 4 类排污口海域中, 变形菌门和厚壁菌门的细菌均有分布且种类丰富(图 3、表 1)。度假区排污口海域分离到的 30

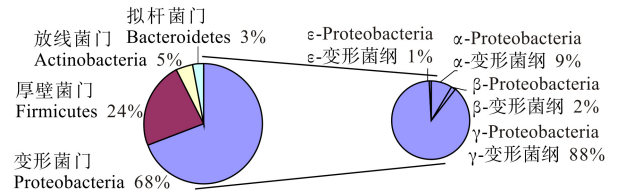


图 2 测序细菌种类的分布
Fig.2 The distributions of sequenced bacteria

株细菌, 其中变形菌门的种类最丰富, 包括 α 、 β 、 ϵ -变形菌纲的 9 个属, 未发现放线菌门的菌株; γ -变形菌纲的 *Vibrio* sp.是优势菌群, 占度假区总量的 36.67%。工业区排污口海域分离到的菌株在变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门 4 个门类均有分布; 放线菌门分离到 *Brevibacterium* sp.、*Microbacterium* sp.和 *Nesterenkonia* sp. 3 个属的细菌各 1 株; 与度假区排污口海域相同, *Vibrio* sp.是优势菌群。港口区排污口海域分离到 56 株细菌, 细菌种类最丰富; 变形菌门包括 α 、 β 、 γ -变形菌纲的 14 个属; 放线菌门分离到 *Cellulomonas* sp.的 1 株细菌; 其中 γ -变形菌纲的 *Klebsiella* sp.占 12.50%, 为优势菌群, 而 *Vibrio* sp.只占 1.79%。养殖区海域分离到 *Nesterenkonia* sp.和 *Agrococcus* sp.两个属的 3 株放线菌, 未分离到拟杆菌; *Vibrio* sp.为优势菌群, 另外分离到的同样来自 γ -变形菌纲的 *Pseudidiomarina* 占该区域细菌总数的 15.79%, 为第二大优势菌群。

许多研究表明, 变形菌门的 γ -变形菌纲和 α -变形菌纲是海洋环境中微生物的主要类群(Acinas *et al*, 1999; 李彬等, 2010; 高菲等, 2012)。本研究结果显示, γ -变形菌纲的菌株在分离到的菌株中占到了大多数, 说明各排污口海域的细菌优势菌群与一般海洋环境中的优势菌群相比, 未发生明显变化。4 类排污口海域中均大量存在 γ -变形菌纲的 *Vibrio* sp., 与宁波陆源排污口优势菌群检测结果一致(姜南等, 2013)。

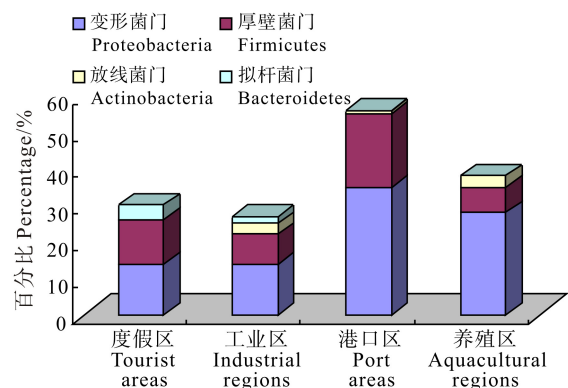


图 3 4类海域的细菌门类组成
Fig.3 The bacterial compositions of the four sea areas

表1 各排污口附近海域异养细菌 16S rDNA 序列鉴定结果
Tab.1 The sequence results of the strains analyzed by 16S rDNA

类群 Group	度假区 Tourist areas		工业区 Industrial regions		港口区 Port areas		养殖区 Aquacultural regions	
	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)	种属 Genus	百分比 Percentage (%)
α -变形菌 α -Proteobacteria	<i>Donghicola</i>	3.33	<i>Phaeobacter</i>	3.70	<i>Rhodobacteraceae</i>	1.79	<i>Brevundimonas</i>	5.26
	<i>Rhodobacteraceae</i>	10.00	<i>Sphingomonas</i>	3.70				
β -变形菌 β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>	3.33			<i>Limnobacter</i>	1.79		
γ -变形菌 γ -Proteobacteria	<i>Alteromonas</i>	6.67	<i>Alcanivoracaceae</i>	3.70	<i>Alcanivorax</i>	1.79	<i>Alishewanella</i>	2.63
	<i>Citrobacter</i>	3.33	<i>Alcanivorax</i>	3.70	<i>Alteromonas</i>	1.79	<i>Enterobacter</i>	5.26
	<i>Pseudoalteromonas</i>	6.67	<i>Idiomarina</i>	3.70	<i>Chromohalobacter</i>	8.93	<i>Enterobacteriaceae</i>	2.63
	<i>Pseudomonas</i>	6.67	<i>Pseudidiomarina</i>	3.70	<i>Citrobacter</i>	5.36	<i>Escherichia</i>	5.26
	<i>Vibrio</i>	36.67	<i>Vibrio</i>	29.63	<i>Enterobacter</i>	3.57	<i>Klebsiella</i>	2.63
					<i>Halomonas</i>	3.57	<i>Idiomarina</i>	2.63
					<i>Klebsiella</i>	12.50	<i>Pseudomonas</i>	2.63
					<i>Marinobacter</i>	1.79	<i>Pseudidiomarina</i>	15.79
					<i>Pseudoalteromonas</i>	7.14	<i>Shewanella</i>	7.89
					<i>Pseudomonas</i>	7.14	<i>Shigella</i>	2.63
					<i>Salinisphaera</i>	5.36	<i>Vibrio</i>	18.42
					<i>Vibrio</i>	1.79		
ϵ -变形菌 ϵ -Proteobacteria	<i>Arcobacter</i>	3.33	<i>Acinetobacter</i>	7.41	<i>Acinetobacter</i>	5.36	<i>Acinetobacter</i>	5.26
厚壁菌门 Firmicutes	<i>Bacillus</i>	3.33	<i>Bacillus</i>	7.41	<i>Bacillus</i>	8.93	<i>Bacillus</i>	7.89
	<i>Virgibacillus</i>	3.33	<i>Exiguobacterium</i>	7.41	<i>Enterococcus</i>	1.79	<i>Chryseomicrobium</i>	2.63
			<i>Staphylococcus</i>	7.41	<i>Exiguobacterium</i>	1.79	<i>Staphylococcus</i>	2.63
					<i>Gracilibacillus</i>	1.79		
					<i>Staphylococcus</i>	8.93		
					<i>Virgibacillus</i>	5.36		
放线菌门 Actinobacteria			<i>Brevibacterium</i>	3.70	<i>Cellulomonas</i>	1.79		
			<i>Microbacterium</i>	3.70			<i>Nesterenkonia</i>	2.63
			<i>Nesterenkonia</i>	3.70			<i>Agrococcus</i>	5.26
拟杆菌门 Bacteroidetes	<i>Escherichia</i>	3.33	<i>Flexibacter</i>	3.70				
	<i>Maribacter</i>	6.67	<i>Orabacterium</i>	3.70				
	<i>Neptuniibacter</i>	3.33						

革兰氏阳性的厚壁菌门细菌在近海海水中较为常见 (Ravenschlag *et al*, 1999)。在本研究中, 厚壁菌门细菌也主要分布于青岛周边海域的水体中。

放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同, 可能与各海域的环境因子有相关性。本研究分离到的放线菌门细菌包括 5 个属, 分别来自氮磷元素和有机质丰富、多种污染物共存的工业区、港口区和养殖区, 而氮磷元素和有机质相对较少、污染也较少的度假区海域未发现放线菌门的细菌。放线菌门在有机质分解和矿化的过程中起着重要的作用 (Bull *et al*, 2005)。本研究在一定程度上验证了已

有的报道: 微生物在地理空间上的分布差异可以看作是微生物群落对环境污染或压力的反应 (白洁等, 2009)。

2.2 弧菌的组成与分布

调查研究发现, γ -变形菌纲的弧菌属细菌 (*Vibrio* sp.) 在 4 类海域中均被检测到, 占总检测量的 18.54%。Ren 等 (2006) 研究表明, 不同区域的海水中微生物种类多样性有所不同。本研究的青岛度假区、工业区、港口区和养殖区各排污口邻近海域的污染物种类及污染情况各有不同, 各排污口弧菌的分布必然存在差

异性。

4 类海域共检测到 11 个种的弧菌, 各海域检测到的弧菌种类及其数量见表 2。度假区弧菌种类最丰富, 共分离到 12 株, 隶属于 *V. alginolyticus*、*V. azureus*、*V. communis*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus* 和 *V. splendidus* 6 个种, 其中 *V. harveyi* 最多。港口区只检测到 1 株弧菌(*V. azureus*)。工业区检测到 8 株弧菌, 来自 *V. alginolyticus*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus*、*V. splendidus* 4 个种, *V. alginolyticus* 数量最多。养殖区检测到 *V. alginolyticus*、*V. chagasii*、*V. diabolicus*、*V. owensii* 和 *V. rotiferianus* 5 个种的弧菌, *V. rotiferianus* 数量最多。整体来看, 4 类海域中, *V. alginolyticus* 是数量最多的弧菌种类, 占弧菌测序总量的 25%。众多研究表明(韩善桥等, 2008; Ren *et al.*, 2006; 赖福才等, 2004), 从不同海域分离出的细菌虽然种类与数量上有差别, 但 *V. alginolyticus* 均为数量最多的菌株, 说明在我国广大海域中 *V. alginolyticus* 分布广泛。

V. parahaemolyticus、*V. harveyi*、*V. campbellii*、*V. parahaemolyticus* 等均为水产养殖业常见潜在致病菌(Manuela *et al.*, 2003; Alsina *et al.*, 1994), 本研究在不同排污口海域也检测到了上述菌种, 随区域的不同致病菌种也随之变化。

弧菌的 16S rDNA 系统进化关系显示(图 4), 工业区和养殖区两个排污口海域的弧菌大部分聚成了一簇, 说明这两个海域的弧菌的群落特征相似, 它们与度假区和港口区海域的弧菌群落分布有一定差异, 这说明弧菌细菌群落因海域环境的不同而呈现一定

的差异性。本研究的工业区采样点位于青岛李沧区制碱企业等工业排污口附近, 重金属离子含量较其他海域丰富; 而养殖区采样点位于崂山浦里海水养殖区附近, 养殖废水中氮磷含量较高。这两个海域的水质较其他两个海域的有机质和重金属离子含量高, 污染较严重, 因此推测二者海域的细菌分布具有一定的相关性, 可能与海域的水质特征有一定关系。有研究指出, 弧菌属的一些种类具有高效处理低浓度的氮磷或重金属污染的能力, 这类细菌在治理工业、养殖废水方面有广阔的应用前景(赵锐, 2010)¹⁾。

2.3 物种聚类分析

根据各海域细菌的种类和数量作出的度假区、工业区、港口区和养殖区 4 类排污口邻近海域的细菌种类聚类图(图 5), 度假区和港口区的排污口邻近海域细菌种类聚成一支, 相似度在 70%左右; 而工业区和养殖区的排污口邻近海域的细菌种类聚成另外一支, 相似度为 50%, 说明工业区和养殖区的排污口邻近海域的细菌群落与度假区和港口区的细菌群落差异较明显。

表 2 各海域检测到的细菌种类中, 工业区和养殖区检测到数量最多的细菌均为弧菌。根据 16S rDNA 序列结果的系统进化关系得到的弧菌群落关系显示(图 4), 工业区和养殖区排污口海域的弧菌种类分布相似度较高。这些结果在一定程度上验证了细菌种类聚类分析中工业区和养殖区排污口细菌群落相似性高的特点。

表 2 各海域弧菌的种类

Tab.2 The distribution of *Vibrio* sp. in different sea areas

种类 Species	度假区 Tourist areas	工业区 Industrial regions	港口区 Port areas	养殖区 Aquacultural regions	合计 Total
<i>V. alginolyticus</i>	3	3	—	1	7
<i>V. azureus</i>	1	—	1	—	2
<i>V. campbellii</i>	—	1	—	—	1
<i>V. chagasii</i>	—	—	—	1	1
<i>V. communis</i>	1	—	—	—	1
<i>V. diabolicus</i>	—	—	—	1	1
<i>V. harveyi</i>	4	—	—	—	4
<i>V. owensii</i>	—	—	—	1	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	3	—	—	4
<i>V. rotiferianus</i>	—	—	—	3	3
<i>V. splendidus</i>	2	1	—	—	3
总计 Total	12	8	1	7	28

1) 赵锐. 青岛近海两种生态环境可培养细菌多样性研究及 3 株海洋新菌的分类鉴定. 中国海洋大学博士学位论文, 2012, 15-16

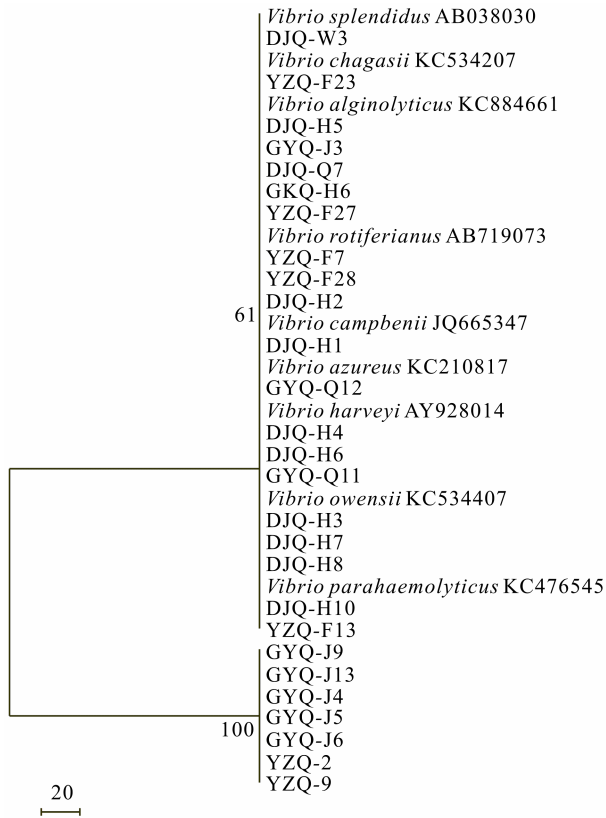


图4 各海域弧菌的16S rDNA系统进化分析

Fig.4 Phylogeny of *Vibrio* (dominant strain) in different sea areas based on the analysis of 16S rDNA

DJQ: 度假区; GKQ: 港口区; GYQ: 工业区; YZQ: 养殖区
 DJQ: tourist areas; GKQ: port areas; GYQ: industrial regions;
 YZQ: aquacultural regions

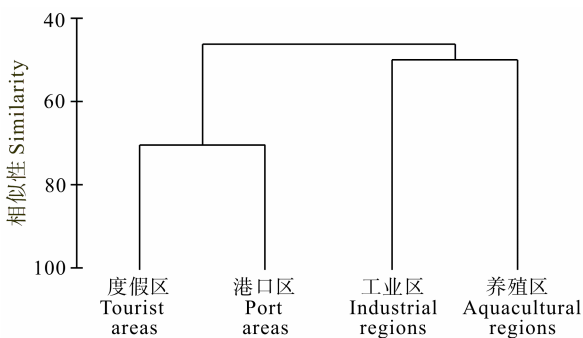


图5 4类海域的细菌种类相似度聚类

Fig.5 The cluster analysis of bacteria in different sea areas

3 结论

(1) 青岛近海排污口海域表层水的细菌组成具有多样性,分离到的菌株分布在变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门4个细菌类群。变形菌门是优势菌群,在度假区、工业区、港口区和养殖区4类排污口海域中均大量存在,变形菌门细菌数量占总测序数量的68%,其中 γ -变形菌纲的数量在变形菌门中占

88%;不同排污口邻近海域中细菌组成和分布有所不同,放线菌门和拟杆菌门的细菌种类较少且各海域分布有所不同,但 γ -变形菌纲的弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)在4类海域中均被检测到,占总检测量的18.54%,其中溶藻胶弧菌占弧菌总量的25%。

(2) 弧菌为重要的条件致病菌,在排污口各海域均被检测到,并随排污口类型的不同种类也不同,应引起相关部门的重视,加强相关监测。

(3) 不同区域的海水中微生物多样性有所不同。根据16S rDNA系统进化关系和细菌门类聚类分析得到的结论推断,工业区和养殖区海域的细菌组成和分布相似度较高,推测各海域的细菌组成与海域环境有一定相关性。

本研究拓宽了对青岛近岸不同排污口水域可培养细菌多样性的认识,并初步总结、比较了各个区域的细菌类群特点,为进一步研究青岛近岸海洋异养细菌的多样性及其分布规律与环境的关系奠定了基础,为周边海域污水治理提供了理论储备,也为今后微生物资源的开发和利用做了前期准备。

参 考 文 献

- 田甜,李冬梅,戴世鲲,等.海洋环境中难培养微生物的寡营养培养.微生物学通报,2009,36(7):1031-1039
- 白洁,李海艳,赵阳国.黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征.微生物学报,2009,49(3):343-350
- 孙昌魁,冯静,马桂荣.海洋微生物多样性的研究进展.生命科学,2001,13(3):97-99
- 刘慧慧,徐英江,邓旭修,等.莱州湾海域双酚A污染现状调查.渔业科学进展,2013,34(4):16-20
- 李彬,荣小军,姜卓,等.秋、冬季节刺身养殖池塘浮游细菌数量变化规律的研究.渔业科学进展,2010,31(3):44-48
- 李筠,周宏霞,刘佳琳,等.青岛近岸特征环境中海洋异养细菌的分布规律及其分子鉴定.中国海洋大学学报(自然科学版),2006,36(6):965-970
- 王印庚,郭伟丽,荣小军,等.养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定.渔业科学进展,2012,33(6):81-86
- 姜南,李春丽,周君,等.宁波陆源入海排污口优势菌群的数量、组成分析与研究.宁波大学学报(理工版),2013,26(2):22-27
- 胡修贵,赵培,李玉宏,等.生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性.渔业科学进展,2012,33(5):97-103
- 高菲,孙慧玲,王肖君,等.刺身龙须菜混养系统中细菌数量与群落组成.渔业科学进展,2012,33(4):89-98
- 韩善桥,虞积耀,姜涛,等.东南沿海海域海水细菌的分布.解放军预防医学杂志,2008,26(1):18-21
- 赖福才,王前,周一平,等.南海西沙海域海水细菌学调查及药敏检测.第一军医大学学报,2004,24(3):347-348
- Acinas SG, Anton J, Rodriguez-Valera F. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean

- waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(2): 514–522
- Alsina M, Blanch AR. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*, 1994, 76(1): 79–85
- Ausubel FM. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology, 3rd, 1995, 555–557
- Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 65–79
- DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685–5689
- Erick C, James MT. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotech*, 2008, 19(6): 544–549
- Fuhrman JA, Azam F. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of Brith Columbia, Antarctica and Southern California. *Appl Envir Microbiol*, 1980, 39(6): 1085–1095
- Manuela DL, Michiel S, Marcelo E, *et al.* Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol*, 2003, 185(19): 5822–5830
- Ravenschlag K, Sahm K, Peruthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 3982–3989
- Ren J, Dang H, Song L. Bacterial and cyanobacterial diversities determined by T-RFLP analyses in Jiaozhou Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25(4): 124–130

(编辑 冯小花)

Diversity and Distribution of Marine Heterotrophic Bacteria Nearby Qingdao Land-Based Drainage Discharge Outlets

LIU Shuang^{1,2①}, LI Yongxia³, LIU Xudong⁴, CUI Zhengguo³, WANG Yanan⁵,
SUN Beibei^{1,2}, SONG Shuai^{1,2}

(1. North China Sea Environment Monitoring Center, SOA, Qingdao 266033; 2. Key Laboratory of Marine Spill Oil Identification and Damage Assessment Technology, SOA, Qingdao 266033; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 4. Qingdao Environmental Monitoring Station, Qingdao 266003; 5. Ocean and Fisheries Bureau of Qingdao, Qingdao 266071)

Abstract Three hundred and twelve strains of heterotrophic bacteria were isolated from the seawater of Qingdao land-based drainage discharge outlets. The sampling locations included tourist area, port area, aquaculture area and industrially affected region. Based on the analysis of 16S rDNA and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis(ARDRA), these strains were clustered and identified. Four phyla including Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes were identified. Sixty-eight percent of strains belonged to Proteobacteria, and 88% of Proteobacteria were classified into Gammaproteobacteria. The diversity and distribution of the bacteria among each region were different, and a few of them were Actinobacteria and Bacteroidetes. *Vibrio* sp. was found in all four regions, and it accounted for more than 18% of strains. Twenty-five percent of *Vibrio* sp. was *V. alginolyticus*. Many pathogenic bacteria such as *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, and *V. parahaemolyticus* were found in all samples. Based on analysis of 16S rDNA and clustering, the diversity and distributions of bacteria between industrially affected region and aquaculture area were highly similar. These results suggest a close relationship between the environment and the diversity and distribution of bacteria among different regions.

Key words Discharge outlet; Marine heterotrophic bacteria; 16S rDNA; *Vibrio* sp.

① Corresponding author: LIU Shuang, E-mail: liushuang@bhj.gov.cn

绿鳍马面鲀(*Navodon septentrionalis*)对 4 种大型水母的捕食行为*



刘春胜 庄志猛 陈四清^① 刘长琳 赵 鹏 陈昭廷

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

摘要 以绿鳍马面鲀为研究对象,通过室内受控实验,比较研究了其对我国沿海 4 种常见大型水母(海蜇、沙海蜇、海月水母和白色霞水母)的捕食差异。结果显示,体重为(215±20) g 的绿鳍马面鲀对海月水母的捕食能力最强,日均最大摄食量为(150.7±18.6) g/fish,其次是海蜇和白色霞水母,日均摄食量分别为(129.7±11.6)和(120.0±19.3) g/fish,对沙海蜇的摄食量最少,为(92.5±11.3) g/fish;绿鳍马面鲀对海月水母与海蜇摄食量主要受投喂量影响,与规格无关,当投喂量小于其最大捕食量时,绿鳍马面鲀可捕食其周围所有水母,当投喂量超过其最大摄食量并继续增加时,绿鳍马面鲀摄食量保持不变,但残余水母的触手和伞部边缘均被啃食,继而导致水母摄食能力丧失,难以继续生存;在适口饵料冰鲜玉筋鱼充足的情况下,绿鳍马面鲀对水母具有明显的摄食偏向性,与仅投喂水母实验组相比,其对海月水母和海蜇的日均摄食量仅降低了 20.2%和 16.9%。研究结果表明,绿鳍马面鲀对上述 4 种水母皆能捕食。

关键词 绿鳍马面鲀;海蜇;沙海蜇;海月水母;白色霞水母;摄食量

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0030-09

水母是海洋生态系统中的重要组成部分,其在有机物的垂直传递中起着重要作用 (Robison *et al.*, 2005)。近年来,在全球一些高生产力的近海海区,受人类活动、全球变暖、富营养化等因素的影响,水母出现的数量及频率不断加大,并呈现出明显的种群暴发现象(Purcell *et al.*, 2001)。我国所在的东亚海域更是水母暴发的重灾区。据报道,我国的渤海辽东湾、黄海南部和东海北部相继出现了沙海蜇、白色霞水母和海月水母暴发的现象,且暴发规模和频率逐年增加,已严重影响了当地正常的渔业生产(程家骅等, 2005; 张芳等, 2009; Dong *et al.*, 2010; 郑凤英等, 2010)。

大量证据表明,水母暴发与鱼类数量变动之间有密切的关系,相关报道主要集中在水母对鱼卵及仔稚

鱼捕食行为、水母与鱼类的饵料竞争等研究领域 (Cowan *et al.*, 1993; Purcell *et al.*, 1994)。鱼类捕食水母的报道相对较少,且主要通过胃含物分析获取相关数据(Arai, 2005)。然而, Arai 等(2003)在研究大马哈鱼对水母(*Pleurobrachia bachei*)的消化速率中发现,其对水母的消化速率是虾(*Pandalus* sp.)的 20 多倍,因此传统的胃含物分析不能够准确反映水母在鱼类饵料组成中所占的真实比例。而室内捕食实验可更直观地反映鱼类与水母的捕食关系。Miyajima 等(2011)研究了冠鳞单棘鲀(*Stephanolepis cirrhifer*)对海月水母的捕食能力,发现该鱼对海月水母的日均摄食量为其体重的 24 倍。Liu 等(2014)也证明了银鲳幼体(*Pampus argenteus*)能够积极捕食海月水母及海蜇。

绿鳍马面鲀为暖温性鱼类,广泛分布于渤海、黄

* 国家 973 课题(2011CB403605)和青岛市科技计划项目(11-3-1-6-hy)共同资助。刘春胜, E-mail: liucs@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2013-11-16, 收修改稿日期: 2014-03-05

海、东海、朝鲜及日本沿海,是我国重要的海产经济鱼类(王跃中等, 2013), 且该物种的分布范围与我国当前水母灾害暴发区域相吻合。在对捕食水母鱼类的筛选中, 作者发现绿鳍马面鲈能够以海月水母为食。基于以上结果, 作者推测绿鳍马面鲈可能摄食海蜇、沙海蜇及白色霞水母。本研究以绿鳍马面鲈为研究对象, 通过室内受控实验, 量化了绿鳍马面鲈对 4 种水母的摄食量; 以海月水母和海蜇为实验材料, 研究了不同规格、不同投喂量的水母对绿鳍马面鲈摄食行为的影响; 通过过量投喂水母和适口饵料玉筋鱼块, 研究了绿鳍马面鲈对水母的摄食偏好性。该实验的开展将有助于评估绿鳍马面鲈分布及数量对大型水母生物量的影响, 可为研究我国沿海鱼类数量变动与大型水母暴发之间的关系提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 绿鳍马面鲈

绿鳍马面鲈为 2013 年 4–5 月份收购的野生个体, 体长(26.5±5) cm, 体重(215±20) g。饵料为 0.4–0.6 cm³ 的冰鲜玉筋鱼块, 每天投饵两次, 采用常流水养殖, 经 28 d 驯养后开始实验。

1.2 4 种大型水母

海蜇与海月水母: 实验所用各规格海蜇和海月水母幼体均培养自青岛金沙滩水产开发有限公司实验基地。实验开始前 2 d, 选取实验所需规格的海蜇和海月水母转移至 300 L 的聚乙烯白色方桶中暂养, 微充气, 每天投喂适量卤虫无节幼体, 实验开始前 12 h 停止投饵。

白色霞水母与沙海蜇: 实验所需白色霞水母和沙海蜇为海捕野生个体。2013 年 6–7 月捕捉规格为 (20±4) cm 的白色霞水母和沙海蜇。为保证两种野生水母的活性, 捕获后立刻充氧, 3 h 内运回实验基地。由于沙海蜇捕获后极易产生应激反应, 3 d 后出现快速腐烂现象, 因此, 沙海蜇运回实验基地立刻开展相关研究。

1.3 实验方法

1.3.1 绿鳍马面鲈对海月水母的摄食实验 实验开始前将 48 条绿鳍马面鲈随机分成 16 组, 每组 3 条, 置于 16 个 300 L 的聚乙烯白色方桶中。饥饿 24 h 后开始实验, 实验过程中加强充气, 使海月水母均匀分布, 以保证其与绿鳍马面鲈充分接触。

为研究海月水母规格及其投喂量对绿鳍马面鲈

摄食量的影响, 实验采用双因子交互法(表 1)。具体设计为, 海月水母按伞径分为 30、70、110 和 150 mm 4 个规格, 投喂量设为 40、80、160、320 g/(fish·d) 4 个梯度。按表 1 的 4×4 组合分为 16 组(A1、B1、C1、D1)。投喂 24 h 后收集残余水母, 计算绿鳍马面鲈对各组的日均摄食。待实验结束后, 各组绿鳍马面鲈饥饿 24 h 后, 重复实验, 实验共计重复 3 次。

1.3.2 绿鳍马面鲈对海蜇的摄食实验 实验准备同 1.3.1。为研究海蜇规格及其投喂量对绿鳍马面鲈摄食量的影响, 实验采用双因子交互法(表 1)。具体设计为, 海蜇按伞径分为 10、20、30 和 40 mm 4 个规格, 投喂量设为 40、80、160、320 g/(fish·d) 4 个梯度。按表 1 的 4×4 组合分为 16 组(a1、b1、c1、d1)。投喂 24 h 后收集残余海蜇, 计算绿鳍马面鲈对各组的日均摄食。待实验结束后, 各组绿鳍马面鲈饥饿 24 h 后, 重复实验, 实验共计重复 3 次。

表 1 不同规格和投喂量交互实验设计

Tab.1 Two-factor orthogonal design of different sizes and feeding amounts

投喂量 Feeding amount [g/(fish·d)]	伞径 Size of umbrella (mm)							
	海月水母 <i>A. aurila</i>				海蜇 <i>R. esculentum</i>			
	30	70	110	150	10	20	30	40
40	A1	B1	C1	D1	a1	b1	c1	d1
80	A2	B2	C2	D2	a2	b2	c2	d2
160	A3	B3	C3	D3	a3	b3	c3	d3
320	A4	B4	C4	D4	a4	b4	c4	d4

1.3.3 绿鳍马面鲈对白色霞水母和沙海蜇的摄食实验 绿鳍马面鲈对白色霞水母摄食实验: 将饥饿 24 h 的 9 条绿鳍马面鲈随机分成 3 组, 每组投喂新捕获的已称重野生白色霞水母 1 只(伞径 180–200 mm, 湿重 960–1200 g), 24 h 后, 收集残饵, 计算绿鳍马面鲈对白色霞水母的日均摄食量。

绿鳍马面鲈对沙海蜇摄食实验: 将捕获的 6 只沙海蜇(伞径 180–200 mm, 湿重 1000–1450 g)分别称重后, 放置于 6 个 300 L 的白色塑料桶中, 将其随机分成 A、B 两组, 每组 3 个平行样, 其中 A 组每桶中放入 3 条绿鳍马面鲈, B 组作为对照组。24 h 后, 收集残饵, 计算绿鳍马面鲈对沙海蜇的日均摄食量。由于沙海蜇受刺激后, 出现自溶现象, 每条绿鳍马面鲈对沙海蜇的日均摄食量 P 用以下公式计算:

$$P = \left(W \frac{W_{24}}{W_C} - W_L \right) / 3$$

式中, W 为 A 组中沙海蜇的起始重量; W_L 为 24 h

后, A组中沙海蜇残饵的重量; W_C 为 B组中沙海蜇的起始重量; W_{24} 为 24 h 后, B组中沙海蜇的重量。

1.3.4 绿鳍马面鲀对水母和玉筋鱼摄食选择性实验 将 45 条绿鳍马面鲀随机放入 15 个 300 L 白色塑料桶中, 每桶 3 条。实验分为 5 组(A、B、C、D 和 E 组), 每组 3 个平行样, 各组投喂方案如下: A 组: 110 mm 海月水母 160 g/fish; B 组: 20 mm 海蜇 160 g/fish; C 组: 0.5 cm³ 的冰鲜玉筋鱼块 20 g; D 组: 110 mm 海月水母 160 g/fish 及冰鲜玉筋鱼块: 20 g/fish; E 组: 20 mm 海蜇 160 g/fish 及冰鲜玉筋鱼块: 20 g/fish。实验各组饵料均过量投喂。投喂 24 h 后, 用 40 目的筛绢收集残饵, 并对水母和玉筋鱼残饵分别称重, 计算各组绿鳍马面鲀对不同饵料的摄食量。

1.3.5 数据统计 各实验数据处理水平上的摄食量均表示为平均值±标准差, 所有数据均采用 SPSS 15.0

进行分析。统计学显著性差异水平设置为 $P<0.05$ 。

2 实验结果

2.1 投喂量对绿鳍马面鲀摄食海月水母和海蜇的影响

绿鳍马面鲀对水母的摄食量与水母投喂量有很大关系。在一定范围内, 绿鳍马面鲀摄食量随投喂量的增加而增大。但其存在最大摄食量, 当投喂量继续增加时, 其摄食量不会增加。从表 2 中可以看出, 在海月水母投喂量为 40、80 和 160 g/fish 时, 绿鳍马面鲀的摄食量分别为 39.1、75.2 和 142.1 g/(fish·d), 其摄食量与投喂量呈正相关。但当投喂量继续增加至 320 g/fish 时, 该鱼摄食量与投喂量 160 g/fish 没有显著性变化。与之相同, 在投喂其他规格的海月水母或海蜇时均呈现相同的趋势。

表 2 绿鳍马面鲀对不同规格、不同生物量的海月水母与海蜇的摄食量
Tab.2 The consumption of *A. aurita* and *R. esculentum* with different size by filefish

投喂量 Feeding amount [g/(fish·d)]	伞径 Size of umbrella (mm)							
	海月水母 <i>A. aurita</i>				海蜇 <i>R. esculentum</i>			
	30	70	110	150	10	20	30	40
40	39.1±0.9	38.4±1.2	39.2±0.8	39.0±0.9	40±0.0	39.4±0.4	39.8±0.2	39.4±0.5
80	75.2±4.6	78.2±1.8	79.1±0.9	78.4±1.6	79.2±0.5	76.9±1.8	78.1±1.9	79.4±0.8
160	142.1±10.1	151.2±9.1	140.0±18.1	138.9±11.4	114.1±9.1	115.9±17.4	108.3±13.1	103.2±12.1
320	150.7±18.6	144.3±13.1	139.5±20.1	149.2±29.1	129.7±11.6	113.3±16.1	111.5±13.1	106.2±19.1

在投喂量相同的情况下, 绿鳍马面鲀对同种水母的摄食量不受其伞径大小的影响。从表 2 可以发现, 当过量投喂量时, 绿鳍马面鲀对 30、70、110、150 mm 海月水母的摄食量分别为 150.7、144.3、139.5 和 149.2 g/(fish·d)。不同伞径的海月水母之间没有显著性差异。同理, 在绿鳍马面鲀摄食海蜇实验中也有类似的结果。

此外, 据观察绿鳍马面鲀优先摄食海月水母的口腕、生殖腺及水母伞部边缘, 其次是厚的中胶层。而在对海蜇的摄食实验中, 绿鳍马面鲀优先啃食海蜇触手, 其次才是伞部。

2.2 绿鳍马面鲀对 4 种大型水母的摄食量比较

鉴于实验材料限制, 实验仅开展了绿鳍马面鲀对 180–200 mm 的白色霞水母和沙海蜇的捕食实验, 结果见表 3。绿鳍马面鲀对白色霞水母和沙海蜇的摄食量分别为 120.0 和 92.5 g/(fish·d)。通过比较绿鳍马面鲀对 4 种大型水母最大捕食量, 可以发现其对海月水母的摄食能力最强, 为 150.7 g/(fish·d), 其次是海蜇和白色霞水母, 分别是 129.7 和 120.0 g/(fish·d), 对

表 3 绿鳍马面鲀对沙海蜇和白色霞水母的摄食量
Tab.3 The consumption of *N. nomurai* and *C. nozakii* by filefish

	沙海蜇 <i>N. nomurai</i> (200±4.1 mm)	白色霞水母 <i>C. nozakii</i> (200±4.6 mm)
投喂个体重量 Feeding amount (g)	1450±302	1200±215
摄食量 Consumption [g/(fish·d)]	92.5±11.3	120.0±19.3

沙海蜇的捕食能力最弱, 为 92.5 g/(fish·d)(图 1), 数据统计结果表明差异显著($P<0.05$)。

2.3 绿鳍马面鲀对水母及玉筋鱼饵料的摄食选择性

实验结果表明, 在适口饵料玉筋鱼块存在的条件下, 绿鳍马面鲀依旧摄食海月水母和海蜇, 并呈现一定的偏好性。从表 4 中可以发现, 在冰鲜玉筋鱼充足的情况下, 绿鳍马面鲀对 110 mm 海月水母和 20 mm 海蜇的摄食量分别为 110.9 和 96.3 g/(fish·d)。与仅投喂海月水母和海蜇组相比, 绿鳍马面鲀对海月水母和海蜇的摄食量仅降低了 20.2%和 16.9%。

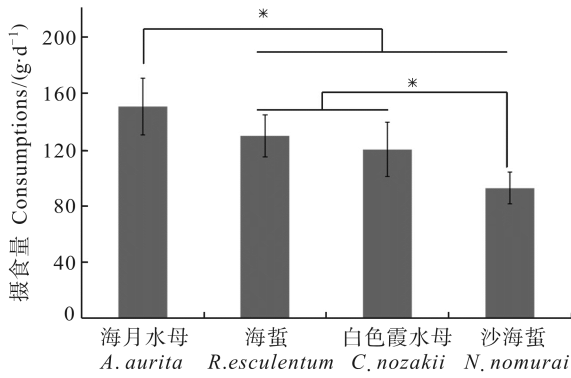


图 1 绿鳍马面鲀对 4 种水母的最大摄食量

Fig.1 The maximum consumptions of four jellyfish species by filefish

2.4 捕食水母鱼类的比较

为了更加全面了解鱼类与水母的相互关系,作者对部分已报道的摄食水母鱼类进行了总结(表 5)。结果表明,目前有记录的捕食水母鱼类共有 41 种,其中 38 种是通过其胃含物分析获得的。另有 3 种是通过室内量化实验获得的,包括冠鳞单棘鲀、银鲳及本研究对象—绿鳍马面鲀。从表 5 中可以看出,水母占其胃含物总量 30%以上的鱼类有 8 种,其中 3 种水母总量超过 50%,短吻拟深海鲑(*Pseudobathylagus milleri*)的胃含物中水母含量甚至可达 100%;对比冠鳞单棘鲀、银鲳及绿鳍马面鲀的室内捕食实验数据可发现,绿鳍马面鲀对水母的相对捕食量远小于其他两

表 4 绿鳍马面鲀对水母(海月水母和海蜇)与玉筋鱼的选择性摄食

Tab.4 Prey selection of jellyfish (*A. aurita* and *R. esculentum*) and *Ammodytes* sp. by filefish

投喂及摄食量		海月水母	海蜇	玉筋鱼	海月水母+玉筋鱼	海蜇+玉筋鱼
Feeding & consumption amount (g)		<i>A. aurita</i>	<i>R. esculentum</i>	<i>Ammodytes</i> sp.	<i>A. aurita</i> + <i>Ammodytes</i> sp.	<i>R. esculentum</i> + <i>Ammodytes</i> sp.
饵料投喂量	水母 Jellyfish	160	160	—	160	160
Feeding amount	玉筋鱼 <i>Ammodytes</i> sp.	—	—	20	20	20
水母摄食量		138.9±11.4	115.9±17.4	—	110.9±9.5	96.3±12.6
Jellyfish consumption						
玉筋鱼摄食量		—	—	8.3±1.6	6.3±1.3	6.9±0.7
<i>Ammodytes</i> sp. consumption						

表 5 捕食水母鱼类相关数据统计

Tab.5 Statistical data of predation on pelagic coelenterates by fish predators

捕食者 Predators	被捕食水母种类 Prey	捕食量 Consumption	参考文献 References
冠鳞单棘鲀 ¹ <i>S. cirrhifer</i>	海月水母 <i>A. aurita</i>	日均摄食鱼体重的 24 倍 24 times fish body weight	Miyajima <i>et al</i> , 2011
银鲳 ¹ <i>P. argenteus</i>	海月水母 <i>A. aurita</i>	日均捕食鱼体重的 11.6 倍 11.6 times fish body weight	Liu <i>et al</i> , 2013
	海蜇 <i>R. esculentum</i>	日均捕食鱼体重的 4.1–13 倍 4.1-13 times fish body weight	Liu <i>et al</i> , 2013
绿鳍马面鲀 ¹ <i>Navodon septentrionalis</i>	海月水母 <i>A. aurita</i>	日均捕食鱼体重的 0.68 倍 0.68 times fish body weight	实验获得的数据 This study
	海蜇 <i>R. esculentum</i>	日均捕食鱼体重的 0.54 倍 0.54 times fish body weight	实验获得的数据 This study
	白色霞水母 <i>C. nozakii</i>	日均捕食鱼体重的 0.56 倍 0.56 times fish body weight	实验获得的数据 This study
	沙海蜇 <i>Nemopilema nomurai</i>	日均捕食鱼体重的 0.43 倍 0.43 times fish body weight	实验获得的数据 This study
蓝背西鲱 ² <i>Alosa aestivalis</i>	栉水母 Ctenophora	43%	Bowman <i>et al</i> , 2000
裸盖鱼 ² <i>Anoplopoma fimbria</i>	钵水母	13.5%	Yang <i>et al</i> , 2000
仰鼻水珍鱼 ² <i>Argentina silus</i>	水母 Ctenophora	9.2%	Bowman <i>et al</i> , 2000
太平洋深海鲑 ² <i>Bathylagus pacificus</i>	水母体 Medusae	32.7%	Balanov <i>et al</i> , 1995
	栉水母 Ctenophore	48.7%	Sobolevskii <i>et al</i> , 1996

续表 5

捕食者 Predators	被捕食水母种类 Prey	捕食量 Consumption	参考文献 References
小头孔绵鲷 ² <i>Bothrocarina microcephala</i>	水母体 Medusae	7.9%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
尾明角灯鱼 ² <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	管水母 Siphonophore	6%–29% (干重 Dry weight)	Hopkins <i>et al.</i> , 1992
大西洋棘白鲷 ² <i>Chaetodipterus faber</i>	曳手水母 <i>Chiropsalmus</i>	9.4%	Hayse, 1990
短距眶灯鱼 ² <i>Diaphus mollis</i>	管水母 Siphonophore	10%–12% (干重 Dry weight)	Hopkins <i>et al.</i> , 1992
大鳞雅南极鱼 ² <i>Lepidonotothen squamifrons</i>	栉水母 Ctenophora	0–48.8% (具有季节性 Seasonal)	Pakhomov, 1993
	水母体 Medusae	0.91%–9.2% (具有季节性 Seasonal)	Pakhomov, 1993
北部光滑舌鱼 ² <i>Leuroglossus schmidti</i>	水母体 Medusae	8.95%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
	刺细胞动物 Cnidaria	9.2%	Balanov <i>et al.</i> , 1994
	水母体 Medusae	56.3%	Sobolevskii <i>et al.</i> , 1996
弯鳃深海脂鲑 ² <i>Lipolagus ochotensis</i> ²	水母体 Medusae	26.1%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
	栉水母 Ctenophore	36.15%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
斯氏似白狼绵鲷 ² <i>Lycogrammoides schmidt</i>	水母体 Medusae	9.45%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
大马哈鱼 ² <i>Oncorhynchus keta</i>	瓜水母 <i>Beroe</i>	38.6%	Sobolevskii <i>et al.</i> , 1996
红大马哈鱼 ² <i>Oncorhynchus nerka</i>	水母 Jellyfish	11%	Tadokoro <i>et al.</i> , 1996
三刺底鳍鲷 ² <i>Peprilus triacanthus</i>	刺细胞动物 Cnidaria	8.7%	Bowman <i>et al.</i> , 2000
多线鱼 ² <i>Pleurogrammus monoptyerygius</i>	钵水母 Scyphomedusae	19%	Yang <i>et al.</i> , 2000
短吻拟深海鲑 ² <i>Pseudobathylagus milleri</i>	水母体 Medusae	100%	Balanov <i>et al.</i> , 1995
竹刀鱼 ² <i>Scomberesox saurus</i>	管水母 Siphonophora	54.4%	Bowman <i>et al.</i> , 2000
美洲平鲷 ² <i>Sebastes melanops</i>	侧腕水母 Pleurobrachia	13.3%	Brodeur <i>et al.</i> , 1987
白身臂灯鱼 ² <i>Stenobranchius leucopsarus</i>	水母体 Medusae	8.1%	Gorbatenko <i>et al.</i> , 1992
宽尾臂灯鱼 ² <i>Stenobranchius nannochir</i>	水母体 Medusae	6.6%	Il'inskii <i>et al.</i> , 1994
智利竹鱼 ² <i>Trachurus murphyi</i>	钵水母 Scyphomedusae	27.7%	Nesin, 2004
深海鲑鱼科 ³ <i>Bathylagus antarcticus</i>	管水母 Siphonophores	14/28	Lancraft <i>et al.</i> , 1991
麦克罗深海鲑 ³ <i>Bathyraja macloviana</i>	栉水母 Ctenophora	11/64 (春 Spring)	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
疣鳞鲷 ³ <i>Canthidermis maculata</i>	管水母 Siphonophora	18/66	Senta <i>et al.</i> , 1993

续表 5

捕食者 Predators	被捕食水母种类 Prey	捕食量 Consumption	参考文献 References
黑腹无鳔鲉 ³ <i>Helicolenus dactylopterus</i>	栉水母 Ctenophora	130/273	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
天竺舵鱼 ³ <i>Kyphosus cinerascens</i>	管水母 Siphonophora	20/54	Senta <i>et al.</i> , 1993
低鳍舵鱼 ³ <i>Kyphosus vaigiensis</i>	管水母 Siphonophora	40/47	Senta <i>et al.</i> , 1993
弗氏绒须石首鱼 ³ <i>Micropogonias furnieri</i>	栉水母 Ctenophora	37/350	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
银鲑 ³ <i>Oncorhynchus kisutch</i>	帆水母 <i>Velella</i>	14/87	Brodeur <i>et al.</i> , 1987
拉氏南美南极鱼 ³ <i>Patagonotothen ramsay</i>	栉水母 Ctenophora	15/81	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
绿青鳕 ³ <i>Pollachius virens</i>	水母体 Medusae	23/133	Hall <i>et al.</i> , 1990
黄尾平鲈 ³ <i>Sebastes flavidus</i>	刺细胞动物 Cnidaria	2/14	Brodeur <i>et al.</i> , 1987
蓝平鲈 ³ <i>Sebastes mystinus</i>	五角水母 Muggiaea	4/12	Hobson <i>et al.</i> , 1996
	一种管水母 Stephanomia	6/12	Hobson <i>et al.</i> , 1996
	瓜水母 <i>Beroe</i>	4/12	Hobson <i>et al.</i> , 1996
南美鳎 ³ <i>Serirolella porosa</i>	栉水母 Ctenophora	62/133	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
白斑角鲨 ³ <i>Squalus acanthias</i>	栉水母 Ctenophora	44/221 (冬 Winter)	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
巴西真鲷 ³ <i>Stromateus brasiliensis</i>	栉水母 Ctenophora	216/285	Mianzan <i>et al.</i> , 1996
条纹鲷 ³ <i>Terapon theraps</i>	钵水母 Scyphomedusae	22/57	Senta <i>et al.</i> , 1993

1 室内实验获得捕食数据; 2 水母占整个胃含物成分的质量比; 3 胃内含水母个体数/实验检测个数总数

1 Data from laboratory experiments; 2 Weight percentage of pelagic coelenterates in fish stomach; 3 Numbers of fish containing pelagic coelenterates / observed fish numbers

种鱼类, 然而值得思考的是, 冠鳞单棘鲈和银鲷捕食水母相关研究中所用的是体重分别为 1.41 g 和 1.0 g 的幼鱼, 而本研究所用的绿鳍马面鲈为体重 215 g 的成鱼。

3 讨论

水母是一类肉食性低等动物, 与桡足类等其他饵料型浮游动物相比, 水母因水分和无机盐含量极高(占其湿重的 95%以上), 最初被生态学家认为是几乎没有任何饵料价值的浮游动物功能群(Sommer *et al.*, 2002)。本研究结果表明, 绿鳍马面鲈可摄食我国沿海 4 种常见大型水母。基于此, 可以推断该鱼或许可以摄食栉水母、管水母等其他胶质化浮游动物。事实上, 越来越多的研究表明, 胶质化水母可以作为饵料被某些海洋生物利用。甚至有报道称, 胶质化水母可

满足冠鳞单棘鲈幼体及九齿扇虾叶状幼体的基本营养需求及生理代谢, 并分析了胶质化水母在人工养殖上述两种经济物种的可行性(Miyajima *et al.*, 2011; Wakabayashi *et al.*, 2012)。此外, 绿鳍马面鲈摄食不同水母种类的量化, 可为研究该鱼数量及分布变化对水母种群数量变动的影响提供帮助。据报道, 目前我国水母暴发的海域主要集中在渤海辽宁湾、黄海南部和东海北部, 水母旺发时间为每年的 4–10 月(Zhang *et al.*, 2009)。因此在时空分布上, 水母暴发区域和时间与绿鳍马面鲈相吻合, 由此推断绿鳍马面鲈的种群数量变动对 4 种水母的生物量均能产生直接影响。

尽管绿鳍马面鲈能够捕食 4 种水母, 但其摄食能力却存在显著差异。实验结果表明, 其对海月水母捕食量最大, 为 150.7 g/(fish·d), 其次为海蜇和白色霞

水母, 分别为 129.7 和 120.0 g/(fish·d), 而对沙海蜇的捕食量最少, 为 92.5 g/(fish·d)。Liu 等(2014)在对银鲟捕食海月水母和海蜇幼体实验中也有类似的报道, 并推测水母体内水分含量变化及刺细胞毒素的强弱是影响摄食量的原因。我们测定了 4 种水母的水分含量(海月水母: 96.79%–97.28%; 海蜇幼体: 95.86%–96.89%; 白色霞水母: 96.13%; 沙海蜇: 96.29%), 结果表明海月水母水分含量比其他 3 种水母略高, 因此含水量不是影响绿鳍马面鲀摄食量差异的主要因素。同时, 基于目前已报道相关水母毒素实验数据, 4 种水母刺细胞毒性强弱如下: 海月水母最低, 海蜇和白色霞水母次之, 沙海蜇最强(Anderson *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2005; 苏秀榕等, 2007)。该结论恰好与绿鳍马面鲀摄食不同种类水母的多少相吻合。因此, 推测影响绿鳍马面鲀摄食胶质水母的主要因素是水母毒性的强弱。尽管有研究表明, 摄食水母鱼类可通过加厚皮肤及产生抗水母毒素抗体等方式降低水母毒素的影响, 但当摄食的毒素过多, 超出鱼体承受能力上限后, 仍能致其死亡(Jenkins, 1983; Arai, 1988; Pucell *et al.*, 2001)。

在水母和玉筋鱼过量投喂实验中, 绿鳍马面鲀对水母的摄食量仅减少了 16.9%–20.2%。Miyajima 等(2011)在比较冠鳞单棘鲀摄食海月水母和虾的实验中获得了类似的实验结果。我们推测摄食的偏好性及胶质化水母的易消化特性是其主要原因。鱼类对水母的消化速度是其他饵料的 10–20 倍, 据 Arai(2003)报道, 马苏大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)幼鱼对水母的消化率是虾(*Pandalus sp.*)的 20 倍以上, 因此一旦水母被消化后, 绿鳍马面鲀可继续捕食水母以补充饵料的不足。

大量研究表明, 摄食水母鱼类食性均比较广。从表 5 中可以看出, 在 38 种摄食水母鱼类的胃含物中, 仅有 3 个物种其水母含量为 50%以上。然而, 传统的胃含物分析大多是将捕获鱼类冷冻后或甲醛固定后再观察的方法, 在此过程中胶质化水母很难统计在内, 其数据明显不准确。因此传统胃含物分析法只能定性分析鱼类对水母的捕食情况, 其定量研究只能通过室内实验获得。

总之, 本研究结果表明, 绿鳍马面鲀可捕食我国沿海 4 种大型水母, 其摄食能力是海月水母>海蜇和白色霞水母>沙海蜇, 其摄食能力可能与水母毒性相关。研究表明, 其他适口饵料充足状态下, 绿鳍马面鲀对水母的捕食量仅降低 16.9%–20%。假设水母在自然水域出现的时间是 4–10 月(按 200 d 计算), 体重为 (215 ± 20) g 的绿鳍马面鲀在其他适口饵料存在条件

下每年可摄食水母量为 19.3–22.2 kg。据渔业统计年鉴, 我国每年绿鳍马面鲀的渔获量约为 20 万 t, 相应的其每年摄食水母量为 1798.4–2062.0 万 t。本研究的开展将为研究我国沿海以绿鳍马面鲀为代表的鱼类数量变动与大型水母暴发之间的关系提供参考。

参 考 文 献

- 王跃中, 孙典荣, 贾晓平, 等. 捕捞压力和气候变化对东海马面鲀渔获量的影响. 南方水产科学, 2013, 9(1): 8–15
- 苏秀榕, 杨春, 黄晓春, 等. 两种海蜇毒素的分子标记研究. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 206–210
- 张芳, 孙松, 李超伦. 海洋水母类生态学研究进展. 自然科学进展, 2009, 19(2): 121–130
- 郑凤英, 陈四清, 倪佳. 海月水母的生物学特征及其爆发. 海洋科学进展, 2010, 28(1): 126–132
- 程家骅, 丁峰元, 李圣法, 等. 东海区大型水母数量分布特征及其与温盐度的关系. 生态学报, 2005, 25(3): 440–445
- Anderson PA, Thompson LF, Moneypenny CG. Evidence for a common pattern of peptidergic innervation of cnidocytes. Biol Bull, 2004, 207(2): 141–146
- Arai MN. Interactions of fish and pelagic coelenterates. Can J Zool, 1988, 66: 1913–1927
- Arai MN. Predation on pelagic coelenterates: a review. J Mar Biol Assoc UK, 2005, 85(03): 523–536
- Arai MN, Welch DW, Dunsmuir AL, *et al.* Digestion of pelagic Ctenophora and Cnidaria by fish. Can J Fish Aquat Sci, 2003, 60(7): 825–829
- Balanov AA, Gorbatenko KM, *et al.* Foraging dynamics of mesopelagic fishes in the Bering Sea during summer and autumn. J Appl Ichthyol, 1995, 35: 65–77
- Balanov AA, Gorbatenko KM, *et al.* Daily feeding dynamics of mesopelagic fishes in the Bering Sea during summer. J Appl Ichthyol, 1994, 34: 85–99
- Bowman RE, Stillwell CE, Michaels WL, *et al.* Food of Northwest Atlantic fishes and two common species of squid. NOAA Technical Memorandum NMFS-NE, 2000, 155: 1–137
- Brodeur RD, Lorz HV, Percy WG. Food habits and dietary variability of pelagic nekton off Oregon and Washington, 1979–1984. NOAA Technical Report NMFS, 1987, 57: 1–32
- Cowan JHJ, Houde ED. Relative predation potentials of scyphomedusae, ctenophores and planktivorous fish on ichthyoplankton in Chesapeake Bay. Mar Ecol Prog Ser, 1993, 95: 55–65
- Dong Z, Liu D, Keesing JK. Jellyfish blooms in China: Dominant species, causes and consequences. Mar Pollut Bull, 2010, 60(7): 954–963
- Gorbatenko KM, Il'inskii EN. Feeding behavior of the most common mesopelagic fishes in the Bering Sea. J Appl Ichthyol, 1992, 32: 52–60

- Hall SJ, Raffaelli D, Basford DJ, *et al.* The feeding relationships of the larger fish species in a Scottish sea loch. *J Fish Biol*, 1990, 37(5): 775–791
- Hobson ES, Chess JR, Howard DF. Zooplankters consumed by Blue Rockfish during brief access to a current off California's Sonoma Coast. *California Fish Game*, 1996, 82: 87–92
- Hopkins TL, Gartner JV. Resource partitioning and predation impact of a low-latitude myctophid community. *Mar Biol*, 1992, 114(2): 185–197
- Il'inskii EN, Gorbatenko KM. Main trophical relationship between nekton of the mesopelagical of the Sea of Okhotsk. *News of Pacific Research University of Fishery and Oceanography*, 1994, 116: 1–18
- Jenkins RL. Observations on the commensal relationship of *Nomeus gronovi* with *Physalia physalis*. *Copeia*, 1983(1): 250–252
- Lancraft TM, Hopkins TL, Torres JJ, *et al.* Oceanic micro-nektonic/macrozooplanktonic community structure and feeding in ice covered Antarctic waters during the winter (AMERIEZ 1988). *Polar Biol*, 1991, 11: 157–167
- Liu CS, Zhuang ZM, Chen SQ, *et al.* Medusa consumption and prey selection of silver pomfret *Pampus argenteus* juveniles. *Chin J Oceanol Limnol*, 2014, 32(1): 71–80
- Mianzan HW, Mari N, Prenski B, *et al.* Fish predation on neritic ctenophores from the Argentine continental shelf: a neglected food resource? *Fish Res*, 1996, 27: 69–79
- Miyajima Y, Masuda R, Kurihara A, *et al.* Juveniles of threadsail filefish, *Stephanolepis cirrhifer*, can survive and grow by feeding on moon jellyfish *Aurelia aurita*. *Fish Sci*, 2011, 77(1): 41–48
- Nesin AV. Feeding of peruvian horse mackerel *Trachurus symmetricus murphyi* in the Southwestern Pacific. *J Appl Ichthyol*, 2004, 44: 132–134
- Pakhomov YA. Feeding habits and estimate of ration of Gray Notothenia, *Notothenia squamifrons squamifrons*, on the Ob and Lena Tablemounts (Indian Ocean Sector of Antarctica). *J Appl Ichthyol*, 1993, 33: 57–71
- Purcell JE, Arai MN. Interactions of pelagic cnidarians and ctenophores with fish: a review. *Hydrobiologia*, 2001, 451(1–3): 27–44
- Purcell JE, Nemazie DA, Dorsey SE, *et al.* Predation mortality of bay anchovy (*Anchoa mitchilli*) eggs and larvae due to scyphomedusae and ctenophores in Chesapeake Bay. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, 114: 47–58
- Radwan FY, Roman LG, Baksi KS, *et al.* Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rican coasts. *Toxicon*, 2005, 45(1): 107–112
- Robison BH, Reisenbichler KR, Sherlock RE. Giant larvacean houses: Rapid carbon transport to the deep sea floor. *Science*, 2005, 308(5728): 1609–1611
- Sobolevskii EI, Senchenko IA. The spatial structure and trophic connections of abundant pelagic fish of eastern Kamchatka in the autumn and winter. *J Appl Ichthyol*, 1996, 36: 30–39
- Sommer U, Stibor H, Katechakis A, *et al.* Pelagic food web configurations at different levels of nutrient richness and their implications for the ratio fish production: primary production. *Hydrobiologia*, 2002, 484: 11–20
- Senta T, Kimura M, Kanbara T. Predation of fishes on open-ocean species of sea-skaters (*Halobates* spp.). *Jap J Ichthyol*, 1993, 40: 193–198
- Tadokoro K, Ishida Y, Davis ND, *et al.* Change in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stomach contents associated with fluctuation of pink salmon (*O. gorbuscha*) abundance in the central subarctic Pacific and Bering Sea. *Fish Oceanogr*, 1996, 52: 89–99
- Wakabayashi K, Sato R, Ishii H, *et al.* Culture of phyllosomas of *Ibacus novemdentatus* (Decapoda: Scyllaridae) in a closed recirculating system using jellyfish as food. *Aquaculture*, 2012, 330: 162–166
- Yang MS, Nelson MW. Food habits of the commercially important groundfishes in the Gulf of Alaska in 1990, 1993, and 1996. NOAA Technical Memorandum NMFS AFSC, 2000, 112: 174
- Zhang F, Sun S, Jin X, *et al.* Associations of large jellyfish distributions with temperature and salinity in the Yellow Sea and East China Sea. *Hydrobiologia*, 2012, 690(1): 81–96

(编辑 江润林)

Navodon septentrionalis Predation of Four Species of Giant Jellyfish

LIU Chunsheng, ZHUANG Zhimeng, CHEN Siqing^①, LIU Changlin, ZHAO Peng, CHEN Zhaoting

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

Abstract The predatory behavior of filefish *Navodon septentrionalis* to *Aurelia aurita* was observed before. Here we hypothesized that there were also predator-prey relationships between filefish and other jellyfish species. We explored the predatory behaviors of filefish to four species of giant jellyfish, including *Rhopilema esculentum*, *Nemopilema nomurai*, *A. aurita* and *Cyanea nozakii*, under laboratory conditions. We also studied the prey selection of filefish among jellyfish species of *R. esculentum* and *A. aurita*, and sand lance. Filefish weighted (215±20) g actively preyed on all four jellyfish species, and its daily medusae consumption of *A. aurita*, *R. esculentum*, *C. nozakii*, and *N. nomurai* was 150.7±18.6, 129.7±11.6, 120.0±19.3, and 92.5±11.3 g/fish respectively. It was the medusae biomass, not the bell diameter that affected the daily consumption when medusae of *A. aurita* and *R. esculentum* were fed to filefish. All medusae were preyed when their biomass was below the maximum consumption of filefish. Filefish did not prey more than the daily maximum consumption even if the medusa exceeded the maximum consumption, however, the remaining medusae all died because their tentacles and edges of umbrella were eaten. Filefish showed prey preference for jellyfish when sand lance was fed along with medusae of *A. aurita* and *R. esculentum*, and the daily consumption of *A. aurita* and *R. esculentum* was only reduced by 20.2% and 16.9%. These results should contribute to better understanding of the relationship between changes in fish population and giant jellyfish blooms in Chinese coastal areas.

Key words Filefish *Navodon septentrionalis*; *Rhopilema esculentum*; *Nemopilema nomurai*; *Aurelia aurita*; *Cyanea nozakii*; Consumption

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

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)生长性状的遗传参数估计*



刘永新¹ 周 勤² 张红涛² 姜长波³ 张福崇⁴

(1. 中国水产科学研究院 北京 100141; 2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100;
3. 天津水产养殖公司 唐山 063205; 4. 河北省海洋与水产科学研究院 秦皇岛 066200)

摘要 通过人工受精的方法获得红鳍东方鲀 8 个半同胞家系(16 个全同胞家系), 共测量了 790 尾红鳍东方鲀 8 个半同胞家系(16 个全同胞家系)135 日龄和 200 日龄的体质量和体长。将 135 日龄生长性状作为协变量构建 3 个动物模型, 模型(1)包含加性遗传效应、母本遗传效应和全同胞效应; 模型(2)包含加性遗传效应和母本遗传效应; 模型(3)包含加性遗传效应和全同胞效应。利用 DMU 软件, 采用平均信息约束极大似然法估计各模型中性状的方差组分, 用似然比检验法进行不同模型的差异检验。选择最优模型估计红鳍东方鲀 200 日龄生长性状的遗传参数。结果表明, 母本遗传效应对 200 日龄红鳍东方鲀生长性状无显著影响, 确定模型(3)为最优模型。200 日龄红鳍东方鲀, 体质量和体长的遗传力分别为 0.16 和 0.14, 全同胞效应比率分别为 0.12 和 0.13。研究表明, 红鳍东方鲀生长性状具备一定的选择潜力, 应用家系选育方法能够获得较好的遗传进展。

关键词 红鳍东方鲀; 全同胞家系; 生长性状; 遗传参数; 最优模型

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0039-06

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀亚目(Tetraodontoidei)、鲀总科(Tetraodontoidea)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*), 俗称虎河鲀、气规、规仔等, 为暖水性海洋底栖鱼类, 在我国东海、黄海以及日本、韩国和北朝鲜等海域存在较为广泛的分布, 其模式产地为日本长崎(孟庆闻等, 1995)。红鳍东方鲀肉质细致、味道鲜美, 是具有高度经济价值的海水鱼类品种。在日本, 红鳍东方鲀的商业价值表现更高, 除作佳肴、泡酒食用外, 还可从其卵巢中提取河豚鱼毒素, 每克售价高达数万美元。20 世纪 80 年代, 日本开始进行红鳍东方鲀陆上水池人工养殖研究, 但养殖产量无法满足日本民众的需求, 因此每年还需从我国进口大量的商品鱼。虽然国内外红鳍东方鲀的大规模人工养殖工作早已起步, 但均以繁育、养

殖为主(王新安等, 2012; 陆丽君等, 2013), 有关遗传选育、遗传参数估计的相关工作尚未见文献报道。

为了进行目标性状的遗传改良, 需要获得准确、可靠的遗传参数, 这是制定育种规划的前提和基础(Henderson, 1984)。遗传参数包括 3 个重要指标: 遗传力、遗传相关和育种值。国内外开展有关此 3 个遗传参数估计的研究已有众多报道(李镛等, 2011; Martinez *et al*, 1999; Liu *et al*, 2011), 涉及的水产动物品种涵盖了鱼类、虾类、贝类和蟹类。然而, 不同的遗传参数估计方法均需要通过数学模型来进行计算, 在已有报道中, 往往只建立一个模型进行参数求解, 并未构建多个模型进行比较, 从中选择估计遗传参数的最优模型(李镛等, 2011; Martinez *et al*, 1999; Liu *et al*, 2011)。有鉴于此, 本研究建立了 16 个红鳍东方鲀全同胞家系, 在模型中考虑不同的随机效应, 构建了 3

* 国家科技支撑计划(2012BAD26B01)资助。刘永新, E-mail: liuyx@cafs.ac.cn

① 通讯作者: 周 勤, 高级工程师, E-mail: laozhou_529@hotmail.com

收稿日期: 2014-01-25, 收修改稿日期: 2014-03-11

个不同的单性状动物模型,通过不同模型比较,确定最优统计模型,并以此模型为基础,通过约束极大似然法估计红鳍东方鲀主要生长性状的遗传参数,旨在为制定行之有效的红鳍东方鲀育种策略提供必备的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用红鳍东方鲀亲鱼群体于 2013 年 4 月选自河北省唐山市天河水产养殖公司,该群体为日本引进的受精卵繁育形成的后代。从外观上选择个体较大、体重范围为 2.8–3.5 kg、体表无外伤、性腺发育良好的雄性亲鱼和雌性亲鱼各 16 尾,采用人工干预法授精制备家系。在实际配组过程中,按照雌雄比例 1:2 的方式,即 1 尾雄鱼同 2 尾雌鱼配组,总计建立了 16 个全同胞家系,其中包含 8 个半同胞家系。

每个家系饲养在独立的玻璃钢圆形水槽中。养殖期间的仔鱼饲养采用常规方法进行,投喂饵料随日龄增加依次为轮虫、卤虫和配合饵料,养殖温度随自然海水温度改变而变化,各家系的养殖密度、充氧、饵料投喂量、流水等条件保持一致,所有的苗种孵化和仔鱼培育在中国水产科学研究院北戴河中心实验站良种场完成。

各家系的初孵仔鱼数量为 3000 尾,培育至 60 日龄,各家系随机保留 300 尾,在 90 日龄各家系再次随机保留 60 尾,于 135 日龄进行个体电子标记,每个家系标记约 50–60 尾鱼,总计完成电子标记的个体数为 790 尾。标记后个体混合养殖,个体性状测量的时间点包括 135 日龄和 200 日龄。两次测量间的混养过程中,由于红鳍东方鲀自残较严重,经过 65 d 培育,各家系均有个体发生死亡。大多数家系的成活率基本相同,损失个体仅为个位数,但有两个家系的成活率明显低于其他家系。测量的主要生长性状分别为体质量和体长,用电子天平测量体质量,精度为 0.01 g,用电子数显游标卡尺测量体长,精度为 0.01 cm。

1.2 统计模型

为了筛选估计红鳍东方鲀 200 日龄生长性状遗传参数的最优模型,参考已有鱼类生长性状动物模型(马爱军等, 2009; Liu *et al.*, 2011),将 135 日龄生长性状作为协变量,建立了如下 3 个单性状动物模型选优,其表示形式如下:

$$y_{ij} = u + a_i + f_i + m_i + bd_{ij} + e_{ij} \quad (1)$$

$$y_{ij} = u + a_i + m_i + bd_{ij} + e_{ij} \quad (2)$$

$$y_{ij} = u + a_i + f_i + bd_{ij} + e_{ij} \quad (3)$$

式中, y_{ij} 为第 i 个个体生长性状, u 为总体均值, a_i 为第 i 个个体加性遗传效应, f_i 为第 i 个全同胞效应, m_i 为第 i 个母本遗传效应, d_{ij} 为初始日龄生长性状协变量, b 为回归系数, e_{ij} 为残差效应。

假定模型(1)为最优模型,则其期望和方差可表示为:

$$E(y) = X\beta, E(a) = E(m) = E(f) = 0, E(e) = 0,$$

$$\text{Var} \begin{bmatrix} a \\ m \\ f \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & A\sigma_{a,m}^2 & 0 & 0 \\ A\sigma_{a,m}^2 & A\sigma_m^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_f^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

式中, A 为系谱中所有个体的亲缘关系矩阵, I 为单位矩阵。 σ_a^2 、 σ_m^2 、 σ_f^2 和 σ_e^2 分别为加性遗传效应、母本遗传效应、全同胞效应和残差效应的方差组分。

遗传力计算公式为:

$$h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2,$$

式中, $\sigma_p^2 = \sigma_a^2 + \sigma_m^2 + \sigma_f^2 + \sigma_e^2$,

母本效应遗传力为:

$$h_m^2 = \sigma_m^2 / \sigma_p^2,$$

全同胞效应与表型方差比率为:

$$f^2 = \sigma_f^2 / \sigma_p^2,$$

残差效应与表型方差比率为:

$$e^2 = \sigma_e^2 / \sigma_p^2.$$

1.3 数据处理

使用 SAS 8.2 软件统计不同日龄所有测量个体生长性状的表型参数。遗传模型分析过程采用 DMU 软件 (Version 6) 执行 AI-REML (Average Information Restricted Maximum Likelihood) 来完成。在迭代 REML 过程中,选择不同的方差初始值重复计算,以保证达到整体而不是局部的最大化。收敛标准为两次迭代所得估计值的方差小于 10^{-6} 。

为了决定最优模型,构建似然比统计量来检验不同模型之间差异的显著性。似然比统计量定义为:

$$LR = -2(\ln L_2 - \ln L_1),$$

式中, $\ln L_2$ 是简化模型的最大似然函数值, $\ln L_1$ 是全模型的最大似然函数值。似然比统计量服从渐近分布 (χ_{df}^2), 其中自由度 (df) 为待估参数个数。

2 结果与分析

2.1 不同日龄生长性状的表型参数

红鳍东方鲀不同日龄体质量和体长的表型参数列于表 1 中。在 135 日龄和 200 日龄, 体质量平均值分别为 40.11 g 和 120.79 g, 体长的平均值分别为 10.51 cm 和 16.43 cm。体质量的变异系数相对较大,

在 135 日龄和 200 日龄分别为 0.24 和 0.26; 体长的变异系数则相对较小, 在 135 日龄和 200 日龄均为 0.09。以体质量为例, 绘制其 135 日龄和 200 日龄的散点图(图 1)。200 日龄体质量随着 135 日龄体质量的增加而变大, 表明两个变量间呈现正相关。二者相关系数为 0.72($P<0.0001$), 表明 135 日龄和 200 日龄体质量存在较强相关, 因此有必要将 135 日龄体质量作

表 1 红鳍东方鲀不同日龄生长性状的表型参数

Tab.1 The phenotypic parameters for growth traits of *Takifugu rubripes* at different days of age

性状 Traits	日龄 Days of age	个体数 No. of individuals	平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation	最大值 Maximum	最小值 Minimum
体质量 Body weight(g)	135	790	40.11	9.51	0.24	73.38	16.63
	200	765	120.79	31.96	0.26	206.01	45.02
体长 Body length(cm)	135	790	10.51	0.98	0.09	13.69	7.15
	200	765	16.43	1.47	0.09	19.80	11.40

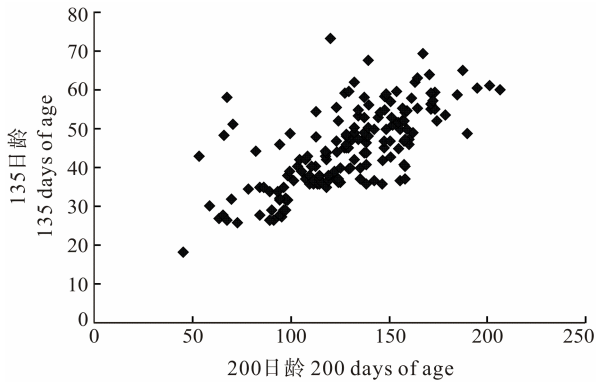


图 1 体质量散点图

Fig.1 Scatter diagram for body weight

为协变量加入到模型中。

2.2 遗传模型比较

不同遗传模型比较结果详见表 2。对于 200 日龄的体质量, 模型(1)和模型(2)之间存在显著性差异, 表明全同胞效应对分析的目标性状具有显著影响; 模型(1)和模型(3)之间不存在显著性差异, 表明母本效应对分析的目标性状无显著影响。对于 200 日龄的体长分析也获得了相同的结果。由此显示, 建立估计红鳍东方鲀 200 日龄生长性状遗传参数的数学模型中应

表 2 3 个遗传模型的似然值和似然比

Tab.2 The natural log likelihood ($-2\ln L$) and likelihood ratio (LR) obtained with 3 genetic models

项目 Items	模型 Model	似然值 $-2\ln L$	似然比 LR
体质量	1	3724.75	
	2	3753.60	28.85**
	3	3727.47	2.72 ^{ns}
体长 Body length (cm)	1	738.92	
	2	747.15	8.23**
	3	744.89	5.97 ^{ns}

注: 似然比(LR)统计量, 当自由度(df)=1, 显著水平为 0.01 的 $\chi^2=6.63$, **表示存在极显著差异($P<0.01$), ns 表示不存在显著差异($P>0.01$)

Note: Likelihood ratio (LR) statistics, $\chi^2=6.63$ at 0.01 significant level when $df=1$; **. Extremely significant difference at $P<0.01$; ns. No significant difference

同时考虑加性遗传效应和全同胞效应, 即模型(3)为最优遗传模型。

2.3 生长性状的遗传参数

表 3 列出了红鳍东方鲀 200 日龄生长性状的遗传力和方差组分。由方差组分计算获得各项遗传参数, 其中体质量的遗传力估计值为 0.16, 体质量的全同胞

表 3 红鳍东方鲀 200 日龄生长性状的遗传参数

Tab.3 The genetic parameters for growth traits of *T. rubripes* at 200 days of age

性状 Traits	表型方差 σ_p^2	加性效应遗传 方差 σ_a^2	全同胞效应 方差 σ_f^2	残差效应 方差 σ_e^2	遗传力 h^2	全同胞效应 比率 f^2	残差效应 比率 e^2
体质量 Body weight(g)	398.26	63.73	46.49	288.04	0.16	0.12	0.72
体长 Body length(cm)	1.62	0.23	0.21	1.18	0.14	0.13	0.73

效应比率为 0.12, 体质量的残差效应比率为 0.72; 体长的遗传力估计值为 0.14, 体长的全同胞效应比率为 0.13, 体长的残差效应比率为 0.73。

3 讨论

准确估计性状的遗传参数主要取决于 3 个要素: 数据集质量、参数估计方法和采用的分析模型。大规模群体的系谱结构和多个生长时间点的性状记录是建立高质量数据集的基础, 但这往往会消耗较多的人力和物力。与畜牧相比较, 水产动物品种由于其可产生众多的子代, 在个体发育达到能够进行电子标记的时间点后, 便可重复进行生长或其他性状的测量, 据此积累大量的数据记录用于遗传评估, 这是畜禽动物无法比拟的优势所在。

估计遗传参数的方法有很多种, 其中约束极大似然法更适用于分析小规模数据集(Patterson *et al.*, 1971), 为目前进行畜牧和水产动物生长性状遗传评估的主要方法。分析模型对于遗传参数估计结果具有显著影响, 在实际育种工作中往往不容易确定影响目标性状的各种遗传和环境因素, 因此, 在建立模型时应尽量考虑可能存在的固定效应和随机效应, 通过不同模型比较确定对目标性状具有显著性影响的效应因素。分析不同效应对生长性状遗传参数估计的作用已有众多报道。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Crandell *et al.*, 1993)、大西洋鲱(*Clupea harengus*) (Bang *et al.*, 2006)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Saillant *et al.*, 2001)、黄鳍鲷(*Acanthopagrus butcheri*) (Doupe *et al.*, 2005)和牙鲆(Liu *et al.*, 2011)等均发现了母本效应影响的存在, 而 Martinez 等(1999)和 Gjerdea 等(2004)则分别证实了全同胞效应对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)和大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)生长性状的作用, 由此表明, 模型中拟合不同的效应项将在不同程度上影响遗传参数估计的准确性。

本研究通过不同模型比较确定影响红鳍东方鲀生长性状的随机效应项包括加性遗传效应和全同胞效应, 由此筛选出模型(3)为估计红鳍东方鲀生长性状遗传参数的最优模型。母本效应对目标性状无显著影响, 这可能是因为本研究测定红鳍东方鲀生长性状的日龄分别为 135 日龄和 200 日龄, 非发育的初期阶段。在已有文献中, 母本效应发挥作用的时期多为个体发育早期阶段, 而后随着日龄增加母本效应的影响逐渐降低(Kaori *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2007)。全同胞效应对性状的作用阶段依品种不同而存在些许差异, 如 168 日龄虹鳟体质量(Su *et al.*, 1996)和 180 日龄牙鲆体

质量和形态性状(Liu *et al.*, 2011)的遗传参数估计结果因模型中是否考虑此效应而存在差异。这些品种进行个体性状记录的日龄与本研究相类似, 获得遗传分析结果也基本相同, 从而证实全同胞效应在上述鱼类的这一发育时期是存在影响的。

此外, 马爱军等(2009)构建了 4 个估计大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)180 日龄体质量的遗传模型, 经过似然比检验确定的最优模型与本研究结果完全吻合, 进一步辅证了所筛选模型的正确性和有效性。分析全同胞组效应较大的原因, 其一, 每个家系在进行个体电子标记之前, 单独养殖的时间太长, 从而导致家系之间存在较大的差异; 其二, 多数研究所用的系谱仅有 1 代, 而且半同胞家系的数量也并不多, 造成了全同胞组效应没有被完全剖分。

采用最优遗传模型估计红鳍东方鲀 200 日龄生长性状的遗传参数, 体质量的遗传力估计值为 0.16, 体长的遗传力估计值为 0.14。按照遗传力分级定义标准: 低遗传力范围为 0.05–0.15, 中等遗传力范围为 0.20–0.40, 高遗传力范围为 0.45–0.60, 超高遗传力范围为 0.65 以上(Cardellino *et al.*, 1987)。红鳍东方鲀生长性状在这个发育时期的遗传力接近于中等遗传力。目前, 有关红鳍东方鲀生长性状遗传参数估计值的结果尚无文献可以参考。

借鉴其他鱼类品种相近发育阶段生长性状的遗传力, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)180 日龄体质量和全长的遗传力估计值分别为 0.40 和 0.31(韦信键等, 2013), 牙鲆 185 日龄体质量和体长的遗传力估计值均为 0.25(顾宪明等, 2008), 虹鳟 360 日龄体质量和体长的遗传力估计值分别为 0.45 和 0.28(刘宗岳等, 2009)。这些鱼类品种的生长性状遗传力估计值均高于本研究结果, 但需要指出的是, 上述研究分析所采用的动物模型在随机效应项均只考虑了一个加性遗传效应, 并无全同胞效应或母本效应等其他效应的存在。无疑, 这必然增大了加性遗传效应方差, 提高了遗传力估计值。

当模型中包括了全同胞效应等其他随机效应时, 加性遗传效应方差将降低, 遗传力估计值也就被低估了。由于本研究仅有 1 代数据, 个体间的遗传联系并不紧密, 而且只有 8 个半同胞家系占 50%。用这些系谱关系估计全同胞组效应, 家系间的一部分遗传差异会被剖分进全同胞组效应方差, 从而导致遗传力估计值被低估, 因此世代和家系间的亲缘关系非常重要。如, 大口黑鲈 180 日龄体质量和体长的估计遗传力分别为 0.28 和 0.26(李镛等, 2011), 牙鲆 240 日龄体质量和体长的估计遗传力分别为 0.27 和 0.30(Liu *et al.*,

2011), 银大马哈鱼 130 日龄体质量的估计遗传力为 0.26(Martinez *et al*, 1999), 大西洋鳕鱼 200 日龄体质量的估计遗传力为 0.29(Gjerdea *et al*, 2004), 虹鳟鱼 168–364 日龄体质量的估计遗传力范围为 0.05–0.10 (Su *et al*, 1996)。这些品种报道的遗传力估计值与本研究结果更为接近, 其分析所采用的动物模型均同时包含了加性遗传效应和全同胞效应。对比这些研究获得的生长性状遗传力估计值和前面所述模型中仅包含加性遗传效应的遗传力估计结果, 显而易见, 当模型中考虑更多的随机效应项时, 性状的遗传力估计值明显降低。由此, 再次证实在进行鱼类生长性状遗传评估之前, 建立不同的统计遗传模型进行模型选优的过程是至关重要的, 这将显著提高下一步估计生长性状遗传参数和个体育种值的准确程度。

本研究优化了进行红鳍东方鲀 200 日龄生长性状遗传评估的数学模型, 获得了主要生长性状的遗传力, 其估计值表明这些性状具备一定的选择潜力, 可以采用家系选育的方法开展红鳍东方鲀生长性状的遗传改良工作。未来将在选育基础群体中继续挑选性状优良的个体, 大规模建立选育家系, 通过最优遗传分析模型准确估计个体育种值、筛选优良家系, 从而加速红鳍东方鲀育种工作的研究进展, 尽早培育出新品种或新品系, 最终满足养殖产业对于红鳍东方鲀良种的迫切需求。

参 考 文 献

王新安, 马爱军, 庄志猛, 等. 红鳍东方鲀体型性状选育指标的综合判定. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 10-15

马爱军, 王新安, 雷霖霖. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)不同生长阶段体重的遗传参数和育种值估计. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 187-194

韦信键, 刘贤德, 王志勇. 32 个大黄鱼家系早期阶段生长性状比较及遗传参数估计. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(5): 321-328

刘宗岳, 高会江, 白秀娟, 等. 应用不同模型估计虹鳟生长性状的遗传参数. 水产学杂志, 2009, 22(1): 10-14

李镛, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈生长性状的遗传参数和育种值估计. 中国水产科学, 2011, 18(4): 766-773

陆丽君, 马爱军, 王新安, 等. 5 个红鳍东方鲀养殖群体微卫星 DNA 遗传多态性分析. 渔业科学进展, 2013, 34(4):

27-33

孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 970

顾宪明, 刘永新, 王凯, 等. 应用 DF-REML 法估计牙鲆性状遗传参数. 东北农业大学学报, 2008, 39(11): 71-75

Bang A, Gronkjaer P, Clemmesen C, *et al*. Parental effects on early life history traits of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) larvae. J Exp Mar Biol Ecol, 2006, 334(1): 51-63

Cardellino R, Rovira J. Mejoramiento genético animal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 1987, 253

Crandell PA, Gall GAE. The genetics of body weight and its effect on early maturity based on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1993, 117(1-2): 77-93

Doupe R, Lymbery A. Additive genetic and other sources of variation in growth traits of juvenile black bream, *Acantopagrus butcheri*. Aquac Res, 2005, 36(7): 621-626

Gjerdea B, Terjesen BF, Barr Y, *et al*. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture, 2004, 236(1-4): 167-177

Henderson CR. Estimation of variances and covariance under multiple traits model. J Dairy Sci, 1984, 67(7): 1581-1589

Kaori U, Kazuo T. Estimation of the heritability of quantitative traits in fry and juvenile hirame, *Paralichthys olivaceus*. Suisanzoshoku, 1999, 47(1): 49-54

Liu YX, Wang GX, Wang YF, *et al*. Estimation of genetic parameters for growth traits of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using an animal model. Fisheries Science, 2011, 77(1): 87-93

Martinez V, Neira R, Gall GAE. Estimation of genetic parameters from pedigreed populations: lessons from analysis of alevin weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 1999, 180(3-4): 223-236

Patterson HD, Thompson R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. Biometrika, 1971, 58(3): 545-554

Saillant E, Chatain B, Fostier A, *et al*. Parental influence on early development in the European sea bass. J Fish Biol, 2001, 58(6): 1585-1600

Shimada Y, Shikano T, Murakami N, *et al*. Maternal and genetic effects on individual variation during early development in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 2007, 73(2): 244-249

Su GS, Liljedahl LE, Gall GAE. Genetic and environmental variation of body weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1996, 144(1-3): 71-80

(编辑 冯小花)

Estimation of Genetic Parameters of Growth Traits of Redfin puffer (*Takifugu rubripes*)

LIU Yongxin¹, ZHOU Qin^{2①}, ZHANG Hongtao², JIANG Changbo³, ZHANG Fuchong⁴

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141; 2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100; 3. Tianhe Aquaculture Farming Ltd.Co., Tangshan 063205; 4. Hebei Ocean and Fisheries Science Research Institute, Qinhuangdao 066200)

Abstract Redfin puffer is an important marine fish species and is widely cultured in China, Korea and Japan because of its high edible value. It is common that in the development of redfin puffer aquaculture cultivated fingerlings showed slow growth rate and poor resistance to disease. To improve the traits of interest, accurate estimation of their genetic parameters is needed to develop selective breeding programs. However, the heritability of different growth traits in redfin puffer has been rarely reported so far. In this study, we generated eight half-sib families (16 full-sib families) of redfin puffer *Takifugu rubripes* with artificial insemination to select the optimal model of genetic evaluation and to acquire accurate and reliable genetic parameters of the growth traits. Two growth traits of 790 redfin puffers from these families were measured, including the body weight and the body length. The growth traits at 135 days of age were used as covariates to construct three animal models as below: in model (1) the additive genetic effect, the maternal genetic effect and the family effect were considered; in model (2) the additive genetic effect and the maternal genetic effect were included; and in model (3) the additive genetic effect and the family effect were analyzed. DMU software was applied to estimate the variance components in each model with the average information restricted maximum likelihood method, and the differences between the three models were analyzed with the likelihood ratio test. The optimal model was used to estimate the genetic parameters of growth traits at 200 days of age in redfin puffer. The results showed that the maternal effect was significant in none growth traits at 200 days of age. Thus, the optimal model should be model (3). At 200 days of age, the body weight and the body length showed heritability of 0.16 and 0.14 respectively, and full-sib effect ratio of 0.12 and 0.13 respectively. These results suggested that there could be a certain potential for growth traits during artificial selection and that family breeding could effectively improve these traits in redfin puffer.

Key words Redfin puffer; Full-sib family; Growth traits; Genetic parameter; Optimal model

① Corresponding author: ZHOU Qin, E-mail: laozhou_529@hotmail.com

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)生长后期 对苏氨酸需要量*



窦秀丽^{1,2} 梁萌青^{1①} 郑珂珂¹ 王新星¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 在半精制饲料中分别添加0、0.35%、0.70%、1.05%、1.40%、1.75%苏氨酸,制成苏氨酸实际梯度为1.05%、1.35%、1.65%、2.00%、2.42%、2.65%的6组等能等氮饲料(44.67%粗蛋白质,21.65 kJ/g总能),对初始体重为(333.93±6.60)g的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)在海水浮式网箱(1.5 m×1.5 m×2.0 m)中进行了70 d的喂养实验,研究其对苏氨酸的最适需求量。结果显示,鲈鱼成活率在89.58%–95.83%之间,各处理组之间无显著差异($P>0.05$);随着饲料中苏氨酸水平的升高,鲈鱼的特定生长率(SGR)显著增加($P<0.05$),且在2.00%苏氨酸饲料组出现最大值,但随着苏氨酸水平的继续升高,SGR呈减小的趋势;饲料效率(FE)随饲料中苏氨酸水平的升高呈先增加后减小的趋势,2.00%苏氨酸组的FE显著高于1.05%组及2.65%组($P<0.05$);随着饲料中苏氨酸水平的升高,蛋白质沉积率(PPI)呈先增加后减小的趋势,且于2.00%苏氨酸组出现最大值;肝脏谷草转氨酶、谷丙转氨酶活性随饲料中苏氨酸水平的升高呈先增加后减小的趋势;饲料中不同水平苏氨酸对鱼体粗蛋白、粗脂肪、粗灰分无显著影响($P>0.05$)。以特定生长率、饲料效率及蛋白质沉积率为评价指标,经二次回归分析得出,鲈鱼对饲料中苏氨酸的最适需求量分别为占饲料干重的1.84%、1.87%及1.83%,占饲料蛋白质的4.11%、4.18%及4.09%。

关键词 鲈鱼; 苏氨酸; 生长; 需求量; 生长后期

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0045-08

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)称花鲈、寨花、伴鲈等,属鲈形目、鲈科、花鲈属。目前对鲈鱼营养需求的研究较多,鲈鱼对蛋白质的需求量为40.0%–44.1%,对脂肪的需求量为5.4%–15.4%,对碳水化合物的需求量为19.8% (陆国君等,1998;洪惠馨等,1994、1999;高淳仁等,1998;苏传福等,2005)。

蛋白质是构成生命的基础物质,是由氨基酸组成的含氮高分子化合物,鱼类对蛋白质的需求其实是对氨基酸的需求(文华等,2009)。苏氨酸作为必需氨基酸之一,属于易缺乏氨基酸,在植物蛋白源中常常是第二或者第三限制性氨基酸(Tibaldi *et al.*, 1999)。苏氨

酸具有重要的生理作用,参与蛋白质的合成、促进生长,且具免疫功能(麦康森等,2008)。随着蛋白质氨基酸营养需求研究的不断深入,苏氨酸在日粮氨基酸平衡中的作用日益突出,最显著的是苏氨酸的缺少会限制养殖动物的生长(Kovar *et al.*, 1993)。国内外学者已确定了印度鲤鱼(Ahmed *et al.*, 2004)、欧洲黑鲈(Tibaldi *et al.*, 1999)、牙鲆(Forster *et al.*, 1998)、美国红鱼(Moon *et al.*, 1991)、草鱼(文华等,2009)、鲈鱼(何志刚等,2012)对苏氨酸的需求量,其范围在占粗蛋白2.3%–4.60%之间。但这些报道多数为幼鱼(0.5–8.5 g)对苏氨酸的需求,实际生产中鲈鱼饲料氨基酸的添加量

* 农业公益性行业专项(201003200)资助。窦秀丽, E-mail: douxiuli103-1101@163.com

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

收稿日期: 2014-01-04, 收修改稿日期: 2014-03-07

多以幼鱼氨基酸需求量为标准,但是由于鱼体各阶段生理、生长状况的不同,对氨基酸的需求存在差异,以幼鱼氨基酸需求量为标准添加苏氨酸,难以适应养成期鲈鱼对苏氨酸的需求。本研究旨在明确鲈鱼不同生长阶段对饲料中苏氨酸的需求量,为鲈鱼精准饲料配方的设计提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

以鱼粉、玉米蛋白、明胶为蛋白源,鱼油及豆油为脂肪源,糊精为糖源,配制成粗蛋白含量为平均值44.67%、总能为21.65 kJ/g的基础饲料(表1)。以鲈

表1 实验饲料配方及其化学成分分析
Tab.1 The experimental diet formulation and their proximate analyses

成分 Ingredients	饲料 Diet					
	Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.40%)	Diet 6 (2.65%)
玉米蛋白 Zein meal	20	20	20	20	20	20
鱼粉 Fish meal	5	5	5	5	5	5
明胶 Gelatin	15	15	15	15	15	15
糊精 Dextrin	11	11	11	11	11	11
鱼油 Fish oil	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
豆油 Soybean oil	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
磷脂 Phospholipid	2	2	2	2	2	2
混合必需氨基酸 Essential amino acids premix ¹	7	7	7	7	7	7
混合非必需氨基酸 Non-essential amino acids premix ²	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2
维生素和矿物质混合物 Vitamin and mineral premix ³	4	4	4	4	4	4
诱食剂 Attractant ⁴	1	1	1	1	1	1
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	10	10	10	10	10	10
谷氨酸 Glutamic acid	5.8	5.45	5.10	4.75	4.40	4.05
L-苏氨酸 L-threonine	0	0.35	0.70	1.05	1.40	1.75
化学组成 Chemical composition						
苏氨酸 Threonine (% dry matter)	1.05	1.35	1.65	2.00	2.42	2.65
粗蛋白 Crude protein (% dry matter)	44.20	45.15	45.23	44.24	45.21	44.19
粗脂肪 Crude lipid (% dry matter)	8.39	9.09	9.13	8.92	8.53	8.75
灰分 Ash (% dry matter)	2.68	2.76	2.69	2.75	2.73	2.94
水分 Moisture (% dry matter)	7.50	7.07	7.20	7.21	7.40	7.29
能量 Gross energy (kJ/g dry matter)	21.56	21.69	21.69	21.68	21.65	21.62

注: 1. 混合必需氨基酸(%饲料): 精氨酸 0.8; 组氨酸 0.13; 异亮氨酸 0.87; 亮氨酸 0.3; 赖氨酸 2.3; 蛋氨酸 0.9; 苯丙氨酸 0.3; 缬氨酸 1.4

2. 混合非必需氨基酸(%饲料): 天冬氨酸 3.19; 丝氨酸 0.69; 甘氨酸 2.31; 丙氨酸 1.72; 胱氨酸 0.24; 酪氨酸 0.69; 谷氨酸 3.37

3. 维生素和矿物质混合物(mg/kg 预混料): 维核黄素 45 mg; 硫胺素 25 mg; 维生素 K₃ 10 mg; 肌醇 800 mg; 盐酸吡哆醇 20 mg; 维生素 B₁₂ 0.1 mg; 泛酸 60 mg; 生物素 1.20 mg; 维生素 A 32 mg; 维生素 D 5 mg; 烟酸 200 mg; 叶酸 20 mg; 维生素 E 120 mg; 次粉 18.67 g; 碘化钾 0.8 mg; 氟化钠 2 mg; 硫酸铁 80 mg; 硫酸锌 50 mg; 氯化钴 50 mg; 硫酸铜 10 mg; 硫酸镁 1200 mg; 氯化钠 100 mg; 磷酸二氢钙 3000 mg; 沸石粉 15.51 g

4. 诱食剂: 本品由青岛玛斯特生物技术有限公司提供

Note: 1. Essential amino acids premix (% diet): arginine 0.8; histidine 0.13; isoleucine 0.87; leucine 0.3; lysine 2.3; valine 1.4; phenylalanine 0.3

2. Non-essential amino acids premix (% diet): aspartic acid 3.19; serine 0.69; glycine 2.31; alanine 1.72; Cystine 0.24; tyrosine 0.69; Glutamic 3.37

3. Vitamin and Mineral premix (mg/kg diet): Riboflavin 45 mg; Thiamine 25 mg; Menadione 10 mg; Inositol 800 mg; Pyridoxine 20 mg; Vitamin B₁₂ 0.1 mg; Pantothenate 60 mg; Biotin 1.2 mg; Vitamin A 32 mg; Vitamin D 5 mg; Tocopherol acetate 200 mg; Folic acid 20 mg; Vitamin E 120 mg; Wheat flour 18.67 g; KI 0.8 mg; NaF 2 mg; FeSO₄·7H₂O 80 mg; ZnSO₄·7H₂O 50 mg; CoCl₂·6H₂O 50 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; MnSO₄·4H₂O 1200 mg; NaCl 100 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 3000 mg; Mordenzeo 15.51 g

4. Attractant: provided by Qingdao Master of Biotechnology Co. Ltd

表 2 各组饲料中氨基酸组成分析(%饲料干物质)
Tab.2 Amino acid composition of the diets (% dry matter)

氨基酸 Amino acids	43%鱼体蛋白 43% whole body protein	饲料 Diet					
		Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.42%)	Diet 6 (2.65%)
精氨酸 Arg	2.58	2.27	2.11	2.25	2.05	2.11	2.28
组氨酸 His	0.55	0.53	0.52	0.54	0.56	0.53	0.57
异亮氨酸 Ile	1.78	1.53	1.58	1.58	1.53	1.58	1.81
亮氨酸 Leu	3.02	2.78	2.77	2.86	2.56	2.65	2.73
赖氨酸 Lys	3.36	2.50	2.39	2.52	2.32	2.45	2.57
蛋氨酸 Met	1.22	1.11	1.30	1.15	1.05	1.35	1.63
苯丙氨酸 Phe	1.51	1.52	1.63	1.78	1.47	1.62	1.54
苏氨酸 Thr	1.60	1.05	1.35	1.65	2.00	2.42	2.65
缬氨酸 Val	2.01	2.16	2.16	2.16	2.07	2.07	2.15
天冬氨酸 Asp	4.01	4.31	4.31	4.38	4.29	4.30	4.35
丝氨酸 Ser	1.44	1.68	1.70	1.69	1.65	1.66	1.70
甘氨酸 Gly	2.87	3.05	2.86	3.21	3.33	3.12	3.39
丙氨酸 Ala	2.55	2.45	2.62	2.60	2.60	2.35	2.40
胱氨酸 Cys	0.24	0.25	0.26	0.27	0.19	0.26	0.34
酪氨酸 Tyr	1.21	1.29	1.41	1.37	1.19	1.44	1.67
谷氨酸 Glu	6.60	7.19	6.98	6.83	6.58	6.26	6.19

注: 本实验未测定色氨酸的含量, 实验测定中 $n=3$

Note: tryptophane was not determined in this study. $n=3$

鱼体氨基酸含量为标准, 在基础饲料中添加相应的晶体氨基酸, 使除苏氨酸以外的氨基酸达到鱼体最适需要量(表 2)。在 6 组基础饲料中分别添加晶体 L-苏氨酸 0、0.35%、0.70%、1.05%、1.40%、1.75%, 以谷氨酸进行配平, 使 1-6 组实验饲料中苏氨酸含量分别为 1.05%、1.35%、1.65%、2.00%、2.42%、2.65%饲料干重。配制饲料时先将原料粉碎均匀, 用 6 mol/L 的 NaOH 调节饲料的 pH 值至中性(Wilson *et al*, 1977), 加工成 5 mm 粒径的颗粒, 于 55℃ 下烘干, 置于阴凉干燥处保存备用。

1.2 实验鱼及饲养管理

实验在浙江省宁波市象山港湾水产种苗有限公司海水浮式网箱中进行, 选用同一批初始体重为 (333.93±6.60) g 的鲈鱼。在开始正式实验前, 将鲈鱼放于海水网箱(3.0 m×3.0 m×3.0 m)中暂养 14 d, 并投喂实验基础饲料(对照组)至表观饱食, 使之逐渐适应实验饲料和养殖环境。实验开始前, 实验鱼饥饿 24 h, 然后称重, 随机挑选规格一致的鲈鱼, 并随机分组。实验鱼在海水浮式网箱(1.5 m×1.5 m×2.0 m)中养殖, 每个网箱放养 16 尾, 每组 3 个平行。每天投喂两次(06:00 和 18:00)至饱食, 养殖周期为 70 d(2012 年 9 月 25 日-12 月 4 日)。实验期间, 海水温度为 19-24.5℃, 盐度为

25-30, pH 值为 7.2-7.5, 溶解氧含量在 7 mg/L 左右。

1.3 样品采集与分析

实验开始时, 随机抽取 5 尾鱼置于-20℃冰箱中保存, 用于常规成分分析。生长实验结束后, 鲈鱼饥饿 24 h, 记数, 称重。分别从每网箱随机抽取 3 尾鲈鱼, 每个饲料组 15 尾, 分别取肌肉、肝脏, 放于液氮中快速冷冻, 保存于-80℃超低温冰柜中备用。另每网箱分别取 4 尾实验鱼置于-20℃冰箱中, 用于常规成分分析。

饲料、全鱼样品的水分采用 105℃恒温烘干失重法。粗蛋白含量测定采用凯氏定氮法(VELP UDK142 automatic distillation unit)。粗脂肪含量采用索氏提取法(以石油醚作为抽提液)测得(丹麦 FOSS 索氏抽提仪 SOXTEC 2050)。灰分测试采用灼烧法, 将样品在电炉上炭化后, 在 550℃马福炉中灼烧 5 h, 测得灰分含量。肌肉及饲料中氨基酸的含量采用日立 L-8900 型氨基酸分析仪测定。谷草转氨酶和谷丙转氨酶均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法测定。

1.4 计算及统计分析

各参数的计算公式:

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

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

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

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

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

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, *PER*, %)=100×(终末体重-初始体重)/摄入蛋白

蛋白质沉积率(Protein productive value, *PPV*, %)=100×(鱼体蛋白增量/摄入蛋白)

所得实验数据采用平均值±标准差表示, 采用SPSS 19.0 分析软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 比较组间差异显著性采用 Duncan's 检验方法, 以 $P<0.05$ 为显著水平。

2 结果

2.1 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼生长性能的影响

不同水平苏氨酸对鲈鱼生长性能的影响如表3。结果显示, 各组存活率在89.58%–95.83%之间, 饲料苏氨酸水平对各组存活率无显著影响($P>0.05$)。随着饲料中苏氨酸水平的升高, 实验组鱼体特定生长率(*SGR*)呈现先增加后减少的趋势, 并且苏氨酸水平2.00%组的 *SGR* 显著高于其他各组($P<0.05$)。鲈鱼鱼体增重率(*WGR*)随饲料中苏氨酸水平的升高, 呈先增

加后减少的趋势, 各组间差异显著($P<0.05$), 且苏氨酸水平2.00%组增重率出现最大值。各实验组的摄食率在0.47–0.54%/d之间, 饲料中不同水平苏氨酸对鲈鱼的摄食率无显著影响($P>0.05$)。随着饲料中苏氨酸水平的升高, 各实验组饲料效率呈现出先增加后减少的趋势, 苏氨酸水平2.00%组饲料效率显著高于苏氨酸水平1.05%组($P<0.05$), 与1.35%、1.65%及2.42%组无显著性差异($P>0.05$)。随着饲料中苏氨酸水平的升高, 蛋白质效率(*PER*)呈现先增加后减少的趋势, 其中苏氨酸水平2.00%组蛋白质效率最高, 且显著高于苏氨酸水平1.05%及2.65%组($P<0.05$), 与1.35%、1.65%及2.42%组无显著性差异($P>0.05$)。各实验组蛋白质沉积率(*PPV*)亦呈现先增加后减少的趋势, 苏氨酸水平2.00%组显著高于苏氨酸水平1.05%及2.65%组($P<0.05$), 与1.35%、1.65%及2.42%组无显著性差异($P>0.05$)。

以饲料苏氨酸水平为横坐标, 鲈鱼的特定生长率(*SGR*)为纵坐标, 经二次曲线回归分析得 $y = -0.211x^2 + 0.776x - 0.291$, $R^2 = 0.937$, 当苏氨酸水平为1.84%饲料干重时, 得到最大特定生长率(图1)。以饲料苏氨酸水平为横坐标、鲈鱼的饲料效率(*FE*)为纵坐标进行二次曲线回归分析得 $y = -0.401x^2 + 1.506x - 0.591$, $R^2 = 0.779$, 当苏氨酸水平为1.87%饲料干重时, 饲料效率达到最大值(图2)。以饲料苏氨酸水平为横坐标、鲈鱼的蛋白质沉积率(*PPV*)为纵坐标进行二次曲线回归分析得 $y = -16.794x^2 + 61.453x - 20.944$, $R^2 = 0.986$, 当苏氨酸水平为1.83%饲料干重时, 蛋白沉积率最大(图3)。

表3 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼生长性能的影响(平均值±标准差)

Tab.3 Effects of dietary threonine levels on the growth performance of Japanese seabass (Mean±SD, $n=3$)

指标 Parameters	饲料 Diet					
	Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.42%)	Diet 6 (2.65%)
初始体重 Initial weight(g)	333.93±6.60	333.93±6.60	333.93±6.60	333.93±6.60	333.93±6.60	333.93±6.60
终末体重 Final weight(g)	420.74±9.32 ^{bc}	432.67±4.08 ^b	455.42±9.96 ^a	461.39±7.74 ^a	435.79±4.65 ^b	405.20±15.61 ^c
存活率 Survival rate (%)	95.83±3.61	95.83±3.61	93.75±0.00	91.67±3.61	95.83±3.61	89.58±7.21
增重率 <i>WGR</i> (%)	23.76±0.17 ^e	27.78±0.36 ^d	32.87±0.41 ^b	35.41±0.37 ^a	28.49±0.35 ^c	21.04±0.52 ^f
特定生长率 <i>SGR</i> (%/d)	0.30±0.02 ^d	0.35±0.04 ^c	0.41±0.04 ^b	0.43±0.04 ^a	0.36±0.04 ^c	0.27±0.06 ^e
摄食率 <i>FI</i> (%/d)	0.52±0.07	0.54±0.08	0.54±0.14	0.52±0.03	0.47±0.10	0.54±0.09
饲料效率 <i>FE</i> (%)	0.59±0.07 ^{bc}	0.65±0.09 ^{abc}	0.78±0.17 ^{ab}	0.83±0.05 ^a	0.79±0.15 ^{ab}	0.52±0.09 ^c
蛋白质效率 <i>PER</i> (%)	1.44±0.18 ^{bc}	1.54±0.20 ^{abc}	1.89±0.42 ^{ab}	2.01±0.12 ^a	1.87±0.37 ^{ab}	1.26±0.22 ^c
蛋白质沉积率 <i>PPV</i> (%)	25.20±3.12 ^{bc}	31.2±4.258 ^{abc}	34.34±7.64 ^{ab}	35.64±2.09 ^a	28.72±5.65 ^{abc}	24.25±4.25 ^c

注: 同一行中不同的上标字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Note: Means in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

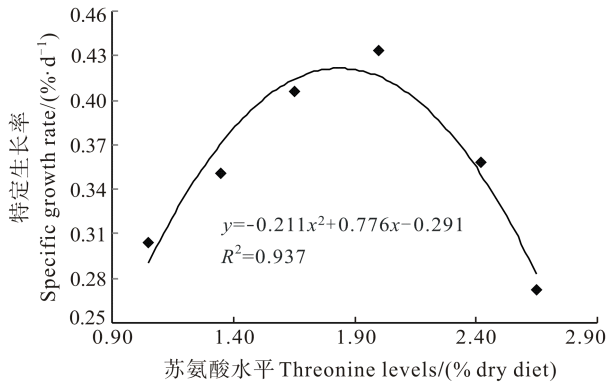


图 1 饲料中不同苏氨酸水平对鲈鱼特定生长率的影响
Fig.1 Effects of dietary threonine levels on the specific growth rate of Japanese seabass

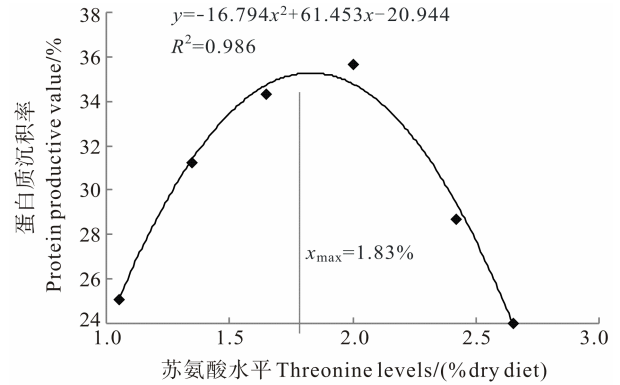


图 3 饲料中不同苏氨酸水平对鲈鱼蛋白质沉积率的影响
Fig.3 Effects of dietary threonine levels on the protein productive value of Japanese seabass

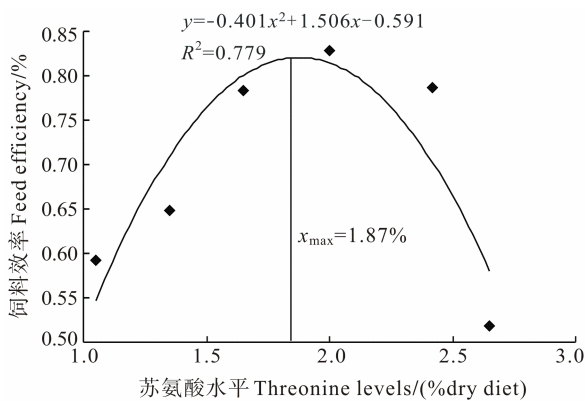


图 2 饲料中不同苏氨酸水平对鲈鱼饲料效率的影响
Fig.2 Effects of dietary threonine levels on the feed efficiency of Japanese seabass

2.2 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼体组成的影响

饲料中不同水平的苏氨酸对鲈鱼体组成的影响如表 4。各实验组鲈鱼水分含量为 69.52%–74.65%，粗蛋白含量为 15.04%–15.35%(湿重)，粗脂肪含量为 7.04%–7.17%(湿重)，灰分含量为 5.35%–5.68%(湿重)，各组间无显著差异($P>0.05$)，饲料中不同水平苏氨酸对鲈鱼体组成无显著影响($P>0.05$)。

2.3 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼肝脏转氨酶的影响

肝脏谷草转氨酶活性随饲料中苏氨酸水平的升高呈现先增加后减少的趋势，其中苏氨酸水平 2.00% 组显著高于其他各组($P<0.05$) (表 5)。肝脏谷丙转氨酶的活性亦随饲料中苏氨酸水平的升高呈现先增加后

表 4 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼体组成的影响(均值±标准差)

Tab.4 Effects of dietary threonine levels on the whole body composition of Japanese seabass (Mean±SD, n=3)

指标 Parameters	饲料 Diet					
	Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.42%)	Diet 6 (2.65%)
鱼体水分 Moisture (%)	74.65±1.22	69.68±2.88	70.91±1.91	69.52±0.89	72.85±1.96	70.12±2.18
鱼体粗蛋白 Crude protein (%)	15.28±0.27	15.04±0.21	15.35±0.24	15.14±0.36	15.12±0.51	15.27±0.37
鱼体粗脂肪 Crude lipid (%)	7.06±0.11	7.17±0.08	7.10±0.26	7.04±0.62	7.04±0.07	7.04±0.07
鱼体灰分 Ash (%)	5.55±0.43	5.49±0.89	5.36±0.04	5.68±0.58	5.64±0.27	5.35±0.26

注：同一行中不同的上标字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Note: Means in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

表 5 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼肝脏转氨酶活性的影响(均值±标准差)

Tab.5 Effects of dietary threonine levels on GOT, GPT activities of livers in Japanese seabass (Mean±SD, n=3)

指标 Parameters	饲料 Diet					
	Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.42%)	Diet 6 (2.65%)
谷草转氨酶 GOT(U/g prot)	40.65±0.29 ^b	40.97±0.89 ^b	41.10±0.63 ^b	43.62±1.29 ^a	41.72±1.96 ^{ab}	39.90±1.22 ^b
谷丙转氨酶 GPT(U/g prot)	46.02±1.94 ^b	45.07±0.94 ^b	49.76±0.57 ^a	50.62±1.07 ^a	46.01±1.17 ^b	46.95±0.70 ^b

注：同一行中不同的上标字母表示组间差异显著($P<0.05$)

Note: Means in each row with different superscripts have significant differences ($P<0.05$)

表6 饲料苏氨酸水平对鲈鱼肌肉必需氨基酸组成的影响(均值±标准差)

Tab.6 Effects of dietary threonine levels on the essential amino acid profile of the muscle in Japanese seabass (Mean±SD, n=3)

氨基酸 Amino acids	饲料 Diet						ANOVA	
	Diet 1 (1.05%)	Diet 2 (1.35%)	Diet 3 (1.65%)	Diet 4 (2.00%)	Diet 5 (2.42%)	Diet 6 (2.65%)	F 值	P 值
精氨酸 Arg	4.56±1.33	4.52±1.19	4.34±1.64	4.35±0.17	4.55±0.44	5.03±1.14	0.16	0.97
组氨酸 His	2.60±0.33	2.45±0.30	2.69±0.05	2.57±0.19	2.60±0.49	2.49±0.40	0.17	0.97
异亮氨酸 Ile	3.51±0.12	3.46±0.11	3.48±0.08	3.43±0.06	3.46±0.11	3.44±0.06	0.14	0.98
亮氨酸 Leu	5.36±0.04	5.5±0.04	5.35±0.04	5.33±0.05	5.34±0.08	5.33±0.05	0.16	0.97
蛋氨酸 Met	3.84±0.90	3.40±0.23	3.15±0.47	2.90±0.16	2.89±0.15	2.83±0.16	2.44	0.10
苯丙氨酸 Phe	4.37±0.28	4.35±0.04	4.07±0.63	4.25±0.28	4.14±0.34	4.23±0.28	0.34	0.88
赖氨酸 Lys	5.99±0.03	5.99±0.02	5.99±0.07	5.98±0.03	5.98±0.08	5.97±0.04	0.17	0.97
缬氨酸 Val	4.29±0.02	4.23±0.05	4.22±0.06	4.21±0.04	4.27±0.03	4.24±0.03	1.78	0.20
苏氨酸 Thr	4.01±0.08	3.99±0.11	4.06±0.04	3.99±0.09	4.05±0.09	3.99±0.08	0.35	0.87

注: 本实验未测定色氨酸的含量, 实验测定中 $n=3$

Note: tryptophane was not determined in this study

减少的趋势(表5), 苏氨酸水平 2.00%及 1.65%组显著高于其他各组 ($P<0.05$), 这两组间无显著差异 ($P>0.05$)。

2.4 饲料中苏氨酸水平对鲈鱼肌肉必需氨基酸组成的影响

饲料中添加不同水平的苏氨酸对鲈鱼肌肉中必需氨基酸组成的影响如表6。肌肉中除色氨酸未做测定外, 在饲料不同的苏氨酸水平下其他9种必需氨基酸, 各组间均没有显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

本研究以鲈鱼(333.93±6.60 g)为研究对象, 通过在基础饲料中添加不同水平的苏氨酸, 经过 70 d 的生长试验, 以 SGR、FE 和 PPV 为评价指标, 探讨鲈鱼生长后期对饲料中苏氨酸的最适需求量。结果显示, 当饲料中苏氨酸含量为饲料干重 1.83%–1.87% 时, 鲈鱼呈现最佳生长性能和最高蛋白质利用效率。此结果高于欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*) 2.6%饲料蛋白(Tibaldi *et al*, 1996)、条纹鲈(*Morone saxatilis*) 3.0%饲料蛋白(Small *et al*, 1998)、日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 2.3%饲料蛋白(Forster *et al*, 1998)、美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*) 2.9%饲料蛋白(Moon *et al*, 1991), 低于印度鲤鱼(*Cirrhinus mrigala*) 4.5%饲料蛋白(Ahmed *et al*, 2004)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 5.5%饲料蛋白(Silva *et al*, 2006), 不同种鱼对氨基酸的需求量不同是存在差异的主要原因。

鲈鱼幼鱼的苏氨酸需求量为 4.21%饲料蛋白(何志刚等, 2012), 高于本研究条件下苏氨酸需求量占饲料蛋白 4.09%–4.18%, 鱼体不同生长阶段对苏氨酸需求量不同是出现差异的主要原因。有研究显示,

初重 2.7 g 条纹鲈对苏氨酸的需求量为 1.03%饲料干重(13.4 kJ/kg 可消化能, 42%粗蛋白)(Small *et al*, 1999), 而 Small 等(1998)在之前对 110 g 及 790 g 左右的条纹鲈研究中证明苏氨酸的需求量为 1.10%饲料干重(13.39 MJ/kg 可消化能, 42%粗蛋白)。此外, 鲈鱼幼鱼实验温度为 26–32℃(何志刚等, 2012), 本研究实验温度为 19.0–24.5℃, 实验温度的不同可能会影响鱼体对苏氨酸的吸收与代谢, 从而导致实验结果的差异。鲈鱼幼鱼实验与本实验的实验配方及饲料原料均不同, 鲈鱼幼鱼实验所采用的蛋白源为白鱼粉、豆粕与明胶(何志刚等, 2012), 本实验蛋白源为玉米蛋白、鱼粉与明胶, 并且两个实验中蛋白源的比例也不同, 这也可能是两个实验结果存在差异的一个原因。

本研究结果显示, 饲料中不同苏氨酸水平会显著影响鲈鱼的生长, 适宜的苏氨酸含量会显著提高鲈鱼的生长, 这与王琤韡等(2013)、Shi 等(2010)、文华等(2009)及何志刚等(2012)的研究一致。苏氨酸缺乏或者过量均会阻碍鲈鱼的生长, 饲料中苏氨酸含量过少或过高时, 鱼体生长缓慢, 蛋白质效率降低, 主要原因可能是氨基酸平衡破坏, “水桶效应”产生, 从而影响鱼体生长。Ravia 等(1991)证明苏氨酸过量会抑制印度锦鲤(*Catla catla*)的生长。彭艳等(2009)研究显示, 饲料中苏氨酸不足会显著降低鼠的摄食量, 阻碍其生长速度。另外有研究表明, 苏氨酸缺乏会影响欧洲鲈鱼(Tibaldi *et al*, 1999)及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Rodehutschord *et al*, 1995)的摄食和生长。

肝脏是鱼类氨基酸代谢的主要场所, 在肝脏细胞中存在大量的与氨基酸代谢相关的酶类, 转氨酶是催化氨基酸氧化分解时, 氨基酸转移到 α -酮酸的酶, 其常作为评价鱼类营养状况的指标。本研究结果显示, 饲料中不同苏氨酸水平对肝脏谷草转氨酶及谷丙转氨

酶活性具有显著影响($P < 0.05$)。但是也有研究表明, 苏氨酸在代谢过程不经过转氨基作用(麦康森等, 2008; 国春艳等, 2006)。本研究结果可能是由于适宜的苏氨酸促进了体内氨基酸的平衡, 促进了苏氨酸与丝氨酸和甘氨酸之间的转化, 从而表现出较高的酶活性。

饲料中氨基酸会影响鱼体血浆、血清、肝脏及肌肉中氨基酸水平(Mai *et al.*, 2006), 但也有研究显示, 喂食 48 h 后氨基酸水平会恢复正常水平(Walton *et al.*, 1986)。本实验条件下对肌肉氨基酸进行测定, 并对除色氨酸外的 9 种必需氨基酸进行分析, 结果显示, 各实验组均无显著差异($P > 0.05$), Mai(2006)等证明饲料氨基酸水平会显著影响大黄鱼肌肉氨基酸的水平, 与本实验结果不一致。但也有报道饲料中苏氨酸水平会影响鲈鱼肌肉苏氨酸的含量(何志刚等, 2012), 与本实验结果存在差异, 其主要原因可能是鱼体规格的不同。

饲料中氨基酸会影响鱼体组成(Mai *et al.*, 2006), Zhou 等(2011)和陈乃松等(2010)研究证明, 饲料中不同水平蛋氨酸会影响黑鲷体蛋白组成。本实验条件下, 饲料中不同苏氨酸水平对鲈鱼体组成无显著影响($P > 0.05$), 这与赵红霞等(2007)、李燕等(2011)、Helena 等(2008)、何志刚等(2012)的研究一致。出现这种结果的原因可能是本研究的鱼体偏大, 实验周期比较短, 对鱼体组分的影响不明显。

综上所述, 在本研究条件下, 对于处于生长后期初重为(333.93±6.60) g 的鲈鱼, 以特定生长率(SGR)、饲料效率(FE)及蛋白质沉积率(PPI)为评价指标经二次回归分析得出的鲈鱼对饲料中苏氨酸的最适需求量分别为 1.84%、1.87%及 1.83%饲料干重, 占饲料蛋白质的 4.11%、4.18%及 4.09%。

参 考 文 献

王瑄, 喻兵权, 王仁华, 等. 日粮苏氨酸水平对生长肥育猪生长性能和屠宰性能的影响. 江西饲料, 2013(4): 12-16, 19

文华, 高文, 尚晓迪, 等. 草鱼幼鱼的饲料苏氨酸需要量. 中国水产科学, 2009, 16(2): 238-246

李燕, 艾庆辉, 麦康森, 等. 鲈鱼对组氨酸需求量的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(3): 31-36

麦康森, 何志刚, 艾庆辉. 鱼类苏氨酸营养生理研究进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(2): 195-200

陈乃松, 马建忠, 周恒永, 等. 大口黑鲈对饲料中蛋氨酸需求量的评定. 水产学报, 2010, 34(8): 1243-1253

何志刚, 艾庆辉, 麦康森, 等. 鲈鱼幼鱼对饲料中苏氨酸的需要量. 水产学报, 2012, 36(1): 124-131

苏传福. 花鲈营养需求的研究进展. 饲料研究, 2005(11): 30-33

国春艳, 许宗运, 刁其玉. 苏氨酸的营养免疫作用及畜禽对其需要量的研究. 饲料工业, 2006, 27(14): 46-48

林利民, 胡家财, 洪惠馨. 鲈鱼人工配合饲料中蛋白质最适含量的研究. 厦门水产学院学报(自然科学版), 1994, 16(1): 6-10

陆国君, 罗红宇, 钟明杰. 鲈鱼幼鱼对饵料中蛋白质、脂肪、碳水化合物适宜含量的研究. 海洋水产研究, 1998, 19(1): 81-85

洪惠馨, 林利民, 陈学豪, 等. 鲈鱼人工配合饵料中脂肪的适宜含量研究. 集美大学学报(自然科学版), 1999, 4(2): 41-51

赵红霞, 曹俊明, 吴建开, 等. 军曹幼鱼对饲料中精氨酸的需要量. 华南农业大学学报, 2007, 28(4): 87-90

高淳仁, 刘庆慧, 梁亚全, 等. 鲈鱼幼鱼对人工配合饲料中蛋白质、脂肪适宜含量的研究. 海洋水产研究, 1998, 9(1): 81-86

高敏英, 关金藏. 淡水养殖鲈鱼试验技术总结. 福建水产, 1992(2): 29-34

彭艳, 周小秋, 冯琳. 苏氨酸缺乏引起动物厌食反应的研究进展. 中国饲料, 2009(9): 8-11, 14

Ahmed I, Khan MA, Jafri AK. Dietary threonine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*(Hamilton). Aquaculture Research, 2004, 35(2): 162-170

Forster I, Ogata HY. Lysine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and juvenile red seabream *Pagrus major*. Aquaculture, 1998, 161: 131-142

Helena P, Aires OT. Lysine requirement and efficiency of lysine utilization in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. Aquaculture, 2008, 275(1-4): 283-290

Kovar JL, Lewis AJ, Radke TR, *et al.* Bioavailability of threonine in soybean meal for young pigs. J Anim Sci, 1993, 71(8): 2133-2142

Mai KS, Zhang L, Ai QH, *et al.* Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 535-542

Mai KS, Wan JL, Ai QH, *et al.* Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. Aquaculture, 2006, 253(1-4): 564-572

Moon HY, Gatlin DM. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture, 1991, 95(1-2): 97-106

Ravia J, Devarajb KV. Quantitative essential amino acid requirements for growth of catla, *Catla catla* (Hamilton). Aquaculture, 1991, 96(3-4): 281-291

Rodehutsord M, Jacobs S, Pack M, *et al.* Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 170 g to supplements of either L-arginine or L-threonine in a semipurified diet. J Nutr, 1995, 125(4): 964-969

Silva LCR, Furuva WM, Wilson M, *et al.* Threonine levels in diets for Nile Tilapia. Revista Brasileira de Zootecnia, (R.Bras. Zootec.). 2006, 35(4): 1258-1264

Shi SR, Wang ZY, Zou JM, *et al.* Effects of dietary threonine on

- growth performance and carcass traits of Yangzhou Geese. Czech. J Anim Sci, 2010, 55(9): 1212–1819
- Small BC, Soares JH Jr. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile stripe bass *Morone saxatilis*. J World Aquacul Soc, 1999, 30(3): 319–323
- Small BC, Soares JH Jr. Estimating the quantitative essential amino acid requirements of striped bass *Morone saxatilis*, using fillet A/E ratios. Aquaculture Nutrition, 1998, 4(4): 225–232
- Tibaldi E, Tulli F, Corsin F. Dietary threonine requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 1999, 175(1–2): 155–166
- Walton MJ, Wilson RP. Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. Aquaculture, 1986, 51(2): 105–115
- Wilson RP, Harding DE, Garling DL Jr. Effect of dietary pH on amino acid utilization and the lysine requirement of fingerling channel catfish. J Nutr, 1977, 107(1): 166–236
- Zhou F, Xiao JX, Hua Y, et al. Dietary L-methionine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*) at a constant dietary cystine level. Aquaculture Nutrition, 2011, 17(5): 469–481

(编辑 刘丛力)

Threonine Requirement of Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) in Mature Stages

DOU Xiuli^{1,2}, LIANG Mengqing¹①, ZHENG Keke¹, WANG Xinxing¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract It has been clear that the dietary threonine is essential in the growth of juvenile Japanese seabass, and the requirement of threonine could vary at different growth stages. It is necessary to identify the requirement of threonine at mature stages. We designed a 10-week feeding experiment to investigate the effects of threonine on the growth performance of Japanese seabass and to determine the optimal level of dietary threonine. Six isonitrogenous and isoenergetic semipurified diets (44.67% crude protein, 21.65 kJ/g gross energy) were formulated with graded levels of crystalline threonine (0, 0.35%, 0.70%, 1.05%, 1.40%, and 1.75%). The actual levels of threonine were determined to be 1.05%, 1.35%, 1.65%, 2.00%, 2.42%, and 2.65% in the dry diets, respectively, and then used them to feed the six groups of Japanese seabass (average body weight: 333.93±6.60 g). The result showed that no significant differences in survival rate (89.58%–95.83%) were found among dietary treatments ($P>0.05$). With the increasing of dietary threonine levels, the specific growth rate (*SGR*), feed efficiency (*FE*) and protein productive value (*PPV*) increased significantly ($P<0.05$), then these indexes showed a declining tendency after reaching their peaks at the 2.00% dietary threonine level. The activities of glutamic-oxaloacetic transaminase (*GOT*) in livers observably increased when threonine level was increased from 1.05% to 2.00% ($P<0.05$), and then decreased when the threonine level was increased from 2.00% to 2.65%. The highest activity of glutamic-pyruvic transaminase (*GPT*) in liver was obtained in fish fed with 2.00% of dietary threonine. However there was no significant difference in the body composition between different dietary treatments ($P>0.05$). The second-order regression analysis based on different parameters (*SGR*, *FE*, and *PPV*) indicated that the optimal levels of dietary threonine were 1.84%, 1.87% and 1.87% (of diet), and 4.11%, 4.18% and 4.09% (of dietary protein) respectively.

Key words *Lateolabrax japonicus*; Threonine; Growth performance; Requirement; Mature stages

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

甘露寡糖对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)稚鱼生长、肠道发育和非特异性免疫水平的影响*



于朝磊^{1,2} 常青^{1①} 吕云云^{1,2}

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

摘要 通过投喂经甘露寡糖强化的卤虫无节幼体,探索其对半滑舌鲷稚鱼(初始体长为1.4 cm左右)生长性能、肠道发育和非特异性免疫水平的影响。试验设两个处理组(对照组和甘露寡糖组),分别投喂经裂壶藻或甘露寡糖+裂壶藻强化的卤虫无节幼体。试验进行34 d,每17 d取样1次。结果显示,17 d时甘露寡糖组体长显著大于对照组($P<0.05$)。两组间的特定生长率和存活率无显著性差异($P>0.05$)。RNA/DNA和protein/DNA的比值在17 d时两组间均无显著性差异($P>0.05$);34 d时甘露寡糖组的RNA/DNA和protein/DNA比值均大于对照组。甘露寡糖组17 d时淀粉酶比活力和34 d时胰蛋白酶比活力显著高于对照组($P<0.05$)。甘露寡糖组的过氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶和溶菌酶活性均显著高于对照组($P<0.05$)。甘露寡糖组的微绒毛长度和皱襞高度显著大于对照组($P<0.05$);黏膜厚度大于对照组,但无显著性差异($P>0.05$)。试验结果表明,甘露寡糖可以提高半滑舌鲷稚鱼肠道发育和非特异性免疫水平。

关键词 甘露寡糖;半滑舌鲷;生长;肠道发育;非特异性免疫

中图分类号 S96 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0053-07

甘露寡糖(Mannan oligosaccharide, MOS)又称甘露低聚糖或葡甘露寡聚糖,是由几个甘露糖分子或甘露糖与葡萄糖通过 $\alpha(1-2)$ 、 $\alpha(1-3)$ 、 $\alpha(1-6)$ 、 $\beta(1-4)$ 及 $\beta(1-3)$ 糖苷键连接而成的寡聚糖(周景等,2011;徐磊等,2012)。有研究表明,甘露寡糖可以提高鱼类的存活率、生长性能和非特异性免疫能力(Liu *et al.*, 2013; Torrecillas *et al.*, 2013),被广泛应用在水产养殖中。此外,甘露寡糖可以通过增加鱼类肠道绒毛的高度、一致性和完整性来改善肠道功能(Yilmaz *et al.*, 2007; Dimitroglou *et al.*, 2010)。作为一种新型环保的益生元,甘露寡糖在水产养殖中应用前景广阔。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)隶属

鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鲷科(Cynoglossidae)、舌鲷属(*Cynoglossus* Buchanan-Hamiltou),是我国海水养殖中重要的经济鱼类。近年来,半滑舌鲷人工繁殖技术的研究取得了重大进展(柳学周等,2006;吕庆凯等,2012),但是仔稚鱼期通常会出现生长缓慢、死亡率高、摄食率低且消化器官发育异常等问题,其中主要是由于消化道发育不完善以及养殖水体病原微生物导致。本研究旨在通过甘露寡糖强化卤虫投喂半滑舌鲷稚鱼,来验证甘露寡糖是否能够增加半滑舌鲷稚鱼生长性能、消化道发育和非特异性免疫水平。研究结果为促进海水鱼类消化道发育和健康生长提供一个途径。

* 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101913)资助。于朝磊, E-mail: wdmmy19871125@163.com

① 通讯作者: 常青, 研究员, E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-03-15, 收修改稿日期: 2014-03-31

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养管理

本试验于 2013 年 5–6 月在山东省海阳市黄海水产股份有限公司完成。试验动物采用人工繁殖、同一批卵孵化的半滑舌鲷稚鱼, 稚鱼刚开始俯底, 初始体长为 1.4 cm 左右。

试验设对照组和试验组。对照组投喂经裂壶藻强化的卤虫无节幼体(卤虫无节幼体干重营养成分: 粗蛋白占 52.79%, 粗脂肪占 25.32%); 试验组投喂裂壶藻和甘露寡糖(奥特奇生物制品中国有限公司)强化的卤虫无节幼体; 每组设 3 个重复。试验鱼随机分配在 6 个直径 1 m、高 1 m 的圆柱形养殖桶中, 每桶 200 尾鱼, 暂养 2 d 后正式开始试验。水位 50 cm 左右, 流水养殖, 连续充气, 每天投喂两次(08:00 和 20:30), 投喂量为 5 个/ml。投喂时水位保持在 20 cm 左右, 并停止向缸中注水, 投喂 1 h 后流水。试验期间水温保持在 18–23℃。

投喂试验鱼的卤虫无节幼体均强化 12 h。采用直接强化法将强化物质准确称量后混合匀浆, 通过 300 目筛绢, 直接溶于强化水体中。强化密度为每毫升水体约 200 个卤虫无节幼体。强化剂用量参照 Salze 等(2008): 裂壶藻 100 g/m³; 甘露寡糖用量占强化水体重量的 0.2%。试验前用红色食物染料将甘露寡糖染色, 然后投喂给孵化后 48 h 的卤虫无节幼体, 观察发现, 经甘露寡糖强化的卤虫无节幼体消化道颜色明显比未强化颜色深, 这说明可以通过强化方法将甘露寡糖带到卤虫体内。

1.2 取样与分析

1.2.1 取样 每 17 d 取样 1 次, 每桶取 20 尾用于体重和体长的测定, 10 尾用于酶活性的测定。试验结束时取样 1 次, 用于 DNA/RNA 指标、肠道组织切片材料和免疫指标的测定, 采样时间为每日第 1 次投饵之前进行, 取样后放于 -80℃ 冷冻保存。

1.2.2 样品的处理 取腹腔部分(鳃盖骨后缘至肛门后缘)放入离心管中, 加入 4 倍质量比的冰冷双蒸水进行匀浆。匀浆液在 4℃ 条件下 3300 g/min 离心 3 min, 然后取上清液, 稀释成适当的浓度用于测定酶活(淀粉酶和胰蛋白酶)和免疫指标(超氧化物歧化酶、溶菌酶、过氧化氢酶、过氧化物酶和一氧化氮合酶)。

1.2.3 肠道组织切片的制备 取全鱼, 先用 Davidesdous 液固定 24 h, 然后置于 70% 乙醇中保存。经过乙醇脱水和石蜡包埋后, 用 LEICA RM2235 型切片机连续切片, 切片厚度为 6 μm, 进行 H.E 染色。

用中性树脂封片, 在 Nikon E800 型显微镜下观察、拍照。

1.3 指标测定与方法

1.3.1 生长性能计算

特定生长率 $SGR(\%/d) = (\ln \text{末均干重} - \ln \text{初均干重}) / \text{饲养天数} \times 100$

存活率 $SR(\%) = (\text{试验开始时的鱼尾数} - \text{死亡的鱼尾数}) / \text{试验开始时的鱼尾数} \times 100$

1.3.2 生理生化指标的测定 胰蛋白酶活性的测定参照 Eranlger 等(1961), 略有改动。以 N- α -benzoyl DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) 作为测定的底物, 步骤如下: 27 μl 的双蒸水加到 150 μl BAPNA 溶液中, 于 25℃ 平衡 5 min。加入样品 3 μl, 25℃ 反应 10 min。最后加入 30 μl 30% 乙酸终止反应。读取 $OD_{410\text{nm}}$ 值, 通过标准曲线计算胰蛋白酶含量。制作标准曲线时, 将 3 μl 样品换成 3 μl 0–400 μg/ml 胰蛋白酶梯度溶液, 其余步骤相同。

淀粉酶、总蛋白和免疫指标均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

核酸的测定参照 Buckley 等(1987)和 Kuropat 等(2002)的方法。

每组选取 5 个肠道组织切片, 进行肠微绒毛(肠道上皮细胞表面伸出的细长指状突起)长度、粘膜(肠道内壁的粘膜层)厚度和皱襞(黏膜和黏膜下层向腔面形成的突起)高度的测量, 观察肠道发育情况。

1.4 统计分析

试验结果以平均数±标准误差表示, 经 SPSS 17.0 处理, 使用配对样本进行 *t* 检验分析(Paired- samples *t*-test)。结果用平均数±标准误差(Mean±SD)表示。每组 3 个平行, 差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼生长与成活率的影响

不同试验组的生长指标见表 1。半滑舌鲷稚鱼的体长在 17 d 时, 甘露寡糖组显著大于对照组($P < 0.05$), 34 d 时两组间无显著性差异($P > 0.05$); 17 d 和 34 d 时甘露寡糖组的特定生长率均大于对照组, 但无显著性差异($P > 0.05$); 两组间的存活率在 17 d 和 34 d 均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 核酸和蛋白比值分析

如表 2 所示, RNA/DNA 和 protein/DNA 的比值在 17 d 时, 两组间均无显著性差异($P > 0.05$); 在 34 d 时,

表 1 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼生长与成活率的影响
Tab.1 Effects of MOS on the growth and survival rate of the postlarvae of *Cynoglossus semilaevis* Günther

指标 Parameters	组别 Treatment	
	甘露寡糖组 MOS group	对照组 Control group
1 d 体长 Body length(cm)	2.43±0.06 ^a	2.38±0.07 ^b
34 d 体长 Body length(cm)	3.68±0.09	3.49±0.06
17 d 特定生长率 Specific growth rate(%/d)	8.74±0.44	8.53±0.64
34 d 特定生长率 Specific growth rate(%/d)	8.34±0.12	8.21±0.20
存活率 Survival rate(%)	86.92±12.15	89.76±1.56

注: 表中同行相同上标或者无上标表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同上标字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表同

Note: Data within the same row with same superscript or no superscript are not significantly different ($P>0.05$), the different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same in the below

表 2 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼核酸比值的影响
Tab.2 Effects of MOS on the nucleic acid ratio of the postlarvae of *C. semilaevis* Günther

指标 Parameters	组别 Treatment	
	甘露寡糖组 MOS group	对照组 Control
17 d RNA/DNA	7.00±1.84	8.17±4.88
34 d RNA/DNA	9.53±0.23 ^a	4.75±0.06 ^b
17 d protein/DNA	53.91±1.28	52.91±2.93
34 d protein/DNA	62.49±4.81	41.16±4.16

甘露寡糖组的 RNA/DNA 和 protein/DNA 比值均大于对照组, 并且 RNA/DNA 比值存在显著性差异 ($P<0.05$)。

2.3 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼肠道消化酶活力的影响

如表 3 所示, 17 d 时甘露寡糖组淀粉酶比活力显著高于对照组 ($P<0.05$), 34 d 时两组间淀粉酶比活力无显著性差异 ($P>0.05$); 17 d 时两组间胰蛋白酶比活力无显著性差异 ($P>0.05$), 34 d 时甘露寡糖组胰蛋白酶比活力显著高于对照组 ($P<0.05$)。

2.4 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼非特异性免疫水平的影响

如表 4 所示, 在 34 d 时, 甘露寡糖组的一氧化氮合酶(NOS)活性小于对照组, 但无显著性差异 ($P>0.05$); 甘露寡糖组的过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和溶菌酶(LSZ)活性均显著大于对照组 ($P<0.05$)。

2.5 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼肠道组织结构的影响

各组试验鱼的肠道发育情况如表 5 和图 1 所示。

表 3 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼消化酶比活力的影响
Tab.3 Effects of MOS on the digestive enzyme relative activities of the postlarvae of *C. semilaevis* Günther

指标 Parameters	组别 Treatment	
	甘露寡糖组 MOS group	对照组 Control
17 d 淀粉酶比活力 Amylase relative activity (U/mg protein)	0.63±0.04 ^a	0.56±0.05 ^b
34 d 淀粉酶比活力 Amylase relative activity (U/mg protein)	0.38±0.05	0.37±0.06
17 d 胰蛋白酶比活力 Trypsin relative activity (U/g protein)	84.02±3.18	81.83±12.18
34 d 胰蛋白酶比活力 Trypsin relative activity (U/g protein)	70.54±1.44 ^a	59.97±4.50 ^b

表 4 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼非特异性免疫水平的影响
Tab.4 Effects of MOS on the non-specific immunity level of the postlarvae of *C. semilaevis* Günther

指标 Parameters	组别 Treatment	
	甘露寡糖组 MOS group	对照组 Control
一氧化氮合酶 NOS (U/mg protein)	6.79±0.68	6.91±0.37
超氧化物歧化酶 SOD(U/mg protein)	53.86±1.55 ^a	42.99±3.34 ^b
过氧化氢酶 CAT (U/mg protein)	13.72±3.13 ^a	6.36±1.30 ^b
过氧化物酶 POD (U/mg protein)	13.28±0.86 ^a	9.47±0.08 ^b
溶菌酶 LSZ (U/ml)	853.68±138.20 ^a	334.48±104.90 ^b

表 5 甘露寡糖对半滑舌鲷稚鱼肠道显微结构指标的影响
Tab.5 Effects of MOS on the intestinal microscopic structure parameters of the postlarvae of *C. semilaevis* Günther

指标 Parameters	组别 Treatment	
	甘露寡糖组 MOS group	对照组 Control
微绒毛长度 Length of microvilli (μm)	2.48±0.29 ^a	1.66±0.08 ^b
黏膜厚度 Thickness of mucosa (μm)	25.52±1.55	23.05±0.27
皱襞高度 Highness of fold (μm)	195.52±18.37 ^a	120.14±12.68 ^b

甘露寡糖组的微绒毛长度和皱襞高度显著大于对照组 ($P<0.05$); 黏膜厚度大于对照组, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。

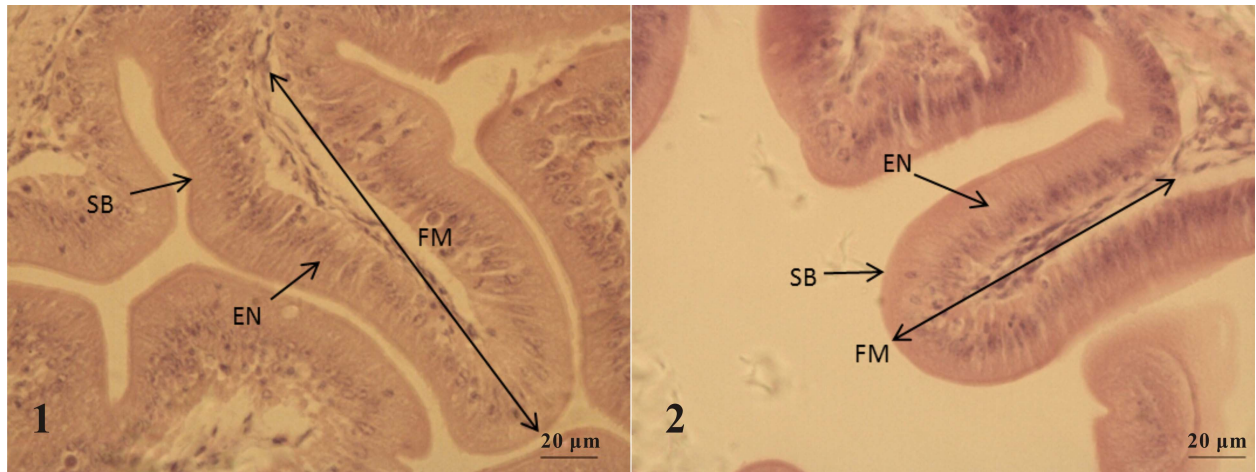


图 1 MOS 对半滑舌鳎稚鱼肠道组织的影响

Fig.1 Effects of MOS on the intestine structure of the postlarvae of *C. semilaevis* Günther

1. MOS 组肠道组织纵切; 2. 对照组肠道组织纵切

1. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish postlarvae in MOS group;
2. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish postlarvae in control group
EN: 肠上皮细胞 Enteroocytes; SB: 纹状缘 Striated Border; FM: 皱襞 fold of mucous membrane

3 讨论

许多研究表明, 甘露寡糖可以促进畜禽幼体动物生长(侯玉洁等, 2012; 李梅等, 2010; White *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2012)。但是, 国内外对于甘露寡糖是否能够促进水产动物生长争议比较大(Dimitroglou *et al.*, 2010; 徐磊等, 2012)。经过 34 d 的试验, 甘露寡糖组和对照组之间的特定生长率之间无显著性差异, 这一结果与在军曹鱼(*Rachycentron canadum* L.) (Salze *et al.*, 2008)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Grisdale-Helland *et al.*, 2008)和白鲷(*Diplodus sargus* L.) (Dimitroglou *et al.*, 2010)仔鱼的研究结果一致, 但与(Torrecillas *et al.*, 2007; Staykov *et al.*, 2007)的研究结果相反。值得一提的是, 在本研究中, 34 d 时, 甘露寡糖组的 RNA/DNA 和 protein/DNA 比值均大于对照组, 并且 RNA/DNA 比值存在显著性差异($P < 0.05$); 甘露寡糖和对照组关于 protein/DNA 差异水平为 $P = 0.054$, 从某种意义上说, 二者之间的水平也存在着一定差异。RNA/DNA 和 protein/DNA 比值是仔稚鱼生长潜能的重要指标, 其比值增大反映了仔稚鱼蛋白合成和生长的能力增强(Clemmesen *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2007; Vinagre *et al.*, 2008), 这表明甘露寡糖可以一定程度上促进幼体动物的生长。甘露寡糖组的体长在 17 d 时显著高于对照组, 34 d 时甘露寡糖组的体长和干重虽然与对照组没有显著性差异但大于对照组, 也说明了这一问题。

关于甘露寡糖对幼体动物存活率是否有影响, 目

前的研究结果争议较大。黄辨非等(2011)对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的研究中, 试验组随着投喂甘露寡糖时间的增长, 死亡率呈明显下降的趋势, 且与对照组之间存在极显著差异。本研究中, 甘露寡糖组和对照组存活率无显著性差异。这与刘爱君等(2009)对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)稚鱼和 Zhang 等(2012)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究结果相同。

目前, 关于甘露寡糖对动物消化酶活性的影响报道极少, 仅在对奥尼罗非鱼的研究中有所报道: 在饲料中添加 0.25%、0.50%和 0.75%的甘露寡糖, 均显著提高了奥尼罗非鱼胃蛋白酶和肠蛋白酶的活性(刘爱君等, 2009)。本研究中, 17 d 时甘露寡糖组淀粉酶比活力显著高于对照组, 34 d 时甘露寡糖组胰蛋白酶比活力显著高于对照组。淀粉酶在动物体内有着重要的生理生化功能(Ma *et al.*, 2001)。胰蛋白酶不仅是水解和消化蛋白质的主要酶, 也是胰腺酶的激活剂(Chen *et al.*, 2003)。淀粉酶和胰蛋白酶是胰腺组织成熟的重要指标(Peulen *et al.*, 2000)。这可能表示, 甘露寡糖对胰腺的发育有一定的积极作用。

SOD、POD、CAT、NOS 和 LSZ 在动物机体非特异免疫防御中发挥着重要作用。SOD 是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的酶, 它广泛存在于各类动物、植物、微生物中, 是一种重要的抗氧化剂, 保护暴露于氧气中的细胞(董亮等, 2013)。在 35 日龄断奶仔猪日粮中添加 0.3%甘露寡糖可极显著提高 SOD 活性(岳文斌等, 2002)。

饲料中添加甘露寡糖也能够显著提高奥尼罗非鱼 SOD 活性(刘爱君等, 2009), 这与本研究的结果一致。POD 是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化的酶, 可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物, 具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。CAT 是催化过氧化氢分解成氧和水的酶, 存在于所有已知的动物的各个组织中, 特别在肝脏中以高浓度存在。CAT 能在一定程度上消除活性氧自由基, 维系膜系统的稳定性, 降低细胞的受伤害程度(夏斌等, 2011)。关于甘露寡糖对动物 CAT 和 POD 活性的影响报道很少。本研究中, 甘露寡糖能够促进半滑舌鲷稚鱼的 CAT 和 POD 活性。王芳等(2007)研究表明, 补充 1–2 g/kg 的 MOS 可提高小鼠肝脏组织 CAT 活性。NOS 能够催化 L-精氨酸生成一氧化氮(NO), 广泛存在于各组织器官中。NO 在多种生物中是一种免疫与调控因子, 还可以调解由感染引起的炎症, 并可以进行免疫抑制(Eisenstein *et al*, 1994), 因此 NOS 的活力能够在一定程度上反映生物的健康状况与抗病力水平(张胜根等, 2011)。目前尚未有关于甘露寡糖对动物 NOS 活性的影响的报道。在本研究中, 两试验组 NOS 差异不显著。NOS 有 3 种同工酶亚型: 神经元型 NOS (Nitronal NOS, nNOS, 也称 I 型)、内皮细胞型 NOS (endothelial NOS, eNOS, m 型)和诱导型 NOS (Inducible NOS, iNOS, II 型), 前两种又称为构成型 NOS (cNOS), 含量较稳定(苏岭等, 2010)。iNOS 主要在炎症和免疫刺激下表达(Chakravorty *et al*, 2003)。这或许是因为机体内没有发生炎症和大的免疫刺激, 所以两试验组间 NOS 活性差异不显著。

LSZ 作为鱼类非特异性免疫的重要组成成分, 在鱼体的防御机制中起着重要作用(姜柯君等, 2013)。LSZ 不仅能水解细菌细胞壁而致细菌死亡, 还可诱导调节其他免疫因子的合成与分泌(郑清梅等, 2006)。本研究发现, 甘露寡糖可以增加半滑舌鲷稚鱼 LSZ 活性。这与 Staykov 等(2007)对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和李洋(2011)¹⁾对建鲤幼鱼(*Cyprinus carpio* Var. Jian)的研究结果一致。甘露寡糖提高动物非特异性免疫可能与增加肠道微绒毛密度和长度、增强肠黏膜免疫功能有关; 也可能是因为甘露寡糖可以通过对病原微生物的识别、黏附和排除作用调节非特异性免疫防御系统, 可结合肠黏膜上皮细胞受体, 竞争性排除病原微生物, 打断病原菌附着–繁殖–致病的途径, 使病原菌排出体外, 保护动物健康(陈小兵等, 2005);

或者是因为甘露寡糖作为一种生长代谢的营养物质, 可促进一些有益菌的生长繁殖, 对一些致病有抑制作用, 从而增强动物机体非特异性免疫。

肠道微绒毛长度、黏膜厚度和皱襞高度是反映肠道发育成熟的重要指标(Uda *et al*, 2003)。研究表明, MOS 可以增加白鲷(*Diplodus sargus* L.) (Dimitroglou *et al*, 2010a)、真鲷(*Sparus aurata*) (Dimitroglou *et al*, 2010b)、欧洲海鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) (Torrecillas *et al*, 2011、2013)的微绒毛长度、密度及异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (徐磊等, 2012)的肠褶皱皱襞高度。本研究中, 甘露寡糖组的微绒毛长度和皱襞高度显著大于对照组; 黏膜厚度也大于对照组, 但无显著性差异。

4 结论

本试验条件下, MOS 强化卤虫无节幼体能够促进半滑舌鲷稚鱼肠道的发育成熟和提高非特异性免疫水平。MOS 作为一种新型绿色饲料添加剂, 具有环保、安全、结构稳定等特点, 还能够促进动物消化道发育和提高非特异性免疫的功能, 是替代抗生素的理想选择。但 MOS 在动物营养上的作用机理和适合的添加量还不十分清楚, 有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 王芳, 乐国伟, 施用晖, 等. 甘露寡糖对小鼠肝脏中自由基的清除及抗氧化酶活性的影响. 营养学报, 2007, 29(5): 466–469
- 李梅, 刘文利, 赵桂英, 等. 不同寡糖对仔猪免疫力和生产性能的影响研究. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15655–15657
- 刘爱君, 冷向军, 李小勤, 等. 甘露寡糖对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)生长、肠道结构和非特异性免疫的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(3): 329–336
- 吕庆凯, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料中添加不同脂肪源对半滑舌鲷亲鱼繁殖性能和仔鱼质量的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 44–52
- 陈小兵, 丁宏标, 乔宇. 甘露寡糖的益生作用、免疫机制与应用技术. 中国畜牧兽医, 2005, 32(8): 6–8
- 苏岭, 刘红柏, 王获, 等. 四种复方中药和黄芪多糖对鲫鱼生长、组织中 NO 含量与 NOS 活性的影响. 水产学杂志, 2010, 23(3): 11–15
- 张胜根, 邢克智, 孙敬锋, 等. 半滑舌鲷组织器官中一氧化氮含量和一氧化氮合酶活性的测定. 安徽农业科学, 2011, 39(12): 7295–7297

1) 李洋. 甘露寡糖对幼建鲤生长性能和非特异性免疫的影响. 四川农业大学博士学位论文, 2011, 5–8

- 岳文斌, 车向荣, 臧建军, 等. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道主要菌群和免疫机能的影响. 山西农业大学学报(自然科学版), 2002, 22(2): 97-101
- 郑清梅, 吴锐全, 叶星. 水生动物溶菌酶的研究进展. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 483-487
- 周景, 邵庆均. 甘露寡糖在水产动物饲料中的应用. 湖南饲料, 2011, (4): 13-15
- 姜柯君, 王际英, 张利民, 等. 饲料中添加小肽对星斑川鲷幼鱼生长性能, 体组成及血清生化指标的影响. 动物营养学报, 2013, 25(1): 222-230
- 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 17-24
- 夏斌, 陈碧鹃, 李传慧, 等. 胜利原油对半滑舌鳎肝脏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 53-59
- 徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 甘露寡糖对异育银鲫生长性能、免疫及 HSP70 基因表达的影响. 水生生物学报, 2012, 36(4): 656-664
- 黄辨非, 徐恩. 两种添加剂对斑点叉尾鲷养殖效果的观察. 科学养鱼, 2011(7): 65-66
- 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 53-58
- Buckley LJ, Bulow FJ. Techniques for the estimation of RNA, DNA, and protein in fish. Iowa State University Press: Ames, IA 1987, 345-354
- Chen JM, Kukor Z, Le Maréchal C, et al. Evolution of tryptophan activation peptides. Mol Biol Evol, 2003, 20(11): 1767-1777
- Clemmesen C. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. Mar Biol, 1994, 118(3): 377-382
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Spring P, et al. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2010, 300(1): 182-188
- Dimitroglou A, Davies SJ, Sweetman J, et al. Dietary supplementation of mannanoligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. Aquaculture Res, 2010, 41(9): 245-251
- Eisenstein TK, Huang D, Meissler JJ, et al. Macrophage nitric oxide mediates immunosuppression in infectious inflammation. Immunobiol, 1994, 191(4): 493-502
- Grisdale-Helland B, Helland SJ, Gatlin III DM. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 2008, 283(1-4): 163-167
- Kuropat C, Mercaldo-Allen R, Caldarone E, et al. Evaluation of RNA concentration as an indicator of growth in young-of-the-year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* and tautog *Tautoga onitis*. Mar Ecol Prog Ser, 2002, 230(1): 265-274
- Liu B, Xu L, Ge X, et al. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carrasius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(6): 1395-1403
- Ma P, Sivaloganathan B, Reddy PK, et al. Ontogeny of α -amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). Mar Biotechnol, 2001, 3(5): 463-469
- Peulen O, Deloyer P, Grandfils C, et al. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. Livest Prod Sci, 2000, 66(2): 109-120
- Uda K, Tsujikawa T, Fujiyama Y, et al. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. J Gastroen Herpetol, 2003, 18(5): 554-559
- Salze G, Mclean E, Schwarz MH, et al. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval coibia. Aquaculture, 2008, 274(1): 148-152
- Staykov Y, Spring P, Denev S, et al. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult Int, 2007, 15(2): 153-161
- Tanaka Y, Gwak WS, Tanaka M, et al. Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fisheries Sci, 2007, 73(2): 378-384
- Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(5): 969-981
- Torrecillas S, Makol A, Benítez-Santana T, et al. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 674-681
- Torrecillas S, Makol A, Betancor MB, et al. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(6): 1485-1495
- Vinagre C, Fonseca V, Maia A, et al. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* Kaup 1858, in the Tagus estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA-DNA ratio. J Appl Ichthyol, 2008, 24(2): 163-169
- White LA, Newman MC, Cromwell GL, et al. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. J Anim Sci, 2002, 80(10): 2619-2628
- Yilmaz E, Genc MA, Genc E. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Isr J Aquacult-bamid, 2007, 59(3): 182-188

Zhang J, Liu YJ, Tian LX, *et al.* Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(4): 1027–1032.

Zhao PY, Jung JH, Kim IH. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. *J Anim Sci*, 2012, 90(3): 833–839

(编辑 冯小花)

Effects of Mannan Oligosaccharide on the Growth, Intestinal Development and Non-Specific Immunity of Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) Postlarvae

YU Chaolei^{1,2}, CHANG Qing^{1①}, Lü Yunyun^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Mannan oligosaccharide (MOS) could promote the growth, intestinal development and non-specific immune index of some marine fishes; however, the role of MOS in the *Cynoglossus semilaevis* Günther postlarvae is unclear. The tongue sole postlarvae with initial length about 1.4 cm were fed *Artemia*, enriched by *Schizochytrium* with the addition (MOS group) or absence of MOS (control group) to study the effects of MOS on the growth, intestinal development and non-specific immunity. The experiments lasted for 34 days, and the samples were collected at day 17 and day 34. The results indicated that MOS significantly enhanced the body length at day 17 but it did not reach a significant effect at day 34. The MOS did not affect the growth and survival rate at both day 17 and day 34. MOS did not have a significant function on the ratios of RNA/DNA and protein/DNA at day 17 but it had a significant effect at day 34. MOS dramatically increased the amylase specific activity at day 17 and enhanced trypsin specific activity at day 34. At the end of the experiment, the superoxide dismutase, catalase, peroxidase and lysozyme activities in the MOS group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$), but the nitric oxide synthase activity was not significantly different ($P > 0.05$) between the two groups. The microvilli length and the fold highness of the MOS group were significantly greater compared with the control group ($P < 0.05$); the mucosal thickness between the two groups were not significantly different ($P > 0.05$). These results indicated that MOS could improve the intestinal development and non-specific immunity of *Cynoglossus semilaevis* Günther postlarvae.

Key words Mannan oligosaccharide; *Cynoglossus semilaevis* Günther; Growth; Intestinal development; Non-specific immunity

① Corresponding author: CHANG Qing, E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

罗非鱼源无乳链球菌溶血素基因 体外表达及其免疫原性*



王 蓓^{1,2,3} 李桂欢^{1,2,3} 王 培^{1,2,3} 汤菊芬^{1,2,3}
鲁义善^{1,2,3} 吴灶和^{2,3,4} 简纪常^{1,2,3}①

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524088;
3. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室 湛江 524088; 4. 仲恺农业工程学院 广州 510225)

摘要 为研究罗非鱼源无乳链球菌溶血素(Hemolysin, Hly)对鱼体的免疫保护作用,根据已获得的无乳链球菌 ZQ0910 全基因组序列设计引物扩增 *hly* 基因,定向克隆于原核表达载体 pET-28a 中,构建原核重组质粒 pET-28a-hly,经 IPTG 诱导表达后,制成亚单位疫苗免疫吉富罗非鱼,并分析疫苗的免疫保护力。结果显示, *hly* 基因产物大小 1335 bp,编码 444 个氨基酸,经测序与 GenBank 报道的链球菌属 Hly 氨基酸序列同源性可达 99%。经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析可见一条 51.7 kD 的特异条带; Western blotting 分析结果说明表达的 Hly 蛋白能与 His-Tag 单抗特异性结合;制备的亚单位疫苗免疫鱼体后第 14 天即可检测到抗体产生,并在第 28 天达到峰值,抗体效价为 1 : 4096,免疫保护率为 70%。由此证实,该亚单位疫苗有望成为预防由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病的基因工程类疫苗。

关键词 无乳链球菌; 溶血素; 原核表达; 免疫原性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0060-08

罗非鱼(*Oreochromis nilotices*), 又称“白色三文鱼”, 是联合国粮农组织推荐的 21 世纪最有发展前景的淡水养殖品种(雷光英等, 2009; 储霞玲等, 2012), 然而随着高密度养殖和环境日益恶化, 病害日趋严重, 造成的损失逐年增加。从 2009 年至今, 罗非鱼链球菌病在我国罗非鱼多个主养区泛滥, 发病率及死亡率高, 并由传统的高温时节发病演变为全年大部分时间均可发生, 部分地区发病率和死亡率可达 90% (林庆强, 2010)。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一种革兰氏阳性链球菌, 是近年来引起我国南方地区罗非鱼链球菌病的主要病原菌之一(Wang *et al.*, 2012)。该菌

的表面蛋白在细菌侵染机体时, 首先粘附于上皮细胞, 并通过与宿主细胞外基质或血浆蛋白相互作用来逃避宿主的免疫监视, 目前已相继报道多种致病蛋白, 包括表面免疫相关蛋白(Surface immunogenic protein, Sip)、cpB 蛋白、Lmb 蛋白等(沈定数等, 2007)。此外, 链球菌的某些分泌性蛋白也可能在致病过程中起到至关重要的作用, 这些分泌性蛋白一旦达到一定的浓度, 就可以发挥作用(Baums *et al.*, 2009)。其中最重要的分泌性蛋白就是溶血素(Hemolysin, Hly), 它作为一种公认的毒力因子, 在动物细菌性疾病的感染发展过程中起着重要作用(Gottschalk *et al.*, 2000、2007), 并且有研究表明, 在猪链球菌不同血清型中产生的溶血

* 国家自然科学基金青年基金(31302226)、国家科技支撑计划项目(2012BAD17B02; 2012BAD17B03)、广东省科技计划农业攻关项目(2012B020308009)和广东省 2012 年鱼病防治专项资金(2130108)共同资助。王 蓓, E-mail: wong19820204@126.com

① 通讯作者: 简纪常, 研究员, E-mail: jianjichang@126.com

收稿日期: 2014-04-30, 收修改稿日期: 2014-06-18

素在理化特征及免疫原性方面均相同,是一种理想的免疫原,可作为基因工程疫苗靶标(王雅等,2012)。

对于细菌性疾病的防治,我国养殖业主要依赖于抗生素的使用,虽然在短期内能起到一定的效果,但并不能从根本上控制疾病的发生,并且会引起耐药性、药物残留及食品安全等问题(解俊等,2013;邓楠楠等,2012)。因此,为了预防罗非鱼链球菌病,人们不断地研究和探索链球菌病疫苗。亚单位疫苗因其安全性好、技术成熟、便于产业化等优点得到了科学家的青睐。本研究扩增得到溶血素基因并进行体外高效表达,制备亚单位疫苗并对其免疫保护率进行初步研究,旨在为今后进一步研制罗非鱼源无乳链球菌亚单位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与实验用鱼

罗非鱼源无乳链球菌强毒株 ZQ0910 由本实验室分离保存(Wang *et al.*, 2012)。大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)与 pET-28a(+)均由本实验室保存。实验用鱼为湛江国联罗非鱼种苗基地提供的健康吉富罗非鱼,体重为(100 \pm 10) g,实验前驯养 7 d,继续饲养 42 d 用于免疫及攻毒实验。

1.2 试剂及仪器

克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶和 Ex *Taq* DNA polymerase 均购自 TaKaRa 公司(日本);小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 和显色底物 DAB 均为 Invitrogen 产品(美国);细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品(中国);HisTrap HP 为 GE 公司产品(美国),Anti-Tilapia (*O. niloticus*) IgM monoclonal antibody 购于英国 Aquatic Diagnostics Ltd 公司。PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取及 *hly* 基因的扩增

按照天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取无乳链球菌基因组 DNA,根据 GenBank 上已登录的 Hly 氨基酸序列(EIM70828.1)设计特异性引物 hlyF/hlyR,分别引入酶切位点 *EcoR* I 与 *Sal* I,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

hlyF: 5'-CGCGGAATTCATGGAAGACCCTGG-CAGTCA-3'

hlyR: 5'-ATCCTCGAGTGACTGCCAGGGTCT-TCCAT-3'

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后切胶回收,然后克隆入 pMD18-T 载体,菌落 PCR 鉴定后将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序并进行生物信息学分析。

1.4 原核重组质粒构建及体外诱导表达

将测序结果正确的阳性质粒扩大培养,抽提质粒后,采用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切并定向插入到经相同内切酶酶切的 pET-28a(+)质粒中,构建重组质粒 pET-28a-hly。将重组质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,筛选阳性菌落并进行 PCR 检测和测序。将测序结果正确的阳性菌落以 1:100 的比例接种于含 Amp⁺(100 μ g/ml)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600nm} 为 0.4-0.6,加异丙基- β -硫代半乳糖 1 mmol/L 进行诱导,5 h 后收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 重组融合蛋白纯化

将重组质粒菌种扩大培养于 100 ml 含 Kana⁺的 LB 培养基中,经 IPTG 诱导表达后,离心收集菌体,采用超声波裂解法对菌体进行裂解,收集蛋白,使用 HisTrapTM HP 柱在不同浓度咪唑洗脱缓冲液的作用下进行纯化,进行 SDS-PAGE 电泳分析。按照 Bradford 蛋白质定量测定试剂盒说明书进行蛋白含量测定。

1.6 Western blot 分析

将诱导表达后的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂牛奶封闭过夜,分别先后加入一抗(鼠抗 His 单克隆抗体,1:2000 稀释)、二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1:500 稀释)、DAB 显色液进行显色拍照。

1.7 疫苗制备及免疫动物

用 0.01 mol/L 的 PBS 调整体外表达的溶血素蛋白浓度为 500 μ g/ml,取 4.5 ml 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂在注射器中充分混合。将暂养 7 d 的吉富罗非鱼分为两组,每组 180 尾鱼分组(每组 3 个重复,每个重复 60 尾鱼)进行腹腔注射 Hly 抗原,每尾注射 0.1 ml,对照组 1 注射相同剂量的无菌 PBS。

1.8 取血与攻毒

免疫后第 14-49 天每 7 d 从各实验组随机取 5 尾实验鱼采血,分离血清,采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗体效价。免疫后第 28 天从上述两组试

验鱼中每组随机抽取 30 尾(包括平行组),每尾腹腔注射 0.1 ml 1×10^8 CFU/ml 的无乳链球菌活菌悬液,另设对照组 2(健康的未注射抗原及 PBS)不注射无乳链球菌活菌悬液,观察 14 d,记录实验鱼的发病与死亡情况,计算 Hly 抗原对吉富罗非鱼的免疫保护率(Relative percentage survival, RPS)和累计存活率。免疫保护率计算参照 Amend(1981),计算公式:

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} \% / \text{对照组死亡率} \%) \times 100$$

$$\text{累计存活率} = (\text{试验末鱼尾数} / \text{试验初鱼尾数}) \times 100$$

1.9 数据处理

实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析(ANOVA),并用均值多重比较分析法(LSD 法)检验组内及组间的差异显著性。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 hly 基因扩增、重组质粒构建及序列鉴定

以罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 株基因组 DNA 为模板,扩增出 hly 基因,PCR 特异条带与预期的 1335 bp

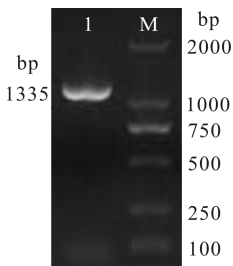


图 1 无乳链球菌 ZQ0910 hly 基因克隆
Fig.1 Cloning of hly gene from *S. agalactiae*

M: DL2000 分子量标准;
1: hly PCR 产物
M: DL2000 marker; 1: PCR product of hly

大小相符(图 1)。构建的重组质粒 pET-28a-hly 经双酶切后鉴定,约在 5.3 kb 和 1.3 kb 处有特异性条带,与理论分子量相符(图 2)。经过酶切鉴定的阳性重组菌 DNA 测序结果经生物信息学分析表明, hly 基因编码 444 个氨基酸(登录号: EIM70828.1)。与 GenBank 上其他链球菌氨基酸序列进行比对结果表明,本研究克隆得到的 hly 基因及其编码的 Hly 蛋白与其他种类链球菌 hly 基因及蛋白序列同源性达到 99%(图 3、图 4)。

2.2 Hly 融合蛋白表达分析与纯化

软件预测 Hly 蛋白的分子量为 49.7 kD, pET28a 的融合表达标签约为 2.0 kD。从图 5 可以看出,将 pET28-Hly 重组质粒转化入表达菌中并在 1 mmol/L IPTG 的诱导下可以特异表达分子量约为 51.7 kD 的融合蛋白,以 3 个对照组[pET28-Hly 未诱导、pET-28a(+)诱导、pET-28a(+)诱导后]相比,pET28-Hly

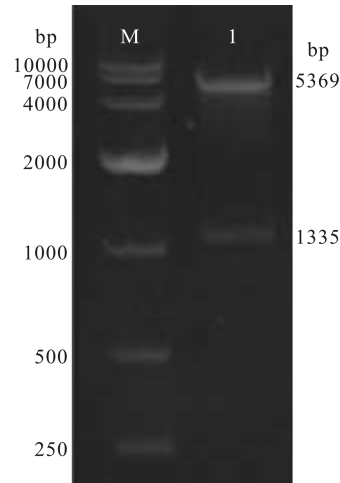


图 2 重组质粒 pET-28a-hly 酶切鉴定

Fig.2 The determination of pET-28a-hly recombinants by enzyme restriction

M: DL10000 bp 分子量标准;
1: pET-28a-hly 经 EcoRI 和 SalI 酶切后结果
M: DL10000 bp marker; 1: The result of pET-28a-hly digested by EcoRI and SalI

在表达菌中得到了成功表达,并且大小与预期相符。

分别将超声离心后的上清液和沉淀用 SDS-PAGE 电泳进行分析,结果表明,Hly 融合蛋白主要存在于沉淀中,上清液中几乎检测不到蛋白,因此该融合蛋白主要以包涵体形式表达(图 5)。

采用 HisTrap™ HP 亲和层析柱纯化重组蛋白,用不同浓度的咪唑缓冲液对纯化融合蛋白进行洗脱。结果表明,浓度为 90 mmol/L 的咪唑纯化效果最佳,融合蛋白浓度约为 720 μg/ml。

2.3 Hly 重组质粒表达产物 Western blotting 分析

以鼠抗 His 单克隆抗体为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,对诱导后重组菌的表达蛋白进行免疫印迹分析,结果显示仅在 51.7 kD 处出现一条特异性条带,表明该蛋白已得到成功表达(图 6)。

2.4 抗体血清效价检测

分别在第 14、21、28、35、42、49 天给免疫后的罗非鱼进行血清采集,用间接 ELISA 法测定抗体效价。从实验结果获知,抗原免疫鱼体后,实验用罗非鱼能产生较强的特异性免疫应答,并且免疫组与对照组之间均存在显著差异($P < 0.01$)。免疫后第 14 天鱼体即可产生抗体,在免疫后第 28 天抗体水平达到峰值,当第 49 天试验结束时,试验组的抗体效价均能达到 1:64 以上(图 7),Hly 的效价最高可达为 1:4096。

2.5 疫苗安全性评价

将 Hly 蛋白亚单位疫苗注射 10 尾健康罗非鱼,7 d 以后全部存活,均无临床症状出现,解剖后无病理变化,证明该种抗原是安全的,可以用于后续实验。

2.6 累计存活率及免疫保护率

实验鱼在无乳链球菌 ZQ0910 活菌攻击后 14 d 内


```

ATGGGTACAGCTGTTCTCTTACCTAAGAGTGATGAGAATAATGATTTGCCCTCCAGCTTTACTGGTTATTTTAAAG
M G Q L F S S P K S D E N N D L P S S F T G Y F K
AAATTTAATACGGGAAGAAAATCAATTTCTCAAGAGATCCTCAATTTGATGAATTAAGGATGAGAAAAGGGAAT
K F N T G R K I I S Q E I L N L I E L R M R K G N
ATTGATTTGACAACTCTGCAATCAGTGATGCATTAAGAAAATCGATAGTAGTGTGCTCAATGTTGCTCACC
I Q L T N S A I S D A L K E I D S S V L N V A V T
GGGAGACGGGATCAGGGAAGTCCAGCTTCAATACCTGAGAGGCATGGGAATGAAGAAGAAGGTCAGCT
G E T G S G K S S F I N T L R G I G N E E E G A A
AAAATGGGTTGGTGGAGTAACCATGGAAAAGACATCCATACAAAACACCCAATATACCCAATGTTGGT
K T G V V E V T M E R H P Y K H P N I P N V V F W
GACCTGCCTGGGATTTGGAAGCACAATTTCCACCAACACTTACCTGGGAAAAATGAAGTTCTATGATACGAT
D L P L L G S T N F P P N T Y L E K M K F Y E Y D
TTCTTATTATTTTCGGCCACACGCTTCAAGAAAATGATATAGACATTTGCCAAAGCAATCAGCATGATGAAG
F F I I I S A T R F K K N D I D I A K A I S M M K
AAGGAATTTACTTCTGAGAACCAAGGTGGACTCTGACATAACAAATGAAGCAGATGGCAAACCTCAAACCTTT
K E F Y F V R T K V D S D I T N E A D G K P Q T F
GACAAAGAAAAGGTCCTGCAGGACATCCGCCTTAACGTGTGAACACCTTTAGGGAGAATGGCATTGCTGAGCCA
D K E K V L Q D I R L N C V N T F R E N G I A E P
CCAATCTTCTGCTCTTAACAAAATGTTTGTCACTATGACTTCCCCGCTCTGATGGACAAGCTGATAAGTGAC
P I F L L S N K N V C H Y D F P V L M D K L I S D
CTCCCTATCTACAAGACACAATTTTATGGTCTCCTTACCCAATATCACAGATTCAGTCATTGAAAAGAAGCGG
L P I Y K R H N F M V S L P N I T D S V I E K K R
CAATTTCTGAAGCAGAGGATTTGGCTGGAAGGATTTGCTGACCTAGTGAATATCATCCCTTCTGACCTTT
Q F L K Q R I W L E G F A A D L V N I I P S T L T F
CTCTTGACAGTATTTGGAGACTCTGAAGAAAAGCATGAAAATTTACCCGCACTGTGTTTGGAGTGGATGAAACA
L L D S D L E T L K K S M K F Y R T V F G V D E T
TCTTTGCAGAGATTAGCTAGGACTGGGAAATAGAGGTGGATCAGGTGGAGGCCATGATAAAATCTCCTGCTGTG
S L Q R L A R D W E I E V D Q V E A M I K S P A V
TTCAAACCTACAGATGAAGAAAACAATACAAGAAAGGCTTTCAAGATATATTCAGGAGTTCTGTTTGGCTAATGGF
F K P T D E E T I Q E R L S R Y I Q E F C L G A N G
TACTTACTTCTAAAAATAGTTTTCTTAAAGAAAATTTTACCTGAAAATATTATTTCTTGCATGTTGACTGAG
Y L L P K N S F L K E I F Y L K Y Y F L D M V T E
GATGCTAAAACCTTCTTAAAGAGATATGTTTAAAGAACTAG
D A K T L L K E I C L R N *

```

图 3 无乳链球菌 *hly* 基因序列及其推测的氨基酸序列

Fig.3 DNA sequence and deduced amino acid sequence of *hly* in *S.agalactiae*

```

S. agalactiae ZQ0910 : MEDPQSQSLILQFVILLILTLNFAFFSASEMALVSLNRSKVEQKAEEGDKRYRLLLDVLEPNPFLSTIQVGTIFISLLQ : 80
S. agalactiae SA20-06 : MEDPQSQSLILQFVILLILTLNFAFFSASEMALVSLNRSKVEQKAEEGDKRYRLLLDVLEPNPFLSTIQVGTIFISLLQ : 80
S. pyogenes M1 : MEDPQSQSLILQFLLLVLLNFAFFSASEMALVSLNRSRVEQKAADGDKKYRLLLDVLEPNPFLSTIQVGTIFISLLS : 80
S. ictaluri 707-05 : MEDPVSQFLIQLFLLLVLLNFAFFSASEMALVSLNRSRVEQKADGDKRYRLLLDVLEPNPFLSTIQVGTIFISLLS : 80

S. agalactiae ZQ0910 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGSIIILIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDRLAIVSAPIIIFLGKIVSPFVWLLS : 160
S. agalactiae SA20-06 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGSIIILIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDRLAIVSAPIIIFLGKIVSPFVWLLS : 160
S. pyogenes M1 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGTIIISLVFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKLAIVSAPIIIFGLRLVSPFVWLLS : 160
S. ictaluri 707-05 : GASLSASLGRVVISGWLGSATACTAGSIIISLIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKLAIVSAPIIIFGLRLVSPFVWLLS : 160

S. agalactiae ZQ0910 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFSLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAQSNIE : 240
S. agalactiae SA20-06 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFSLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAQSNIE : 240
S. pyogenes M1 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGVFSLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDPLENIQ : 240
S. ictaluri 707-05 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFSLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAPFNIQ : 240

S. agalactiae ZQ0910 : GILSQNFSRVPVYDIDKDRVVGVLHTRKRLLEAGFRITGFDITDLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. agalactiae SA20-06 : GILSQNFSRVPVYDIDKDRVVGVLHTRKRLLEAGFRITGFDITDLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. pyogenes M1 : EILKQSF SRIPVYDIDKDKIIGL IHTKRLLES GFROGFDIINMRKMLQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. ictaluri 707-05 : EILKQSF SRIPVYDIDKDKVIGL IHTKRLLEAGFRIDFENINLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320

S. agalactiae ZQ0910 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVLGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGYYLTGVGSIPNQ : 400
S. agalactiae SA20-06 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVLGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGYYLTGVGSIPNQ : 400
S. pyogenes M1 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVVGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGFYLTGIGTIPSQ : 400
S. ictaluri 707-05 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVVGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGFYLTGIGTIPSQ : 400

S. agalactiae ZQ0910 : EEKVAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. agalactiae SA20-06 : EEKVAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. pyogenes M1 : EQKEAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. ictaluri 707-05 : EEKESFACDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444

```

图 4 无乳链球菌 Hly 氨基酸序列与其他物种的 Alignment 分析

Fig.4 Multiple alignments of Hly amino acid sequence of *S.agalactiae* with other species

GenBank accession numbers of the Hly are as follows: *S.agalactiae* ZQ0910: EIM70828.1; *S.agalactiae* SA20-02:YP_006951537.1; *S.pyogenes* M1:NP_268699.1; *S.ictaluri* 707-05:ZP_09125482.1

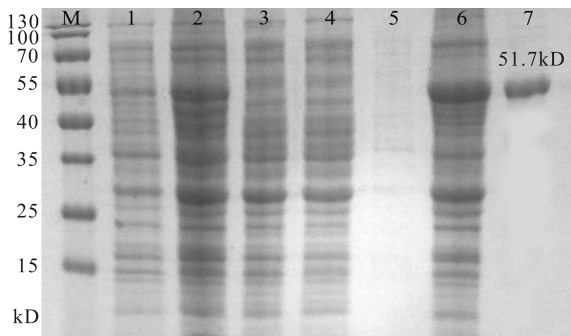


图 5 Hly 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the Hly fusion protein

M: 蛋白分子量标准; 1: pET28-Hly 诱导前; 2: pET28-Hly 诱导后; 3: pET28 空载体诱导前; 4: pET28 空载体诱导后; 5: 超声上清液; 6: 超声沉淀; 7: 纯化后蛋白

M: Protein MW standards; 1: pET28-Hly without IPTG induction; 2: pET28-SIP with IPTG induction; 3: pET28 without IPTG induction; 4: pET28 with IPTG induction; 5: Supernatant protein induced at 37°C; 6: Sedimentation protein induced at 37°C; 7: Purification of Hemolysin fusion protein

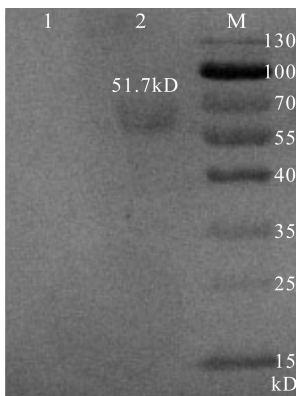


图 6 用 His-Tag 单克隆抗体进行 Western blotting 分析

Fig.6 Western blotting analysis of the purified Hly fusion protein

M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导 pET28-Hly;

2: 纯化后的 Hly 融合蛋白
M: Protein MW standards;
1: Purified Hly fusion protein;
2: pET28-Hly without IPTG induction

组获得了最高的存活率, 为 70%, Hly 组获得了 70% 的免疫保护率(表 1、图 8)。

3 讨论

自 Robinson 等(1966)首次在鱼体上分离到致病

出现了不同程度的发病死亡现象, 死亡时间基本发生于第 4-12 天之间, 未免疫的对照组 1 在 14 d 内全部发病死亡, 未攻毒的健康鱼组(对照组 2)在 14 d 内均未出现死亡现象。发病鱼出现了体表充血、眼球突出、角膜混浊、体色变深等症状, 解剖发现发病鱼具有肝脏淤血、出血、脾脏肿大、肠腔积水等典型的链球菌病的发病症状。其中, 注射 Hly 的试验组存活率较不注射 Hly 的试验组 1 有显著提高。随着攻毒时间的推移, 各试验组鱼死亡数在增加, 至 14 d 时, 对照组 1 实验用鱼全部死亡。计算得出 Hly

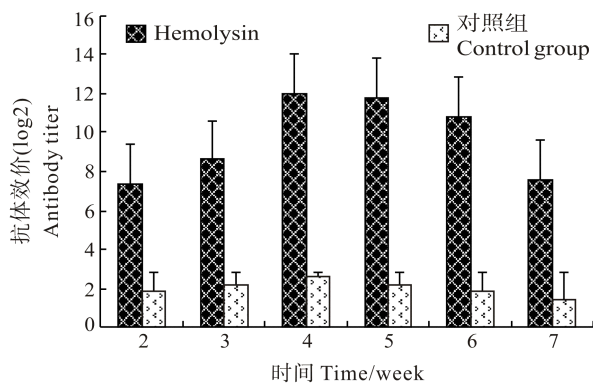


图 7 间接 ELISA 法测定的免疫罗非鱼各时期抗体效价

Fig.7 Antibody titers of vaccinated fish detected by ELISA

表 1 Hemolysin 对免疫吉富罗非鱼后获得的累计存活率

Tab.1 Effects of Hemolysin on the survival rate of *O. niloticus*

注射无乳链球菌后天数 Days after injection with <i>S. agalactiae</i> (d)	累计存活率 Survival rate (%)		
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	Hemolysin 组 Hemolysin group
1	100	100	100
2	67±3.32*	100	100
3	60±1.45	100	100
4	60±1.53*	100	93±1.12**
5	47±2.65	100	93±1.03
6	40±4.56*	100	87±5.74
7	40±2.21	100	87±3.31
8	20±3.39*	100	73±4.56**
9	10±2.87*	100	73±1.53
10	0	100	73±6.73
11	0	100	70±3.54
12	0	100	70±3.12**
13	0	100	70±2.87
14	0	100	70±1.12

注: **表示与对照组 1 相比差异极显著($P<0.01$); *表示与对照组 1 相比差异显著($P<0.05$)。对照组 1 为生理盐水

Note: **: significant difference compared with control group 1 ($P<0.01$); *: significant difference compared with the control group ($P<0.05$). The control group 1 is injected with normal saline

性无乳链球菌至今, 链球菌病在世界范围内的多个地区、多种鱼类品种中成为了重要的感染性病原。罗非鱼作为一种具有良好养殖前景的品种, 近年来也常常受到链球菌病的危害, 造成的经济损失逐年增加(鲁义善, 2012)。因此, 必须加强对罗非鱼链球菌病的预防和控制(储霞玲等, 2010、2012)。消灭和控制传染病的有效途径之一是采用疫苗预防。传统的疫苗是基于全菌体的灭活疫苗或减(弱)毒疫苗, 然而随全

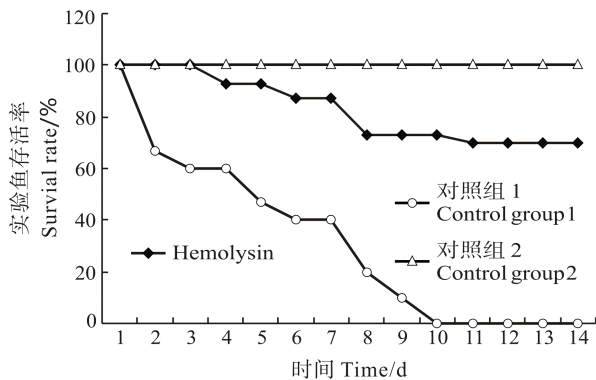


图 8 用无乳链球菌 ZQ0910 攻毒后 Hemolysin 免疫的罗非鱼累计存活率

Fig.8 The survival rate of immunized *O. niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae* ZQ0910

菌疫苗进入机体的非抗原物质不仅会干扰机体对抗原的免疫应答,还会对宿主产生严重的毒副作用,存在安全隐患。随着基因工程技术及基因组序列的测定,亚单位疫苗成为了研究热点,它的优点在于组分清楚、安全性好、便于产业化等(李桂欢等, 2014)。国内外众多学者致力于此类疫苗的研制,黎炯等(2012)将无乳链球菌的表面免疫相关蛋白制备成亚单位疫苗,应用到吉富罗非鱼中,获得了 79% 的保护率。卢志山等(2004)¹⁾研制了变形链球菌毒力因子亚单位疫苗并免疫小鼠,也得到了良好的免疫保护率。可见,采用链球菌属的毒力因子或表面蛋白作为其亚单位疫苗的设计靶点是可行的,这为研制无乳链球菌亚单位疫苗提供了思路。

保护性抗原能刺激宿主机体产生相应的免疫应答,使其具备清除外源物质的能力。细菌表面抗原、胞外蛋白和毒力因子均可作为保护性抗原应用到疫苗研发中(王涛等, 2006; Knaust *et al.*, 2004)。溶血素也被称为细胞溶素,它是一种能使细胞溶解的毒素,是革兰氏阳性细菌和阴性细菌的重要致病因子(Bhakdi *et al.*, 1988、1994),在动物细菌性疾病的感染发展过程中起着重要作用。王海丽等(2011)通过克隆表达猪链球菌溶血素基因证实了其可作为猪链球菌病基因工程疫苗靶标的可能性。此外,张翠娟等(2009)也将体外表达的嗜水气单胞菌溶血素制成的类毒素疫苗免疫小鼠,获得了较高的保护效力。因此认为溶血素可以作为一种理想的疫苗候选分子。本研究在获得罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 株全基因组序列的前提

下,克隆表达了无乳链球菌溶血素蛋白,经免疫印迹实验证明了重组溶血素蛋白具有特异的免疫原性,并在此基础上,制备了亚单位疫苗免疫足量的吉富罗非鱼,在 28 d 的养殖周期内,血清效价最高可达 1:4096,最后的攻毒实验中,获得 70% 的免疫保护率,略低于黎炯等(2012)采用表面免疫相关蛋白制备的亚单位疫苗的保护率,这可能是由于本实验周期较长、鱼体间存在个体差异等因素所造成。

原核蛋白表达系统是研究者最常用的外源蛋白表达系统,外源蛋白在大肠杆菌中有两种表达形式,即可溶性蛋白和不溶性的包涵体(范翠英等, 2012)。可溶性蛋白可以保留蛋白质的天然生物学活性,而包涵体则不具有生物学活性,但是在下游生产中以包涵体形式表达的蛋白质具有相对优越性,例如可以较好地抵御外源蛋白酶对其自身的酶解作用,进行蛋白纯化时不需考虑目的蛋白失活等问题。两种外源蛋白表达形式各具优缺点,对于本研究而言,表达的蛋白是作为抗原免疫动物探讨其免疫原性,对于蛋白的表达形式并无刻意的要求。有研究表明,重组表达蛋白与天然蛋白具有同等的致敏性、交叉反应及免疫原性(杜欣军等, 2009),因此,本研究借助 pET 原核表达系统获得了溶血素蛋白包涵体,采用 HisTrapTM HP 亲和层析柱纯化得到重组目的蛋白,并成功应用到后续实验中,取得良好的实验效果。如何将体外表达的溶血素蛋白进行蛋白复性并应用于动物实验是今后进一步研究的方向。

本研究成功克隆、表达了罗非鱼源无乳链球菌溶血素保护性抗原,构建了该基因的高效表达菌株,并通过动物活体实验证实了溶血素抗原具有良好的免疫原性,可作为由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病的基因工程疫苗的候选靶蛋白,为罗非鱼链球菌病的防治提供了一定的实验依据,使将溶血素基因工程类疫苗应用于田间水产动物成为可能,对该种疾病的防治研究具有参考价值。

参 考 文 献

- 王涛,刘纯杰. 反向疫苗学分析方法及在疫苗开发中应用进展. 微生物免疫学进展, 2006, 34(1): 66-73
王雅,张安定,李冉,等. 猪链球菌 2 型 III 型溶血素的研究. 中国动物传染病学报, 2012, 20(4): 39-44

1) 卢志山. 变形链球菌 SBR 制备及免疫小鼠后机体抗体应答和局部细胞因子表达变化. 山东大学硕士学位论文, 2004, 62-64

- 王海丽, 徐公义, 葛长城, 等. 猪链球菌 2 型溶血素融合蛋白的制备及免疫活性测定. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3604-3605
- 邓楠楠, 王印庚, 张正, 等. 黄芪多糖佐剂对大菱鲆五联疫苗免疫增效作用. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 35-42
- 李桂欢, 王蓓, 鲁义善, 等. 罗非鱼源无乳链球菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与原核表达. 水产科学, 2014, 33(3): 175-180
- 张翠娟, 于宙亮, 田莉琰, 等. 嗜水气单胞菌溶血素基因的克隆表达及其类毒素的免疫原性分析. 生物工程学报, 2009, 25(2): 251-256
- 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 38-43
- 沈定数, 周雪艳. 无乳链球菌表面蛋白的研究进展. 中国微生物杂志, 2007, 19(5): 472-473
- 林庆强. 罗非鱼的链球菌病防治. 科学养鱼, 2010(11): 56
- 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展. 生物技术, 2012, 22(2): 76-80
- 储霞玲, 曹俊明, 万忠, 等. 2009 年广东罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2010(7): 270-272
- 储霞玲, 曹俊明, 白雪娜, 等. 2011 年广东罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2012(8): 12-14
- 鲁义善. 罗非鱼链球菌病五年反思与考校. 海洋与渔业: 水产前沿, 2012(9): 59-60
- 雷光英, 曹俊明, 万忠, 等. 2008 年度广东省罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2009(7): 240-243
- 解俊, 彭程远, 金珊, 等. 灭活鲫鱼诺卡氏菌对乌鲢非特异性免疫指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 71-76
- 黎炯, 叶星, 可小丽, 等. 罗非鱼无乳链球菌 *Sip* 基因的克隆、表达及免疫原性分析. 水生生物学报, 2012, 36(4): 626-633
- Amend DF. Potency testing of fish vaccines. In: International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand, 1981, 49: 447-454
- Baums CG, Valentin-weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. Anim Health Res Rev, 2009, 10(1): 65-83
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. Progress in Allergy. 1988, 40: 1-43
- Bhakdi S, Grimminger F, Suttorp N, et al. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. Med Microbiol Immun, 1994, 183(3): 119-144
- Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol, 2000, 76(3): 259-272
- Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim Health Res Rev, 2007, 8(1): 29-45
- Knaust A, Frosch M. Genome-based vaccines. Int J Med Microbiol, 2004, 294(5): 295-301
- Robinson JA, Meyer FP. Streptococcal fish pathogen. J Bacteriol, 1966, 92(2): 512
- Wang B, Jian JJ, Lu YS, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Bacteriol, 2012, 194(8): 5132-5133

(编辑 冯小花)

Expression and Immunogenicity Analysis of Hemolysin Gene in *Streptococcus agalactiae* Isolated from *Oreochromis niloticus*

WANG Bei^{1,2,3}, LI Guihuan^{1,2,3}, WANG Pei^{1,2,3}, TANG Jufen^{1,2,3}, LU Yishan^{1,2,3},
WU Zaohe^{2,3,4}, JIAN Jichang^{1,2,3}①

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088;
3. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088;
4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

Abstract *Streptococcus* is a genus of spherical gram-positive bacteria that can infect a wide range of hosts. Streptococcal diseases of cultured fish caused by *Streptococcus agalactiae* have been frequently reported in South China, which incurred catastrophic economic losses. Vaccine is one of effective ways to control and eradicate infectious diseases, and so far no effective subunit vaccine for *S. agalactiae* diseases has been developed. To test whether Hemolysin (Hly) is a potential candidate for vaccine development of *Oreochromis niloticus*, we cloned *hly* gene based on bioinformatics analysis and constructed and expressed it. The open reading frame of *hly* gene contains 1335 bp that encodes 444 amino acid residues. Alignment analysis indicated that the Hly protein was highly homologous to Hly proteins from other *Streptococcus*(99%). SDS-PAGE confirmed the expression of Hly (51.7 kD) in *Escherichia coli* BL21(DE3). Then, the recombinant Hly protein was purified by affinity chromatography, which was used for vaccination in Tilapia, *O. niloticus*. Immunogenicity was confirmed by subsequent western blotting. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis demonstrated that Hly produced an observable antibody response in all vaccinated fish, and the maximum antibody titers in the sera reached 1:4096. The RPS value for the Sip vaccine was 70. Tilapia vaccinated with Hly was highly resistant to the infection of the contaminant *S. agalactiae*. These results indicate that Hly is an effective vaccine candidate against *S. agalactiae* for tilapia, *O. niloticus*.

Key words *Streptococcus agalactiae*; Hemolysin; Prokaryotic expression; Immunogenicity

① Corresponding author: JIAN Jichang, E-mail: jianjichang@126.com

盐度对寄主暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)存活影响及其对车轮虫的杀灭作用*



刘金海^{1,2} 张正¹ 王印庚^{1①} 郭正龙³ 武宁宁⁴

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 江苏中洋集团 海安 226600; 4. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266001)

摘要 为防治河鲀车轮虫病, 分别设置 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、25.0、30.0、35.0 和 40.0 共 13 个盐度梯度, 对暗纹东方鲀进行了浸浴实验。结果显示, 盐度为 15 以下, 对暗纹东方鲀的存活没有影响; 盐度为 0、2.5、5.0 时, 4 d 内车轮虫的数量没有减少反而有增加趋势; 盐度 7.5 作用 4 d, 盐度 10.0 作用 3.5 d, 盐度 12.5 作用 3 d, 杀虫率可达 95% 以上; 盐度 15.0 作用 32 h, 盐度 17.5 作用 24 h, 盐度 20.0 作用 10 h, 盐度 25.0 作用 4 h, 盐度 30.0 作用 1.5 h, 盐度 35.0 作用 1 h, 盐度 40.0 作用 0.5 h, 对车轮虫的杀虫率均可达 100%。应用 SPSS 软件, 对杀虫盐度和时间进行拟合曲线方程分析, 其数学模型为对数曲线方程 $y=34.19-5.55\ln x$ 。另外, 车轮虫在暗纹东方鲀体表的复活试验显示, 用提高盐度的方法杀灭暗纹东方鲀体表车轮虫后, 再恢复到正常养殖盐度 5.0 的情况下, 暗纹东方鲀的体表车轮虫病不再复发, 说明盐度 7.5 以上能治疗暗纹东方鲀的车轮虫病。结合提高盐度治疗暗纹东方鲀车轮虫病的生产性试验结果, 建议以盐度为 7.5–15.0 作为治疗暗纹东方鲀体表车轮虫的适宜盐度。

关键词 暗纹东方鲀; 盐度; 车轮虫; 灭杀; 存活

中图分类号 S942 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0068-08

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)隶属鲀形目、鲀科、东方鲀属, 俗称河鲀, 它是一种江海徊游性鱼类, 在繁殖季节需经历盐度的急剧变化, 具有很强的渗透压调节能力, 属广盐性生物, 对盐度耐受性力强(严美姣等, 2005)。河鲀作为一种名贵养殖鱼类, 其肉质鲜美、营养丰富, 备受广大消费者青睐(成庆泰等, 1975; 华元淦等, 1996; 李晓川等, 1998; 赵清良等, 1999), 从其肝脏、性腺中提取的河豚毒素(TTX)是一种很强的神经毒素, 在医学、生理学上是阻滞 Na^+ 通道的重要药品, 临床上小剂量使用可以治疗神经系统疾病和减轻晚期癌痛等(施永海等, 2007), 因此河鲀具有较高的食用和药用价值。近年来各地大力发展河鲀的繁殖和养殖(吴剑峰等, 2003; 施永海等, 2007;

郭正龙等, 2011), 且获得了较高的经济效益。然而, 在河鲀人工养殖过程中, 由于水质的污染、饲养管理不当等原因, 经常会出现车轮虫病, 导致鱼类大批死亡, 给养殖业造成了较大的经济损失。

车轮虫有 280 余种, 种类繁多, 在我国发现 5 属近 80 种车轮虫, 它们属寄生性纤毛虫原生动植物(徐奎栋等, 2000; 蔡飞等, 2011), 主要对养殖鱼类的皮肤、鳃丝等组织产生破坏作用。以往, 防治河鲀车轮虫病的方法是频繁使用硫酸铜与硫酸亚铁合剂或甲醛(李莉萍等, 2011), 但是, 这种治疗不能彻底治愈车轮虫病, 而且可造成厌食或鱼体组织损伤, 有时给更多的敌害生物可乘之机, 病情愈加重。加之车轮虫的耐药性大大提高, 上述药物的药效几乎微乎其微。盐度是影

* 国家科技支撑计划课题“海洋水产病害综合防控技术的集成与示范”(2012BAD17B03)资助。刘金海, E-mail: ljh870228@126.com

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-12-31, 收修改稿日期: 2014-03-11

响水生动物存活、生长的重要环境因子之一(Gilles *et al.*, 2001; Imsland *et al.*, 2008; 董晓亮等, 2013), 关于盐度对鱼类生长的影响已有不少文献报道(Zhang *et al.*, 2010; 李炎璐等, 2013), 盐度变化对车轮虫的杀灭虽有报道(王锐等, 2012), 但缺乏系统的研究。为了进一步研究盐度对淡水车轮虫的灭杀效果, 本研究设定一系列盐度梯度, 通过盐度对车轮虫杀灭及暗纹东方鲀对盐度的耐受性试验, 旨在探索适宜的能够灭杀车轮虫的盐度范围及药浴时间, 为防治暗纹东方鲀车轮虫病提供技术支撑和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验河鲀 试验于2013年1月在江苏某河鲀养殖场进行, 从中选取体长20–25 cm、患车轮虫病的河鲀。试验期间持续充气, 保证溶氧充足, 水温为15℃, pH 7.3–8.3。

1.1.2 试验材料和工具 聚乙烯塑料桶、充氧泵、YSI556多参数水质检测仪(美国)、Nikon E800光学显微镜(日本)等, 市售粗盐用于调节盐度。

1.2 方法

1.2.1 病鱼检查及病原形态学观察 首先对病鱼样品的体表、鳃丝、内脏器官进行目测观察, 分析具有车轮虫病典型症状的河鲀表现观性病理变化。随后, 取病鱼的体表黏液、溃烂组织、鳃丝以及内脏各组织制成水浸片, 置于Nikon E800显微镜下观察车轮虫的形态。

1.2.2 盐度对寄主河鲀的影响及其对车轮虫的杀灭作用 将河鲀随机分成13组, 每组的河鲀体长(20–25 cm)、健康状态无较大差异。该养殖场河鲀养殖水体的盐度约为5–6, 设定0、2.5、5.0(对照)、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0一系列盐度梯度, 用过滤后的自来水和粗盐分别将淡水调节到设定的盐度, 曝气1 d。采用盐度骤变的方法将所有试验鱼从盐度5.0分别转入其他各盐度组中, 每组约25尾。

于0 h、0.25 h、0.5 h、1 h、1.5 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、16 h、24 h、32 h、2 d、3 d、3.5 d、4 d、5 d、6 d、7 d对每组河鲀进行观察, 记录其活动状态、异常生理现象及存活率; 另外, 于第3天从30.0高盐度组选取濒死河鲀, 分别取体积约0.5 cm³的鳃、皮肤、肝、脾、肾、肠等组织, 对其进行组织切片, 显微镜下观察高盐度对河鲀各组织器官的影响。同时, 每

组随机取3尾鱼, 在每尾鱼的体表上刮取面积为4 cm²的体表黏液制成水浸片, 用Nikon E800显微镜在×100倍下观察体表黏液中车轮虫的活力, 选取5个视野, 统计并记录纤毛摆动或可自由运动的车轮虫的数量, 取平均值, 从而判断和比较不同盐度在不同时间阶段对车轮虫的杀灭作用。

试验期间各试验组的水温、pH保持一致, 不投饵、不换水, 保持各盐度组的盐度不变, 若有死亡个体, 及时捞出, 保障水质良好。每次取样刮取的面积基本相同, 均在体表处刮取。取样时河鲀干露时间较少, 保障放回试验桶后不影响它的生存。

1.2.3 车轮虫在河鲀体表的复活 在1.2.2试验进行中, 当盐度组7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0分别浸浴4 d、3.5 d、3 d、32 h、24 h、10 h、4 h、1.5 h、1 h和0.5 h时, 从各盐度组中, 随机取3尾河鲀, 分别放回到盐度为5.0的塑料桶中试验15 d。试验前每组捞取3尾鱼, 每尾鱼刮取面积为4 cm²的体表黏液, 每个盐度组所刮取的体表黏液总面积均为12 cm²(3 cm×4 cm), 制成水浸片, 于×100倍显微镜下, 统计每个盐度组12 cm²体表黏液中车轮虫的总数。试验后, 观察河鲀的健康状态。同样方法观察体表黏液中车轮虫的数量, 以确定车轮虫的复活情况。实验期间, 每天投喂1次, 日投喂量为河鲀体重的5%, 每日换水量为1/2, 并用吸管将河鲀的粪便和残饵吸出, 以保持水质良好。

1.2.4 提高盐度治疗车轮虫病的生产性试验 试验选择在河鲀养殖车间内进行, 选取患车轮虫病严重的4个池子, 每个池子(容积3 m³)盛有河鲀约200尾, 盐度为5.0。试验分两组进行, 一组加粗盐使养殖水盐度从5.0快速提高到15.0。具体操作如下: 称量粗盐31 kg, 把食盐磨碎, 放入200 L的塑料桶内, 加入100 L热水, 充气并搅拌使食盐溶解。把食盐水均匀全池泼洒, 连续浸浴2 d后换水, 使盐度恢复到5.0; 另一组作为对照组, 每个组设1个平行。跟踪观察10 d, 记录鱼的死亡量、摄食和健康活力状况; 同时镜检车轮虫的数量和活力。

1.3 数据处理统计

试验所得数据均以平均值表示, 采用SPSS 19.0软件统计包中的独立样本 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

杀虫率% (Insecticidal rate %) = $(N_0 - N_T) / N_0 \times 100\%$

式中, N_0 、 N_T 分别为试验开始和结束时车轮虫的数量。

设自变量 x 为杀灭车轮虫所需的时间, 另设依变

量 y 为杀灭车轮虫所用的盐度。对于变量 x 和 y ，通过 SPSS 19.0 进行曲线拟合，本研究选取了 6 种曲线，包括直线方程、对数方程、二次方程、三次方程、幂函数曲线模型以及指数模型，求出对应的曲线方程、决定系数 R^2 (也称拟合优度)、回归显著性检验的 F 值以及 F 值的显著水平 P 值，并进行对比，从中找出最佳的拟合函数方程，即以方程的形式表示杀死车轮虫的盐度和相应时间的关系。

2 结果

2.1 流行病学特征及病原形态学观察

河鲢的苗期、养成期和亲鱼培养期均可发生车轮虫病，发病水温为 20–28℃，一年四季均有发生，4–8 月为发病高峰期，该病感染率高、传染快，流行范围遍布整个江苏地区河鲢养殖场，累积死亡率较高。2012 年 12 月，江苏省某养殖场室内工厂化养殖河鲢，越冬期间大面积暴发车轮虫病，个别池子感染率几乎为 100%，死亡率达 10% 以上。该疾病发生过程中常引起细菌性烂鳃和烂尾并发症。

车轮虫感染的河鲢最典型的症状表现为：早期病鱼体表和鳃丝黏液增多，体色暗浊，似蒙着一层“白雾”；病鱼沿池边游动，时而在池壁上摩擦体表；严重者出现体表红肿、溃疡、烂鳍和机械摩擦损伤；解剖严重感染的鱼体，发现腹腔积水，肝脏充血，肠道充血(图 1-a–图 1-d)；后期出现食欲不振、行动呆滞、离群独游、呼吸困难，直至最后死亡。

取体表黏液镜检可见大量的车轮虫，虫体大小约 20–40 μm ，虫体隆起为口面，相对凹入面为反口面，口面有 1 口沟，两面侧各有 1 排纤毛，有大小核各 1 个，反口面环生 1 圈较长的纤毛，齿环和辐线环是反口面最显著的构造，车轮虫以车轮般旋转方式运动(图 1-e)。

2.2 盐度对寄主河鲢存活的影响

观察试验发现，河鲢刚进入试验桶中时，都表现得十分躁动不安，沿着桶壁快速游动，数小时后，除高盐度组外，其他组的河鲢都慢慢开始适应环境；高盐度组表现极度不适应，河鲢惊慌错乱，快速游动，不时窜出水面或撞击试验桶，大口吐水吸气，对高盐度刺激反应强烈。但随着时间的推移，表现出行动迟缓，应激反应逐渐减弱，最后沉底死亡。死亡的河鲢全身性出血和肿胀(图 2-a)。对高盐度组河鲢的内脏器官进行组织病理分析发现，部分鳃小片末端膨大，

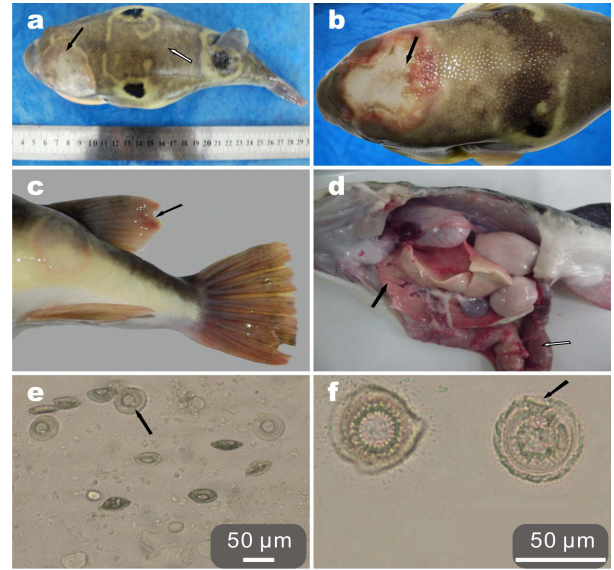


图 1 车轮虫和受感染的河鲢

Fig.1 Parasite *Trichodina* sp. and the infected *T. obscurus*

a: 车轮虫感染的河鲢，病灶区呈红肿、溃疡状态(←)，大面积体表呈“白雾”状(⇐)；b: 严重感染车轮虫的河鲢，出现红肿、溃疡(←)；c: 车轮虫感染的河鲢出现烂鳍(←)；d: 车轮虫感染的河鲢腹腔积水、肝脏充血(←)、肠道充血(⇐)；e: 盐度作用前，体表黏液中大量的车轮虫(←)；f: 盐度作用后，车轮虫的结构不完整，边缘毛糙、模糊，丧失活动力，车轮虫解体死亡(←)

a: The diseased *T. obscurus*, serious lesions area showed swelling and ulceration (←), Large area of body surface appeared white mist condition (⇐); b: The serious effected *T. obscurus*, appeared swelling and ulceration on body surface (←); c: The effected *T. obscurus* showed rot fin (←); d: The effected *T. obscurus* with abdominal effusion, liver congestion (←), intestinal hyperemia (⇐); e: Numerous *Trichodina* in skin mucosa before high salinity exposure (←); f: After high salinity exposure, the structure of *Trichodina* was incomplete, its edge was coarse and fuzzy, lost mobility, finally *Trichodina* was integrated and died (←)

发生融合的现象；肝组织间有充血现象；脾脏铁血黄素增多沉淀；肾小管上皮细胞凝固性坏死，肾小球崩解、坏死；心脏无明显的异常；肠黏膜上皮细胞脱落，微绒毛结构不整齐，缺失甚至消失(图 2-b–图 2-g)。

盐度对河鲢存活的影响见图 3。试验结果表明，盐度为 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 试验组中，7 d 后河鲢活力依然很好，盐度 12.5 组的存活率最低，为 70%，其他组存活率均达 80% 以上；盐度为 15.0 以上的试验组中，7 d 后河鲢存活率很低；其中盐度为 15.0、17.5 和 20.0 组，2 d 时河鲢的存活率分别为 100%、90% 和 80%，7 d 时存活率分别为 50%、45% 和 40%，并且存活的河鲢活力均很弱；而在 25.0、30.0、35.0、

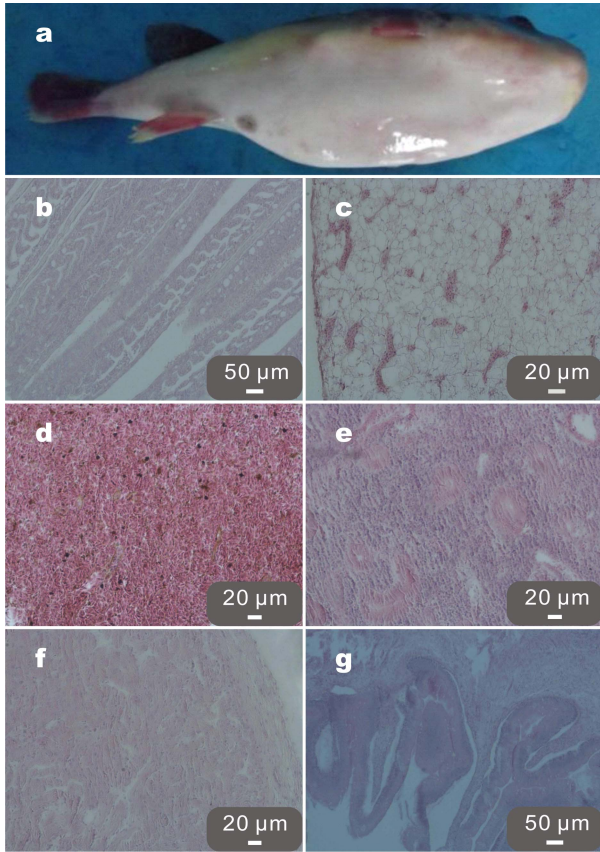


图 2 高盐度作用后的河鲀及内脏器官

Fig.2 Diseased *T. obscurus* and its organs after high salinity exposure

a: 河鲀; b: 鳃; c: 肝脏; d: 脾脏; e: 肾脏;
f: 心脏; g: 肠道
a: Diseased *T. obscurus*; b: Gill; c: Liver; d: Spleen;
e: Kidney; f: Heart; g: Intestine

40.0 盐度组中, 河鲀全部死亡。其中, 在盐度为 35.0 组中, 河鲀 24 h 内全部死亡, 而盐度为 40.0 中, 河鲀 12 h 内就全部死亡, 说明河鲀对盐度的应激反应时间会因为盐度增加而缩短。

2.3 不同盐度对车轮虫的杀灭作用

试验结果显示, 盐度为 0、2.5、5.0 时, 河鲀体表车轮虫的数量没有减少, 反而有增加的趋势, 而且寄生虫活力依然很好, 说明盐度为 0、2.5、5.0 均没有杀虫作用。而盐度为 7.5 及以上的 10 个盐度组对车轮虫均有灭杀作用, 致使车轮虫解体、死亡(图 1-f)。其中盐度 7.5 浸浴 4 d、盐度 10.0 浸浴 3.5 d、盐度 12.5 浸浴 3 d 时的杀虫率均可达 95% 以上; 盐度 15.0 浸浴 32 h, 盐度 17.5 浸浴 24 h, 盐度 20.0 浸浴 10 h, 盐度 25.0 浸浴 4 h, 盐度 30.0 浸浴 1.5 h, 盐度 35.0 浸浴 1 h, 盐度 40.0 浸浴 0.5 h, 其杀虫率均可达到

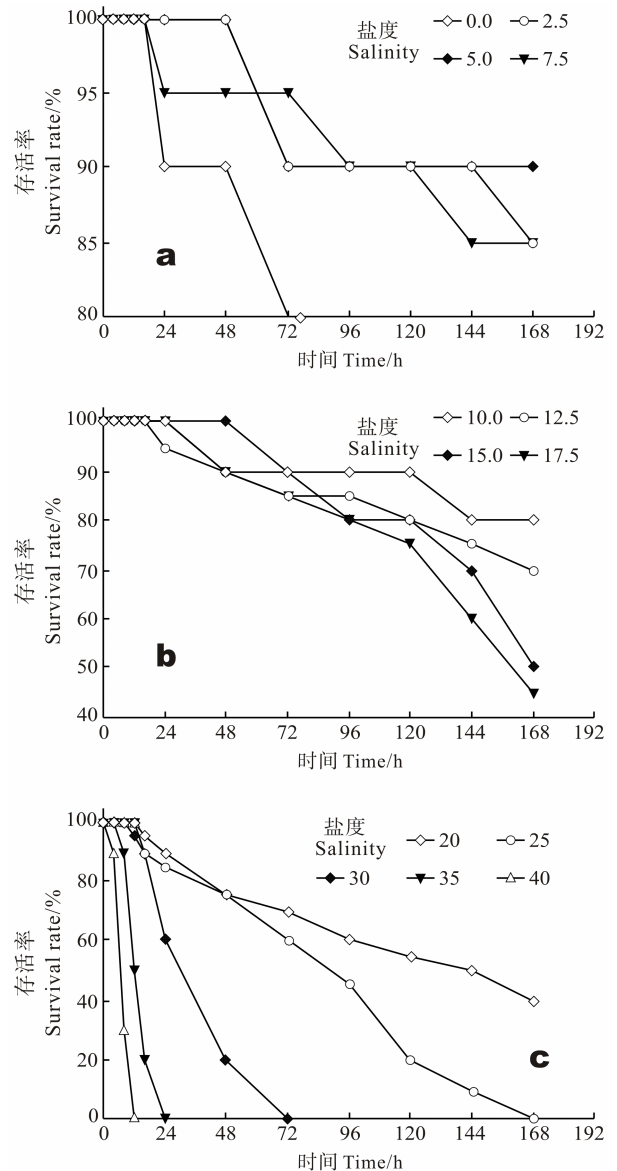


图 3 不同盐度作用下河鲀的存活率

Fig.3 The survival rate of *T. obscurus* under different salinity

100% (表 1、图 4)。

表 2 为各拟合曲线模型的方程式及其参数。 R^2 越大, 表明曲线方程与观察值的拟合回归程度越好。回归的方差分析 F 值越大, F 值的显著水平 P 值越小, 表明曲线拟合的估计值越逼近观察值, 曲线回归的关系越好。在表 2 中, 对数曲线方程的 R^2 达 0.982, F 值为 432.279, P 值为 0 ($P < 0.01$ 为极显著水平标准), 故对数曲线具有极显著相关性。这说明对数曲线对观察数据的拟合回归具有极好的拟合性, 拟合函数方程为 $y = 34.19 - 5.55 \ln x$, 即以方程的形式表示杀死车轮虫的盐度和相应时间的关系。

表1 盐度对车轮虫的杀灭作用

Tab.1 Killing effects of salinity on *Trichodina* sp.

时间 Time	不同盐度下河鲀体表车轮虫的数量变化(个/光镜×100倍视野) Amount of <i>Trichodina</i> on the body surface of <i>T. obscurus</i> at different salinity (ind./×100 times)												
	0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0
0 h	13.8	17.2	14.8	15.2	15.0	14.8	13.2	18.0	21.0	17.2	12.0	14.6	16.2
0.25 h	13.8	17.2	14.8	15.2	15.0	14.8	13.2	18.0	22.0	15.0	10.0	3.4	1.2
0.5 h	13.8	17.2	14.8	15.2	15.0	14.8	13.2	18.0	21.2	11.4	7.2	1.6	0
1 h	13.8	17.2	14.8	15.2	15.0	14.8	13.2	18.0	19.0	7.6	1.6	0	—
1.5 h	13.8	17.2	14.8	15.2	15.0	14.8	13.2	18.0	16.0	3.4	0	—	—
4 h	14.2	17.4	15.2	15.2	15.2	15.2	12.8	15.8	11.6	0	—	—	—
6 h	14.2	17.4	15.2	15.2	15.2	14.8	12.2	14.6	8.0	—	—	—	—
8 h	14.0	17.4	15.0	15.2	14.8	13.6	11.2	13.0	4.2	—	—	—	—
10 h	14.0	17.4	15.0	15.2	14.8	12.8	10.0	11.0	0	—	—	—	—
12 h	13.4	17.8	15.4	15.2	14.4	13.0	9.0	8.0	—	—	—	—	—
16 h	13.4	18.2	15.4	15.2	14.2	12.6	7.0	3.4	—	—	—	—	—
24 h	14.6	18.4	15.8	14.6	14.0	11.2	2.0	0	—	—	—	—	—
32 h	14.8	18.4	16.0	14.2	13.0	9.0	0	—	—	—	—	—	—
2 d	16.0	18.8	16.4	12.6	10.0	6.0	—	—	—	—	—	—	—
3 d	16.2	19.0	17.0	8.2	5.0	0.8	—	—	—	—	—	—	—
3.5 d	16.6	20.0	17.2	5.2	0.6	—	—	—	—	—	—	—	—
4 d	17.4	20.2	18.0	0.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
杀虫率 Insecticidal rate (%)				95	96	95	100	100	100	100	100	100	100

注: —表示没有车轮虫 Note: —. no *Trichodina* sp.

表2 各拟合曲线拟合参数

Tab.2 The parameters of different fitting curve

拟合模型 Fitting model	方程 Equation	R^2	F	P
直线 Linear	$y = 29.357 - 0.249x$	0.728	21.406	0.002
对数曲线 Logarithmic	$y = 34.190 - 5.55 \ln x$	0.982	432.279	0
二次曲线 Quadratic	$y = 32.411 - 0.687x + 0.05 x^2$	0.843	18.724	0.002
三次曲线 Cubic	$y = 34.342 - 1.257x + 0.023x^2 - 0.00013x^3$	0.911	20.449	0.001
幂函数曲线 Power	$y = 35.323x^{-0.273}$	0.942	129.518	0
指数曲线 Exponential	$y = 29.245e^{-0.014x}$	0.881	59.171	0

表3 试验前后河鲀体表车轮虫的数量

Tab.3 The number of *Trichodina* on the body surface of *T. obscurus* before and after test

时间 Time	不同盐度组中车轮虫的总数(个/12 cm ² 的体表黏液) Amount of <i>Trichodina</i> on the body surface of <i>T. obscurus</i> at different salinity (ind./12 cm ² skin mucosa)											
	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0	平均值 Mean	
试验前 Before test(0 d)	7	5	4	2	2	1	3	3	1	2	3	
试验后 After test(15 d)	1	3	1	2	0	1	2	1	0	1	1.2	

表4 试验前后对车轮虫的数量进行t检验

Tab.4 t -test of the amount of *Trichodina* performed before and after test

时间 Time	方差相等的 Levene 检验 Levene's test for equality of variance		均值相等的 t 检验 T-test for equality of means		
	F	P	t	P .双侧 P .2-tail	
试验前后 Before and after test	假设方差相等 Equal variances assumed	3.034	0.099	2.714	0.014
	假设方差不相等 Equal variances not assumed			2.714	0.018

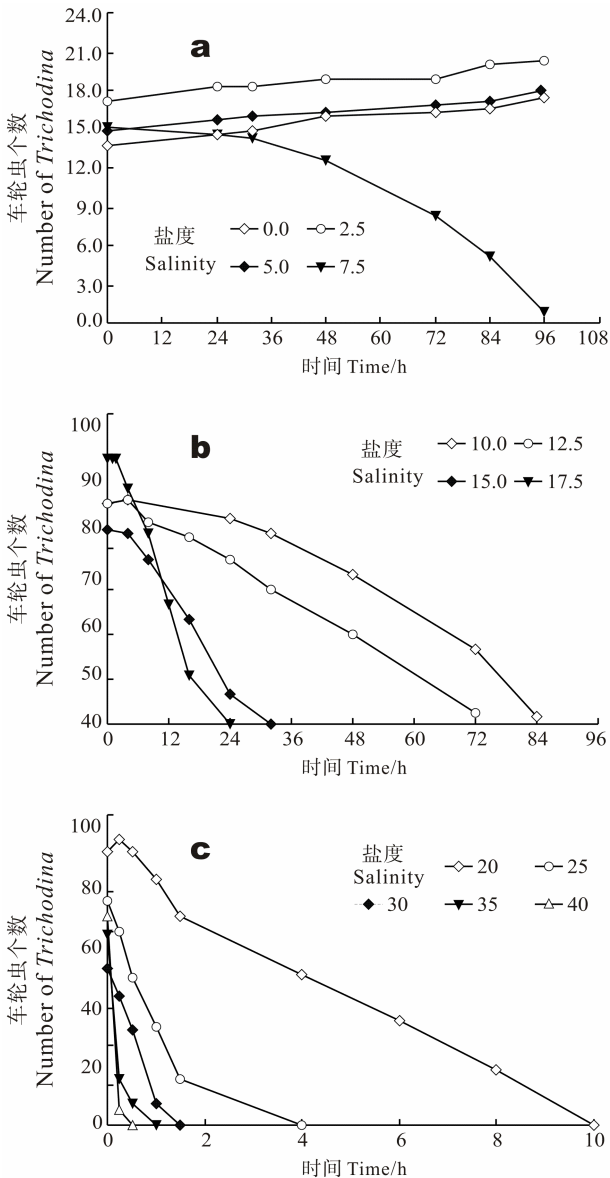


图 4 不同盐度下河鲀体表车轮虫的数量变化(个/光镜 ×100 倍视野)

Fig.4 The number of *Trichodina* sp. on the body surface of *T. obscurus* under different salinity

a: 盐度在 20 以下 ; b: 盐度在 20 以上
a: Salinities below 20; b: Salinities above 20

2.4 车轮虫在河鲀体表的复活

由 1.2.2 试验得知, 盐度大于 7.5 时, 河鲀体表黏液中的车轮虫基本被杀死。分别从盐度为 7.5 以上的 10 个盐度组中, 随机取 3 尾河鲀, 经盐度 5.0 试验 15 d 后观察发现, 河鲀体表、鳃丝的黏液减少, 由车轮虫感染引起的红肿、溃疡、烂鳍现象逐步好转, 体色恢复正常, 呈灰褐色; 摄食正常, 游动活泼, 活力好。盐度 7.5 以上的 10 个盐度组镜检面积为 12 cm² (3 cm×4 cm) 的体表黏液, 试验前, 车轮虫的平均个数

为 3.0 个; 试验 15 d 后, 车轮虫的平均个数为 1.2 个, ×100 倍显微镜下几乎找不到车轮虫, 相比试验前有所降低(表 3)。

由表 4 可知, Levene 方差齐性检验, $F=3.034$, $P=0.099(P > 0.05)$, 可以认为试验前后河鲀体表车轮虫数量的方差相等。进行 t 检验, $t=2.714$, $P=0.014$, 可以认为, 在盐度为 5.0 中试验 15 d 后, 车轮虫的数量会逐渐变少($P < 0.05$), 说明用提高盐度的方法杀灭车轮虫后, 在盐度恢复到正常养殖盐度情况下, 河鲀体表车轮虫不再复活生长。

2.5 提高盐度治疗车轮虫病的生产性试验

经观察发现, 用盐度 15.0 作用的两个试验池中, 2 d 内河鲀死亡 3 尾, 第 3-10 天未出现死亡; 患病河鲀恢复摄食, 游泳活泼, 活力良好。取河鲀体表黏液以及鳃丝镜检, 几乎观察不到车轮虫。两个对照组池中, 2 d 内死亡 9 尾河鲀, 其后每天都有 3-6 尾河鲀死亡; 河鲀行动呆滞, 离群独游, 呼吸困难。取河鲀体表黏液以及鳃丝镜检, 发现大量车轮虫。盐度 15.0 浸浴 2 d, 对杀除河鲀体表和鳃丝的车轮虫效果明显。

3 讨论

盐度是影响水生动物存活、生长的重要环境因子之一, 国内外已研究了盐度对很多水产动物生理方面的影响(Patrick *et al*, 2007; 尹飞等, 2010; Biswaranjan *et al*, 2009)。从盐度对河鲀的存活影响试验可以看出, 河鲀抵御盐度的能力较强, 盐度为 15.0 以下, 河鲀能长时间存活。其中, 盐度为 0-10.0 是河鲀适宜生存的盐度范围; 盐度高于 15.0, 对河鲀的存活显现不利影响。在 15.0 盐度组中, 2 d 时河鲀的存活率为 100%, 7 d 时存活率为 50%; 在 25.0、30.0、35.0、40.0 盐度组中, 7 d 内河鲀全部死亡, 说明盐度对河鲀的影响作用表现为累加效应, 这种影响会随着时间的延长而增加, 并引起死亡。

不同盐度对车轮虫的杀灭作用可以看出, 盐度在 0 和 5.0 时, 车轮虫的数量没有减少, 反而有增加的趋势, 说明盐度 0-5.0 是车轮虫的适宜盐度范围。陈毕生(2003)指出, 盐度 10-30 药浴淡水鱼 15-20 min, 或盐度 30-100 药浴河蟹 15-20 min 可以防治车轮虫病。从试验得到, 盐度高于 7.5 都具有杀灭车轮虫的作用, 并且杀灭效果显著, 杀虫率可达 95% 以上; 同时发现, 盐度对车轮虫的杀灭效果是随着杀灭时间延长而加强的, 试验所得结果和陈毕生(2003)报道的相似, 只是杀灭车轮虫所需要的时间略有不同, 这可能是因为杀灭车轮虫的时间依水温高低、车轮虫种类不

同而定。试验可知,随着盐度的增加,杀虫所需时间越短。通过 SPSS 19.0 软件对杀虫盐度和杀虫所需时间进行分析,即形成回归方程 $y = 34.19 - 5.55 \ln x$, 式中, x 为灭杀车轮虫所需的时间, y 为灭杀车轮虫所用的盐度。根据回归方程,可以通过一个已知变量,求出另一个未知变量,有助于探索适宜的能够杀灭车轮虫的盐度范围及药浴时间,为今后使用提高盐度的办法来防治河鲢车轮虫病提供了理论依据。

另外,在养殖生产中用盐度杀除车轮虫时,应根据养殖条件注意杀虫盐度与杀虫时间的选择。因为盐度长时间高于 15.0 可降低河鲢的存活力。因此,使用盐度为 40.0 杀虫时,建议时间不超过 0.5 h,盐度为 35.0 时浸浴不超过 1 h,盐度 30.0 时浸浴不超过 3 h,盐度 25.0 时浸浴不超过 6 h,盐度 20.0 时浸浴 12 h,盐度 15.0 时浸浴 2 d。盐度为 7.5–12.5,可以长时间浸浴杀车轮虫,且对河鲢的存活率没有影响。

由盐度对河鲢的存活影响试验可知,盐度 15.0 浸浴 2 d 内时河鲢的存活率可达 100%,证明盐度 15.0 浸浴 2 d 对河鲢是安全的;从生产性治疗试验得知,盐度 15.0 能有效杀除河鲢体表和鳃丝的车轮虫,可有效治疗河鲢的车轮虫病;结合车轮虫在河鲢体表的复活试验可知,用提高盐度的方法杀灭河鲢体表车轮虫后,在盐度恢复到正常养殖盐度情况下,河鲢体表车轮虫不再复活生长,说明 7.5 以上盐度能治疗河鲢车轮虫病。综上所述,建议以盐度 7.5–15 作为治疗河鲢体表车轮虫的适宜盐度。

4 结 语

本研究通过在水体中加入粗盐的方式进行车轮虫的治疗,属于化学治疗方法,但又不同于常用的消毒剂,无毒无害、成本低、效果好,便于推广使用。另外,车轮虫种类繁多,约有 280 余种,它们对盐度和药物的敏感程度不同。本次发病案例中,对暗纹东方鲢皮肤上的车轮虫还没有进行鉴定分类。今后,尚需从形态学、分子生物学等方面入手,对寄生暗纹东方鲢的所有车轮虫进行调查研究,进行种属鉴定与分类,为全面了解暗纹东方鲢车轮虫病及其疾病防治提供技术支撑。

参 考 文 献

王锐,黄爱华. 团头鲂车轮虫病防治方法及误区. 科学养鱼, 2012(10): 58

- 尹飞,彭士明,孙鹏,等. 低盐胁迫对银鲳幼鱼肠道消化酶活力的影响. 海洋渔业, 2010, 32(2): 160-165
- 成庆泰,王存信,田明诚,等. 中国东方鲈属鱼类分类研究. 动物学报, 1975, 21(4): 359-378
- 华元渝,陈亚芬,胡亚丽,等. 暗纹东方鲈生殖期两性判别的. 水产学报, 1996, 20(3): 209-214
- 严美姣,李钟杰,熊邦喜. 不同盐度预处理后 I 龄暗纹东方鲈的摄食、生长和饲料利用. 水生生物学报, 2005, 29(2): 142-145
- 李炎璐,王清印,陈超,等. 盐度对云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育和仔鱼活力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 17-22
- 李莉萍,黄娟,林勇. 早春罗非鱼苗暴发车轮虫病、三代虫病的防治. 中国水产, 2011, (1): 62
- 李晓川,林美娇. 河豚鱼及其加工利用. 北京: 中国农业出版社, 1998, 23-29
- 吴剑峰,华元渝,邹宏海. 家化暗纹东方鲈全人工繁殖. 动物学杂志, 2003, 38(1): 59-62
- 陈毕生. 水产动物常见病害防治方法与用药手册. 广州: 广东科技出版社, 2003, 42-43
- 赵清良,赵强,殷宁,等. 养殖三龄暗纹东方性腺发育及其毒性. 南京师大学报, 1999, 22(4): 89-93
- 施永海,张根玉,朱雅珠,等. 菊黄东方鲈河口区海水全人工繁育技术研究. 水产科技情报, 2007, 34(3): 99-102
- 徐奎栋,宋微波. 车轮虫属(原生动物,纤毛门)种类鉴定的方法学. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2000, 30(3): 397-405
- 郭正龙,杨小玉,丁伟,等. 暗纹东方鲈高效健康养殖模式. 渔业现代化, 2011, 38(2): 46-49
- 董晓亮,李成林,赵斌,等. 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活性及抗菌活力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 82-87
- 蔡飞,潘连德. 养殖松江鲈鱼车轮虫病的病原种类鉴定. 江苏农业科学, 2011(1): 264-268
- Biswaranjan P, Chainy GBN. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. Comp Biochem Physiol, 2009, 151(1): 142-151
- Gilles B, Patreck PH. How should salinity influence fish growth. Comp Biochem Physiol, 2001, 130(4): 411-423
- Imsland AK, Gustavsson A, Gunnarsson S. Effects of reduced salinities on growth, feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture, 2008, 274(2-4): 254-259
- Patrick S, Sawsan K, Antoine C, et al. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na^+ - K^+ -ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 348(1-2): 183-190
- Zhang GY, Shi YH, Zhu YZ, et al. Effects of salinity on embryos and larvae of tawny puffer *Takifugu flavidus*. Aquaculture, 2010, 302(1-2): 71-75

(编辑 冯小花)

The Effects of Salinity on the Survival of *Takifugu obscurus* and Annihilation of Its Parasite, *Trichodina* sp.

LIU Jinhai^{1,2}, ZHANG Zheng¹, WANG Yingeng^{1①}, GUO Zhenglong³, WU Ningning⁴

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Jiangsu Zhongyang Group Limited Company, Hai'an 226600; 4. Qingdao Fishery Technology Expansion Station, Qingdao 266001)

Abstract Trichodiniasis is a common fish disease and has recently become a serious issue in fugu fish culture in China. In this study we investigated the effects of salinity on the survival of fugu, *Takifugu obscurus*, and annihilation of the parasites, *Trichodina* sp., on the fish body surface. We set up 13 salinity gradient groups (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, and 40.0) for the experiment. The results showed that *T. obscurus* could survive safely under salinity 15.0. At low salinity (0, 2.5 or 5.0) *Trichodina* on the body surface was not reduced, and tended to increase in 4 days. However, more than 95% of *Trichodina* could be killed at the salinity 7.5 for 4 days, 10.0 for 3.5 days, or 12.5 for 3 days. The parasites could be completely killed if treated at salinity 15.0 for 32 h, 17.5 for 24 h, 20.0 for 10 h, 25.0 for 4 h, 30.0 for 1.5 h, 35.0 for 1 h, or 40.0 for 0.5 h. A fitting curve equation of salinity and the killing time for *Trichodina* was established using the software SPSS, and the logarithmic curve equation was $y = 34.19 - 5.55 \ln x$. Moreover, according to the resurgence test of *Trichodina* sp. on fish body surface, Trichodiniasis in *T. obscurus* did not reoccur when the salinity returned back to 5.0 during farming if *Trichodina* sp. were entirely killed by the raised salinity. Our results suggested that trichodiniasis in *T. obscurus* could be cured if salinity was maintained higher than 7.5. Salinity between 7.5 and 15.0 could be proper for the treatment of the trichodiniasis in *T. obscurus*. Our study should provide insights and technical supports for clinical treatment of trichodiniasis in fugu farming.

Key words *Takifugu obscurus*; Salinity; *Trichodina*; Kill; Survival

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性*

葛红星^{1,2} 李健^{1①} 陈萍¹ 梁忠秀^{1,2} 任海^{1,2} 李东利^{1,2}

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

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为探讨养殖水体中总氨氮胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)“急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome, AHPNS)”发生的影响,设置了1个对照组和4个不同质量浓度氨氮实验组:2.5、5.0、7.5、10.0 mg/L实验组,胁迫20 d后腹肌注射副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)进行感染。凡纳滨对虾感染后6~24 h,除对照组外,各实验组均出现死亡高峰。24 h后,5.0、7.5和10 mg/L实验组对虾累积死亡率均高于2.5 mg/L组,且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高,48 h后各实验组对虾不再死亡,其累计死亡率分别为0、8%、12%、20%和36%。PO活性呈现先升高再降低的趋势,对照组、2.5和5.0 mg/L实验组PO活性差异性不显著($P>0.05$),7.5和10 mg/L实验组除12 h外均显著低于对照组($P<0.05$)。SOD活性呈现先升高后下降的趋势,7.5和10 mg/L实验组SOD活性在感染后除24 h外均显著高于对照组($P<0.05$),而2.5 mg/L实验组与对照组差异性不显著($P>0.05$)。对照组和2.5 mg/L实验组对虾LSZ活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5和10 mg/L实验组对虾LSZ活性在3 h、6 h、24 h、48 h时间点显著低于对照组($P<0.05$)。感染6 h后各实验组对虾肝胰腺中LvLT mRNA表达量开始上升,24 h后开始下调,至72 h恢复至原水平。实验结果表明,氨氮胁迫能降低凡纳滨对虾的非特异性免疫酶活性,影响对虾肝胰腺中LvLT mRNA对病原刺激的应答反应,增加对副溶血弧菌的易感性,为预防凡纳滨对虾AHPNS的暴发,养殖水体中总氨氮浓度应控制在1.96 mg/L以下。

关键词 凡纳滨对虾;急性肝胰腺坏死综合征;总氨氮;副溶血弧菌

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0076-07

自2009年以来,凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome, AHPNS)或早期死亡综合症(Early Mortality Syndrome, EMS)在亚洲地区暴发并蔓延,造成养殖对虾大量死亡(Flegel, 2012)。Lightner等(2012)对AHPNS的症状(昏睡、厌食、生长缓慢、颜色苍白、软壳等)进行了精确的描述并认为该病主要以肝胰腺坏死为主要病理特征。有专家认为,AHPNS的暴发可能是因为病毒感染引起对虾免疫系统损坏,导致急性肝胰腺坏死,从

而发生细菌继发性感染(黄捷, 2012)¹⁾。2013年联合国粮农组织报道副溶血弧菌是其致病菌(FAO, 2013)。副溶血弧菌是一种条件致病菌,当养殖对虾机体免疫力下降时,副溶血弧菌可能侵入机体大量繁殖,引起各类病害的暴发。氨氮是对虾养殖池中最主要的污染物之一,主要来源于对虾的排泄(对虾体内含氮废物主要以氨氮的形式从鳃组织排出),残饵、粪便等含氮有机物的氨化作用。氨氮胁迫可以降低对虾抗病力,导致病害的发生(管越强, 2003¹⁾;刘晓华, 2007)。

* 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)和公益性行业(农业)科研专项(201103034)共同资助。葛红星, E-mail: hongxinggelu@163.com

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

收稿日期: 2013-12-08, 收修改稿日期: 2014-02-24

1) 黄捷. Research progress on MS/AHPNS of shrimp. 第八届世界华人虾蟹养殖学术研讨会, 宁波, 2012

氨氮胁迫下中国对虾对副溶血弧菌的易感性提高(孙舰军等, 1999), 罗氏沼虾感染弧菌后累计死亡率与水体氨氮浓度呈正相关(Chang *et al*, 2002)。有学者运用副溶血弧菌噬菌体防治副溶血弧菌病, 发现较高浓度氨氮胁迫下效果较差(邱德全等, 2008)。组织病理学和超微病理研究显示, 弧菌常导致对虾淋巴器官、鳃、心脏、肝胰腺及其他组织的坏死和炎症, 尤以淋巴器官和肝胰腺最为严重(Anderson *et al*, 1988; Egusa *et al*, 1988)。

作者研究了氨氮的变化对凡纳滨对虾肝胰腺中免疫相关因子及凡纳滨对虾对副溶血弧菌易感性的影响, 为研究凡纳滨对虾 AHPNS 暴发的环境机制提供相关资料, 也为通过调控养殖环境防治该病的暴发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用凡纳滨对虾购自青岛市宝荣水产科技发展有限公司, 体重(1.76±0.07) g, 体长(5.45±0.18) g, 室内暂养 2 d 后开始氨氮胁迫实验。对虾饲养于 PVC 桶(容积 200 L)中, 每桶分别投放 40 尾。每天按照体重的 4% 投饵, 分早、中和晚 3 次投喂。实验海水为经过沉淀、曝气后的地下海水, 氨氮浓度 0.03 mg/L, 水温 26℃, 盐度 28.50, pH 7.79。采用气石连续充氧, 保证溶解氧在 5.5 mg/L 以上。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮胁迫 根据养殖水体中通常的氨氮浓度和氨氮对凡纳滨对虾的安全浓度(孙国铭等, 2002; 韩永望等, 2012), 采用单因子实验设计, 设置了 1 个对照组和 4 个不同质量浓度氨氮实验组: 2.5、5.0、7.5 和 10.0 mg/L 组, 每组 6 个平行。实验溶液以 NH₄Cl 溶于海水中制得, 各处理组实测氨氮值分别为(0.03±0.006)、(4.21±0.209)、(6.68±0.350)和(9.16±0.375) mg/L。各梯度使用 2 g/L 的 NH₄Cl 溶液调节。实验期间, 为保证水体中氨氮浓度稳定, 投喂后 3 h 吸污, 每隔 24 h

换水 1 次, 换水量为 90%, 并使用实验室光度计(PhotoLab S12, 德国)按时监测水体中氨氮浓度并及时调整。各实验组养殖条件与暂养期间相同, 氨氮胁迫实验进行 20 d。

1.2.2 副溶血弧菌培养及活菌攻毒 副溶血弧菌分离自患 AHPNS 的凡纳滨对虾肝胰腺。将副溶血弧菌接种在 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 条件下培养 8–10 h, PBS 缓冲液梯度稀释菌液进行预实验。根据预实验结果, 确定副溶血弧菌注射浓度约为 1.04×10⁷ CFU/ml, 每尾虾注射剂量为 15 μl。每个氨氮胁迫组设 6 个重复, 每个重复随机取虾 40 尾腹肌注射副溶血弧菌。注射后对照组和各实验组对虾随机分为 6 个重复, 其中 3 个重复(各 25 尾对虾)分别于 0、3、6、9、12、24、48、72、96 和 120 h 统计累计死亡率, 另 3 个重复(各 40 尾对虾)分别于各取样时间点随机取对虾 3 尾, 解剖后取肝胰腺, 保存于液氮中备用。

1.3 样品制备

于液氮中研磨对虾肝胰腺。准确称取研磨后的肝胰腺, 按质量(g): 体积(ml)=1: 9 的比例加入 PBS (4℃), 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液用于非特异性免疫酶活性的测定。另取研磨后的肝胰腺 0.05–0.1 g 于 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml Trizol (4℃)用于 RNA 的提取。

1.4 酶活测定及基因表达

1.4.1 酶活性测定 分别取 1.3 所制备上清液用于非特异性免疫酶活性的测定。超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)活性的测定参照南京建成试剂盒说明书, 酚氧化酶(PO)的测定按照改进的雷质文等(2001)的方法。

1.4.2 肝胰腺中 LvLT mRNA 表达分析 Trizol 法提取总 RNA, 反转录合成第一链 c DNA。应用 RT-PCR 技术, 以 c DNA 为模板, 凡纳滨对虾 18S rRNA 为管家基因检测 Lv LT mRNA 表达量。引物序列见表 1。

1.5 数据统计

RT-PCR 所测数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行处理。实验结果以平均值±标准差表示, 采用 SPSS 17.0 进行单

表 1 引物编号及序列
Tab.1 The sequence of the primers used in this study

正向引物 Forward primer	序列 Sequence (5'-3')	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence (5'-3')
LvLT	GGGAAAGTAGAAGGGCGAGTTA	LvLT	CAACAAAGGTCACGAACAAGAG
18s-F	CCTCGGTTCTATTTTGTCTCGGTTT	18s-R	GCAGATGCTTTCGCAGTAGGT

因素方差分析($P<0.05$)。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾死亡率的变化

凡纳滨对虾在不同氨氮浓度胁迫后,继续感染副溶血弧菌后,各组对虾 120 h 内死亡率如图 1 所示。氨氮胁迫实验结束后,对虾的体长随着氨氮浓度的升高呈现减小的趋势,且其活动能力和自净能力下降。人工感染副溶血弧菌后,对照组没有出现死亡对虾。各实验组随着注射副溶血弧菌后时间的延长,对虾的死亡率逐渐升高。感染后 3 h 内各实验组均没有出现死亡对虾,多数对虾趴伏于桶底,厌食。感染后 6–24 h 各实验组对虾出现死亡高峰。濒死对虾体色呈白色并微红,软壳,肝胰腺呈淡白色。24 h 后,5.0、7.5 和 10 mg/L 实验组对虾累积死亡率均高于 2.5 mg/L 实验组,并且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高。48 h 后各实验组对虾累计死亡率基本不再变化,各实验组对虾累计死亡率分别为 0、8%、12%、20%和 36%。72 h 后对虾活动增强,摄食率增加。

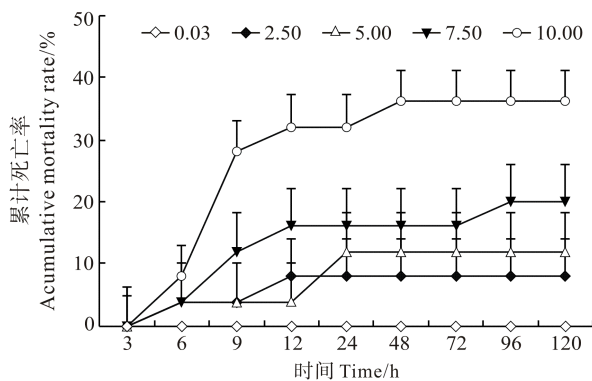


图 1 副溶血弧菌攻毒后对虾的死亡率

Fig.1 The accumulative mortality rate of *Penaeus vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

2.2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

如图 2 所示,凡纳滨对虾感染副溶血弧菌前,氨氮浓度越高,PO 活性、LSZ 活性越低,SOD 活性越高。对虾感染副溶血弧菌后,PO 活性呈现先降低再升高的趋势,对照组、2.5 和 5.0 mg/L 实验组 PO 活性差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组除

12 h 外均显著低于对照组($P<0.05$)。SOD 活性呈现先升高后下降的趋势,各实验组在 12–48 h 后分别达到最高值,后逐渐降低,7.5 和 10 mg/L 实验组 SOD 活性在感染后 3、6、48、72、96、120 h 显著高于对照组($P<0.05$),而 2.5 mg/L 处理与对照组差异性不显著($P>0.05$)。对虾 LSZ 活性在同一取样时间点随着氨氮浓度的升高各实验组 LSZ 活性呈现下降的趋势。对照组和 2.5 实验组对虾 LSZ 活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组对虾 LSZ 活性在 3、6、24、48 h 时间点显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

感染副溶血弧菌后,RT-PCR 测定的凡纳滨对虾肝胰腺中的 LvLT mRNA 相对表达量如图 3 所示。感染 6 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量上升,对照组、2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组显著高于 10.0 mg/L 实验组($P<0.05$)。感染 12 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量均达到最大值,其中,10.0 mg/L 实验组显著高于其他各实验组($P<0.05$)。感染 24 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量开始下调,至 72 h 恢复至原水平。对照组 LvLT mRNA 表达量在 6、12、24 h,高于 2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组,但差异性不显著($P>0.05$),在 48 h 和 72 h 显著高于其他各实验组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对凡纳滨对虾副溶血弧菌易感性的影响

副溶血弧菌是一种广泛分布于世界各地沿海水域中的条件致病菌。当虾蟹类长期在不良的环境条件、受伤或遭遇不利刺激时,会诱发疾病的发生甚至死亡(邱德全等,2008;刘昌彬等,2001;于赫男,2007¹⁾)。注射副溶血弧菌后,对虾体内的微生态平衡被打破,进而导致对虾发病和死亡。实验期间,感染副溶血弧菌后对照组没有死亡对虾,这可能是由于本研究注射剂量为 15 μ l,剂量较小且对照组对虾所处环境没有氨氮等胁迫因子,对虾通过自身免疫应答,快速清除了机体内弧菌的结果。感染弧菌 120 h 内,各实验组对虾的累计死亡率在同一取样时间内,随着氨氮浓度的升高而升高。这可能是由于氨氮胁迫降低了实验组对虾的抗病力,增加了对副溶血弧菌的易感

1) 于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士学位论文,2007,34–48

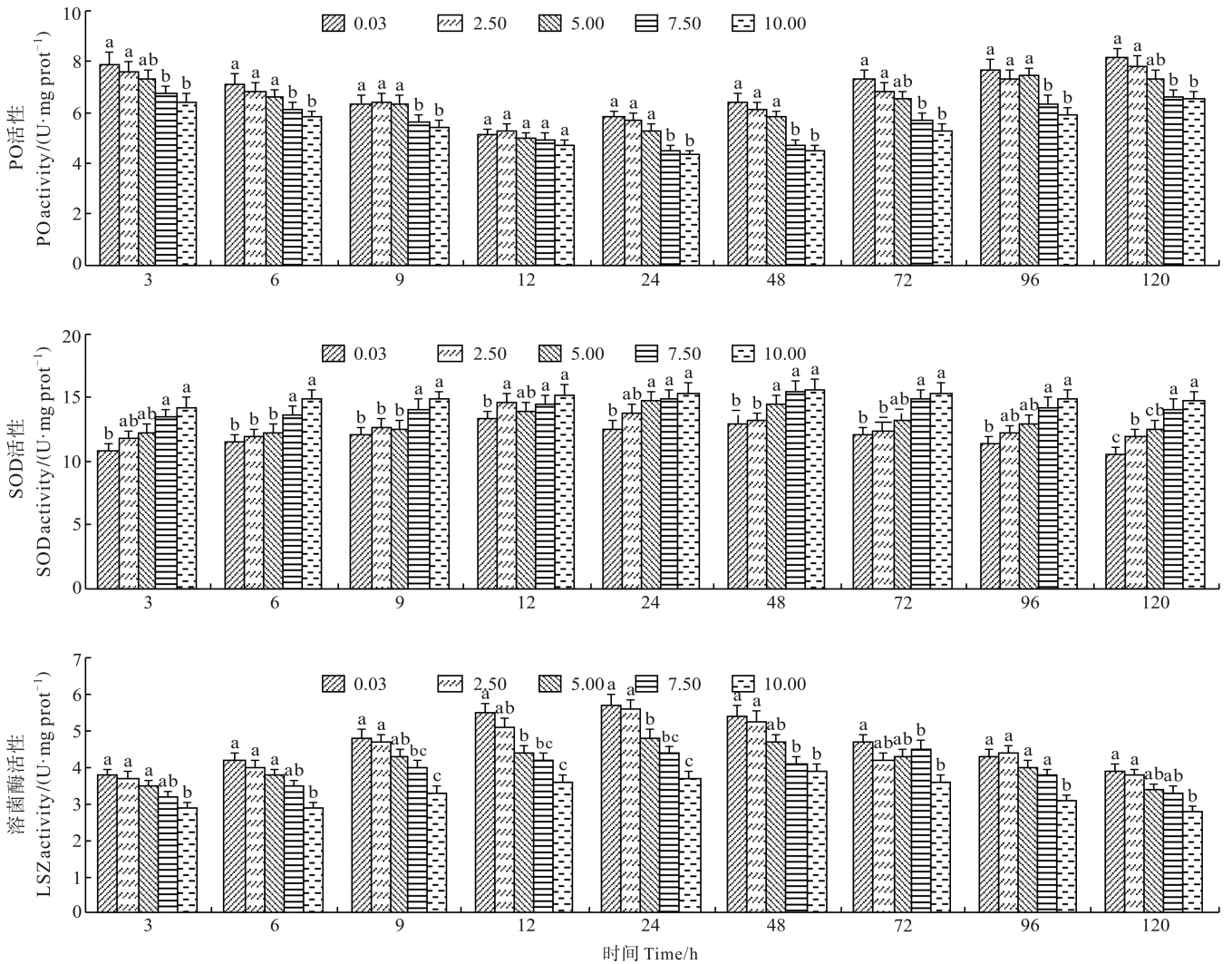


图 2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

Fig.2 Effects of ammonia nitrogen on the immune parameters in hepatopancreas of *P. vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

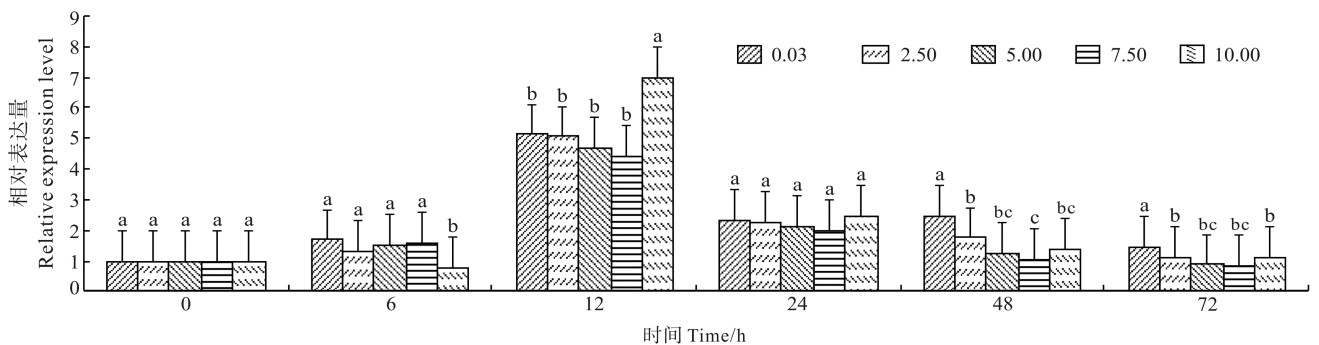


图 3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

Fig.3 Effects of ammonia nitrogen on the relative expression of LvLT mRNA gene in hepatopancreas of *P. vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

性,这与其他学者关于氨氮导致对虾对病害的发生的结论是一致的(何建国等, 1999)。注射同样剂量的副溶血弧菌后,对照组死亡率为 0,这可能是因为对照

组对虾所处环境没有氨氮等胁迫因子,对虾通过自身免疫应答,快速清除了机体内弧菌的结果。本研究还发现,对虾感染副溶血弧菌 6-24 h 内出现死亡高峰,

48 h 后对虾死亡较少,并且注射部位肌肉由发白逐渐变为黑色,这可能是对虾清除或抑制机体内弧菌的结果;感染副溶血弧菌 24 h 后,5.0、7.5 和 10 mg/L 实验组对虾累积死亡率均高于 2.5 mg/L 实验组,且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高,表明氨氮提高了凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性。参考氨氮对凡纳滨对虾的安全浓度(孙国铭等,2002)建议为预防 AHPNS 的暴发,养殖水体中总氨氮浓度控制在 1.96 mg/L 以下。

3.2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

虾蟹类的酚氧化酶原激活系统的识别和防御作用,在虾蟹类的非特异性免疫反应中发挥着重要作用。异物入侵激活虾类酚氧化酶原系统,酚氧化酶活化后可以迅速杀死异物。人工感染副溶血弧菌前,各实验组 PO 活性随着氨氮浓度的升高而降低,表明长时间氨氮胁迫抑制对虾 PO 活性。感染副溶血弧菌后,对照组和较低浓度实验组比高浓度组先下降到最低值后,较快恢复且在同一取样时间下随着氨氮浓度的升高而降低,这可能也是因为较高浓度氨氮破坏了酚氧化酶激活系统(于赫男,2007¹⁾;刘昌彬等,2001;李永等,2012),影响机体的应激反应,从而降低对虾抗病力。对照组、2.5 和 5.0 mg/L 实验组 PO 活性差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组除 12 h 外均显著低于对照组($P<0.05$),说明氨氮高于 5.0 mg/L 超出了机体的调节范围并对 PO 活性造成影响。本研究说明,总氨氮质量浓度超过 5.0 mg/L 处,可能降低凡纳滨对虾免疫力,从而提高对虾对副溶血弧菌的易感性。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内重要的抗氧化酶,能有效清除氧自由基并对机体的氧化和抗氧化平衡起着重要作用。感染副溶血弧菌前,各实验组氨氮越高,对虾肝胰腺中 SOD 活性越高,这可能是由于高浓度的氨氮胁迫下,对虾体内氧自由基较多。感染副溶血弧菌后,各实验组 SOD 活性呈现先升高后降低的趋势,对照组和 2.5 mg/L 实验组于 24 h 达到最高值,而高浓度实验组达到最高值时间延后且同一取样时间点 SOD 活性随着氨氮浓度的升高而升高。这可能是由于长时期高浓度氨氮胁迫抑制对虾 SOD 活性,扰乱了对虾清除氧自由基等生化过程(刘昌彬等,2001)。7.5 和 10 mg/L 实验组 SOD 活性在感染后第 3、6、48、72 和 96 h 显著高于对照组($P<0.05$),而 2.5 mg/L 处理与对照组差异性不显著($P>0.05$),说明低浓度氨

氮不会显著影响对虾 SOD 活性,但高浓度氨氮则会扰乱机体内正常生理功能,导致抗病力降低。本研究表明,总氨氮质量浓度超过 2.5 mg/L 可能影响机体内抗氧化防御功能,从而提高对虾对副溶血弧菌易感性。

溶菌酶是一种碱性蛋白,能够破坏细菌细胞壁,是虾蟹类非特异性免疫防御体系的重要组成部分(冯伟等,2011; Lee *et al*, 2004)。本研究表明,凡纳滨对虾在氨氮胁迫 20 d 后,肝胰腺中溶菌酶活性随着氨氮浓度的升高而降低,表明长期氨氮胁迫会降低对虾肝胰腺中溶菌酶的活性。感染副溶血弧菌后,各实验组溶菌酶活性呈现先升高后降低的趋势。这可能是由于副溶血弧菌刺激机体产生免疫反应,促进机体中抗菌蛋白和溶菌蛋白的合成,故机体 LSZ 活性升高,这与其他学者等关于对虾在弧菌感染初期,LSZ 基因的表达显著上升的结论是一致的(Hikima *et al*, 2003)。而在感染后期,可能是副溶血弧菌导致机体机细胞的代谢紊乱,破坏了某些合成机制,故 LSZ 活性降低。对照组和 2.5 实验组对虾 LSZ 活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组对虾 LSZ 活性在 3、6、24、48 h 显著高于对照组($P<0.05$),且在同一取样时间各实验组 LSZ 活性随着氨氮浓度升高而降低,说明低浓度氨氮不会显著降低 LSZ 活性,但高浓度氨氮显著降低 LSZ 活性。以上研究表明,总氨氮质量浓度高于 2.5 mg/L 情况下,对虾溶菌酶活性就会受到抑制,免疫水平下降。

3.3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

C-型凝集素是一类具有结构和功能多样性的模式识别蛋白,具有结合糖类和凝聚细胞的能力,在甲壳类非特异性免疫系统中扮演着重用作用。凡纳滨对虾体内存在着多个 C-型凝集素,包括 LvLT、LVL、LvCTL1 等(Ma *et al*, 2007; Sun *et al*, 2007; Zhao *et al*, 2009)。感染副溶血弧菌前,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量与对照组没有差异,这是因为 LvLT 基因正常情况下表达水平很低,各实验组对虾虽经氨氮长期胁迫,但没有病原刺激诱导其表达。本研究发现,感染副溶血弧菌后,各实验组肝胰腺中 LvLT mRNA 表达水平均上升,后逐渐恢复正常值,表明 LvLT mRNA 参与了机体应答副溶血弧菌的侵染。凡纳滨对虾注射 WSSV 2 h 后 LvLT mRNA 表达量开始上升至 4 h 达到最高值(Ma *et al*, 2007),而本研究中 12 h 后达到最大值,这可能是由于氨氮胁迫抑

1) 于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士学位论文, 2007, 34-48

制了机体内免疫应答机制,也可能是因为本研究刺激病原是弧菌,而非 WSSV 所致。本研究中,10 mg/L 实验组 LvLT mRNA 表达量于 12 h 显著高于其他实验组,这可能是由于氨氮胁迫导致机体内应激紊乱。感染 24 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量开始下调。LvLT mRNA 表达量下降的原因可能是机体在感染副溶血弧菌过程中,肝胰腺中 LvLT mRNA 降解或转移到感染部位。本研究中 PO, SOD 及 LSZ 活性在 12–48 h 内达到极值,表明 LvLT mRNA 可能参与凡纳滨对虾机体内非特异性免疫酶活性的调节作用,这与本研究中感染副溶血弧菌 48 h 后,各实验组对虾不再死亡的结果也是一致的。以上研究结果表明,感染副溶血弧菌后, LvLT mRNA 在凡纳滨对虾的天然免疫中起着重要作用。对照组 LvLT mRNA 表达量在 6、12、24 h 高于 2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组,但差异性不显著($P>0.05$),在 48 h 和 72 h 显著高于其他各实验组($P<0.05$),表明氨氮胁迫影响了对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 对免疫系统的调控。另外,本研究发现,对虾感染副溶血弧菌后, LvLT mRNA 表达量与感染前有显著变化,这表明对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 可以作为 AHPNS 的参考指标。

4 结语

氨氮是对虾养殖池中最主要的污染物之一,已经有研究表明,水体中氨氮超过对虾耐受限度时,可能严重影响对虾的呼吸、蜕皮和排泄等正常生理功能,导致对虾对病原微生物抵抗力的下降,提高其易感性。本研究发现,高浓度的氨氮(高于 2.5 mg/L)长期胁迫凡纳滨对虾,导致对虾感染副溶血弧菌后死亡率增大,且其肝胰腺中重要的非特异性免疫酶活性降低。同时影响其 LvLT 基因表达量,表明高浓度氨氮胁迫下凡纳滨对虾非特异性免疫力下降,增加其对副溶血弧菌的易感性。目前有报道称,凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征的暴发,可能是因为病毒感染或者是养殖环境恶化引起对虾免疫系统损坏,导致急性肝胰腺坏死,从而发生细菌继发性感染,而高浓度氨氮胁迫可直接损伤对虾肝胰腺。本实验为研究凡纳滨对虾 AHPNS 暴发的环境机制提供相关资料,也为通过调控养殖环境防治该病的暴发提供理论依据。所以在凡纳滨对虾养殖过程中,为预防 AHPNS 的暴发,水体中总氨氮浓度应控制在 1.96 mg/L 以下。

参 考 文 献

孙舰军,丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖

- 沼, 1999, 30(3): 267–272
- 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. 水利渔业, 2007, 27(6): 24–26
- 刘昌彬, 王金星, 刘存仁, 等. 非生物环境因子对暴发性流行病病原感染的中国对虾发病的影响. 水产学报, 2001, 25(1): 58–63
- 孙国铭, 汤建华, 仲霞铭, 等. 2002. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究. 水产养殖, 2011, 1: 22–24
- 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF- κ B 表达量的影响. 水产学报, 2011, 35(2): 200–208
- 何建国, 莫福. 对虾白斑综合征病毒爆发流行与传播途径、气候和水体理化因子的关系. 中国水产, 1999, 7: 34–37
- 李永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 358–362
- 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455–461
- 韩永望, 李健, 潘鲁青, 等. 微孔管增氧和气石增氧对凡纳滨对虾室内养殖影响的比较研究. 中国海洋大学学报, 2012, 42(4): 41–47
- 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关因子的研究. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46–51
- Anderson IG, Shamsudin MN, Shariff M, *et al.* Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, culture in Malaysian brackish water ponds, *Asian Fish Sci*, 1988, 2: 93–108
- Chang W, Chen JC. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12: 97–109
- Egusa S, Takahashi Y, Itami T, *et al.* Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Fish Pathol*, 1988, 23(1): 59–65
- Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J Invert Pathol*, 2012, 110: 166–173
- Hikima S, Hikima J, Rojinnakorn J, *et al.* Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 2003, 316: 187–195
- Lee MH, Shiau SY. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 475–485
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, January/February: 2012, 40
- Ma TH, Tiu SH, He JG, *et al.* Molecular cloning of a C-type lectin(LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(2): 430–437
- Sun J, Wang L, Wang B, *et al.* Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(2): 292–299
- Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 2009, 83(1): 347–356

(编辑 江润林)

The Immune Response of *Litopenaeus vannamei* and Its Susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* Under Stress Caused by Ammonia Nitrogen at Different Concentrations

GE Hongxing^{1,2}, LI Jian¹①, CHEN Ping¹, LIANG Zhongxiu^{1,2}, REN Hai^{1,2}, LI Dongli^{1,2}

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

Abstract Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS), also known as Early Mortality Syndrome (EMS), was officially reported in China in 2010 and has caused large-scale die-offs of cultivated shrimp in several Asian countries. A research team of the University of Arizona has identified that the pathogen is *Vibrio parahaemolyticus* which is a strain of a bacterium commonly found in brackish coastal waters around the globe. Because *V. parahaemolyticus* is a conditioned pathogen, it is very important to study the effects of ammonia nitrogen on the toxicity of this pathogen to *Litopenaeus vannamei*. To evaluate the effects of total ammonia nitrogen during the outbreak of AHPNS in *L. vannamei*, we examined the susceptibility to the pathogen, the non-specific immunity and the expression of LvLT mRNA in the hepatopancreas of the shrimp. Shrimp underwent the ammonia stress for 20 days with different ammonia nitrogen concentrations: 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 7.5 mg/L, 10.0 mg/L and the control concentration. After the exposure to *V. parahaemolyticus*, the death rate of shrimp peaked in 6–24 h. The accumulative mortality rates of the treated groups were 0, 8%, 12%, 20% and 36% respectively at 120 h. The activities of phenoloxidase (PO) reached the lowest at 12 h in the control, 2.5 and 5.0 mg/L groups, and at 24 h in the 7.5 and 10.0 mg/L groups. The activity of superoxide dismutase (SOD) increased at first and then gradually declined, and lysozyme (LSZ) exhibited the same trend. The expression of LvLT mRNA in the hepatopancreas increased at 6 h in all groups and was significantly higher in the control, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/L group than that in the 10.0 mg/L group. The LvLT mRNA expression reached the maximum at 12 h and then declined gradually at 24 h. The results indicated that high ammonia nitrogen could cause depression in the immunity of *L. vannamei*, and subsequently increase their susceptibility to *V. parahaemolyticus* and the resultant mortality rate. Therefore it is crucial to regulate the concentration of total ammonia nitrogen in aquatic environment to prevent the breakout of Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome.

Key words Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome; *Litopenaeus vannamei*; Total ammonia nitrogen; *Vibrio parahaemolyticus*

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

克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的 克隆及 mRNA 表达量的相对定量*



刘 红 崔 俊 颜 婕 蔡生力^①

(上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 从成熟的克氏原螯虾卵巢中提取总 RNA, 通过同源克隆得到了卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列, 长度为 506 bp, 在 NCBI 网站上进行比对后发现, 其与斑节对虾、短沟对虾、罗氏沼虾的卵黄蛋白原受体(VgR) cDNA 序列有较高的相似性。采用实时荧光定量 PCR 方法, 测定了卵巢不同发育时期卵巢和肝胰腺两个组织中卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达水平。结果显示, 卵巢是卵黄蛋白原受体基因表达的主要部位, 而肝胰腺只能检测到少量表达, 卵黄蛋白原受体基因在卵巢的卵原细胞增殖期相对表达量最高, 随后下降, 成熟期达到最低值, 恢复期开始回升。结合卵巢不同发育阶段卵巢质量的变化计算表达总量, 结果发现, 卵黄蛋白原受体基因的表达总量在卵原细胞增殖期为最低, 随后持续升高并至成熟期达到峰值, 恢复期急剧下降, 但仍略高于卵原细胞增殖期的表达量。此外, 运用所构建的系统进化树比较了克氏原螯虾 VgR mRNA 与其他物种间的遗传距离。

关键词 卵黄蛋白原受体; 克氏原螯虾; 克隆; 表达量

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0083-07

在卵生动物中, 雌性成熟的标志是卵黄蛋白的合成。卵黄蛋白是一种为胚胎提供营养物质的糖脂蛋白, 由卵黄蛋白原修饰而来(吴维福等, 2012)。在虾类中, 卵巢的外源卵黄蛋白原由肝胰腺合成, 通过血淋巴循环系统运输到卵巢, 被卵母细胞通过卵黄蛋白原受体介导的胞饮作用摄取, 在细胞内被酶解修饰成小分子量的卵黄相关蛋白并发挥其营养作用(Schneider, 1996; Willnow, 1997; Sappington *et al*, 1998)。卵黄蛋白原受体(Vitellogenin receptor, VgR)是低脂蛋白受体超家族中的一员, 在卵巢发育过程中与卵黄蛋白原结合, 起到受体介导的作用, 因此卵黄蛋白原受体在胚胎成熟的过程中有重要的作用。

目前, 已经公布了不少十足目虾、蟹类的卵黄蛋白原 cDNA 全序列, 针对甲壳动物卵黄蛋白原的合成部位的研究也较多(Tom *et al*, 1987; Yang *et al*, 2000)。但是关于卵黄蛋白原受体的 cDNA 全序列和 mRNA

表达量的研究很少。克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) 分布在全球各地, 进入中国后, 已经成为重要的甲壳经济物种, 只是迄今为止, 克氏原螯虾的卵黄蛋白原受体序列及表达量的研究还未见报道。本研究以克氏原螯虾为研究对象, 克隆了卵黄蛋白原受体 mRNA 的部分序列, 并采用实时荧光定量 RT-PCR 相对定量法(Livak *et al*, 2001)对不同卵巢发育时期雌虾的卵巢和肝胰腺卵黄蛋白原受体 mRNA 表达水平进行分析, 从分子水平上探讨克氏原螯虾卵巢发育机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用克氏原螯虾雌虾, 平均体重为(10.90±4.55) g, 平均体长为(6.83±0.73) cm, 分别于 2012 年 5-8 月购自上海市浦东新区临港新城古棕路菜市场,

* 上海市教委创新项目(12YZ125)和上海高校水产学一流学科建设项目共同资助。刘 红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

① 通讯作者: 蔡生力, 教授, E-mail: slcai@shou.edu.cn

收稿日期: 2014-04-29, 收修改稿日期: 2014-07-25

在上海海洋大学繁殖发育实验室进行后续实验。以卵巢的颜色、形态及组织切片观察到的占主要比例的卵细胞的时相和进行统计分析的细胞直径大小为依据,将克氏原螯虾卵巢发育阶段分为6个时期,分别为卵原细胞增殖期、卵黄发生前期、初级卵黄发生期、次级卵黄发生期、成熟期和恢复期,每个发育阶段取3尾虾分析。

1.2 方法

1.2.1 克氏原螯虾卵巢质量测定 解剖克氏原螯虾雌虾,获得发育各时期卵巢样品,称量卵巢的质量,每个阶段的卵巢质量用3尾虾的卵巢质量平均值表示。

1.2.2 总RNA提取和cDNA合成 解剖克氏原螯虾雌虾,获得肝胰腺和卵巢样品,迅速将其置于液氮中冷冻,随后放置于液氮预冷过的无RNase的离心管内,并转移至-80℃保存。总RNA的提取按照Trizol (Invitrogen)试剂盒操作步骤提取,DEPC水溶解,保存于-80℃。提取的总RNA用微量分光光度计Nano-drop2000进行定量测定, A_{260nm}/A_{280nm} 在1.8-2.0之间,变性琼脂糖凝胶电泳证实RNA的完整性。用TaKaRa第一链合成试剂盒逆转录,参照说明书步骤操作,将反转录cDNA置于-20℃保存。

1.2.3 引物设计 参照GenBank中已知的十足目以及昆虫的卵黄蛋白原受体cDNA序列设计简并引物F1(5'-GAYTGYKMSGAYGGCTCTGACGAGA-3')和R1(5'-CCACAGTCATCCTCGCCRTC-3'),具体参考物种如下:*Macbrachium rosenbergii* (GU454802.1) (Roth *et al.*, 2012)、*Marsupenaeus japonicus* (AB304798.1) (Mekuchi *et al.*, 2008)、*Penaeus monodon* (EU024890) (Tiu *et al.*, 2008)、*Penaeus semisulcatus* (AY075108.1) (Michelis *et al.*, 2002)、*Aedes aegypti* (AY027888.1) (Cho *et al.*, 2001)、*Rhyparobia maderae* (AB255883.1) (Tiu *et al.*, 2008)。参照GenBank中已知克氏原螯虾18S cDNA序列以及克隆所得克氏原螯虾卵黄蛋白原受体部分序列,设计荧光定量PCR所用卵黄蛋白原受体引物和内参引物VgR-F (5'-TGTCCTCCTCACAGTTCACC-3')、VgR-R (5'-CATCGGCACAATCTGGGTCA-3')、18S-F (5'-CGCAAATTACCCACTCCCG-3')、18S-R (5'-GCACCAGACTTGCCCTCC-3')。

1.2.4 RT-PCR扩增和克隆测序 RT-PCR扩增体系为100 μl,产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收纯化片段,连接到PMD-19T载体,转化到DH5α菌株。采用PCR扩增法筛选阳性克隆,将挑选的阳性克隆菌液送往上海生工生物有限公司进行测序。

1.2.5 荧光定量RT-PCR扩增 荧光定量RT-PCR参照SYBR Premix *ExTaq*TM(TaKaRa)试剂盒说明书操作。每期取3个样品,共6个期,每个样品设置3个平行对照。荧光定量PCR(ΔΔCt法)扩增体系为20 μl,包括10 μl SYBR Premix *Ex Taq*TM (2×)、0.4 μl PCR Forward Primer (10 μmol/L)、0.4 μl PCR Reverse Primer(10 μmol/L)、0.4 μl ROX Reference Dye II (50×)、1.0 μl cDNA模板、7.8 μl ddH₂O。反应程序为95℃ 30 s; 95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。

1.2.6 序列分析 根据所得克氏原螯虾卵黄蛋白原受体cDNA部分序列,结合已经发表的其他节肢动物的卵黄蛋白原受体cDNA全长序列,用MEGA 4.0软件的NJ法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。其他物种的卵黄蛋白原氨基酸序列均从NCBI中的GenBank下载,具体的物种分别为:*M. rosenbergii* (GU454802.1)、*M. japonicus* (AB304798.1)、*P. monodon* (EU024890)、*P. semisulcatus* (AY075108.1)、*A. aegypti* (AY027888.1)、*R. maderae* (AB255883.1)、*Caenorhabditis elegans* (CAA98143.1)。以线虫作为外延物种构建得到部分节肢动物卵黄蛋白原受体的系统进化树(NJ法)。

1.2.7 mRNA的差异表达、表达总量及贡献率的数据分析与计算方法 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体mRNA相对表达水平用Livak等(2001)建立的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,其中18S内参基因和目的基因均取9个数据(每期取3条虾,每条虾取3个平行样品)的平均值,扣除内参,进行相对表达量的计算,然后选取相对表达量最低的样本为校验样本(以表达量最低的样本作为1进行参照),计算目的基因的组织阶段相对表达量,结果用平均值±标准差表示,以此为依据分别计算不同组织(卵巢和肝胰腺)和不同发育阶段的表达量以及表达总量,计算公式如下:

组织阶段表达量=组织阶段相对表达量×该期组织(卵巢或肝胰腺)平均质量

组织各阶段表达总量=卵巢或肝胰腺在整个卵巢发育阶段的组织阶段表达量的总和

个体表达总量=卵巢和肝胰腺的组织各阶段表达总量之和

组织贡献率=卵巢或肝胰腺的组织各阶段表达总量占个体表达总量的百分比

采用SPSS 17.0统计软件进行数据的单因素方差分析(ANOVA)和Duncan多重比较检验统计差异, $P < 0.05$ 为差异显著。

1.2.8 mRNA 表达量的数据来源及计算方法 卵黄蛋白原 mRNA 表达量数据来源于本实验室未发表的研究结果(于改红), 数据来源方法如下: 通过雌性克氏原螯虾卵巢总 RNA 提取、cDNA 反转录、卵黄蛋白原序列引物设计和克隆测序得到克氏原螯虾卵黄蛋白原部分 cDNA 序列, 利用此序列和 18S 内参基因进行实时荧光定量 PCR, 得到不同卵巢发育时期卵黄蛋白原在卵巢和肝胰腺的表达量。其中表达量的计算参考卵黄蛋白原受体的计算方法。

2 结果

2.1 克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 部分序列的克隆

以克氏原螯虾卵巢总 RNA 为模板, 扩增产出 VgR cDNA 片段, 测序得知产物长度为 506 bp, 序列结果如图 1 所示。将所得序列在 NCBI 上 BlastX 比对, 发现该序列与日本囊对虾、短沟对虾、斑节对虾、罗氏沼虾的卵黄蛋白原受体氨基酸序列相似度分别为 52%、51%、51%、40%。如图 2 所示, 由部分节肢动物卵黄蛋白原受体的系统进化树分析可知, 节肢动物卵黄蛋白原受体在系统进化树中分为两簇: 埃及伊

5'-GATTGTTACGATGGCTCTGACGAGATCAACTGCACAATGT
CATGTCCTCCTCACAAAGTTCACCTGTAAGGATGGGACCTGCA
TACCATCTTTGTGGCAGTGTGACGGAGGCGAGGACTGCACA
GATGGCTCTGATGAGCAAGACTGCCAGTAAACTGCAAGGT
GGGAGAATTCATGTGCAGCAACAAGCAATGTGTCCCACTGT
ATGTGACATGTGATGGTGACCCAGATTGTGCCGATGGGTCT
GATGAGAGCCCCACAAAATGTTTCAGTCATACCTCCTAACTT
GCCAGTGGTGTGCCCTAGTGGCCATGTAATGTGTGCTCTCAG
CCCTTCAAACTTGAACCAATATGCATCCCAAGCACTGCTGT
GTGCGATGGTAAGCGGACTGTCCTCAGGAGGATGATGAGG
ACTGTACGTGGTGTTCACAATATGAGTTTCATTGTGCACAGAA
CGGATCGTTGCATTCCATTGAGGTGGGTGTGTGATGGCGAG
GATGACTGTGG-3'

图 1 克氏原螯虾 VgR cDNA 部分序列(506 bp)

Fig.1 Partial cDNA sequence of VgR of *P. clarkia* (506 bp)

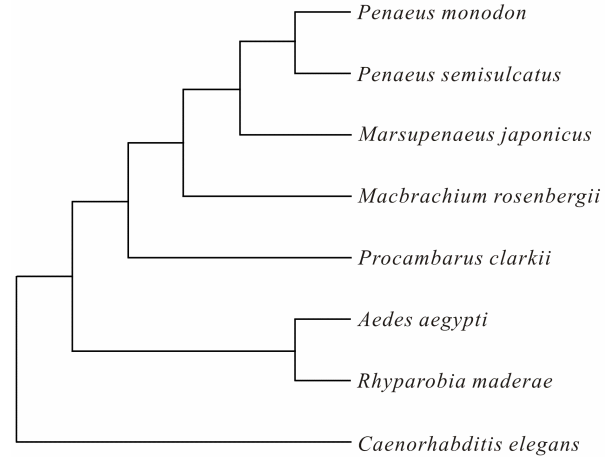


图 2 克氏原螯虾等部分节肢动物的 VgR 系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of VgR among some arthropod species

P. clarkia: 克氏原螯虾; *M. rosenbergii*: 罗氏沼虾;
M. japonicus: 日本囊对虾; *P. monodon*: 斑节对虾;
P. semisulcatus: 短沟对虾; *A. aegypti*: 埃及伊蚊;
R. maderae: 马德拉蜚蠊; *C. elegans*: 秀丽广杆线虫

蚊和马德拉蜚蠊等昆虫聚为一簇, 而包括克氏原螯虾在内的甲壳动物聚为另外一簇。在所分析的几种甲壳动物中, 克氏原螯虾与罗氏沼虾的遗传距离相对较近, 而与日本囊对虾、短沟对虾、斑节对虾等遗传距离相对较远, 作为外延物种的秀丽广杆线虫与所有的节肢动物独立分开。

2.2 卵巢和肝胰腺中卵黄蛋白原受体 mRNA 的差异表达

在不同卵巢发育时期, 卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量见表 1。从表 1 可见, 卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量在卵巢与肝胰腺中差异较大, 卵巢远远大于肝胰腺, 二者比值从卵黄发生前期的 1000 多倍到成熟期的 30 倍左右。肝胰

表 1 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量

Tab.1 The relative expression of vitellogenin receptor mRNA in ovary and hepatopancreas at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 VgR 表达量 Expression of VgR in ovary	肝胰腺 VgR 表达量 Expression of VgR in hepatopancreas	比值 (卵巢/肝胰腺) Ratio O/H
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	1302.7±198.1 ^c	9.6±0.9 ^{cd}	135.7 : 1
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	1158.6±177.6 ^c	1.0±0.2 ^a	1158.6 : 1
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	641.7±35.6 ^b	2.8±0.8 ^{ab}	229.2 : 1
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	436.5±65.1 ^b	8.5±1.9 ^c	51.4 : 1
成熟期 Mature stage	138.1±8.2 ^a	4.7±1.2 ^b	29.4 : 1
恢复期 Recovery stage	646.5±113.1 ^b	11.2±0.1 ^d	57.7 : 1

注: 同一列数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)

Note: Data within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

表 2 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的表达量以及贡献率

Tab.2 The relative expression and contribution ratio of vitellogenin receptor mRNA in ovary and hepatopancreas at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 Ovary		肝胰腺 Hepatopancreas		各期表达比值 (卵巢/肝胰腺) Expression ratio at different stages (O/H)
	表达量 Expression	占总量的百分比 Percentage of total expression(%)	表达量 Expression	占总量的百分比 Percentage of total expression(%)	
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	13.1±1.9 ^a	5.3	11.2±1.1 ^b	16.2	1.2 : 1
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	34.7±5.3 ^{bc}	14.2	1.5±0.3 ^a	2.2	23.1 : 1
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	44.9±2.5 ^{cd}	18.3	4.9±1.4 ^a	7.1	9.2 : 1
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	52.3±7.8 ^d	21.3	18.9±4.2 ^c	27.3	2.8 : 1
成熟期 Mature stage	67.7±4.1 ^e	27.6	16.2±4.2 ^c	23.4	4.2 : 1
恢复期 Recovery stage	32.3±5.7 ^b	13.2	16.6±0.1 ^c	23.9	1.9 : 1
卵巢/肝胰腺表达总量 Total expression O/H		245		69.3	
贡献率 Contribution(%)		77.9		22.1	

注：同一列数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$)；占表达总量的百分比=组织阶段表达量/组织各阶段表达总量 $\times 100\%$

Note: Data within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$); Percentage of total expression=Expression in each stage/Total expression in each stage $\times 100\%$

腺中，卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量一直处于极低水平，在整个卵巢发育周期中有一定波动，卵原细胞增殖期、次级卵黄发生期和恢复期相对表达量较高，卵黄发生前期和初级卵黄发生期相对表达量较低，恢复期与卵黄发生前期的表达量相差近 10 倍，差异显著($P < 0.05$)。

在卵巢中，卵黄蛋白原受体 mRNA 的相对表达量一直处于较高水平，而且随着卵巢的发育有明显的变化，在卵原细胞增殖期时相对表达量为最高，卵黄发生前期有所下降，到成熟期降至最低，随后的恢复期显著回升至接近初级卵黄发生期的水平($P < 0.05$)。卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵原细胞增殖期与卵黄发生前期的卵巢中处于较高表达水平，二者差异不显著($P > 0.05$)；初级卵黄发生期比卵黄发生前期相对表达量显著下降($P < 0.05$)，成熟期的最低水平与次级卵黄发生期以及恢复期均差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 在卵巢和肝胰腺中表达总量的变化及贡献率

随着卵巢的发育，克氏原螯虾卵巢的质量发生了剧烈的变化，由卵原细胞增殖期的平均 0.01 g 增加到成熟期的平均 0.49 g，增加了近 50 倍，因而卵巢中卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量也随之变化(表 2)，呈

现出与卵巢相对表达量近乎完全相反的结果，即：在卵原细胞增殖期为最低，表达量随卵巢的发育而增加，成熟期达到峰值，恢复期显著下降($P < 0.05$)，但仍略高于卵原细胞增殖期的表达量，其中卵黄发生前期的表达量约为卵原细胞增殖期的 3 倍，差异显著($P < 0.05$)，而成熟期表达量的峰值也显著高于其他任何发育时期($P < 0.05$)。结合卵巢在整个发育阶段中卵黄蛋白原受体 mRNA 的总表达量以及各阶段表达量所占比例，仅次级卵黄发生期和成熟期就占到 48.9%，接近一半，而卵原细胞增殖期仅占 5.3%。

肝胰腺的质量在克氏原螯虾卵巢发育过程中变化不大，由卵原细胞增殖期的平均 1.17 g 增加到成熟期的平均 3.46 g，大约增加了两倍，反映在卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量上变化也不太剧烈，除卵黄发生前期和初级卵黄发生期显著较低(二者占肝胰腺卵黄蛋白原受体 mRNA 总表达量的 9.3%)，其他各时期均比较接近(表 2)。

从卵巢和肝胰腺各期卵黄蛋白原受体 mRNA 表达量比值看，卵巢和肝胰腺在卵黄发生前期表达量相差最大，卵巢的表达量约为肝胰腺的 23.1 倍，在卵原细胞增殖期两者表达量基本相当，差异最小(1.2 倍)。从整个卵巢发育时期看，卵巢在各期卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量均高于肝胰腺，最终结果是：在克氏

表 3 不同发育时期卵黄蛋白原受体 mRNA 和卵黄蛋白原 mRNA 主要合成部位的表达量和各期占表达总量比值
Tab.3 Total expressions and proportion of vitellogenin receptor mRNA and vitellogenin mRNA in the main synthesis site at different ovarian developmental stages

卵巢发育时期 Ovarian developmental stage	卵巢 VgR 表达量 Expression of VgR in ovary	肝胰腺 Vg 表达量 Expression of Vg in hepatopancreas	卵巢 VgR 各期占表达总量 VgR total expression of in ovary	肝胰腺 Vg 各期占表达总量 Vg total expression in hepatopancreas
卵原细胞增殖期 Oogonium proliferation stage	28.9±4.4	3.6±1.4	0.005	0*
卵黄发生前期 Pre-vitellogenesis stage	77.2±11.8	37.2±7.7	0.142	0*
初级卵黄发生期 Primary vitellogenesis stage	99.8±5.5	150±108.8	0.183	0*
次级卵黄发生期 Secondary vitellogenesis stage	116.4±17.3	11680±318.4	0.214	0.245
成熟期 Mature stage	150.3±9.1	23120±426.3	0.276	0.752
恢复期 Recovery stage	71.8±12.5	18.8±28.9	0.132	0*

注: VG 数据引用于本实验室于改红的研究结果, 没有正式发表。*为数值太小, 近似于 0

Note: The data of VG cited from not-published results of YU Gaihong in our laboratory. * means the number is small and close to 0

原螯虾卵巢发育的整个阶段中, 卵巢中卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量占 77.9%, 肝胰腺为 22.1%, 相差两倍以上(表 2)。

3 讨论

关于十足目甲壳动物卵黄蛋白原受体的研究目前还不多, 其 cDNA 全序列目前也仅有 Roth 等(2012)和 Tiu 等(2008)报道, 另外为 cDNA 部分序列(Mekuchi *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2008), 基本集中在对虾(3 条)和沼虾(1 条), 螯虾类还未见报道。本研究首次克隆了克氏原螯虾卵黄蛋白原受体 cDNA 的部分序列, 由所获得的部分序列可知卵黄蛋白原受体的 cDNA 序列在已知的 5 种十足目甲壳动物中比较保守, 其氨基酸序列相似度在 40% 以上。与昆虫相比, 5 种十足目甲壳动物自己聚为一簇, 选用的两种昆虫另成一簇, 与线虫分开, 初步判断卵黄蛋白原受体基因在进化过程中在节肢动物内具有一定的保守性。

对卵黄蛋白原受体蛋白合成部位的研究发现, 在昆虫中, 卵黄蛋白原受体 mRNA 主要是在成虫的卵母细胞中表达(Tufail *et al.*, 2005、2007; Cho *et al.*, 2001); 在十足目甲壳动物的斑节对虾和罗氏沼虾中, 也只是在卵巢中检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达, 在其他组织如眼柄、肌肉、心脏、血液、鳃、神经、游泳足(Tiu *et al.*, 2008)以及肝胰腺(Roth *et al.*, 2012)均未能检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达。在本研究中, 卵巢和肝胰腺均检测到卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达, 只是肝胰腺中的表达量相对较低, 约

为卵巢和肝胰腺表达总量的 20%, 其余大约 80% 的卵黄蛋白原受体 mRNA 是在卵巢中表达; 卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量也随卵巢发育进程而变化, 卵巢中的相对单位表达量在卵原细胞增殖期最高, 成熟期降至最低, 而考虑了卵巢质量变化后, 卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量则呈现与其相对表达量相反的变化, 卵原细胞增殖期最低, 随卵巢发育增加, 成熟期到达峰值。斑节对虾卵黄蛋白原受体 mRNA 的表达量和罗氏沼虾的结果与它们的相对单位表达量结果相似, 即在卵巢发育早期相对表达量高, 后期下降, 这也说明十足目甲壳动物在卵黄蛋白原的合成中具有相对相似的变化趋势。

虽然卵原细胞增殖期的卵巢卵黄蛋白原受体 (VgR)mRNA 单位相对表达量最高, 此时卵巢的质量却是最小的, 卵巢实际表达的卵黄蛋白原受体不会太多; 到成熟期时卵巢卵黄蛋白原受体 mRNA 单位相对表达量是卵原细胞增殖期的大约 10%, 但是卵巢的质量却增加了近 50 倍, 此时卵巢实际表达的卵黄蛋白原受体显著高于其他各发育阶段, 这也符合卵巢发育及卵黄蛋白原合成的规律。结合分析卵黄蛋白原 mRNA 的 (Vg) 表达情况(表 3, 本实验室待发表的结果), Vg mRNA 在克氏原螯虾的主要表达部位是肝胰腺, 其表达量随卵巢的发育不断上升, 成熟期达到峰值, 这与卵巢中 VgR mRNA 的表达量变化趋势完全一致, 而克氏原螯虾 Vg 的合成方式以外源性合成为主, 肝胰腺合成的 Vg 经循环系统到达卵巢, 卵母细胞通过受体(即 VgR)介导的方式从周围摄取 Vg 供其

发育。而本研究中在肝胰腺检测到 VgR mRNA, 可能是因为 Vg 还参与肝胰腺中其他脂蛋白的运输和调控作用或者是 VgR 参与转运极低密度脂蛋白(Stifani, 1990; Mac-Lachlan *et al*, 1994)之故。

参 考 文 献

- 吴维福, 李郁娇, 黎东, 等. 三丁基锡对罗氏沼虾卵黄蛋白原(VTG)表达和性腺发育的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 77-83
- Cho KH, Raikhel AS. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect Mol Biol*, 2001, 10(5): 465-474
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- Mac-Lachlan I, Nimpf J, Schneider WJ. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J Biol Chem*, 1994, 269 (39): 24127-24132
- Mekuchi M, Ohira T, Wilder MN. Characterization and expression of the putative ovarian lipoprotein receptor in the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Zool Sci*, 2008, 25(4): 428-437
- Michelis R, Meron H, Tietz A, *et al*. Putative ovarian lipoprotein receptor in the shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Marine Biology and Biotechnology Israel Oceanographic and Limnological Research Tel Shikmona - POB 8030, Haifa 31080, Israel*, 2002
- Roth Z, Khalaila I. Identification and characterization of the vitellogenin receptor in *Macrobrachium rosenbergii* and its expression during vitellogenesis. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(7): 478-487
- Schneider WJ. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int Rev Cytol*, 1996, 166: 103-137
- Stifani S. A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1990, 87(5): 1955-1959
- Sappington TW, Raikhel AS. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28(5-6): 277-230
- Tiu SHK, Benzie J, Chan SM. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. *Biol Reprod*, 2008, 79(1): 66-74
- Tufail M, Takeda M. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(3): 235-245
- Tom M, Goren M, Ovadia M. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Int J Invert Reprod Dev*, 1987, 12(1): 1-12
- Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med*, 1999, 77(3): 306-315
- Yang WJ, Ohira T, Tsutsui N, *et al*. Determination of amino acid sequence and site of mRNA express of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Exp Zool*, 2000, 287(6): 413-422

(编辑 冯小花)

Cloning and Relative Quantification Analysis of Expression of the Partial Vitellogenin Receptor cDNA/mRNA of the Crayfish *Procambarus clarkii*

LIU Hong, CUI Jun, YAN Jie, CAI Shengli^①

(College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In oviparous animals, vitellin (Vt) and vitellogenin (Vg) are of importance for early embryonic development. Vitellogenin molecules are transported into a developing egg cell through vitellogenin receptor-mediated endocytosis. At present most studies of vitellogenesis have emphasized on vitellogenin. Here we analyzed the expression of vitellogenin receptor (VgR) mRNA in order to elucidate the dynamic relationship between vitellogenin and its receptor. Total RNA was extracted from ovary and hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii* at different ovarian developmental stages. A partial cDNA fragment of 506 bp was cloned with RT-PCR using degenerated primers. Relative VgR expression levels were compared between ovary and hepatopancreas of *P. clarkii* at different ovarian developmental stages using real-time fluorescent quantitative RT-PCR. It was found that in *P. clarkii*, ovary was the major organ that expressed VtR gene and there was also VgR mRNA in hepatopancreas. During the development of ovary, the relative VgR expression reached its climax at the beginning (the oogonium proliferation stage) and then decreased along with the developmental process until it reached the minimum at the mature stage. Considering the quantity changes in ovary during the whole developmental stages, the total relative VgR expression level was calculated as the relative VgR expression level multiplied by the mean value of ovary quantity at each developmental stage. It showed an opposite trend that the minimum appeared at the beginning (the oogonium proliferation stage) and the expression level constantly increased along with the developmental process until it reached the maximum at the mature stage. The total relative VgR expression level was similar to the Vg expression level in ovary and hepatopancreas in *P. clarkia*, which was an indicator of the relationship of the receptor and its target molecule between VgR and Vg. The present study was the first report of the relationship between vitellogenin and its receptor in Decapoda crustaceans in terms of the mRNA expression. Furthermore, we constructed the phylogenetic tree based on VgR sequences to evaluate the evolutionary relationship between *P. clarkii* and the other arthropod species.

Key words *Procambarus clarkii*; Vitellogenin receptor; Cloning; Expression

① Corresponding author: CAI Shengli, E-mail: slcai@shou.edu.cn

拟沼螺(*Assiminea* sp.)营养成分分析与评价*

李 涛¹ 马 甦^{1①} 徐 涛²

(1. 中国海洋大学 青岛 266003; 2. 山东省渔业技术推广站 济南 250013)

摘要 采用凯氏定氮法及索氏抽提法对拟沼螺(*Assiminea* sp.)的基本营养成分以及氨基酸、脂肪酸的组成进行了测定和分析,并与蓝蛤、淡水钩虾、沙蚕、卤虫、轮虫等饵料生物进行了比较。结果显示,拟沼螺的粗蛋白含量为 67.76%,高于比较组的饵料生物,水分含量最低为 42.57%,粗脂肪含量为 10.4%,高于蓝蛤、淡水钩虾和沙蚕;拟沼螺氨基酸组成全面,富含鱼虾生长所必需的各种氨基酸,总量达 58.51%,必需氨基酸相对含量为 46.62%,与蓝蛤(46.17%)、卤虫(47.31%)、轮虫(45.69%)、沙蚕(49.48%)的值接近,远大于 WHO/FAO 推荐模式(35.38%),但略低于鸡蛋蛋白模式(48.08%)。另外,拟沼螺的呈味氨基酸总量较高,是淡水钩虾的 2.5 倍。根据氨基酸评分或化学评分,拟沼螺的第一限制氨基酸均为缬氨酸。分析比较必需氨基酸指数,拟沼螺的必需氨基酸组成更接近中国对虾和斑节对虾的必需氨基酸组成。拟沼螺体内脂肪酸种类齐全,饱和脂肪酸含量为 54.64%,多不饱和脂肪酸含量为 27.45%,EPA(二十二碳五烯酸)含量为 9.56%,DHA(二十二碳六烯酸)含量为 4.46%。营养成分分析结果表明,拟沼螺氨基酸组成全面,必需氨基酸含量高,脂肪酸种类齐全,含有较多多不饱和脂肪酸,能够满足对虾生长对氨基酸、脂肪酸等各种营养物质的利用需求,在促进对虾生长、提高免疫力等方面具有许多潜在功效,是一种优质的生物饵料。

关键词 拟沼螺;营养成分;氨基酸;脂肪酸

中图分类号 S91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0090-07

拟沼螺(*Assiminea* sp.)隶属于软体动物门、中腹足目、前腮亚纲、拟沼螺科,个体小(成体在 4 mm 左右),螺壳质地薄脆,在咸、淡水域中均有分布,匍匐于水草或在水底爬行,以碎屑、藻类和水生植物为食,生命力强,繁殖迅速,水体条件适宜时,能在较短的时间内形成优势种群。拟沼螺一直作为生物饵料,被广泛地应用于对虾养殖产业。生物饵料具有增殖速度快、便于定向筛选、营养均衡丰富、适口性强,可增强养殖对象的抗病力等优势(孙晓庆等, 2006),在我国北方地区的对虾生态养殖中应用普遍。在苗种入池前首先对养殖水体施肥,移植拟沼螺、藻钩虾等饵料生物,随着水温升高,饵料生物不断繁殖,在虾池内建立人工生态系统。一方面为对虾提供大量天然饵

料,增强对虾抗病力,减少投饵量,降低养殖成本;另一方面,移植的饵料生物可摄食虾池的有机质,使虾池物质循环畅通,净化养殖水体(张士华等, 2002),从而实现对虾养殖系统的生态调控。郭登勇(2005)¹⁾研究发现,伪才女虫、藻钩虾和拟沼螺 3 种移植生物可摄食池塘底质有机物,拟沼螺的摄食强度最大,底质有机物移除率达 20.9%。另外,移植饵料生物如拟沼螺、藻钩虾,可以改变虾池底质理化环境、降低氨氮,同时拟沼螺等饵料生物自身所富含的营养免疫成分,对对虾的生长有明显的促进作用,可有效预防对虾暴发病毒病(张士华等, 2002),提高养殖效益。合理利用生物饵料,可以实现对虾的健康养殖(崔慧敏, 2004)。

* 公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)资助。李 涛, E-mail: Aquacultureskill@sina.cn

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

收稿日期: 2013-11-24, 收修改稿日期: 2014-01-05

1) 郭登勇. 南美白对虾生态调控养殖技术研究. 中国农业大学硕士学位论文, 2005, 10-32

对虾白斑综合征(WSSV)自暴发以来,严重阻碍了中国对虾产业的健康发展。据文献记载,对虾天然饵料如轮虫、卤虫、沙蚕、桡足类、端足类均可检测出WSSV(刘家举, 2013)¹⁾,但病毒携带量有差异,沙蚕携带WSSV量最高,蓝蛤和拟沼螺携带量最低,7月病毒量较高,4月与9月病毒量较低(何建国等, 1999)。综上所述,拟沼螺在对虾养殖中的普遍应用和取得的良好效果,一定程度上也说明拟沼螺具备作为优质生物饵料大规模推广的潜力。

拟沼螺是一种优良饵料生物,但针对拟沼螺的营养成分的研究却一直未见报道,为了更全面地了解 and 评价拟沼螺在生物饵料方面的功效,本研究通过对拟沼螺基本营养成分的测定和分析,为拟沼螺的应用和推广提供基础营养学数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用螺均采自山东省胶州宝荣水产科技有限公司对虾养殖池塘,拟沼螺壳长(3.55±0.21) mm,体重(0.009±0.001) g。经暂养排污、清洗外壳附着杂物处理后,计算其含肉率。鉴于单个螺体过小,无法逐一去壳取肉测定组分,故将具壳拟沼螺烘干至恒重,用组织粉碎机粉碎成粉末状,置于干燥器中保存待用。脂肪酸测定所需样品经冷冻干燥、研磨后单独保存。

1.2 实验方法

水分测定: 105℃烘干至恒重,计算差值。

粗蛋白测定: 凯氏定氮法(黄伟坤等, 1979),将样品用硫酸消化后直接蒸馏,用硼酸溶液吸收,盐酸标准溶液滴定。

粗脂肪测定: 采用索氏抽提法(黄伟坤等, 1979),样品在 55℃条件下抽提脂肪 6 h 以上,分析纯乙醚作为抽提剂。

糖类测定: 硫酸-苯酚显色测定法(林海等, 2012),制备拟沼螺干粉,氢氧化钠溶液水浴提取总糖,定容,加苯酚和浓硫酸,显色并测定光密度,根据标准曲线测定总糖含量。

粗灰分测定: 样品在电炉上经碳化预处理后,移至 550℃马弗炉灼烧至恒重(何建国等, 1999)。

氨基酸测定: 采用盐酸水解法(黄伟坤等, 1979)(色氨酸被水解,未测出),使用 6 mol/L 分析纯 HCl 水解,样品委托国家水产品质量监督检验中心测定。

脂肪酸测定: 气相色谱法。拟沼螺经冷冻干燥后,在研钵中充分研磨,取 100 mg 样品于 10 ml 刻度具塞试管中,加 1 mol/L KOH-甲醇溶液 3 ml, 75℃水浴中加热 25 min, 放置冷却,加 2 mol/L HCl-甲醇溶液 3 ml, 75℃水浴中加热 25 min, 放置冷却后加正己烷 1 ml, 振荡萃取、过夜,加水分层,静置后取上清液 400 μl 至新的离心管, 1000 r/min 离心 2 min, 用微量进样器取上清液 1 μl, 上机进样。

螺肉营养价值评价方法: 营养价值评定根据世界卫生组织/联合国粮农组织(WHO/FAO)推荐的蛋白质模式和中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所提出的鸡蛋蛋白模式(许贻斌等, 2008), 分别进行氨基酸评分(Amino Acid Score, AAS)和化学评分(Chemical Score, CS), 必需氨基酸指数(EAAI)的计算参照 Penafiorida(冯东勋, 1997)的方法。

$$AAS = \frac{\text{待测样品蛋白质中必需氨基酸的含量(mg/g)N}}{\text{蛋白质评分标准模式中氨基酸含量(mg/g)N}}$$

$$CS = \frac{\text{待测样品蛋白质中必需氨基酸的含量(mg/g)N}}{\text{鸡蛋蛋白评分标准模式中氨基酸含量(mg/g)N}}$$

式中, (mg/g)N=必需氨基酸含量(mg)/16。

$$EAAI = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n \frac{A_i}{a_i}}$$

式中, A_i 为饵料生物中某必需氨基酸占必需氨基酸总量的百分数, a_i 为参比蛋白中该必需氨基酸占必需氨基酸总量的百分数。

2 结果与分析

2.1 拟沼螺的基本营养成分

拟沼螺及其他几种饵料生物的成分测定结果见表 1。从表 1 可以看出,拟沼螺全脏器中所含水分 42.57%, 明显低于蓝蛤、淡水钩虾等其他饵料生物,表明同等重量的鲜物质中,拟沼螺具有较少的水分和更多的营养物质;拟沼螺的粗蛋白含量为 67.76%, 高于蓝蛤、淡水钩虾、沙蚕等饵料生物,是一种高蛋白饵料;其灰分含量为 12.83%, 高于淡水钩虾的 10.55%;粗脂肪含量为 10.4%, 高于蓝蛤的 8.12%和淡水钩虾的 8.92%。此外,拟沼螺体内含有较高比例的多糖,其粗糖含量为 8.55%, 远高于蓝蛤的 4.50%。

2.2 拟沼螺蛋白质的氨基酸组成及评价

拟沼螺蛋白质的氨基酸组成见表 2。

1) 刘家举. 对虾饵料生物携带 WSSV 的风险评估及红肉河蓝蛤对凡纳滨对虾抗病力的影响. 中国海洋大学硕士学位论文, 2013, 15-51

表1 拟沼螺和其他几种饵料生物的基本营养成分对比
Tab.1 The nutritional compositions of *Assimineea* sp. and other food organisms

名称 Items	水分 Moisture (%)	灰分 Ash (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude fat (%)	糖分 Sugar (%)
拟沼螺 <i>Assimineea</i> sp.	42.57	12.83(7.37)	67.76(39.13)	10.4(6.03)	8.55(4.91)
蓝蛤 <i>Aloididae aloidis</i> (吴海歌等, 2001)	86.25	25.98(13.75)	61.51(8.46)	8.12(1.12)	4.50(0.61)
淡水钩虾 Fresh water gammarid(申志新等, 2010)	64.51	10.55(3.65)	45.15(15.95)	8.92(3.17)	—
卤虫 Brine shrimp(童圣英等, 1988)	89.00	10.00(1.10)	61.82(6.80)	20.0(2.20)	—
轮虫 Rotifer(童圣英等, 1988)	88.80	8.04(0.90)	65.18(7.30)	24.1(2.70)	—
沙蚕 <i>Perineries aibuhitensis</i> (滕瑜等, 2004)	82.49	24.35(4.26)	50.79(8.89)	8.06(1.41)	—

注：括号外为湿重百分比，括号内为干重百分比，“—”为未检测数据

Notes: Wet weight percentages are outside the brackets, dry weight percentages are shown inside. —. Not determined

表2 拟沼螺及其他几种饵料生物的氨基酸含量(%)
Tab.2 The contents of amino acids in *Assimineea* sp. and other food organisms (%)

氨基酸 Amino acids		拟沼螺 <i>Assimineea</i> sp.	蓝蛤 <i>A. aloidis</i>	淡水钩虾 Fresh water gammarid	卤虫 Brine shrimp	轮虫 Rotifer	沙蚕 <i>P. aibuhitensis</i>
必需氨基酸 Essential amino acids (%)	苏氨酸 Thr	2.95	2.89	2.34	1.70	3.30	2.02
	缬氨酸 Val	2.64	2.05	0.14	3.20	4.10	2.35
	异亮氨酸 Ile	2.26	1.82	1.58	2.60	3.20	2.37
	亮氨酸 Leu	3.77	3.28	2.28	6.10	6.20	3.87
	苯丙氨酸 Phe	3.52	1.87	2.23	3.20	3.90	2.33
	赖氨酸 Lys	4.71	3.12	1.75	6.10	5.80	4.30
	蛋氨酸 Met	1.51	0.96	2.62	0.90	0.90	1.68
半必需氨基酸 Half essential amino acids (%)	组氨酸 His	1.89	1.08	2.79	1.30	1.50	1.41
	精氨酸 Arg	4.02	5.01	5.61	5.00	4.50	3.64
非必需氨基酸 Non-essential amino acids (%)	丝氨酸 Ser	2.95	2.35	2.51	4.60	4.10	1.99
	天门冬氨酸 Asp	6.16	4.62	2.34	7.50	8.30	4.61
	□△谷氨酸 Glu	3.90	6.38	3.01	8.80	10.00	7.71
	□△甘氨酸 Gly	4.65	3.42	0.82	3.40	3.10	2.77
	□丙氨酸 Ala	6.73	4.46	2.40	4.10	3.90	3.67
	胱氨酸 Cys	1.32	0.64	2.05	0.40	0.70	0.49
	酪氨酸 Tyr	3.14	1.65	0.59	3.70	3.20	2.10
	脯氨酸 Pro	2.38	2.22	1.89	4.70	6.40	1.13
	非必需氨基酸总量 NEAA(%)	31.23	25.74	15.61	37.20	39.70	24.47
必需氨基酸总量 EAA(%)	27.28	22.08	21.33	30.10	33.40	23.97	
呈味氨基酸总量 DAA(%)	21.44	18.88	8.57	16.70	25.30	18.76	
氨基酸总量 TAA(%)	58.51	47.82	36.94	67.30	73.10	48.44	
非必需氨基酸相对含量	0.534	0.538	0.423	0.553	0.543	0.505	
必需氨基酸相对含量	0.466	0.462	0.577	0.447	0.457	0.495	
呈味氨基酸相对含量	0.366	0.395	0.232	0.248	0.346	0.387	
必需氨基酸指数 EAAI	0.812	0.763	0.652	0.646	0.748	0.808	

注：标“□”为呈味氨基酸，标“△”为免疫氨基酸，EAAI以凡纳滨对虾肌肉蛋白为参比计算，参考文献同表1

Notes: “□”means delicious amino acid, “△”means immune amino acid, EAAI is calculated by South America white shrimp muscle protein as reference, reference is the same as in Table 1

由表 2 可知, 拟沼螺的氨基酸组成全面且丰富, 富含人体及鱼虾蟹等生长所需的各种氨基酸。拟沼螺的氨基酸总量(TAA)为 58.51%, 高于淡水钩虾、蓝蛤和沙蚕的氨基酸总量, 但低于卤虫和轮虫。必需氨基酸中, Thr、Val、Ile、Leu、Phe、Lys 的含量都高于蓝蛤及淡水钩虾中对应含量。非必需氨基酸中, Asp、Ala 的含量都高于所比较的其他几种饵料生物, Gly 作为具有一定免疫增强功效的氨基酸的主要成分, 在拟沼螺中也含有较高的比例。Asp、Glu、Gly、Ala 是主要的呈味氨基酸, 拟沼螺呈味氨基酸总量(DAA)为 21.44%, 仅低于轮虫的 25.30%。

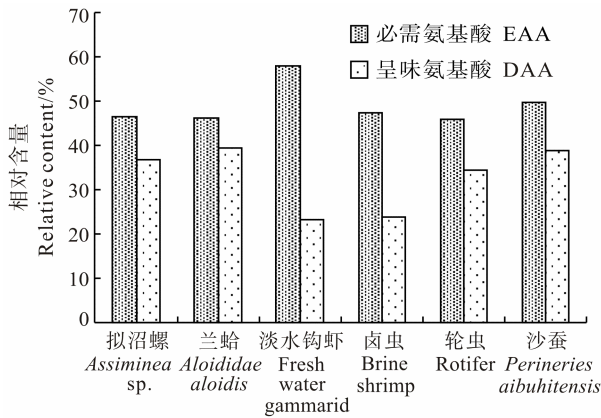


图 1 拟沼螺和其他几种饵料生物的必需氨基酸含量和呈味氨基酸含量比较

Fig.1 The comparison of the essential amino acid and delicious amino acid in *Assiminea* sp. and other food organisms

由图 1 可以看出, 拟沼螺的必需氨基酸含量为 46.62%, 低于淡水钩虾的 57.74%, 与其他几种饵料生物相近, 均接近 50%。呈味氨基酸方面, 拟沼螺的呈味氨基酸含量较高, 呈味氨基酸含量为 36.64%, 远大于钩虾和卤虫的含量。

参考王娟(2013)所测定的中国对虾、南美白对虾和斑节对虾的必需氨基酸组成, 分别以 3 种对虾肌肉蛋白作为参比, 计算必需氨基酸指数(EAAI), 结果如表 3 所示, 拟沼螺的 EAAI 值高于其他几种饵料生物。以中国对虾和斑节对虾肌肉为参比蛋白的 EAAI 值高于以南美白对虾肌肉为参比蛋白的 EAAI 值。

结合表 4 所列数据, 分析拟沼螺的 AAS 值和 CS 值可以发现, 拟沼螺的第一限制氨基酸为缬氨酸。根据 AAS 确定的拟沼螺第二限制氨基酸为亮氨酸, 依据 CS 值得出的第二限制氨基酸为异亮氨酸。

2.3 拟沼螺的脂肪酸组成及分析

表 5 数据表明, 拟沼螺中所含脂肪酸种类齐全,

表 3 拟沼螺和其他几种饵料生物的必需氨基酸指数
Tab.3 The content of EAAI in *Assiminea* sp. and other food organisms

种类 Species	EAAI 中国对虾	EAAI 南美白对虾	EAAI 斑节对虾
拟沼螺 <i>Assiminea</i> sp.	0.834	0.812	0.815
蓝蛤 <i>A. aloidis</i>	0.784	0.763	0.765
钩虾 Fresh water gammarid	0.669	0.652	0.653
卤虫 Brine shrimp	0.663	0.646	0.647
轮虫 Rotifer	0.768	0.748	0.749
沙蚕 <i>Perineries aibuhitensis</i>	0.830	0.808	0.810

表 4 拟沼螺的氨基酸评分(AAS)和化学评分(CS)
Tab.4 The contents of amino acids in *Assiminea* sp. by AAS and CS

氨基酸 Amino acids	含量 Content (mg/g) (N)		拟沼螺 <i>Assiminea</i> sp.	
	FAO/W HO 模式	鸡蛋蛋白模式 Egg protein pattern	含量 Content (mg/g) (N)	AAS CS
异亮氨酸 Ile	250	331	141	0.56 0.43
亮氨酸 Leu	440	534	236	0.54 0.44
赖氨酸 Lys	340	441	295	0.87 0.67
苏氨酸 Thr	250	292	185	0.74 0.63
缬氨酸 Val	310	411	165	0.53 0.40
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	220	386	176	0.80 0.46
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	380	565	416	1.09 0.74

包括了饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸, 共检测出 15 种脂肪酸, 占总脂肪酸的 89.12%。对虾生长所必需的脂肪酸为亚油酸、亚麻酸、EPA 和 DHA, 在拟沼螺中的含量分别为 4.27%、2.16%、9.56% 和 4.46%。拟沼螺中不饱和脂肪酸含量为 54.64%, 其中单不饱和脂肪酸为 27.19%, 与多不饱和脂肪酸的 27.45% 差异不显著, 多不饱和脂肪酸中 EPA 和 DHA 的含量较高, 合计为 14.02%。拟沼螺的脂肪酸组成中, 饱和脂肪酸都以棕榈酸为主, 含量为 20.34%, 单不饱和脂肪酸中含量较多的为棕榈油酸和油酸。与其他饵料生物比较可知, 拟沼螺的不饱和脂肪酸的总量为 54.64%, 高于钩虾的 50.5%, 却低于卤虫和轮虫的不饱和脂肪酸总量, 但是, 拟沼螺体内的 EPA 和 DHA 总量是卤虫和轮虫的 6-7 倍(图 2)。

3 讨论

3.1 蛋白质与多糖

蛋白质是对虾人工配合饲料的主要成分。谭北平

表5 拟沼螺和其他饵料生物的脂肪酸种类及含量(%)
Tab.5 The compositions and contents of fatty acid in *Assiminea* sp. and other food organisms(%)

脂肪酸 Fatty acids	拟沼螺 <i>Assiminea</i> sp.	蓝蛤 <i>A. aloidis</i>	卤虫 Brine shrimp	轮虫 Rotifer
肉豆蔻酸 C14:0	4.81	3.6	0.9	4.6
十四碳不饱和脂肪酸 C14:1	1.04	—	—	—
棕榈酸 C16:0	20.34	20.5	11.4	8.9
棕榈油酸 C16:1	13.39	5.8	3.2	18.9
硬脂酸 C18:0	4.99	4.2	6.0	1.6
油酸 C18:1	8.44	6.9	28.7	9.0
亚油酸 C18:2	4.27	3.0	6.6	15.7
亚麻酸 C18:3	2.16	1.2	27.6	10.2
十八碳四烯酸 C18:4	4.01	—	—	—
花生酸 C20:0	4.34	—	3.1	0.3
花生烯酸 C20:1	1.25	2.6	—	—
花生四烯酸 C20:4	2.99	5.0	0.3	1.1
EPA C20:5	9.56	12.2	2.3	1.9
二十二碳一烯酸 C22:1	3.07	—	—	4.1
DHA C22:6	4.46	13.8	—	—
其他	10.88	21.2	9.9	23.7
饱和脂肪酸 SFA	34.48	28.3	21.4	15.4
不饱和脂肪酸 UFA	54.64	50.5	68.7	60.9
单不饱和脂肪酸 MUFA	27.19	15.3	31.9	32.0
多不饱和脂肪酸 PUFA	27.45	35.2	36.8	28.9
EPA+DHA	14.02	26.0	2.3	1.9

注：“—”为未检测数据，参考文献同表1

Notes: —. Not determined, reference is the same as in Tab.1

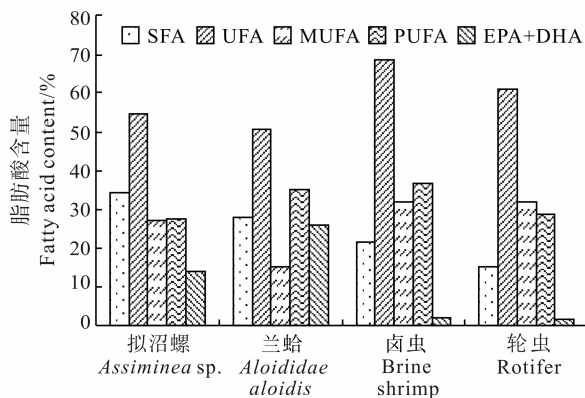


图2 拟沼螺和其他几种饵料生物中不同种类脂肪酸含量的比较

Fig.2 The comparison of fatty acids in *Assiminea* sp. and other food organisms

等(2001)研究发现,海水南美白对虾幼虾对蛋白的需要量为37.6%,成虾的需要量为30%。拟沼螺粗蛋白含量67.76%(干重),高于其他饵料生物,完全可以满足对虾生长的蛋白质需求。拟沼螺体内粗糖含量达8.55%,是蓝蛤的两倍。多糖是生物体内普遍存在的

一类生物大分子,具有免疫促进和调节、抗菌、抗病毒、抗氧化等多种生物活性(江霞等,2009)。拟沼螺体内的丰富多糖资源在提供能源的同时,也可能具备潜在的免疫增强功效。

3.2 氨基酸组成与评价

氨基酸是蛋白质的基本组成单位,20种氨基酸都是机体必需的,它们影响着淋巴器官的发育、细胞免疫和体液免疫,对生物的机体具有重要的免疫作用。一部分氨基酸可以在机体内合成,或者由别种氨基酸转变而成,另一部分却必须由食物中蛋白质供给。据报道,南美白对虾所必需的氨基酸有10种:缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸(黄凯等,2002),除色氨酸水解未检测出外,拟沼螺体内富含对虾生长发育所必需的9种氨基酸。赖氨酸、精氨酸和蛋氨酸是南美白对虾饲料中的3种限制性氨基酸,赖氨酸为第一限制性氨基酸。拟沼螺体内赖氨酸含量高达4.71%,是淡水钩虾的3倍,可以满足对虾生长发育过程中对赖氨酸的营养需求。

拟沼螺中必需氨基酸(EAA)的比例远高于 WHO/FAO 模式推荐值(35.38%)(李晓英等, 2010), 略低于鸡蛋蛋白模式推荐值(48.08%)。根据 WHO/FAO 模式标准, 理想蛋白质中, 必需氨基酸约占总氨基酸的 40%, 说明拟沼螺是一种理想的蛋白质来源。拟沼螺呈味氨基酸含量显著高于淡水钩虾和卤虫中的含量, 较高比例的呈味氨基酸使拟沼螺呈现独特的鲜味, 肉质鲜嫩, 是对虾喜食的饵料生物。

饵料蛋白质中的必需氨基酸组成越接近动物体的氨基酸组成, 就越容易满足动物体合成蛋白质的营养需要, 其营养价值也就越高, 对动物体的生长贡献越大(李晓英等, 2010)。必需氨基酸指数(EAAI)反映了饵料蛋白源必需氨基酸组成与养殖对象的必需氨基酸组成的拟合程度, 以养殖对象蛋白作为参比蛋白, 必需氨基酸指数(EAAI)的大小与饵料蛋白源对养殖对象的营养价值高低呈正比关系(许贻斌等, 2008)。以南美白对虾肌肉蛋白为参比计算的拟沼螺 EAAI 值为 0.812, 小于以中国对虾和斑节对虾肌肉蛋白为参比计算所得 EAAI 值, 说明拟沼螺的必需氨基酸组成更接近中国对虾和斑节对虾, 将拟沼螺作为生物饵料用于中国对虾和斑节对虾的养殖, 会取得更良好的养殖效果。

3.3 脂肪酸组成

研究表明, 亚麻酸、亚油酸、EPA、DHA 四种多不饱和脂肪酸是对虾的必需脂肪酸(EFA), 其适宜含量分别为 0.3%、0.3%、0.4%、0.4%, 必需脂肪酸(EFA)的含量是决定生物营养价值的重要因素(谭北平等, 2001)。拟沼螺内脏团中检测到 4 种必需脂肪酸, 总量为 20.45%。其中, EPA、DHA 是鱼油的特征氨基酸, 具有增强免疫的功效(翁幼竹等, 2001), 拟沼螺中 EPA 和 DHA 总量为 14.02%, 是卤虫和轮虫的 7 倍, 将其作为饵料生物可增强养殖对象的免疫力。

4 结语

拟沼螺氨基酸组成全面, 必需氨基酸含量高, 脂肪酸种类齐全, 含有较多多不饱和脂肪酸, 能够满足对虾生长对氨基酸、脂肪酸等各种营养物质的利用需

求, 在促进对虾生长、提高免疫力等方面具有许多潜在功效, 是一种优质生物饵料。

参 考 文 献

- 王娟. 中国对虾、南美白对虾和斑节对虾肌肉营养成分的比较. 食品科技, 2013, 38(6): 146-150
- 冯东勋. 必需氨基酸指数(EAAI)在饲料中的应用. 饲料工业, 1997(3): 21-22
- 申志新, 王国杰, 唐文家, 等. 青海淡水钩虾的营养分析及评价. 青海农牧业, 2010(1): 34-39
- 江霞, 徐铭, 殷彦君, 张丽. 多糖的生物活性及其在动物生产中的应用. 中国畜牧兽医, 2009, 36(1): 31-33
- 孙晓庆, 董树刚. 生物饵料在水产养殖中的综合应用现状. 齐鲁渔业, 2006, 23(10): 31-33
- 许贻斌, 沈铭辉, 魏永杰, 等. 两种东风螺的营养成分分析与评估. 台湾海峡, 2008, 27(1): 26-32
- 何建国, 周化民, 姚伯. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65-69
- 李晓英, 董志国, 阎斌伦, 等. 青蛤与文蛤的营养成分分析与评价. 食品科学, 2010, 31(23): 366-370
- 吴海歌, 刘发义, 李光友. 兰蛤营养成分的研究. 黄渤海海洋, 2001, 19(3): 82-86
- 张士华, 杨秀霞, 林式柱, 等. 几种对虾在黄河三角洲地区生长及移植饵料生物效果的比较分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2002, 32(4): 543-550
- 林海, 韩凯宁, 杨红丽. 正交实验优化脉红螺多糖的提取. 现代食品科技, 2012, 28(4): 438-440
- 翁幼竹, 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹幼体饵料蛋白质的营养价值评价. 台湾海峡, 2001, 20(Z1): 11-15
- 崔慧敏. 利用生物饵料无公害健康养虾技术. 齐鲁渔业, 2004, 21(1): 4-5
- 黄凯, 周洪琪. 南美白对虾营养研究进展. 广西水产科技, 2002(1): 32-37
- 黄伟坤, 赵国君, 赖献桐. 食品化学分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, 11-39
- 童圣英, 林成辉, 王雪涛. 蒙古裸腹蚤营养成分分析与评价. 大连水产学院学报, 1988, 3(Z1): 29-33
- 谭北平, 阳会军, 朱旺明. 南美白对虾的营养需要. 广东饲料, 2001, 10(6): 35-37
- 滕瑜, 王印庚, 王彩理. 沙蚕的营养分析与功能研究. 海洋科学进展, 2004, 22(2): 215-218

(编辑 刘丛力)

Nutritional Analysis and Appraisalment of *Assiminea* sp.

LI Tao¹, MA Shen^{1①}, XU Tao²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Shandong Province Fisheries Technology Extension Station, Jinan 250013)

Abstract The basic nutrients, amino acids and fatty acids composition of *Assiminea* sp. were determined and analyzed, and were compared with *Aloidiidae aloidis*, fresh water gammarid, *Perineries aibuhitensis*, brine shrimp and rotifer. The results showed that the protein content of *Assiminea* sp. was 67.76%, which was higher than other organisms; moisture content was 42.57%; crude fat content was 10.4%, which was higher than the *A. aloidis*, fresh water gammarid and *P. aibuhitensis*; the amino acid composition of the *Assiminea* sp. was comprehensive and rich that the total amino acid was 58.51% and the relative contents of essential amino acids 46.62%, which was close to the value of *A. aloidis* (46.17%), brine shrimp (47.31%), rotifers (45.69%), *P. aibuhitensis* (49.48%). The value of essential amino acids was higher than the WHO/FAO pattern (35.38%), but slightly lower than the egg protein pattern (48.08%). In addition, the total delicious amino acid was 2.5 times of fresh water gammarid and valine was the first limiting amino acid according to the values of AAS and CS. The EAAI of *Assiminea* sp. was similar to the *Penaeus chinensis* and the *Penaeus japonicas* Bate. All kinds of fatty acids were found in *Assiminea* sp., and the content of unsaturated fatty acid was 54.64% including 27.45% polyunsaturated fatty acid, 9.56% EPA and 4.46% DHA.

Key words *Assiminea* sp.; Nutrition composition; Amino acid; Fatty acid

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

马氏珠母贝转录组数据的重新组装*



陈 琼 顾志峰 王爱民 战 欣 石耀华^①

(海南大学海洋学院 热带生物资源教育部重点实验室 海南省热带水生生物技术重点实验室 海口 570228)

摘要 对本实验室和其他学者已经发表的马氏珠母贝外套膜和珍珠囊的 454 焦磷酸测序转录组数据以及 NCBI 中的 EST 数据进行了重新组装、同源序列比对和 GO 注释分析。重新组装获得了 30266 个 contig, 平均长度 522 bp, 其中最长的 contig 为 4144 bp; NR 数据库 BLAST 分析获取了 2310 个相似性 contig ($E \leq 10^{-5}$), 其中 1902 个在模式动物(人、小鼠、海胆、线虫、斑马鱼、果蝇或者太平洋牡蛎和珠母贝)中可以查找到同源序列。基因注释(GO)结果表明, 注释到生物学过程的 3846 个 contig 可分为 23 个亚类, 其中代谢过程蛋白、细胞过程蛋白和生物学调控蛋白为 contig 数量最多的 3 个亚类; 注释到分子功能的 4601 个 contig 共分为 11 个亚类, 其中结合蛋白的 contig 数量最多, 其次是具有催化活性的蛋白和结构分子活性蛋白; 注释到细胞成分的 2992 个 contig 分为 17 个亚类, 其中细胞和细胞组成部分的 contig 数量最多, 其次分别是细胞器和大分子复合体 contig 数量。本研究结果有助于开展外套膜和珍珠囊特异性表达基因的大规模筛选。

关键词 马氏珠母贝; 外套膜; 珍珠囊; 转录组; 454 焦磷酸测序

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0097-06

马氏珠母贝又称合浦珠母贝(*Pinctada fucata martensii* Dunker, *P. fucata*, *P. martensii*), 是我国培育海水珍珠的主要贝类(Guo *et al.*, 1999; 王爱民等, 2010; Wang *et al.*, 2011; 顾志峰等, 2012)。虽然马氏珠母贝贝壳内部的珍珠质层和外部的棱柱层均由碳酸钙组成, 但是棱柱层是无光泽的方解石, 而紧邻内部的珍珠质层则是有光泽的文石(Zhan *et al.*, 2013)。马氏珠母贝可以培育海水游离珍珠, 因而是研究生物矿化的理想模式生物。马氏珠母贝贝壳的文石和方解石中均含有不超过 5%的以蛋白质为主的生物大分子, 其在贝壳的形成中发挥着关键性作用(Belcher *et al.*, 1996; Joubert *et al.*, 2010)。因此, 这些决定贝壳形成的蛋白质基因即矿化基因的筛选是阐明贝壳生物矿化形成机理的前提与基础。

采用贝壳和珍珠的蛋白质成分分析、抑制差减杂

交筛选等技术已经鉴定了许多参与贝壳棱柱层和珍珠质层形成的矿化基因(Sudo *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2011)。尽管如此, 贝壳的形成和生物矿化是一个多基因控制的过程, 筛选鉴定更多的矿化基因仍然是很有必要的基础性工作。为此, 应用第二代测序技术对参与马氏珠母贝贝壳和珍珠形成的外套膜及珍珠囊开展了较多的大规模转录组测序(Kinoshita *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013; Zhan *et al.*, 2013)。基于经费等方面的制约, 虽然测序数据量已经很多, 但并不是很完整, 每个报道中均有较多的 singleton, 组装后的 contig 序列长度也较短, 而且没有采用他人已经发表的数据。因此, 本研究对已经发表的 454 测序技术获取的马氏珠母贝的珍珠囊和外套膜的转录组数据以及 NCBI 中马氏珠母贝 EST 数据进行重新组装和分析, 为进一步开展芯片杂交筛选矿

* 国家自然科学基金(41366003)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB126405)共同资助。陈 琼, E-mail: joise234@sina.com

^① 通讯作者: 石耀华, 教授, E-mail: stone70@126.com

收稿日期: 2013-12-25, 收修改稿日期: 2014-05-02

化基因等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

Shi 等(2013) 454 焦磷酸测序获取的马氏珠母贝外套膜组织 220824 个 reads, Zhan 等(2013)焦磷酸测序获取的马氏珠母贝珍珠囊 86121 个 reads, Kinoshita 等(2011)焦磷酸测序获取的马氏珠母贝外套膜外缘组织 32388 个 reads、外套膜制备细胞小片相应部位组织 174872 个 reads 和珍珠囊组织 183265 个 reads (<http://trace.ddbj.nig.ac.jp/DRAsearch/submission?acc=DRA000393>), 以及 2012 年 10 月 31 日从 NCBI 下载的 19073 个马氏珠母贝 EST 序列。

1.2 数据组装与分析

采用软件 CLC Genomics Workbench 5(默认参数)对以上转录组数据进行序列拼接形成 contig, 并对照 NR 库(Non-redundant GenBank CDS, Database: All translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects, Date: Apr 8, 2012, 12:23 AM)进行同源性查找比对, BLAST 参数为: blastx-db/nr-out result.txt-evalue 1e-5-max_target_seqs1-outfmt "6 qseqid qlen sseqid slen evalue score length"。

查找到同源性的 contig 进行基因注释(Gene ontology annotation, GO), 将其分别归类于生物学过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)和细胞成分(Cellular component, CC) 3 大类。由于同一个 contig 可能同时归类于几个亚类别, 因此每一大类的百分数之和均可能超过 100% (Vizcaino *et al.*, 2006)。

2 结果

2.1 序列拼接组装

用于组装的 816543 个 reads 或者 EST 序列中, 有 129131 个序列不能与其他任何序列组装(称为 singleton), 其余的 687412 个可以比对拼接上, 共组装成 30266 个 contig, 其中的 29666 个 contig 序列超过 200 bp。contig 最长的为 4144 bp, 平均长度为 522 bp (表 1)。

Contig 中各种核苷酸的数量不相同, 其中腺嘌呤(Adenine, A)和胸腺嘧啶(Thymine, T)的含量较高, 分别占 32.80%和 31.80%; 鸟嘌呤(Guanine, G)显著低于腺嘌呤和胸腺嘧啶, 仅占 contig 中核苷酸的 18.40%; 胞嘧啶(Cytosine, C)的含量最低, 仅占 16.50%; 此外

表 1 拼接组装序列信息
Tab.1 Assembly information

	组装特征 Characters	数量 Number
用于拼接的序列 Assembled reads or EST	拼接组装上的序列 Matched reads or EST	687412
	未拼接组装上的序列 Not matched reads or EST	129131
	小计 Total	816543
拼接后的 contigs Assembled contigs	contig 总数 contig number	30266
	最长序列 Maximum length of contigs (bp)	4144
	序列平均长度 Average length of contigs (bp)	522

还有约 0.50%难以区分的核苷酸(N)。

2.2 序列相似性

NR 库 BLAST 分析结果显示, 有 7597 个 contig 可以找到相似性序列, 其中 E 值小于或者等于 10^{-5} 的 contig 有 2310 个。2310 个具有较高序列相似性的 contig 中有 1902 个在模式动物的人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)或者珠母贝属(*Pinctada*)中可以查找到同源序列。 E 值小于或者等于 10^{-5} 的水平上, contig 在人、斑马鱼和小鼠中的同源序列最多, 约有 1500 个 contig; 其次是果蝇, 有 1082 个 contig; 线虫和海胆的同源序列比果蝇少, 约 700 个 contig; 珠母贝属和太平洋牡蛎同源序列更少, 分别仅有 278 和 184 个 contig。在 E 值小于或者等于 10^{-10} 的水平上, contig 在上述模式动物和珠母贝属中的同源序列数量变动趋势与 E 值小于或者等于 10^{-5} 基本相似, 斑马鱼、人和小鼠中的同源序列仍然最多, 约为 1200 个 contig; 其次是果蝇, 893 个 contig; 线虫和海胆紧随果蝇之后, 约 550 个 contig; 珠母贝属和太平洋牡蛎则分别只有 220 和 158 个 contig 可以查找到同源序列(图 1)。

2.3 GO 注释

3846 个具有同源性的 contig 可以 GO 注释至生物学过程上, 并细分为多达 23 个亚类。其中, 归于代谢过程和细胞过程的 contig 最多, 分别为 75.35%和 69.99%; 归于生物学调控、生物学过程调控、对刺激的反应、定位和建立定位的 contig 也较多, 在 20.20%-11.28%之间变动; 信号蛋白、细胞的成分组

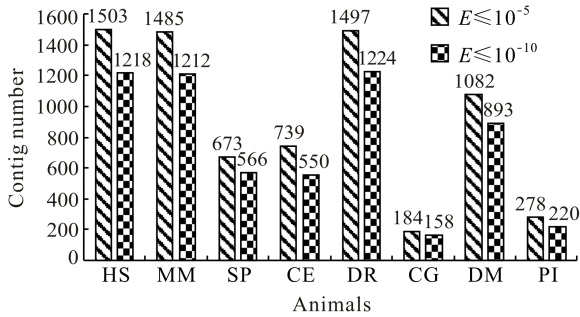


图 1 与模式动物以及珠母贝具有相似性的 contig 数量
Fig.1 Number of contigs with sequence similarity to several model animals or *Pinctada*

HS: 人; MM: 小鼠; SP: 紫海胆; CE: 秀丽隐杆线虫;
DR: 斑马鱼; CG: 太平洋牡蛎; DM: 果蝇; PI: 珠母贝
HS: *H. sapiens*; MM: *M. musculus*; SP: *S. purpuratus*;
CE: *C. elegans*; DR: *D. rerio*; CG: *C. gigas*;
DM: *D. melanogaster*; PI: *Pinctada*

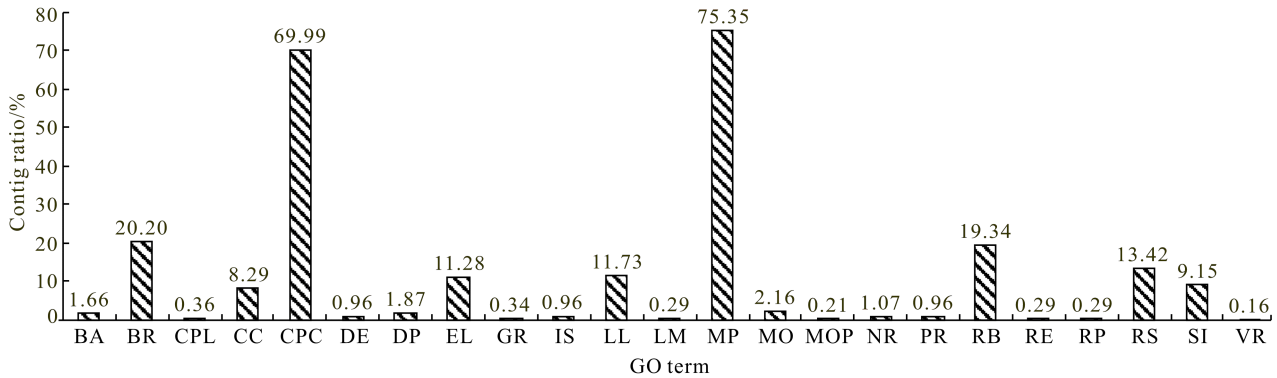


图 2 contig 的生物学过程 GO 注释
Fig.2 Gene ontology annotation of biological process for contig

BA: 生物学附着; BR: 生物学调控; CPL: 细胞扩增; CC: 细胞成分的组织或者生物学发生; CPC: 细胞过程; DE: 死亡;
DP: 发育过程; EL: 建立定位; GR: 生长; IS: 免疫系统过程; LL: 定位; LM: 运动; MP: 代谢过程; MO: 多细胞有机体过程;
MOP: 多器官进程; NR: 生物学过程负调控; PR: 生物学过程正调控; RB: 生物学过程调控; RE: 繁殖; RP: 繁殖过程;
RS: 对刺激的反应; SI: 信号; VR: 病毒繁殖

BA: biological adhesion; BR: biological regulation; CPL: cell proliferation; CC: cellular component organization or biogenesis;
CPC: cellular process; DE: death; DP: developmental process; EL: establishment of localization; GR: growth; IS: immune system
process; LL: localization; LM: locomotion; MP: metabolic process; MO: multicellular organismal process; MOP: multi-organism
process; NR: negative regulation of biological process; PR: positive regulation of biological process; RB: regulation of biological
process; RE: reproduction; RP: reproductive process; RS: response to stimulus; SI: signaling; VR: viral reproduction

可以 GO 注释到细胞成分的 contig 较少,为 2992 个,可分为 17 个亚类。归于细胞和细胞组成部分的 contig 最多而且数量相同,均是 68.22%; 其次是归于细胞器的 contig, 约占 47.46%; 大分子复合体、膜和膜组成部分的 contig 也较多,分别为 30.48%、30.21%和 22.09%; 此外,细胞器组成部分和胞外区的 contig 数量也不少,分别为 19.65%和 15.37%; 其余的胞外区组成部分、膜内包腔、胞外基质、细胞连接、细胞外基质组成部分、突触、突触组成部分、病毒粒子、

织或者生物学发生、多细胞有机体过程、发育过程、生物学附着和生物学过程负调控的 contig 虽然超过 1%,但均不足 10%; 其余与死亡、免疫系统过程、生物学过程正调控等 10 个亚类相关的 contig 均不足 1% (图 2)。

4601 个具有同源性的 contig 可以 GO 注释至分子功能上,共分为 11 个亚类。contig 数量最多的是结合蛋白和具有催化活性的蛋白,分别有 2902 和 2232 个 contig,约占 63.07%和 48.51%; 其余依次为结构分子活性蛋白、转运子活性蛋白、酶调控活性蛋白、电子载体活性蛋白、受体活性蛋白、分子转导活性蛋白和结合核酸的转录因子活性,分别占 contig 的 9.89%–1.80%不等; 比例最小的则是抗氧化活性蛋白和结合蛋白质的转录因子活性,分别为 0.93%和 0.70% (图 3)。

病毒粒子组成部分等 9 个亚类均较少,其 contig 数量都不足 4% (图 4)。

3 讨论

第二代测序技术主要有 454 焦磷酸测序、Illumina solexa 测序、Solid 等。虽然 Illumina 和 Solid 每个反应可以产生更多的数据,但 Illumina 和 Solid 测序获取的每个 read 序列长度非常短,容易导致进行序列

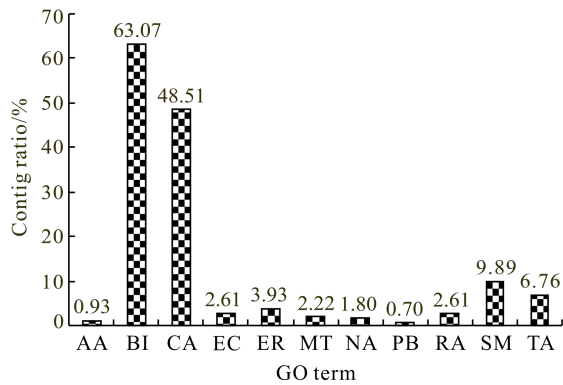


图3 contig 分子功能的 GO 注释

Fig.3 Gene ontology annotation of molecular function for contig

AA: 抗氧化活性; BI: 结合; CA: 催化活性; EC: 电子载体活性; ER: 酶调控活性; MT: 分子转导活性; NA: 结合核酸的转录因子活性; PB: 结合蛋白质的转录因子活性; RA: 受体活性; SM: 结构分子活性; TA: 转运子活性

AA: antioxidant activity; BI: binding; CA: catalytic activity; EC: electron carrier activity; ER: enzyme regulator activity; MT: molecular transducer activity; NA: nucleic acid binding transcription factor activity; PB: protein binding transcription factor activity; RA: receptor activity; SM: structural molecule activity; TA: transporter activity

拼接时同一 read 拼接位置的不确定性, 对于没有全基因组信息的物种而言这种拼接组装困难更加突出 (Zhao *et al*, 2012; Shi *et al*, 2013)。454 焦磷酸测序每个 read 序列平均长度多在 350 bp 以上, 明显长于 Illumina 和 Solid 测序, 拼接结果的可靠性显著高于 Illumina 和 Solid 测序, 并且每个反应也可以获取大

量数据, 因而是许多转录组分析的首选第二代测序技术 (Kinoshita *et al*, 2011; Yúfera *et al*, 2012)。马氏珠母贝的外套膜和珍珠囊组织转录组虽然有 Illumina 测序数据 (Huang *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2012), 但是采用 454 焦磷酸测序已经获得了大量数据, 因此, 本研究在进行数据分析时没有采用 Illumina 测序的数据, 而是将更有效可靠的 454 焦磷酸测序数据与 NCBI 中经典测序获取的 EST 数据整合进行分析, 确保数据的一致性和可靠性。

组装得到 30266 个 contig, 其中 29666 个 contig 的序列长度大于 200 bp。Shi 等 (2013) 外套膜转录组数据的组装只是获得了 3574 个长度大于 100 bp 的 contig, Zhan 等 (2013) 关于珍珠囊的转录组数据的组装也只得到 1554 个长度大于 100 bp 的 contig, 他们组装的 unique 基因中 90% 以上都是单一 read 构成的 singleton。Kinoshita 等 (2011) 虽然在结果中列出了共 29682 个 contig, 但是其每个 contig 的 read 数量为 1-2460, 很显然也将很多单个 read 列为 contig, 而且, 该研究 contig 最小的只有 118 bp, 组装的 contig 的平均长度为 495 bp, 显著小于本次重组 contig 的平均长度 522 bp。本次重组的 contig 最长为 4144 bp, 也明显长于其他报道。因而, 本次重组更好地利用了测序获取的 read 数据, 为进一步用于大规模的基因芯片杂交筛选组织特异性转录子和功能基因鉴定奠定了初步基础。

组装的 contig 中腺嘌呤和胸腺嘧啶的含量较高, 而鸟嘌呤和胞嘧啶含量较低, 这与组装的是转录组数据有关。真核生物转录的 mRNA 在加工成熟过程中

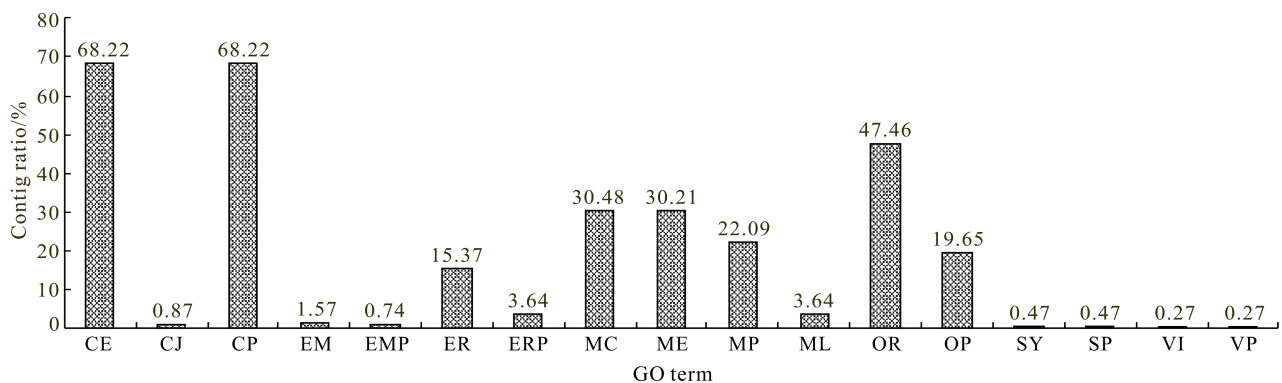


图4 contig 的细胞成分 GO 注释

Fig.4 Gene ontology annotation of cellular component for contig

CE: 细胞; CJ: 细胞连接; CP: 细胞组分; EM: 胞外基质; EMP: 细胞外基质的组成部分; ER: 胞外区; ERP: 胞外区组成部分; MC: 大分子复合体; ME: 膜; MP: 膜组成部分; ML: 膜内包腔; OR: 细胞器; OP: 细胞器组成部分; SY: 突触; SP: 突触组成部分; VI: 病毒粒子; VP: 病毒粒子组成部分

CE: cell; CJ: cell junction; CP: cell part; EM: extracellular matrix; EMP: extracellular matrix part; ER: extracellular region; ERP: extracellular region part; MC: macromolecular complex; ME: membrane; MP: membrane part; ML: membrane-enclosed lumen; OR: organelle; OP: organelle part; SY: synapse; SP: synapse part; VI: virion; VP: virion part

有 3'端加尾修饰,显著增加了腺嘌呤的数量,在测序过程中虽然只有部分转录子测序到了 3'末端,仍然会显著增加腺嘌呤的数量。因此,腺嘌呤和胸腺嘧啶的含量较高是合理的。

contig 与模式动物人、斑马鱼和小鼠的同源序列最多,其他的果蝇、线虫和海胆中同源的 contig 虽然明显比这 3 种动物低,但是大大高于珠母贝和太平洋牡蛎。虽然珠母贝与马氏珠母贝是同一属生物,而与太平洋牡蛎均属于软体动物的双壳纲,理论上应该与马氏珠母贝的同源序列更多且同源性也更高,而且太平洋牡蛎最近完成了全基因组序列的测定(Zhang *et al.*, 2012),但是,这些生物不是模式生物,与模式生物的基因组和转录组研究水平相去甚远,很多序列没有进行注释,而且注释也往往是参照模式生物,很少是直接进行功能鉴定分析后注释的。因此,很多非模式生物进行同源性查找时,与人、小鼠和斑马鱼等模式生物的同源序列最多,这里马氏珠母贝的外套膜和珍珠囊转录组分析结果也不例外。

Kinoshita 等(2011)分析的生物学过程 GO 注释中所占百分比最高的 3 个亚类与 Shi 等(2013)关于外套膜转录组的注释结果相同,依次为细胞过程蛋白、代谢过程蛋白和生物学调控蛋白;重组装后的注释中前二者的顺序发生了互换,即代谢过程蛋白高于细胞过程蛋白的 contig 数量。Zhan 等(2013)关于珍珠囊的生物学过程 GO 注释则是定位蛋白取代细胞过程蛋白进入 contig 数量第 3。

重组装后的分子功能 GO 注释中所占百分比最高的 3 个亚类与 Shi 等(2013)关于外套膜转录组的注释和 Zhan 等(2013)关于珍珠囊的注释结果相同,分别是结合蛋白、催化活性蛋白和结构分子活性蛋白。Kinoshita 等(2011)的分子功能 GO 注释结果也显示,这 3 类蛋白 contig 数量最多,而且其中的结合蛋白 contig 数量也是最高的,但其结构分子活性蛋白比催化活性蛋白的 contig 数量要少。

Shi 等(2013)和 Zhan 等(2013)关于外套膜和珍珠囊的转录组的细胞成分 GO 注释与重组装后的注释结果均显示细胞或细胞组成部分、细胞器蛋白以及大分子复合体蛋白依次是 contig 数量最多的 3 大亚类,与 Kinoshita 等(2011)的结果既有相似之处,即细胞或细胞组成部分是 contig 数量最多的,但彼此间又存在一定差异,即 Kinoshita 等(2011)注释时没有大分子复合体蛋白亚类,而是细胞器蛋白细分为非膜结合细胞器亚类和膜结合细胞器亚类,而且这两个亚类的 contig 数量分别居于第 2、3 位。

参 考 文 献

- 王爱民, 石耀华, 王嫣, 等. 马氏珠母贝生物学与养殖新技术. 北京: 中国农业科技出版社, 2010
- 顾志峰, 黄锋绍, 王海, 等. 不同海区养殖的马氏珠母贝珍珠质颜色比较. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 91-94
- Belcher AM, Wu XH, Christensen RJ, *et al.* Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*, 1996, 381(6577): 56-58
- Fang D, Xu G, Hu Y, *et al.* Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e21860
- Guo X, Ford SE, Zhang F. Molluscan aquaculture in China. *J Shellfish Res*, 1999, 18(1): 19-31
- Huang XD, Zhao M, Liu WG, *et al.* Gigabase-scale transcriptome analysis on four species of pearl oysters. *Mar Biotechnol*, 2013, 15(3): 253-264
- Joubert C, Piquemal D, Marie B, *et al.* Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 613
- Kinoshita S, Wang N, Inoue H, *et al.* Deep sequencing of ESTs from nacreous and prismatic layer producing tissues and a screen for novel shell formation-related genes in the pearl oyster. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21238
- Shi YH, Yu CC, Gu ZF, *et al.* Characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle transcriptome unravels biomineralization genes. *Mar Biotechnol*, 2013, 15(2): 175-187
- Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, 1997, 387(6633): 563-564
- Vizcaino JA, Gonzalez FJ, Suarez MB, *et al.* Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics*, 2006, 7: 193
- Wang AM, Wang Y, Gu ZF, *et al.* Development of expressed sequence tags from the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker. *Mar Biotechnol*, 2011, 13(2): 275-283
- Yúfera M, Halm S, Beltran S, *et al.* Transcriptomic characterization of the larval stage in gilthead seabream (*Sparus aurata*) by 454 pyrosequencing. *Mar Biotechnol*, 2012, 14(4): 423-435
- Zhan X, Gu ZF, Yu CC, *et al.* Expressed sequence tags 454 sequencing and biomineralization gene expression for pearl sac of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture Research*, 2013, DOI: 10.1111/are.12227
- Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54
- Zhao X, Wang Q, Jiao Y, *et al.* Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*. *Mar Biotechnol*, 2012, 14(6): 730-739

(编辑 冯小花)

Data Reassembling Reveals More Information of Transcriptome for *Pinctada fucata martensii* Dunker

CHEN Qiong, GU Zhifeng, WANG Aimin, ZHAN Xin, SHI Yaohua^①

(Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Ministry of Education, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Ocean College, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract The pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, was an ideal animal for studies of biomineralization. The mantle and pearl sac were the two important tissues involved in biomineralization of the shell and pearls. In this study we reassembled the transcriptome data of 454 pyrosequencing of the mantle and pearl sac. The sources of the data included studies in our own laboratory, reports from other researchers, and ESTs from NCBI. We conducted BLAST and Gene Ontology analysis, and analyzed the contig reassembling with CLC Genomics Workbench 5. The reassembling generated 30266 contigs with an average length of 522 bp, and the largest length of 4144 bp. The Blast analysis against non-redundant (NR) database revealed 2310 contigs with the *E*-values smaller than 10^{-5} , among which 1902 contigs had homologous sequences in at least one of the following model animals of *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, or *Crassostrea gigas* and *Pinctada*. The GO annotation showed that 3846 contigs could be characterized into 23 subcategories of biological processes, of which the top three subcategories with most contigs were metabolic process, cellular process and biological regulation; 4601 contigs could be characterized into 11 subcategories of molecular functions, of which the top three with most contigs were binding, catalytic activity, and structural molecular activity; 2992 contigs could be characterized into 17 subcategories of cellular components, of which the top three were cell part, organelle, and macromolecular complex. These results suggested that there were a great number of transcriptome contigs of *P. fucata martensii*. Our study will be helpful in the large-scale screening of specially-expressed genes in the mantle and pearl sac of *P. fucata martensii*.

Key words *Pinctada fucata martensii*; Mantle; Pearl sac; Transcriptom; 454 Pyrosequencing

^① Corresponding author: SHI Yaohua, E-mail: stone70@126.com

基于遗传连锁图谱筛选虾夷扇贝性别相关 AFLP 分子标记的方法*



周丽青¹ 杨爱国^{1①} 刘志鸿¹ 王清印¹ 吴彪¹
孙秀俊¹ 郑利兵² 郑言鑫²

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

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 基于近年来他人构建的遗传连锁图谱,对 2011–2013 年 2–5 月期间采集的雌性、雄性及雌雄同体虾夷扇贝进行性别相关 AFLP 分子标记筛选。从雄性和雌性遗传连锁图谱上选取合计 18 对引物组合,经 3 批次试验,有 8 对引物扩增出性别相关的条带,其中 EbMc、EjMf 和 EiMk 重复性好,有 4 对引物扩增出雌雄同体特异性条带,5 对引物扩增出雌性特异性条带。结果表明,基于高密度遗传连锁图谱筛选性别相关分子标记的方法简单可行,雌雄同体的基因组 DNA 与雌性和雄性存在显著差异,可能是一个单独的群体。

关键词 虾夷扇贝; 性别相关标记; AFLP; 雌雄同体

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0103-07

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)相对我国北方土著种栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)而言,具有个体大、抗病力强、冷水性特点,20 世纪 80 年代初引进我国试养后,已经发展成为我国北方沿海重要的养殖品种。虾夷扇贝一般为雌雄异体型,且雌雄性比接近 1:1,但是养殖群体中常常有一定比例的个体表现为雌雄同体。于瑞海等(2011)粗略统计了人工育苗的养殖虾夷扇贝成贝中雌雄同体比例,2006 年占 5%–6%,2007 年占 8%–9%,2008–2009 年超过 10%,最高可达 18%。本课题组从 2011 年至今对虾夷扇贝生殖腺观察,也发现雌雄同体比例呈逐年上升的趋势,并存在性逆转现象。虾夷扇贝无性染色体,尚未见有性别相关基因和雌雄同体形成机制的报道。AFLP 分子标

记技术具有信息量大、灵敏度高、多态性丰富等特点,成功用于多种水产动物遗传连锁图谱构建、性别之间差异分析及性别特异性扩增片段筛选(刘卫东等,2009;臧云鹏¹,2011;李静等,2007;张超等,2010;姜龙等,2013)。为探讨虾夷扇贝雌雄同体形成的分子机制,并筛选性别相关 AFLP 分子标记,基于刘卫东等(2009)、徐科凤(2009)²和赵海波(2009)³已构建的虾夷扇贝遗传连锁图谱开展了性别相关 AFLP 分子标记筛选方法的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

2011–2013 年 2–5 月,多批次从青岛市南山水产

* 黄海所基本科研业务费项目(20603022012003)和国家科技基础条件平台项目(2007DKA30470)共同资助。周丽青, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-11-14, 收修改稿日期: 2013-12-20

1) 臧云鹏. 仿刺参微卫星 DNA 标记的筛选与应用及性别差异研究初探. 上海海洋大学硕士学位论文, 2011, 45–66

2) 徐科凤. 虾夷扇贝分子生物学研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27–39

3) 赵海波. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 37–50

品市场采购 2-4 龄虾夷扇贝雌性 20 只、雄性 20 只和雌雄同体 30 只,产地分属山东威海、长岛、荣成、烟台和辽宁大连等海区,均为人工养殖。通过生殖腺外观观察和解剖涂片确定性别。剖取闭壳肌冻存,用于 DNA 提取。相机拍摄并记录生殖腺类型。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 每个个体取闭壳肌约 0.1 g,参照《分子克隆实验指南》(第三版)中常规的酚-氯仿 DNA 提取方法,提取基因组 DNA,超纯水溶解,1%的琼脂糖和核酸定量仪检测 DNA 的质量并测定其浓度。

1.2.2 AFLP 分析 参照 Vos 等(1995)的方法并加以优化,进行 AFLP 分析。选择不同实验对象,重复实验 3 次。雌性(Female)简称 F,雄性(Male)简称 M,雌雄同体(Hermaphrodite)简称 H,生殖腺以雌性为主的雌雄同体简称 Hf,以雄性为主简称 Hm,雌雄相间简称 Ha。实验用限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 及 T4-DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司, *Taq* DNA 聚合酶为北京全式金生物技术有限公司 Easy Taq 系列,所有引物均由上海生工生物工程公司合成。选择性扩增引物及接头序列见表 1,选择性引物对引自刘卫东

等(2009)、徐科凤(2009)¹⁾和赵海波(2009)²⁾构建的雄性及雌性遗传连锁图谱(引物对选取方法暂不详述,拟申报专利)。扩增产物用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶 50 W 恒功率电泳 2.5 h,进行银染检测,用相机拍摄胶板并记录,查找性别相关的 AFLP 条带,条带记为有或无。

2 结果与分析

18 对引物组合中,8 对引物可扩增出性别相关特异性条带,3 次重复实验引物对 EbMc、EjMf 和 EiMk 扩增出明显的性别相关特异性条带,且 3 次实验特定条带均有比较好的对应性,详见图 1、图 2 和图 3。其他 5 对引物扩增出的特异性条带在不同批次试验中会出现个别样品的特例,各引物对扩增出的特异性条带情况见表 2。

EbMc 稳定扩增出雄性全无的条带(图 1 中的箭头 1),EjMf 稳定扩增出雌性全无的条带(图 2 中的箭头 1);EiMk 扩增出雌性特有而雄性全无的条带(图 3 中的箭头 5)。其他 5 对引物扩增结果见图 4, EgMa、E33M51 分别扩增出一条雌性特异性条带, E38M58 扩增出一条雌雄同体全无和一条雄性全无的特异性条带, E39M60

表 1 所用接头和引物组合
Tab.1 List of AFLP primers and adapters used in the experiments

序列名称 Name	<i>EcoR</i> I	<i>Mse</i> I
接头 Adapters	EA ₁ : 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	MA ₁ : 5'GATCATGAGTCCTGCT-3'
	EA ₂ : 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	MA ₂ : 5'-CGAGCAGGACTCAGAA-3'
预扩引物 Preamplification primers	E0: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	M0: 5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGG-3'
选扩引物对 Selective amplification primer combinations	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	M51: M0+CCA-3'
	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	Ec: 5'-E0+ACG-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Eg: 5'-E0+CAG-3'	Ma: M0+ATG-3'
	Eh: 5'-E0+CTA-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	E38: 5'-E0+ACT-3'	M58: M0+CGT-3'
	E33(Eb): 5'-E0+AAG-3'	Mc: M0+CAG-3'
	Ec: 5'-E0+ACG-3'	Mf(M59): M0+CTA-3'
	Ee: 5'-E0+ATC-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Eg: 5'-E0+CAG-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'
	Ei: 5'-E0+GTG-3'	Mk: M0+TGC-3'
	Ej: 5'-E0+TAG-3'	Mf(M59): M0+CTA-3'
	E35: 5'-E0+ACA-3'	M48: M0+CAC-3'
	E39: 5'-E0+AGA-3'	M48: M0+CAC-3'
	E39: 5'-E0+AGA-3'	M60(Mg): M0+CTC-3'

1) 徐科凤. 虾夷扇贝分子生物学研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27-39

2) 赵海波. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009, 37-50

表 2 扩增出性别相关特异性条带的引物组合及特异性条带
Tab.2 The primer-combinations amplified sex specific markers and the related bands

引物组合 Primer-combinations	雌性特有带 Female-specific bands	雄性特有带 Male-specific bands	雌雄同体特有带 Hermaphrodite-specific bands
EbMc	10/19	0	33/34
EjMf	0	7/14	18/22
EiMk	14/14	0	8/21
EgMa	19/19	0	1/34
E33M51	19/19	0	1/34
E38M58	14/14	3/14	0
	14/14	0	22/22
E39M60	4/14	3/14	21/22
	0	0	9/22
E39M48	0	1/14	14/22
	9/9	0	24/24

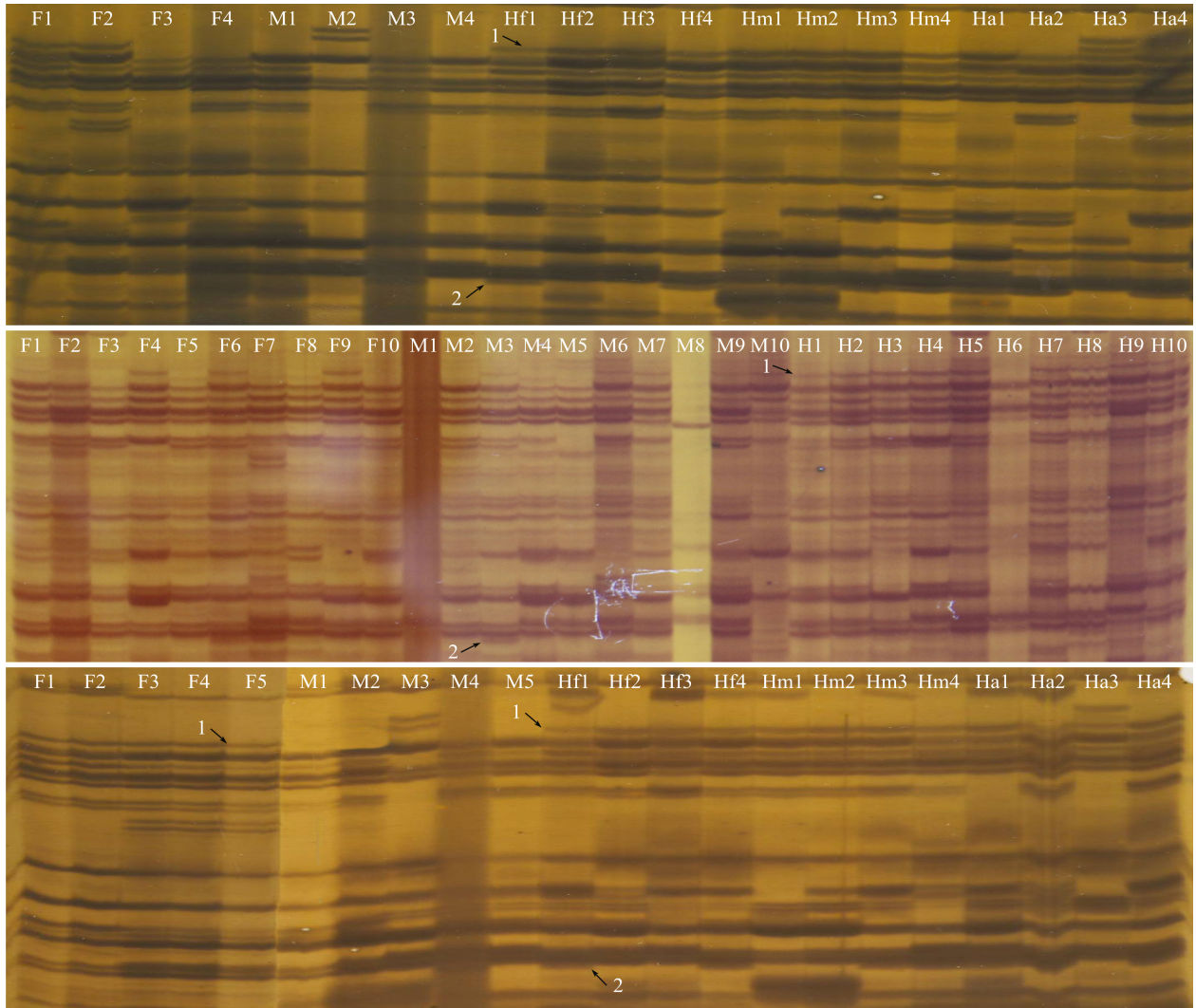


图 1 引物 EbMc 三批次 AFLP 实验均扩增出雌雄同体特异性条带
Fig. 1 Primer-combination EbMc amplified hermaphrodite-specific bands in three AFLP experiments

1. 雄性无、雌雄同体特异性条带; 2. 不同批次试验相对应的条带
1. Non-male but hermaphrodite-specific bands; 2. Corresponding DNA bands in different experiments

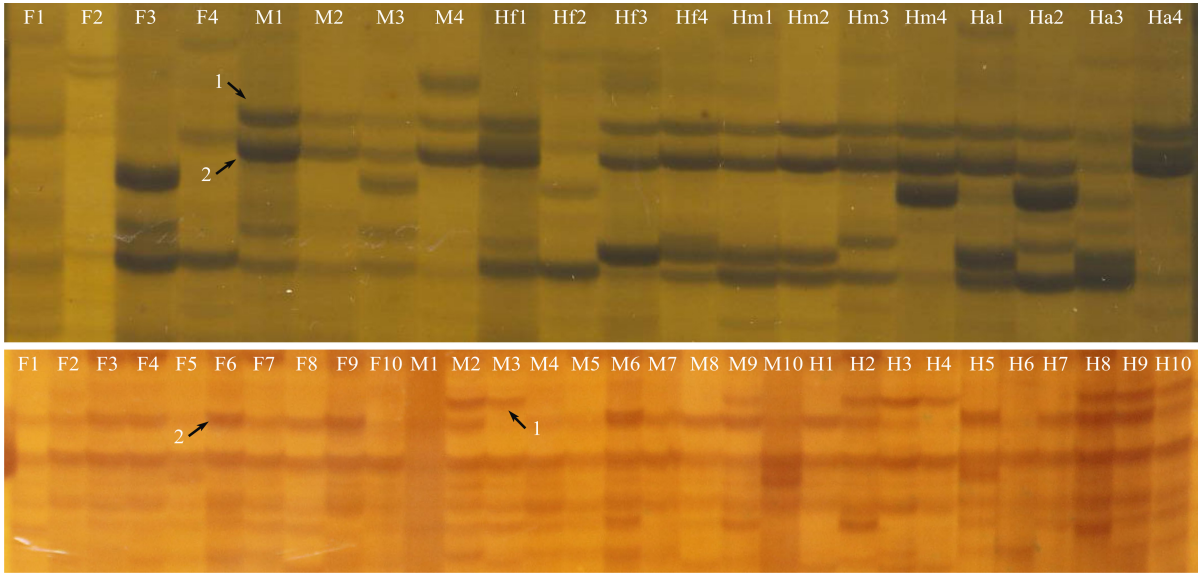


图 2 引物 EjMf 两批次 AFLP 实验扩增雌性全无的特异性条带
 Fig.2 Primer-combination EjMf amplified non-female specific DNA bands in two AFLP experiments

1. 雌性全无的特异性条带; 2. 不同批次试验相对应的条带
 1. Non-female DNA specific bands; 2. Corresponding DNA bands in different experiments

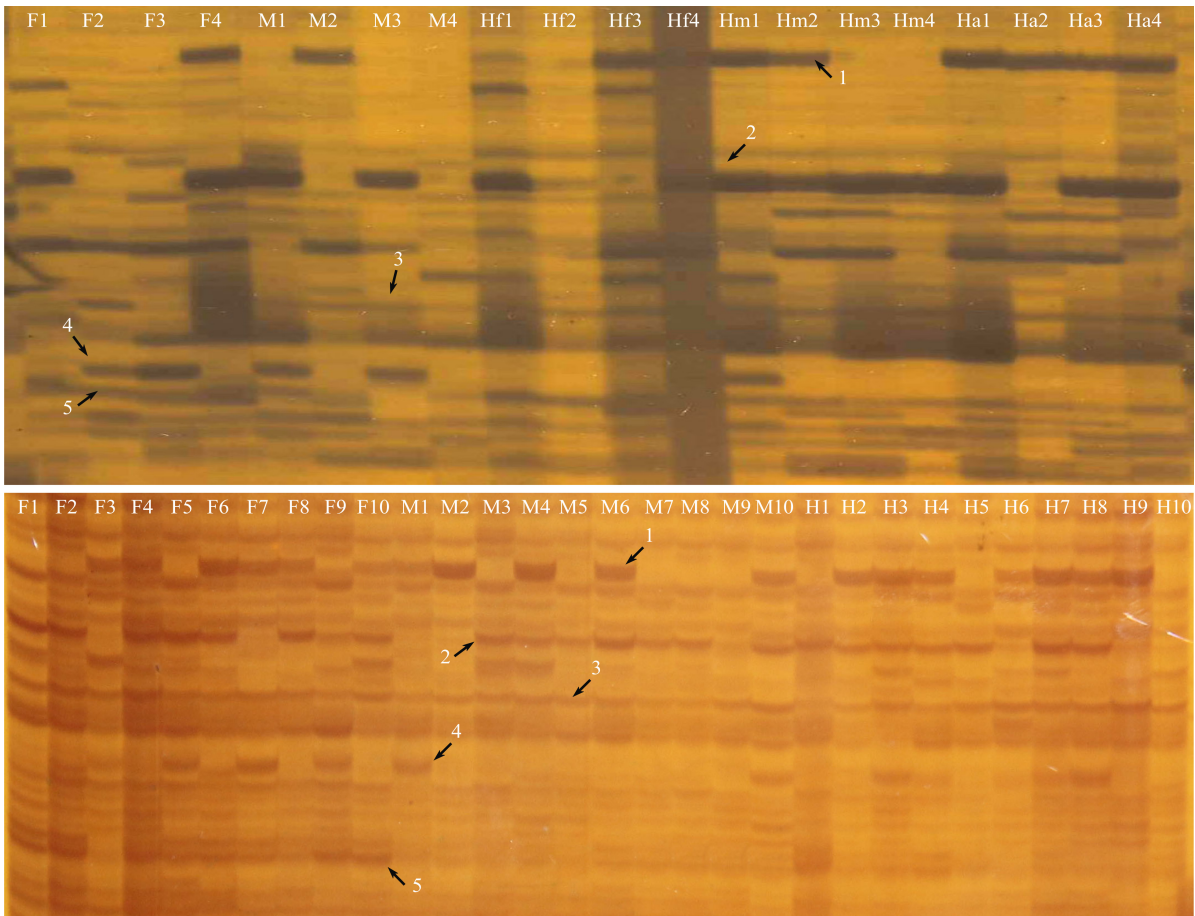


图 3 引物 EiMk 两批次 AFLP 实验扩增结果
 Fig.3 The amplified results of three sex types *P. yseooensis* by primer-combination EiMk in two experiments

1、2、3、4. 不同批次试验相对应的条带; 5. 雌性特有的条带
 1, 2, 3, and 4. Corresponding DNA bands in different experiments; 5. Female-specific bands

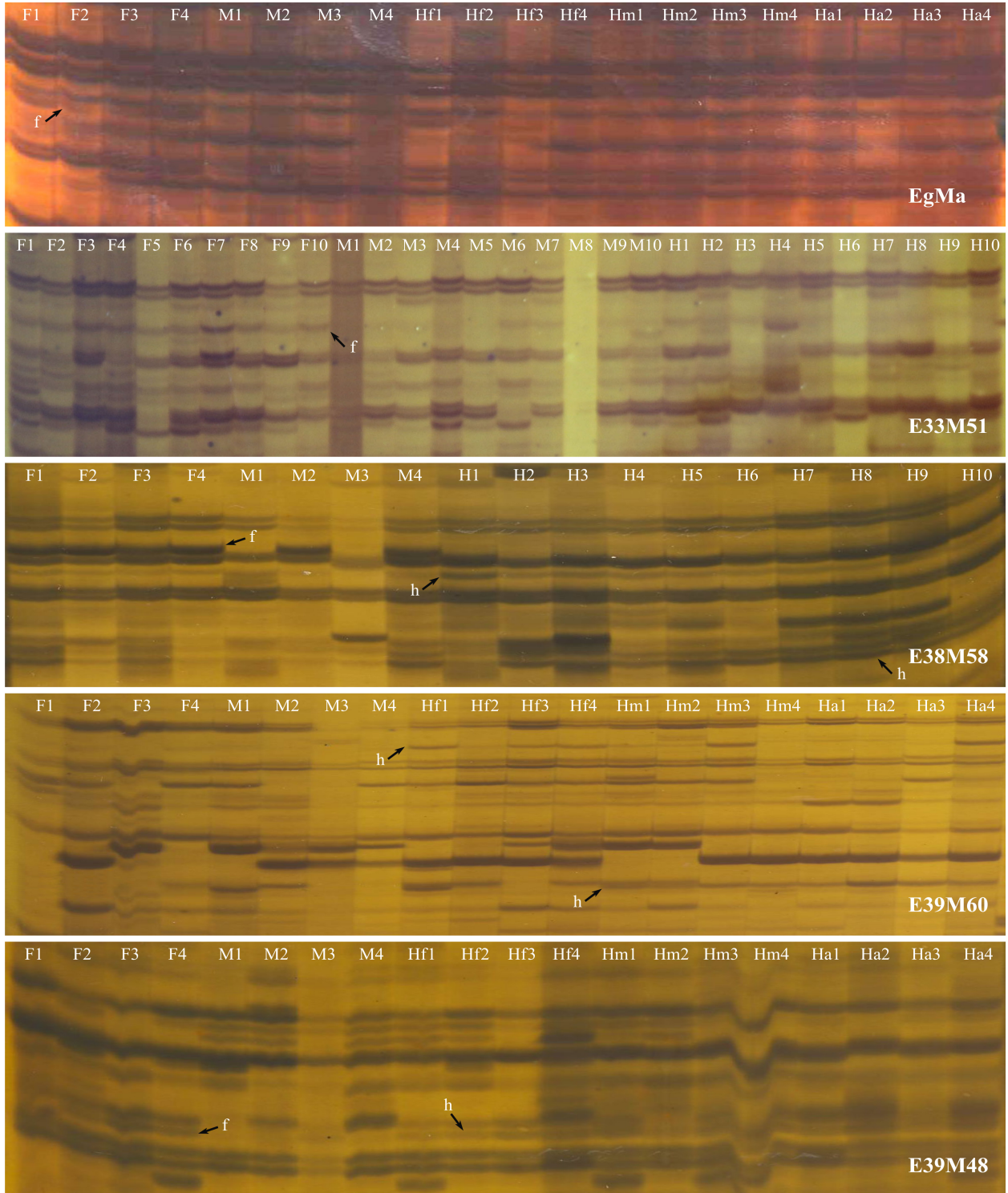


图 4 5 对引物扩增结果

Fig.4 The amplified results of three sex types *P. yseooensis* of primer-combinations EgMa, E33M51, E38M58, E39M60 and E39M48

f. 雌性特异性条带; h. 雌雄同体特异性条带

f. Female-specific bands; h. Hermaphrodite-specific bands

扩增出两条有性别偏向性的条带, E39M48 扩增出一条雄性全无的特异性条带。EbMc、EjMf、E38M58

和 E39M48 在雌雄同体中扩增出特异性条带, 反映出雌雄同体基因组 DNA 与雌性和雄性均存在明显的差

异。5 对引物筛选出雌性相关 AFLP 分子标记 6 个, 4 对引物扩增出雌雄同体特异性条带 5 条, 其中有两个为雌性和雌雄同体所特有, 而相对应的雄性却未扩增出条带(表 2)。

3 讨论

遗传连锁图谱是重要数量性状遗传定位的基础, 也是分子标记辅助育种的前提(刘卫东等, 2009)。遗传连锁图谱的构建一般采用“双假测交”理论(Two-way pseudotestcross strategy), 对 F_1 代的父、母本分别作图, 获得两张遗传连锁图谱, 只有符合孟德尔遗传的标记才能用于作图。刘平等(2002)将对父本表现为杂合而对母本表现为纯合隐性的标记用于父本作图, 将对母本表现为杂合而对父本表现为纯合隐性的标记用于母本作图。根据这个原理, 分别从雌性和雄性遗传连锁图谱中筛选出可能与性别相关的标记。2009 年前后虾夷扇贝遗传连锁图谱的构建开展较多, 可供选择的标记数量也很多, 大大减少了标记选择的盲目性和工作量, 增加了标记选择的精准度。EbMc 中雌雄同体特异性条带、EjMf 中雌性全无的条带及 EiMk 中雌性特异性条带的筛出便是很好的证明。

AFLP 技术无 RFLP 技术的繁杂过程, 较 RAPD 技术稳定, 被用于多种水产动物的高密度遗传连锁图谱的构建(Zhang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Lallias *et al.*, 2007)、性状相关分子标记筛选(董迎辉等, 2012; 李三磊等, 2012)及遗传多样性的研究(鲍相渤等, 2009; 孟鹏等, 2008; 韩志强等, 2006; 汪开毓等, 2013; 陈见等, 2014)。基于同一种生物不同性别之间存在 DNA 水平差异的理论, Watanabe 等(2004)利用 AFLP 技术筛选出一条 141 bp 的香鱼雄性特有带; 李静等(2007)经 3 轮筛选和验证, 4 个引物组合扩增出 7 个雌性个体出现频率为 100% 的 DNA 片段, 并认为这 7 个 AFLP 标记是半滑舌鲷雌性特异性标记; 王亮晖等(2007)从 64 对引物组合中筛选出 9 对引物, 共发现 18 条带在不同性别中出现的比例差异显著。Xia 等(2005)采用 AFLP 技术, 结合 BSA 法对长江江豚进行性别相关分子标记的筛选, E-AGT/ M-CTC 引物组合扩增出一条分子量约为 200 bp 的雄鱼特异性条带, 此带在雌鱼中均未能得到扩增, 认为此带与性别相关。本研究基于遗传连锁图谱也成功筛选出雌性相关 AFLP 分子标记 6 个, 雌雄同体相关标记 5 个, 实验可重复性强, 证明 AFLP 分子标记可作为寻找低等无性染色体动物性别特异性分子标记的一种有效技术。

研究发现 5 个雌雄同体特异性的标记, 说明雌雄同体可能是一个独立于雌性和雄性的群体, 从连续 3 年

成熟生殖腺组织切片的结果来看, 雌雄同体虾夷扇贝存在雌性向雄性性逆转的趋势, 出现雌雄同体情形是在每年的 2、3、4、5 月, 而这之前和之后未能见有雌雄同体(周丽青等, 2014)。杨东等(2007)采用 AFLP 方法, 筛选雌雄尼罗罗非鱼雄性特异性片段, 所筛选的片段在雄性中比例为 100%, 但在雌性中缺失比例高达 90%, 因此认为此片段应该与性别相关。在本研究的 3 批次实验中也发现了一些这种类型的条带, 即在一种性别中 100% 有或无, 在另一种性别中出现个别特例, 这可能是雌雄同体被误判为雌性或雄性所导致。因此, 这些标记将来可以被用来在育种中选择雌雄同体型虾夷扇贝, 控制其同时排放精卵进行自交, 也能被用来研究性别决定机制。所筛选出的这些特异性条带所对应的位点也有可能位于性别决定基因的相邻区域, 它们与 3 种性别类型的确切关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 于瑞海, 王昭萍, 赵雪琳, 等. 虾夷扇贝雌雄同体自体受精繁殖生物学的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(11): 23-26, 56
- 王亮晖, 司伟, 傅洪拓, 等. 运用 AFLP 技术分析鲤鱼雌雄之间的差异. 安徽农学通报, 2007, 13(12): 41-43
- 刘卫东, 鲍相渤, 宋文涛, 等. 虾夷扇贝遗传连锁图谱的初步构建. 遗传, 2009, 31(6): 629-637
- 刘平, 彭士琪, 刘孟军, 等. 分子标记在果树上的应用及前景展望. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 100-105
- 李三磊, 徐冬冬, 楼宝, 等. 褐牙鲈耐热相关分子标记筛选及遗传多样性分析. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 516-523
- 李静, 陈松林, 邓恩平, 等. 半滑舌鲷雌性特异性扩增片段长度多态性标记的筛选与应用. 水产学报, 2007, 31(5): 591-597
- 张超, 佟广香, 匡友谊, 等. 利用 AFLP 技术筛选与哲罗鱼 *Hucho taimen* (Pallas) 性别相关的分子标记. 东北农业大学学报, 2010, 41(5): 96-102
- 汪开毓, 牟巧凤, 黄锦炉, 等. 38 株维氏气单胞菌分离株的 AFLP 基因分型研究. 水生生物学报, 2013, 37(5): 905-911
- 陈见, 李清, 王贵英, 等. 嘴红鲃(♀) × 黑尾近红鲃(♂) 杂种 F_1 的 AFLP 分析. 水生生物学报, 2014, 38(6): 891-896
- 孟鹏, 刘晓敏, 王伟继, 等. 中国对虾家系遗传多样性的 AFLP 分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 21-26
- 杨东, 余来宁, 张繁荣, 等. 筛选与尼罗罗非鱼性别相关的 AFLP 标记. 水生生物学报, 2007, 31(6): 901-904
- 周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 繁殖期雌雄同体虾夷扇贝生殖腺组织学观察. 高技术通讯, 2014, 24(8): 874-880
- 姜龙, 王忠卫, 周莉, 等. 乌鳢一个养殖群体中性别连锁 AFLP 标记的筛选. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1175-1179
- 董迎辉, 姚韩韩, 林志华, 等. 泥鳅生长性状相关 AFLP 分子标记的筛选. 水产学报, 2012, 36(6): 825-831
- 韩志强, 高天翔, 王志勇, 等. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. 水产学报, 2006, 30(5): 640-646

- 鲍相渤, 董颖, 赫崇波, 等. 基于 AFLP 技术对中国虾夷扇贝群体种质资源的研究. 生物技术通报, 2009, (4): 126-129
- Lallias D, Lapegue S, Hecquet C, *et al.* AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel(*Mytilus edulis*). Anim Genet, 2007, 38(4): 340-349
- Li L, Xiang JH, Liu X, *et al.* Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. Aquaculture, 2005, 245(1-4): 63-73
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414
- Watanabe T, Yamasaki K, Seki S, *et al.* Detection of ayu sex-linked DNA markers using homologous clones. Fisheries Science, 2004, 70(1): 47-52
- Xia J, Zheng J, Wang D. Study on the sex-related AFLP marker of the Yangtze finless porpoise. High Technol Lett, 2005, 11(3): 325-328
- Zhang LS, Yang CJ, Zhang Y, *et al.* A Genetic linkage map of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rate. Genetica, 2007, 131(1): 37-49

(编辑 冯小花)

Screening the Sex-Related AFLP Molecular Markers in *Patinopecten yessoensis* Based on the Genetic Linkage Map

ZHOU Liqing¹, YANG Aiguo¹①, LIU Zhihong¹, WANG Qingyin¹, WU Biao¹,
SUN Xiujun¹, ZHENG Libing², ZHENG Yanxin²

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

Abstract *Patinopecten yessoensis* is one of the most important germplasm resources in scallop breeding in north coast of China. It has male, female and hermaphrodite phenotypes. A rising hermaphroditism percentage in cultured populations was observed in gonochorism *P. yessoensis*. The previous studies indicated that hermaphroditisms were intermediate states of sex-reversal, and that the development of gonad was simultaneous in some hermaphroditic scallops. The hemaphroditisms could provide useful materials for inbred line construction and genetic improvement of scallop. AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers have been used to construct the genetic linkage maps in the scallop *P. yessoensis* by several research groups since 2009. The sex-related AFLP molecular markers were utilized to screen female, male and hermaphrodite *P. yessoensis* from samples that were collected from March to May, 2011-2013. Eighteen AFLP primer-combinations were chosen to screen sex-related bands and 8 primer-combinations were sex-specific markers. Three of eight markers (EbMc, EjMf and EiMk) had a good repeatability. Hermaphrodite-specific bands were found in four primer-combinations and female-specific bands were detected in five primer-combinations. The present results indicate that the method of sex-related molecular markers screening based on the highly dense genetic linkage map was practical and feasible, and that the hermaphroditism is probably an independent group since the sex-related molecular markers in hermaphrodite genomic DNA were apparently different from those of the female and male. The method of sex-related markers screening and the sex-related bands screened may contribute to the efficiency improvement of sex control and breeding, and help to identify the hermaphrodite and then induce the female- and male-gametes to mature synchronously to construct self-bred-lines.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Sex-related markers; AFLP; Hermaphrodite

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

斧文蛤(*Meretrix lamarchii*)形态性状对体质量的影响效果分析*



张嘉丽 王庆恒^① 邓岳文 杜晓东

(广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室 湛江 524088)

摘要 从湛江东海岛斧文蛤野生群体随机取 200 个 2 龄个体,测量壳长(*SL*)、壳宽(*SW*)、壳高(*SH*)、韧带长(*LiL*)、小月面长(*LuL*)和体质量(*W*) 6 个性状,计算性状间的相关系数;以壳性状为自变量、体质量为依变量,采用通径分析方法计算壳性状对体质量的通径系数、决定系数,建立回归方程。结果显示,壳长、壳宽、壳高、韧带长与体质量极显著相关($P<0.01$),小月面长与体质量相关不显著($P>0.05$)。壳长、壳宽、壳高对体质量的直接影响均达到极显著水平($P<0.01$),韧带长对体质量的直接影响较小,相关不显著($P>0.05$);壳长对体质量的直接效应和间接效应均最大,是影响体质量的最重要因素。采用逐步回归分析方法建立了形态性状对体质量的多元回归方程 $Y_W = -126.784 + 1.249X_{SL} + 2.036X_{SW} + 0.911X_{SH}$,为斧文蛤选种提供了理论依据和测度指标。

关键词 斧文蛤;形态性状;体质量;通径分析;回归方程

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0110-04

斧文蛤(*Meretrix lamarchii*)隶属于软体动物门、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroida)、帘蛤科(Veneroidae)、文蛤属(*Meretrix*),分布于台湾和广东以南至海南三亚沿海、日本房总以南(庄启谦,2001)。有关斧文蛤的报道主要集中在近缘种的系统分类学研究方面(张素萍等,2012)。

斧文蛤个大味美,售价高于相同规格的文蛤,具有很好的市场潜力。斧文蛤也是研究人员建议的南海北部近海增殖放流备选种类(陈丕茂,2009)。目前,市售斧文蛤主要依赖于采捕自然资源,人工繁育和增养殖技术报道极少,仅有董迎辉等(2011)对斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化进行了观察研究;张炯明等(2011)¹⁾简要介绍了斧文蛤人工繁育试验的初步结果。

质量性状(体质量、软体部质量、闭壳肌质量等)

是食用贝类最直接也是最重要的育种目标性状(吕庆凯等,2012),但测定不便;贝壳形态性状则易于测量,适合基层单位操作。利用统计学方法剖析形态性状与重量性状之间的关系,可通过对形态性状的选择达到育种目的。刘小林等(2002)报道 2 龄栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)壳长、壳宽、壳高与活体质量间呈显著正相关($P<0.05$),其中壳高的直接影响最大,是影响活体质量的主要因素。何毛贤等(2006)分析了马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)不同生长时期的壳长、壳高、壳宽和活体质量间的相关性,构建了形态性状对活体质量的回归方程。常亚青等(2008)研究发现,1 龄虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)壳长、壳宽、壳高与活体总质量、软体质量和闭壳肌质量均极显著相关,但仅有壳长对 3 个质量性状的直接作用达到显著水平。

2013 年,作者开展了斧文蛤人工育苗技术的探

* 国家贝类产业体系湛江综合试验站(CARS-48)资助。张嘉丽, E-mail: 383372278@qq.com

① 通讯作者:王庆恒,副教授, E-mail: wangqingheng@163.com

收稿日期:2014-04-09,收修改稿日期:2014-06-22

1) 张炯明,肖国强,邵艳卿,等.斧文蛤(*Meretrix lamarchii* Deshayes)人工繁殖技术试验.中国动物学会中国海洋湖沼学会贝类学分会第九次会员代表大会暨第十五次学术讨论会会议摘要集,2011,163

索, 利用相关分析、通径分析和多元回归分析等统计方法, 分析斧文蛤贝壳形态性状对体质量的影响, 以期为斧文蛤优质种苗繁育工作提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用斧文蛤于 2013 年 9 月采集自湛江市东海岛海域, 随机取样 200 个 2 龄个体, 清洗干净后进行各指标测定。利用游标卡尺测量壳长(*SL*)、壳宽(*SW*)、壳高(*SH*)、韧带长(*LiL*)、小月面长(*LuL*), 精确到 0.02 mm。*SL* 为壳前后端的最大距离, *SW* 为捏紧两边贝壳测量其两壳的最大距离, *SH* 为从壳顶至腹缘的最大距离; *LiL* 为韧带前后端之间的最大距离; *LuL* 为小月面前后端之间的最大距离。利用电子天平称量个体的体质量(*W*), 精确到 0.01 g。

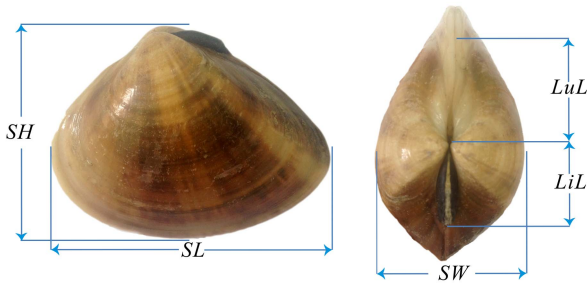


图 1 斧文蛤形态性状测量

Fig.1 The morphological characters of *M. lamarchii*

SL: 壳长; *SW*: 壳宽; *SH*: 壳高; *LiL*: 韧带长; *LuL*: 小月面长
SL: Shell length; *SW*: Shell width; *SH*: Shell height;
LiL: Ligament length; *LuL*: Lunule length

1.2 数据分析

以斧文蛤壳长、壳宽、壳高、韧带长、小月面长和体质量为字段名建立数据库, 用 Excel 对数据进行初步处理, 再利用 SPSS 19.0 软件分别进行表型相关分析、形态性状各指标对体质量通径分析和决定系数的计算, 剖析这些性状对体质量的直接作用和间接影响, 并采用逐步回归法建立多元回归方程, 进一步对方程进行拟合度检验(袁志发等, 2003; Stevens, 2001)。

2 结果

2.1 测量性状表型值

斧文蛤贝壳形态性状和体质量测定统计值见表 1。各测定性状变异系数在 5.80%–19.72%之间, 体质量的变异系数最大, 其次为小月面长, 壳高的变异系数最小。

表 1 测量性状的统计值 ($n=200$)

Tab.1 The statistical results of each measurement ($n=200$)

性状 Traits	均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV(%)
壳长 <i>SL</i> (mm)	63.47	4.21	6.63
壳高 <i>SH</i> (mm)	49.66	2.88	5.80
壳宽 <i>SW</i> (mm)	31.26	2.14	6.85
韧带长 <i>LiL</i> (mm)	15.70	1.32	8.41
小月面长 <i>LuL</i> (mm)	16.89	1.83	10.81
体质量 <i>W</i> (g)	61.40	12.11	19.72

2.2 测量性状相关分析

各测定性状间的表型相关系数见表 2。其中, 壳长、壳高、壳宽和韧带长与体质量间相关性极显著($P<0.01$), 小月面长与体质量间相关性不显著($P>0.05$)。

表 2 测量性状的表型相关系数

Tab.2 The correlation coefficients of the traits

性状 Traits	壳高 <i>SH</i>	壳宽 <i>SW</i>	韧带长 <i>LiL</i>	小月面长 <i>LuL</i>	体质量 <i>W</i>
壳长 <i>SL</i>	0.935**	0.863**	0.769**	0.076	0.948**
壳高 <i>SH</i>		0.857**	0.826**	0.217*	0.931**
壳宽 <i>SW</i>			0.746**	0.196*	0.921**
韧带长 <i>LiL</i>				0.390**	0.759**
小月面长 <i>LuL</i>					0.120

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

2.3 通径分析

根据上述相关分析结果, 壳长、壳高、壳宽和韧带长与体质量间均存在极显著相关性, 可进行通径分析, 将各贝壳形态性状对体质量的相关系数剖分为各性状的直接效应和通过其他性状的间接效应两部分, 分析结果见表 3。壳长、壳高、壳宽对体质量的直接效应分别为 $P_{SL}=0.426$ 、 $P_{SH}=0.274$ 、 $P_{SW}=0.372$, 均呈极显著相关($P<0.01$); 而韧带长对体质量的直接影响较小, 相关不显著($P>0.05$)。

各形态性状对体质量的间接效应由大到小为

表 3 各形态性状对体质量的通径分析

Tab.3 Path analysis of the morphological traits to the weight

性状 Traits	相关系数 r_{ij}	直接效应 P_i	Σ	间接效应 $r_{ij}P_j$			
				→壳长 <i>SL</i>	→壳高 <i>SH</i>	→壳宽 <i>SW</i>	→韧带长 <i>LiL</i>
壳长 <i>SL</i>	0.948**	0.426**	0.522		0.256	0.321	-0.056
壳高 <i>SH</i>	0.931**	0.274**	0.657	0.398		0.319	-0.060
壳宽 <i>SW</i>	0.921**	0.372**	0.548	0.367	0.235		-0.054
韧带长 <i>LiL</i>	0.759**	-0.073	0.832	0.327	0.226	0.278	

**: $P<0.01$

$LiL>SH>SW>SL$ 。各形态性状通过壳长对体质量的间接作用最大,为 0.327–0.398;壳长、壳高和壳宽对体质量的间接效应占相关系数的比例分别为 55.06%、59.50%、70.57%。

2.4 决定系数

各形态性状对体质量的决定系数见表 4。结果表明,壳长、壳宽、壳高和韧带长对体质量的相对决定程度由大到小为 $SL>SW>SH>LiL$,分别为 0.182、0.138、0.075 和 0.005;在共同决定系数中,壳长和壳宽对体质量的共同决定程度最大,达 0.297。4 种形态性状对体质量的总决定系数 $\Sigma d=0.969$ 。

表 4 各形态性状对体质量的决定系数

Tab.4 The determination coefficient of the morphological traits to the weight

性状 Traits	壳长 SL	壳高 SH	壳宽 SW	韧带长 LiL
壳长 SL	0.182	0.218	0.297	-0.048
壳高 SH		0.075	0.175	-0.033
壳宽 SW			0.138	-0.040
韧带长 LiL				0.005

2.5 回归方程的建立

利用逐步回归法建立以斧文蛤贝壳形态性状指标为自变量、体质量为依变量的回归方程 $Y_w = -126.784 + 1.249X_{SL} + 2.036X_{SW} + 0.911X_{SH}$ 。采用 F 检验对构建的回归方程进行显著性检验,结果表明,回归方程达到极显著水平($F=684.307, P<0.01$);入选性状对体质量的拟合优度 R^2 为 0.945,达到极显著水平($P<0.01$),说明所引入性状对体质量有较大的决定作用。

3 讨论

相关分析是研究表型性状间密切程度的一种常用的统计方法,在育种工作中有利于制定合理的多性状选育方案。已有大量研究表明,海洋贝类壳形态性状与体质量间存在显著相关性。王辉等(2006)报道了南海毛蚶(*Scapharca subcrenata*)壳厚、壳高、壳长和体质量间均为极显著正相关($P<0.01$)。Deng 等(2007)报道了皱纹盘鲍(*Haliotis discus Hannai*)稚贝期的壳长、壳高和体质量间呈显著正相关($P<0.05$)。本研究结果表明,斧文蛤的壳长、壳宽、壳高、韧带长和体质量间存在极显著正相关($P<0.01$),小月面长与体质量间相关性不显著($P>0.05$),相关系数排序为壳长>壳高>壳宽>韧带长>小月面长。

但是,表型性状的相关关系是两变量间关系的综

合体现,由变量间的直接关系以及通过其他变量影响的间接关系共同决定,不能准确表述两个性状间的真实关系。通径分析可将相关系数剖分成直接影响(即通径系数)和间接影响两部分,从而可以探明两个性状之间的真正关系。一般情况下,以自变量对依变量的表型相关系数达到显著水平作为通径分析中自变量入选条件,将表型相关系数不显著者剔除。在本研究中,壳长、壳宽、壳高、韧带长作为进行通径分析入选自变量,而小月面长被剔除。

通径分析结果显示,斧文蛤壳长、壳宽、壳高对体质量的直接效应均与体质量呈极显著相关($P<0.01$),数值排序为壳长>壳宽>壳高,与上述相关系数壳高>壳宽不一致;韧带长对体质量直接效应为-0.073,经检验相关性均不显著($P>0.05$),说明韧带长对体质量的影响主要是通过其他性状间接产生的。这种相关系数和通径系数趋势不一致的现象已在多种物种的研究中得到证实。刘志刚等(2009)报道华贵栉孔扇贝壳长、壳高和绞合线长对闭壳肌重呈极显著正相关($P<0.01$),但通径系数分别为 0.04 和-0.043,相关性均不显著($P>0.05$)。王庆恒等(2010)报道波纹巴非蛤(*Paphia undulate*)壳长、壳宽、壳高和韧带长对软体部重的表型相关系数均呈极显著相关($P<0.01$),但通径系数分别为 0.005($P>0.05$)、0.567($P<0.01$)、0.340($P<0.05$)和 0.066($P>0.05$)。

在表型相关分析的基础上,进行通径系数分析和决定系数分析时,只有当相关指数 R^2 或各自变量对依变量的单独决定系数及两两共同决定系数的总和 Σd (在数值上 $R^2=\Sigma d$)大于或等于 0.85 时,才表明影响依变量的主要自变量已经找到(刘小林等, 2002)。本研究中,入选的形态性状对体质量总的决定系数为 0.969,说明所测性状包含影响体质量的主要性状,其他未测定或剔除的性状对体质量的影响较小,可以不予考虑。

多元回归分析结果显示,斧文蛤韧带长和小月面长对体质量的偏回归系数不显著,在建立回归方程时予以剔除,所建立的方程为 $Y_w = -126.784 + 1.249X_{SL} + 2.036X_{SW} + 0.911X_{SH}$,经检验,回归关系极显著,偏回归关系也极显著。入选的 3 个性状对软体部重的拟合优度 R^2 为 0.945,达到极显著水平($P<0.01$),因此可以确定,壳长、壳宽、壳高是影响体质量的主要性状。在本研究中回归分析和通径分析的结果是一致的。该研究结果对斧文蛤的育种具有指导意义和实用价值。

参 考 文 献

王庆恒, 邓岳文, 杜晓东. 波纹巴非蛤 *Paphia undulata* 表型性

- 状通径和回归分析. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 132-135
- 王辉, 刘志刚, 符世伟. 南海毛蚶形态特征对体重的相关分析. 热带海洋学报, 2007, 26(6): 58-61
- 庄启谦. 中国动物志 软体动物门 双壳纲 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 2001, 229-236
- 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝壳尺寸性状对活体重的影响效果分析. 海洋与湖沼, 2002, 33(6): 673-678
- 刘志刚, 章启忠, 王辉. 华贵栉孔扇贝主要经济性状对闭壳肌重的影响效果分析. 热带海洋学报, 2009, 28(1): 61-66
- 吕庆凯, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料中添加不同脂肪源对半滑舌鳎亲鱼繁殖性能和仔鱼质量的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 44-56
- 何毛贤, 史兼华, 林岳光, 等. 马氏珠母贝生长性状的相关分析. 海洋科学, 2006, 30(11): 1-4
- 陈丕茂. 南海北部放流物种选择和主要种类最适放流数量估算. 中国渔业经济, 2009, 27(2): 39-50
- 张素萍, 王鸿霞, 徐凤山. 中国近海文蛤属(双壳纲, 帘蛤科)的系统分类研究. 动物分类学报, 2012, 37(3): 473-479
- 袁志发, 周静芋. 多元统计分析. 北京: 科技出版社, 2003, 145-180
- 常亚青, 张存善, 曹学彬, 等. 1龄虾夷扇贝形态性状对重量性状的影响效果分析. 大连水产学院学报, 2008, 23(5): 330-334
- 董迎辉, 林志华, 姚韩韩. 斧文蛤精子超微结构与受精过程的细胞学变化. 水产学报, 2011, 35(3): 356-364
- Deng YW, Liu X, Zhang GF, et al. Genetic parameter estimates for growth traits at early stage of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 26(5): 90-95
- Stevens JP. Applied multivariate statistics for the social science (4th Ed.). Mahwah NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 2001, 123-165

(编辑 冯小花)

Effects of Morphological Traits on the Weight of *Meretrix lamarchii*

ZHANG Jiali, WANG Qingheng^①, DENG Yuewen, DU Xiaodong

(Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract *Meretrix lamarchii* is delicious seafood with high economic value. The present market of *M. lamarchii* was mainly from wild population due to the lack of large-scale artificial breeding. In 2013, we carried out the artificial seedling exploration of *M. lamarchii*. The current study utilized several statistical methods to analyze the effects of morphological traits on *M. lamarchii*, which may provide knowledge for clam quality seedlings breeding work. The samples of *M. lamarchii* were randomly collected from Donghai Island, Zhanjiang. Shell length(*SL*), shell width(*SW*), shell height(*SH*), ligament length(*LiL*), lunule length(*LuL*) and weight(*W*) of two-years old *M. lamarchii* were measured. A correlation coefficient matrix was constructed based on the results, in which the weight was set as the dependent variable and others as independent variables. Path coefficient and correlation index were calculated, and the major phenotypic characters were determined. The results showed that all the correlation coefficients between independent variables and dependent variable were significant ($P < 0.01$) except the lunule length ($P > 0.05$). The effects of the shell length, shell width, and shell height on the weight were significant ($P < 0.01$), and the shell length had predominant impact on the weight as a key effective factor. The multiple regression equation between the weight and the other traits was established as $Y_W = -126.784 + 1.249X_{SL} + 2.036X_{SW} + 0.911X_{SH}$, where Y_W is weight, X_{SL} , X_{SW} and X_{SH} are the shell length, shell width and shell height, respectively. The current study may contribute to the artificial breeding of *M. lamarchii*.

Key words *Meretrix lamarchii*; Morphologic traits; Weight; Path analysis; Regression equation

① Corresponding author: WANG Qingheng, E-mail: wangqingheng@163.com

两株海洋微生物抗肿瘤代谢产物的 筛选及其菌种鉴定*



衣 尧^{1,2} 郑兰红¹ 陈世建¹ 盛 军¹ 孙 谧^{1①}

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

摘要 对 5 株海洋微生物进行发酵培养, 发酵液离心后, 收集上清液, 采用饱和正丁醇萃取制备海洋微生物的代谢产物, 采用 MTT 活性跟踪法, 以 BEL-7402、RKO、A549、U251 和 MCF-7 等细胞系为模型, 对代谢产物进行抗肿瘤活性的筛选。结果显示, 菌株 S-1 和 N16 代谢产物的活性组分具有较好的抗肿瘤活性: 菌株 S-1 对 MCF-7、U251 和 BEL-7402 三种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 44、102 和 82 $\mu\text{g/ml}$; 菌株 N16 对 MCF-7 和 BEL-7402 两种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 84、133 $\mu\text{g/ml}$ 。对菌株 S-1 和 N16 进行了 16S rRNA 序列分析、生理生化特征鉴定, 结果显示, 菌株 S-1 为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。通过显微镜观察了菌株 *Brevibacillus* sp. S-1 和 *Bacillus* sp. N16 代谢产物的活性组分对 BEL-7402 细胞形态的影响, 表明两株菌的活性组分可以改变肝癌细胞 BEL-7402 的细胞形态, 抑制细胞增殖。该研究为新型抗肿瘤先导化合物的发现提供了新的海洋微生物种质资源。

关键词 海洋微生物; 菌种鉴定; 代谢产物; 抗肿瘤活性

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0114-06

海洋环境有着特殊的生态条件, 比如高盐、低温、无光等, 形成了海洋微生物基因组成和代谢产物的多样性(张恩等, 2010; 任虹等, 2010; 薛宝贵等, 2012; 王英姿等, 2013; Tan *et al*, 2012)。因此, 海洋微生物成为寻找具有生物活性的天然产物的重要资源。近 20 年来, 从海洋无脊椎动物短头海兔中分离出一种抗肿瘤五肽尾海兔素 10 (Luesch *et al*, 2001), 从海洋海鞘中分离出抗肿瘤环肽 Vitilevuamide (Cruz-Monserrate *et al*, 2003), 从海绵(*Phakellia costata*)中分离出抗肿瘤环七肽 Phakellistatins (Pettit *et al*, 1993), 这些具有抗肿瘤活性的天然产物是医学界开发新型抗肿瘤药物的重要基础。目前, 已经从多种海洋微生物的代谢产物中分离出具有开发价值的抗肿瘤化合物(Lebar *et al*, 2007; Petit *et al*, 2013; Schwartsmann *et al*, 2003)。尽管

如此, 海洋抗肿瘤药物的数量仍然无法与陆生来源的抗肿瘤药物相比。因此, 新的抗肿瘤药物的研发仍然需要寻找更多海洋微生物活性物质。本研究采用 MTT 活性跟踪法从 5 株海洋细菌中筛选出两株具有较好活性的菌株, 并测定了其代谢产物粗提物对多种肿瘤细胞株的 IC_{50} 值, 这两株菌株的代谢产物对多种肿瘤细胞均有较好的抗肿瘤活性, 具有良好的研究价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 中国水产科学院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室菌种库保藏菌株 S-1、N16、SW2、SS10、B12-2, 均由采集自不同区域的

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014B01YQ01)、山东省科技发展计划项目(2014GSF121016)和中央级公益性科研院所基本业务费专项资金项目(206030220130017; 20603022012013)共同资助。衣 尧, E-mail: yiyao-@163.com

① 通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-04-07, 收修改稿日期: 2014-07-18

海水和海泥样品中分离。

1.1.2 细胞株 人肝癌细胞 BEL-7402、结肠腺癌细胞 RKO、非小细胞肺癌细胞 A549、胶质瘤细胞 U251、乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 恒温培养箱(Thermorma 311, 美国 Thermo), 酶标仪(Infinite M200 PRO, 瑞士 TECAN), 离心机(CF 15Rii, 日本 Hitachi), 96 孔梯度 PCR 仪(Robocycler, 美国 Stratagene), 核酸电泳仪(DY-A 型, 北京六一)。

1.1.4 主要试剂 PCR 扩增相关试剂和核酸 Marker, 宝生物工程公司; DMSO、胰蛋白酶, Solarbio 公司; RPMI1640、特级胎牛血清, Hyclone 公司; DMEM、F-12K 培养基, 吉诺公司; MTT, Sigma 公司; 微孔滤膜, 美国 Pall 公司; 其他常规试剂为国产优质纯试剂; 实验用水为超纯水和蒸馏水。

1.1.5 培养基 种子培养基: 10 g/L 蛋白胨, 3 g/L 牛肉膏, 5 g/L NaCl, pH=7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

发酵培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH=7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

1.1.6 16S rRNA 引物(刘志恒, 2002) 采用 16S rRNA 通用引物, 正向引物 27F(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCA-3'), 反向引物 1492R(5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'), 由上海生工生物工程有公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株的发酵培养 用接种环从各菌株保存的斜面上挑取一环菌落接种于 3 ml 种子培养基中, 于 30℃、200 r/min 的摇床中恒温培养 24 h, 即为种子培养液; 按照 4% 的接种量将活化后的种子培养液接种于 300 ml 的发酵培养液中, 相同条件下继续培养 36 h。

1.2.2 菌株的发酵活性组分的制备(项斌等, 2010) 将各菌株发酵液在 10000 g 的条件下离心 15 min 后取上清液, 加入等体积的水饱和正丁醇萃取发酵液, 每次萃取 4 h, 收集上层有机相, 之后利用旋转蒸发仪将萃取液在 80℃ 减压蒸干。减压蒸干的样品经重溶、离心、冻干后, 得到具有抗肿瘤活性的发酵活性组分。

1.2.3 细胞培养和抗肿瘤测定 BEL-7402 细胞、RKO 细胞和 MCF-7 细胞采用 RPMI1640 培养基, U251 细胞采用 DMEM 高糖培养基, A549 细胞采用 F-12K 培养基。将各肿瘤细胞接种于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640、DMEM 或 F-12K 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养

箱内培养, 取对数生长期细胞用于实验。

MTT 抗肿瘤活性分析方法(He *et al*, 2005): 取对数生长期的细胞, 胰酶消化后调整细胞悬液密度为 4×10^4 个/孔, 接种于 96 孔板中, 每孔 180 μ l, 在 37℃ 条件下培养 24 h。然后将样品溶解在磷酸盐缓冲液中, 先经过微孔滤膜过滤除菌, 用合适的培养液将样品稀释成 5 个浓度梯度, 每孔加入 20 μ l, 4 个平行孔, 置于细胞培养箱中继续培养 48 h。然后, 加入 MTT(5 mg/ml) 20 μ l, 置 CO₂ 培养箱 37℃ 培养 4 h。弃除孔中培养液, 然后每孔加入 DMSO 150 μ l, 37℃ 恒温振荡 30 min。酶标仪检测各孔在 570 nm 的吸光值, 实验重复 3 次。细胞抑制率 = $[(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$ 。采用 Excel 分析软件计算半数抑制浓度 IC₅₀。

1.2.4 菌种鉴定 菌株基因组 DNA 的提取采用 Invitrogen Genomic DNA mini Kit。

16S rRNA 序列的 PCR 扩增体系: 以菌株提取的基因组 DNA 为模板, 加入 2 μ l 引物(见 1.1.6); 0.25 μ l Taq DNA 聚合酶(5 U/ml); 5 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液; 4 μ l dNTP MasterMix; ddH₂O 补足至 50 μ l。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 4 min; 30 个循环(94℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 90 s); 72℃ 延伸 10 min。经 1.5% 的琼脂糖电泳检测观察后, 若发现在 Marker 1.5 kb 左右有一条单带, 证明 16S rRNA 序列成功扩增, PCR 产物送北京华大基因测序。

将所测定菌株的 16S rRNA 序列进行双向拼接后, 在 NCBI 网站上通过 BLAST 检索已有序列进行相似性比较分析, 下载与实验菌株亲缘关系较近的序列, 用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 Mega 4.1 软件的邻接法(Neighbor-joining Method)绘制系统发育树。

依据《伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)》(Bergey *et al*, 1994), 实验按照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)及《微生物学实验》(沈萍等, 1999)进行。

1.2.5 倒置显微镜观察活性组分对细胞形态的影响(Wang *et al*, 2012) 取对数生长期的细胞, 将细胞制成浓度为 4×10^4 个/ml 的细胞悬液, 均匀铺在 96 孔培养板中, 每孔加入 180 μ l, 置于 CO₂ 恒温培养箱中 37℃ 培养 24 h。参考 MTT 实验结果加样, 4 个平行孔, 每孔加入 20 μ l 样品, 继续在 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h。取出平板后在倒置显微镜下对细胞形态进行观察, 并拍照记录。

1.2.6 数据统计与分析 实验数据以 3 次试验结果的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 统计学处理用 *t* 检验进行统计显著性分析, 以 $P < 0.05$ 作为不同处理之间显著差异的标志。

2 结果

2.1 MTT 法检测活性组分的抗肿瘤活性

将 5 种制备好的代谢产物分别稀释成浓度为 200、100、50、25 $\mu\text{g/ml}$ 的样品, 作用于肿瘤细胞系 (BEL-7402、RKO、U251、A549、MCF-7) 48 h, 并通过 MTT 法检测细胞活性。结果发现有两种菌株(S-1 和 N16)的代谢产物对肿瘤细胞系的增殖有抑制作用, 其他 3 种菌株的代谢产物对肿瘤细胞系几乎无抑制作用。如表 1 结果显示, 菌株 S-1 对 MCF-7、U251 和 BEL-7402 三种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 44、82、102 $\mu\text{g/ml}$; 而菌株 N16 对 MCF-7 和 BEL-7402 两种肿瘤细胞的抑制率最高, 分别为 84、133 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1 海洋菌株代谢产物对几种肿瘤细胞的 IC_{50} 值 ($\mu\text{g/ml}$)的测定($n=3, \chi=S$)

Tab.1 The IC_{50} of fermented products from the marine strains on several cancer cells

菌株 Strain	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	BEL-7402	RKO	U251	A549	MCF-7
S-1	102 ^c	147 ^d	82 ^b	108 ^e	44 ^a
N16	133 ^b	160 ^d	165 ^d	146 ^e	84 ^a

注: 同一行数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Data within the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

2.2 菌种鉴定结果

2.2.1 16S rRNA 序列分析 菌株 S-1 和 N16 的 16S rRNA 序列 PCR 产物经电泳检测为大小约 1.5 kb 的单带(图 1)。

分别对它们的 PCR 产物测序, 测得 S-1 和 N16 的 16S rRNA 的序列长度分别为 1466 bp 和 1541 bp。

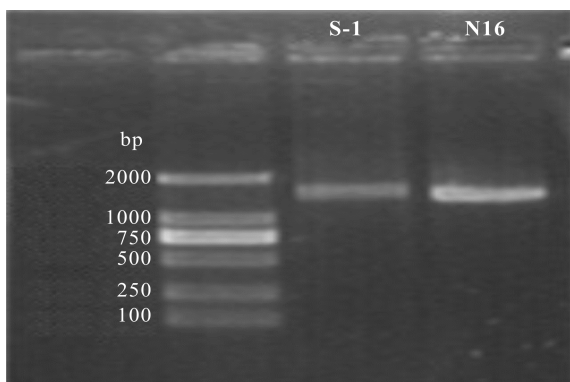


图 1 菌株 S-1 和 N16 的 16S rRNA PCR 扩增结果

Fig.1 The 16S rRNA PCR result of strains S-1 and N16

将它们的序列在 NCBI 的 16S rRNA 核酸数据库中通过 Blast 进行分析, 下载与实验菌株亲缘关系最近的序列, 通过 Mega 4.1 软件 Neighbor-joining 选项绘制发育树(图 2): Bootstrap 重复 1000 次, 模型选择核酸 p-distance。

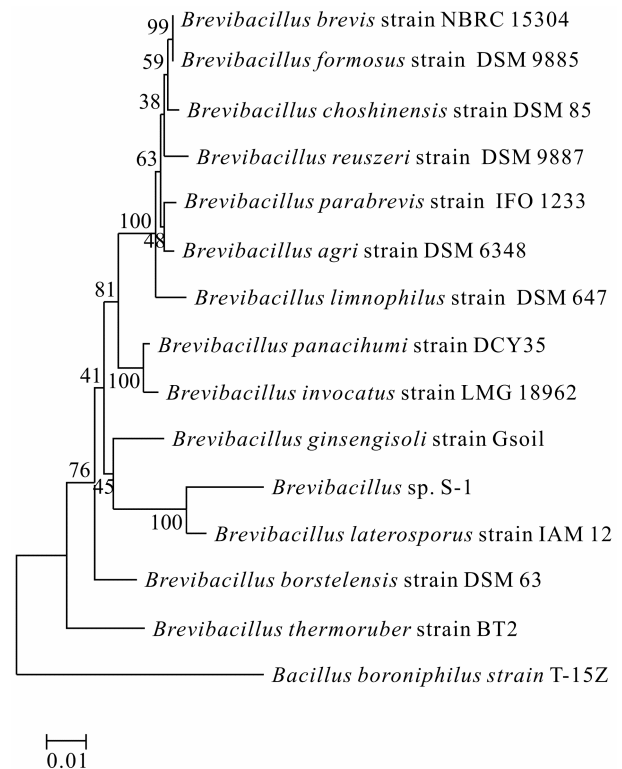


图 2 菌株 S-1 的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of strain *Brevibacillus* sp. S-1

由图 2 和图 3 可知, 菌种 S-1 和 N16 分别与 *Brevibacillus laterosporus* IAM 12 和 *Bacillus cereus* ATCC 14579 strain ATCC 1 在同一分支上, 在进化位置上最为接近。

2.2.2 生理生化特征 菌株 S-1 有较好的耐盐性, 在 7% NaCl(w/v)培养液中生长良好。生长 pH 范围为 5.0–9.0。生长温度范围较宽, 在 15–37°C 环境下也可良好生长。菌株 N16 为好氧菌, 在 pH 为 7.0–7.5、培养温度为 15–30°C、6% NaCl (w/v)的培养基中生长良好。其他生理生化鉴定结果见表 2。

参考《伯杰细菌鉴定手册(第九版)》, 分析菌株的生理生化特征指标; 结合 16S rRNA 序列分析结果, 初步确定菌株 S-1 为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), 分别命名为 *Brevibacillus* sp. S-1 和 *Bacillus* sp. N16。

2.3 倒置显微镜观察活性组分对细胞形态的影响

通过 MTT 法, 发现海洋菌株 *Brevibacillus* sp. S-1

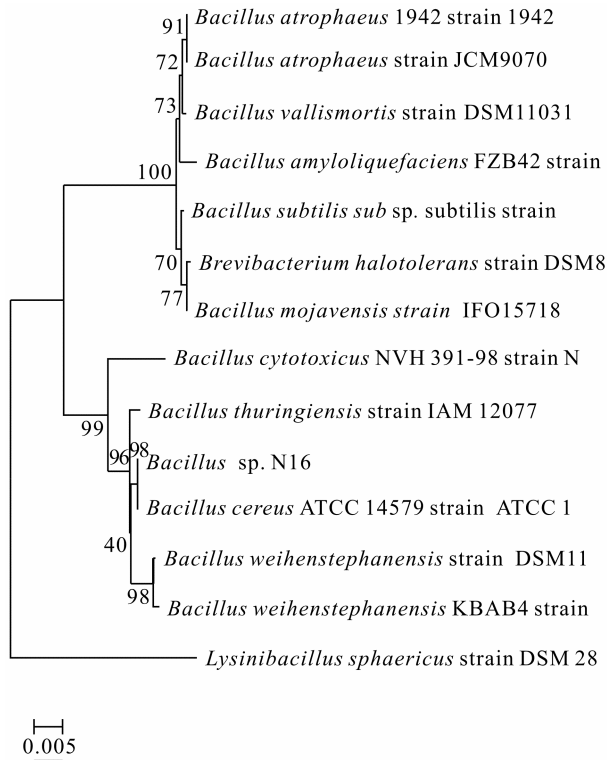


图 3 菌株 N16 的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of strain *Bacillus* sp. N16

和 *Bacillus* sp. N16 的活性组分具有体外抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的活性。因此, 通过倒置显微镜观察了活性组分对肿瘤细胞的作用过程。结果表明, 对照组(图 4、图 5-a)的 BEL-7402 细胞具有人肝癌细胞的形态特点: 细胞贴壁生长, 细胞之间排列紧密, 并呈马赛克状连成一片; 而经过 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的活性组分处理后(图 4、图 5-b), 细胞外形发生变化, 细胞体积变小, 细胞间连接变少, 间隙明显; 当组分浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(图 4、图 5-c), 细胞轮廓也越来越粗糙, 细胞最终变圆并解体。这些说明两株海洋菌株的抗肿瘤活性组分在体外可以改变 BEL-7402 细胞的细胞形态, 并能有效抑制 BEL-7402 细胞的增殖。

表 2 菌株 S-1 和 N16 的生理生化特征

Tab.2 The physiological and biochemical properties of strain S-1 and N16

特征 Characteristics	S-1	N16
革兰氏染色 Staining	+	+
菌株形状 Cell shape	杆状 Rods	杆状 Rods
是否产芽孢	是 Yes	是 Yes
Spore production		
孢子主要位置	中生	中生
Spore main position	Middle position	Middle position
孢子形状	椭圆 Oval	椭圆 Oval
Spore shape		
鞭毛 Flagella	周生 Peritrichous	周生 Peritrichous
运动性 Moveability	+	+
厌氧生长	-	-
Anaerobic growth		
氧化酶 Oxidase	+	-
V-P 试验	-	+
Voges-Proskauer test		
硝酸盐还原	+	+
Nitrate reduction		
柠檬酸盐利用	-	+
Citrate utilization		
硫化氢产生	-	+
H ₂ S production		
吲哚实验 Indole test	-	-
水解明胶	+	-
Hydrolyzed gelatin		
葡萄糖产酸	+	+
Glucose producing acid		
阿拉伯糖产酸	-	+
Arab sugar producing acid		
甘露醇产酸	+	-
Mannitol producing acid		
葡萄糖产气 Glucose gas	-	+
7% NaCl	+	+

注: “+”为反应阳性, “-”为反应阴性

Note: +. Positive; -. Negative

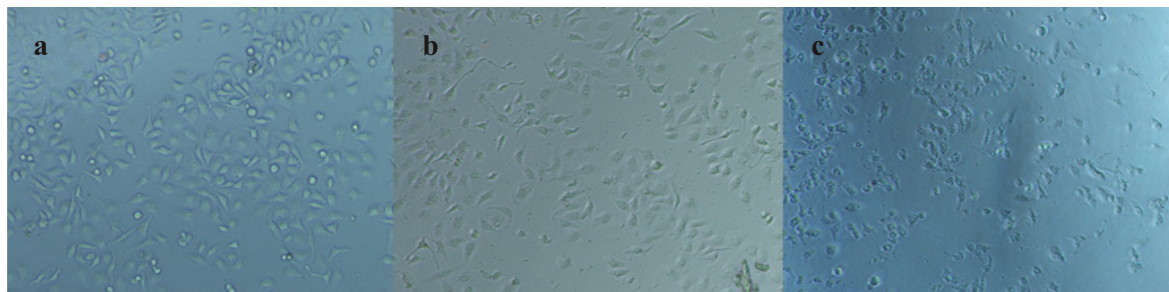


图 4 菌株 S-1 代谢产物对 BEL-7402 的形态影响

Fig.4 The morphological change of BEL-7402 cells induced by fermented product from *Brevibacillus* sp. S-1

a. 阴性对照; b. 浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; c. 浓度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

a. Negative control; b. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fermented product; c. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fermented product

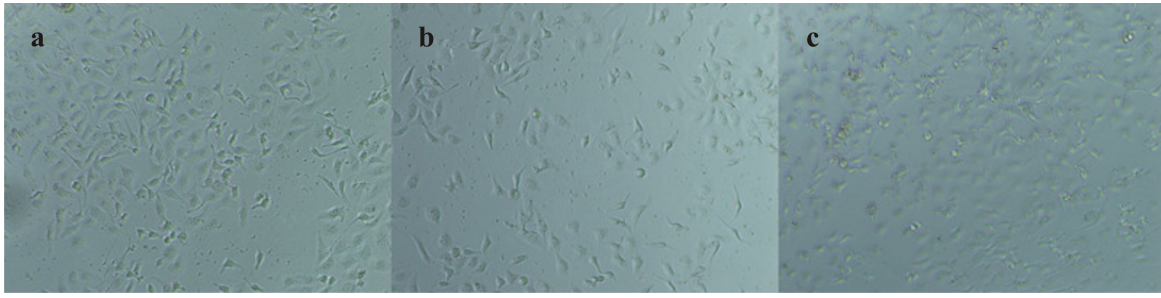


图 5 菌株 N16 代谢产物对 BEL-7402 的形态影响

Fig.5 The morphological change of BEL-7402 cells induced by fermented product from *Bacillus* sp. N16

a. 阴性对照; b. 浓度 100 µg/ml; c. 浓度 200 µg/ml
a. Negative control; b. 100 µg/ml fermented product; c. 200 µg/ml fermented product

3 讨论

本研究从实验室保藏的 5 株海洋微生物中通过 MTT 活性跟踪法筛选出两株产抗肿瘤活性物质的菌株 S-1 和 N16。它们的代谢产物对多种肿瘤细胞株 (BEL-7402、RKO、U251、A549、MCF-7) 都具有良好的抗肿瘤活性, 有进一步研究的价值。通过 16S rRNA 的序列分析和生化特征试验, 初步确定 S-1 为短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。两种海洋菌株的发酵液通过正丁醇萃取制备的活性组分, 通过 MTT 和形态学观察法初步确定有抑制肝癌细胞 BEL-7402 增殖并引起细胞形态改变的生物活性。

本研究以筛选小分子化合物为目的, 采用有机溶剂萃取的方法 (Acharya *et al*, 2012; Benariba *et al*, 2012; Jain *et al*, 2012; Wen *et al*, 2012), 从 5 株供试菌中筛选出两株产抗肿瘤活性物质的菌株。后期试验可对有较好抗肿瘤活性的组分通过多种方式进一步纯化, 包括超滤、离子交换层析、分子筛层析和高效液相色谱等。其他暂无生物活性的菌株可以通过不同极性或非特异性的试剂或不同的肿瘤细胞模型重新筛选, 以期待有新的抗肿瘤活性物质的发现。

海洋微生物是自然资源最大的宝库, 蕴含着巨大潜力。近年来, 从海洋细菌、海洋真菌和海洋放线菌中筛选出越来越多新颖抗肿瘤化合物, 其中有很多已经进入临床阶段 (田树红等, 2007)。尽管如此, 现在仍只有极少数海洋微生物来源的抗肿瘤药物在市场上应用。因此, 一方面要加快和完善先导化合物的筛选和纯化工艺; 另一方面要尽量避免相同菌株的筛选和相同化合物的纯化等基础工作 (田树红等, 2007)。海洋中有抗肿瘤活性的微生物多以放线菌和真菌为主, 从芽孢杆菌属的海洋细菌代谢产物中筛选出抗肿瘤活性物质的报道并不多见。因此, 本研究丰富了抗

肿瘤海洋微生物种质资源, 有望为结构新颖的抗肿瘤先导化合物的发现奠定基础。

参 考 文 献

- 王英姿, 姬泓巍, 李兆新, 等. 磺胺邻二甲氧嘧啶在牙鲆体内的代谢动力学. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 94-99
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 43-65
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社. 1999, 15-123
- 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002, 62-67
- 田树红, 黄惠琴, 鲍时翔, 等. 海洋微生物抗肿瘤天然产物研究进展. 微生物学通报, 2007, 34(4): 799-803
- 任虹, 崔承彬. 海洋微生物抗肿瘤活性产物研究进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(5): 57-63
- 项斌, 杜国华, 王煦辰, 等. 快速分离与鉴定天山堇菜中的天然环肽. 药学报, 2010, 45(11): 1402-1409
- 张德, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究. 生物多样性保护, 2010, 25(6): 651-658
- 薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 45-51
- Acharya SR, Acharya NS, Bhangale JO, *et al*. Antioxidant and hepatoprotective action of *Asparagus racemosus* Willd. root extracts. Indian J Exp Biol, 2012, 50(11): 795-801
- Benariba N, Djaziri R, Hupkens E, *et al*. Insulinotropic action of *Citrullus colocynthis* seed extracts in rat pancreatic islets. Mol Med Rep, 2012, 7(1): 233-236
- Cruz-Monserrate Z, Vervoort HC, Bai R, *et al*. Diazonamide A and a synthetic structural analog: disruptive effects on mitosis and cellular microtubules and analysis of their interactions with tubulin. Mol Pharmacol, 2003, 63(6): 1273-1280
- He QJ, Yang B, Lou YJ, *et al*. Contragestazol (DL111-IT) inhibits proliferation of human androgen-independent prostate cancer cell line PC3 *in vitro* and *in vivo*. Asian J Androl, 2005, 7(4): 389-393
- Jain NK, Singhai AK. Protective role of *Beta vulgaris* L. leaves extract and fractions on ethanol-mediated hepatic toxicity.

- Acta Pol Pharm, 2012, 69(5): 945–950
- Lebar MD, Heimbegner JL, Baker BJ. Cold-water marine natural products. Chem Inform, 2007, 38(45): 774–797
- Luesch H, Moore RE, Paul VJ, *et al.* Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. J Nat Prod, 2001, 64(7): 907–910
- Petit K, Biard JF. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(4): 603–631
- Pettit GR, Cichacz Z, Barkoczy J, *et al.* Isolation and structure of the marine sponge cell growth inhibitory cyclic peptide phakellistatin 1. J Nat Prod, 1993, 56(2): 260–267
- Schwartzmann G, Da Rocha AB, Mattei J, *et al.* Marine-derived anticancer agents in clinical trials. Expert Opin Investig Drugs, 2003, 12(8): 1367–1383
- Tan QW, Ouyang MA, Shen S, *et al.* Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Neosartorya* fisheries. Nat Prod Res, 2012, 26(15): 1402–1407
- Wang C, Liu M, Cheng LY, *et al.* A novel polypeptide from *Meretrix meretrix* Linnaeus inhibits the growth of human lung adenocarcinoma. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(4): 442–450
- Wen Q, Lin X, Liu Y, *et al.* Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. Root. Molecules, 2012, 17(10): 12330–12340

(编辑 冯小花)

Screening of Antitumor Metabolites From Two Marine Microorganisms and Their Strain Identification

YI Yao^{1,2}, ZHENG Lanhong¹, CHEN Shijian¹, SHENG Jun¹, SUN Mi^{1①}

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

Abstract Marine microorganisms are the important resources in the natural products with biological activity. Finding antitumor drugs and compounds from germplasm resources has become a hot topic. The current study investigated the biological role of the fermented products of marine bacteria isolated from marine strains in several cancer cell lines. Five marine strains were fermented, and the supernatant was collected after centrifugation as total products that were fractionated with n-butyl alcohol. The pooled organic layer was evaporated using a rotary evaporator under reduced pressure, and the peptide pellet was dissolved in phosphate buffer for further usages. Antitumor metabolites of five marine microorganisms were screened by MTT method in several cancer cell lines. The result showed that the fermented products of strain S-1 and N16 inhibited cancer cell proliferation. Specifically, fermented product from strain S-1 attenuated MCF-7, U251 and BEL-7402 cell proliferation and the IC_{50} were 44 $\mu\text{g/ml}$, 82 $\mu\text{g/ml}$ and 102 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Moreover, fermented product from strain N16 inhibited MCF-7 and BEL-7402 cell proliferation and their IC_{50} was 84 $\mu\text{g/ml}$ and 133 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The fermented products of S-1 and N16 induced the morphological change of the BEL-7402 cells. According to their 16S rRNA sequences and physiological biochemical properties, strains S-1 and N16 were identified as *Brevibacillus* sp. and *Bacillus* sp., respectively. The further research is to find new antitumor compounds from the fermented products of marine bacteria *Brevibacillus* sp. S-1 and *Bacillus* sp. N16. This study supports that the germplasm resources of marine microorganisms may be a novel resource for the discovery of novel anti-tumor compounds.

Key words Marine microorganism; Strain identification; Fermented product; Antitumor activity

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

海带岩藻聚糖硫酸酯电渗析分离工艺*



姜晓东 汪秋宽^① 李鹏亮 何云海 宋悦凡 任丹丹 侯 丽

(大连海洋大学食品科学与工程学院 辽宁省水产品加工及综合利用重点实验室
国家海藻加工技术研发分中心 大连 116023)

摘要 采用电渗析法对盐沉后的海带酶解液中岩藻聚糖硫酸酯进行分离,探索工业化分离生产岩藻聚糖硫酸酯的方法,以解决目前乙醇沉淀法存在的安全性和高成本等问题。以脱盐率、糖保留率为检测指标,采用响应面法优化了电渗析工艺参数。结果显示,在操作电压 80 V、料液流量 3.2 L/min、固形物浓度 10 mg/ml、pH=5 的条件下,电渗析连续循环 3 次,海带酶液解干基中多糖含量由 40.17% 提高至 47.11%,硫酸根含量由 3.36% 提高至 4.97%。电渗析后海带酶液干基中的金属离子含量为 Ca 0.13 mg/g、Mg 16.04 μg/g、Cu 0.29 μg/g、Se 11.7 μg/g、Cr 8.06 μg/g、Pb 未检出,较电渗析前均有降低。电渗析对脱除褐藻胶的海带酶解液进行脱盐纯化处理,可有效地分离纯化出岩藻聚糖硫酸酯。

关键词 电渗析;岩藻聚糖硫酸酯;响应面法;脱盐

中图分类号 R151 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0120-08

岩藻聚糖硫酸酯(Fucoidan)是一种存在于褐藻类的特殊硫酸多糖(纪明侯, 1987),具有抗凝血(Chen *et al.*, 2012)、降血脂(湛素华等, 2010)、抗慢性肾衰(Coothan *et al.*, 2006)、抗肿瘤(Men'shova *et al.*, 2012)、促进组织再生(Sezer *et al.*, 2011)、增强机体免疫(Caipang *et al.*, 2011)等多种生理活性,是 21 世纪研究的热点之一。

海带(*Laminaria japonica*)是褐藻门、海带目、海带科、海带属的一种大型海藻,是食药两用的褐藻类植物(陈云龙等, 2013),2012 年我国海带产量高达 97.9 万 t(干基),但这些资源还远未得到充分利用。目前从海带中提取岩藻聚糖硫酸酯普遍采用乙醇分级沉淀纯化法(Anno, 1966),但乙醇分级纯化法在工业生产中存在安全隐患。电渗析是运用带电离子交换膜(Atungulu *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2004),在电场的作用下,使阴阳离子发生定向移动,从而实现溶液的纯化、浓缩和淡化的目的。与其他方法相比,电渗析法耗能少,对生产的安全性要求低,具有操作连续、对环境污染小、成本低廉等诸多优点(Cai, 2006)。大量文献显示,电渗析在食品工业领域有广泛的应用(Xu, 2005; Mabrook *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007)。

本研究采用电渗析的方法分离纯化岩藻聚糖硫酸酯,通过优化电渗析工艺条件,得到高产率、高纯度的岩藻聚糖硫酸酯。此方法的应用,对实际生产有一定的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器设备

实验于 2012 年 5-9 月在辽宁省大连海洋大学进行。

电渗析器由沧州晟达瑞水处理科技有限公司生产(100 对膜,单层膜面积 200 mm×800 mm),原子吸收分光光度计由北京普析通用仪器有限责任公司生产。

脱除褐藻胶的海带酶解液由实验室制备,L-岩藻糖为 Sigma 公司生产,D-半乳糖为国药集团化学试剂有限公司生产,其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 海带酶解液制备 海带酶解液由大连海洋大学国家海藻加工技术研发分中心提供。海带加水,用高速组织捣碎机捣碎,酶解、抽提、离心,得上清

* 公益性行业(海洋)科研专项(201405040)资助。姜晓东, E-mail: dejiaaa@126.com

^① 通讯作者:汪秋宽,教授, E-mail: wqk320@dlou.edu.cn

收稿日期: 2014-01-17, 收修改稿日期: 2014-04-29

液, 上清液脱除褐藻胶沉淀, 得脱除褐藻胶的海带酶解液(何云海等, 2007)。

1.2.2 电渗析实验方法 海带酶解液进行电渗析试验。首先优化确定了电渗析的各单因素试验条件, 包括电渗析海带酶解液的 pH、电渗析电压、料液流量、海带酶解液的固形物浓度, 在单因素实验结果的基础上以响应面试验设计优化电渗析条件。

1.2.3 总糖的测定 用苯酚-硫酸法测定糖含量(张惟杰, 1987)。

1.2.4 硫酸根的测定 用盐酸水解-硫酸钡重量法测定硫酸根含量(张惠芬等, 2002)。

1.2.5 甘露醇的测定 用比色法测定甘露醇含量(余炜等, 2012)。

1.2.6 碘的测定 利用溴将碘离子转化成碘, 然后用硫代硫酸钠滴定析出的碘, 从而测定出样品中碘的含量(周令芬, 1997)。

1.2.7 脱盐率的计算 脱盐率计算公式:

$$R = (K_j - K_d) / K_j \times 100$$

式中, R 为脱盐率(%), K_j 为初始溶液的电导率(mS/cm), K_d 为电渗析后溶液的电导率(mS/cm)。

1.2.8 总糖保留率的计算 总糖保留率计算公式:

$$R_s = (C_{i,p} / C_{i,f}) \times 100$$

式中, R_s 为总糖保留率(%), $C_{i,f}$ 为处理前样品中总糖含量(mg/ml), $C_{i,p}$ 为电渗析处理后总糖含量(mg/ml)。

2 结果与分析

2.1 电渗析试验最佳 pH 的确定

当电渗析电压为 30 V、料液流量为 1.5 L/min、

固形物浓度为 10 mg/ml 时, 调节海带酶解液的 pH 分别为 4、5、6、7、8、9, 进行电渗析分离脱除重金属, 经喷雾干燥后, 测定样品中的各成分含量, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 当 pH=5 时电渗析后海带酶解液中总糖含量和硫酸根含量最高, 且各金属离子含量相对较低, 所以综合考虑选取 pH=5 作为电渗析的最佳 pH 值。

2.2 电渗析单因素试验

2.2.1 不同电压条件下电渗析试验结果 将海带酶解液 pH 调至 5, 调节固形物浓度为 10 mg/ml, 进料流量为 1.5 L/min, 测定不同电压条件下电渗析对海带酶解液脱盐率、总糖保留率的影响, 结果见图 1。在 20–120 V 电压范围内, 脱盐率随着电压的升高而增高, 当电压升高到 80 V 后, 脱盐率随着电压的升高其增幅减小。总糖保留率在 20–80 V 范围内均在 80% 以上, 说明电渗析较好地保存了海带酶解液中的岩藻聚糖硫酸酯, 电压在 80 V 时电渗析效果较好。

2.2.2 不同进料流量对电渗析分离效率的影响 海带酶解液(pH=5), 在固形物浓度为 10 mg/ml、电压 30 V 条件下, 测定电渗析流量对海带酶解液脱盐率、总糖保留率的影响结果见图 2。结果显示, 在 1.5–5.5 L/min 流量范围内, 脱盐率随着流量的增加而降低, 总糖保留率在 1.5–3.5 L/min 范围内逐渐增加, 流量大于 3.5 L/min 时, 总糖保留率基本保持恒定, 但此时脱盐率低于 40%。

2.2.3 海带酶解液固形物浓度对电渗析脱盐率、总糖保留率的影响 在海带酶解液 pH=5、流量 1.5 L/min、

表 1 海带酶解液 pH 对电渗析后岩藻聚糖硫酸酯粗品(干基)各成分含量的影响

Tab.1 The content of polysaccharide, sulfate and other components in the crude fucoidan electro dialysed from *L. japonica* enzymatic hydrolysis solution under different pH

项目 Items	起始 Initial	ED pH 4	ED pH 5	ED pH 6	ED pH 7	ED pH 8	ED pH 9
总糖 Polysaccharide (%)	40.17	48.32	57.61	47.20	53.25	35.64	38.41
硫酸根 SO_4^{2-} (%)	3.36	3.60	3.69	1.51	2.50	2.74	3.10
甘露醇 Mannitol (%)	15.00	16.10	16.60	16.60	9.30	16.00	18.00
碘 Iodine (%)	2.05	2.04	2.31	2.31	1.76	2.00	2.34
Pb ($\mu\text{g/g}$)	2.85	1.58	1.81	0.23	0.23	0.01	0.27
Cu ($\mu\text{g/g}$)	7.12	5.62	4.97	5.68	5.38	6.55	5.65
Cr ($\mu\text{g/g}$)	12.78	9.55	8.61	1.32	0.41	0.31	0.45
Mg ($\mu\text{g/g}$)	449	379	421	431	462	471	389
Ca (mg/g)	9.16	8.15	6.79	7.13	7.29	5.32	5.19
Se ($\mu\text{g/g}$)	13.16	10.35	13.43	10.48	10.63	14.81	13.36
Cd ($\mu\text{g/g}$)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
As ($\mu\text{g/g}$)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: ED. 电渗析; ND. 未检出 Note: ED. Electrodialysis; ND: not detected

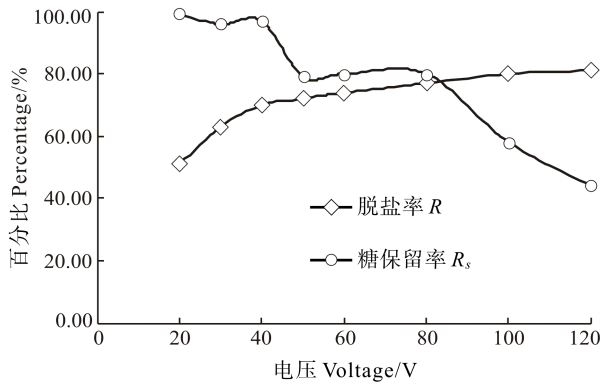


图1 不同电渗析电压的影响
Fig.1 The effects of different voltage

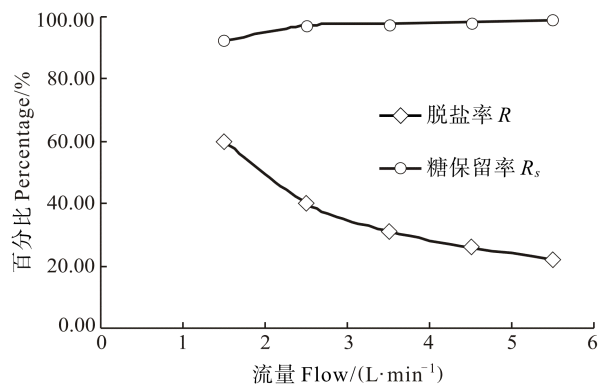


图2 不同流量条件的影响
Fig.2 The effects of different flow

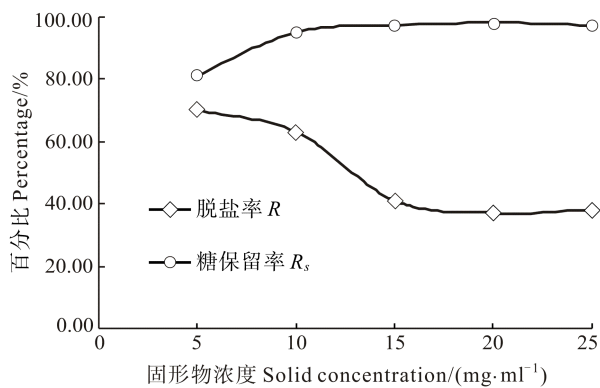


图3 固形物浓度的影响
Fig.3 The effects of different solid concentration

电压 30 V 条件下,电渗析对海带酶解液脱盐率、总糖保留率的影响,结果见图 3。结果显示,在 5–20 mg/ml 固形物浓度范围内,脱盐率随着固形物浓度的增加而降低,固形物浓度大于 20 mg/ml 以后,脱盐率基本保持不变,这是因为固形物浓度增加,膜两侧电荷密度加大,但是电压保持不变,单位时间内只能迁移相同的电荷,所以脱盐率基本不变。总糖保留率在 5–20 mg/ml 范围内逐渐增加,固形物浓度大于 20 mg/ml 时,总

糖保留率基本保持恒定。

2.3 响应面法优化电渗析工艺

2.3.1 响应面法试验设计及电渗析工艺条件的确定

在上述试验的基础上,利用 Design-Expert 软件进行响应面设计,采用中心组合试验 Box-Behnken 设计方案,以电压(V)、流量(L/min)、固形物浓度(mg/ml)为影响因素,利用电渗析器对海带酶解液脱盐工艺进行优化。试验因素水平编码见表 2。试验设计方案和方差分析结果如表 3–表 8 所示。其中表 3、表 5 中 3、6、8、9、15 组为中心试验,用来估计试验误差,其余组为析因试验。经 Design-Expert 软件处理得到响应面分析结果,见图 4–图 9。

表 2 试验因素水平编码
Tab.2 The experimental factors and levels

自变量 Independent variable	编码水平 Code level		
	-1	0	1
A 电压 Voltage (V)	20	50	80
B 流量 Flow (L/min)	1.5	2.5	3.5
C 固形物浓度 Hydrolysate concentration (mg/ml)	10	17.5	25

2.3.2 电渗析对脱盐率的影响 以脱盐率为响应值时,海带酶解液电渗析响应面的试验设计及响应值如表 3、表 4 所示。结果显示,模型的 F 值为 34.29, $P < 0.0001$,表明该回归模型高度显著差异,具有合理性。失拟项的 $P=0.127 > 0.05$,说明失拟项差异不显著。模型的信噪比(Adeq-Precision)为 20.775 > 4 ,这表明方程的拟合度和可信度均很高,进一步说明本模型可用于预测脱盐率。校正决定系数(Adj R^2)为 0.949,说明该模型能解释 94.93%响应值的变化。脱盐率关于电压、流量、固形物浓度的二次多项回归方程:

$$Y1 = 0.39 + 0.16A - 0.077B - 0.079C - 0.006602AB - 0.043AC + 0.027BC - 0.044A^2 + 0.043B^2 + 0.064C^2$$

式中, A 为电渗析器的操作电压(V), B 为通过电渗析器经脱除褐藻酸的海带酶解液流量(L/min), C 为脱除褐藻酸的海带酶解液中固形物浓度(mg/ml)。

以脱盐率为响应值形成的响应面,见图 4–图 6。由图 4 可知,当固形物浓度一定时,电压对脱盐率影响较大,随着电压的升高,脱盐率呈现一直升高的趋势,但流量较大时,随着电压的升高脱盐率升高的比较慢;随着流量的增加脱盐率缓慢降低,电压较高时,随着流量的增大,脱盐率降低的非常缓慢;由图 5 可知,当电压一定时,固形物浓度和流量对脱盐率影响

表 3 Box-Behnken 设计方案及响应值
Tab.3 Box-Behnken experimental design and the corresponding electro dialysis desalination rate

序号 No	电压 Voltage (V)	流量 Flow (L/min)	固形物浓度 Hydrolysate concentration(mg/ml)	脱盐率 R(%)
1	80	1.5	17.5	62.15
2	20	2.5	25.0	23.12
3	50	2.5	17.5	42.25
4	20	3.5	17.5	16.20
5	80	2.5	10.0	66.59
6	50	2.5	17.5	37.68
7	50	1.5	25.0	44.66
8	50	2.5	17.5	39.61
9	50	2.5	17.5	36.80
10	20	1.5	17.5	28.87
11	80	3.5	17.5	46.83
12	80	2.5	25.0	47.39
13	50	3.5	25.0	33.09
14	50	3.5	10.0	48.67
15	50	2.5	17.5	36.80
16	50	1.5	10.0	71.01
17	20	2.5	10.0	25.26

较小, 表现为曲面比较平缓; 由图 6 可知, 当流量一定时, 电压对脱盐率影响较大。随着电压的提高, 脱盐率呈现一直升高的趋势, 但在高固形物浓度的条件下, 电压的升高对脱盐率的影响不大; 而随着固形物浓度的增加脱盐率缓慢降低, 但是固形物浓度对脱盐率的影响较小。

2.3.3 电渗析对总糖保留率的影响 以总糖保留率为响应值时, 海带酶解液电渗析响应面的试验设计及响应值如表 5、表 6 所示。结果显示, 模型 F 值为 5.76, $P=0.015$, 表明该回归模型显著, 具有合理性。失拟项的 $P=0.011<0.05$, 说明失拟项显著。模型的信噪比(Adeq-Precision)为 8.602>4, 这表明方程的拟合度和可信度均很高, 进一步说明本模型可用于总糖保留率的预测。校正决定系数(Adj R^2)为 0.728, 说明该模型能解释 72.81%响应值的变化。脱盐率基于电压、流量、固形物浓度的二次多项回归方程:

$$Y2 = 0.80 - 0.027A - 1.660E - 3B + 0.045C + 0.17AB - 0.053AC - 0.056BC + 0.11A^2 - 0.051B^2 + 0.12C^2$$

表 4 回归模型方差分析结果

Tab.4 The regression model analysis of variance results

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.35	9	0.039	34.29	<0.0001	显著 Significant
残差 Residual	0.008	7	0.001			
失拟项 Lack of fit	0.006	3	0.001	3.55	0.127	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.002	4	0.0005			
总残差 Total residual	0.36	16				

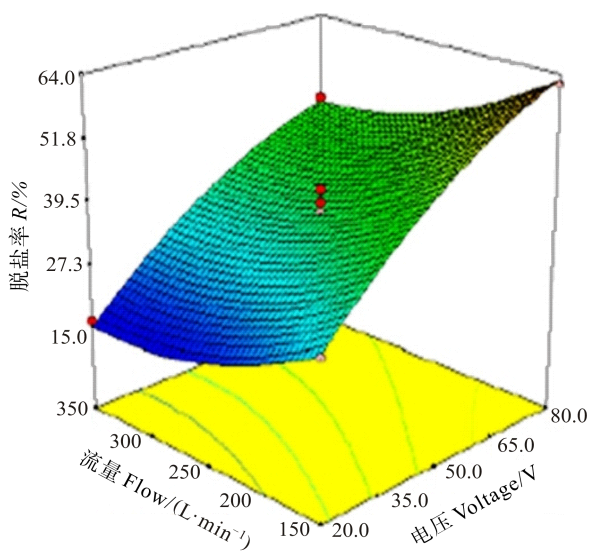


图 4 流量和电压对脱盐率的影响
Fig.4 The effects of flow and voltage on the rate of desalination

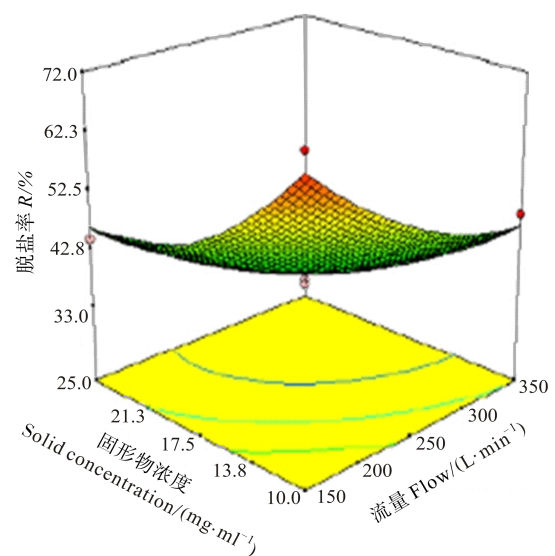


图 5 固形物浓度和流量对脱盐率的影响
Fig.5 The effects of solids concentration and flow on the rate of desalination

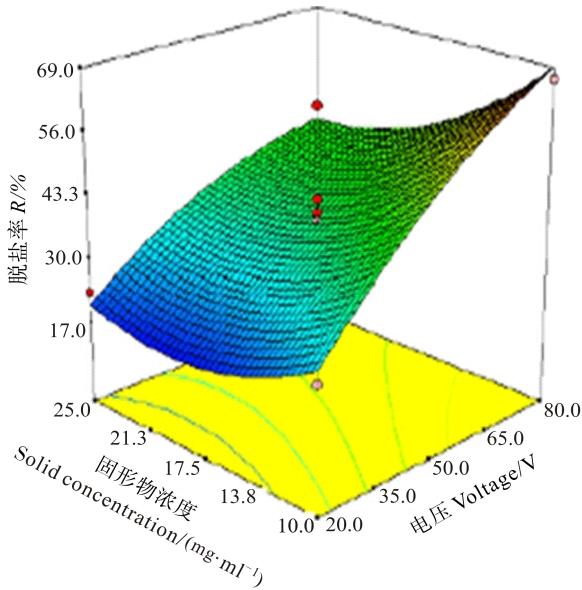


图 6 固形物浓度和电压对脱盐率的影响

Fig.6 The effects of solids concentration and voltage on the rate of desalination

式中, A 为电渗析器的操作电压(V), B 为通过电渗析器的脱除褐藻酸的海带酶解液的流量(L/min), C 为脱除褐藻酸的海带酶解液的固形物浓度(mg/ml)。

以总糖保留率为响应值形成的响应面见图 7-图 9。由图 7 可知, 当流量一定时, 电压和固形物浓度对总糖保留率影响均较大。随着电压的升高, 总糖保留率呈先降低后升高的趋势; 随着固形物浓度的增加, 总糖保留率呈先降低后升高的趋势, 表现为一个锅型曲面。

由图 8 可知, 当电压一定时, 固形物浓度和流量对总糖保留率影响均较大。随着固形物浓度的升高, 总糖保留率整体表现为先缓慢降低, 随后快速升高; 流量对总糖保留率的影响表现为在较低固形物浓度时, 总糖保留率随着流量的增加而增加, 在较高固形物浓度时, 总糖保留率随着流量的增加而降低。

由图 9 可知, 当固形物浓度一定时, 电压和流量对总糖保留率影响均较大。电压对总糖保留率的影响表现为: 在较低流量时, 总糖保留率随着电压升高而降低, 在较高流量时, 总糖保留率随着电压的升高而增加; 流

表 5 Box-Behnken 设计方案及响应值
Tab.5 Box-Behnken experimental design and the corresponding electro dialysis saccharide retention

序号 No	电压 Voltage (V)	流量 Flow (L/min)	固形物浓度 Hydrolysate concentration (mg/ml)	总糖保留率 R_s (%)
1	80	1.5	17.5	80.43
2	20	2.5	25.0	94.14
3	50	2.5	17.5	97.87
4	20	3.5	17.5	93.01
5	80	2.5	10.0	97.98
6	50	2.5	17.5	97.67
7	50	1.5	25.0	98.27
8	50	2.5	17.5	97.81
9	50	2.5	17.5	89.12
10	20	1.5	17.5	99.47
11	80	3.5	17.5	92.11
12	80	2.5	25.0	86.45
13	50	3.5	25.0	92.89
14	50	3.5	10.0	94.84
15	50	2.5	17.5	91.55
16	50	1.5	10.0	97.42
17	20	2.5	10.0	85.87

量对总糖保留率的影响表现为, 在较低电压时, 总糖保留率随着流量升高而降低, 在较高电压时, 总糖保留率随着流量升高而增加。

2.3.4 响应面优化结果 以脱盐率最高、总糖损失最少为目的, 对电渗析工艺条件进行优化, 得出的理论值及实际检测值见表 7。由表 7 可以看出, 在理论最佳条件下, 实际的总糖保留率达到了 100%, 脱盐率也接近理论值。在最佳条件下, 将经电渗析处理的样品喷雾干燥, 并测定样品中各成分含量, 结果见表 8。由表 8 可知, 样品中(干基)总糖含量由 40.17%提高到 62.61%, 硫酸根含量由 3.36%提高到 3.73%, 各金属离子含量均下降。

2.3.5 电渗析试验方案的进一步优化 由于按优化条件进行电渗析处理后的样品硫酸根含量较低(硫酸根含量只占干基含量的 3.73%), 各金属离子含量依

表 6 回归模型方差分析结果
Tab.6 The regression model analysis of variance results

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.280	9	0.031	5.76	0.015	显著 Significant
残差 Residual	0.038	7	0.005			
失拟项 Lack of fit	0.035	3	0.012	16.04	0.011	显著 Significant
纯误差 Pure error	0.003	4	0.0007			
总残差 Total residual	0.320	16				

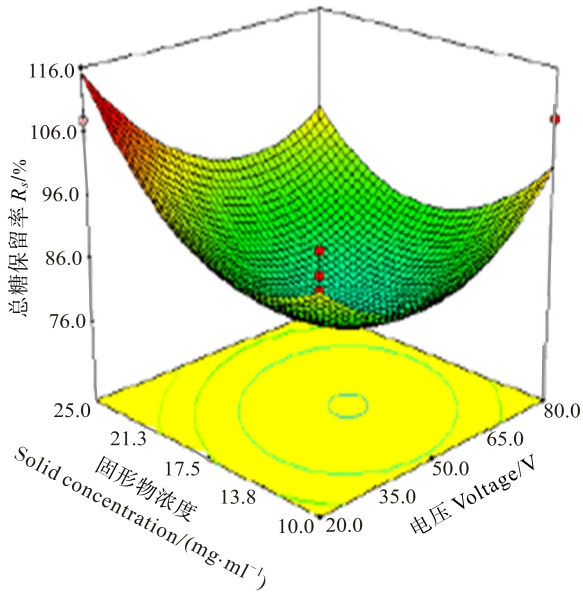


图 7 固形物浓度和电压对总糖保留率的影响

Fig.7 The effects of solids concentration and voltage on the rate of carbohydrate retention

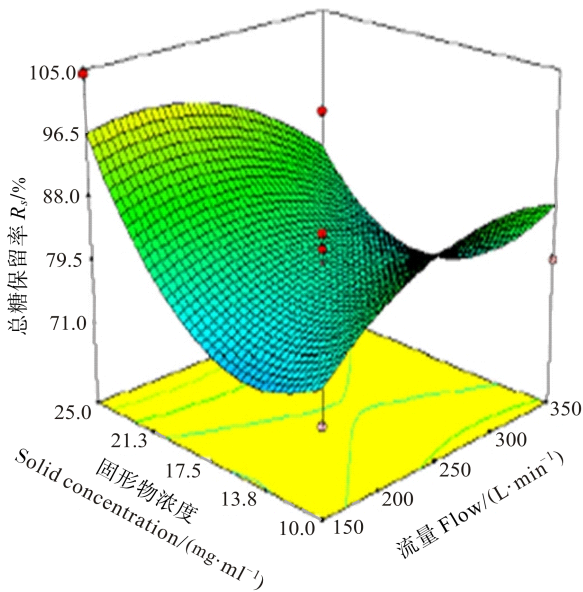


图 8 固形物浓度和流量对总糖保留率的影响

Fig.8 The effects of solids concentration and flow on the rate of carbohydrate retention

然较高, 因此采用多次脱盐处理, 考察脱盐次数对岩藻聚糖硫酸酯及各金属离子含量的影响, 结果见表 9。由表 9 可以看出, 当电渗析脱盐次数为 3 时, 岩藻聚糖硫酸酯粗品(干基)中硫酸根含量已经达到 4.97%, 再增加脱盐次数对其含量影响不大, 且此时各金属离子含量相对较低。综合考虑, 选择电渗析脱盐次数为 3 次。

3 讨论

电渗析在多糖脱盐方面的研究已经取得了一定

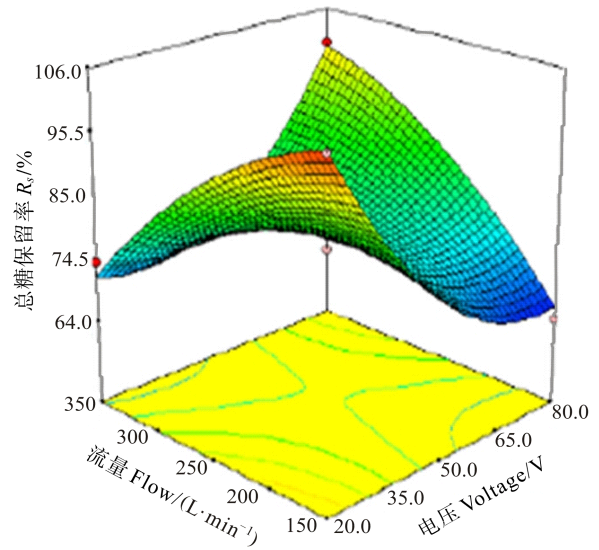


图 9 流量和电压对总糖保留率的影响

Fig.9 Effects of flow and voltage on the rate of carbohydrate retention

表 7 响应面优化结果理论值与实际值的比较

Tab.7 The comparison of the actual value and the theoretical value of response surface optimization

最佳条件 Optimum condition	电压 Voltage (V)	流量 Flow (L/min)	固形物浓度 Hydrolysate Concentration (mg/ml)	脱盐 率 R(%)	总糖保 留率 R _s (%)
理论值 Theoretical value	79.99	3.13	10	63.65	100
实际值 Actual val- ue	80.00	3.20	10	60.32	100

表 8 电渗析前后各成分(干基)含量比较

Tab.8 The comparison of the components before and after electrodialysis

项目 Items	ED 前 Before ED	1 次 1 time
总糖 Polysaccharide (%)	40.17	62.61
硫酸根 SO ₄ ²⁻ (%)	3.36	3.73
甘露醇 Mannitol (%)	15.0	16.7
碘 Iodine (%)	2.05	2.34
Pb (μg/g)	2.85	1.71
Cu (μg/g)	7.117	4.94
Cr (μg/g)	12.78	8.85
Mg (μg/g)	449	415
Ca (mg/g)	9.16	6.38
Se (μg/g)	13.16	12.32
Cd (ng/g)	ND	ND
As (ng/g)	ND	ND

注: ED. 电渗析; ND. 未检出

Note: ED. Electrodialysis; ND: not detected

表 9 不同电渗析次数下各成分(干基)含量比较

Tab.9 The comparison of the components under different times of electro dialysis

项目 Items	ED 前 Before ED	1 次 1 time	3 次 3 times	5 次 5 times	7 次 7 times
总糖 Polysaccharide (%)	40.17	62.61	47.11	54.94	58.23
硫酸根 SO ₄ ²⁻ (%)	3.36	3.73	4.97	5.09	4.93
甘露醇 Mannitol (%)	15	16.7	16.02	17.17	17.65
碘 Iodine (%)	2.05	2.34	2.54	1.75	1.63
Pb (μg/g)	2.85	1.71	ND	ND	ND
Cu (μg/g)	7.12	4.94	0.29	0.12	0.08
Cr (μg/g)	12.78	8.85	8.06	8.12	7.96
Mg (μg/g)	449	415	16.04	8.35	2.28
Ca (mg/g)	9.16	6.38	0.13	0.13	0.08
Se (μg/g)	13.16	12.32	11.7	12.55	13.93
Cd (μg/g)	ND	ND	ND	ND	ND
As (μg/g)	ND	ND	ND	ND	ND

注: ED. 电渗析; ND. 未检出

Note: ED. Electrodialysis; ND: not detected

的成果,王秋霜等(2008)通过电渗析的方法对大豆低聚糖进行脱盐处理,得出电渗析的最佳操作条件为:工作电压 20 V、进料流量为 1 L/min,脱盐率达到 96.07%,大豆低聚糖保留率 83.82%。本研究将盐沉淀后的海带酶解液进行电渗析脱盐,得出电渗析条件为料液 pH 为 5、电压为 80 V、进料流量为 3.2 L/min、固形物浓度为 10 mg/ml 的条件下连续脱盐 3 次,脱盐率达到 72%,岩藻聚糖硫酸酯保留率 100%。与大豆低聚糖电渗析相比,本研究岩藻聚糖硫酸酯无损失,且电渗析前后岩藻聚糖硫酸酯由 43.53%提高到 52.08%。与文献相比,脱盐率相对低的原因是:采用的原料不同,且前者的流量很小,不能满足工业化生产的需要。

黄伟等(2007)采用批量循环式脱盐的方式对竹笋原液进行电渗析脱盐,在电压为 26 V、流量为 1.17 L/min、固形物浓度为 21.4 mg/ml 的条件下,脱盐率达到 47.5%,氨基酸保留率 93.48%,且各金属离子都有明显的下降。本研究将盐沉淀后的海带酶解液进行电渗析纯化,对电渗析前后的海带酶解液进行喷雾干燥,检测干基中的金属离子含量,其中 Ca 脱除了 98.56%,Mg 脱除了 96.42%,Cu 脱除了 96%,Cr 脱除了 36.93%,Se 脱除了 11.09%,电渗析后 As、Pb、Cd 均未检出,说明电渗析对金属离子有较好的脱除作用。

综上所述,电渗析对脱除褐藻胶的海带酶解液进行脱盐纯化处理,可比较有效地分离、纯化海带酶解

液中的岩藻聚糖硫酸酯。

参 考 文 献

- 王秋霜,应铁进,赵超艺,等. 电渗析技术在大豆低聚糖溶液脱盐上的应用. 农业工程学报, 2008, 24(10): 243-247
- 纪明侯. 海藻化学. 北京: 科学出版社, 1987: 208-231
- 何云海,汪秋宽,张婷,等. 海带岩藻聚糖硫酸酯酶解工艺及分离和纯化研究. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(2): 215-219
- 余炜,伍时华,张英. 甘露醇测定方法研究. 广西民族师范学院学报, 2012, 29(3): 19-23
- 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 6-7
- 张惠芬,李宝才,范家恒,等. 盐酸水解-硫酸钡重量法测定硫酸酯化多糖硫酸基含量方法考察. 食品科学, 2002, 23(5): 107-111
- 陈云龙,单秀娟,戴芳群,等. 东海近海带鱼群体相对资源密度、空间分布及其产卵群体的结构特征. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 8-15
- 周令芬. 新法从海带中提取碘. 海南大学学报(自然科学版), 1997, 15(3): 236-238
- 黄伟,刘东红. 竹笋原液电渗析脱盐工艺的研究. 食品与发酵工业, 2007, 33(3): 72-74
- 谌素华,王维民,刘辉. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 28-31
- Anno K. Isolation and purification of fucoidan from brown seaweed *Pelvetia wrightii*. Agr Biol Chem, 1996, 30(5): 495-499
- Atungulu G, Koide S, Sasaki S. Ion-exchange membrane mediated electro dialysis of scallop broth: Ion, free amino acid and heavy metal profiles. Food Eng, 2007, 78(4): 1285-1290
- Cai BX. Study of membrane separation processes of a betaine-like medicinal solution. Desalination, 2006, 191(3): 432-437
- Caipang CM, Lazado CC, Berg I, et al. Influence of alginic acid and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. Fish Physiol Biochem, 2011, 37(3): 603-612
- Chen A, Zhang F, Shi J, et al. Study on antithrombotic and antiplatelet activities of low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica*. Journal of Ocean University of China, 2012, 11(2): 236-240
- Gong Y, Tang Y, Wang XL. The possibility of the desalination of actual 1, 3-propanediol fermentation broth by electro dialysis. Desalination, 2004, 161(2): 169-178
- Huang CH, Xu TW, Zhang YP. Application of electro dialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. J Membr Sci, 2007, 288: 1-12
- Mabrook MF, Petty MC. Effect of composition on the electrical conductance of milk. J Food Eng, 2003, 60(3): 321-323
- Men'shova RV, Ermakova SP, Rachidi SM, et al. Seasonal variations of the composition, structural features, and antitumor properties of polysaccharides from *Padina pavonica* (Leba-

- non) as a function of composition. *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 47(6): 870–875
- Sezer AD, Cevher E. Fucoïdan: A Versatile Biopolymer for Bio-medical Applications. *Tissue Engineering and Biomaterials*, 2011, 8: 377–406
- Veena CK, Josephine A, Preetha P, *et al.* Renal peroxidative changes mediated by oxalate: The protective role of fucoïdan. *Life Sciences*, 2006, 79(19): 1789–1795
- Xu TW. Ion exchange membrane: State of their development and perspective. *J Membr Sci*, 2005, 263(1–2): 1–29

(编辑 刘丛力)

Separating Fucoïdan From *Laminaria japonica* Using Electro-dialysis Technology

JIANG Xiaodong, WANG Qiukuan^①, LI Pengliang, HE Yunhai, SONG Yuefan, REN Dandan, HOU Li

(Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Utilization of Liaoning Province, National R & D Branch Center For Seaweed Processing, College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Fucoïdan is a type of heteropolysaccharides that contains the sulfate group. It has gradually become a hotspot of research on the marine bioactive ingredients because it has various biological activities. Fucoïdan is commonly found in brown algae such as *Laminaria japonica*. Fucoïdan can be separated from *L. japonica* with the ethanol method. However this method costs a large amount of ethanol and requires special safety facilities during the precipitation process. In order to establish a more practical and efficient technology, here we explored the separation of fucoïdan from pretreated *L. japonica* enzymatic hydrolysate using electro-dialysis technology. We used salt removing and carbohydrate retention rates as the indicators and optimized the electro-dialysis with the response surface method. The contents of each component in the fucoïdan crude (on dry basis) were determined before and after the electro-dialysis. The results suggested that the optimal conditions were: voltage 80 V, pH 5, flow 3.2 L/min, and solids content 10 mg/ml. Under these conditions, the salt removing rate was 60.32% and the carbohydrate retention rate was 100%. After continuous electro-dialysis for three times, the polysaccharide content in the dry matter increased from 40.17% to 47.11% and the level of SO_4^{2-} increased from 3.36% to 4.97%. Some metal ions and heavy metal ions decreased after electro-dialysis, which were Ca 0.13 mg/g, Mg 16.04 $\mu\text{g/g}$, Cu 0.29 $\mu\text{g/g}$, Se 11.7 $\mu\text{g/g}$, and Cr 8.06 $\mu\text{g/g}$ on the dry basis, and Pb was not detected. These results suggested that electro-dialysis technology could be an efficient and practical method for desalination and fucoïdan purification from alginate-free kelp enzymatic hydrolysate. This method should help optimize the pre-treatment process in the industrial mass production of fucoïdan, and provide a new idea and theoretical foundation on fucoïdan separation from *L. japonica*. Moreover it follows the trend in current food industry: high efficiency, high quality, and environmental protection.

Key words Electro-dialysis; Fucoïdan; Response surface; Desalination

① Corresponding author: WANG Qiukuan, E-mail: wqk320@dlou.edu.cn

紫菜中六六六、滴滴涕和扑草净的检测*



周明莹¹ 曲克明¹ 陈碧鹃¹ 谢寒冰² 王联珠^{1①} 邵 会³ 顾晓慧⁴

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

2. 山东省青岛市菜篮子商品质量监督检测中心 青岛 266071;

3. 青岛大学医学院 青岛 266021; 4. 中国海洋大学 青岛 266100)

摘要 利用气相色谱-质谱联用技术测定紫菜中六六六、滴滴涕和扑草净的残留量。试样用乙腈提取,经石墨化炭黑/氨基复合柱净化,采用气相色谱-电子轰击源质谱测定,检测模式采用选择离子监测(SIM),外标法定量。研究结果显示,六六六方法定量限为 5.0 μg/kg,滴滴涕为 2.5–5.0 μg/kg,扑草净为 2.5 μg/kg。各组分加标回收率在 78.5%–112.0%之间,相对标准偏差在 3.6%–10.3%之间。结果表明,该方法简便、快速,其准确度和精密度能够满足紫菜中六六六、滴滴涕和扑草净同时检测的要求。

关键词 气相色谱-质谱;六六六;滴滴涕;扑草净;紫菜

中图分类号 X836 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0128-05

六六六(HCHs)与滴滴涕(DDTs)属于有机氯农药,曾作为杀虫剂广泛使用在农业生产中;扑草净(Prometryn)是一种三嗪类(又称均三氮苯类)除草剂,主要用来防治一年生阔叶杂草,近几年,在水产养殖业,扑草净也被用来防除养殖池塘的水草和有害藻类(陈溪等,2013)。以上3种农药理化性质比较稳定,使用的主要环境问题是其残留时间长、降解缓慢,能够长期存在于土壤、水体中,随地表径流进入河流、湖泊,汇入大海。从近年出现的池塘肥水困难,沿海贝类生长速度下降等情况分析,可能与水田、旱田、沿海池塘大量使用除草剂有关。

进入海洋中的有机污染物,极易被海洋中经济海藻吸附(曹煜成等,2012),造成海藻中较高的农残含量。2006年5月,日本通报检测出我国干紫菜中扑草净残留量超出肯定列表中的一致标准(0.01 mg/kg),虽然经过我国的据理投诉,日本最终于2007年1月修改了肯定列表,将紫菜中扑草净限量放宽到0.14–0.19 mg/kg(紫菜基本合格),但此事已引起国内及国际社会对海藻中农药残留的关注,敲响了我国海藻中

农残超标的警钟。有关藻类 HCHs、DDTs 和扑草净的检测方法,目前我国还没有统一标准。为了维护消费者利益、维护水产品正常出口,严格控制海藻中的农药残留量,制定与国际水平相当的检测方法势在必行。

诸多的 HCHs、DDTs 检测方法中,紫外分光光度法、高效液相色谱法灵敏度低,气相色谱法不是确证方法,确证检测方法主要为气相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法。考虑到检测成本以及方法的开展和普及,本研究利用气相色谱-质谱联用检测技术,以紫菜为研究对象,同时测定3种农药的残留量。该方法简便、快速,样品前处理净化效果好,准确度、精密度均能满足农药残留分析的要求。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

甲苯、乙腈均为色谱纯(美国 TEDIA 公司);无水硫酸钠(国药集团化学试剂有限公司):分析纯,550℃

* 国家海洋局环保项目[DOME(P(MEA)-02)和“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD29B06)共同资助。周明莹, E-mail: zhoumy@ysfri.ac.cn

① 通讯作者:王联珠,研究员, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期:2013-11-08, 收修改稿日期:2014-03-08

高温灼烧 4 h, 冷却后密封存放; 无水硫酸镁(国药集团化学试剂有限公司): 分析纯; 氯化钠(天津科密欧试剂开发中心): 优级纯; HCHs、DDTs 混合标准溶液: α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、p, p'-DDE、p, p'-DDD、o, p'-DDT、p, p'-DDT 各单体的浓度均为 100 $\mu\text{g/ml}$; 扑草净(纯度 $\geq 99\%$)(均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

混合标准溶液配制: 扑草净先用乙腈配制成 100 $\mu\text{g/ml}$ 标准溶液, 再与 HCHs、DDTs 标准溶液等体积混合, 用甲苯配成各组分浓度均为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的混合标准溶液。使用时再分别采用逐级稀释的方法用甲苯或乙腈配制系列浓度的混合标准工作液。

1.2 主要仪器与设备

Agilent 7890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配 5975 MSD 检测器, 电子电离源(EI 源); 旋转蒸发设备(日本 Tokyo Rikakikai 公司); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 旋涡振荡器(德国 IKA 仪器公司); Milli-Q 超纯水仪(美国密理博公司); 离心机(德国 Sigma 公司); 石墨化碳/氨基复合柱 500 mg/500 mg/6 ml (博纳艾杰尔科技); VisiprepTM-DL 型固相萃取装置(美国 Supelco 公司)。

1.3 气相色谱-质谱条件

色谱柱: DB-5 MS 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)。柱温箱升温程序: 起始温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 梯度升温至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。进样口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$ 。载气(高纯氮气, 纯度 $\geq 99.999\%$)。流速: 0.7 ml/min。进样方式: 不分流进样。进样体积: 1 μl 。离子源电离能量: 70 eV。离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$ 。传输线温度: 280 $^{\circ}\text{C}$, 四极杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$ 。溶剂延迟时间: 7 min。

1.4 提取

称取 2 g 粉碎好的干紫菜样品(精确至 0.01 g)于 250 ml 锥形瓶中, 加入 10 ml 水振摇 2 min, 静置 10 min。加入 25 ml 乙腈, 再加入 6 g 无水硫酸镁和 1.5 g 氯化钠, 于超声波清洗器提取 20 min, 转移于 100 ml 离心管中, 3500 r/min, 离心 5 min, 倾出上清液于浓缩瓶中。重复提取一次, 合并上清液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发浓缩至约 1 ml。

1.5 净化

在石墨化碳/氨基复合柱中加入约 2 cm 高的无水硫酸钠, 用 10 ml 3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂活化, 当液面到达硫酸钠的顶部时, 将浓缩后的提取液用 3 \times 2 ml 的 3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂全部转移至该柱

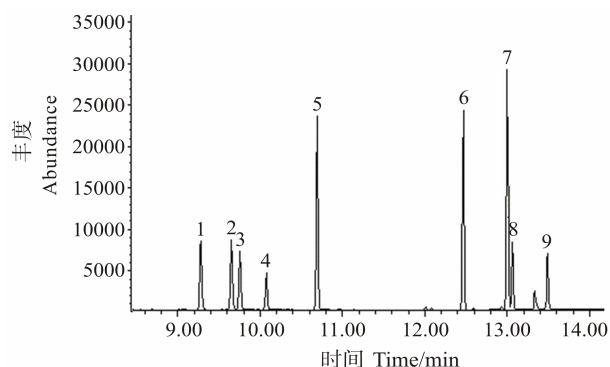
上(注意小柱不得干涸)。然后用 2 \times 2 ml 3:1(v/v)的乙腈/甲苯混合溶剂洗脱, 收集所有流出液体, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转蒸发, 浓缩至 1 ml。加入 10 ml 丙酮, 再浓缩至干。用 1.0 ml 乙腈溶解残渣, 用于 GC/MS 分析。

1.6 定性及定量分析

目标化合物的定性采用全扫描方式, 首先配制一个浓度稍高的标准溶液, 进行全扫描测定(Scan), 确定每种目标物的保留时间和特征离子, 再应用选择离子扫描模式(SIM)分别对选定的特征离子进行分组扫描。选择质量数较大、相对丰度较大的碎片离子作为定量离子, 依此原则再选择 2 个碎片离子作为定性离子, 以定量离子和定性离子共流出与否以及丰度比来判断样品是否含有目标化学物, 由定量离子积分来定量。SIM 方式下 HCHs、DDTs 和扑草净的定量离子及定性离子见表 1。HCHs、DDTs 和扑草净的选择离子监测总离子流见图 1。

表 1 HCHs、DDTs 和扑草净定量和定性离子
Tab.1 The characteristic ions of HCHs, DDTs and prometryn

化合物 Compound	定量离子 Quantitative ion (m/z)	定性离子 Qualitative ions (m/z)
α -HCH	181	181, 183, 219
β -HCH	219	181, 183, 219
γ -HCH	181	181, 219, 109
δ -HCH	181	181, 183, 219
p, p'-DDE	246	246, 318, 316
p, p'-DDD	235	235, 237, 178
o, p'-DDT	235	235, 237, 212
p, p'-DDT	235	235, 237, 212
扑草净 Prometryn	241	241, 184, 226



α -HCH; 2. β -HCH; 3. γ -HCH; 4. δ -HCH; 5. 扑草净;
6. p, p'-DDE; 7. p, p'-DDD; 8. o, p'-DDT; 9. p, p'-DDT

图 1 HCHs、DDTs 和扑草净的总离子流
Fig.1 Total ion current chromatogram of HCHs, DDTs and prometryn

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

研究了乙腈、乙酸乙酯、丙酮:正己烷(1:1) 3种溶剂的提取效果。对比研究发现,3种有机溶剂的提取效率都很好。在添加水平为100 μg/kg时,各组分的回收率在78.5%–110.2%之间。但是通过基质空白和试剂空白研究发现,用乙酸乙酯和丙酮:正己烷(1:1)两种溶剂提取后,色谱峰干扰较严重,而乙腈提取之后得到的谱图干扰较少,因此,研究中采用乙腈作为提取剂。考虑到扑草净属于有机碱类化合物,具有一定的碱性(张敬波等,2006),提取时加入适量的水中显弱酸性的硫酸镁,可起到中和作用。另外,在用乙腈提取时,由于乙腈与水互溶,研究时加入氯化钠,可以改变乙腈在水中的溶解度,增大水相的密度,使乙腈与水相完全分离,提高提取效率。

2.2 净化方法的选择

由于紫菜中含有较多的色素和其他诸如胡萝卜素、叶绿素、维生素、蛋白质等成分,如果在上机进样前没有得到有效的去除,就会对仪器造成污染,并且会对定性、定量产生干扰。本研究运用固相萃取技术对提取液进行净化,石墨化炭黑可以去除紫菜中大量色素和油脂的干扰,氨基固相萃取小柱能够将非水溶液中的中等极性和极性化合物吸附,而极性较弱的HCHs、DDTs和扑草净将随洗脱液流出。采用石墨化炭黑/氨基小柱复合柱,减少了重复过柱、浓缩的步骤,收到事半功倍的效果。

2.3 方法线性范围、相关系数和定量限

用紫菜阴性样品提取液配制目标物质量浓度分

别为0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μg/ml的系列标准工作溶液,在气相色谱-质谱设定条件下分别进样,以定量离子峰面积为纵坐标,工作溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,得到回归方程和相关系数的平方(R^2)见表2。研究结果表明,目标化合物标准曲线的相关系数的平方均在0.995以上,说明各化合物在线性范围内有很好的相关性,符合分析质量保证的要求。结合空白基质加标谱图,以测定结果的信噪比(S/N)大于10的最小浓度为定量限(LOQ)。本方法中HCHs、DDTs和扑草净定量限见表2。

2.4 准确度和精密度

选用紫菜阴性样品进行加标回收率和重复性实验,以考察方法的准确度和精密度。研究选择5、25、100 μg/kg 3个不同浓度水平,每个浓度水平平行测定6次。研究结果见表3。

2.5 实际样品测定

采用上述方法,分别对江苏省连云港养殖区生产的5批条斑紫菜进行检测。检测结果是,5批紫菜样品中有3批检出 α -HCH,两批检出p, p'-DDT,有一批分别检出 δ -HCH和p, p'-DDD,但含量都在定量限附近;有两批检出扑草净,但很微量,低于2007年1月修改后的日本《肯定列表》对扑草净残留量的规定。检测结果见表4。

3 结语

以紫菜为研究对象,采用乙腈提取,石墨化炭黑/氨基复合柱净化,很好地消除了紫菜中色素、蛋白质、脂类等各类干扰物的影响。利用气相色谱-质谱联用

表2 HCHs、DDTs和扑草净的保留时间、回归方程、相关系数、线性范围和定量限
Tab.2 Retention time, regression equation, correlation coefficient, linear range and limit of quantification of HCHs, DDTs and prometryn

目标物 Compound	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range (μg/kg)	定量限 Limit of quantification (μg/kg)
α -HCH	9.29	$y = 5.17 \times 10^3 x - 75.4$	0.999	5.0–500	5.0
β -HCH	9.65	$y = 4.87 \times 10^3 x - 84.1$	0.999	5.0–500	5.0
γ -HCH	9.75	$y = 4.08 \times 10^3 x - 73.6$	0.999	5.0–500	5.0
δ -HCH	10.09	$y = 2.43 \times 10^3 x - 64.3$	0.999	5.0–500	5.0
p, p'-DDE	12.46	$y = 1.86 \times 10^4 x - 209$	0.999	2.5–500	2.5
p, p'-DDD	13.00	$y = 2.90 \times 10^4 x - 463$	0.999	2.5–500	2.5
o, p'-DDT	13.07	$y = 3.96 \times 10^3 x - 78.5$	0.998	5.0–500	5.0
p, p'-DDT	13.50	$y = 2.23 \times 10^3 x - 58.4$	0.995	5.0–500	5.0
扑草净 Prometryn	10.70	$y = 1.43 \times 10^4 x - 177$	0.999	2.5–500	2.5

表 3 HCHs、DDTs 和扑草净回收率及精密度试验结果($n=6$)
Tab.3 Spiked recoveries and relative standard deviation of HCHs, DDTs and prometryn

目标物 Compound	添加量 Spiked levels					
	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
α -HCH	95.80	5.17	99.14	4.25	101.35	4.19
β -HCH	93.01	6.33	95.90	5.45	97.03	3.65
γ -HCH	110.24	7.10	105.68	5.84	105.42	4.40
δ -HCH	103.20	8.85	102.65	6.17	104.44	5.36
p, p'-DDE	96.88	5.32	97.08	4.57	98.32	4.96
p, p'-DDD	78.54	6.19	93.28	6.10	98.73	5.31
o, p'-DDT	107.17	8.46	101.00	9.86	103.32	9.72
p, p'-DDT	112.16	9.94	103.17	10.26	105.94	8.94
扑草净 Prometryn	88.78	4.58	95.97	3.90	98.45	3.56

表 4 条斑紫菜检测结果*
Tab.4 Test results of *Porphyra yezoensis*

目标物 Compound	测定值 Measured value ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Dry weight)				
	1	2	3	4	5
	α -HCH	6.5	5.2	5.4	ND
β -HCH	ND	ND	ND	ND	ND
γ -HCH	ND	ND	ND	ND	ND
δ -HCH	5.4	ND	ND	ND	ND
p, p'-DDE	ND	ND	ND	ND	ND
p, p'-DDD	3.2	ND	ND	ND	ND
o, p'-DDT	ND	ND	ND	ND	ND
p, p'-DDT	ND	5.3	5.6	ND	ND
扑草净 Prometryn	3.1	3.8	ND	ND	ND

*ND 为未检出, Not detected

检测技术, 同时测定紫菜中 HCHs、DDTs 和扑草净 3

种农药的残留量。该方法简便、快速, 样品前处理净化效果好, 溶剂用量少。准确度、精密度均能满足食品中农药残留分析的要求。

参 考 文 献

- 张敬波, 姜文凤, 董振霖, 等. 气相色谱法同时测定玉米中 12 种三嗪类除草剂的残留量. 色谱, 2006, 24(6): 648-651
- 陈溪, 刘梦遥, 曲世超, 等. 海产品、底泥、海水中扑草净药物残留量的液相色谱-串联质谱检测. 化学通报, 2013, 76(2): 183-186
- 杨云, 栾伟, 罗学军. 微波辅助萃取-固相萃取联用气相色谱-质谱法测定土壤中的扑草净. 分析化学, 2004, 23(6): 775-778
- 杨云, 关碧晖, 李攻科. 固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析水中的痕量扑草净. 分析实验室, 2002, 21(4): 19-22
- 曹煜成, 王少沛, 李卓佳, 等. 微绿球藻、隐藻和颤藻竞争氮磷营养的通径分析. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 99-106

(编辑 陈严)

Residual Determination Method of HCHs, DDTs and Prometryn in Porphyra

ZHOU Mingying¹, QU Keming¹, CHEN Bijuan¹, XIE Hanbing²,
WANG Lianzhu^{1①}, SHAO Hui³, GU Xiaohui⁴

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Qingdao Quality Supervision and Inspection Center for Shopping Basket Commodity, Qingdao 266071; 3. Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021; 4. Ocean University of China, Qingdao 266100)

Abstract Seaweed is one kind of phycophyta living on the rock in shallow intertidal. Porphyra is a kind of important economic algae, and it mainly includes *Porphyra haitanensis*, *Porphyra yezoensis* and *Porphyra suborbiculata* Kjellm. The organic pollutants in the marine environment are easily adsorbed by the ocean algae, causing high levels of pesticide residues. Pesticide pollutants in seaweed have seriously restricted the development of Chinese seaweed industry, which inhibits the expanding of international market. However, there are no nationwide standard methods to measure HCHs, DDTs and prometryn in algae. The current study developed new methods to measure the pollutants. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine HCHs, DDTs and prometryn in porphyra. Pesticide residues were extracted with acetonitrile, cleaned-up by Cleanert PestiCarb/NH₂ SPE cartridge, and were determined by GC-EI/MS in the selected ion monitoring mode (SIM). The data was identified and quantified with the exterior standard method. The results showed that the limit of quantification (LOQ) in porphyra of HCHs, DDTs, and prometryn were 5.0, 2.5–5.0, and 2.5 µg/kg, respectively. The efficiencies of extract pesticides were between 78.5% and 112.0%, and the relative standard deviations were from 3.6% to 10.3%. These results suggest that we have developed an easy, fast, and accurate method to simultaneously determine HCHs, DDTs and prometryn in algae.

Key words Gas chromatography-Mass spectrometry; HCHs; DDTs; Prometryn; Porphyra

① Corresponding author: WANG Lianzhu, E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

最佳遗传贡献理论及其在水产动物 选择育种中的应用前景*



栾 生 隋 娟 孟宪红 罗 坤 曹宝祥 孔 杰^①

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

摘要 水产动物多性状复合育种技术已发展成为国内水产选择育种的重要技术体系。在限定的近交水平下,如何选种和配种实现遗传进展最大化是当前该体系亟待解决的一个突出问题。在动植物选择育种中,最佳遗传贡献理论(Optimum Contribution, OC)已成为平衡育种核心群长期遗传进展与近交水平的有效工具。本文论述了 OC 理论的提出背景和发展过程、不同优化算法的特点和该理论在动植物选择育种中的应用进展,并进一步综述了基于基因组信息的 OC 理论研究新进展。遗传贡献目标函数的优化算法主要包括拉格朗日乘数法、半正定规划法和差分进化算法等。基于拉格朗日乘数法,执行 OC 选择 10 代后获得的遗传进展要比最佳线性无偏预测法(Best Linear Unbiased Prediction, BLUP)育种值直接选择高 21%–60%。针对水产动物等高繁殖力大群体,育种学家进一步改进了算法,利用候选亲本父母本群体的加性遗传相关矩阵来计算候选亲本群体的加性遗传相关矩阵和逆矩阵,降低了逆矩阵的维数,提高了最佳遗传贡献值的计算效率。但是拉格朗日乘数法并不能保证求解出的遗传贡献值为全局最大值,而半正定规划方法利用内点算法可以获得候选亲本的最佳遗传贡献值,与前者相比遗传进展可进一步提高 1.5%–9%。差分进化算法可将遗传进展、遗传多样性、后代近交、场间遗传联系、多阶段选择、分子标记利用和成本等多种因素纳入目标函数进行优化,同时完成个体选择和交配方案制定两个关键任务。复合系谱和基因组信息,在限定的近交水平下,可以获得更为准确的遗传贡献值,遗传进展可进一步提高。OC 选择已经应用在畜牧、林木育种研究中,育种群体的近交水平得到了有效控制,与 BLUP 直接选择相比,目标性状的遗传进展进一步提高(17%–30%)。针对水产动物多性状复合育种技术体系的特点,本文分析了 OC 理论应用的紧迫性和可行性,提出了亟待解决的关键技术问题和解决方案,为下一步在水产动物选择育种中应用 OC 理论提供借鉴和指导。

关键词 最佳遗传贡献; 优化算法; 选择育种; 水产动物

中图分类号 S-1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0133-08

随着遗传评估方法的不断改进、选择强度的不断提高,现代动物育种项目的选择反应也在持续增加。以水产动物为例,自 20 世纪 90 年代中后期,引入基于个体动物模型和最佳线性无偏预测法(Best Linear Unbiased Prediction, BLUP)的遗传评估技术后,水产

动物育种的遗传进展得到了快速提高(Gall *et al*, 2002; Ponzoni *et al*, 2005)。经过 9 年选育, GIFT 罗非鱼体重提高了 64%,平均每代 7.1%(Khaw *et al*, 2008)。起始于 20 世纪 70 年代的挪威大西洋鲑育种,经过 5 个世代选择,大西洋鲑选育品系的收获体重比野生群体

* 科技部 863 项目“主要养殖甲壳类良种培育”(2012AA10A409)、农业部 948 项目“水产主导品种分子育种技术引进”(2011-G12)和国家自然科学基金(30700623; 31302180)共同资助。栾 生, E-mail: luansheng@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 孔 杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-06-04, 收修改稿日期: 2014-06-30

提高了 115%，生长周期从 40 个月缩短为 20 个月，饵料系数降低了 20%(Thodesen *et al.*, 1999)。

人工选择产生了遗传进展,同时也会提高育种群体的近交水平(Robertson, 1961)。已有研究表明,应用表型选择、BLUP、分子标记辅助 BLUP 和全基因组选择等方法估计育种值时,个体间的亲缘关系越近,育种值(Estimated Breeding Value, EBV)估计值相关度越高,共同入选留种群的概率越大(Woolliams *et al.*, 2002)。因此,仅利用 EBV 进行选择,育种核心群多世代选择后近交水平上升,遗传方差迅速降低,直至产生近交衰退。特别是水产动物,大部分繁殖力非常高,会进一步加快这种趋势(孔杰等, 2009)。基于 BLUP 育种值选择,开展了 4 代银鲑鱼选育后,两个选育系近交系数分别为 9.5%和 4.3%,近交系数每提高 10%,体长会衰退 5.3%和 1.56%(Gallardo *et al.*, 2004)。鱼类和虾类育种中关于近交衰退的研究较多,多数研究表明,近交衰退对物种的适应性相关性状的影响更大,例如成体体质量和体长、性腺成熟系数、产卵数、孵化率、幼鱼死亡率、幼鱼畸形率、成鱼存活率及饲料转化率等,近交系数每提高 10%引起的近交衰退最高可达 13.8%(马大勇等, 2005)。

尽管在育种群体中无法避免近交,但仍需将近交率控制在一定水平。为了取得较大的遗传进展,一般利用家系间选择方法,依据选择指数,淘汰一定数量的家系;为了降低下一代核心群的近交水平,每一个留种家系贡献同等数目的高选择指数个体作为留种亲本。制定配种方案时,在限定的近交率($\Delta F \leq 1\%$)下,每个留种亲本具有相同的交配机会,个体间随机组合,构建下一代核心群家系。但是,上述方案显然并不是最优方案,远没有实现遗传进展最大化。对于高选择指数家系,应该贡献更多的个体作为留种亲本;对于高选择指数亲本,也应该给予更多的交配机会。但是具体到在限定的近交水平下,需要留种多少家系、每个家系需要贡献多少个体、每个留种亲本交配几次、亲本间按照何种原则配种(如随机交配、高选择指数亲本间优先交配、共亲系数最小亲本间优先交配等)、选择可以持续多少代、遗传进展能够提高多少等问题,亟需一个理论体系和一个遗传模式系统进行预测、验证和优化。特别是对于一些世代离散的水产类育种项目,优秀候选亲本如果在当代没有纳入配种方案,交配期后大部分将死亡,种质资源无法保存,这对于以提高遗传进展为目标的育种项目是一个无法弥补的损失。

如何有效地平衡育种核心群体的遗传进展和近交水平,一直是数量遗传学研究的重要内容。20 世

纪 90 年代中后期,数量遗传学家在畜牧育种研究中发展了最佳遗传贡献(Optimum Contribution, OC)理论,将选择反应和近交率表述为候选亲本遗传贡献的函数,实现控制近交和遗传进展最大化。本文对最佳遗传贡献理论方法及其研究进展进行了综述,并对其在水产动物选择育种中的应用前景进行了展望。

1 最佳遗传贡献理论和最优化算法

育种学家很早就认识到,如果目标性状为高遗传力,应用家系内选择时,育种群体的加性遗传方差的衰减速度要明显低于群体选择,能够获得更大的选择反应。为了降低育种核心群的内交率,提高遗传进展,学者们提出了一系列的个体选择留种策略,包括:1) 降低选择强度,扩大留种群体的规模;2) 赋予家系内个体更多的权重,降低家系的加权(Toro *et al.*, 1990);3) 每个家系贡献同等数量的个体(Brisbane *et al.*, 1993);4) 在选择强度不变的前提下,分配更多的交配机会给高育种值个体(Toro *et al.*, 1984);5) 基于修正后的育种值 $EBV^* = EBV - \lambda X$ 进行选择(λ 为加权值, X 为该个体与其他候选亲本个体间的平均亲缘关系)(Goddard *et al.*, 1990; Brisbane *et al.*, 1993);6) 利用线性规划理论,从一系列交配组合中找到最优化的组合,在低近交率下,最大化选择反应(Toro *et al.*, 1990)。上述策略的模拟研究表明,大部分方法短期内能够控制近交,取得一定的选择反应。但是,上述方法在设立选择标准时,缺乏一个理论体系设置成本因子、加权值等参数,无法控制核心群的长期遗传进展和近交水平。

20 世纪 90 年代中后期,Wray 等(1994)数量遗传学家建立了最佳遗传贡献(Optimum Contribution, OC)理论,将选择反应和近交率表述为候选亲本遗传贡献的函数,即在限定的近交水平下,利用候选亲本的选择指数和亲缘关系信息,最优化其对下一代的遗传贡献(百分比数值),从而达到控制育种群体近交水平、最大化目标性状遗传进展的目的。

1.1 拉格朗日乘数法

Wray 等(1994)提出应用一个成本因子,对所有候选亲本的亲缘关系进行加权。选择反应的计算公式为:

$$V = 1/2s_m'b_m + 1/2s_f'b_f - Q(w_j - w_{j-1})$$

式中, s_m 和 s_f 代表候选亲本对下一代遗传贡献最优化值, b_m 和 b_f 为留种雄性和雌性个体的育种值, Q 为成本因子, $w_j - w_{j-1}$ 表示 j 世代近交系数的增加值。通过拉格朗日乘数法,最优化 s_m 和 s_f , 实现选择反应的最大化。应用该方法可以灵活地控制每个家系入选

的个体数目, 这样具有遗传优势的家系可以有更多的同胞个体入选留种。模拟研究表明, 经过 10 个世代选择, 近交水平降低了 35%–39%, 每个世代的选择反应仅降低了 1%–3%。但是作者也指出, 由于 Q 值的求导并不精确, 因此无法确保获得的遗传进展为最大值。此外, 应用该方法进行个体选择, 无法获得每个世代的近交率, 即无法控制每个世代的近交增量。

Meuwissen 等(1997)应用动态选择规则, 在限定的近交水平下, 最大化遗传进展。该研究将下一代遗传进展表述为 $G=c'EBV$, 并设置两个限制条件:

$$\bar{A}_p = c'Ac, c'Q=0.5$$

式中, G 代表留种亲本的平均遗传水平, 即子代的期望遗传水平, 最优化的目的就是最大化 G ; EBV 为候选亲本的育种值向量; c 为亲本的遗传贡献(所有雄性亲本和雌性亲本的遗传贡献均为 0.5, $c=0$ 表示个体 i 未被选择); \bar{A}_p 为设定的候选亲本的平均遗传亲缘关系值; A 为加性遗传相关矩阵; Q 为候选亲本性别的关联矩阵(矩阵共有两列, 如果候选亲本为雄性, 在第一列中为 1, 否则为 0; 如果候选亲本是雌性, 在第二列中为 1, 否则为 0)。 $c'Q=0.5$ 确保雄性和雌性亲本的遗传贡献和均为 0.5。候选亲本的遗传贡献 c 通过最优化算法, 如拉格朗日乘数法等求解。

\bar{A}_p 为预先设定值, 但是随着选育世代的增加, 也会不断提高。这主要是由于核心群个体间的亲缘关系随着选育世代的增加越来越紧密所造成。不同世代间的 \bar{A}_p 可以通过以下公式求解得到:

$$\bar{A}_p = 2\bar{C}_t = 2[\bar{C}_{t-1} + \Delta F(1 - \bar{C}_{t-1})]$$

式中, \bar{C}_t 为平均共亲系数, ΔF 指设定的每代近交率。

将近交率设置为 $\Delta F=2.5\%$, 应用拉格朗日乘数法对遗传贡献进行最优化。模拟 10 个世代后, 尽管近交系数提高了 20.2%, 但是 10 个世代的遗传进展为 0.315–0.380, 选择潜力仍然较大。将每个世代核心群设定为 32 个父本和 32 个母本, 将 G_{10} 代的近交水平控制在 0.1, 模拟 10 个世代后, 基于 OC 选择的遗传进展要比基于 BLUP 育种值选择高 60%, 前者具有很强的选择优势(Meuwissen, 1997)。Meuwissen 等(1998)将上述方法扩展到世代重叠群体, 实现了不同年龄段留种亲本的遗传贡献最优化, 扩大了该方法的使用范围, 提高了使用价值。奶牛核心群的模拟分析表明, 经过 20 年选择, 遗传进展比 BLUP 直接选择最大可提高 44%。

Hinrichs 等(2006)对 Meuwissen(1997)和 Meuwissen 等(1998)的 OC 算法进行了改进, 重新设计了候选个

体的血缘相关矩阵和逆矩阵, 使之适合大群体的遗传贡献最优化计算。水产动物由于其繁殖力较高, 少数个体就可产生大量的候选亲本。因此, 作者利用候选亲本父母本群体的加性遗传相关矩阵来计算候选亲本群体的加性遗传相关矩阵和逆矩阵, 降低了逆矩阵的维数, 提高了计算效率。修改后的血缘相关矩阵为:

$$A = ZA_pZ' + D$$

式中, A_p 为候选亲本父母本群体的加性遗传相关矩阵, D 为孟德尔抽样方差矩阵(对角阵), Z 阵中元素 Z_{ij} 由 1/2 和 0 组成, 如果 j 是 i 的父本或者母本, $Z_{ij}=1/2$, 否则为 0。修改后的加性遗传相关矩阵的逆矩阵为:

$$A^{-1} = d^{-1} - d^{-1}Z(Z'd^{-1}Z + A_p^{-1})Z'd^{-1}$$

因为 D 为对角矩阵, 所以 d^{-1} 也很容易计算。采用修改后的算法, 不需要进行预选择, 就可以计算出 39214 尾候选鲑鱼的最佳遗传贡献值。

1.2 半正定规划法

Pong-Wong 等(2007)建议应用半正定规划(Semidefinite Programming, SDP)优化方法对候选亲本的遗传贡献进行最优化。将最优化问题转化为半正定规划法也就是通过诸如内点算法这样的途径高效解决最优化问题。这些算法由 Karmarkar (1984)引入线性规划, 后来拓展到半正定规划, 属于交互算法, 即在严格可行的参数范围内寻找最优解。从实用的角度出发, 应用半正定规划的关键过程是证明这个问题是凸的, 并将它转化为半正定规划的标准形式, 即在最小化 $a^T x$ 的前提下, 满足 $Y \geq 0$,

$$Y = Y_0 + \sum_{i=1}^k Y_i X_i$$

式中, a 为成本, x 为需要优化的 k 变量, X_i 为 X 中的 i 元素, Y 为有 $k+1$ 个仿射矩阵的半正定规划矩阵($Y_i, i=0, 1, 2, \dots, k$), $Y \geq 0$ 表示 Y 为半正定规划矩阵。简单来说, 内点算法是迭代算法, 通过一个 Y 矩阵的障碍函数来确保提出的解决方案严格控制在可行方案范围内。内点算法的特点是很高的计算效率, 可以有效地解决 1000 个变量和限制条件下的半正定规划问题。

半正定规划的主要优势在于该理论保证了以有效的方式找到最优解。凸理论的可追溯性以及原始对偶内点算法保证了半正定规划找到的解决方案是真正的最优解。拉格朗日乘数法中, 在迭代过程中删掉候选亲本或者固定它们的贡献值, 从本质上把寻找最优解重新定向并限定在了一个更小的范围内。模拟实

验证实,SDP方法实现的最大遗传进展要比拉格朗日乘数法高3.7%–8.8%(设定的近交水平上限为0.29);在设定的近交水平下,如果进一步限定候选亲本的遗传贡献上限值,拉格朗日乘数法有很大几率只得到局部最优解,甚至得不到优化的遗传贡献值(Pong-Wang *et al*, 2007)。应用SDP方法求解得到的遗传贡献为最优值,但是对于大群体SDP的执行效率还需要进一步探讨。

半正定规划法另一个优势是新的复杂的限制条件可以轻松加入最优化过程。假设新的限制条件为凸方程,将它们作为额外的块对角加入线性矩阵不等式。内点算法通常在整个可行范围内用作寻找半正定规划的解决方法,因此可以找到最优解。从最实用的角度来看,半正定规划法的另一个优势是现有的通用软件可以实现半正定优化问题,如SDPA、CSDP、DSDP以及SDPSOL。

1.3 差分进化算法

差分进化算法(Differential Evolution, DE)是一种基于种群的全局搜索优化算法,通过种群个体间的差分信息对个体形成扰动而搜索整个种群空间。DE采用实数编码,引入差分变异模式进行迭代搜索,具有较强的全局搜索能力和收敛速率。在求解一些复杂环境中的优化问题时,被证明是一种有效的全局最优解的搜索算法(Storn *et al*, 1996)。算法的基本思想是对当前种群进行变异和交叉操作,产生另一个新种群;利用基于贪婪思想的选择操作对这两个种群进行一对一的选择,从而产生最终的新一代种群(刘波等, 2007)。该算法控制参数少、原理相对简单,且其表现出来的高可靠性、强鲁棒性和良好的优化性能等特点受到广泛关注。

Carvalho *et al* (2010)认为当目标函数的约束条件和各因子表现为凸优化时,半正定规划算法具有优势,而DE对目标函数的要求更为宽松、更加灵活,可以对多个目标函数进行优化。将差分进化算法应用于遗传贡献值计算,据此获得的遗传进展比育种值直接选择提高16.4%–19.1%。

1.4 交配优化策略

获得留种个体的最佳遗传贡献值后,采取何种交配策略也是影响遗传进展和近交水平的重要因素。研究中常用的交配方法有留种亲本间随机交配(RM, random mating)、最大育种值亲本间交配(PAM, positive assortative mating)和最小共亲系数亲本间交配(MCM, minimum coancestry mating)等。应用BLUP法选择留

种亲本时,MCM与RM的选择反应差异很小(Toro *et al*, 1988; Caballero *et al*, 1996)。但是,当利用OC选择留种亲本后,MCM与RM策略的选择反应存在很大差别。模拟分析表明,前者比后者高约22%(Sonesson *et al*, 2000、2002)。Hallander等(2009b)将RM、PAM和MCM等3种交配策略应用于雌雄同体林木遗传育种,模拟结果显示,7代选择后,MCM遗传进展比RM高约7.1%,近交水平降低37%。PAM的遗传进展与RM相当,但是近交水平增加了43%。MCM方法的优势主要是将无亲缘关系的家系组合在一起,避免了近亲交配,如全同胞交配等,从而使育种核心群的亲缘关系保持在一个低水平上。在低亲缘关系水平下,应用OC选择会进一步促使更多的高育种值个体入选留种群,提高遗传进展。MCM策略特别适合对近交限制特别严格的小群体选育。

Kinghorn等(1999)提出了交配选择方法(Mate Selection),可同时完成个体选择和交配方案制定两个关键任务。交配选择方法的优势是可以通过设置一个选择指数MSI作为目标函数考虑多种因素,如:遗传进展、遗传多样性、后代近交、场间遗传联系、多阶段选择、分子标记利用和成本等。为了进一步提高运算速度,Kinghorn(1998、2011)进一步提出组选择(Group Selection)策略,先后通过线性规划、遗传算法和差分进化等优化算法提高交配选择方法的效率。目前,该方法已在Pedigree viewer、TGRM、Ani-Mate和EVA等软件中实现,并在动植物育种中开展应用。

1.5 基于基因组信息的OC理论

随着高通量测序技术和芯片技术的不断发展,育种学家可以利用覆盖全基因组的高密度遗传标记信息来估计育种值(Genomic Estimated Breeding Value, GEBV),开展基因组选择育种。基因组选择已在德国(Habier *et al*, 2009)及北美(van Raden *et al*, 2009)等多个奶牛育种项目中实施。与传统的BLUP方法相比较,基因组选择可以有效区分家系、降低近交风险、降低世代间隔、提高选择强度和准确度(Daetwyler *et al*, 2007; Dekkers, 2007; Muir, 2007)。最佳遗传贡献理论,主要通过加性遗传相关矩阵来控制近交。传统系谱信息中,个体系谱丢失和记录错误是难以避免的问题,这影响了构建的加性遗传相关矩阵的准确性。而基于高通量分子标记信息,可以构建更为准确和密切的分子加性遗传相关矩阵,从而提高个体遗传贡献值估计的准确度。

Nielsen等(2010)通过计算机模拟,比较了在鱼类育种中分别基于基因组育种值和传统BLUP育种值

进行 OC 选择的差别。与传统 BLUP 育种值相比, 应用基因组育种值得到的遗传进展比传统 BLUP 法高出 81%。Körte(2011)应用拉格朗日乘数法, 通过计算机模拟数据, 比较了低遗传力性状($h^2=0.1$)在基因组 OC 及系谱 OC 选择后近交率、选择反应、遗传方差、QTL 频率改变、优势 QTL 位点的丢失以及选择动物个体数等方面的差别。结果显示, 应用基因组信息开展 OC 选择可以维持低频率优势 QTL 更高的变异度, QTL 更少的丢失。Roughsedge 等(2008)指出 OC 选择可在基因组范围内限制近交, 但在正向选择时并不能限制 QTL 周围区域的近交。Körte(2011)估计了基因组 OC 选择和系谱 OC 选择时的遗传进展和近交率。结果表明, 将系谱信息加入分子亲缘信息, 遗传进展和近交率未能获得显著提升。因此, 可以只利用高通量的分子标记信息构建分子加性遗传相关矩阵来控制近交。

2 OC 理论在动植物选择育种中的应用

育种学家已开始评估最佳遗传贡献理论在畜牧、林木育种的应用价值(Kearney *et al*, 2004)。Avendaño 等(2003)评估了 OC 选择在 Meatline 绵羊和 Aberdeen Angus 肉牛育种核心群中的应用潜力。在相同的近交率上限下(Meatline: 1.0%; Aberdeen Angus: 0.2%), 应用 OC 选择代替 BLUP 直接选择后, 两个选育系遗传进展分别提高了 17%和 30%。Sørensen 等(2008)研究表明, 在丹麦荷斯坦奶牛核心群中应用 OC 选择, 群体的近交系数从 16.21%降低到 14.95%, 但是其应用潜力很大程度上依赖已有系谱的质量。在林木育种研究中, 已有学者将 OC 选择应用在欧洲赤松(*Pinus sylvestris* L.)树高和胸径两个性状的遗传改良中(Hallander *et al*, 2009a)。在相同的共亲系数限制条件下, 应用 OC 选择后, 遗传进展比 EBV 选择高约 8%–30%。在相同的遗传进展限制条件下, 应用 OC 选择后胸径和树高两个育种核心群的共亲系数比 BLUP 直接选择分别降低了 56%和 39%。

水产动物中主要以鱼类育种数据为基础展开模拟研究。Sonesson(2005)模拟了鱼类中 Walk-back 选择与 OC 选择相结合的效果, 结果表明, 该方法在控制近交率的同时维持了较高的遗传进展且节省了待测亲本基因型检测的费用; Holtsmark 等(2008a、b)研究了应用 OC 选择时基础群体组成、不同的加性遗传关系矩阵以及不同交配策略对育种项目的影响; Skaarud 等(2011)检测了不同 OC 选择策略在鱼类中的

应用, 结果显示, 使用 OC 选择方法所得到的遗传进展比当今普遍使用的选种方法高 13%。水产动物选择育种项目中实际应用 OC 选种仅在芬兰虹鳟等少数育种项目中有过报道(Kause *et al*, 2005), 但具体应用过程未有详细描述。上述研究为在水产动物选择育种中应用 OC 选择奠定了理论及实践基础。

3 OC 理论在国内水产动物选择育种中的应用前景

以 BLUP 法为遗传评估核心的水产多性状复合育种体系, 已发展成为我国水产动物选择育种的重要技术体系。自 2004 年引入中国对虾育种研究后, 已推广到罗氏沼虾、凡纳滨对虾、斑节对虾、日本对虾、大菱鲆、斑点叉尾鲷、罗非鱼、三疣梭子蟹等多个品种。如前言所述, 仅依据 BLUP 遗传评估的结果进行留种和配种, 多代选择后核心群近交率将会快速上升。当近交积累到一定程度时, 育种目标性状和相关的适应性性状(繁殖力、存活等)将会产生近交衰退现象(Luo *et al*, 2014; 喻驰方等, 2013; 张洪玉等, 2009)。当前国内大部分水产动物 BLUP 育种体系, 选育世代较短, 在留种和配种两个影响遗传进展和近交水平的关键技术环节上, 缺乏最优化理论支持, 遗传进展还存在着较大的提升空间。

如前所述, 与 EBV 直接选择相比较, OC 选择的遗传进展增加幅度最高可达 60%。然而, 水产动物育种体系与畜牧育种体系存在着较大差别, OC 理论无法直接应用。大部分水产物种个体小、产卵量大, 一般以家系为单位进行培育和选择。受限于养殖设施, 每个世代建立的家系数量一般都是相等的, 规模在 100–300 个家系。每个全同胞或半同胞家系内的标记个体数也是相同的, 大约为 50–100 个体/全同胞家系, 每个世代有 5000–30000 个候选亲本参与遗传评估。如果直接利用畜牧育种的 OC 选择方法, 则意味着下一代多则要建立上千个家系, 并且每个家系内的个体数量不一致, 少则几个, 多则几百个。当前大部分水产动物育种基地尚无如此庞大的养殖设施实施 OC 选择, 而且家系内个体数量不一致也无法实现标准化的养殖管理。

因此, 在水产动物选择育种中应用 OC 选择, 需要设计大规模加性遗传相关矩阵和逆矩阵高效计算方法, 评估并建立大群体 OC 值优化计算方法, 提高运算和选择效率, 才能适应水产动物家系规模较大、候选亲本数量多的现状。此外, 由于水产动物种类繁

多,不同物种的繁殖和交配特性差异大,需要建立多种优化配种策略,研发配种最优化软件,提高 OC 选择的灵活性和适用性。

目前水产动物选择育种研究中,主要是利用计算机随机生成的数据对 OC 选择的优势进行模拟评估分析,缺乏基于 OC 选择的育种实例去验证和分析 OC 选择的优势和不足之处。因此,可选择繁殖周期短、易于配种和操作的物种如脊尾白对虾和卤虫等,建立基于 OC 选择的水产动物多性状复合育种体系,评价 OC 选择的实际遗传进展和控制近交的效率,这将为在水产动物 BLUP 选育中推广应用 OC 选择奠定技术基础。

参 考 文 献

- 马大勇,孔杰,胡红浪. 近交及其对水产养殖的影响. 水产学报, 2005, 29(6): 849-856
- 孔杰,金武,栾生,等. 水产动物选择育种的近交分析. 自然科学进展, 2009, 19(9): 917-923
- 刘波,王凌,金以慧. 差分进化算法研究进展. 控制与决策, 2007, 22(7): 721-729
- 张洪玉,罗坤,孔杰,等. 近交对中国明对虾生长、存活及抗逆性的影响. 中国水产科学, 2009, 16(5): 744-750
- 喻驰方,栾生,张志伟,等. 中华卤虫不同近交水平家系生长性能比较. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 75-79
- Avendaño S, Villanueva B, Woolliams JA. Expected increases in genetic merit from using optimized contributions in two livestock populations of beef cattle and sheep. *J Anim Sci*, 2003, 81(12): 2964-2975
- Brisbane JR, Gibson JP. Selection methods to reduce inbreeding with minimal effects on genetic progress. *J Dairy Sci*, 1993, 76(supp 1): 292
- Caballero A, Santiago E, Toro MA. Systems of mating to reduce inbreeding in selected populations. *Anim Sci*, 1996, 62(3): 431-442
- Carvalho R, de Queiroz SA, Kinghorn B. Optimum contribution selection using differential evolution. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2010, 39(7): 1429-1436
- Daetwyler HD, Villanueva B, Bijma P, *et al.* Inbreeding in genome-wide selection. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124(6): 369-376
- Dekkers JCM. Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124(6): 331-341
- Gall GAE, Bakar Y. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture*, 2002, 212(1-4): 93-113
- Gallardo JA, Garcia X, Lhorente JP, *et al.* Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture*, 2004, 234(1-4): 111-122
- Goddard ME, Smith C. Adjustment of sires' estimated breeding values for the prospective inbreeding impact on the breed. *J Dairy Sci*, 1990, 73(Supp1): 233
- Habier D, Fernando RL, Dekkers JCM. Genomic selection using low-density marker panels. *Genetics*, 2009, 182(1): 343-353
- Hallander J, Waldmann P. Optimum contribution selection in large general tree breeding populations with an application to Scots pine. *Theor Appl Genet*, 2009a, 118: 1133-1142
- Hallander J, Waldmann P. Optimization of selection contribution and mate allocations in monoecious tree breeding populations. *BMC Genetics*, 2009b, 10: 70
- Hinrichs D, Wetten M, Meuwissen THE. An algorithm to compute optimal genetic contributions in selection programs with large numbers of candidates. *J Anim Sci*, 2006, 84(12): 3212-3218
- Holtmark M, Klemetsdal, Sonesson AK, *et al.* Establishing a base population for a breeding program in aquaculture, from multiple subpopulations, differentiated by genetic drift: I. Effects of the number of subpopulations, heritability and mating strategies using optimum contribution selection. *Aquaculture*, 2008a, 274(2-4): 232-240
- Holtmark M, Klemetsdal G, Sonesson AK, *et al.* Establishing a base population for a breeding program in aquaculture, from multiple subpopulations, differentiated by genetic drift: II. Sensitivity to assumptions on the additive genetic relationships of base animals. *Aquaculture*, 2008b, 274(2-4): 241-246
- Karmarkar N. A new polynomial-time algorithm for linear programming. *Combinatorica*, 1984, 4(4): 373-395
- Kause A, Ritola O, Paananen T, *et al.* Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 177-187
- Kearney JF, Wall E, Villanueva B, *et al.* Inbreeding trends and application of optimized selection in the UK Holstein population. *J Dairy Sci*, 2004, 87(10): 3503-3509
- Khaw HL, Ponzoni RW, Danting MJC. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. *Aquaculture*, 2008, 275(1-4): 64-69
- Kinghorn BP, Shepherd RK. Mate selection for the tactical implementation of breeding programs. *Assoc Advmt Anim Breed Genet*, 1999, 13: 130-133
- Kinghorn BP. Mate selection by groups. *J Dairy Sci*, 1998, 81(2): 55-63
- Kinghorn BP. An algorithm for efficient constrained mate selection. *Genet Sel Evol*, 2011, 43(1): 4-12
- Körte J. Consequences of applying Optimum Contribution Selection on conventional and genomic based breeding

- schemes. *Zuchtungskunde*, 2011, 84(4): 357–358
- Luo K, Kong J, Luan S, *et al.* Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2014, 420–421: 32–37
- Meuwissen THE, Sonesson AK. Maximizing the response of selection with predefined rate of inbreeding: Overlapping generations. *J Anim Sci*, 1998, 76(10): 2575–2583
- Meuwissen THE. Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. *J Anim Sci*, 1997, 75(4): 934–940
- Muir WM. Comparison of genomic and traditional BLUP-estimated breeding value accuracy and selection response under alternative trait and genomic parameters. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124(6): 342–355
- Nielsen HM, Sonesson AK, Meuwissen THE. Optimum contribution selection using traditional BLUP and genomic breeding values in aquaculture breeding schemes. *J Anim Sci*, 2010, 89(3): 630–638
- Pong-Wong R, Woolliams JA. Optimisation of contribution of candidate parents to maximize genetic gain and restricting inbreeding using semi-definite programming. *Genet Sel Evol*, 2007, 39(1): 3–25
- Ponzoni RW, Hamzah A, Tan S, *et al.* Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2005, 247(1–4): 203–210
- Robertson A. Inbreeding in artificial selection programmes. *Genet Res*, 1961(2): 189–194
- Roughsedge T, Pong-Wong R, Woolliams JA, *et al.* Restricting coancestry and inbreeding at a specific position on the genome by using optimized selection. *Genet Res*, 2008, 90(2): 199–208
- Skaarud A, Woolliams JA, GjØen HM. Strategies for controlling inbreeding in fish breeding programs; an applied approach using optimum contribution (OC) procedures. *Aquaculture*, 2011, 311(1–4): 110–114
- Sonesson AK, Meuwissen THE. Mating schemes for optimum contribution selection with constrained rates of inbreeding. *Genet Sel Evol*, 2000, 32(3): 231–248
- Sonesson AK, Meuwissen THE. Non-random mating for selection with restricted rates of inbreeding and overlapping generations. *Genet Sel Evol*, 2002, 34(1): 23–39
- Sonesson AK. A combination of walk-back and optimum contribution selection in fish: a simulation study. *Genet Sel Evol*, 2005, 37(6): 587–599
- Storn R, Price K. Minimizing the real functions of the ICEC'96 contest by differential evolution. *Proc IEEE Conf Evolutionary Computation*. Nagoya: IEEE, 1996, 842–844
- Thodesen J, Grisdale-Helland B, Helland SJ, *et al.* Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmo (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 1999, 180(3–4): 237–246
- Toro MA, Nieto BM. A simple method for increasing the response to artificial selection. *Genet Res*, 1984, 44(3): 347–349
- Toro MA, Perez-Enciso M. Optimization of selection response under restricted inbreeding. *Genet Sel Evol*, 1990, 22(1): 93–107
- Toro MA, Nieto BM, Salgado C. A note on minimization of inbreeding in small-scale selection programmes. *Livest Prod Sci*, 1988, 20(4): 317–323
- van Raden PM, Van Tassell CP, Wiggans GR, *et al.* Invited review: Reliability of genomic predictions for North American holstein bulls. *J Dairy Sci*, 2009, 92(1): 16–24
- Woolliams JA, Pong-Wong R, Villanueva B. Strategic optimization of short and long-term gain and inbreeding in MAS and non-MAS schemes, in '7th world congress of genetics applied to livestock production', Montpellier, France. CD-ROM Communication, 2002, 1–8
- Wray NR, Goddard ME. Increasing long term response to selection. *Genet Sel Evol*, 1994(26): 431–451

(编辑 冯小花)

Optimum Contribution Theory and the Prospect of Its Application in Selective Breeding in Aquaculture

LUAN Sheng, SUI Juan, MENG Xianhong, LUO Kun, CAO Baoxiang, KONG Jie^①

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

Abstract Aquatic multi-trait integrated breeding system is an important selective breeding technology to improve economic traits of aquatic animals in China. It has been a vital issue how to select and mate the broodstock candidates to maximize the genetic gain at a defined rate of inbreeding in the breeding system. The optimum contribution theory (OC) has become an effective tool to establish equilibrium between the genetic gain and the inbreeding in the nucleus population. In this review we introduced the establishment and development of optimum contribution theory, the characteristics of different optimization algorithms, and its application in selective breeding of plants and animals. Three algorithms, Lagrange multipliers, Semidefinite programming and Differential evolution, have been used in the calculation of optimum genetic contribution. At equal rates of inbreeding, genetic gains calculated with Lagrange multipliers were 21%–60% greater than that with selection for BLUP-EBV. An improved algorithm based on Lagrange multipliers was invented for the calculation of optimal genetic contributions in the case of large number of candidates in the aquatic animal population. The additive relationship matrix between the selection candidates and the inverse of this matrix was replaced with the relationship matrix between the parents of the selection candidates and its inverse in the calculation of the optimal genetic contribution of the selection candidates to the next generation. Lagrange multipliers did not guarantee that the final solution is the global maximum; on the contrast the SDP method could always find the optimum solution that maximized the genetic gain using the interior point algorithms. The expected gains obtained from the Semidefinite programming were 1.5%–9% greater than that from Lagrange multipliers. Individual selection and mate allocation could be performed using Differential evolution algorithm. Many issues including genetic gain, diversity, progeny inbreeding, connections among farms, multi-stage selection, management of genetic marker, and various types of costs could be contained in the object function and be optimized. Genetic gain and the accuracy of optimum contribution could be increased using the pedigree and genomic information at predefined rate of inbreeding. The inbreeding level of selective breeding population was effectively controlled and genetic gains of object traits were 17%–30% greater than that of selection for BLUP-EBV in the livestock and forest breeding. New progress on the OC theory based on genomic information was also reviewed. The prospect of application of optimum contribution theory in aquatic selective breeding was analyzed in order to provide reference and guidance in aquatic animal breeding.

Key words Optimum contribution theory; Optimization algorithm; Selective breeding; Aquatic animal

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Members (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang

戈贤平 GE Xianping

方建光 FANG Jianguang

王清印 WANG Qingyin

王新鸣 WANG Xinming

包振民 BAO Zhenmin

司徒建通 SITU Jiantong

关瑞章 GUAN Ruizhang

刘占江 LIU Zhanjiang

刘海金 LIU Haijin

孙效文 SUN Xiaowen

孙 溢 SUN Mi

庄 平 ZHUANG Ping

曲克明 QU Keming

江世贵 JIANG Shigui

何建国 HE Jianguo

吴常文 WU Changwen

吴淑勤 WU Shuqin

张士瑾 ZHANG Shicui

张全启 ZHANG Quanqi

张国范 ZHANG Guofan

张显良 ZHANG Xianliang

李来好 LI Laihao

李杰人 LI Jieren

李 健 LI Jian

李家乐 LI Jiale

杨红生 YANG Hongsheng

邹桂伟 ZOU Guiwei

陈立侨 CHEN Liqiao

陈松林 CHEN Songlin

陈雪忠 CHEN Xuezhong

周永灿 ZHOU Yongcan

林 洪 LIN Hong

俞志明 YU Zhiming

姚 杰 YAO Jie

相建海 XIANG Jianhai

赵宪勇 ZHAO Xianyong

徐 皓 XU Hao

桂建芳 GUI Jianfang

殷邦忠 YIN Bangzhong

秦 松 QIN Song

贾晓平 JIA Xiaoping

常亚青 CHANG Yaqing

常剑波 CHANG Jianbo

黄 捷 HUANG Jie

董双林 DONG Shuanglin

翟毓秀 ZHAI Yuxiu

魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 沙珍霞 (编辑部主任) SHA Zhenxia (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua

刘 慧 LIU Hui

刘丛力 LIU Congli

陈 严 CHEN Yan

渔 业 科 学 进 展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

YUYE KEXUE JINZHAN

(Bimonthly, founded in 1980)

(双月刊, 1980年创刊)

第35卷 第6期 2014年12月

Vol.35 No.6 Dec. 2014

主管单位 中华人民共和国农业部

Supervised by Ministry of Agriculture, P.R.China

主办单位 中国水产学会

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,

中国水产科学研究院黄海水产研究所

Chinese Academy of Fishery Sciences

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,

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

Chinese Academy of Fishery Sciences

电话: 0532-85833580

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn

http://www.yyqxjz.cn; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

Editor-in-Chief Tang Qisheng

印 刷 青岛星球印刷有限公司

Printed by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.

国内发行 青岛市邮政局

Domestic Distributed by Post Office of Qingdao

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 Trad-

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

ing Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

国内邮发代号: 24-153

定 价: 30.00元

ISSN 1000-7075

ISSN 1000-7075

国外发行代号: 4578Q



CN 37-1466/S

国内外公开发行

9 771000 707145