

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第40卷 VOL.40 第4期 NO.4



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 40 卷 第 4 期

2019 年 8 月

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

目 次

营养与饲料专栏

- 红鳍东方鲀幼鱼对饲料中蛋氨酸需求的研究.....张庆功 梁萌青 徐后国 卫育良 (1)
- 复合动植物蛋白部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响.....
.....郝甜甜 王际英 李宝山 宋志东 黄炳山 孙永智 王雅平 王晓艳 (11)
- 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响.....
.....胡冬雪 马季 王成强 乔洪金 王际英 李宝山 孙永智 (21)
- 蚕粉替代鱼粉对加州鲈幼鱼生长、饲料利用及体成分的影响.....饶远 向泉 黄先智 段彪 (31)
- 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和肌肉脂肪酸的影响.....
.....郑建明 赵捷杰 陈四清 常青 严俊丽 朱之发 刘长琳 胡建成 (39)
- 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响
.....王成强 李宝山 王际英 黄炳山 孙永智 郝甜甜 马长兴 周莹 (47)

研究论文

- 驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析.....
.....樊佳佳 白俊杰 李胜杰 马冬梅 姜鹏 (57)
- 基于投喂法的牙鲆耳石镉标记.....司飞 王青林 于清海 刘洪波 姜涛 杨健 王俊 (65)
- 杂交种“云龙石斑鱼”与亲本的形态差异分析.....
.....李振通 成美玲 田永胜 唐江 马文辉 侯云霞 王晓梅 翟介明 (73)
- 应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构.....
.....吴欢欢 王伟继 吕丁 胡玉龙 孔杰 (84)
- 松江鲈白介素 15(TfIL-15)的结构特征与重组表达.....刘莹莹 于珊珊 柴迎梅 林啸鹏 祝茜 (95)
- 一对虾养殖场的多病原跟踪.....武和英 王秀华 杨冰 于党辉 黄捷 (104)
- 光强对极北海带幼苗生长和生化特性的影响.....
.....梁洲瑞 刘福利 杜欣欣 袁艳敏 梁启迪 汪文俊 孙修涛 王飞久 (115)
- 不同培养条件对铜藻生长和营养组分的影响.....栾青 吕芳 吴海一 丁刚 詹冬梅 (123)
- 广东紫菜 *Hsp70* 基因 cDNA 克隆与表达分析.....曾俊 陈伟洲 陈泽攀 刘浩然 (131)
- 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病原菌的分离鉴定.....
.....李杰 牟宗娟 杨慧超 茅云翔 阎永伟 莫照兰 (140)
- luxR* 基因调控嗜水气单胞菌耐药性的分子机制初探.....
.....毛磊磊 鄢庆彬 黄力行 张梅梅 王素云 张萌萌 覃映雪 (147)
- 利用酵母双杂交技术筛选与 *wsv112* 互作的宿主蛋白.....王中一 刘庆慧 卢翠玉 黄捷 (156)
- 青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响.....
.....王震 公丕海 关长涛 李娇 史佰佰 (163)
- 研究简报
- 棘头梅童鱼染色体核型分析.....梁述章 宋炜 蒋科技 谌微 李羽 马凌波 (172)
- 酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究.....
.....焦奎 高翔 于佳 魏玉西 高洁 张雪梅 王金梅 李钰金 (178)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.40 No.4 August 2019

Dietary Methionine Requirement of Juvenile Tiger Puffer (<i>Takifugu rubripes</i>).....	(1)
..... ZHANG Qinggong, LIANG Mengqing, XU Houguo, WEI Yuliang	
Effects of Replacement of Fish Meal With an Animal and Plant Protein Mixture on Growth, Body Composition, and Physiological and Biological Indices of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.).....	(11)
..... HAO Tiantian, WANG Jiyong, LI Baoshan, SONG Zhidong, HUANG Bingshan, SUN Yongzhi, WANG Yaping, WANG Xiaoyan	
Effects of Replacement of Dietary Fish Meal by <i>Nannochloropsis</i> sp. Meal on Growth Performance, Body Composition, and Serum Biochemical Indices of Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.).....	(21)
..... HU Dongxue, MA Ji, WANG Chengqiang, QIAO Hongjin, WANG Jiyong, LI Baoshan, SUN Yongzhi	
Effects of Replacement of Fish Meal with Silkworm Powder on Growth Performance, Feed Intake, and Body Composition of Juvenile Black Bass (<i>Micropterus salmonides</i>).....	(31)
..... RAO Yuan, XIANG Xiao, HUANG Xianzhi, DUAN Biao	
Growth and Fatty Acid Composition of Juvenile Spotted Halibut (<i>Verasper variegatus</i>) Fed Diets with Fish Oil Replaced by SoyBean Oil.....	(39)
..... ZHENG Jianming, ZHAO Jiejie, CHEN Siqing, CHANG Qing, YAN Junli, ZHU Zhifa, LIU Changlin, HU Jiancheng	
Effects of Dietary <i>Bacillus subtilis</i> and Yeast Culture on Growth, Serum Biochemical Indices and Antioxidant Capacity of Juvenile Hybrid Grouper (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂).....	(47)
..... WANG Chengqiang, LI Baoshan, WANG Jiyong, HUANG Bingshan, SUN Yongzhi, HAO Tiantian, MA Changxing, ZHOU Ying	
Analysis on Genetic Diversity of Three Breeding Populations of Largemouth Bass Using Formulated Feeds.....	(57)
..... FAN Jiajia, BAI Junjie, LI Shengjie, MA Dongmei, JIANG Peng	
Use of Strontium Chloride in Otolith Marking of Japanese Flounder.....	(65)
..... SI Fei, WANG Qinglin, YU Qinghai, LIU Hongbo, JIANG Tao, YANG Jian, WANG Jun	
Analysis of the Morphological Differences Between Hybrid “ <i>Epinephelus moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂” and Its Parents.....	(73)
..... LI Zhentong, CHENG Meiling, TIAN Yongsheng, TANG Jiang, MA Wenhui, HOU Yunxia, WANG Xiaomei, ZHAI Jieming	
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) Biodiversity Assessment Using High-Throughput Illumina Sequencing to Analyze Juvenile Turbot Intestines and Their Bacterial Cultures.....	(84)
..... WU Huanhuan, WANG Weiji, LÜ Ding, HU Yulong, KONG Jie	
Characterization and Recombinant Protein Expression of Interleukin-15 from Roughskin Sculpin, <i>Trachidermus fasciatus</i>	(95)
..... LIU Yingying, YU Shanshan, CHAI Yingmei, LIN Xiaopeng, ZHU Qian	
Tracking of Shrimp Multiple Pathogens in a Shrimp Farm.....	(104)
..... WU Heying, WANG Xiuhua, YANG Bing, YU Danghui, HUANG Jie	
Effects of Light Intensities on the Growth and Biochemical Characteristics of <i>Laminaria hyperborea</i> Young Seedling.....	(115)
..... LIANG Zhourui, LIU Fuli, DU Xinxin, YUAN Yanmin, LIANG Qidi, WANG Wenjun, SUN Xiutao, WANG Feijiu	
Effects of Culture Conditions on Nutrient Composition of <i>Sargassum horneri</i>	(123)
..... LUAN Qing, LÜ Fang, WU Haiyi, DING Gang, ZHAN Dongmei	
The cDNA Cloning and Expression Analysis of the <i>Hsp70</i> Gene from <i>Pyropia guangdongensis</i>	(131)
..... ZENG Jun, CHEN Weizhou, CHEN Zepan, LIU Haoran	
Isolation and Identification the Pathogen of <i>Pyropia yezoensis</i> Green Spot Disease.....	(140)
..... LI Jie, MOU Zongjuan, YANG Huichao, MAO Yunxiang, YAN Yongwei, MO Zhaolan	
Molecular Mechanism of <i>luxR</i> Regulation of Drug Resistance of <i>Aeromonas hydrophila</i>	(147)
..... MAO Leilei, YAN Qingpi, HUANG Lixing, ZHANG Meimei, WANG Suyun, ZHANG Mengmeng, QIN Yingxue	
Identification of the Host Interactors of wsv112 of WSSV by Yeast Two-Hybrid.....	(156)
..... WANG Zhongyi, LIU Qinghui, LU Cuiyu, HUANG Jie	
Effect of Different Artificial Reefs on the Community Structure of Organisms in Shique Beach of Qingdao.....	(163)
..... WANG Zhen, GONG Pihai, GUAN Changtao, LI Jiao, SHI Baibai	
Karyotype Analysis of <i>Collichthys lucidus</i>	(172)
..... LIANG Shuzhang, SONG Wei, JIANG Keji, CHEN Wei, LI Yu, MA Lingbo	
Study of the Preparation of Compound Amino Acid-Chelated Calcium by Protease Hydrolysis of Scallop Skirts.....	(178)
..... JIAO Kui, GAO Xiang, YU Jia, WEI Yuxi, GAO Jie, ZHANG Xuemei, WANG Jinmei, LI Yujin	

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180525001

http://www.yykxjz.cn/

张庆功, 梁萌青, 徐后国, 卫育良. 红鳍东方鲀幼鱼对饲料中蛋氨酸需求的研究. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 01-10
Zhang QG, Liang MQ, Xu HG, Wei YL. Dietary methionine requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 01-10

红鳍东方鲀幼鱼对饲料中蛋氨酸需求的研究*

张庆功^{1,2} 梁萌青^{2①} 徐后国² 卫育良²

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

摘要 在半精制饲料中分别添加 0、0.30%、0.60%、0.90%、1.20%、1.50% 蛋氨酸制成 6 组等氮等脂饲料, 各组蛋氨酸的实际含量分别为 0.61%、0.85%、1.10%、1.39%、1.60%、1.84%, 对初始体重为(13.83±0.63) g 的红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 幼鱼在室内流水系统中进行了 76 d 的喂养实验, 探讨其蛋氨酸的需求量。研究表明, 当饲料中蛋氨酸水平由 0.61% 升高至 1.60% 时, 红鳍东方鲀的特定生长率(Specific growth rate, SGR)、饲料效率(Feed efficiency, FE)、蛋白效率比(Protein efficiency ratio, PER)均显著升高($P < 0.05$), 且都在 1.60% 组取得最大值。其中, 特定生长率在 1.39%、1.60% 实验组无显著差异($P > 0.05$), 但随着蛋氨酸的进一步升高, 特定生长率、饲料效率、蛋白效率比均呈现出下降的趋势; 蛋氨酸水平对于蛋白沉积率没有显著影响($P > 0.05$); 饲料中蛋氨酸水平对全鱼粗脂肪含量呈现出先升高再降低的趋势, 但各组间粗蛋白、水分和粗灰分无显著差异($P > 0.05$); 随着蛋氨酸水平升高, 肝体比(Hepatosomatic index, HSI)和脏体比(Viscerosomatic index, VSI)呈现先升高再下降, 在蛋氨酸含量为 1.60% 时达到最高, 显著高于蛋氨酸 0.61% 组($P < 0.05$), 与其他组无显著差异; 血清中甘油三酯、胆汁酸的含量, 随着蛋氨酸水平的升高呈现出先升高再降低的趋势, 饲料蛋氨酸水平对血清中总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、总蛋白水平及谷草转氨酶、谷丙转氨酶的活性无显著影响($P > 0.05$)。以特定生长率为评价指标进行一元二次回归曲线分析, 得出体重为(13.83~82.47) g 的红鳍东方鲀幼鱼的蛋氨酸需求量为 1.38%, 占饲料蛋白质的 2.71%。

关键词 红鳍东方鲀幼鱼; 蛋氨酸需求量; 生长性能; 体组成; 生理生化指标

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)04-0001-10

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。饲料蛋白质被鱼体摄食后, 必须在鱼消化道中各种消化酶的作用下, 分解成氨基酸后才能被鱼体吸收利用。因此, 氨基酸构成决定了蛋白质的质量。在鱼类中的必须氨基酸组成中, 蛋氨酸是含硫氨基酸, 是鱼类 10 种必须氨基酸的一种。在鱼类的生长发育过程中, 蛋氨酸广泛的参与鱼类的代谢过程, 例如可以参与形成 S-腺苷甲硫氨酸的形成,

然后以此作为甲基供体参与机体的生理代谢过程(Baker *et al*, 2006)。还可以参与牛磺酸、硫酸酯、磷酸胆碱和其他磷脂的形成(Brosnan *et al*, 2006)。同时也是很多植物性原料的第一限制性氨基酸(Goff *et al*, 2004), 和其他营养素一样, 投喂低水平的蛋氨酸饲料会导致饲料效率和生长下降(Mai *et al*, 2006)。而且在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等鲑科鱼类中发现, 投喂蛋氨酸缺乏的饲料后, 还会患上白内障(Cowey

* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47)资助 [This work is supported by China Agriculture Research System (CARS-47)]. 张庆功, E-mail: 592565638@qq.com

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

收稿日期: 2018-05-25, 收修改稿日期: 2018-07-02

1992)。摄食非常高含量的蛋氨酸则可能对虹鳟的生长产生负面影响(Poppi *et al*, 2011)。相关研究表明,适宜的蛋氨酸水平可显著提高大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)(陈乃松等, 2010)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)(Mai *et al*, 2006)、建鲤(*Cyprinus carpio* var Jian)(Xiao *et al*, 2010)等的特定生长率、饲料转化效率。目前,国内外已经进行了很多关于鱼类蛋氨酸营养需求的研究,确定了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(Alam *et al*, 2015)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Harding *et al*, 1977)、日本鳗鱼(*Anguilla japonica*)(NRC, 1993)、大黄鱼(Mai *et al*, 2006)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)(Zhou *et al*, 2011)军曹鱼(*Rachycentron canadum*)(Zhou *et al*, 2006)、建鲤(Xiao *et al*, 2010)等多种养殖鱼类的蛋氨酸需求量。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)俗称河豚,目前对于河豚营养学方面的研究主要需求集中在蛋白质(王淑敏, 2008; Sungsam, 2009)和脂肪(孙阳等, 2013; Takii *et al*, 1995)等方面,对于蛋氨酸适宜需求量的研究还未见报道。鉴于此,本研究采用剂量-效应法,探讨不同蛋氨酸水平对于红鳍东方鲀生长性能、鱼体组成和相关生化指标的影响,为河豚专用配合饲料的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本实验通过向基础饲料中等梯度添加 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% 的 DL-蛋氨酸。其中,蛋氨酸的有效含量为 99.3%。以谷氨酸作为蛋氨酸的等氮替代物,配制成 6 种不同蛋氨酸梯度水平的等氮等脂的半精制饲料,实验饲料配方及氨基酸组成如表 1、表 2。其中,蛋白、脂肪水平分别参照 Kin 等(2009)和 Kikuchi 等(2009),氨基酸混合物的添加参照红鳍东方鲀肌肉氨基酸组成(高露皎等, 2011)。经测定,各组饲料的实际蛋氨酸含量分别为 0.61%、0.85%、1.10%、1.39%、1.60%、1.84%,对应占饲料蛋白质的 1.20%、1.67%、2.16%、2.72%、3.14%、3.61%。饲料原料经粉碎过 80 目筛,按照从小量到大量的顺序,逐步混合均匀,加水搅匀后通过小型颗粒饲料机制成直径为 3~4 mm,长度为 3~5 mm 的颗粒饲料,55℃烘干后,保存于-20℃冰箱中。

1.2 实验鱼和养殖管理

红鳍东方鲀为海阳黄海水产有限公司的当年鱼苗。投喂对照组实验饲料驯化 7 d,使其适应养殖系

统和实验饲料。实验开始时,统一让实验鱼饥饿 24 h,随后随机挑选体质健康、体格均匀的鱼。称重后放入 18 个桶(500 L)中,每个桶中放入 30 尾鱼[平均体重为(13.83±0.61) g]。将 6 种饲料随机分派到 18 个桶,每种饲料 3 个重复。实验期间,每天分别于 07:00、12:00、16:00、20:00 表观饱食投喂,投喂量按实验鱼体重的 3%投喂,收集残饵并计数,每 2 d 刷桶 1 次,保持桶壁和桶底清洁,实验持续 67 d。

养殖用水为浅井海水,经二级沉淀、砂滤后进入蓄水池,采用室内流水系统(每天流水总量为 4 m³),并换 1/2 水;实验期间,溶氧高于 6 mg/L,采取纸板遮挡窗户以降低室内光线强度。实验期间,水温为 22℃~27℃,盐度为 24~26, pH 为 7.90~8.05。

1.3 实验取样

实验开始前随机取 10 尾红鳍东方鲀幼鱼作为初始鱼,用于常规营养成分分析。实验结束时,饥饿 24 h,然后对每桶鱼进行计数、称重。每桶随机取 4 尾实验鱼,-20℃保存,用于体成分分析;每缸随机取 6 尾鱼,尾静脉取血,血样暂存于 1.5 ml 离心管中,静置过夜后 3000 r/min 离心获得血清样,保存于-20℃冰箱备用。取 6 尾鱼在冰盘上解剖,取出肝脏和肌肉,分装于 2 个冷冻管,迅速放入液氮中,之后转移到-80℃冰箱中,用以实验相关要求的测定。

1.4 生化分析

实验饲料、饲料原料和鱼体的粗蛋白、粗脂肪、灰分、水分的测定,均参照(AOAC, 1995)方法进行,水分含量用(105±2)℃常温干燥法;粗灰分含量用马弗炉 550℃高温灼烧法;粗脂肪含量用索氏抽提法测定(Foss Tecator, Hoganas, 瑞典);粗蛋白的含量用凯氏定氮仪测定(VELP, UDK142 automatic distillation unit, VELP, Usmate, MB, 意大利)。饲料氨基酸分析采用盐酸水解法通过氨基酸分析仪(日立 L-8900, 日本)测定。

血清酶活利用深圳迈瑞(Mindray)公司生产的 LX-20 型 Beckman 全自动生化分析仪及其配套试剂进行分析。肝脏谷丙转氨酶、谷草转氨酶酶活均采用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒。

1.5 计算方法及统计分析方法

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)= $100 \times [\ln(\text{终末体重}) - \ln(\text{初始体重})] / \text{实验天数}$

摄食率(Feeding intake, FI, %/d)= $100 \times \text{总干物质摄入量} / [\text{实验天数} \times (\text{初始体重} + \text{终末体重}) / 2]$

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

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

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

肥满度(Condition factor, CF)=体重/体长³ (体重
单位: g; 体长单位: cm)

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %) = 100 ×肝
重/鱼体重

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %) = 100 ×内
脏重/鱼体重

实验数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示, 使
用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析(One-way
ANOVA), 当差异达到显著水平($P < 0.05$), 则采用邓
肯多重比较(Duncan's multiple range tests)。

表 1 实验饲料配方及化学组成(%干物质)

Tab.1 Formulation and chemical composition of the experimental diet (% dry matter)

原料 Ingredient	饲料 1 Diet1	饲料 2 Diet2	饲料 3 Diet3	饲料 4 Diet4	饲料 5 Diet5	饲料 6 Diet6
鱼粉 Fish meal	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
豆粕 Soybean meal	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
明胶 Gelatin	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
小麦粉 Wheat meal	11.89	11.89	11.89	11.89	11.89	11.89
糊精 Dextrin	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
氨基酸混合物* ¹ Amino acid mixture	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81
蛋氨酸 Methionine	0.00	0.30	0.60	0.90	1.20	1.50
谷氨酸 Glutamate	1.50	1.20	0.90	0.60	0.30	0.00
鱼油 Fish oil	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
豆油 Soybean oil	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
卵磷脂 Lecithin	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
维生素混合物* ² Vitamin premix	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
矿物质混合物* ³ Mineral premix	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素 C Vitamin C	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
化学组成% Chemical composition%						
粗蛋白 Crude protein	51.10	51.67	51.23	51.26	51.26	51.08
粗脂肪 Crude lipid	9.41	9.37	9.43	9.56	9.90	9.80
灰分 Ash	8.70	9.09	8.73	8.51	8.46	8.46
蛋氨酸 Methionine	0.61	0.85	1.10	1.39	1.60	1.84

*¹: 氨基酸混合物为每 kg 饲料提供以下氨基酸: 精氨酸 7.7 g; 组氨酸 1.2 g; 异亮氨酸 7.1 g; 亮氨酸 11.8 g; 赖氨酸 15.5 g; 半胱氨酸 6.7 g; 苯丙氨酸 2.3 g; 苏氨酸 6.2 g; 色氨酸 1.5 g; 缬氨酸 8.1 g; 牛磺酸 5 g; 羟脯氨酸 5 g

*²: 维生素混合物(mg/kg 混合物): 硫胺素, 2.5 mg; 核黄素, 4.5 mg; 盐酸吡哆醇, 2 mg; 维生素 B₁₂, 0.01 mg; 生物素, 0.12 mg; 维生素 K₃, 1 mg; 肌醇, 80 mg; 泛酸, 6 mg; 烟酸, 20 mg; 叶酸, 2 mg; 维生素 A, 3.2 mg; 维生素 D, 0.5 mg; 维生素 E, 12 mg; 次粉 867 mg

*³: 矿物质混合物(mg/kg 混合物): 氟化钠, 0.2 mg; 碘化钾, 0.08 mg; 氯化钴, 5 mg; 硫酸铜, 1 mg; 硫酸铁, 8 mg; 硫酸锌, 5 mg; 硫酸镁, 120 mg; 磷酸二氢钙, 300 mg; 氯化钠, 10 mg; 沸石粉, 551 mg

*¹: Amino acid mixture provides the following amino acids for every kg feed: arginine 7.7 g; histidine 1.2 g; isoleucine 7.1 g; leucine 11.8 g; lysine 15.5 g; cysteine 6.7 g; phenylalanine 2.3 g; threonine 6.2 g; tryptophan 1.5 g; valine 8.1 g; taurine 5 g; hydroxyproline 5 g

*²: Vitamin premix (mg/kg premix): thiamine 2.5 mg; riboflavin 4.5 mg; pyridoxine 2 mg; vitamin B₁₂ 0.01 mg; biotin 0.12 mg; menadione 1 mg; inositol 80 mg; pantothenate 6 mg; tocopherol acetate 20 mg; folic acid 2 mg; vitamin A 3.2 mg; vitamin D 0.5 mg; vitamin E 12 mg; wheat flour 867 mg

*³: Mineral premix (mg/kg premix): NaF 0.2 mg; KI 0.08mg; CoCl₂·6H₂O 5mg; CuSO₄·5H₂O 1mg; FeSO₄·7H₂O 8 mg; ZnSO₄·7H₂O 5 mg; MnSO₄·4H₂O 120 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 300 mg; NaCl 10mg; Mordenzeo 551 mg

表2 实验饲料的氨基酸组成(%干物质)
Tab.2 The amino acid composition of the experiment diets (% dry matter)

氨基酸 Amino acid	饲料 1 Diet1	饲料 2 Diet2	饲料 3 Diet3	饲料 4 Diet4	饲料 5 Diet5	饲料 6 Diet6
缬氨酸 Val	2.00	2.01	2.15	2.19	2.02	2.10
蛋氨酸 Met	0.61	0.85	1.10	1.39	1.60	1.84
异亮氨酸 Ile	1.87	1.81	1.81	1.89	1.82	1.90
亮氨酸 Leu	2.97	2.91	3.04	3.02	2.95	3.09
苏氨酸 Thr	1.54	1.55	1.67	1.79	1.55	1.79
苯丙氨酸 Phe	1.61	1.67	1.71	1.79	1.70	1.74
赖氨酸 Lys	3.08	3.11	3.23	3.12	3.10	3.15
组氨酸 His	0.89	0.88	0.91	0.97	0.90	0.94
精氨酸 Arg	2.51	2.60	2.66	2.68	2.58	2.58
半胱氨酸 Cys	0.89	0.86	0.88	0.91	0.89	0.82
牛磺酸 Tau	0.75	0.70	0.71	0.76	0.71	0.70
天冬氨酸 Asp	2.92	2.94	3.08	3.10	2.81	3.09
酪氨酸 Tyr	0.99	0.97	1.07	1.11	1.08	1.10
丝氨酸 Ser	1.26	1.28	1.35	1.43	1.27	1.45
谷氨酸 Glu	6.43	6.22	6.20	6.12	5.82	5.35
丙氨酸 Ala	2.35	2.48	2.60	2.64	2.43	2.60
甘氨酸 Gly	2.00	1.98	1.97	2.08	1.95	2.10

2 结果

2.1 饲料中蛋氨酸水平对红鳍东方鲀生长、饲料利用和鱼体组成的影响

表3为饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀生长性能的影响,饲料中的蛋氨酸水平显著影响红鳍东方鲀的成活率、摄食率、特定生长率、饲料效率和蛋白质效率($P<0.05$)。特定生长率、饲料效率和蛋白效率比随着蛋

氨酸水平的升高先升高后下降,到蛋氨酸水平为1.60%时达到最高,显著高于0.61%处理组($P<0.05$)。其中,特定生长率在1.39%组和1.60%组无显著差异;对于成活率,1.10%处理组显著高于1.60%处理组($P<0.05$),其他各组无显著差异($P>0.05$);摄食率随饲料蛋氨酸水平的升高先升高后下降,蛋氨酸1.39%处理组达到最高,显著高于0.61%处理组($P<0.05$),与其他各组无显著差异($P>0.05$);饲料蛋氨酸水平对蛋白沉积率没有显著影响($P>0.05$)。

表3 饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀生长性能的影响
Tab.3 Effect of dietary methionine levels on growth performance of *T. rubripes*

指标 Index	饲料蛋氨酸水平 Dietary methionine level (%)					
	0.61	0.85	1.10	1.39	1.60	1.84
鱼体初重 IBW(g)	13.73±0.06	13.72±0.05	13.78±0.06	14.03±0.25	13.84±0.11	13.74±0.10
鱼体末重 FBW(g)	70.73±3.34 ^a	79.91±1.77 ^b	82.38±2.52 ^b	90.34±2.70 ^c	91.84±1.06 ^c	79.59±1.33 ^b
成活率 SR(%)	88.89±4.01 ^{ab}	94.44±5.56 ^b	97.78±1.11 ^b	87.78±2.94 ^{ab}	76.67±6.94 ^a	94.44±2.22 ^b
摄食率 FI(%/d)	1.88±0.01 ^a	1.91±0.01 ^{ab}	1.92±0.01 ^{ab}	1.95±0.02 ^b	1.90±0.01 ^{ab}	1.90±0.01 ^{ab}
特定生长率 SGR(%/d)	2.15±0.02 ^a	2.32±0.02 ^b	2.35±0.04 ^b	2.47±0.04 ^c	2.49±0.03 ^c	2.31±0.03 ^b
饲料效率 FE(%)	0.95±0.01 ^a	0.96±0.01 ^{ab}	0.98±0.01 ^{ab}	0.99±0.02 ^{ab}	1.01±0.02 ^b	0.99±0.02 ^{ab}
蛋白效率比 PER	1.85±0.01 ^a	1.90±0.01 ^{ab}	1.91±0.02 ^{ab}	1.92±0.04 ^{ab}	1.97±0.03 ^b	1.94±0.03 ^{ab}
蛋白沉积率 PPV(%)	34.62±0.48	34.61±0.46	36.02±0.60	35.73±1.16	36.66±0.69	35.94±0.65

注:同一列数值中右上角不同小写字母表示组间存在显著差异($P<0.05$),下同

Note: Data within the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), the same as below

表4为饲料蛋氨酸水平对鱼体组成和形体指标的影响。饲料的蛋氨酸水平对全鱼的粗蛋白、灰分、肥满度无显著影响($P>0.05$); 对于鱼体粗脂肪、肝体比、脏体比, 蛋氨酸1.60%组显著高于0.61%处理组($P<0.05$), 但随着蛋氨酸水平的进一步升高, 呈现出下降的趋势, 但与其他各组差异不显著($P>0.05$)。

表4 饲料蛋氨酸水平对鱼体组成和形体指标的影响(%湿重)

Tab.4 Effect of dietary methionine levels on body composition and physical indicators of *T. rubripes* (%wet weight)

指标 Index	饲料蛋氨酸水平 Dietary methionine level					
	0.61	0.85	1.10	1.39	1.60	1.84
粗蛋白 Crude protein(%)	19.63±0.42	19.67±0.33	19.46±0.25	19.21±0.30	18.94±0.32	19.14±0.12
粗脂肪 Crude lipid(%)	5.40±0.25 ^a	5.54±0.14 ^{ab}	5.75±0.05 ^{ab}	6.01±0.21 ^{ab}	6.22±0.30 ^b	5.63±0.35 ^{ab}
灰分 Ash(%)	2.98±0.09	2.98±0.06	2.89±0.04	2.98±0.08	2.83±0.08	2.85±0.03
水分 Moisture(%)	71.37±0.55	70.98±0.41	71.37±0.24	71.14±0.58	70.86±0.61	71.49±0.34
肝体比 Hepatosomatic index(%)	7.70±0.33 ^a	7.68±0.24 ^{ab}	8.53±0.40 ^{ab}	8.16±0.16 ^{ab}	9.05±0.50 ^b	8.08±0.29 ^{ab}
脏体比 Viscerasomatic index(%)	11.90±0.35 ^a	12.02±0.17 ^{ab}	12.98±0.49 ^{ab}	12.61±0.08 ^{ab}	13.72±0.52 ^b	12.73±0.36 ^{ab}
肥满度 Condition factor	4.34±0.15	4.09±0.07	4.14±0.09	4.01±0.21	4.19±0.13	4.10±0.13

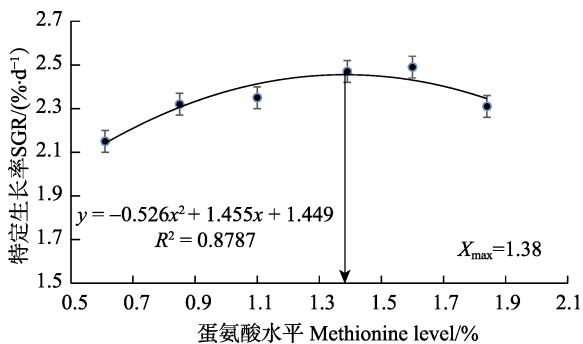


图1 红鳍东方鲀特定生长率与饲料中蛋氨酸水平的二次曲线关系

Fig.1 Second-order polynomial relationship between SGR of *T. rubripes* and dietary methionine levels

2.2 饲料中蛋氨酸水平对红鳍东方鲀血清、肝脏相关生化指标的影响

表5为饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀血清和肝脏生理生化指标的影响。如表5所示, 饲料蛋氨酸水平对肝脏中的谷丙转氨酶没有显著影响($P>0.05$), 1.10%处理组中的肝脏谷草转氨酶活性显著高于0.85%和1.60%处理组($P<0.05$), 与其他处理组无显著差异; 饲料蛋氨酸水平显著影响血清中甘油三酯的含量, 蛋氨酸含量为1.39%的处理组最高, 蛋氨酸含量为1.10%、1.39%、1.60%处理组显著高于1.84%处理组($P<0.05$), 其他各组间无显著差异($P>0.05$); 饲料蛋氨酸水平还对血清中的胆汁酸含量产生显著影响, 蛋氨酸含量为1.39%、1.60%处理组显著高于0.61%、

将红鳍东方鲀的特定生长率数据与饲料中的蛋氨酸水平进行二次回归曲线分析, 得到特定生长率与蛋氨酸水平的二次曲线关系为: $y = -0.526x^2 + 1.455x + 1.449$ ($R^2 = 0.8787$)。由图1可知, 当蛋氨酸水平为1.38%, 即占饲料蛋白的2.71%时, 红鳍东方鲀的特定生长率达到最高。

0.85%、1.84%处理组($P<0.05$), 其他组间无显著差异($P>0.05$); 饲料蛋氨酸水平还对血清中的血糖含量产生显著差异, 0.61%组显著高于0.85%、1.10%、1.60%、1.84%处理组($P<0.05$); 蛋氨酸水平对红鳍东方鲀中血清中的总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、总蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶无显著影响($P>0.05$)。

表6为饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀肌肉氨基酸组成的影响。如表6所示, 饲料蛋氨酸水平对肌肉中的半胱氨酸的含量没有显著影响($P>0.05$), 对其他的氨基酸均随饲料蛋氨酸水平增加先升高, 然后趋于平稳。

3 讨论

3.1 饲料中不同蛋氨酸水平对红鳍东方鲀生长和饲料利用的影响

本研究采用剂量-效应法来确定红鳍东方鲀饲料中最适蛋氨酸需求量。在实验中, 蛋氨酸缺乏组显示较低的生长速度, 而随着蛋氨酸水平的提高, 其特定生长率、饲料转化效率和蛋白质效率均得到了显著提高, 但随着蛋氨酸水平的进一步升高, 则呈现出下降的趋势, 这与红鳍东方鲀血清中的甘油三酯、胆汁酸含量和肌肉氨基酸组成的变化趋势一致。在本研究中, 当蛋氨酸的需求量超过或者低于最适需求量时, 其生长遭到抑制。这与五条鲷(Ruchimat *et al*, 1997)、

表5 饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀血清和肝脏生理生化指标的影响
Tab.5 Effect of dietary methionine levels on physiological and biochemical parameters in serum and liver

指标 Index	饲料蛋氨酸水平 Dietary methionine level(%)					
	0.61	0.85	1.10	1.39	1.6	1.84
肝脏 Liver						
谷丙转氨酶 GPT(U/g prot)	75.34±1.25	76.89±4.10	81.54±9.17	70.34±1.92	75.99±3.90	78.72±2.48
谷草转氨酶 GOT(U/g prot)	73.07±6.23 ^{ab}	69.07±2.46 ^a	85.48±4.79 ^b	72.39±2.92 ^{ab}	69.39±5.72 ^a	73.17±1.94 ^{ab}
血清 Serum						
谷丙转氨酶 GPT(U/L)	33.00±4.73	24.67±2.33	32.00±5.13	41.00±5.03	30.33±1.45	26.67±6.67
谷草转氨酶 GOT(U/L)	49.5±10.5	57.67±11.84	57.50±12.5	77.00±4.58	57.00±12.34	49.00±3.00
甘油三酯 TG(mmol/L)	2.09±0.13 ^{ab}	2.10±0.09 ^{ab}	2.32±0.08 ^b	2.36±0.09 ^b	2.32±0.08 ^b	1.87±0.05 ^a
总胆汁酸 TBA(μmol/L)	1.67±0.07 ^{ab}	1.73±0.09 ^{abc}	1.85±0.05 ^{abc}	2.10±0.10 ^c	2.03±0.12 ^{b^c}	1.60±0.10 ^a
总胆固醇 TC(mmol/L)	2.57±0.17	2.34±0.14	2.39±0.07	2.26±0.12	2.48±0.13	2.37±0.12
总蛋白 TP(g/L)	37.81±2.65	36.38±1.88	37.79±1.10	38.94±1.20	38.72±1.19	35.00±0.63
血糖 GLU(mmol/L)	1.85±0.14 ^b	1.36±0.08 ^a	1.32±0.12 ^a	1.50±0.07 ^{ab}	1.30±0.12 ^a	1.30±0.11 ^a
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C(mmol/L)	3.61±0.16	3.43±0.11	3.51±0.03	3.37±0.08	3.62±0.09	3.67±0.22
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C(mmol/L)	0.41±0.07	0.51±0.08	0.52±0.06	0.47±0.05	0.52±0.06	0.45±0.06

表6 饲料蛋氨酸水平对红鳍东方鲀肌肉氨基酸组成的影响(%)
Tab.6 Effects of dietary methionine levels on amino acid composition in muscle of *T. rubripes*

氨基酸 Amino acid	饲料蛋氨酸水平 Dietary methionine level(%)					
	0.61	0.85	1.10	1.39	1.60	1.84
半胱氨酸 Cys	0.96±0.08	1.1±0.12	1.1±0.15	1.1±0.01	1.16±0.16	1.13±0.22
缬氨酸 Val	2.07±0.21 ^a	3.1±0.34 ^b	3.39±0.26 ^b	3.3±0.01 ^b	3.65±0.4 ^b	3.56±0.44 ^b
蛋氨酸 Met	0.99±0.04 ^a	1.6±0.19 ^{ab}	1.71±0.24 ^b	1.43±0.01 ^{ab}	1.87±0.27 ^b	1.84±0.29 ^b
异亮氨酸 Ile	2.07±0.18 ^a	2.83±0.3 ^{ab}	3.15±0.14 ^b	3.02±0.03 ^b	3.35±0.38 ^b	3.38±0.39 ^b
亮氨酸 Leu	3.29±0.29 ^a	4.82±0.61 ^b	5.35±0.36 ^b	5.12±0.12 ^b	5.65±0.47 ^b	5.61±0.54 ^b
苏氨酸 Thr	1.86±0.19 ^a	2.88±0.4 ^b	3.24±0.24 ^b	3.06±0.1 ^b	3.31±0.26 ^b	3.26±0.31 ^b
苯丙氨酸 Phe	2.4±0.17 ^a	3.02±0.51 ^{ab}	3.64±0.34 ^b	3.34±0.36 ^{ab}	3.46±0.32 ^{ab}	3.64±0.21 ^b
赖氨酸 Lys	4.3±0.47 ^a	6.22±0.7 ^b	6.66±0.38 ^b	6.19±0.31 ^b	6.76±0.44 ^b	6.74±0.41 ^b
组氨酸 His	1.12±0.09 ^a	1.53±0.2 ^b	1.81±0.04 ^b	1.7±0.04 ^b	1.8±0.14 ^b	1.77±0.19 ^b
精氨酸 Arg	2.48±0.23 ^a	3.81±0.47 ^b	4.22±0.35 ^b	4.08±0.15 ^b	4.47±0.36 ^b	4.35±0.39 ^b
牛磺酸 Tau	0.88±0.02 ^a	1.29±0.12 ^b	1.49±0.08 ^b	1.5±0.06 ^b	1.71±0.18 ^b	1.54±0.21 ^b
天冬氨酸 Asp	3.72±0.43 ^a	5.76±0.76 ^b	6.48±0.52 ^b	6.15±0.17 ^b	6.85±0.7 ^b	6.61±0.9 ^b
酪氨酸 Tyr	1.7±0.09 ^a	2.37±0.38 ^{ab}	2.96±0.27 ^b	2.58±0.19 ^b	2.74±0.17 ^b	2.87±0.1 ^b
丝氨酸 Ser	1.6±0.17 ^a	2.5±0.38 ^b	2.9±0.21 ^b	2.7±0.16 ^b	2.93±0.19 ^b	2.87±0.24 ^b
谷氨酸 Glu	5.96±0.67 ^a	9.41±1.23 ^b	10.46±0.95 ^b	10±0.25 ^b	11.2±1.1 ^b	10.77±1.43 ^b
丙氨酸 Ala	2.14±0.2 ^a	3.17±0.37 ^b	3.53±0.3 ^b	3.55±0.24 ^b	3.69±0.23 ^b	3.65±0.28 ^b
甘氨酸 Gly	2.83±0.22 ^a	3.79±0.4 ^b	4.32±0.23 ^b	4.16±0.11 ^b	4.42±0.25 ^b	4.34±0.35 ^b

大黄鱼(Mai *et al.*, 2006)、军曹鱼(Zhou *et al.*, 2006)等结果一致。原因则可能是蛋氨酸缺乏时,引起了氨基酸的不平衡,限制了其他氨基酸的充分利用,导致了生长受到了抑制,也使得饲料和蛋白的利用受到了影响

(任和等, 2006)。当蛋氨酸过量时,过量的蛋氨酸可能会氧化产生酮或者其他代谢产物,引起了毒害作用而导致了鱼类生长受阻(Murthy *et al.*, 2015)。

由于蛋氨酸能够转化成半胱氨酸,所以,半胱氨酸

酸的含量会影响鱼类对于蛋氨酸的需要量。因此,有研究者认为将此表示为动物对于含硫氨基酸的总需要量或者表述为蛋氨酸+半胱氨酸的形式。但有一些研究发现,饲料中的半胱氨酸的含量低于3g/kg(0.3%)时,才能作为鱼类含硫氨基酸的有效补给源,这就表明当半胱氨酸的含量超过该用量时,半胱氨酸就不存在节省蛋氨酸需要量的作用(Kim *et al.*, 1992; Pack *et al.*, 1995)。在本研究中,半胱氨酸的含量为0.86%左右,占饲料蛋白的1.67%左右。本次结果显示,初始体重为13.83g的红鳍东方鲀,以特定生长率为评价指标通过二次曲线回归分析,得出对蛋氨酸的需求量为占饲料干物质的1.38%,占饲料蛋白的2.71%(胱氨酸0.86%,占饲料蛋白的1.67%)。高于初始体重为11.61g,以特定生长率为评价指标的军曹鱼(Zhou *et al.*, 2006)蛋氨酸需求量占饲料蛋白2.64%(胱氨酸1.49%);同样也低于初始重量为1.23g,以特定生长率为评价指标,得出蛋氨酸需求量占饲料蛋白的大黄鱼(Mai *et al.*, 2006)的3.34%(胱氨酸0.67%);同初始体重为37.88g,以特定生长率为评价指标得出蛋氨酸需求量占饲料蛋白的大口黑鲈(陈乃松等, 2010)的2.75%(胱氨酸0.30%)接近。现有报道的鱼类蛋氨酸的需求量的差异是多方面的因素,其一可能是不同种属间的差异,同时也可能是受到不同养殖环境的影响,如鱼的大小、年龄、水温、养殖密度和饲料的种类,水流、投喂频率、氨基酸模式和饲料中其他营养物质的相互作用等(Chiu *et al.*, 1988; Cowey, 1995; Simmons *et al.*, 2015)。

3.2 蛋氨酸水平对于鱼体组成和形体指标的影响

本研究中,蛋氨酸水平对于鱼体粗蛋白、灰分、水分没有显著性差异($P>0.05$),但对鱼体的粗脂肪含量产生了显著差异,表明了蛋氨酸可能参与了红鳍东方鲀体内的脂肪调控过程,同在大菱鲆(*Psetta maxima*)中(Ma *et al.*, 2013)的发现相似,随着蛋氨酸的水平上升,鱼体粗脂肪也随之增高;但是在大黄鱼(Mai *et al.*, 2006)和军曹鱼(Zhou *et al.*, 2006)的蛋氨酸需求研究中蛋氨酸水平并没有显著影响鱼体粗脂肪含量;而在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Luo *et al.*, 2005)中发现,蛋氨酸水平的升高会降低鱼体粗脂肪的含量。本研究发现,鱼体中的肝体比和脏体比随着蛋氨酸水平呈现先升高后下降的趋势,蛋氨酸水平为1.60%时达到最高。这与在大菱鲆中(Klatt *et al.*, 2016)的发现一致,肝体比会随着蛋氨酸水平的上升而随之增大;与在大口黑鲈(陈乃松等, 2010)和大西洋鲑(*Salmo salar*)(Espe *et al.*, 2008)研究中的不一致,饲料的蛋氨

酸水平较低时,肝体比、脏体比较大。Espe等(2008)认为蛋氨酸引起的肝体比降低是对机体的有益行为;Walton等(1982)在虹鳟中的研究认为,肝体比的增加是因为饲料中过多的游离氨基酸转化为肝糖原的结果。

鱼体对于蛋白质的沉积是通过外源氨基酸的供给来合成的。本研究中,肌肉中的氨基酸基本呈现出一种先升高再趋于平稳的趋势。Alam(2015),研究证实,饲料的不同氨基酸模式会影响到牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的生长和体蛋白结合态氨基酸的组成。在大黄鱼(Mai *et al.*, 2006)的研究中发现,肌肉中的蛋氨酸水平会随着饲料中蛋氨酸水平的升高呈现出一种先升高后稳定的趋势;在胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)(林郁葱, 2012)中发现,肌肉中的精氨酸、组氨酸、亮氨酸和赖氨酸都会随着饲料中蛋氨酸水平的增加而呈现出一种先升后降的趋势;在吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(向泉等, 2014)中,肌肉中的半胱氨酸、丝氨酸和组氨酸没有表现出显著差异,其余的氨基酸含量都基本呈现了一种先升高后降低的趋势,上述结果与本研究结果基本一致。鱼体肌肉中各种氨基酸含量的上升,说明了随着饲料中蛋氨酸含量的上升,饲料中的氨基酸含量会趋于平衡,所摄食的这些的氨基酸就能够更大比例的用于体内蛋白质的合成。

3.3 蛋氨酸水平对血清和肝脏中相关生化指标的影响

通过研究胆汁酸、甘油三酯、血糖、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇来研究饲料中蛋氨酸水平对红鳍东方鲀机体脂肪代谢的影响。胆汁酸是胆固醇代谢过程产生的一系列固醇类物质,胆汁酸能促进脂肪乳化,促进脂类物质的消化吸收,调节脂类代谢(Romański *et al.*, 2007; Sirvent *et al.*, 2004)。在牛蛙(*Rana catesbiana shaw*)(胡田恩等, 2015)中发现,添加适量胆汁酸能够降低血清中血糖的含量,在本研究中,也发现了随着蛋氨酸水平的升高,胆汁酸含量会上升,血清中的血糖则呈现出下降的趋势。血清中甘油三酯含量的上升,表明蛋氨酸水平的上升能够加速脂肪代谢的过程,同罗非鱼(向泉等, 2014)相似,适量的蛋氨酸能够显著提高甘油三酯的含量,但在异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(Wang *et al.*, 2016)中发现,随着蛋氨酸含量的上升,血清中的甘油三酯则没有显著差异。血清中的血糖,随着蛋氨酸水平的增加则呈现了一种降低的趋势,这同胭脂鱼(林郁葱, 2012)中随着蛋氨酸水平的升高,血清中的血糖含量呈现的趋势一致。

谷丙转氨酶和谷草转氨酶常用来评价机体肝脏功能的受损情况,其酶活性升高说明肝脏功能出现了问题。在本研究中,血清中的谷草转氨酶、谷丙转氨酶均无显著差异,但是在肝脏中的谷草转氨酶则呈现了一种先升高再降低的趋势,这同在异育银鲫(Wang *et al.*, 2016)中的发现类似,随着蛋氨酸水平的升高,也是呈现了一种先升高再降低的趋势,说明蛋氨酸的升高会加速脂肪调控,加大肝脏的负担;有研究证明,在蛋氨酸不足或者过量时,都会影响鱼类的转氨酶活性,例如建鲤(Feng *et al.*, 2011)和金鲷鱼(*Xenobrama*) (Niu *et al.*, 2013)。

4 结论

本研究结果表明,饲料中的蛋氨酸水平对红鳍东方鲀幼鱼的生长、饲料利用效率、蛋白质效率产生了显著的影响。在本次实验中,以特定生长率为评价指标,经过二次回归曲线分析:体重为(13.83~82.47) g的红鳍东方鲀幼鱼对饲料中的蛋氨酸需求量为1.38%,占饲料蛋白的2.71%。

参 考 文 献

- Alam MS, Teshima S, Ishikawa M, *et al.* Methionine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by the oxidation of radioactive methionine. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 7(3): 201–209
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14th edn. Williams S(Eds), Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 1984, 1141
- Baker DH. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *Journal of Nutrition*, 2006, 136(6 Suppl): 1636S
- Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: An overview. *Journal of Nutrition*, 2006, 136(6 Suppl): 1636S
- Chen NS, Ma JZ, Zhou HY, *et al.* Assessment of dietary methionine requirement in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1244–1253 [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): 1244–1253]
- Chiu YN, Austic RE, Rumsey GL. Effect of feeding level and dietary electrolytes on the arginine requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 1988, 69(1–2): 79–91
- Cowey CB. Protein and amino acid requirements: A critique of methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 1995, 11(3–4): 199–204
- Cowey CB. Nutrition: Estimating requirements of rainbow trout. *Aquaculture*, 1992, 100(1–3): 177–189
- Espe M, Hevrøy EM, Liaset B, *et al.* Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 132–141
- Feng L, Xiao WW, Liu Y, *et al.* Methionine hydroxy analogue prevents oxidative damage and improves antioxidant status of intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*, var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(6): 595–604
- Gao LJ, Huang YQ, Xia LJ, *et al.* Comparison of flesh quality of farmed fugu, *Takifugu rubripes* from different culture models. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1668–1676 [高露姣, 黄艳青, 夏连军, 等. 不同养殖模式下红鳍东方鲀的品质比较. *水产学报*, 2011, 35(11): 1668–1676]
- Goff JB, Dmiii G. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. *Aquaculture*, 2004, 241(1–4): 465–477
- Harding DE, Jr AO, Wilson RP. Sulfur amino acid requirement of channel catfish: L-methionine and L-cystine. *The Journal of nutrition*, 1977, 107(11): 2031–2035
- Hu TE, Wang L, Zhang CX, *et al.* Effects of dietary bile acid supplementation on the growth, whole-body composition and apparent nutrient digestibility of Bullfrog (*Rana Catesbelana*). *Acta Hydrobiology Sinica*, 2015, 39(4): 677–685 [胡田恩, 王玲, 张春晓, 等. 饲料中添加胆汁酸对牛蛙生长性能、体组成和营养物质表观消化率的影响. *水生生物学报*, 2015, 39(4): 677–685]
- Kikuchi K, Furuta T, Iwata N, *et al.* Effect of dietary lipid levels on the growth, feed utilization, body composition and blood characteristics of tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 2009, 298(1–2): 111–117
- Kim KI, Kayes TB, Amundson CH. Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1992, 101(1–2): 95–103
- Kim SS, Lee KJ. Dietary protein requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Aquaculture*, 2009, 287(1–2): 219–222
- Klatt SF, Danwitz AV, Hasler M, *et al.* Determination of the lower and upper critical concentration of Methionine + Cystine in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 2016(452): 12–23
- Lin YC. Study on lysine and methionine requirements for juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012 [林郁葱. 胭脂鱼幼鱼对赖氨酸和蛋氨酸的最适需要量. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Luo Z, Liu YJ, Mai KS, *et al.* Dietary L-methionine requirement of juvenile grouper *Epinephelus coioides* at a constant dietary cystine level. *Aquaculture*, 2005, 249(1–4): 409–418
- Ma R, Hou H, Mai KS, *et al.* Comparative study on the effects of

- L-methionine or 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid as dietary methionine source on growth performance and anti-oxidative responses of turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 2013, 412–413(6): 136–143
- Mai, KS, Wan, JL, Ai, QH, *et al.* Dietary methionine requirement of juvenile yellow croaker *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*, 2006, 251: 564–572
- Murthy HS, Varghese TJ. Total sulphur amino acid requirement of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 2015, 4(1): 61–65
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of Fishes. National Academy of Sciences, Washington, DC. 1993
- Niu J, Du Q, Lin HZ, *et al.* Quantitative dietary methionine requirement of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* at a constant dietary cystine level. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(5): 677–686
- Pack M, Rodehutsord M, Jacobs S, *et al.* Amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) II. Protein deposition as function of dietary methionine, threonine and arginine. *Journal of Applied Ichthyology*, 1995, 11(3–4): 390–393
- Poppi DA, Quinton VM, Hua K, *et al.* Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 100–109
- Ren H, Zhan XA. Advances in amino acid nutrition of aquatic animals. *Feed Research*, 2006(2): 41–43 [任和, 占秀安. 水产动物氨基酸营养研究进展. *饲料研究*, 2006(2): 41–43]
- Romański KW. The role and mechanism of action of bile acids in the digestive system - Bile acids in the gut. *Advances in Clinical & Experimental Medicine*, 2008, 17(1): 83–89
- Ruchimat T, Masumoto T, Hosokawa H. *et al.* Quantitative methionine requirement of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 1997, 150(1–2): 113–122
- Sungsam K. Dietary protein requirement of juvenile tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Aquaculture*, 2009, 287(1–2): 219–222
- Sun Y, Jiang ZQ, Li YQ, *et al.* Effects of dietary lipid on the liver antioxidant capacity and histology of *Takifugu rubripes* juvenile. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(3): 27–32 [孙阳, 姜志强, 李艳秋, 等. 饲料脂肪水平对红鳍东方鲀幼鱼肝脏抗氧化酶活力及组织结构的影响. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(3): 27–32]
- Simmons L, Moccia RD, Bureau DP, *et al.* Dietary methionine requirement of juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Nutrition*, 2015, 5(2): 93–100
- Sirvent A, Claudel T, Martin G, *et al.* The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Letters*, 2004, 566(1–3): 173–177
- Takii K, Ukawa M, Nakamura M, *et al.* Suitable lipid level in brown fish meal diet for tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Fisheries Science*, 1995, 61(5): 841–844
- Walton MJ, Cowey CB, Adron JW. Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. *Journal of Nutrition*, 1982, 112(8): 1525–35
- Wang XM. Study on the optimum dietary protein level of juvenile tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Master's Thesis of Hebei Normal University, 2008, 14–27 [王淑敏. 红鳍东方鲀幼鱼饲料最适蛋白质含量的研究. 河北师范大学硕士研究生学位论文, 2008, 14–27]
- Wang X, Xue M, Figueiredo-Silva C, *et al.* Dietary methionine requirement of the pre-adult gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) at a constant dietary cystine level. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(3): 509–516
- Xiang X, Zhou XH, Luo L, *et al.* Effects of dietary methionine levels on the growth performance, feed utilization and body composition of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 538–549 [向象, 周兴华, 罗莉, 等. 饲料蛋氨酸水平对吉富罗非鱼生长、饲料利用率和体成分的影响. *水产学报*, 2014, 38(4): 538–549]
- Xiao WW, Feng L, Liu Y, *et al.* Effects of dietary methionine hydroxyl analogue supplement on growth, protein deposition and intestinal enzymes activities of juvenile jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian). *Aquaculture Nutrition* 2010, 17(4): 408–417
- 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
- Zhou QC, Wu ZH, Tan BP, *et al.* Optimal dietary methionine requirement for Juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 2006, 258(1–4): 551–557

Dietary Methionine Requirement of Juvenile Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*)

ZHANG Qinggong^{1,2}, LIANG Mengqing^{2①}, XU Houguo², WEI Yuliang²

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

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract A 67-days feeding experiment was conducted to investigate the effects different levels on the growth performance and biochemical parameters of tiger puffer [average body weight: (13.83±0.63) g], and to determine the dietary methionine requirement for tiger puffer. There were six experimental isonitrogenous and isolipidic semipurified diets which were formulated with the graded levels of methionine (0.61%, 0.85%, 1.10%, 1.39%, 1.60%, 1.84%, respectively). Each diet was randomly assigned to triplicate groups, and each group contained 30 individuals. Fish were fed fourth daily(07:00, 12:00, 16:00, 20:00) to apparent satiation. The result showed that no significant differences in protein productive value (PPV) were found among dietary treatments ($P>0.05$). Specific growth rate (SGR), feed conversion ratio(FCR) and protein efficiency ratio (PER) increased with increasing dietary methionine levels from 0.61% to 1.60%($P<0.05$), the highest group was observed in methionine levels 1.60% group, and there after showed a declining tendency with increasing dietary methionine levels from 1.60% to 1.84%. Hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic index (VSI) of the 1.60% methionine diets was significantly higher than that of 0.61% groups ($P<0.05$), with further increase from 1.60% to 1.84%, HSI and VSI decreased. The crude lipid contents of whole body were significantly affected by dietary methionine levels ($P<0.05$), the 1.60% methionine diets was significantly higher than 0.61% groups ($P<0.05$), with further increase from 1.60% to 1.84%, crude lipid decreased. while moisture, crude protein and ash showed no significant differences ($P>0.05$). Dietary methionine levels significantly influenced the contents of triglyceride, bile acid and blood glucose in serum ($P<0.05$), There were no significant difference in total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, total protein, activity of glutamic-pyruvic transaminase and glutamic-oxaloacetic transaminase ($P>0.05$) in serum. Second-order regression analysis on the basis of SGR indicated that the optimum dietary methionine requirements of tiger puffer were estimated to be 1.38% of diet (2.71% of dietary protein).

Key words Tiger puffer (*Takifugu rubripes*); Methionine requirement; Growth; Body composition; Physiological and biochemical indices

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180611003

http://www.yykxjz.cn/

郝甜甜, 王际英, 李宝山, 宋志东, 黄炳山, 孙永智, 王雅平, 王晓艳. 复合动植物蛋白部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 11-20

Hao TT, Wang JY, Li BS, Song ZD, Huang BS, Sun YZ, Wang YP, Wang XY. Effects of replacement of fish meal with an animal and plant protein mixture on growth, body composition, and physiological and biological indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 11-20

复合动植物蛋白部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响*

郝甜甜¹ 王际英^{1①} 李宝山¹ 宋志东¹ 黄炳山¹
孙永智¹ 王雅平^{1,2} 王晓艳¹



(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;
2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306)

摘要 本研究设计 5 组等氮等能(粗蛋白为 53%, 能量为 25KJ/g)的实验饲料, 以 60% 的鱼粉饲料组作为对照(D1), 豆粕:花生粕:鱼溶浆粉:鸡肉粉(2:1:3:2)的复合蛋白替代 40% (D2)、50% (D3)、60% (D4)和 70% (D5)的鱼粉, 养殖大菱鲆幼鱼(*Scophthalmus maximus* L.)初始体重(53.0±0.2) g, 养殖周期 84 d, 每天定时(08:00, 16:30)投喂 2 次, 投喂量为体重的 1.5%~2%。实验结果显示, 各处理组之间幼鱼存活率、饲料系数和摄食率均无显著性差异($P>0.05$); 与对照组相比, D4 和 D5 组增重率显著降低($P<0.05$); 肥满度在 D2 组达到最高值, 显著高于 D3、D4 和 D5 组($P<0.05$); 脏体比(VSI)、肝体比(HSI)和肠体比(ISI)均在 D2 组达到最低值, 均显著低于 D5 组($P<0.05$); 复合动植物蛋白替代鱼粉对大菱鲆幼鱼全鱼水分和粗蛋白含量均无显著影响($P>0.05$); 各替代组全鱼粗脂肪含量显著高于对照组($P<0.05$); 全鱼灰分含量在 D5 组显著低于对照组($P<0.05$); 各组间背肌水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量均无显著性差异($P>0.05$); 复合动植物蛋白替代鱼粉对鱼体肌肉非必需氨基酸和必需氨基酸总量无显著影响($P>0.05$); 各替代组均显著提高了血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性($P<0.05$); 总蛋白浓度在 D2 组显著高于 D4 和 D5 组($P<0.05$); 血糖浓度在 D2 和 D3 组显著低于其他 3 组($P<0.05$); D3、D4 和 D5 组甘油三酯浓度和高密度脂蛋白浓度均显著低于对照组和 D2 组($P<0.05$); 各替代组胆固醇和低密度脂蛋白浓度均显著低于对照组($P<0.05$); 各组之间碱性磷酸酶浓度无显著差异($P>0.05$)。研究结果表明, 复合动植物蛋白可有效替代 50% 鱼粉而不影响大菱鲆幼鱼生长性能和部分生理生化指标。

关键词 大菱鲆; 复合动植物蛋白; 鱼粉; 生长; 生理生化指标

中图分类号 S963.73 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0011-10

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)是我国北方重要的海水鱼经济养殖品种, 具有较高的经济和社会效

* 山东省重点研发计划(2016GSF115005)和烟台市科技计划(2017ZH066)共同资助[The work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province of China (2016GSF115005), and Science and Technology Development Project of Yantai (2017ZH066)]. 郝甜甜, E-mail: haotiantian0805@163.com

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

收稿日期: 2018-06-11, 收修改稿日期: 2018-06-29

益(雷霖, 2003)。目前, 工厂化养殖大菱鲆多投喂高蛋白商品饲料, 鱼粉作为优质蛋白源是大菱鲆商业饲料的首选。然而, 随着全球渔业资源的匮乏和鱼粉需求量的不断增大, 鱼粉价格不断上涨, 因此, 开发可利用的廉价新型蛋白源替代鱼粉是水产养殖业盈利的先决条件。目前, 大多数的蛋白源替代鱼粉研究多集中在植物蛋白源和动物蛋白源上。对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)等研究表明, 豆粕等植物蛋白单一替代鱼粉的最高比例可达30%~40%, 而不影响鱼体生长(Kaushik *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2005); 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆的研究表明, 蚕蛹粉、肉骨粉等动物蛋白单一替代鱼粉最高比例可达10%~20%, 而不影响幼鱼生长(Lee *et al.*, 2012; 梅琳, 2015)。因此, 对于肉食性或偏肉食的杂食性鱼类来说, 这些单一蛋白源替代鱼粉比例很难达到或超过50% (李学丽等, 2017; 魏佳丽等, 2016; 李宗升等, 2016)。因此, 如何将不同蛋白源组合互补, 提高其在海水鱼配合饲料中的利用率, 是开发海水鱼配合饲料中鱼粉替代研究的关键问题。同时, 新型蛋白源鱼溶浆粉由于含有较多寡肽, 游离氨基酸、牛磺酸及保留了鱼粉特有的未知生长因子, 具有提高生物体生长等作用(罗其刚等, 2015), 但鱼溶浆粉在海水鱼配合饲料中的应用还未见报道。本研究在综合考虑氨基酸平衡及适口性等基础上, 采用来源广泛且实际生产中常用的豆粕、花生粕、鸡肉粉和鱼溶浆粉为复合蛋白源, 在补充限制性氨基酸和牛磺酸的条件下, 相互复合搭配(2:1:3:2), 用其部分替代大菱鲆配合饲料中的不同水平鱼粉, 对大菱鲆幼鱼生长性能、体成分及生理生化指标进行研究, 旨在尽可能的替代更多鱼粉, 为大菱鲆新型蛋白源的开发研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验用蛋白源为鱼粉、酪蛋白、豆粕、花生粕、鸡肉粉及鱼溶浆粉, 鱼油为脂肪源。原料营养和氨基酸组成见表1。鱼溶浆粉购自荣成海圣饲料有限公司, 其工艺为: 新鲜鱼经洗涤去杂, 蒸煮压榨后, 酶解处理, 真空干燥至水分为40%~50%, 最后喷雾干燥至成品。其他原料均由山东升索渔用饲料研究中心提供。实验设置5组等氮等能(粗蛋白为53%, 能量为25 kJ/g)饲料, 以60%的鱼粉组作为对照(D1), 豆粕:花生粕:鱼溶浆粉:鸡肉粉(2:1:3:2)复合替代

40% (D2)、50% (D3)、60% (D4)和70% (D5)的鱼粉, 根据鱼粉对照组必需氨基酸组成, 添加晶体氨基酸L-赖氨酸和L-蛋氨酸平衡各处理组必需氨基酸。具体饲料配方见表2。饲料氨基酸组成见表3。

表1 饲料原料氨基酸组成及主要营养成分
Tab.1 Amino acid and nutrient contents of dietary ingredient

项目 Items	花生粕 Peanut meal	鱼粉 Fish meal	鱼溶浆粉 Stickwater meal	鸡肉粉 Poultry by-product meal	豆粕 Soybean meal
Asp	6.39	6.62	5.41	5.47	6.08
Thr	1.49	2.34	1.96	2.72	2.12
Ser	2.79	3.23	2.84	2.97	2.72
Glu	12.00	8.54	9.31	9.74	9.84
Gly	3.26	4.52	4.07	6.04	2.30
Ala	1.01	4.29	4.16	4.38	2.32
Cys	1.83	0.89	0.35	0.91	1.15
Val	0.16	3.12	1.96	2.57	2.18
Met	1.39	1.76	0.50	0.93	0.18
Ile	3.35	2.79	2.27	1.98	2.00
Leu	1.86	5.36	4.45	4.20	3.87
Tyr	2.68	2.48	0.94	1.89	1.79
Phe	1.75	2.28	1.64	2.63	2.69
Lys	0.75	4.49	4.00	3.51	3.10
His	1.21	1.87	2.25	1.27	1.32
Arg	6.33	5.16	3.60	4.27	3.80
Pro	2.26	2.79	2.09	4.19	2.64
粗蛋白 Crude protein	53.90	65.58	63.00	64.60	50.57
粗脂肪 Crude lipid	2.10	6.15	7.51	10.84	2.40

饲料原料粉碎过80目筛, 按照饲料配方逐级扩大混匀, 将鱼油均匀加入原料中, 混合均匀, 然后加水搓匀, 经螺旋挤压机加工成直径为3.0 mm的硬颗粒饲料, 60℃烘干12 h, 密封保存于-20℃备用。

1.2 实验用鱼和实验条件

实验用大菱鲆购自山东蓬莱宗哲养殖有限公司, 养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院全封闭水循环系统进行。实验开始之前, 实验鱼暂养7 d, 使其适应养殖环境。驯化结束后, 禁食24 h, 挑选健康、规格均一的大菱鲆幼鱼[初重(53.0±0.2) g]随机分配到15个绿色圆柱形塑料养殖桶中(直径70 cm×高80 cm, 水深50 cm)。每个处理3个重复, 每个重复30尾鱼。整个实

验期间, 微水流循环水养殖, 控制水温为 $(16\pm 1)^{\circ}\text{C}$, pH 为7.8~8.0, 盐度为27~28, 溶解氧 $> 8\text{ mg/L}$, 氨氮 $< 0.01\text{ mg/L}$, 亚硝酸盐 $< 0.01\text{ mg/L}$ 。养殖周期为84 d, 每天投喂2次(08:00, 16:30), 投喂量为鱼体重的1.5%~2%, 投喂结束之后从系统自带的排水口将残饵排出, 数颗粒计数。

1.3 样品采集

养殖实验结束时, 禁食 24 h, 以桶为单位称重量, 记录每桶实验鱼的尾数和重量, 计算成活率、增重率和饲料系数。每桶随机选择 9 尾幼鱼, 用氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)麻醉, 2 尾作为全鱼分析, 剩余 7 尾尾静脉采血, 之后取背肌和内脏团, 称重, 然

表 2 饲料配方和主要营养成分(%干物质)

Tab.2 Formulation and proximate chemical composition of the tested diets (% dry matter)

项目 Items	组别 Groups				
	D1	D2	D3	D4	D5
鱼粉 Fish meal	60.00	36.00	30.00	24.00	18.00
酪蛋白 Casein	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
豆粕 Soybean meal	0.00	6.67	8.34	10.01	11.68
花生粕 Peanut meal	0.00	3.34	4.17	5.01	5.84
鱼溶浆粉 Stickwater meal	0.00	10.01	12.51	15.02	17.52
鸡肉粉 Poultry by-product meal	0.00	6.67	8.34	10.01	11.68
鱼油 Fish oil	6.00	5.60	5.2	4.9	4.6
A-淀粉 α -starch	10.45	10.45	10.45	10.45	10.45
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 Mineral mixture ^a	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素预混料 Vitamin mixture ^b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
甜菜碱 Betaine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
赖氨酸 Lysine	0.00	0.22	0.27	0.33	0.38
蛋氨酸 Methionine	0.00	0.10	0.12	0.15	0.17
牛磺酸 Taurine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
羧甲基纤维素钠 CMC	6.5	3.49	2.74	1.97	1.23
合计 Total	100	100	100	100	100
常规成分组成 Proximate composition					
粗蛋白 Crude protein	52.95	52.75	52.89	52.73	53.32
粗脂肪 Crude lipid	11.55	11.52	11.53	11.61	11.63
能量 Gross energy/(KJ/g)	24.76	24.75	24.80	25.18	25.12
灰分 Ash	14.78	13.38	13.16	12.93	12.38

注: a: 矿物质预混料(mg/kg 饲料预混料): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3568.0 mg; KCl 3020.5 mg; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 8.3 mg; CoCl_2 28.0 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 353.0 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9.0 mg; KI 7.0 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 63.1 mg; Na_2SeO_3 1.5 mg; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1533.0 mg; NaCl 100.0 mg; NaF 4.0 mg; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25568.0 mg; Ca-lactate 15968.0 mg

b: 维生素预混料(mg/kg 饲料预混料): 维生素 A 38.0 mg; α -生育酚 210.0 mg; 维生素 D₃ 13.2 mg; 硫胺素 115.0 mg; 核黄素 380.0 mg; 盐酸吡哆醇 88.0 mg; 泛酸 368.0 mg; 烟酸 1030.0 mg; 生物素 10.0 mg; 叶酸 20.0 mg, 维生素 B₁₂ 1.3 mg; 肌醇 4000.0 mg

Note: a: One kilogram of mineral premix contained the following: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3568.0 mg, KCl 3020.5 mg, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 8.3 mg, CoCl_2 28.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 353.0 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9.0 mg, KI 7.0 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 63.1 mg, Na_2SeO_3 1.5 mg, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1533.0 mg, NaCl 100.0 mg, NaF 4.0 mg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25568.0 mg, Ca-lactate 15968.0 mg

b: One kilogram of vitamin premix contained the following: Retinol acetate 38.0 mg, alpha-tocopherol 210.0 mg, cholecalciferol 13.2 mg, thiamin 115.0 mg, riboflavin 380.0 mg, pyridoxine HCl 88.0 mg, pantothenic acid 368.0 mg, niacin acid 1030.0 mg, biotin 10.0 mg, folic acid 20.0 mg, vitamin B₁₂ 1.3 mg, inositol 4000.0 mg

表3 饲料氨基酸组成
Tab.3 Amino acid of the tested diets

氨基酸 Amino acids	组别 Groups				
	D1	D2	D3	D4	D5
非必需氨基酸 Non-essential amino acids (g/100 g dry matter)					
天冬氨酸 Asp	4.56	4.50	4.60	4.50	4.73
丝氨酸 Ser	2.72	2.80	2.50	2.45	2.51
谷氨酸 Glu	9.04	9.00	9.01	9.05	9.44
甘氨酸 Gly	3.22	3.20	3.00	3.08	3.21
丙氨酸 Ala	2.98	2.80	2.75	2.79	2.94
半胱氨酸 Cys	0.78	0.80	0.79	0.81	0.69
酪氨酸 Tyr	1.79	1.80	1.70	1.71	1.50
脯氨酸 Pro	2.76	2.80	2.85	2.86	2.95
合计 Total	27.85	27.70	27.20	27.24	27.97
必需氨基酸 Essential amino acids (mg/100 g dry matter)					
苏氨酸 Thr	2.22	2.20	2.12	2.09	2.14
缬氨酸 Val	2.1	2.05	2.02	2.06	2.06
蛋氨酸 Met	1.6	1.51	1.40	1.39	1.38
异亮氨酸 Ile	1.73	1.72	1.68	1.64	1.67
亮氨酸 Leu	4.02	3.90	3.75	3.63	3.71
苯丙氨酸 Phe	2.27	2.21	2.15	2.08	2.12
赖氨酸 Lys	3.78	3.71	3.68	3.59	3.73
组氨酸 His	1.15	1.20	1.22	1.28	1.32
精氨酸 Arg	3.14	3.11	3.00	2.91	3.02
合计 Total	22.01	21.61	21.02	20.67	21.15

后,分离肝脏和肠道分别称重,计算肝体比和肠体比。血样 4℃静置 4 h, 4000 r/min 离心 10 min, 取血清。将所有样品保存于-20℃, 待测。

1.4 测定指标和方法

实验原料、饲料及实验鱼组织水分测定采用 105℃烘干恒重法测定(GB/T 6435-2006); 粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-2006); 脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T 6433-2006); 粗灰分采用 550℃灼烧法测定(GB/T 6433-2007); 能量采用燃烧法(IKA, C6000, Germany); 实验原料、饲料及实验鱼组织氨基酸采用全自动氨基酸测定仪(Hitachi L-8900, 日本)测定。

生长性能指标及计算公式:

存活率(Survival rate, SR, %)=终末尾数/初始尾数×100

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

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

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR, %)=摄食饲

料量/鱼体增重×100

肥满度(Condition factor, CF)=鱼体重/鱼体长³×100

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

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

肠体比(Intestinesomatic index, ISI, %)=(肠重/鱼体末重)×100

血清丙氨酸转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转移酶(Aspartate transaminase, AST)、总蛋白(Total protein, TP)、白蛋白(Albumin, ALB)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、葡萄糖(Glucose, GLU)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TCHO)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)均采用生化分析仪(7020, 日立, 日本)测定, 试剂盒购于北京利德曼生化股份有限公司。酶活力单位参照试剂盒说明书。

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS17.0 对所得数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 差异显著, 则采用 Duncan's 进行多重检验, 显著水平为 0.05, 统计数据以平均值±标准差(Mean±SD)形式表示。

2 结果与分析

2.1 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能和饲料利用率的影响

由表 4 可知, 养殖结束后, 各组间成活率无显著差异($P>0.05$); 与对照组(D1)相比, D4 和 D5 组鱼体末重显著降低($P<0.05$); 增重率随替代比例的升高呈降低趋势, D4 和 D5 组显著低于对照组($P<0.05$), D2、D3 组与对照组之间无显著差异($P>0.05$); 各组间摄食率和饲料系数均无显著差异($P>0.05$)。

2.2 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼形体指标的影响

由表 5 可知, 随着替代比例的升高, 肥满度呈先上升后下降趋势, 在 D2 组达到最高值, 与对照组无显著差异($P>0.05$), 但是显著高于 D3、D4 和 D5 组($P<0.05$)。脏体比、肝体比和肠体比均随着替代比例的升高呈先下降后上升趋势, 均在 D2 组达到最低值, D5 组达到最高值, 且 D2 与 D5 之间差异显著($P<0.05$)。

表 4 复合蛋白替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能和饲料利用的影响($n=3; \bar{x} \pm SD$)Tab.4 Effect of replacement of fishmeal by compound proteins on growth indices and feed utilization of juvenile turbot($n=3; \bar{x} \pm SD$)

组别 Groups	初始体重 IBM(g)	终末体重 FBW(g)	存活率 SR(%)	增重率 WGR(%)	摄食率 FI(%/d)	饲料系数 FCR
D1	53.01±0.05	105.28±2.27 ^c	96.67±5.77	98.60±4.41 ^c	0.96±0.01	1.14±0.04
D2	53.00±0.08	104.10±1.56 ^{bc}	97.77±3.85	96.42±2.98 ^{bc}	0.95±0.02	1.14±0.03
D3	53.10±0.18	104.44±0.45 ^{bc}	100.00±0.00	96.69±0.89 ^{bc}	0.96±0.00	1.14±0.01
D4	53.13±0.24	101.96±2.07 ^b	98.89±1.92	91.91±4.75 ^b	0.95±0.03	1.18±0.06
D5	52.81±0.07	99.04±0.85 ^a	100.00±0.00	87.54±1.36 ^a	0.94±0.08	1.21±0.02

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$). 下同

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). The same as bellow

表 5 复合蛋白替代鱼粉对大菱鲆幼鱼形体指标的影响($n=3; \bar{x} \pm SD$)Tab.5 Effect of replacement of fishmeal by compound proteins on somatic indices of juvenile turbot ($n=3; \bar{x} \pm SD$)

组别 Groups	肥满度 CF	脏体比 VSI(%)	肝体比 HSI(%)	肠体比 IWR(%)
D1	3.26±0.08 ^{bc}	5.03±0.23 ^b	1.42±0.06 ^{bc}	1.76±0.11 ^a
D2	3.36±0.03 ^c	4.58±0.09 ^a	1.21±0.03 ^a	1.69±0.12 ^a
D3	3.14±0.11 ^{ab}	4.89±0.23 ^{ab}	1.34±0.04 ^b	1.82±0.02 ^a
D4	3.16±0.08 ^{ab}	4.89±0.15 ^{ab}	1.34±0.04 ^b	2.03±0.12 ^b
D5	3.08±0.06 ^a	5.36±0.13 ^c	1.49±0.09 ^c	2.22±0.04 ^c

2.3 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼体成分的影响

据表 6 可知, 动植物复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼全鱼水分和粗蛋白含量均无显著性影响($P>0.05$)。各替代组粗脂肪含量均显著高于对照组($P<0.05$)。灰分呈降低趋势, 在 D5 组达到最低值, 与对照组差异显著($P<0.05$)。复合动植物蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼背肌水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量

均无显著影响($P>0.05$)。

背肌氨基酸组成见表 7, 复合动植物蛋白替代鱼粉对鱼体肌肉非必需氨基酸和必需氨基酸总量无显著影响($P>0.05$); 随着复合动植物蛋白替代鱼粉水平的升高, Cys 呈先上升后稳定的趋势, 各替代组均显著高于对照组($P<0.05$); Tyr 含量在 D4 替代组达到最高值, 显著高于对照组和 D2 组; 各替代组 Val 和 Met 含量显著高于对照组($P<0.05$)。

表 6 复合蛋白替代鱼粉对大菱鲆幼鱼体成分的影响[($n=3; \bar{x} \pm SD$; %湿重(FW))]Tab.6 Effect of replacement of fishmeal by compound proteins on proximate composition of the whole body and muscle of juvenile turbot ($n=3; \bar{x} \pm SD$; wet weight)

组别 Groups	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	灰分 Ash
全鱼 Whole fish				
D1	76.21±0.29	16.36±0.54	2.22±0.10 ^a	3.92±0.17 ^b
D2	76.40±1.13	16.40±0.24	2.98±0.09 ^b	3.75±0.09 ^{ab}
D3	77.25±0.28	15.88±0.14	2.88±0.17 ^b	3.77±0.11 ^{ab}
D4	76.76±0.36	15.92±0.15	2.86±0.14 ^b	3.74±0.05 ^{ab}
D5	77.29±0.71	16.14±0.52	2.91±0.16 ^b	3.59±0.17 ^a
背肌 Dorsal muscle				
D1	79.38±1.28	18.68±1.06	0.54±0.05	1.16±0.09
D2	78.95±0.28	19.32±0.42	0.53±0.02	1.17±0.04
D3	79.08±0.38	19.02±0.56	0.50±0.07	1.17±0.02
D4	79.43±0.33	18.79±0.31	0.47±0.06	1.16±0.02
D5	79.95±0.61	18.23±0.43	0.52±0.03	1.15±0.01

表7 复合蛋白替代鱼粉对大菱鲂幼鱼背肌氨基酸组成的影响(g/100 g)(n=3; $\bar{x}\pm SD$)Tab.7 Effect of replacement of fishmeal by compound proteins on amino acid of muscle in juvenile turbot (g/100 g) (n=3; $\bar{x}\pm SD$)

氨基酸 Amino acids	组别 Groups				
	D1	D2	D3	D4	D5
非必需氨基酸 Non-essential amino acids					
天门冬氨酸 Asp	9.51±0.27	9.61±0.31	9.80±0.47	9.90±0.44	9.70±0.15
丝氨酸 Ser	4.03±0.08	3.99±0.14	4.21±0.11	4.12±0.17	4.04±0.06
谷氨酸 Glu	15.83±0.35	15.94±0.52	16.53±0.54	16.48±0.62	16.10±0.21
脯氨酸 Pro	3.06±0.04	3.00±0.10	3.12±0.08	3.02±0.09	2.99±0.04
甘氨酸 Gly	4.50±0.13	4.49±0.19	4.56±0.12	4.44±0.14	4.36±0.07
丙氨酸 Ala	5.50±0.17	5.58±0.18	5.76±0.21	5.69±0.17	5.56±0.07
胱氨酸 Cys	1.04±0.06 ^a	1.18±0.01 ^b	1.38±0.03 ^c	1.30±0.03 ^c	1.35±0.02 ^c
酪氨酸 Tyr	2.90±0.15 ^{ab}	2.82±0.16 ^a	3.14±0.19 ^{bc}	3.19±0.12 ^c	3.09±0.07 ^{abc}
合计 Total	46.38±1.05	46.44±1.20	48.76±1.72	48.16±1.88	47.20±0.61
必需氨基酸 Essential amino acids					
苯丙氨酸 Phe	3.61±0.11	3.62±0.07	3.66±0.11	3.67±0.10	3.59±0.07
赖氨酸 Lys	8.07±0.26	8.18±0.24	8.34±0.36	8.41±0.29	8.15±0.12
组氨酸 His	1.84±0.07	1.81±0.08	1.87±0.10	1.90±0.09	1.82±0.12
精氨酸 Arg	5.65±0.13	5.67±0.16	5.79±0.21	5.82±0.17	5.68±0.07
苏氨酸 Thr	4.25±0.11	4.27±0.16	4.44±0.13	4.40±0.20	4.31±0.08
缬氨酸 Val	3.43±0.03 ^a	3.62±0.05 ^b	3.65±0.05 ^b	3.68±0.06 ^b	3.62±0.16 ^b
蛋氨酸 Met	1.98±0.04 ^a	2.55±0.13 ^b	2.69±0.06 ^{bc}	2.80±0.03 ^c	2.74±0.07 ^c
亮氨酸 Leu	6.96±0.19	7.02±0.20	7.16±0.28	7.20±0.23	7.02±0.10
异亮氨酸 Ile	3.45±0.29	3.52±0.06	3.39±0.01	3.50±0.15	3.34±0.10
合计 Total	39.19±1.57	39.92±0.36	40.81±1.69	41.38±1.44	40.18±0.79

注：同行数值后不同上标英文字母表示差异显著($P<0.05$)，下同

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

2.4 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲂幼鱼血清生理指标的影响

复合蛋白替代鱼粉显著影响了大菱鲂幼鱼部分

生理指标(表8)。与对照组相比,各替代组 ALT 浓度显著升高;AST 浓度在 D4 和 D5 组显著高于对照组、D2 和 D3 组;TP 浓度在 D2 组达到最高值,显著高于 D4 和 D5 组($P<0.05$),但是与对照组差异不显著

表8 复合蛋白替代鱼粉蛋白对大菱鲂幼鱼血清生理指标的影响(n=3; $\bar{x}\pm SD$)

Tab.8 Effect of replacement of fishmeal by compound proteins on serum physiological indices of juvenile turbot

指标 Parameter	组别 Groups				
	D1	D2	D3	D4	D5
谷丙转氨酶 ALT (U/L)	10.00±0.00 ^a	11.33±0.57 ^b	11.67±0.57 ^b	16.33±0.57 ^c	20.00±1.00 ^d
谷草转氨酶 AST (U/L)	45.00±1.00 ^a	52.00±2.64 ^a	48.67±4.93 ^a	105.33±10.11 ^b	149.33±4.50 ^c
总蛋白 TP (g/L)	47.47±1.32 ^{ab}	50.17±2.27 ^b	46.30±4.13 ^{ab}	45.37±1.55 ^a	45.40±1.04 ^a
白蛋白 ALB (g/L)	14.93±0.68	15.37±0.32	15.40±1.38	14.33±0.72	14.83±0.73
葡萄糖 GLU (mmol/L ¹)	1.04±0.03 ^{bc}	0.72±0.07 ^a	0.73±0.04 ^a	0.96±0.03 ^b	1.12±0.09 ^c
甘油三酯 TG (mmol/L)	4.33±0.03 ^c	4.38±0.15 ^c	3.20±0.23 ^a	3.54±0.29 ^{ab}	3.66±0.18 ^b
胆固醇 CHO (mmol/L)	7.12±0.20 ^d	6.10±0.07 ^c	5.04±0.03 ^b	4.63±0.24 ^a	4.51±0.02 ^a
高密度脂蛋白 HDL-C (mmol/L)	4.51±0.12 ^c	4.18±0.22 ^c	3.76±0.16 ^b	3.47±0.24 ^{ab}	3.30±0.20 ^a
低密度脂蛋白 LDL-C (mmol/L)	2.17±0.16 ^d	1.66±0.03 ^c	1.48±0.03 ^b	1.07±0.07 ^a	1.02±0.03 ^a
碱性磷酸酶 ALP (U/L)	34.00±2.64	33.00±0.00	32.33±1.15	33.67±2.08	34.33±1.15

($P > 0.05$); 各组之间 ALB 浓度和 ALP 浓度差异不显著($P > 0.05$); GLU 浓度随替代比例的升高呈先下降后上升趋势, 在 D2 和 D3 组显著低于对照组、D4 和 D5 组($P < 0.05$); TG 浓度在 D3、D4 和 D5 组显著低于对照组和 D2 组($P < 0.05$); CHO、HDL-C 和 LDL-C 浓度均随替代比例的升高呈下降趋势, 与对照组相比, 各替代组 CHO 和 LDL-C 浓度均显著降低($P < 0.05$); HDL-C 浓度在 D3、D4 和 D5 组显著低于对照组和 D2 组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、饲料利用率和形体指标的影响

在本研究条件下, 复合动植物蛋白源替代不同水平的鱼粉对大菱鲆幼鱼成活率没有显著影响, 这表明本研究饲料对大菱鲆幼鱼的健康没有产生不利影响。已有研究表明, 复合植物蛋白替代大菱鲆饲料中 30% 的鱼粉会显著降低鱼体生长性能(陈超等, 2012), 复合动物蛋白也只能替代大菱鲆饲料 40% 的鱼粉(李会涛等, 2007), 但在本研究中, 以增重率为评价指标, 复合动植物蛋白替代 50% 的鱼粉与对照组无显著差异, 这表明鱼溶浆粉在饲料蛋白源替代中具有一定的潜力, 动植物蛋白与鱼溶浆粉复合达到了互补作用, 提高了蛋白利用率。但是鱼粉替代比例超过 50% 会抑制鱼体生长, 可能的原因是随着替代比例的升高, 复合植物蛋白中的多种抗营养因子导致饲料中蛋白利用率降低(Fournier *et al*, 2004), 从而降低了幼鱼生长。

已有研究表明, 动植物蛋白源替代鱼粉引起生长下降的原因是适口性低引起的(Yigit *et al*, 2006; Kader *et al*, 2010), 但是在本研究中各组之间摄食率和饲料系数均无显著差异, 可能原因是本研究饲料中复合蛋白源中含有的鱼溶浆粉含有较多寡肽、牛磺酸及一些特有的未知因子等(罗其刚等, 2015), 改善了饲料的适口性, 保证了在高水平动植物蛋白替代鱼粉后, 大菱鲆幼鱼仍保持较高的摄食率。

代伟伟等(2016)研究表明, 在营养发生改变时, 鱼体的内脏重量也会发生一定的变化。在本研究中, 当复合蛋白替代比例在 40% 时, 脏体比和肝体比均显著低于对照组, 表明复合动植物蛋白替代鱼粉后使大菱鲆形体发生了一定程度的改变, 这与刘运正等(2016)研究结果一致。

3.2 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼体成分的影响

本研究结果表明, 动植物复合蛋白替代鱼粉后,

各组之间全鱼水分和粗蛋白含量均无显著差异。已有研究表明, 当复合植物蛋白替代鱼粉时, 会降低鱼体粗脂肪含量(代伟伟等, 2016; Kader *et al*, 2012), 但在本研究中动植物复合蛋白替代鱼粉后却增加了全鱼粗脂肪含量。出现此结果的原因, 可能是随着复合蛋白源替代鱼粉比例的升高, 蛋白质效率逐渐降低, 用于合成鱼体蛋白的能量降低, 则用于合成脂肪的能量逐渐增加(于继英, 2018), 从而使饲料中的脂肪消化吸收率升高, 影响了脂肪在鱼体的累积代谢率, 使其脂肪含量随复合动植物蛋白源的升高而升高(Sheng, 1994), 具体作用机理还需进一步研究。关于复合蛋白源替代鱼粉对鱼体灰分的影响, 不同的实验得出的结果亦不同。在已有的大菱鲆、牙鲆和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的研究中发现, 复合蛋白替代鱼粉对鱼体灰分含量无显著影响(董纯等, 2015; 罗嘉翔等, 2017; Deng *et al*, 2006), 但在本研究中, 鱼体灰分含量随着替代比例的升高呈下降趋势, 出现此现象的原因, 可能是复合动植物蛋白源中含有的抗营养因子能与 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 等金属离子螯合形成稳定的不溶性络合物(苗雪霞, 1999), 从而降低鱼体对矿物质的消化吸收率, 进而导致鱼体灰分含量降低。

本研究表明, 复合动植物蛋白替代鱼粉对大菱鲆幼鱼背肌水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量均无显著影响, 这与动植物蛋白在海水鱼上的研究结果一致(Kadera *et al*, 2012; Turker *et al*, 2005)。从氨基酸角度分析, 动植物复合蛋白替代鱼粉对肌肉非必需氨基酸总量和必需氨基酸总量均无显著影响, 这表明本研究饲料复合动植物蛋白配比没有降低肌肉氨基酸品质。与对照组相比, 替代组 Cys、Tyr、Val 和 Met 含量均有升高趋势, 可能原因是蛋白源的不同导致了组织氨基酸代谢库的变化, 不同氨基酸的消耗与沉积发生了相应的变化(代伟伟等, 2015), 具体机理还需进一步研究。

3.3 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清生化指标的影响

饲料蛋白的来源组成会影响鱼体血液生化指标的变化(Lim *et al*, 2011)。Ye 等(2011)研究表明, 即使动植物蛋白替代鱼粉对鱼体蛋白含量没有显著影响, 但是在一定程度上会影响鱼体血液生化指标。本研究结果表明, ALT 和 AST 随着替代比例的升高均呈升高趋势, 说明随着复合动植物蛋白替代鱼粉水平的升高, 对鱼体肝脏造成了一定胁迫, 导致 ALT 和 AST 大量游离到血液(Kouba *et al*, 2014)。血清 TP 浓度在 D2 组达到最高值, 各组间 ALB 浓度无显著性差异, 表明本研究中复合动植物蛋白替代鱼粉后对鱼体蛋

白代谢并未产生负面影响,这与 Lee 等(2012)的研究结果相似。TG、CHO、HDL-C 和 LDL-C 是检测鱼体脂类代谢的重要指标(Geurden *et al*, 2008)。本研究中,血清 TG、CHO、HDL-C 和 LDL-C 浓度均随替代水平的变化而降低,与已有的复合植物蛋白或者复合动植物蛋白替代鱼粉,会导致血清脂类代谢酶活下降(Dias *et al*, 2005; 代伟伟等, 2016)的相关研究结果一致。其原因可能是随着复合蛋白替代鱼粉比例的升高,饲料蛋白源发生变化导致了鱼体脂类平衡的改变(Panserat *et al*, 2008; Nagel *et al*, 2012),从而影响了血清脂类代谢酶活的变化。

4 结 论

在 84 d 养殖时间内,使用复合动植物蛋白源可有效替代饲料 50% 的鱼粉而不影响大菱鲆生长性能,饲料利用和蛋白沉积;对肌肉氨基酸品质无显著影响;但是,复合动植物蛋白源的使用影响了鱼体脂类代谢,表现为降低了血清 TG、CHO、HDL-C 和 LDL-C 浓度。综上所述,以增重率为评价指标,当用比例为,豆粕:花生粕:鱼溶浆粉:鸡肉粉=2:1:3:2 的复合蛋白源替代鱼粉时,最佳替代比例为 50%。

参 考 文 献

- Chen C, Chen JH. Effects of taurine and compound crystalline amino acid on feed intake, growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(23): 108-112 [陈超, 陈京华. 牛磺酸、晶体氨基酸对大菱鲆摄食、生长和饲料利用率的影响. 中国农学通报, 2012, 28(23): 108-112]
- Dias J, Alvarez MJ, Arzel J, *et al*. Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Comparative Biochemistry Physiology, Part A, 2005, 142(1): 19-31
- Dai WW, Mai KS, Xu W, *et al*. Effects of replacing fish meal with plant-based protein on growth, physiological and biological indices, and intestinal histology in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Güntuer. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 125-137 [代伟伟, 麦康森, 徐玮, 等. 复合植物蛋白源替代鱼粉对半滑舌鳎生长、生理生化指标和肠组织结构的影响. 中国水产科学, 2016, 23(1): 125-137]
- Deng JM, Mai KS, Ai QH, *et al*. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 503-513
- Dong C, Zhou HH, Mai KS, *et al*. Replacement of fishmeal in juvenile turbot diets with compound proteins: Effects on growth performance, whole body composition and apparent digestibility coefficient. Periodical of Ocean University of China(Natural Science), 2015, 45(4): 27-34 [董纯, 周慧慧, 麦康森, 等. 复合蛋白源替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体组成和表观消化率的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(4): 27-34]
- Dai WW, Mai KS, Xu W, *et al*. Effects of lysine-arginine interaction on growth performance, body composition, and muscle amino acid levels of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 876-887 [代伟伟, 麦康森, 徐玮, 等. 饲料中赖氨酸和精氨酸含量对大菱鲆幼鱼生长、体成分和肌肉氨基酸含量的影响. 水产学报, 2015, 39(6): 876-887]
- Fournier V, Huelvan C, Desbruyeres E. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 2004, 236(1-4): 451-465
- Fan T, Liu Y, Ming W, *et al*. Effects of substituting fishmeal with earthworm (*Eisenia foetida*) meal on growth, muscle composition, serum biochemistry index and immunity performance in the loach *Paramisgurnus dabryanus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1320-1331 [范涛, 刘毅, 明伟, 等. 蚯蚓粉替代鱼粉对大鳞副泥鳅生长、肌肉成分、血清生化指标及免疫性能的影响. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1320-1331]
- Geurden I, Kaushik S, Corraze G. Dietary phosphatidylcholine affects postprandial plasma levels and digestibility of lipid in common carp (*Cyprinus carpio*). British Journal of Nutrition, 2008, 100(3): 512-517
- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, *et al*. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 2004, 230(1): 391-404
- Kader MA, Koshio S, Ishikawa M, *et al*. Supplemental effects of some crude ingredients in improving nutritive values of low fishmeal diets for sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture, 2010, 308(3-4): 136-144
- Kader MA, Koshio S. Effect of composite mixture of seafood by-products and soybean proteins in replacement of fishmeal on the performance of red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture, 2012, (368-369): 95-102
- Kadera MA, Bulbul M, Koshio S, *et al*. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture, 2012(350-353): 109-116
- Kouba A, Velíšek J, Stará A, *et al*. Supplementation with sodium selenite and selenium-enriched microalgae biomass show varying effects on blood enzymes activities, antioxidant response, and accumulation in common barbel (*Barbus barbus*). BioMed Research International, 2014, 2014(1): 143-146
- Lei JL. Farming techniques of turbot. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2003, 8 [雷霖霖, 大菱鲆养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2003, 8]
- Lee J, Choi IC, Kim KT, *et al*. Response of dietary substitution of fishmeal with various protein sources on growth, body composition and blood chemistry of olive flounder

- (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846). Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(3): 735–744
- Li XL, Wang JY, Song ZD, *et al.* Research on partial replacement of fishmeal by two kinds of soybean meal in the feed of juvenile ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 716–725 [李学丽, 王际英, 宋志东, 等. 两种豆粕部分替代鱼粉在珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中的研究. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 716–725]
- Li ZS, Wu LX, Li SM, *et al.* Effects of replacing fish meal with poultry by-product meal on growth performance and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fisheries Science, 2016, 35(5): 486–491 [李宗升, 吴立新, 李思萌, 等. 鸡肉粉替代鱼粉对大菱鲆生长和体组成的影响. 水产科学, 2016, 35(5): 486–491]
- Luo QG, Ye YT, Cai CF, *et al.* Effects of adding stickwater meal and fish oil into basal diets on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth, liver fat content and serum indicators. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 888–898 [罗其刚, 叶元土, 蔡春芳, 等. 日粮中添加鱼溶浆粉和鱼油对草鱼生长、肝脏脂肪含量和血清理化指标的影响. 水产学报, 2015, 39(6): 888–898]
- Li HT, Mai KS, Ai QH, *et al.* Apparent digestibility of selected protein ingredients for larger yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(3): 370–376 [李会涛, 麦康森, 艾庆辉, 等. 大黄鱼对几种饲料蛋白原料消化率的研究. 水生生物学报, 2007, 31(3): 370–376]
- Liu YZ, He G, Mai KS, *et al.* Effect of partial replacement of dietary fishmeal with an animal and plant protein mixture on the growth performance and muscle texture of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2016, 46(1): 33–39 [刘运正, 何良, 麦康森, 等. 新型复合动植物蛋白源部分替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长和肉质的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(1): 33–39]
- Luo JX, Huang WW, Yuan Y, *et al.* Effects of fish meal replacement with poultry by-product meal on growth performance, feed utilization, digestive enzyme activities and antioxidant capacity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Chinese journal of animal nutrition, 2017, 29(11): 141–150 [罗嘉翔, 黄文文, 袁野, 等. 鸡肉粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、饲料利用、消化酶活性及抗氧化能力的影响. 动物营养学报, 2017, 29(11): 141–150]
- Lim S, Lee K, A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42(4): 494–503
- Lee J, Choi IC, Kim KT, *et al.* Response of dietary substitution of fishmeal with various protein sources on growth, body composition and blood chemistry of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846). Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(3): 735–744
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蚕蛹蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92]
- Miao XX, Chen HG, Li XL, *et al.* Effect of dietary phytase on growth and phosphorus utilization of broiler chicks. Acta Agriculture Universitatis Henanensis, 1999, 33(1): 68–71 [苗雪霞, 陈红歌, 李秀兰, 等. 植酸酶对肉鸡生长及磷利用率的影响. 河南农业大学学报, 1999, 33(1): 68–71]
- Nagel F, von Danwitz A, Tusche K, *et al.* Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Pestta maxima* L.) impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. Aquaculture, 2012, 356–357(4): 357–364
- Panserat S, Kolditz C, Richard N, *et al.* Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. British Journal of Nutrition, 2008, 100(5): 953–967
- Sheng HQ, He XQ. Effects of dietary animal and plant protein ratio and energy on growth and body composition of bream (*Megalobrama skolkovii* Dybowski). Aquaculture, 1994, 127(2–3): 189–196
- Turker A, Yigit M, Ergun S. Potential of poultry by-product meal as a substitute for fishmeal in diets for black sea turbot *Scophthalmus maeoticus*: growth and nutrient utilization in winter. The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh, 2005, 57(1): 49–61
- Wei JL, Wang JY, Song ZD, *et al.* Effects of the partial substitute for fish meal by hydrolyzed krill meal on growth performance, the body composition and the serum biochemical parameters of juvenile pearl gentian grouper. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(1): 100–110 [魏佳丽, 王际英, 宋志东, 等. 酶解磷虾粉替代鱼粉对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、体组成及血清生化的影响. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 100–110]
- Yu JY, Xu XJ, Zhang J, *et al.* Effects of lipid and protein metabolism on muscle flavor. Feed Research, 2018, (1): 17–21 [于继英, 许小军, 张继, 等. 脂肪和蛋白质代谢对肉品风味的影响. 饲料研究, 2018(1): 17–21]
- Yigit M, Erdem M, Koshio S, *et al.* Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot *Psetta maeotica*. Aquaculture Nutrition, 2010, 12(5): 340–347
- Ye JD, Liu XH, Wang ZJ, *et al.* Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture International, 2011, 19(1): 143–153

Effects of Replacement of Fish Meal With an Animal and Plant Protein Mixture on Growth, Body Composition, and Physiological and Biological Indices of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

HAO Tiantian¹, WANG Jiyong^{1①}, LI Baoshan¹, SONG Zhidong¹, HUANG Bingshan¹,
SUN Yongzhi¹, WANG Yaping^{1,2}, WANG Xiaoyan¹

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

Abstract A 12-week feeding trial was conducted to evaluate the effects of replacement of fish meal with alternative proteins on growth performance, body composition, and physiological and biological indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Five isonitrogenous and isolipidic practical diets were formulated to contain graded levels (100%, 60%, 50%, 40%, and 30%) of fish meal (D1~D5); the D1 group was used as the control. A protein blend of four ingredients (soybean meal, peanut meal, stickwater meal, poultry by-product meal = 2:1:3:2) were used to replace the fish meal; subsequently, amino acids were supplemented in the low fish meal diet to obtain similar amino acid profiles to the high fish meal diet. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 30 fish [(initial weight, (53.0±0.2) g)] per aquarium. The results of the survival rate, feed conversion ratio, feed intake, whole body moisture and crude protein, dorsal muscle moisture, crude protein, crude lipid, and ash content did not show any significant differences between any of the groups ($P>0.05$), whereas the diets with low fish meal content (D4/D5) significantly reduced the weight gain rate of fish compared with the control diet ($P<0.05$). The condition factor was significantly enhanced in the D2 treatment compared with the D3, D4, and D5 groups ($P<0.05$). However, the viscerosomatic and hepatosomatic indices were significantly reduced in the D2 treatment compared with the D5 ($P<0.05$). The dietary inclusion of the animal and plant protein mixture significantly elevated the whole-body crude lipid content ($P<0.05$). The whole-body ash content in the D5 treatment was significantly lower than the control diet ($P<0.05$). The essential amino acid compositions of the muscle were not significantly affected by the replacement of dietary fish meal with animal and plant protein mixtures ($P>0.05$). The dietary inclusion of animal and plant protein mixture significantly elevated serum aspartate aminotransferase and alanine transaminase activities ($P<0.05$). All the substituted protein diets caused significantly reduced serum cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol ($P<0.05$), but only D3~D5 diets caused a significantly decreased serum high-density lipoprotein cholesterol ($P<0.05$). The dietary inclusion of animal and plant protein mixture had no strong effects on the total protein content and the alkaline phosphatase content ($P>0.05$). The replacement of up to 50% of dietary fish meal with an animal and plant protein mixture did not impair growth or reduce the feed efficiency of juvenile turbot.

Key words *Scophthalmus maximus* L.; Animal and plant protein mixture; Fish meal; Growth; Physiological and biological index

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180529003

http://www.yykxjz.cn/

胡冬雪, 马季, 王成强, 乔洪金, 王际英, 李宝山, 孙永智. 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 21-30

Hu DX, Ma J, Wang CQ, Qiao HJ, Wang JY, Li BS, Sun YZ. Effects of replacement of dietary fish meal by *Nannochloropsis* sp. meal on growth performance, body composition, and serum biochemical indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 21-30

拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼生长性能、 体组成和血清生化指标的影响*



胡冬雪^{1,2} 马季^{1,2} 王成强² 乔洪金^{2①} 王际英² 李宝山² 孙永智²

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 为探讨拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)粉替代鱼粉对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响,用拟微绿球藻粉替代基础饲料中0%、3.88%、7.76%、11.64%和15.52%的鱼粉,配制成5种等氮等能的饲料(N₀、N_{3.88}、N_{7.76}、N_{11.64}、N_{15.52})。选取初始体重为(24.60±0.02)g的大菱鲂幼鱼600尾,随机分成5组,每组3个重复,每个重复40尾鱼,养殖周期70d。结果显示:1)各实验组大菱鲂幼鱼的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、蛋白质效率(PER)、饲料系数(FCR)、日摄食率(DFI)、肥满度(CF)和成活率(SR)均无显著差异(P>0.05);2)随着藻粉添加量的增加,全鱼及肌肉中粗脂肪含量显著降低(P<0.05),粗蛋白、粗灰分和水分含量无显著差异(P>0.05);3)血清溶菌酶(LZM)、补体蛋白C3、补体蛋白C4及酸性磷酸酶(ACP)活力均呈先上升后下降的趋势,分别在N_{7.76}、N_{7.76}、N_{11.64}、N_{7.76}组达到最大值,且显著高于N₀组(P<0.05),N_{15.52}组碱性磷酸酶(ALP)显著低于其他组(P<0.05),其他组之间无显著差异(P>0.05);4)藻粉组血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力,均呈先上升后下降的趋势,在N_{7.76}组达到最大值,且显著高于N₀组(P<0.05);5)N_{7.76}组血清甘油三酯(TG)含量显著低于其他组(P<0.05),其他组之间无显著差异(P>0.05),藻粉组血清总胆固醇(TCHO)显著低于N₀组(P<0.05),各藻粉组之间差异不显著(P>0.05);6)藻粉组血清谷草转氨酶(AST)活力呈先下降后上升的趋势,N_{11.64}组达到最小值,显著低于N₀组(P<0.05),藻粉组谷丙转氨酶(ALT)活力显著低于N₀组(P<0.05)。研究表明,本实验条件下,拟微绿球藻粉替代大菱鲂幼鱼饲料中15.52%的鱼粉对其生长无显著影响,替代7.76%可显著提高其非特异性免疫力,降低血脂水平。

关键词 大菱鲂; 拟微绿球藻粉; 生长; 抗氧化能力

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)04-0021-10

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)隶属于菱鲂科 (Scophthalmidae), 瘤棘鲂属(*Psettamaxima*), 它的肌

* 烟台市重点研发计划(2017ZH066)、山东省自然科学基金青年基金(ZR2017QD007)、海洋公益性行业科研专项(201505022-5)和山东省现代农业产业技术体系藻类产业创新团队项目(SDAIT-26-05)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Program of Yantai City(2017ZH066); Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2017QD007); Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201505022-5); Modern Agricultural Industry System of Shandong Province of China: Industrial Innovation Team of Algae (SDAIT-26-05)]. 胡冬雪, E-mail: 1018865124@qq.com

① 通讯作者: 乔洪金, 副研究员, E-mail: hongjinqiao@hotmail.com

收稿日期: 2018-05-29, 收修改稿日期: 2018-06-25

肉丰厚白嫩、骨刺少、内脏团小、出肉率高,口感爽滑甘美,是我国北方主要的海水养殖品种之一,也是世界公认的优质比目鱼类之一。鱼粉是名贵水产鱼类配合饲料中的主要蛋白质来源,但近年来远洋捕获的鲜杂鱼已经达到或者接近最大可持续生产(Rana *et al.*, 2009; Krisetherton *et al.*, 2009),造成了鱼粉供需之间的矛盾。寻找新型蛋白原料(Olsen *et al.*, 2012),替代或减少鱼粉的使用成了目前水生动物营养研究的重点方向之一。

植物蛋白存在抗营养因子和氨基酸的平衡问题(Thompson *et al.*, 2012),在大菱鲆配合饲料中的使用比例较低。研究表明,大豆浓缩蛋白仅能替代17%的鱼粉而对大菱鲆幼鱼的生长不产生影响(Day *et al.*, 2015);玉米蛋白替代大菱鲆幼鱼饲料中21%的鱼粉对其生长性能和饲料效率无显著差异(Regost *et al.*, 1999);复合植物蛋白替代20.7%的鱼粉显著降低大菱鲆幼鱼的生长性能(陈超, 2012)。微藻,如拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)、小球藻(*Chlorella*)及螺旋藻(*Spirulina*),含有人体所需的20种氨基酸、多种维生素和微量元素,以及亚油酸和亚麻酸等高度不饱和脂肪酸(Yamaguchi, 1996; Emma *et al.*, 2017),是替代鱼粉蛋白的理想原料。对鲫鱼(*Carassius auratus*) (石西, 2015)、罗非鱼(*Oreochromis* spp) (Olvera-Novoa *et al.*, 1998)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Dallaire, 2007)的研究表明,微藻粉替代适量的鱼粉对其生长无抑制作用。此外,郭斌等(2018)研究表明,10%的藻渣与51%复合植物蛋白粉替代35%的鱼粉,不影响大菱鲆的生长性能,且能促进摄食率、降低饲料系数,而10%的浒苔与51%复合植物蛋白粉替代35%的鱼粉显著降低大菱鲆生长性能。

拟微绿球藻是海洋单细胞微藻,属于褐藻门(Ochrophyta),真眼点纲(Eustigmatophyceae),适温范围广,易于培养,繁殖快,含有丰富的天然色素如玉米黄素和虾青素,可以增强免疫能力和抗氧化能力(吴吉林等, 2010),且含有丰富的高不饱和脂肪酸,尤其是EPA(余颖等, 2005),可以提高鱼虾蟹苗种的发育和存活率(杜涛等, 2010; Marques *et al.*, 2006)。目前,尚无关于微藻粉替代大菱鲆配合饲料中鱼粉的相关报道,因此,本研究旨在探索拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长、体组成、非特异性免疫和血清生化指标的影响,为微藻粉在水产配合饲料中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计

以鱼油和玉米油为主要脂肪源,用拟微绿球藻藻

粉分别替代基础饲料中0、3.88%、7.76%、11.64%和15.52%的鱼粉,制成5种等氮等能的实验饲料(N₀、N_{3.88}、N_{7.76}、N_{11.64}、N_{15.52}),N₀为对照组。在各替代组中分别添加晶体蛋氨酸、赖氨酸和精氨酸,保持各饲料中必需氨基酸的平衡。饲料配方及营养组成见表1。

1.2 实验管理及样品采集

实验鱼购自蓬莱宗哲养殖有限公司,养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院养殖实验室进行。正式实验前,实验鱼在养殖系统中驯养14 d,期间投喂对照组饲料。实验鱼禁食24 h,挑选初始体重为(24.60±0.02) g的600尾大菱鲆幼鱼,随机分5组,每组设3个重复,每个重复40尾鱼,每天定时定量投喂2次(08:00和15:30),投喂量为鱼体重的1%~2%,根据摄食情况调整投喂量,投喂结束0.5 h左右排残饵,数颗粒,计算残饵量。养殖环境:绿色圆柱形水桶(直径80 cm,高70 cm,水深为50 cm),水温为(17.32±0.20)°C, pH为7.8~8.2,盐度为28~30,溶氧>5 mg/L,氨氮、亚硝酸氮均<0.1 mg/L。

70 d养殖实验结束后,禁食24 h,记录每桶鱼的存活数量并称重,计算存活率和增重率。随机取3尾用于全鱼常规分析,剩余随机取15尾测量体长、体重,计算肥满度,尾静脉取血后,分离内脏和背肌,并分别称重,计算脏体比。背肌-20°C保存,用于常规分析,以上取样均在冰盒上进行。血样在4°C冰箱静置4 h,离心分离(4000 r/min, 10 min),取上清液,-80°C保存,用于测定血清生理生化指标。

1.3 测定指标和样品分析方法

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

$$\text{特定生长率(SGR, \% / d)} = (\ln W_t - \ln W_0) / d \times 100;$$

$$\text{蛋白质效率(PER, \%)} = (W_t - W_0) / (F \times P) \times 100;$$

$$\text{饲料系数(FCR)} = F / (W_t - W_0);$$

$$\text{日摄食率(DFI, \% / d)} = F / [(W_0 + W_t) / 2 \times d] \times 100;$$

$$\text{脏体比(VSI, \%)} = W_v / W_t \times 100;$$

$$\text{肥满度(CF)} = W_t / L^3 \times 100;$$

$$\text{成活率(SR, \%)} = N_t / N_0 \times 100;$$

式中, W_t 为实验鱼末体重(g), W_0 为实验鱼初体重(g), d 为养殖天数, F 为摄食干饲料重(g), P 为饲料中粗蛋白质的含量(%), W_v 为内脏质量, L 为实验末鱼体长, N_t 为实验末鱼的数量, N_0 为实验初鱼的数量。

饲料及组织样品分析方法,水分测定采用105°C烘干恒重法测定(GB/T6435-2006);粗蛋白测定采用

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

原料 Ingredients	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
白鱼粉 ^a White fish meal	50.00	48.06	46.13	44.19	42.25
大豆浓缩蛋白 ^b Soy protein concentrate	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
乌贼内脏粉 Squid meal	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼油 Fish oil	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
玉米油 Corn oil	1.50	1.20	0.90	0.60	0.30
矿物质预混料 ^c Mineral premix	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素预混料 ^d Vitamin premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
α-淀粉 α-starch	8.22	8.22	8.22	8.22	8.22
拟微绿球藻粉 ^e <i>Nannochloropsis</i> sp.	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
羧甲基纤维素钠 Carboxymethyl cellulose sodium	3.92	3.53	3.13	2.74	2.35
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
甜菜碱 Betaine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱(50%) Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
蛋氨酸 Met	0.00	0.02	0.03	0.05	0.06
赖氨酸 Lys	0.00	0.03	0.07	0.10	0.13
精氨酸 Arg	0.00	0.03	0.06	0.09	0.12
乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养组成(%干物质) Proximate composition (% dry matter)					
粗蛋白 Crude protein	53.50	53.47	53.38	53.36	53.12
粗脂肪 Crude lipid	12.63	12.55	12.45	12.39	12.17
粗灰分 Crude Ash	15.54	15.11	14.73	14.51	14.33
蛋氨酸 Met	1.13	1.14	1.26	1.29	1.25
赖氨酸 Lys	3.82	3.80	3.80	3.89	3.88
精氨酸 Arg	3.68	3.67	3.70	3.75	3.71

注: a. 白鱼粉(%干物质): 粗蛋白含量 65.47%, 粗脂肪含量 7.2%

b. 大豆浓缩蛋白(%干物质): 粗蛋白含量 69.85%, 粗脂肪含量 2.1%

c. 矿物质预混料(mg/kg 饲料): MgSO₄·7H₂O, 3568.0 mg; NaH₂PO₄·2H₂O, 25568.0 mg; KCl, 3020.5 mg; KAl(SO₄)₂, 8.3 mg; CoCl₂, 28.0 mg; ZnSO₄·7H₂O, 353.0 mg; Ca-lactate, 15968.0 mg; CuSO₄·5H₂O, 9.0mg; KI, 7.0mg; MnSO₄·4H₂O, 63.1mg; Na₂SeO₃, 1.5mg; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1533.0 mg; NaCl, 100.0 mg; NaF, 4.0 mg

d. 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A, 38.0 mg; 维生素 D, 13.2 mg; α-生育酚, 210.0 mg; 硫胺素, 115.0 mg; 核黄素, 380.0 mg; 盐酸吡哆醇, 88.0 mg; 泛酸, 368.0 mg; 烟酸, 1030.0 mg; 生物素, 10.0 mg; 叶酸, 20.0 mg; 维生素 B₁₂, 1.3 mg; 肌醇, 4000.0 mg; 抗坏血酸, 500.0 mg

e. 拟微绿球藻粉(%干物质): 粗蛋白 50.72%, 粗脂肪 18.05%, 购自烟台海融生物技术有限公司

Notes: a. White fish meal(% dry matter): Crude protein 65.47%, Crude lipid 7.2%

b. Soy protein concentrate(% dry matter): Crude protein 69.85%, Crude lipid 2.1%

c. Mineral mixture (mg/kg diet): MgSO₄·7H₂O, 3568.0 mg; NaH₂PO₄·2H₂O, 25568.0 mg; KCl, 3020.5 mg; KAl(SO₄)₂, 8.3 mg; CoCl₂, 28.0 mg; ZnSO₄·7H₂O, 353.0 mg; Ca-lactate, 15968.0 mg; CuSO₄·5H₂O, 9.0 mg; KI, 7.0 mg; MnSO₄·4H₂O, 63.1 mg; Na₂SeO₃, 1.5 mg; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1533.0 mg; NaCl, 100.0 mg; NaF, 4.0 mg

d. Vitamin mixture (mg/kg diet): retinol acetate, 38.0 mg; cholecalciferol, 13.2 mg; alpha-tocopherol, 210.0 mg; thiamin, 115.0 mg; riboflavin, 380.0 mg; pyridoxine HCl, 88.0 mg; pantothenic acid, 368.0 mg; niacin acid, 1030.0 mg; biotin, 10.0 mg; folic acid, 20.0 mg; vitamin B₁₂, 1.3 mg; inositol, 4000.0 mg; ascorbic acid, 500.0 mg

e. *Nannochloropsis* meal (% dry matter): Crude protein 50.72%, Crude lipid 18.05%, buy from Yantai Hai Rong Biotechnology Co., Ltd., China

凯氏定氮法(GB/T6432-2006);粗脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T6433-2006);粗灰分测定采用马弗炉550℃灼烧法(GB/T 6438-2007)。

血清溶菌酶(LZM)、总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力及丙二醛(MDA)含量采用南京建成的试剂盒测定;补体蛋白 C3 和补体蛋白 C4 采用江莱生物酶联免疫分析(ELISA)试剂盒测定。

血清甘油三酯(TG)、胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、采用全自动生化分析仪(7020,日立,日本)进行测定,试剂盒均购自四川迈克生化技术有限公司。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS18.0 软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),当处理之间差异显著($P<0.05$)时,用 Duncan's 检验进行多重比较,结果以平均值±标准差(Means±SD)形式表示。

2 结果

2.1 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼生长及饲料利用的影响

拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼生长和饲料利用数据见表2。随着拟微绿球藻粉替代比例增大,

大菱鲂幼鱼 WGR、SGR、PER 和 CF 呈逐渐上升的趋势,但各组间无显著差异($P>0.05$),FCR 和 DFI 呈逐渐下降的趋势,无显著差异($P>0.05$);藻粉替代鱼粉对实验鱼的 VSI 和 SR 均无显著影响($P>0.05$)。

2.2 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼全鱼和肌肉体组成的影响

如表3所示,藻粉组的全鱼和肌肉粗脂肪含量呈逐渐下降的趋势,显著低于 N_0 组($P<0.05$);藻粉替代鱼粉对全鱼和肌肉的水分、粗蛋白及粗灰分的含量均无显著影响($P>0.05$)。

2.3 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼血清非特异性免疫的影响

如表4所示,LZM 和补体蛋白 C3 活力呈先上升后下降的趋势,在 $N_{7.76}$ 组达到最大值并显著高于 N_0 组($P<0.05$);补体蛋白 C4 活力呈先上升后下降的趋势,在 $N_{11.64}$ 组达到最大值并显著高于 N_0 组($P<0.05$);ACP 活力呈先上升后下降趋势, $N_{7.76}$ 组达到最大值,并显著高于 N_0 组($P<0.05$)。

2.4 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼抗氧化能力的影响

如表5所示,随着拟微绿球藻粉的替代量增大,T-SOD、T-AOC 和 GSH-PX 活力呈先上升后下降的趋势,在 $N_{7.76}$ 组达到最大值并显著高于 N_0 组($P<0.05$),而 MDA 含量呈逐渐下降的趋势并显著低于 N_0 组($P<0.05$)。

表2 微藻粉替代鱼粉对大菱鲂幼鱼生长性能及饲料利用的影响($n=3$; $\bar{x}\pm SD$)

Tab.2 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on growth performance and feed utilization of juvenile turbot

项目 Items	组别 Groups				
	N_0	$N_{3.88}$	$N_{7.76}$	$N_{11.64}$	$N_{15.52}$
初均重 IBW(g)	24.58±0.06	24.59±0.05	24.61±0.02	24.59±0.05	24.62±0.04
末均重 FBW(g)	61.39±1.65	62.87±0.83	63.03±0.88	63.34±1.93	63.59±1.86
增重率 WGR(%)	149.72±6.17	155.65±2.94	156.14±3.58	157.58±7.72	158.31±7.54
特定生长率 SGR(%/d)	1.30±0.04	1.34±0.02	1.34±0.02	1.35±0.04	1.36±0.04
蛋白质效率 PER(%)	2.18±0.10	2.25±0.05	2.27±0.05	2.30±0.10	2.32±0.11
饲料系数 FCR/%	0.86±0.04	0.83±0.02	0.83±0.02	0.81±0.04	0.81±0.04
摄食率 DFI(%/d)	1.05±0.02	1.04±0.01	1.03±0.01	1.03±0.02	1.03±0.02
脏体比 ^a VSI(%)	5.17±0.08	5.18±0.16	5.16±0.08	5.14±0.17	5.17±0.13
肥满度 ^a CF	3.51±0.13	3.59±0.12	3.61±0.04	3.63±0.04	3.58±0.1
成活率 SR(%)	97.50±2.50	99.17±1.44	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

注:同行数值后不同上标英文表示差异显著($P<0.05$),下同。a: 每组 15 个平行

Notes: Values in the same row with different superscripts show significant difference ($P<0.05$), the same below. a: 15 parallels in each group

表 3 微藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼体组成的的影响(%湿重; $n=3; \bar{x}\pm SD$)
Tab.3 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on tissue proximate composition of juvenile turbot (%wet weight; $n=3; \bar{x}\pm SD$)

项目 Items	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
全鱼 Whole fish					
水分 Moisture	78.03±0.41	78.06±0.19	78.03±0.44	78.19±0.30	78.17±0.44
粗蛋白 Crude protein	15.23±0.34	15.36±0.20	15.48±0.26	15.25±0.26	15.24±0.31
粗脂肪 Crude lipid	2.75±0.06 ^c	2.39±0.07 ^b	2.3±0.18 ^b	2.19±0.08 ^{ab}	2.05±0.11 ^a
粗灰分 Crude ash	3.90±0.10	3.95±0.05	3.98±0.05	3.95±0.09	3.94±0.04
肌肉 Muscle					
水分 Moisture	80.18±0.03	80.19±0.07	80.23±0.10	80.26±0.05	80.27±0.06
粗蛋白 Crude protein	18.25±0.06	18.29±0.07	18.34±0.06	18.24±0.05	18.22±0.02
粗脂肪 Crude lipid	0.32±0.03 ^c	0.30±0.02 ^{bc}	0.27±0.02 ^b	0.27±0.02 ^b	0.22±0.03 ^a
粗灰分 Crude ash	1.27±0.01	1.27±0.01	1.25±0.02	1.25±0.01	1.25±0.01

表 4 微藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清非特异性免疫能力的影响($n=3; \bar{x}\pm SD$)
Tab.4 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on serum non-specific immune index of juvenile turbot ($n=3; \bar{x}\pm SD$)

项目 Items	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
溶菌酶 LZM(U/μl)	1.93±0.05 ^a	2.02±0.03 ^b	2.14±0.03 ^c	1.95±0.04 ^{ab}	1.93±0.05 ^c
补体蛋白 C3(μg/ml)	64.08±1.68 ^a	70.73±3.51 ^b	80.92±1.68 ^c	78.68±4.03 ^c	71.95±0.55 ^b
补体蛋白 C4(μg/ml)	82.83±3.34 ^a	92.70±3.65 ^b	105.26±2.51 ^c	110.40±1.78 ^c	93.40±3.66 ^b
碱性磷酸酶 ALP(U/ml)	26.60±0.35 ^b	26.27±0.46 ^b	26.13±0.42 ^b	26.07±0.12 ^b	25.30±0.36 ^a
酸性磷酸酶 ACP(U/ml)	1.39±0.02 ^a	1.40±0.04 ^a	1.54±0.05 ^b	1.46±0.04 ^b	1.43±0.02 ^a

表 5 微藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清抗氧化能力的影响(%湿重; $n=3; \bar{x}\pm SD$)
Tab.5 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on serum antioxidant indices of juvenile turbot (%wet weight; $n=3; \bar{x}\pm SD$)

项目 Items	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
总超氧化物歧化酶 T-SOD(U/ml)	196.37±3.74 ^a	202.57±2.24 ^{ab}	218.82±4.95 ^c	208.34±2.91 ^b	199.59±1.79 ^a
总抗氧化能力 T-AOC(U/ml)	14.18±0.62 ^a	15.42±0.62 ^{ab}	20.35±1.23 ^d	17.68±1.28 ^c	16.96±0.82 ^{bc}
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX(U/ml)	108.66±4.60 ^a	112.240±4.51 ^{ab}	145.08±6.46 ^c	120.30±4.60 ^b	111.94±4.48 ^{ab}
丙二醛 MDA(nmol/ml)	12.04±0.40 ^c	9.55±0.28 ^b	8.74±0.33 ^a	8.70±0.13 ^a	8.40±0.27 ^a

2.5 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清血脂指标的影响

如表 6 所示, 血清 TG 呈先下降后上升的趋势, 在 N_{7.76} 组达到最低值并且显著低于 N₀ 组($P<0.05$); 藻粉组血清 TCHO 含量显著低于 N₀ 组($P<0.05$), 但各藻粉组之间无显著差异($P<0.05$); LDL-C 含量呈下降趋势, HDL-C 含量呈先上升后下降的趋势, 在 N_{7.76} 组达到最大值并显著高于 N₀ 组($P<0.05$), 且 N_{11.64} 和

N_{15.52} 组显著低于 N₀ 组($P<0.05$); 藻粉组血清 LDL-C/HDL-C 显著低于 N₀ 组($P<0.05$), 但各藻粉组之间无显著差异($P>0.05$)。

2.6 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清代谢指标的影响

如表 7 所示, AST 呈先下降后上升的趋势, N_{11.64} 组达到最小值, 显著低于 N₀ 组($P<0.05$), 而 ALT 呈逐渐下降趋势, 显著低于 N₀ 组($P<0.05$)。

表6 微藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清血脂指标的影响($n=3; \bar{x}\pm SD$)
Tab.6 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on serum lipid of juvenile turbot ($n=3; \bar{x}\pm SD$)

项目 Items	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
甘油三酯 TG(mmol/L)	1.46±0.04 ^b	1.45±0.03 ^b	1.32±0.03 ^a	1.42±0.03 ^b	1.43±0.05 ^b
总胆固醇 CHO(mmol/L)	2.60±0.07 ^b	2.25±0.07 ^a	2.18±0.15 ^a	2.16±0.02 ^a	2.11±0.03 ^a
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C(mmol/L)	0.48±0.02 ^c	0.37±0.05 ^b	0.33±0.05 ^{ab}	0.32±0.02 ^{ab}	0.30±0.04 ^a
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C(mmol/L)	1.81±0.11 ^b	1.82±0.06 ^b	1.87±0.05 ^b	1.69±0.05 ^a	1.63±0.03 ^a
LDL-C/HDL-C	0.26±0.01 ^b	0.21±0.03 ^a	0.17±0.03 ^a	0.19±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a

表7 微藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清代谢指标的影响($n=3; \bar{x}\pm SD$)
Tab.7 Effects of fish meal replacement by microalgae meals on serum metabolic index of juvenile turbot ($n=3; \bar{x}\pm SD$)

项目 Items	组别 Groups				
	N ₀	N _{3.88}	N _{7.76}	N _{11.64}	N _{15.52}
谷草转氨酶 AST/(U/L)	213.3±10.07 ^c	124.33±6.66 ^d	103.67±3.51 ^c	66.33±2.08 ^a	79.33±6.66 ^b
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	19.67±0.58 ^b	15.67±1.16 ^a	15.33±0.58 ^a	14.67±0.58 ^a	15.00±1.00 ^a

3 讨论

3.1 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长及饲料利用的影响

研究表明, 饲料中添加适量的海藻(2.5%~10%)可提高鱼类生长、饲料利用和抗病力(Norambuena *et al.*, 2015; Wassef *et al.*, 2005)。本研究中, 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼的生长和饲料的利用均无显著影响, 大菱鲆幼鱼的成活率(SR)介于 97.5%~100%, 各组无显著差异。微藻组与鱼粉组 SR 相比没有显著降低, 这与各组之间成活率均较高有关。大菱鲆幼鱼增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和肥满度(CF)均无显著差异, 与郭斌等(2018)实验结果一致, 而日摄食率(DFI)与其研究结果不同, DFI 可能与其含有的诱食作用的物质含量有关, 例如, 海藻中常见的二甲基-β-丙酸噻亭(DMPT)(邹仕庚等, 2005), 可以增加摄食率, 因本研究中未对拟微绿球藻的诱食成分进行测定, 其与微藻渣的差异需进一步研究。与鱼粉组相比, 大菱鲆幼鱼饲料系数(FCR)无显著差异, 这与小球藻粉替代鲫鱼饲料中鱼粉的报道存在差异(石西等, 2015)。随着小球藻替代鲫鱼饲料中鱼粉比例增加, 饲料系数呈先下降后升高的趋势, 出现差异的原因可能是小球藻粉最低替代水平 21.8%远高于本研究拟微绿球藻粉最高替代水平 15.52%, 拟微绿球藻粉的添加量可能尚未到达引起饲料系数升高的拐点。与鱼粉组相比, 藻粉组大菱鲆幼鱼脏体比(VSI)无显著差异, 这与曹申平等(2016)螺旋藻对异育银鲫幼鱼的研究和 Miller 等(2007)对大西洋鲑鱼(*Salmost salar*)的研

究相符, 而与石西等(2015)小球藻在鲫鱼幼鱼中的研究结果不一致, 其原因可能与鱼的初末体重有关, 也可能与选用的是藻粉种类或替代量有关。

3.2 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼全鱼和肌肉体组成的影响

研究表明, 微藻替代鱼粉对鱼体组成产生一定影响, 但这些影响对鱼的营养价值影响比较小(Tibaldi *et al.*, 2015; Kissinger *et al.*, 2016)。本研究中, 大菱鲆幼鱼全鱼的水分、粗蛋白和粗灰分不受拟微绿球藻粉添加量的影响, 这与郭斌等(2018)、慈丽宁(2011)和张燕等(2017)研究结果一致, 说明添加适量的拟微绿球藻粉替代大菱鲆幼鱼饲料中鱼粉对其全鱼和肌肉蛋白质含量无显著影响。而大菱鲆全鱼和肌肉粗脂肪含量呈下降趋势, 这可能与拟微绿球藻粉中含有较多的 EPA 有关, EPA 可以抑制 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、乙酰羟化酶和苹果酸脱氢酶的活性, 使肝脏内脂肪合成能力减弱, 从而影响脂肪的合成(胡斌等, 2013)。此外, 微藻粉含有较多的色素类成分和纤维素(Ia 型)等非淀粉性多糖, 不能被鱼类充分吸收利用(Lubian *et al.*, 2002), 从而影响脂肪的沉积, 这一研究结果与星斑川鲈(*Platichthys stellatus*)幼鱼饲料中添加拟微绿球藻粉的实验结果一致(张燕等, 2017)。

3.3 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼血清非特异性免疫指标的影响

溶菌酶(LZM)通过溶解细菌的细胞壁来完成免疫反应, 是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分。本研究中, 藻粉组血清中 LZM 活力呈先上升后下降

的趋势,在 N_{7.76} 组达到最大值并显著高于对照组,这说明适量的拟微绿球藻粉可以提升鱼类溶菌酶免疫功能,而过量的会对鱼类溶菌酶免疫产生抑制作用。补体蛋白 C3 和补体蛋白 C4 是鱼类血清和组织液中一组经活化后具有酶活性的蛋白质,补体蛋白 C3 主要是由巨噬细胞、淋巴组织和骨髓等合成的 β 球蛋白,可以在补体蛋白 C3 裂解酶的作用下参与补体激活,补体蛋白 C4 也是补体经典激活途径的重要组分(慈丽宁,2011)。本研究补体蛋白 C3 活力呈先上升后下降趋势,在 N_{7.76} 组达到最大值并显著高于对照组,而补体蛋白 C4 活力呈先上升后下降的趋势,在 N_{11.64} 组达到最大值并显著高于对照组,原因是拟微绿球藻含有的藻多糖(PSP)可以与补体因子结合激活免疫系统,促进细胞的吞噬活性(Dalmo *et al*, 1996),这表明适量的拟微绿球藻粉可以提高大菱鲃幼鱼非特异性免疫能力。ALP 和 ACP 是鱼类非特异性免疫的重要指标,对鱼体抗病力和抗应激力起促进作用。本研究中,血清中 ALP 含量仅 N_{15.52} 组显著低于对照组,ACP 先上升后下降,在 N_{7.76} 组达到最大值并显著高于对照组。可能是拟微绿球藻中多糖和寡糖起到激活非特异性免疫的作用。

3.4 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲃幼鱼抗氧化指标的影响

总超氧化物歧化酶(T-SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等活性在一定程度上能够反映机体抵抗氧化应激的能力,当机体发生氧化损伤时,脂质过氧化物水平往往升高,抗氧化能力下降(梅琳等,2015)。本研究中,随着拟微绿球藻粉的替代比例增大,血清中 T-SOD、T-AOC 和 GSH-PX 活力呈先上升后下降的趋势,均在 N_{7.76} 组达到最大值,并显著高于对照组。说明拟微绿球藻粉替代鱼粉的水平为 7.76% 时,大菱鲃的抗氧化能力达到最大值。随着替代量的增加,对机体可能存在损伤,说明适量的拟微绿球藻粉的添加有利于大菱鲃幼鱼抗氧化能力的提高,过多不利于大菱鲃幼鱼的生长。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化作用的最终分解产物,其含量可以反映大菱鲃幼鱼遭受胁迫伤害的程度(Martínez-Álvarez *et al*, 2005; Jain *et al*, 2001),藻粉组血清中 MDA 含量呈逐渐下降的趋势,并显著低于对照组,说明适量的拟微绿球藻粉的添加有利于大菱鲃幼鱼的抗胁迫能力。

3.5 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲃幼鱼血脂指标的影响

本研究中,拟微绿球藻粉的添加显著影响大菱鲃

幼鱼的血脂水平。随着拟微绿球藻粉替代比例增加,藻粉组 TCHO 呈逐渐下降趋势,而 TG 呈先下降后上升的趋势,在 N_{7.76} 组显著低于对照组,造成血脂水平降低的原因可能是拟微绿球藻粉含有大量的高不饱和脂肪酸和类胡萝卜素,特别是 EPA 含量占总脂肪含量的 35% (魏东等,2000),具有抗血栓和调节血脂的作用,其次含有较多亚油酸和亚麻酸,这 2 种高不饱和脂肪酸是线粒体膜磷脂和细胞膜重要组成成分,可以减少胆固醇和甘油三酯在肝脏和脂肪中的沉淀和堆积(Werman *et al*, 2003),有降脂的作用(Abdel *et al*, 2009)。血清中 LDL-C 含量增加可以使更多的 TCHO 和 TG 转运到血液,而 HDL-C 可以使更多的 TCHO 转运到肝脏,LDL-C 和 HDL-C 影响血清中的 TCHO 和 TG 的含量(曹林等,2017)。本研究中 LDL-C 呈下降趋势, HDL-C 呈先上升后下降趋势, LDL-C/HDL-C 显著低于对照组,各藻粉组间无显著差异。说明饲料中添加适量拟微绿球藻对降低低密度脂蛋白含量,增加高密度脂蛋白含量有一定作用,同时能显著降低低密度脂蛋白与高密度脂蛋白的比值,有利于大菱鲃的血脂健康。

3.6 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲃幼鱼血清代谢指标的影响

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是反映肝功能的指标,AST 主要存在肝细胞线粒体内,当肝脏发生严重坏死和破损时,才会导致血清中 AST 偏高(魏佳丽等,2016)。本研究中,AST 呈先下降后上升的趋势,原因是拟微绿球藻粉含有亚油酸和亚麻酸,可以防止胆固醇和甘油三酯在肝脏中的堆积,一定替代范围内可以保护肝脏等组织的正常生理功能不受损伤,但随着添加量的增加,这种保护作用会呈下降趋势甚至过多的添加可能造成损伤。ALT 主要存在于肝细胞中,血清中含量很低,只有当细胞大量坏死或者细胞膜的通透性增强时含量会增加(Chen *et al*, 2003)。本实验中 ALT 呈下降趋势,说明添加一定量的拟微绿球藻粉可能维持了肝细胞膜对 ALT 的稳定性。

4 结论

综上所述,在本实验条件下,用拟微绿球藻粉替代 15.52% 以内鱼粉对大菱鲃幼鱼的生长性能无显著影响,同时可以降低脂肪在鱼体内的沉积;添加 7.76% 的拟微绿球藻粉替代鱼粉能够显著提高大菱鲃幼鱼的免疫性能和抗氧化能力,同时保护其营养价值。

参 考 文 献

- Abdel TM, Ahmad MH. Live spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 2010, 40(9): 1037–1046
- Cao L, Zhang TT, Xu HG, *et al.* Effects of different protein hydrolysates in high plant protein diets on the lipid accumulation of Juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(03): 89–98 [曹林, 张婷婷, 徐后国, 等. 饲料中不同水解蛋白对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼鱼体及组织脂肪含量的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 89–98]
- Cao SP, Han D, Xie SQ, *et al.* Effects of dietary replacement fish meal protein with *Spirulina platensis* powder protein on feed intake, growth performance, feed utilization and protein deposition in Juvenile Gibel Carp (*Carassis auratus gibelio var. Cas*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 647–654 [曹申平, 韩冬, 解绶启, 等. 螺旋藻粉替代饲料中鱼粉对异育银鲫幼鱼生长、饲料利用和蛋白沉积的影响. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 647–654]
- Chen C, Chen JH. Effects of taurine and compound crystalline amino acid on feed intake, growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(23): 108–112 [陈超, 陈京华. 牛磺酸、晶体氨基酸对大菱鲆摄食、生长和饲料利用率的影响. *中国农学通报*, 2012, 28(23): 108–112]
- Chen JY, Chen JC, Wu JL. Molecular cloning and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 136(1): 117–130
- Ci LN. Effect of the diets replacing different proportions of fish meal with algae powder on the growth performance, nutrients digestibility and immunity of bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*). Magte's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2011 [慈丽宁. 藻粉替代鱼粉对团头鲂生产性能、营养成分、消化机能和免疫的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Dallaire V, Lessard P, Vandenberg G, *et al.* Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1433–1439
- Dalmo RA, Bogwald J, Ingebrigtsen K, *et al.* The immunomodulatory effect of laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. anterior kidney leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. *Journal of Fish Diseases*, 1996, 19(6): 449–457
- Day OJ, Hgg G. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 6(4): 221–228
- Du T, Huang Y, Luo J. Effects of rotifer enriched with alga *Spirulina platensis* intensively on artificial breeding of three fish species. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2010, 25(2): 158–161 [杜涛, 黄洋, 罗杰. 酵母轮虫和以小藻、螺旋藻强化的轮虫对 3 种仔鱼人工育苗效果的影响. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(2): 158–161]
- Emma T, Schrama JW, Gruppen H, *et al.* Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 2017, 479: 490–500
- Guo B, Liang MQ, Xu HG, *et al.* Effects of gracilaria verrucosa, enteromorpha prolifera, algae residue and fungi residue on growth performance, serum and liver biochemical indices, body composition and intestinal histological morphology of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(1): 299–312 [郭斌, 梁萌青, 徐后国, 等. 江蓠、浒苔、藻渣和菌渣替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标、体组成和肠道组织结构的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(1): 299–312]
- Hu B, Song LP, Yan JR, *et al.* Research advance on marine microalgae eicosapentaenoic acid. *Hebei Fisheries*, 2013, 43(4): 43–47 [胡斌, 宋理平, 闫家仁, 等. 海洋微藻源二十碳五烯酸的研究进展. *河北渔业*, 2013, 43(4): 43–47]
- Jain SK, Lim G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na^+ , K^+)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 30(3): 232–237
- Kissinger KR, Garcia OA, Trushenski JT. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for long fin yellow tail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture*, 2016(452): 37–44
- Krisetherton PM, Grieger JA, Etherton TD. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2009, 81(2): 99–104
- Lubian LM, Montero O, Moreno-Garrido I, *et al.* *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(3–5): 249–255
- Marques A, Thanh TH, Sorgeloos P, *et al.* Use of micro-algae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia*, against different pathogens. *Aquaculture*, 2006, 258(1–4): 116–126
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 2005, 15(1–2): 75–88
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fish meal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. *渔业科学进展*,

- 2015, 36(3): 85–92]
- Miller MR, Nichols PD, Carter CG. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium*, sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*, L) diets. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(2): 382–392
- Norambuena F, Hermon K, Skrzypczyk V, *et al.* Algae in Fish Feed: Performances and fatty acid metabolism in Juvenile *Atlantic salmon*. *PLoS One*, 2015, 10(4): 1–17
- Olsen RL, Hasan MR. A limited supply of fish meal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27(2): 120–128
- Olivera-Novoa MA, Domínguez-Cen LJ, Olivera-Castillo L, *et al.* Effect of the use of the microalgae *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*, 1998, 29(10): 709–715
- Rana KJ, Siriwardena S, Hasan MR. Impact of rising feed ingredient prices on aqua feeds and aquaculture production. *FAO, Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, Rome: FAO. 2009, 541: 63–64
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 1999, 180(1–2): 99–117
- Shi X, Luo Z, Huang C, *et al.* Effect of Substituting *Chlorella sp.* for regular fish meal on growth, body composition, hepatic lipid metabolism and histology in crucian carp *Carassius auratus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 498–506 [石西, 罗智, 黄超, 等. 小球藻替代鱼粉对鲫生长、体组成、肝脏脂肪代谢及其组织学的影响. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 498–506]
- Tibaldi E, ChiniZittelli G, Parisi G, *et al.* Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis sp.* (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 2015(440): 60–68
- Thompson KR, Velasquez A, Patterson JT, *et al.* Evaluation of plant and animal protein sources as partial or total replacement of fish meal in diets for Nile tilapia fry and juvenile stages. *North American Journal of Aquaculture*, 2012, 74(3): 365–375
- Wassef EA, El-Sayed A FM, Kandeel KM, *et al.* Evaluation of *Pterocladia* (*Rhodophyta*) and *Ulva* (*Chlorophyta*) meals as additives to gilthead sea bream *Sparus aurata* diets. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2005(31): 321–332
- Wei D, Zhang XC, Sui ZH, *et al.* Effects of nitrogen sources and N/P ration on cell growth, total lipid content and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Marine Sciences*, 2000, 24(7): 46–51 [魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响. *海洋科学*, 2000, 24(7): 46–51]
- Werman MJ, Sukenik A, Mokady S. Effects of the marine unicellular alga *Nannochloropsis sp.* to reduce the plasma and liver *Cholesterol* levels in male rats fed on diets with cholesterol. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2003, 67(10): 2266–2268
- Wei KL, Wang JY, Song ZD, *et al.* Effects of partial substitute for fish meal by hydrolyzed kill meal on the growth performance, the body composition and the serum biochemical parameters of juvenile pearl gentian grouper. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 100–110 [魏佳丽, 王际英, 宋志东, 等. 酶解磷虾粉替代鱼粉对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、体组成及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 100–110]
- Wu JL, Zhou B, Ma MY, *et al.* Research progress on micro-algae pigment. *Food Science*, 2010, 31(23): 395–400 [吴吉林, 周波, 麻明友, 等. 微藻色素的研究进展. *食品科学*, 2010, 31(23): 395–400]
- Yamaguchi K. Recent advances in micro-algal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review. *Journal of Applied Phycology*, 1996, 8(6): 487–502
- Yu Y, Chen BL. Progress of the studies on *Nannochloropsis*. *Marine Science Bulletin*, 2005, 24(6): 75–81 [余颖, 陈必链. 微绿球藻的研究进展. *海洋通报*, 2005, 24(6): 75–81]
- Zhang Y, Qiao HJ, Li BS, *et al.* Effects of replacement of fish oil by micro-algae meals on growth performance, tissue proximate composition and biochemical indices of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1223–1233 [张燕, 乔洪金, 李宝山, 等. 微藻粉替代鱼油对星斑川鲷幼鱼生长、体组成和生理指标的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1223–1233]
- Zou SG, TAo ZG, Xu Y. Application of DMPT in aquatic animal nutrition. *Guangdong Feed*, 2005, 14(3): 34–35 [邹仕庚, 陶正国, 许毅. DMPT 在水产动物营养中的应用. *广东饲料*, 2005, 14(3): 34–35]

Effects of Replacement of Dietary Fish Meal by *Nannochloropsis* sp. Meal on Growth Performance, Body Composition, and Serum Biochemical Indices of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

HU Dongxue^{1,2}, MA Ji^{1,2}, WANG Chengqiang², QIAO Hongjin^{2①}, WANG Jiyong², LI Baoshan², SUN Yongzhi²

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

Abstract A 70-day trial was conducted to investigate the effect of replacement of dietary fish meal by *Nannochloropsis* sp. meal on growth performance, body composition, and serum biochemical indices of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. with an initial weight body weight of (24.60±0.02) g. Five isonitrogenous and isoenergetic diets (N₀, N_{3.88}, N_{7.76}, N_{11.64}, and N_{15.52}) were formulated with 0%, 3.88%, 7.76%, 11.64%, and 15.52% fish meal replaced by *Nannochloropsis* sp. meal, respectively. Each diet was randomly fed to three replicates of fish, with 40 fish per replicate. The following results were obtained. 1) There were no significant differences ($P>0.05$) in weight growth rate, specific growth rate, protein efficiency ratio, feed coefficient ratio, feed intake, condition factor, and survival rate among the groups. 2) As the meal content of *Nannochloropsis* sp. increased, the crude lipid content in the whole body and muscle was significantly decreased ($P<0.05$); however the crude protein, crude ash, and moisture content were not significantly different ($P>0.05$). 3) Lysozyme, complement protein C3, complement protein C4, and acid phosphatase activities showed a rising trend followed by a decline, with the highest point reached in the N_{7.76}, N_{7.76}, N_{11.64}, and N_{7.76} groups, respectively, and were significantly higher than that in the N₀ group ($P<0.05$). The alkaline phosphatase activity of the N_{15.52} group was significantly lower than that the other groups and there were no significant differences among other groups ($P>0.05$). 4) The total superoxide dismutase, total antioxidant capacity, and glutathione peroxidase activities in the serum of the algae meal groups first increased and then decreased, and reached a maximum in the N_{7.76} group, which was significantly higher than that in the N₀ group ($P<0.05$). 5) The triglyceride content in the serum of the N_{7.76} group was significantly lower than that in the other groups ($P<0.05$), and there were no significant differences among the other groups ($P>0.05$). The total cholesterol content of the algae meal groups was significantly lower than in the N₀ group ($P<0.05$), but there were no significant differences among the algae meal groups. 6) The aspartate aminotransferase activity in the serum of the algae meal groups followed a decreasing to increasing trend, reaching the lowest point in the N_{11.64} group and was significantly lower than that in the N₀ group ($P<0.05$). The alanine aminotransferase activity of the algae meal groups was significantly lower than that in the N₀ group ($P<0.05$). In conclusion, under the experimental conditions tested, *Nannochloropsis* sp. meal could replace 15.52% of fish meal in juvenile turbot feed without any effects on the growth performance, and the replacement of 7.76% fish meal significantly improved the nonspecific immunity and reduced the blood lipid levels in juvenile turbot.

Key words Juvenile turbot; *Nannochloropsis* sp. meal; Growth performance; Antioxidant activity

① Corresponding author: QIAO Hongjin, E-mail: hongjinqiao@hotmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180522001

http://www.yykxjz.cn/

饶远, 向泉, 黄先智, 段彪. 蚕粉替代鱼粉对加州鲈幼鱼生长、饲料利用及体成分的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 31–38
Rao Y, Xiang X, Huang XZ, Duan B. Effects of replacement of fish meal with silkworm powder on growth performance, feed intake, and body composition of juvenile black bass (*Micropterus salmonides*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 31–38

蚕粉替代鱼粉对加州鲈幼鱼生长、 饲料利用及体成分的影响*



饶 远¹ 向 泉¹ 黄先智² 段 彪^{1①}

(1. 西南大学动物科学学院 重庆 402460; 2. 家蚕基因组生物学国家重点实验室 重庆 400716)

摘要 本研究评价了蚕粉对加州鲈(*Micropterus salmonides*)幼鱼生长、饲料利用率和体成分的影响。选用初始均体重为(3.13±0.04) g的加州鲈540尾,随机分成6个实验组,每组3个重复,每个重复30尾实验鱼,分别以蚕粉替代0(对照组)、10%、20%、30%、40%和50%的鱼粉设计出6种等氮、等能的饲料配方,按照配方配制实验饲料。由于后期养殖气温下降,不适合继续进行实验,本养殖时间为45 d。结果显示,加州鲈的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)及蛋白质效率(PER)均随蚕粉替代水平的升高呈先上升后下降的变化趋势,且其WGR、SGR和PER均在蚕粉替代水平为30%时达到最大(分别为227.87%、1.98%/d和164.55%)($P<0.05$);饲料系数(FCR)则随蚕粉替代水平的升高呈先降后升的变化趋势,且在蚕粉替代水平为30%时达到最低(为1.43)($P<0.05$);肥满度(CF)、肝体比(HSI)、脏体比(VSI)则随蚕粉替代水平的升高而呈先上升后下降并趋于稳定的趋势($P<0.05$);实验期间各组实验鱼的成活率(SR)差异不显著($P>0.05$)。通过二次回归分析可知,加州鲈幼鱼WGR、SGR、FCR及PER最优时饲料的蚕粉替代比例分别为19.90%、22.00%、18.11%和17.90%;加州鲈全鱼粗脂肪含量随蚕粉替代水平的升高呈先降低后升高的变化趋势($P<0.05$),粗蛋白含量随蚕粉替代水平的升高无明显变化($P>0.05$),水分除蚕粉替代水平为10%和40%组差异显著外($P<0.05$),其余各实验组差异不显著($P>0.05$),蚕粉替代水平大于20%时,全鱼灰分显著降低($P<0.05$)。在本实验条件下,综合考虑实验鱼的生长指标、饲料利用和体成分,饲料中蚕粉适宜的替代水平为17.90%~22.00%。

关键词 加州鲈;蚕粉;生长性能;体成分

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0031-08

鱼粉一直被作为水产饲料的重要蛋白源,因其蛋白质含量高,氨基酸组成平衡及抗营养因子少而被广泛应用。近年来,由于海洋渔业资源的减少和水产养殖的快速发展,导致鱼粉的供应量锐减,而需求量猛增,鱼粉价格飙升,使得养殖成本明显增加,给饲料生产企业和养殖业带来了巨大压力和挑战(李晓丽等,2017)。因此,寻求新的鱼粉替代物已经成为水产养

殖业专注的热点问题。蚕粉是饲养家蚕到4龄期时,将全蚕低温干燥粉碎获得,其蛋白质、脂肪含量高,必需氨基酸含量丰富,氨基酸比例均衡(桂仲争等,2004),是一种优质的动物蛋白源。魏艳洁等(2013)研究表明,在花生粕、玉米蛋白粉、豆粕和谷朊粉等4种植物蛋白中添加5%的蚕粉替代40%的鱼粉可显著提高大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的特定生长率

* 公益性行业科研专项(201303053)和现代农业产业技术体系(CARS-18)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research of Public Welfare Profession(201303053), and China Agriculture Research System(CARS-18)]. 饶 远, E-mail: atraoyuan@163.com

① 通讯作者: 段 彪, 副教授, E-mail: d-biao@126.com

收稿日期: 2018-05-22, 收修改稿日期: 2018-07-22

和摄食率；饲料中添加 1 g/kg 的全蚕粉，饲养 21 d 后鹌鹑体增重增加 11.12%，饲料利用率显著提高(桂钟争等, 2002)。蚕蛹粉是蚕蛹经过干燥、粉碎后的产物，其营养组成与蚕粉相近，都是优质蛋白源。Begum 等(1994)发现，用蚕蛹粉和蚌肉粉的混合物替代 50% 的鱼粉养殖南亚野鲮(*Labeo rohita*)的饲料效率最高。Rangacharyulu 等(2003)报道，用发酵蚕蛹和天然蚕蛹完全替代鱼粉池塘混养麦瑞加拉鲮(*Cirrhinus mrigala*)、喀拉鲃(*Catla catla*)、南亚野鲮，发酵蚕蛹组实验鱼的生长速度和 FCR 显著优于鱼粉组和天然蚕蛹组，而天然蚕蛹组和鱼粉组间的差异不显著；刘丹丹(2009)发现，黄鳢(*Monopterus albus*)对蚕蛹粗蛋白质的离体消化率显著高于鱼粉；梅琳等(2015)发现 15% 蛹肽蛋白替代大菱鲆幼鱼饲料中 15% 的鱼粉不影响其生长、饲料利用，且对大菱鲆的非特异免疫具有促进作用。梁丹妮等(2011)报道，建鲤(*Cyprinus carpio var. Jian*)对蚕粉粗蛋白和粗脂肪的表观消化率分别为 78.76% 和 88.04%；说明蚕粉可以部分替代鱼类饲料中鱼粉，但如添加水平过高时将引起鱼类生长下降，肌肉色泽改变及肝组织等的损伤(杨吉园等, 2009)。

加州鲈(*Micropterus salmonides*)，属鲈形目、太阳鱼科、黑鲈属。原产美国密西西比河，20 世纪 80 年代引入我国，是一种肉质鲜美、抗病力强、生长迅速的名贵肉食性鱼类，在我国广东、江苏、浙江和四川等地已有大面积的养殖(黄太寿等, 2017)。目前对加州鲈肌肉营养价值评价(陈佳毅等, 2007)、人工繁育(陈建酬等, 2001)等方面都有一定的研究，但有关蚕粉在鱼类养殖中的应用还鲜有报道。本研究拟通过用蚕粉替代不同比例鱼粉对加州鲈生长性能、机体营养成分和血液生化指标等影响的研究，旨在探讨蚕粉在加州鲈饲料中替代一定比例鱼粉的可行性和适宜比例，为筛选饲料蛋白原料及优化加州鲈的人工饲料配方提供理论基础和数据支持。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验用加州鲈为重庆荣昌植物园渔场的同一批鱼苗。平均体重为 (3.06±0.25) g，体长为 (6.44±0.81) cm。选择体质健壮 的鱼种 600 尾，用 3% 的食盐水消毒后暂养备用。

1.2 实验饲料

实验饲料以鱼粉和蚕粉为蛋白源，混合油(大豆油：花生油=1：1)为脂肪源，配制 6 种等氮(蛋白水

平为 42.48%)、等能(能量为 20.17 kJ/g)的实验饲料。以蚕粉蛋白分别替代 0(对照组)、10%、20%、30%、40% 和 50% 的鱼粉蛋白，每种饲料 3 个重复，饲料原料全过 60 目筛，各组饲料逐级混合均匀，加水拌匀，用 QRLS-150 型电动绞肉机制成粒径 2 mm 颗粒饲料，25℃ 风干后置于 -20℃ 冰箱内储存备用。实验饲料组成及营养成分见表 1。实验所用蚕粉为家蚕基因组生物学国家重点实验室提供，其营养组成及水平见表 2。

表 1 实验饲料的组成及营养水平(风干基础, %)

Tab.1 Composition and nutrient levels of experimental diets (Air-dry basis, %)

原料 Ingredients	蚕粉替代鱼粉的比例 Replacement ratio of fish meal by silkworm powder					
替代水平 Replacement level	0.00	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
鱼粉 Fish meal	40.00	36.00	32.00	28.00	24.00	20.00
蚕粉 Silkworm powder	0.00	4.00	8.00	12.00	16.00	20.00
豆粕 Soybean meal	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
菜粕 Rapeseed meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
混合油 Mixed oils ¹	8.00	7.20	6.30	5.50	4.70	3.90
次粉 Wheat middling	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	7.00	7.80	8.70	9.50	10.30	11.10
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₃	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
预混料 Premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
营养水平 Nutrient levels ³						
水分 Moisture	10.29	10.32	10.46	10.21	10.18	10.34
粗蛋白 Crude protein	42.85	42.41	42.18	42.43	42.42	42.58
粗脂肪 Lipid	12.47	12.58	12.46	12.52	12.40	12.32
总能 GE(kJ/g)	20.32	20.25	19.86	20.19	19.97	20.41

注：1. 混合油为 1：1 鱼油和豆油；2. 预混料为每 kg 饲料提供的微量元素和维生素：钾 28.0 mg，钙 282.0 mg，镁 9.0 mg，锌 3.5 mg，铁 24.0 mg，铜 1.8 mg，碘 0.25 mg，硒 0.02 mg，维生素 A 8 000 IU，维生素 C 200 mg，维生素 D 900 IU，维生素 E 60 mg，维生素 K 5 mg，维生素 B₁ 15 mg，尼克酸 100 mg，泛酸钙 40 mg，维生素 B₆ 20 mg，维生素 B₁₂ 5 mg，肌醇 100 mg；3. 营养成分为实测值

Note: 1. 1：1 mixture of fish oil and soybean oil; 2. The premix provides mineral and vitamin for a kilogram of diets: K 28.0 mg, Ca 282.0 mg, Mg 9.0 mg, Zn 3.5 mg, Fe 24.0 mg, Cu 1.8 mg, I 0.25 mg, Se 0.02 mg, V_A 8 000 IU, V_C 200 mg, V_D 900 IU, V_E 60 mg, V_K 5mg, V_{B1} 15 mg, nicotinic acid 100 mg, Pantothenate acid 40mg, V_{B6} 20 mg, V_{B12} 5 mg, inositol 100 mg; 3. The feed nutrient content were measured

表2 实验全蚕粉的组成及营养水平(风干基础, %)
Tab.2 Composition and nutrient levels of
silkworm powder (Air-dry basis, %)

项目 Items	含量 Content
常规成分 Routine ingredient	
水分 Moisture	8.80
粗蛋白 Crude protein	64.10
粗灰分 Ash	9.98
粗脂肪 Crude lipid	11.01
粗纤维 Crude fiber	9.23
消化率 Digestibility	86.68
氨基酸 AA	
天冬氨酸 Asp	4.06
苏氨酸 Thr	2.11
丝氨酸 Ser	2.64
谷氨酸 Glu	6.82
脯氨酸 Pro	2.23
甘氨酸 Gly	4.64
丙氨酸 Ala	4.02
胱氨酸 Cys	0.65
缬氨酸 Val	2.73
蛋氨酸 Met	0.94
异亮氨酸 Ile	2.17
亮氨酸 Leu	3.12
酪氨酸 Tyr	2.69
苯丙氨酸 Phe	2.06
组氨酸 His	1.36
赖氨酸 Lys	3.12
精氨酸 Arg	2.42
色氨酸 Trp	0.46
氨基酸总量 TAA	48.24

1.3 实验设计

实验鱼暂养7 d后, 选择健康无伤病的加州鲈540尾随机投入18个水族箱(规格为1.0 m×1.0 m×1.0 m), 分为6个实验组, 每组设3个重复, 每个重复30尾实验鱼。分别投喂用蚕粉替代0、10%、20%、30%、40%和50%鱼粉的实验饲料, 每天按3%~5%的投饵率表观饱食投喂3次(08:00、12:30和17:00), 养殖时间共45 d。养殖池保持微流水, 各养各实验池水每天的交换量为30%。每日监测水温, 溶解氧, 验鱼的摄食行为和死亡数量等。实验期间水温为25~30℃, 水体pH为7.0~7.5, 透明度为50 cm以上, 溶氧为5.5 mg/L以上。

1.4 样品采集

实验开始时, 测定实验鱼的初始体长和体重, 实验结束后对实验鱼饥饿24 h, 然后对每个重复组进行

计数、称重。分别在各实验组中随机取12尾实验鱼用MS-222溶液麻醉, 其中7尾实验鱼分别测定体长和体重。3尾鱼用于测定体重和体长, 并于冰盘解剖后取出内脏团及肝胰脏并称量, 其余2尾用于其全鱼常规营养成分的测定。

1.5 指标测定与方法

饲料原料及实验鱼体样本均在105℃烘干至恒重, 然后进行生化测定, 全鱼的粗蛋白质的测定采用凯氏定氮法, 粗脂肪的测定采用索氏提取法, 粗灰分的测定采用550℃灼烧法(贺建华, 2005)。

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

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=($\ln W_t - \ln W_o$)×100/ t

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER, %)=($W_t - W_o$)100/ $F \times P$

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

成活率(Survival rate, SR, %)=100×($N_t - N_o$)/ N_o

肝体比(Hepatopancreas somatic index, HSI, %)=100× W_k/W

脏体比(Viscera somatic index, VSI, %)=100× W_v/W

肥满度(Condition factor, CF)=100× W_t/L_t^3

式中, W_o 为实验开始时鱼体重(g); W_t 为实验结束时鱼体重(g); N_o 为实验开始时鱼的尾数; N_t 为实验结束时鱼的尾数; F 为饲料摄入量(g); P 为饲料粗蛋白质含量(%); t 为养殖实验天数(d); L_t 为实验结束时鱼的体长(cm); W 为鱼体重(g); W_k 为鱼体肝胰脏质量(g); W_v 为鱼体内脏团重(g)。

1.6 数据处理

采用SPSS 17.0软件对数据统计分析。先对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 若组间差异显著, 再用Duncan's氏法进行多重比较, 显著水平以 $P < 0.05$ 计。以二次多项式来拟合WGR、SGR、PER和FCR与蚕粉替代鱼粉比例间的相关关系。实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 蚕粉替代鱼粉对加州鲈生长及饲料利用率的影响

由表3可知, 实验加州鲈的WGR、SGR及PER均随蚕粉的替代水平的升高呈先上升后下降的变化趋势。且其WGR、SGR和PER均在蚕粉替代水平为30%时达到最大(分别为227.87%、1.98%/d和164.55%), WGR、SGR与蚕粉替代水平为30%、50%

的实验组差异显著($P<0.05$); PER 则与其余各实验组差异显著($P<0.05$); 加州鲈的 FCR 则随蚕粉的替代水平的升高呈先降后升的变化趋势, 且在蚕粉替代水平为 30% 达到最低(为 1.43), 除与蚕粉替代水平为 10%、20% 的实验组差异不显著外($P>0.05$), 与其余各实验组差异显著($P<0.05$); 实验鱼的 CF、HSI 和 VSI 则随蚕粉的替代水平的升高而呈先上升后下降并趋于稳定的趋势, 实验期间各实验组加州鲈的 SR 差异不显著($P>0.05$)。

以二次多项式来拟合 WGR、SGR、PER、FCR 与蚕粉替代比例间的相关关系(图 1~图 4)。以抛物

线回归可知, 加州鲈 WGR、SGR、PER 的回归方程分别为: $Y=-0.0599X^2+2.3835X+192.84$ ($R^2=0.7152$); $Y=-0.0003X^2+0.0132X+1.7906$ ($R^2=0.7383$); $Y=-0.0441X^2+1.5972X+135.72$ ($R^2=0.5647$)。则在抛物线的最高点分别获得加州鲈 WGR、SGR 和 PER 的最大值, 此时对应的蚕粉替代比例分别为 19.90%、22.00% 和 18.11%。FCR 的回归方程为: $Y=0.0005X^2-0.0179X+1.7276$ ($R^2=0.6084$), 则 PCR 最小时蚕粉替代比例应为 17.90%。因此, 满足加州鲈的 WGR、SGR、PER 最大, PCR 最小时的蚕粉替代比例应为 17.90%~22.00%。

表 3 蚕粉替代鱼粉对加州鲈生长性能及饲料利用率的影响
Tab.3 Effects of replacement of fish meal with silkworm powder meal on growth performance and feed utilization of *M. salmonides*

项目 Items	蚕粉替代鱼粉的比例 Replacement ratio of fish meal by silkworm powder (%)					
	0	10	20	30	40	50
初始体重 Initial weight (g)	3.16±0.04	3.15±0.03	3.14±0.04	3.17±0.05	3.20±0.03	3.17±0.04
终末体重 Final weight (g)	9.48±0.31 ^{bc}	9.31±0.41 ^b	10.01±0.34 ^{cd}	10.40±0.76 ^d	8.91±0.39 ^{ab}	8.40±0.34 ^a
增重率 WGR(%)	199.57±8.76 ^{bc}	195.51±11.01 ^{bc}	218.68±9.65 ^{cd}	227.87±12.17 ^d	178.20±9.55 ^{ab}	165.33±8.31 ^a
特定生长率 SGR(%/d)	1.83±0.05 ^{bc}	1.81±0.06 ^{bc}	1.93±0.05 ^{cd}	1.98±0.11 ^d	1.70±0.06 ^{ab}	1.63±0.06 ^a
蛋白质效率 PER(%)	140.21±8.74 ^{bc}	135.84±2.94 ^b	151.03±10.14 ^c	164.55±8.73 ^d	107.92±3.97 ^a	111.58±5.54 ^a
饲料系数 FCR	1.68±0.11 ^{bc}	1.73±0.03 ^c	1.56±0.11 ^{ab}	1.43±0.08 ^a	2.18±0.08 ^d	2.11±0.11 ^d
肥满度 CF	2.62±0.10 ^{ab}	2.58±0.04 ^{ab}	2.44±0.21 ^a	2.51±0.03 ^{ab}	2.67±0.05 ^b	2.59±0.04 ^{ab}
肝体比 HSI(%)	1.22±0.08 ^{ab}	1.29±0.04 ^{ab}	1.31±0.04 ^b	1.19±0.07 ^a	1.26±0.04 ^{ab}	1.25±0.07 ^{ab}
脏体比 VSI(%)	6.54±0.14 ^{bc}	6.44±0.11 ^{ab}	6.67±0.12 ^c	6.29±0.09 ^a	6.36±0.11 ^{ab}	6.38±0.16 ^{ab}
成活率 SR(%)	98.38±0.58	99.02±1.52	98.61±1.21	98.29±1.67	98.33±1.19	98.45±1.05

注: 表格中所给数据为平均数及 3 个重复的标准差。同行肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Note: Values are means and standard deviation of three replicates. In the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ($P>0.05$), different small letter superscripts mean significant differences ($P<0.05$), the same as below

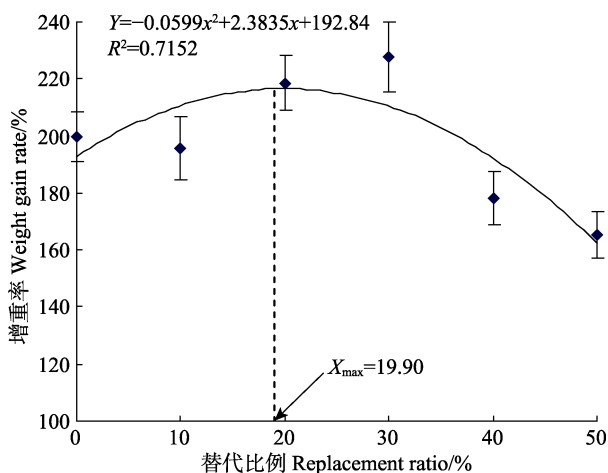


图 1 加州鲈 WGR 与蚕粉替代比例的关系

Fig.1 The relationship between weight gain rate and silkworm powder replacement ratio of *M. salmonides*

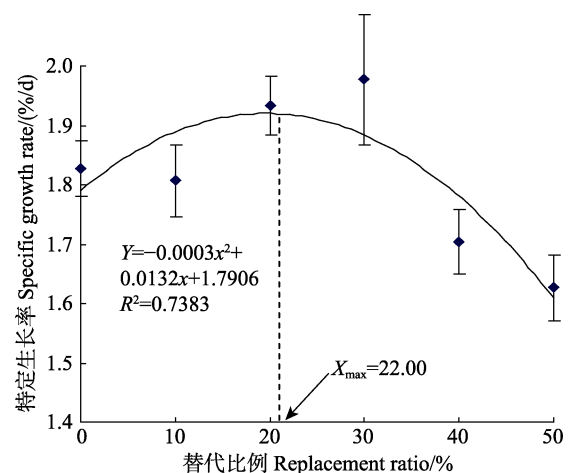


图 2 加州鲈 SGR 与与蚕粉替代比例的关系

Fig.2 The relationship between specific growth rate and silkworm powder replacement ratio of *M. salmonides*

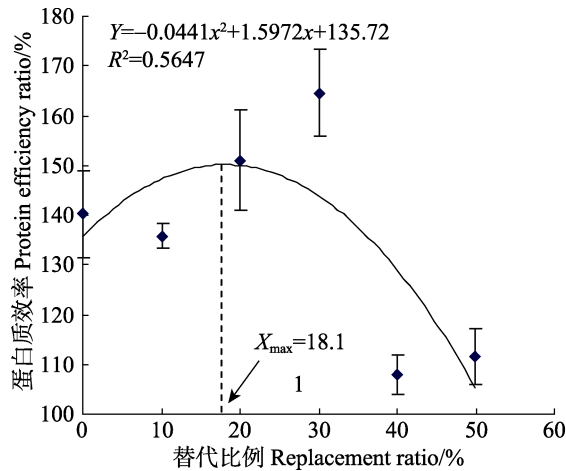


图3 加州鲈蛋白效率与蚕粉替代比例的关系

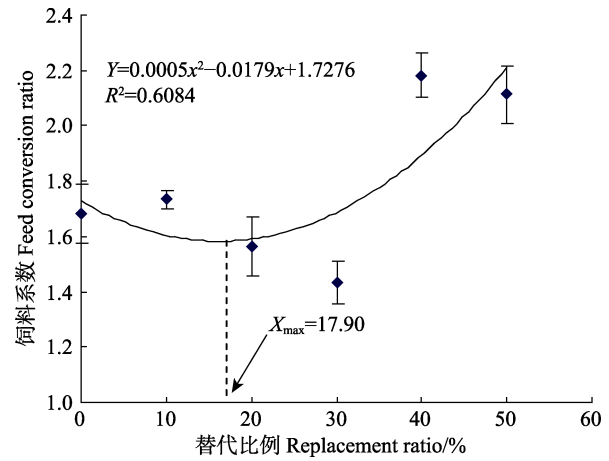
Fig.3 The relationship between protein efficiency ratio and silkworm powder replacement ratio of *M. salmonides*

图4 加州鲈饵料系数与蚕粉替代比例的关系

Fig.4 The relationship between feed conversion ratio and silkworm powder replacement ratio of *M. salmonides*

2.2 蚕粉替代鱼粉对加州鲈体组成的影响

由表4可知,加州鲈全鱼粗脂肪含量随蚕粉替代水平的升高而呈先降低后升高的变化趋势,在蚕粉替代水平为20%时最低,除与10%差异不显著外($P>0.05$),显著低于其余各实验组($P<0.05$);实验鱼全鱼

粗蛋白含量随蚕粉替代水平的升高无明显变化($P>0.05$);各实验组全鱼水分除蚕粉替代水平为10%和40%组差异显著外($P<0.05$),其余各实验组差异不显著($P>0.05$)。蚕粉替代水平为0~10%时,全鱼灰分差异不显著($P>0.05$),蚕粉替代水平大于20%时,各实验组的灰分含量差异不显著($P>0.05$)。

表4 蚕粉代替鱼粉对加州鲈体成分的影响(以湿重计,%)

Tab.4 Effects of replacement of fish meal with silkworm powder meal on body composition of *M. salmoides* (Wet weight, %)

项目 Items	蚕粉替代鱼粉的比例 Replacement ratio of fish meal with silkworm powder meal (%)						
	0	10	20	30	40	50	
水分 Moisture	75.35±0.43 ^{ab}	75.22±0.17 ^a	75.63±0.41 ^{ab}	75.41±0.34 ^{ab}	75.83±0.03 ^b	75.36±0.20 ^{ab}	
粗脂肪 Crude lipid	5.44±0.04 ^b	5.38±0.08 ^{ab}	5.28±0.10 ^a	5.56±0.05 ^c	5.66±0.04 ^{cd}	5.73±0.04 ^d	
粗蛋白质 Crude protein	16.53±0.42	16.46±0.80	17.10±0.62	16.62±0.61	16.61±0.89	17.26±0.30	
灰分 Ash	2.73±0.02 ^c	2.63±0.03 ^{bc}	2.47±0.08 ^a	2.46±0.14 ^a	2.37±0.06 ^a	2.51±0.06 ^{ab}	

3 讨论

3.1 蚕粉替代鱼粉对加州鲈生长及饲料利用率的影响

蚕粉是一种营养价值较高的动物蛋白资源,具有较高的开发利用价值。刘丹丹(2009)研究发现,随着饲料中蚕蛹添加量的上升,黄鳝肝脏、胃及前肠中蛋白酶活性有升高的趋势,饲料中用蚕蛹替代30%以下的鱼粉时,黄鳝的生长无明显差异,说明在黄鳝饲料中蚕蛹可以完全或者部分替代鱼粉。吉红等(2012)认为,框鳞镜鲤(*Cyprinus carpio* var. *specularis*)幼鱼饲料中蚕蛹替代50%以下的鱼粉蛋白时,其WGR、SGR、FCR等无显著性差异;Nandeesh等(2000)报道,在鲤(*Cyprinus carpio*)饲料中蚕蛹添加量达到50%

而不影响其生长速度及饲料效率,且在饲料蛋白沉积率在一定范围内随蚕蛹添加量的增大而提高;陈国定等(1992)报道,采用蚕蛹粉与等量国产鱼粉、日本鱼粉分别养殖甲鱼(*Trionyx sinensis*)108 d,蚕蛹粉组的饲料利用率明显优于鱼粉组。本研究中,蚕粉替代水平在0~30%时并未对加州鲈的生长和饲料利用率产生不利影响,与上述研究基本一致。选用WGR、SGR、PER和FCR作为实验鱼养殖效果的评价指标,通过二次多项式拟合曲线回归分析可知,加州鲈饲料中蚕粉是替代比例应为17.90%~22.00%。但Boscolo等(2001)报道,投喂蚕蛹组饲料的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)仔鱼的增重和饲料转化率较鱼粉组差,但摄食量、末均重及存活率等却无明显差

异。张建禄等(2013)认为建鲤 WGR、SGR 和 PER 均随饲料中脱脂蚕蛹替代水平的升高逐渐下降,而 FCR 则呈相反的变化趋势,但在其添加晶体赖氨酸后,实验鱼的各项指标均有所改善;本研究中实验鱼的 CF、HSI 和 VSI 随蚕粉的替代水平的升高而呈先上升后下降并趋于稳定的趋势,与吉红等(2012)对框鳞镜鲤,张建禄等(2013)对建鲤的报道也有一定的差异。这可能与饲料中 Lys 和 Met 含量的升高与降低有关,蚕粉富含 Lys, 缺乏 Met, 随着实验中蚕粉替代水平升高,其 Lys 含量增高,在一定程度上对于加州鲈的生长有一定的改善。这与张建禄等(2013)在脱脂蚕蛹替代鱼粉的研究中,添加晶体赖氨酸后对建鲤生长均有改善一致。而 Nordrum 等(2000)发现饲料中氨基酸特别是对大西洋鲑(*Salmo salar*)上研究表明, Met 能够提高小鱼与脂肪酶、蛋白酶的活性。本研究中随着蚕粉添加水平的升高, Met 含量降低,而不同鱼类对 Met 的需求量不同,当添加水平达到一定值时, Met 含量低于加州鲈的需求量,导致其生长及对饲料利用率降低。本研究说明,饲料中蚕粉的替代比例小于 30%时不会对加州鲈的生长及饲料转化率产生明显的影响。

3.2 蚕粉替代鱼粉对加州鲈体组成的影响

鱼体的营养成分受饲料营养成分、食物组成和养殖水环境等外界条件的影响(李爱杰, 1996)。张建禄等(2013)发现,在不添加晶体赖氨酸时,随着饲料中蚕蛹替代水平的升高,建鲤全鱼粗蛋白质含量无显著差异,而全鱼粗脂肪含量则逐渐升高,全鱼粗灰分含量呈降低趋势;Nandeesh 等(2000)证实,随着蚕蛹替代比例的增大,鲤全鱼的粗蛋白和粗灰分逐渐升高,而粗脂肪和水分则逐渐降低;随着饲料中蚕蛹替代比例的提高,框鳞镜鲤全鱼、肌肉、肝胰脏的粗蛋白、粗脂肪及灰分水分含量无明显变化(吉红等, 2012);本研究中,随着饲料中蚕粉替代比例的增大,实验鱼全鱼粗蛋白含量无明显变化,粗脂肪含量呈先降低后升高的变化趋势,而全鱼的水分和灰分则在蚕粉的一定替代比例范围内变化不显著。与王淑雯等(2015)对吉富罗非鱼的研究结论蚕蛹粉可有效利用脂肪,最大程度减少体内脂肪蓄积引起的损伤相一致。可能是由于蚕粉富含 α -亚麻酸,一定范围内蚕粉比例的增加,使饲料中 $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ 的比例趋于适宜,从而提高了饲料脂肪的利用率,降低了全鱼中脂肪的含量,但蚕粉添加比例超过适宜值后, α -亚麻酸的进一步增加引起了饲料中 $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ 的失衡,影响鱼类的

脂肪代谢,使饲料脂肪在鱼体中沉积的量增加,也有可能是蚕粉本身脂肪含量高,而因实验环境限制其活动,导致摄入高替代水平的饲料后,导致体内脂肪沉淀。

4 小结

在本研究条件下,用蚕粉替代一定比例鱼粉具有明显的促进加州鲈生长性能,提高其饲料转化率的作用。通过二元多项式回归分析可知,加州鲈饲料中蚕粉替代鱼粉的适宜比例应为 17.90%~22.00%。由养殖环境受限,本养殖周期为 45 d,虽然养殖效果明显,但较低于饲料源评价周期,蚕粉替代鱼粉在更长的养殖周期内出现的效果还需要进一步探讨。

参 考 文 献

- Begum NN, Chakraborty SC, Zaher M, *et al.* Replacement of fishmeal by low-cost animal protein as a quality fish feed ingredient for Indian major carp, *Labeo rohita*, fingerlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1994, 64(2): 191-197
- Boscolo WR, Hayashi C, Meurer F, *et al.* Fish, meat and bone, poultry by-products and silkworm meals as attractive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 2001, 30(5): 1397-1402
- Chen GD, Li XY, Xie DS. Study on silkworm pupae as turtle feed. *Feed Research*, 1992(8): 11-12 [陈国定, 李秀艳, 谢德松. 蚕蛹作甲鱼饲料的研究. *饲料研究*, 1992(8): 11-12]
- Chen JC, Su RR, Lü YM. Artificial propagation technique of *Micropterus salmonoides*. *Fisheries Science*, 2001, 20(4): 21-23 [陈建酬, 苏润荣, 吕贻民. 加州鲈人工繁殖技术. *水产科学*, 2001, 20(4): 21-23]
- Chen JY, Ye YT, Guo JL, *et al.* Analysis of nutritional components in muscles of halibut, river bass and California bass. *Feed Research*, 2007(9): 52-54 [陈佳毅, 叶元土, 郭建林, 等. 梭鲈、河鲈和加州鲈的肌肉营养成分分析. *饲料研究*, 2007(9): 52-54]
- Gui ZZ, Chen J, Sun ZP, *et al.* Effect of silkworm powder on the growth, nutrition, immune and endocrine function in quails. *Journal of Yangzhou University(Agricultural and Life Sciences Edition)*, 2002, 23(3): 33-36 [桂仲争, 陈杰, 孙镇平, 等. 全蚕粉对鹌鹑生长、营养、免疫及内分泌的影响. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2002, 23(3): 33-36]
- Gui ZZ, Dai JY, Chen JJ, *et al.* Studies on the edibility and therapeutic effects of the silkworm powder. *Science of Sericulture*, 2004, 30(1): 107-110 [桂仲争, 戴建一, 陈军建, 等. 全蚕粉的食用价值及其降血糖的临床实验效果. *蚕业科学*, 2004, 30(1): 107-110]
- He JH. *Feed analysis and detection*. Beijing: China Agriculture Press, 2005, 19-46 [贺建华. *饲料分析与检测*. 北京: 中国农业出版社, 2005, 19-46]

- Huang TS, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Current situation and green development of California bass culture in China. *China Fisheries*, 2017(12): 44–47 [黄太寿, 白俊杰, 李胜杰, 等. 我国加州鲈养殖现状和绿色发展问题探讨. *中国水产*, 2017(12): 44–47]
- Ji H, Chen XF, Li J, *et al.* Effect of dietary replacement of fish meal protein with silkworm pupae on the growth performance, body composition, and health status of *Cyprinus carpio* var. *specularis* fingerlings. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 159–161 [吉红, 程小飞, 李杰, 等. 蚕蛹替代鱼粉对框鳞镜鲤幼鱼生长性能、体成分及健康状况的影响. *水产学报*, 2012, 36(10): 159–161]
- Li AJ. Nutrition and feed of aquatic animals. Beijing: China Agriculture Press, 1996, 82–83 [李爱杰. 水产动物营养与饲料学. 北京: 中国农业出版社, 1996, 82–83]
- Li XL, Wang L, Song K, *et al.* Effects of dietary low-molecular-weight fish hydrolysate (LWFH) on nonspecific immunity and antioxidant capacity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(6): 85–91 [李晓丽, 王玲, 宋凯, 等. 低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(6): 85–91]
- Liang DN, Jiang XJ, Liu WB, *et al.* Apparent digestibility of nutrients in six kinds of non-conventional protein ingredients for Jian Carp. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(6): 1065–1072 [梁丹妮, 姜雪姣, 刘文斌, 等. 建鲤对6种非常规蛋白质原料中营养物质的表观消化率. *动物营养学报*, 2011, 23(6): 1065–1072]
- Liu DD. Study on partial replacement for fish meal with silkworm chrysalis in feed for rice field eel (*Monopterus albus*). Master's Thesis of Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2009, 28–29 [刘丹丹. 蚕蛹在黄鳝饲料中替代鱼粉的应用研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2009, 28–29]
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 85–92]
- Nandeesh, MC, Gangadhara B, Varghese TJ, *et al.* Growth response and flesh quality of common carp, *Cyprinus carpio* fed with high levels of nondefatted silkworm pupae. *Asian Fisheries Science*, 2000, 13(3): 235–242
- Nordrum S, Krogdahl A, Røsjø C, *et al.* Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime. *Aquaculture*, 2000, 186(3): 341–360
- Rangacharyulu PV, Giri SS, Paul BN, *et al.* Utilization of fermented silkworm pupae silage in feed for carps. *Bioresource Technology*, 2003, 86(1): 29–32
- Wang SW, Huang XZ, Luo L, *et al.* Effects of replacement of fish meal with silkworm pupae on growth performance, body composition and serum biochemical indices of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(9): 2774–2783 [王淑雯, 黄先智, 罗莉, 等. 蚕蛹替代鱼粉对吉富罗非鱼生长性能、体成分及血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(9): 2774–2783]
- Wei MJ, He Y, Mai KS, *et al.* Effects of partial substitution of dietary fish meal by a mixture of feedstuffs on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Papers of the 9th World Chinese Fish and Shrimp Nutrition Symposium*, 2013, 176 [魏艳洁, 何良, 麦康森, 等. 复合蛋白源部分替代饲料中的鱼粉对大菱鲆生长的影响. 第九届世界华人鱼虾营养学术研讨会论文集, 2013, 176]
- Yang JY, Ye MQ, Qi ZS, *et al.* Processing technology of silkworm pupae for feed and its application in animal husbandry and aquatic industry. *China Sericulture*, 2009, 30(4): 11–13 [杨吉园, 叶明强, 邝哲师, 等. 饲料用蚕蛹的加工技术及其在畜牧水产业中的应用. *中国蚕业*, 2009, 30(4): 11–13]
- Zhang JL, Yu P, Huang JQ, *et al.* Effects of fish meal replacement by defatted silkworm pupae on growth performance, body composition and health status of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1568–1578 [张建禄, 余平, 黄吉芹, 等. 脱脂蚕蛹替代饲料中鱼粉对建鲤生长性能、体成分及健康状况的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1568–1578]

Effects of Replacement of Fish Meal with Silkworm Powder on Growth Performance, Feed Intake, and Body Composition of Juvenile Black Bass (*Micropterus salmonides*)

RAO Yuan¹, XIANG Xiao¹, HUANG Xianzhi², DUAN Biao¹①

(1. College of Animal Sciences, Southwest University, Chongqing 402460;

2. State Key Laboratory Silkworm Genome Biology, Chongqing 400716)

Abstract This experiment evaluated the effects of fish meal (FM) replacement by silkworm powder (SP) on the growth performance and body composition of juvenile black bass (*Micropterus salmonides*). Six isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated by the replacement of 0 (control), 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% FM with SP. Each diet was fed to three replicate groups of 30 juvenile black bass (total, 540 fish) with an initial body weight of (3.13±0.04) g. Owing to the decline in the temperature, the breeding cycle was 45 days. The results show that weight growth rate (WGR), special growth rate (SGR), and the protein efficiency ratio (PER) of black bass increased first and then decreased as along with the replacement rate increased, and reached maximum when replacement level was 30%, with increases of 227.87%, 1.98%/day, and 164.55%, respectively ($P<0.05$). The feed conversion rate (FCR) decreased first, then increased as along with the replacement rate increased, and reached a minimum when replacement level was 30%, with a decrease of 1.43 ($P<0.05$). The condition factor (CF), hepatopancreas somatic index (HSI), and viscera somatic index (VSI) increased first, then decreased as the replacement rate increased, and finally tended towards stability ($P<0.05$). The survival rate (SR) of the six groups of black bass was not significantly different ($P>0.05$). Through quadric regression analysis, when WGR, SGR, FCR, and PER reached the optimum values, the replacement rates were 19.90%, 22.00%, 18.11%, and 17.90%, respectively. The content of crude lipid decreased first and then increased as the replacement rate increased ($P<0.05$); whole body crude protein did not change significantly as the replacement rate increased ($P>0.05$); moisture content in the whole body was not significantly different in any group ($P>0.05$) except the 10% and 40% groups ($P<0.05$); and the ash content of the whole fish decreased significantly when the replacement rates were above 20% ($P<0.05$). Therefore, under the experimental conditions, the measurement of the growth performance and body composition of black bass indicated that the optimum substitution rate of SP with FM was between 17.90% and 22.00%.

Key words Black bass (*Micropterus salmonides*); Silkworm powder; Growth performance; Body composition

① Corresponding author: DUAN Biao, E-mail: d-biao@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420005

http://www.yykyjz.cn/

郑建明, 赵捷杰, 陈四清, 常青, 严俊丽, 朱之发, 刘长琳, 胡建成. 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和肌肉脂肪酸的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 39–46

Zheng JM, Zhao JJ, Chen SQ, Chang Q, Yan JL, Zhu ZF, Liu CL, Hu JC. Growth and fatty acid composition of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*) fed diets with fish oil replaced by soybean oil. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 39–46

豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼 生长和肌肉脂肪酸的影响*

郑建明¹ 赵捷杰¹ 陈四清¹ 常青^{1,2①}
严俊丽³ 朱之发¹ 刘长琳¹ 胡建成¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 农业农村部极地渔业开发
重点实验室 青岛 266071; 3. 山东畜牧兽医职业学院 潍坊 261061)

摘要 本实验旨在研究饲料中豆油替代鱼油对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼生长和肌肉脂肪酸组成的影响。用豆油分别替代0、25%、50%和75%的鱼油, 配制4组等氮、等脂肪的饲料。选择初始体重为(65.47±1.57) g的圆斑星鲈幼鱼360尾, 随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复30尾鱼, 养殖56 d。结果显示, (1)随着豆油替代水平的升高, 增重率(WGR)呈现降低的趋势($P<0.05$), 饲料系数(FCR)呈现升高的趋势($P<0.05$), 25%替代组的WGR高于鱼油组($P<0.05$)。 (2)豆油替代鱼油对圆斑星鲈肌肉的粗蛋白、粗脂肪、灰分和水分含量无显著性影响($P>0.05$), 对肝体比(HSI)、脏体比(VSI)和肥满度(CF)无显著性影响($P>0.05$), 豆油替代组肝脏的脂肪含量显著高于鱼油组($P<0.05$)。 (3)随着饲料中豆油水平的增加, 圆斑星鲈幼鱼肌肉亚油酸(C18:2n-6)和亚麻酸(C18:3n-3)显著升高($P<0.05$), 而二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)则显著降低($P<0.05$)。研究结果表明, 在该实验条件下, 饲料中高比例的豆油替代鱼油会降低鱼体的生长性能和肌肉脂肪酸营养品质。

关键词 豆油; 鱼油; 圆斑星鲈; 生长性能; 肌肉脂肪酸

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0039-08

近年来, 随着水产养殖的快速发展, 饲料行业对鱼油的需求与日俱增, 导致鱼油的价格不断上涨, 因此寻找适宜的鱼油替代源已成为饲料行业的研究热点。鱼油在饲料配方中主要起2个重要的作用: 一是为鱼类提供能量, 二是为鱼体提供长链多不饱和脂肪酸等必需脂肪酸(王骥腾等, 2016)。目前已知的鱼油替代物包括处于海洋食物链较低环节的浮游动物、渔

业的副渔获物及副产品等, 这些油源由于具有来自生态、环境、营养和可持续性的问题, 所以目前来讲上述所有的替代脂肪源没有一种是鱼油的理想替代品(Peng *et al*, 2008)。但是对于植物油, 尽管在营养上缺乏长链多不饱和脂肪酸, 但是在供应上几乎没有任何限制, 所以植物油是目前唯一现成的、经济的鱼油替代油脂。豆油是世界上产量最大的植物油, 目前在

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022016005)和天津市农业科技成果转化与推广项目(201604100)共同资助 [This work was supported by Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016005), and Tianjin Agricultural Science and Technology Achievement Transformation and Extension Project (201604100)]. 郑建明, E-mail: 615709961@qq.com

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

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-06-27

饲料中添加豆油的研究已在黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*) (Peng *et al*, 2008)、金头鲷(*Sparus aurate*) (Izquierdo *et al*, 2003)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) (王骥腾等, 2016)等鱼类有报道, 研究发现适宜比例的植物油替代鱼油对鱼体的生长没有显著性影响。

作为我国北方重要的名贵海水鱼类, 圆斑星鲷(*Verasper variegatus*)肉质鲜美、营养丰富, 主要分布在我国黄渤海附近, 养殖潜力巨大(严俊丽等, 2017)。目前, 圆斑星鲷的养殖方式是工厂集约化养殖。在工厂化养殖中, 饲料成本是最大的部分, 而海水鱼饲料中的脂肪源主要来自鱼油, 因此, 寻找新型的鱼油替代源迫在眉睫。目前, 关于圆斑星鲷适宜的蛋能比(吕云云等, 2015)、维生素 C 需求量(王贞杰等, 2016)和鱼粉替代(吕云云等, 2016; 严俊丽等, 2016; 郑建明等, 2017)的研究已有相关报道。而在圆斑星鲷饲料中, 用植物油替代鱼油的研究未见报道。

因此, 本实验设计在圆斑星鲷饲料中, 用豆油替代 0、25%、50%和 75%的鱼油, 探究其对圆斑星鲷幼鱼的生长性能和肌肉脂肪酸等主要营养成分的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验饲料

以鱼粉、玉米蛋白粉、花生粕和大豆浓缩蛋白为蛋白源, 以豆油分别替代 0、25%、50%和 75%的鱼油, 配制等氮(50%)、等脂肪(8%)的颗粒饲料[饲料中的蛋白、脂肪需要量见吕云云等(2015)的文章结果], 并记为 R0、R25、R50 和 R75。实验饲料配方见表 1。对所有粉状原料经过粉碎机粉碎后, 过 80 目筛, 按饲料配方比例混合均匀, 将鱼油、豆油混合后, 再与其他粉状原料混合均匀, 加 30%的水搅拌均匀, 最后用制粒机制成直径 3 mm 的颗粒饲料, 鼓风烘干 12~14 h, 制成的颗粒饲料-20℃保存。

1.2 饲养管理

实验鱼取自山东省烟台开发区天源水产有限公司。挑选体格健壮、规格统一的圆斑星鲷幼鱼 360 尾, 初始体重为(65.47±1.57) g, 体长为(15.14±0.56) cm, 随机分到 12 个体积为 330 L 的圆柱形塑料桶中, 每组设 3 个重复, 每个重复 30 尾。开始实验前投喂 R0 饲料暂养 7 d。养殖期间, 采用流水养殖模式, 自然水温, 温度范围为(15±1)℃, 盐度为 31, 溶氧为 5 mg/L 以上。实验从 2017 年 6 月 10 日~2017 年 8 月 12 日, 持续 56 d, 每天饱食投喂 1 次, 投喂 0.5 h 后使用虹吸管吸取残饵, 烘干称重, 每天记录摄食量。

表 1 实验饲料配方和营养组成(干物质, %)
Tab.1 Formulation and nutrient compositions of the Experimental diets (Dry matter, %)

原料 Ingredient	组别 Group			
	R0	R25	R50	R75
鱼粉 Fish meal	50.00	50.00	50.00	50.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	5.00	5.00	5.00	5.00
花生粕 Peanut meal	13.00	13.00	13.00	13.00
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	12.00	12.00	12.00	12.00
鱼油 Fish oil	5.60	4.20	2.80	1.40
豆油 Soybean oil	0.00	1.40	2.80	4.20
高筋粉 High gluten flour	10.80	10.80	10.80	10.80
预混料 Premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	1.00	1.00	1.00	1.00
三氧化二铬 Chromium oxide	0.05	0.05	0.05	0.05
抗氧化剂 Antioxygen	0.05	0.05	0.05	0.05
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
粗蛋白 Crude protein	50.73	50.20	50.19	49.98
粗脂肪 Crude lipid	8.03	8.09	8.00	8.02

注: 1. 维生素 A, 375000 IU/kg; 维生素 D₃, 75000 IU/kg; 维生素 E, 3000 mg/kg; 维生素 K₃, 900 mg/kg; 维生素 B₁, 600 mg/kg; 维生素 B₂, 600 mg/kg; 维生素 B₆, 600 mg/kg; 维生素 B₁₂, 3.7 mg/kg; D-泛酸钙, 2400mg/kg; 烟酰胺, 4500 mg/kg; 叶酸, 185 mg/kg; D-生物素, 7.5mg/kg; 肌醇, 3000 mg/kg; 维生素 C, 10500 mg/kg; 锌, 1750mg/kg; 锰, 1050 mg/kg; 铜, 410 mg/kg; 铁, 1150 mg/kg; 钴, 60 mg/kg; 碘, 50 mg/kg; 硒, 15 mg/kg

Note: 1. V_A 375000 IU/kg, V_{D₃} 75000 IU/kg, V_E 3000 mg/kg, V_{K₃} 900 mg/kg, V_{B₁} 600 mg/kg, V_{B₂} 600 mg/kg, V_{B₆} 600 mg/kg, V_{B₁₂} 3.7 mg/kg, Calcium pantothenate 2400 mg/kg, Nicotinic acid amines 4500 mg/kg, Folic acid 185 mg/kg, Biotin 7.5 mg/kg, Inositol 3000 mg/kg, V_C 10500 mg/kg, Zn 1750mg/kg, Mn 1050 mg/kg, Cu 410 mg/kg, Fe 1150 mg/kg, Co 60 mg/kg, I₂ 50mg/kg, Se 15 mg/kg

1.3 样品收集与分析

实验结束后, 采样前使实验鱼饥饿 24 h, 并对每组鱼进行计数、称重。每桶随机取 3 尾鱼, 解剖分离内脏团和肝脏并称量, 用于计算肝体比(HSI)和脏体比(VSI)。然后取其背部肌肉, 测其常规成分及脂肪酸组成。

表 2 实验饲料脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比, %)
Tab.2 Fatty acid composition of the experimental diets
(Percentage of total fatty acids, %)

脂肪酸 Fatty acid	组别 Group			
	R0	R25	R50	R75
C14:0	2.70	2.20	1.71	1.32
C16:0	19.55	17.55	15.65	13.77
C18:0	4.38	4.31	4.29	4.54
C20:0	0.34	0.35	0.33	0.36
C22:0	0.48	0.45	0.37	0.34
SFA	27.45	24.86	22.35	20.33
C16:1	3.38	3.24	3.19	3.02
C18:1	18.59	18.78	18.02	18.09
C20:1	0.59	0.58	0.53	0.53
MUFA	22.56	22.60	21.74	21.64
C18:2n-6	25.21	30.21	35.65	39.43
C18:3n-6	0.09	0.07	0.08	0.06
C20:3n-6	0.03	0.03	0.03	0.03
C20:4n-6	0.44	0.42	0.42	0.40
n-6PUFA	25.77	30.73	36.18	39.92
C18:3n-3	1.98	2.48	3.00	3.66
C18:4n-3	0.69	0.62	0.66	0.58
C20:4n-3	0.25	0.23	0.23	0.21
C20:5n-3EPA	6.35	4.85	3.35	2.24
C22:5n-3	1.06	1.03	1.03	1.01
C22:6n-3DHA	5.74	4.25	2.75	1.87
n-3PUFA	16.07	13.46	11.02	9.57
DHA+EPA	12.09	9.10	6.10	4.11
DHA/EPA	0.90	0.88	0.82	0.83
n-3/n-6PUFA	0.62	0.44	0.30	0.24

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

Note: SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Mono-unsaturated fatty acids; PUFA: Poly-unsaturated fatty acids. The same as below

饲料样品、肝脏及肌肉样品 105℃烘干后, 采用凯氏定氮法测得粗蛋白含量(VELP, UDK-142 automatic distillation unit, 意大利); 采用索氏抽提法(石油醚为抽提液)测得粗脂肪含量(FOSS 脂肪测定仪 SOXTEC-2050, 瑞典); 将样品在马弗炉(550℃)中灼烧 6 h 测得灰分含量。

脂肪酸测定方法: 用于测定脂肪酸的样品按照 Qiao 等(2015)的方法进行转脂化。取所得脂肪酸甲酯的正己烷溶液 2 μl 进行气相色谱测定(岛津 GC-2010), 所用毛细管柱为 Supelco SP-2560 (100 m×0.25 mm, 膜厚度 0.20 μm), 进样口和检测器的温度设定为 260℃, 柱温升温程序为自 140℃以

4℃/min 的速度升高至 240℃并恒温 10 min, 以高纯氮为载气, 通过与 37 种脂肪酸甲酯混标(Supelco 公司, 美国)对照确定脂肪酸组分。相关计算公式如下:

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

存活率(Survival rate, SR, %)=实验末鱼体个数/实验初鱼体个数×100

饲料系数(Feed conversion rate, FCR)=投饲总量/总增重量

肥满度(Condition factor, CF)=体重/体长³×100;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=内脏质量/实验末鱼体质量×100;

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %)=肝脏质量/实验末鱼体质量×100。

1.4 数据统计

实验数据采用 Excel 2010 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据差异显著时采用 Duncan's 进行多重比较, 显著水平为 $P<0.05$, 数据以平均值±标准误差表示(Mean±SE)。

2 结果

2.1 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和饲料利用的影响

豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和饲料利用的影响见表 3。25%替代组的 WGR 显著高于对照组($P<0.05$), 随着豆油替代水平的升高, WGR 呈现降低的趋势($P<0.05$), 25%替代组的 FCR 显著低于对照组($P<0.05$), FCR 呈现升高的趋势($P<0.05$), SR 没有显著性差异($P>0.05$)。

表 3 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和饲料利用的影响

Tab.3 Effects of fish oil replacement by soybean oil on the growth performance and feed utilization of juvenile spotted halibut

组别 Group	增重率 WGR(%)	存活率 SR(%)	饲料系数 FCR
R0	61.81±0.65 ^b	96.67±0.00	1.31±0.01 ^b
R25	76.58±1.55 ^a	95.56±2.94	1.06±0.02 ^c
R50	51.91±0.76 ^c	97.78±1.11	1.32±0.01 ^b
R75	45.09±0.24 ^d	94.44±1.11	1.46±0.01 ^a

注: 同列不同字母上标表示差异显著($P<0.05$), 下表同

Note: Values with different superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$), the same as below

2.2 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉主要组分的影响

通过表4可知,豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉的粗蛋白、粗脂肪、灰分和水分无显著性影响($P>0.05$)。从表5可以看出,豆油替代鱼油对圆斑星鲈的HSI、VSI和CF无显著性影响($P>0.05$),但是随着豆油替代水平的增加,HSI和VSI呈现上升的趋势。肝脏的脂肪含量随着豆油替代水平的增加呈现升高的趋势,豆油替代水平达到50%和75%时,肝脏的脂肪含量显著高于鱼油组($P<0.05$)(表6)。

表4 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉主要组分的影响
Tab.4 Effects of fish oil replacement by soybean oil on the muscle composition of juvenile spotted halibut

组别 Group	粗蛋白 CP (% DM)	粗脂肪 EE (% DM)	灰分 ASH (% DM)	水分 Moisture(%)
R0	69.62±0.16	9.22±0.09	6.08±0.19	77.11±0.24
R25	69.64±0.09	9.16±0.41	6.63±0.46	77.12±0.59
R50	69.38±0.06	9.23±0.07	6.96±0.21	76.63±0.19
R75	68.98±0.55	9.16±0.07	6.88±0.50	76.35±0.20

表5 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼形态指标的影响
Tab.5 Effects of fish oil replacement by soybean oil on the morphometry of juvenile spotted halibut

组别 Group	肝体比 HSI (%)	脏体比 VSI (%)	肥满度 CF
R0	0.91±0.08	3.78±0.23	2.73±0.07
R25	1.06±0.10	3.83±0.14	3.15±0.25
R50	1.19±0.09	3.80±0.16	2.80±0.07
R75	1.17±0.15	4.28±0.21	2.75±0.08

表6 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肝脏脂肪和水分的影响

Tab.6 Effects of fish oil replacement by soybean oil on liver composition of juvenile spotted halibut

组别 Group	水分 Moisture (%)	粗脂肪 EE (%DM)
R0	69.06±0.33	30.75±1.69 ^b
R25	68.32±1.59	33.90±0.96 ^{ab}
R50	68.27±0.82	36.76±1.23 ^a
R75	66.02±0.76	37.21±1.64 ^a

2.3 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉脂肪酸的影响

豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉脂肪酸的影响见表7。随着饲料中豆油水平的增加,圆斑星鲈幼鱼肌肉中饱和脂肪酸(SFA)总量呈现明显的降低趋势

($P<0.05$);单不饱和脂肪酸(MUFA)中,除了C18:1之外,其他2种脂肪酸的含量都有明显地下降($P<0.05$);多不饱和脂肪酸(PUFA)中,亚油酸(C18:2n-6)和亚麻酸(C18:3n-3)显著升高($P<0.05$),二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)则显著降低($P<0.05$);高不饱和脂肪酸(HUFA)中,n-3长链多不饱和脂肪酸的含量也显著降低($P<0.05$),n-6长链多不饱和脂肪酸的含量显著升高($P<0.05$),EPA和DHA的总含量(EPA+DHA)显著降低($P<0.05$),n-3长链多不饱和脂肪酸与n-6长链多不饱和脂肪酸的比值(n-3/n-6PUFA)也显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼生长和饲料利用的影响

鱼油替代实验中,鱼体的生长和饲料利用是重要的测定指标。在本研究中,高比例的豆油替代会显著降低鱼体的生长性能。目前关于植物油替代鱼油的实验已有很多报道,在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) (Subhadra *et al*, 2006)、尖吻重牙鲷(*Diplodus puntazzo*) (Piedecausa *et al*, 2007)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Richard *et al*, 2006)等淡水鱼中研究发现,植物油部分或者全部替代鱼油对鱼体的生长无显著影响。在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Izquierdo *et al*, 2003)、金头鲷(*Sparus aurata*) (Izquierdo *et al*, 2005)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (李桑等, 2015)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) (彭墨等, 2015)等海水鱼中的研究发现,植物油部分替代鱼油不影响鱼体的生长,但是全部替代鱼油会显著影响大部分鱼类的生长。对于以上研究结果,有学者认为那些能够通过C18PUFA满足鱼体对必需脂肪酸需求的鱼类,在饲料中用植物油完全替代鱼油,不会影响鱼类的生长或饲料效率(Turchini *et al*, 2009)。由于淡水鱼具有一个完整的自身n-3长链多不饱和脂肪酸(n-3 LC-PUFA)合成机制,而植物油又富含C18PUFA,因此植物油可以给淡水鱼提供必需脂肪酸。但是由于海水鱼缺乏相应的合成机制,主要通过食物链的累积来满足对n-3 LC-PUFA的需求,因此植物油不能满足大部分海水鱼类对EPA和DHA的需要(Tocher *et al*, 2010)。在本研究中,饲料中用高比例豆油鱼油会显著降低圆斑星鲈的生长,从而也佐证了植物油高比例替代鱼油会影响海水鱼的生长这一结论。同时在本研究中也发现,25%豆油替代组的圆斑星鲈的生长性能优于鱼油组(对照组),原因可能是鱼油和低量的豆油形成脂肪酸

表7 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉脂肪酸组成的影响(占总脂肪酸的百分比, %)
 Tab.7 Effects of fish oil replacement by soybean oil on muscle fatty acid composition of juvenile spotted halibut(Percentage of total fatty acids, %)

脂肪酸 Fatty acid	组别 Group			
	R0	R25	R50	R75
C14:0	2.10±0.06 ^a	1.70±0.05 ^b	1.92±0.06 ^a	1.61±0.06 ^b
C15:0	0.26±0.01 ^a	0.19±0.01 ^c	0.22±0.01 ^b	0.19±0.01 ^c
C16:0	16.12±0.57 ^a	14.48±0.58 ^{ab}	13.92±0.57 ^b	12.55±0.60 ^b
C17:0	0.39±0.01 ^b	0.42±0.01 ^a	0.39±0.01 ^b	0.39±0.01 ^b
C18:0	5.42±0.12 ^c	7.19±0.11 ^a	6.00±0.11 ^b	6.15±0.11 ^b
C20:0	0.15±0.01 ^b	0.56±0.01 ^a	0.14±0.01 ^b	0.15±0.01 ^b
C22:0	0.41±0.01 ^a	0.20±0.01 ^d	0.25±0.01 ^b	0.23±0.01 ^c
SFA	24.85±0.77 ^a	24.74±0.78 ^a	22.84±0.77 ^{ab}	21.27±0.77 ^b
C16:1	2.89±0.06 ^a	1.89±0.05 ^c	2.29±0.06 ^b	1.97±0.06 ^c
C18:1	13.89±0.57	12.48±0.58	13.21±0.58	12.15±0.58
C20:1	1.27±0.06 ^a	0.85±0.06 ^b	1.02±0.05 ^b	0.97±0.05 ^b
MUFA	18.05±0.69 ^a	15.22±0.70 ^b	16.52±0.71 ^{ab}	15.09±0.69 ^b
C18:2n-6	18.05±0.57 ^c	20.89±0.57 ^b	23.51±0.58 ^a	25.12±0.58 ^a
C20:4n-6	1.15±0.05 ^c	1.42±0.06 ^{ab}	1.26±0.06 ^{bc}	1.47±0.06 ^a
n-6PUFA	19.20±0.57 ^c	22.31±0.54 ^b	24.77±0.58 ^a	26.59±0.55 ^a
C18:3n-3	1.30±0.05 ^b	1.28±0.06 ^b	1.99±0.06 ^a	2.09±0.06 ^a
C18:4n-3	0.49±0.01 ^a	0.28±0.01 ^d	0.44±0.01 ^b	0.36±0.01 ^c
C20:4n-3	0.28±0.01 ^a	0.22±0.01 ^c	0.24±0.01 ^b	0.23±0.01 ^{bc}
C20:5n-3EPA	6.90±0.12 ^a	6.59±0.11 ^{ab}	6.36±0.11 ^b	6.20±0.12 ^b
C22:5n-3	2.02±0.05	1.89±0.06	1.97±0.06	2.08±0.06
C22:6n-3DHA	14.04±0.57 ^a	13.70±0.58 ^a	12.10±0.58 ^{ab}	11.28±0.57 ^b
n-3PUFA	25.03±1.15	23.96±1.14	23.10±1.15	22.24±1.15
DHA+EPA	20.94±0.58 ^a	20.29±0.57 ^{ab}	18.46±0.57 ^{bc}	17.48±0.57 ^c
n-3/n-6PUFA	1.30±0.06 ^a	1.07±0.05 ^b	0.93±0.05 ^{bc}	0.83±0.06 ^c

注: 同行不同字母上标表示差异显著($P<0.05$)

Note: Values with different superscripts in the same line indicate significant different ($P<0.05$)

互补, 进而使用效果优于单一油脂(Izquierdo *et al.*, 2005)。目前研究发现黄斑篮子鱼(*Siganus oramin*)自身具有完整的 n-3 LC-PUFA 合成机制(谢帝芝等, 2013), 圆斑星鲈是否可能具有完整的 n-3 LC-PUFA 合成能力, 需要进一步的研究。

3.2 豆油替代鱼油对圆斑星鲈幼鱼肌肉和肝脏脂肪含量的影响

当植物油高比例替代鱼油的时候, 容易出现一系列的问题, 例如会导致脂肪异常沉积。在本研究中, 豆油替代 75% 的鱼油对圆斑星鲈肌肉的粗蛋白、粗脂肪、灰分和水分无显著性影响, 虽然对圆斑星鲈的 HSI、VSI 和 CF 无显著性影响, 但是 HSI 和 VSI 指标的数据呈现增加的趋势, 同时也发现鱼油替代组肝脏的脂肪含量显著高于鱼油组, 替代 75% 的豆油组肝脏脂肪含量最高。在该实验条件下, 脂肪主要沉积在

圆斑星鲈的肝脏部位。目前已有学者在尖吻重牙鲷(*Plecoglossus altivelis*)和 大菱鲆(彭墨等, 2015)得出相同的结论。脂肪过多沉积于肝脏的原因, 可能与 n-3/n-6PUFA 的不平衡密切相关(彭墨等, 2015)。在本研究中, 全鱼油组、25% 的豆油组、50% 的豆油组和 75% 的豆油组饲料中 n-3/n-6 的比例分别为 0.62、0.44、0.30 和 0.24, 后面 2 组的比值明显低于全鱼油组, n-3/n-6PUFA 比例的失衡, 可能影响肝脏将过多的脂肪转运到外周组织, 进而导致肝脏脂肪组织细胞的增殖或增大(艾庆辉等, 2016)。其次可能是饲料中较低的 n-3 LC-PUFA 含量导致。本研究中, 4 组饲料中的 n-3 LC-PUFA 含量依次降低。彭墨等(2015)研究表明, n-3 LC-PUFA 不仅能激活过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α), 促进脂肪分解; 而且能抑制固醇调节元件结合蛋白-1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c,

SREBP-1c)的表达,进而抑制脂肪合成。因此,在本实验条件下,随着饲料中豆油的比例不断增加,饲料中较低的n-3 LC-PUFA含量可能导致肝脏脂肪过多沉积。

3.3 豆油替代鱼油对圆斑星鲈肌肉脂肪酸组分的影响

许多研究表明,饲料脂肪酸组成会显著影响鱼体肌肉脂肪酸的组成,而鱼体的最终脂肪酸组成是饲料输入和体内代谢的综合结果。对赤点石斑鱼(王骥腾等, 2016)、大黄鱼(李桑等, 2015)、大菱鲆(彭墨等, 2015)等海水鱼的研究发现,植物油替代鱼油会导致鱼体中长链多不饱和脂肪酸(EPA 和 DHA)含量的下降,而使 C18 脂肪酸(C18:2n-6 和 C18:3n-3)的含量增加。在本研究中,随着饲料中豆油水平的增加,圆斑星鲈幼鱼肌肉中 C18:2n-6 和 C18:3n-3 的含量显著升高,而 EPA 和 DHA 的含量则显著降低,和以上研究结果一致。肌肉脂肪酸精确的变化主要取决于所采用的脂肪源,用菜籽油替代时,会显著增加肌肉中的油酸(C18:1n-9)的含量(彭墨等, 2015);使用亚麻油时,C18:3n-3 的含量会增加(彭墨等, 2014)。而在本研究中,使用的是富含 C18:2n-6 的豆油,进而使圆斑星鲈肌肉的 C18:2n-6 显著升高。目前在大口黑鲈(Richard *et al*, 2006)、虹鳟(Subhadra *et al*, 2006)等淡水鱼中的研究发现,鱼体具有从 C18PUFA 合成长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)的合成机制,及相关的去饱和酶和延长酶,而在金头鲷(Izquierdo *et al*, 2005)、大黄鱼(李桑等, 2015)、大菱鲆(彭墨等, 2015)等海水鱼中研究发现缺乏相关的酶活。因此饲料中不同的脂肪源及鱼体是否具有从 C18PUFA 合成长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)的合成能力,决定了鱼体肌肉的脂肪酸组成。在本研究中,圆斑星鲈也可能缺乏相关的酶活,进而使肌肉中 EPA 和 DHA 的含量显著降低。

4 结论

综合本研究中豆油替代 0、25%、50%和 75%的鱼油对圆斑星鲈生长和饲料利用、脂肪沉积和肌肉脂肪酸的影响,得出在该实验条件下,饲料中高比例的豆油替代鱼油会显著降低圆斑星鲈的生长性能和肌肉脂肪酸营养品质。

参 考 文 献

- Ai QH, Yan J, Mai KS. Research progresses of lipids and fatty acids transport in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 859-868 [艾庆辉, 严晶, 麦康森. 鱼类脂肪与脂肪酸的转运及调控研究进展. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 859-868]
- Izquierdo MS, Montero D, Robaina L, *et al*. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 2005, 250(1-2): 431-444
- Izquierdo MS, Obach A, Arantzamendi L, *et al*. Dietary lipid sources for seabream and seabass: Growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 2003, 9(6): 397-407
- Li S, Chen CY, Huang XX, *et al*. Effect of partial replacement of fish oil with vegetable oil on muscle and liver total lipid and fatty acid of larvae *Iarmichthys crocea*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(5): 726-736 [李桑, 陈春燕, 黄旭雄, 等. 植物油部分替代饲料中鱼油对大黄鱼脂肪及脂肪酸的影响. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(5): 726-736]
- Lü YY, Chang Q, Chen SQ, *et al*. The effects of dietary fermented soybean meal on the growth and digestive ability of spotted halibut, *Verasper variegatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(1): 10-18 [吕云云, 常青, 陈四清, 等. 发酵豆粕对圆斑星鲈生长及消化能力的影响. *水生生物学报*, 2016, 40(1): 10-18]
- Lü YY, Chen SQ, Yu CL, *et al*. The effects of the ratio of dietary protein to lipid on the growth, digestive enzyme activities and blood biochemical parameters in spotted halibut, *Verasper variegatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 118-124 [吕云云, 陈四清, 于朝磊, 等. 饲料蛋白脂肪比对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)生长、消化酶及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 118-124]
- Peng M, Xu W, Mai KS, *et al*. Growth performance, fatty acids composition and lipid deposition in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) fed diets with various fish oil substitution levels by linseed oil. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1131-1139 [彭墨, 徐玮, 麦康森, 等. 亚麻籽油替代鱼油对大菱鲆幼鱼生长、脂肪酸组成及脂肪沉积的影响. *水产学报*, 2014, 38(8): 1131-1139]
- Peng M, Xu W, Mai KS, *et al*. Growth, fatty acid composition and lipid deposition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed diets with fish oil replacement by rapeseed oil. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(3): 756-765 [彭墨, 徐玮, 麦康森, 等. 菜籽油替代鱼油对大菱鲆幼鱼生长、脂肪酸组成及脂肪沉积的影响. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 756-765]
- Peng SM, Chen LQ, Qin JG, *et al*. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture*, 2008, 276(1-4): 154-161
- Piedecausa MA, Mazón MJ, García BG, *et al*. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*,

- 2007, 263(1-4): 211-219
- Qiao HJ, Wang JY, Zhang LM, *et al.* An improved direct transesterification method for fatty acid determination of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(2): 697-701
- Richard N, Kaushik S, Larroquet L, *et al.* Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 2006, 96(2): 299-309
- Subhadra B, Lochmann R, Rawles S, *et al.* Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 210-222
- Tocher DR. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 2010, 41(5): 717-732
- Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 2009, 1(1): 10-57
- Wang JT, Jiang YD, Yang YX, *et al.* Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil on growth performance, body composition and body fatty acid composition of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 640-646 [王骥腾, 姜宇栋, 杨云霞, 等. 豆油替代鱼油对赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 生长、体组成及体脂肪酸组成的影响. *海洋与湖沼*, 2016, 47(3): 640-646]
- Wang ZJ, Ye BM, Chang Q, *et al.* Effects of dietary vitamin C content on anta-ammonia-nitrite stress ability of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(12): 4054-4062 [王贞杰, 叶保民, 常青, 等. 饲料维生素 C 含量对圆斑星鲈幼鱼抗氨氮胁迫能力的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(12): 4054-4062]
- Xie DZ, Wang SQ, You CH, *et al.* Influencing factors and mechanisms on HUFA biosynthesis in teleosts. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 456-466 [谢帝芝, 王树启, 游翠红, 等. 鱼类高度不饱和脂肪酸合成的影响因素及其机理. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 456-466]
- Yan JL, Chen SQ, Chang Q, *et al.* Early ontogeny of chromatophores and skin color changes of spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 678-686 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 圆斑星鲈仔稚鱼色素细胞发育和体色变化. *水产学报*, 2017, 41(5): 678-686]
- Yan JL, Chen SQ, Chang Q, *et al.* Effects of Antarctic krill meal replacing fish meal on growth performance, serum and liver biochemical indices and serum non-specific immune indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(11): 3503-3510 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 南极磷虾粉替代鱼粉对圆斑星鲈幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标及血清非特异性免疫指标的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(11): 3503-3510]
- Zheng JM, Yan JL, Chen SQ, *et al.* Effects of dietary skimmed krill meal on the growth, non-specific immunity and serum physiological metabolism indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 107-113 [郑建明, 严俊丽, 陈四清, 等. 脱脂磷虾粉对圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 幼鱼生长、非特异性免疫力和血清生理代谢指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 107-113]

(编辑 陈辉)

Growth and Fatty Acid Composition of Juvenile Spotted Halibut (*Verasper variegatus*) Fed Diets with Fish Oil Replaced by Soybean Oil

ZHENG Jianming¹, ZHAO Jiejie¹, CHEN Siqing¹, CHANG Qing^{1,2①},
YAN Junli³, ZHU Zhifa¹, LIU Changlin¹, HU Jiancheng¹

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

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071;

3. Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061)

Abstract An 8-week experiment was conducted to investigate the effects of the replacement of dietary fish oil (FO) with soybean oil (SO) on growth, lipid deposition, and fatty acid composition of juvenile spotted halibut. Four isonitrogenous and isolipidic practical diets were formulated with SO replacing 0, 25%, 50%, and 75% FO, respectively. In total, 360 juvenile spotted halibut, with an initial body weight of (65.47±1.57) g were randomly distributed into four groups; three replicates were used per group and 30 fish were used per replicate. The fish in each group were randomly fed one of the four experimental diets. The following results were obtained: (1) Compared with 100% FO group, the feed conversion rate of spotted halibut was significantly increased ($P<0.05$), whereas the weight gain rate was significantly decreased ($P<0.05$). (2) SO replacement levels had no significant effects on body composition and muscle lipid content of juvenile spotted halibut ($P>0.05$), but had a significant effect on the liver lipid content of juvenile spotted halibut ($P<0.05$). The liver lipid content in the 50% and 75% SO groups was significantly higher than that in 100% FO group ($P<0.05$). (3) The fatty acid composition in the muscle was positively correlated with dietary fatty acid composition. Compared with the 100% FO group, the content of linoleic acid (C18:2n-6) and linolenic acid (C18:3n-3) in the muscle were significantly increased ($P<0.05$), whereas the content of eicosapentamethic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the muscle were significantly decreased ($P<0.05$). This study suggested that there were no significant effects on the growth of juvenile spotted halibut when dietary fish oil was replaced by soybean oil. However, the fatty acid composition of muscle was significantly altered.

Key words Soybean oil; Fish oil; Spotted halibut; Growth; Fatty acid of muscle

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180529001

http://www.yykxjz.cn/

王成强, 李宝山, 王际英, 黄炳山, 孙永智, 郝甜甜, 马长兴, 周莹. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 47-56

Wang CQ, Li BS, Wang JY, Huang BS, Sun YZ, Hao TT, Ma CX, Zhou Y. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices and antioxidant capacity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 47-56

饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物 对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清 生化指标及抗氧化能力的影响*



王成强¹ 李宝山^{1①} 王际英¹ 黄炳山¹
孙永智¹ 郝甜甜¹ 马长兴² 周莹²

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 为探究饲料中添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)幼鱼生长、血清生化指标、抗氧化能力和抗病力的影响,采用2×3双因子实验设计,在基础饲料中添加0(B0)、0.5%(B1)和1.0%(B2)的枯草芽孢杆菌制剂,同时每个枯草芽孢杆菌水平添加0(Y0)、0.5%(Y1)和1.0%(Y2)的酵母培养物,制作9组等氮、等脂的实验饲料,饲喂初始体重为(23.41±0.47)g珍珠龙胆石斑鱼幼鱼56d。结果显示,1)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对幼鱼存活率(SR)和增重率(WGR)均无显著影响($P>0.05$),幼鱼WGR在Y1B1和Y2B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P<0.05$)。2)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对血清谷草转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(AKP)影响显著($P<0.05$),血清ALT和AKP活力在Y1B1和Y1B2组处于较低水平,且显著低于对照组和Y2B2组($P<0.05$)。3)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对肠道超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量影响显著($P<0.05$)。肠道SOD、过氧化氢酶(CAT)活力和总抗氧化能力(T-AOC)在Y1B1和Y1B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P<0.05$),而MDA含量同SOD活力呈相反的变化趋势($P<0.05$)。4)枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)攻毒后幼鱼累积存活率无显著影响($P>0.05$)。鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率在Y1B1组最高,显著高于对照组($P<0.05$)。

关键词 珍珠龙胆石斑鱼; 枯草芽孢杆菌; 酵母培养物; 生长; 抗氧化能力; 抗病力

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0047-10

* 烟台市科技计划项目(2016ZH068)、山东省重点研发计划(2016GSF115005)和山东省自然科学基金(ZR2015CQ023)共同资助[This work was supported by Science and Technology Development Plan of Yantai (2016ZH068), Key Research and Development Project of Shandong Province (2016GSF115005), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015CQ023)]. 王成强, E-mail: chengqiangwang@126.com

① 通讯作者: 李宝山, E-mail: bsleeyt@126.com

收稿日期: 2018-05-29, 收修改稿日期: 2018-06-21

长期以来,人们多用抗生素来控制 and 预防水产疾病的发生,但由于抗生素类药物易残留,污染环境,破坏生态平衡,并能够通过食物链影响人类健康。同时,随着无抗养殖目标的提出,抗生素的使用已被严重限制。益生菌由于具有促进生长、提高饲料利用率、抵御病原体和改善水质等自身优势,且安全性好,已经被广泛应用于水产养殖中(Nayak, 2010)。其中,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)被公认为是一种具有优良作用的益生菌,能够在动物肠道内繁殖,分泌蛋白酶、淀粉酶等多种酶类,并且性能稳定,在金头鲷(*Sparus aurata* L.) (Cerezuela *et al*, 2013)、卡特拉鱼(*Catla catla*) (Sangma *et al*, 2015)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (Liu *et al*, 2010)等水产动物的研究中均表明,其能够促进机体生长,增强免疫能力。

酵母培养物(Yeast culture)主要含有酵母细胞本身和细胞外代谢物,特别是其代谢物,能为消化道微生物提供丰富的营养,如:肽、有机酸、寡糖(β -葡聚糖及甘露寡糖)、氨基酸等(郁欢欢等, 2015),成为当前水产饲料中使用较为广泛的添加剂。在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (李高锋, 2009)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (徐磊等, 2010)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (栗雄高等, 2012)等水产动物的实验中均表明,酵母培养物不仅能促进生长和胃肠道的消化与吸收,还能够增强机体的抗氧化能力,提高抗病力。

近年来,随着珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)养殖规模的不断扩大,弧菌感染等病害问题成为影响石斑鱼养殖业发展的主要问题。同时研究证实,水产动物原籍菌适应宿主内环境能力强,更易于在动物体内增殖和定植,作为微生态制剂效果更为显著(杨红玲等, 2012)。鉴于此,本研究拟从健康珍珠龙胆石斑鱼肠道中分离出能较好适应鱼体肠道环境、产酶能力强、可供饲用的芽孢杆菌菌株,并进行保种发酵,探讨饲料中添加原籍芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标、肠道抗氧化能力及抗弧菌感染能力的影响,以期对珍珠龙胆石斑鱼生物饲料的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 芽孢杆菌制剂的制备和饲料制作

实验从健康珍珠龙胆石斑鱼肠道细菌中分离和培养枯草芽孢杆菌菌种,进行发酵生产,制成枯草芽孢杆菌制剂,作为饲料添加剂。实验方法参考贺国龙等(2017)的方法,并稍作修改,步骤如下:无菌条件

下,取珍珠龙胆石斑鱼肠道,置于离心管中,将其粉碎匀浆,制成原液,将原液置于 70℃ 恒温水浴锅中水浴 30 min,之后将高温处理后的原液按照 1:10 稀释后,涂布于琼脂培养皿上,然后 37℃ 培养 24 h。之后挑选琼脂培养皿上单个灰白色、菌落边缘不规则、不整齐、表面粗糙而干燥的菌落进行纯化培养,并制作成斜面后做进一步鉴定。将斜面保存的菌种进行 16S rDNA 菌种鉴定,同时参考东秀珠等(2001)的方法进行生理生化鉴定,采用平板透明圈法,进行菌株产酶能力分析,筛选出产酶能力强的枯草芽孢杆菌菌株,最后将筛选的枯草芽孢杆菌菌株经发酵、干燥、混合,制成干菌粉(活菌数 2.0×10^9 CFU/g),玉米淀粉作为载体。

以鱼粉、酪蛋白和发酵豆粕为主要蛋白质源,鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源,配制粗蛋白质含量 52%,粗脂肪含量 11% 的基础饲料。采用 2×3 双因子实验设计,分别在基础饲料中添加 0 (B0)、0.5% (B1) 和 1.0% (B2) 的枯草芽孢杆菌制剂,同时每个枯草芽孢杆菌水平添加 0 (Y0)、0.5% (Y1) 和 1.0% (Y2) 的酵母培养物(徐州赛博生物科技有限公司提供),共制成 9 组等氮、等脂的实验饲料,分别记为: Y0B0 (0)、Y0B1 (4.15×10^6 CFU/g)、Y0B2 (8.04×10^6 CFU/g)、Y1B0 (0)、Y1B1 (4.03×10^6 CFU/g)、Y1B2 (7.95×10^6 CFU/g)、Y2B0 (0)、Y2B1 (3.89×10^6 CFU/g) 和 Y2B2 (8.24×10^6 CFU/g), Y0B0 组为对照组,饲料配方及营养成分见表 1。制作饲料时,先将所有原料粉碎后过 80 目标准筛,按配比称重后混匀,加入鱼油与干粉充分混匀之后,加入适量的蒸馏水混合均匀,最后用小型颗粒饲料挤压机制成 2 种型号(直径分别为 2.5 mm 和 3.5 mm)的饲料颗粒,60℃ 烘干,饲料袋包装后,置于通风干燥处储存备用。

1.2 实验用鱼及实验管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地循环水养殖系统中进行,实验用鱼为该基地当年繁育的同一批珍珠龙胆石斑鱼幼鱼,实验周期为 56 d。养殖实验开始之前,先用对照组饲料暂养 15 d,使其充分适应养殖环境。正式实验前,将实验鱼饥饿 24 h,挑选大小均匀、体色健康的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼[平均体重为 (23.41 ± 0.47) g],随机放养于 18 个养殖桶(70 cm×80 cm)中,每个桶内放 30 尾幼鱼,每个实验组 3 个重复。养殖期间,每天在 08:30 和 16:30 饱食投喂 2 次,投喂 30 min 后吸出残饵,并记录残饵数量。水温控制在 (28 ± 1) ℃,溶氧 > 6.3 mg/L,盐度为 23.5~26.5, pH 为 7.5~8.0,氨氮和亚硝酸氮含量均 < 0.1 mg/L。

表 1 实验饲料配方及营养成分(干物质, %)
Tab.1 Formulation and proximate composition of experimental diets (Dry matter, %)

原料 Ingredients	组别 Groups								
	Y0B0	Y0B1	Y0B2	Y1B0	Y1B1	Y1B2	Y2B0	Y2B1	Y2B2
鱼粉 Fish meal	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
发酵豆粕 Fermented soybean meal	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00
酪蛋白 Casein	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
维生素预混料 Vitamin premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 Mineral premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂 Soy lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鱼油 Fish oil	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
其他成分 Other composition	37.00	36.50	36.00	36.50	36.00	35.50	36.00	35.50	35.00
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00	0.00	0.50	1.00
酵母培养物 Yeast culture	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
成分分析 Proximate analysis									
粗蛋白 Crude protein	52.03	52.15	52.57	52.23	52.52	52.73	52.48	52.81	52.95
粗脂肪 Crude lipid	11.38	11.45	11.56	11.47	11.74	11.88	11.60	11.72	11.86
粗灰分 Crude ash	9.02	9.30	9.45	9.16	9.34	9.18	9.12	9.45	9.61

注: 1. 维生素混合料(mg/kg or IU/kg 饲料): 维生素 A, 7500.0 IU; 维生素 D, 1500.0 IU; 维生素 E, 60.0 mg; 维生素 K₃, 18.0 mg; 维生素 B₁, 12.0 mg; 维生素 B₂, 12.0 mg; 维生素 B₁₂, 0.1 mg; 泛酸, 48.0 mg; 烟酰胺: 90.0 mg; 叶酸, 3.7 mg; D-生物素: 0.2 mg; 肌醇, 60.0 mg; 维生素 C, 310.0 mg

2. 矿物质混合料(mg/kg 饲料): 锌, 35.0 mg; 锰, 21.0 mg; 铜, 8.3 mg; 铁, 23.0 mg; 钴, 1.2 mg; 碘, 1.0 mg; 硒, 0.3 mg

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg or IU/kg diet): vitamin A 7500.0 IU, vitamin D 1500.0 IU, vitamin E 60.0 mg, vitamin K₃ 18.0 mg, vitamin B₁ 12.0 mg, vitamin B₂ 12.0 mg, vitamin B₁₂ 0.1 mg, pantothenate acid 48.0 mg, nicotinamide 90 mg, folic acid 3.7 mg, D-biotin 0.2 mg, inositolum 60.0 mg, vitamin C 310.0 mg

2. Mineral premix (mg/kg diet): Zn 35.0 mg, Mn 21.0 mg, Cu 8.3 mg, Fe 23.0 mg, Co 1.2 mg, I 1.0 mg, Se 0.3 mg

1.3 样品收集

养殖实验结束后, 将实验鱼饥饿 24 h, 从每个养殖桶内随机取 5 尾鱼进行解剖, 分离出肠道组织, 放入离心管中后迅速转移到液氮中速冻。之后再从每个养殖桶中随机取 5 尾鱼, 用无菌注射器, 采用尾部静脉取血法进行取血, 取出血液 4℃ 静置 4 h, 3000 r/min 离心 10 min, 小心将血清吸出后, 之后迅速放入液氮中。样品运回实验室后, 转移到-80℃超低温冰箱中保存, 用于后期实验分析。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 生长指标

存活率(Survival rate, SR, %)=100×终末尾数/初始尾数;

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100×(终末体

重-初始体重)/初始体重

1.4.2 血清生化指标 血清中的生化指标均采用日立自动生化分析仪(7020 型, Hitachi, 日本)测定, 测定指标主要包括: 谷丙转氨酶(Cereal third transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、白蛋白(Albumin, ALB)。

1.4.3 肠道抗氧化指标 肠道超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)以及总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 酶活定义及具体测定步骤参照试剂盒说明。

1.4.4 人工攻毒实验 用本实验室保存并经过鉴定的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)菌株进行攻毒实验。

预实验确定半致死浓度,参照马爱军等(2014)方法略有修改。实验结束后,从每个养殖桶中取8尾鱼进行攻毒试验,腹腔注射半致死浓度(5×10^8 CFU/ml)菌液,按照50 g体重腹腔注射50 μ l生理盐水悬浮的鳃弧菌菌液,分别记录注射后1、24、48、72和96 h的死亡情况,并及时捞出死鱼,计算累积存活率。

1.5 数据统计分析

采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)来表示所得实验数据,另外用Tukey's检验方法对实验数据进行多重比较,当 $P < 0.05$ 时,表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长的影响

由表2可知,幼鱼SR介于91.11%~98.89%,不同实验组间无显著差异($P > 0.05$),枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼存活率的影响没表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。在每个酵母培养物添加水平,饲料中添加枯草芽孢杆菌后,幼鱼WGR显著高于未添加组($P < 0.05$),且在添加组间无显著差异($P > 0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌添加水平,随着饲料中酵母培养物添加量的增加,幼鱼WGR先升高后降低,在0.5%添加组幼鱼的WGR最高,显著高于未添加组和1.0%

添加组($P < 0.05$)。实验结果显示,幼鱼WGR在Y1B1和Y2B2组处于较高水平,显著高于对照组和Y2B2组($P < 0.05$),而枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼WGR没有表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。

2.2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响

由表3可知,在每个酵母培养物添加水平,随着饲料中枯草芽孢杆菌添加量的增加,幼鱼血清ALT活力先降低后升高($P < 0.05$),且在添加组间无显著性差异($P > 0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌水平,饲料中添加酵母培养物,幼鱼血清ALT活力也呈先降低后升高趋势,但是仅在枯草芽孢杆菌为1.0%水平时,不同实验组血清ALT活力有显著性差异($P < 0.05$)。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清中ALT活力没有表现出显著的交互作用($P > 0.05$)。血清ALT活力在Y1B1实验组达到最低值,显著低于对照组和Y2B2组($P < 0.05$)。幼鱼血清AST活力呈现同ALT相似的变化趋势,但枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清中AST活力的影响表现出显著的交互作用($P < 0.05$)。

枯草芽孢杆菌和酵母培养物对血清AKP活力的影响没表现出显著的交互作用($P > 0.05$),血清AKP活力在Y1B1实验组达到最低值,显著低于对照组和Y2B2组($P < 0.05$)。同时,实验结果显示,幼鱼血清ALB含量在不同实验组均无显著性差异($P > 0.05$)。

表2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长指标的影响
Tab.2 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the growth indices of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	初始体重 IBW(g)	终末体重 FBW(g)	存活率 SR(%)	增重率 WGR(%)
Y0B0	0.0	0.0	23.42 \pm 0.09	77.85 \pm 0.49 ^c	94.44 \pm 2.94	232.38 \pm 1.35 ^c
Y0B1	0.5	0.0	23.38 \pm 0.14	80.60 \pm 0.24 ^{cd}	93.33 \pm 3.85	244.77 \pm 1.40 ^c
Y0B2	1.0	0.0	23.38 \pm 0.03	79.48 \pm 0.55 ^{cde}	98.89 \pm 1.11	239.97 \pm 2.56 ^{cde}
Y1B0	0.0	0.5	23.46 \pm 0.03	80.00 \pm 0.50 ^{cd}	92.22 \pm 1.11	241.07 \pm 1.83 ^{cd}
Y1B1	0.5	0.5	23.41 \pm 0.09	83.15 \pm 0.06 ^a	95.55 \pm 2.22	255.18 \pm 1.44 ^a
Y1B2	1.0	0.5	23.43 \pm 0.05	83.08 \pm 0.45 ^{ab}	95.55 \pm 2.22	254.54 \pm 2.13 ^{ab}
Y2B0	0.0	1.0	23.46 \pm 0.09	78.58 \pm 0.63 ^{de}	91.11 \pm 2.22	234.99 \pm 1.44 ^{de}
Y2B1	0.5	1.0	23.38 \pm 0.08	81.07 \pm 0.20 ^{bc}	94.45 \pm 2.22	246.76 \pm 0.60 ^{bc}
Y2B2	1.0	1.0	23.40 \pm 0.07	79.87 \pm 0.21 ^{cde}	94.45 \pm 2.22	241.30 \pm 0.11 ^{cd}

方差分析(P 值) ANOVA (P -value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.189	0.000
酵母培养 Yeast culture (%)	0.530	0.000
交互作用 Interaction	0.727	0.242

注:表中同列肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同
Note: In the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ($P > 0.05$), different small letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$), the same as the following

表 3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响
Tab.3 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the serum biochemical indices of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)	白蛋白 ALB (g/L)	碱性磷酸酶 AKP (U/L)
Y0B0	0.0	0.0	234.50±1.86 ^a	46.44±0.65 ^a	7.55±0.03	108.11±1.67 ^a
Y0B1	0.5	0.0	219.12±0.92 ^{cd}	42.42±0.53 ^{cd}	7.47±0.09	93.55±0.39 ^{cde}
Y0B2	1.0	0.0	223.90±2.72 ^{bcd}	42.59±0.41 ^{bcd}	7.63±0.15	95.37±0.74 ^{bcd}
Y1B0	0.0	0.5	227.47±2.22 ^{abc}	45.09±0.39 ^{ab}	7.57±0.12	99.71±0.88 ^b
Y1B1	0.5	0.5	214.80±2.47 ^d	38.82±0.75 ^e	7.57±0.15	87.85±1.14 ^f
Y1B2	1.0	0.5	216.00±2.08 ^d	39.34±0.49 ^e	7.57±0.09	90.31±0.72 ^{ef}
Y2B0	0.0	1.0	232.20±1.60 ^{ab}	46.62±0.65 ^a	7.57±0.12	104.43±1.15 ^a
Y2B1	0.5	1.0	218.37±1.56 ^{cd}	40.98±0.47 ^{de}	7.43±0.18	91.88±0.60 ^{def}
Y2B2	1.0	1.0	226.71±2.34 ^{abc}	44.20±0.32 ^{abc}	7.53±0.09	97.10±0.44 ^{bc}

方差分析(P 值) ANOVA (P-value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.000	0.000	0.626	0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)	0.001	0.000	0.840	0.000
交互作用 Interaction	0.434	0.017	0.947	0.090

2.3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼肠道抗氧化能力的影响

表4显示, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道SOD活力的影响, 表现出显著交互作用($P<0.05$)。在每个酵母培养物水平, 饲料中添加枯草芽孢杆菌提高了幼鱼肠道SOD活力, 在0.5%枯草芽孢杆菌实验组肠道SOD活力最高, 显著高于未添加组($P<0.05$)。当枯

草芽孢杆菌添加水平为0.5%和1.0%时, 饲料中添加0.5%酵母培养物能够显著提高肠道SOD活力($P<0.05$)。肠道SOD活力在Y1B1组达到最高值, 显著高于对照组和Y2B2组($P<0.05$)。饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物, 对幼鱼肠道CAT和T-AOC影响同SOD具有相似的变化趋势($P<0.05$), 而枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道CAT活力和T-AOC的影响无显著交互作用($P>0.05$)。

表 4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼肠道抗氧化能力的影响
Tab.4 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the antioxidant capacity in intestine of juveniles

项目 Items	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	总抗氧化能力 T-AOC (U/mg prot)	过氧化氢酶 CAT (U/mg prot)	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)
Y0B0	0.0	0.0	51.95±0.89 ^c	0.43±0.01 ^c	12.31±0.48 ^d	6.21±0.09 ^a
Y0B1	0.5	0.0	57.10±0.98 ^{bcd}	0.46±0.01 ^{bc}	14.34±0.63 ^{bcd}	6.12±0.15 ^a
Y0B2	1.0	0.0	53.40±0.44 ^{de}	0.43±0.02 ^c	12.71±0.59 ^d	6.05±0.05 ^a
Y1B0	0.0	0.5	52.58±1.25 ^c	0.45±0.02 ^{bc}	13.92±0.40 ^{cd}	6.18±0.12 ^a
Y1B1	0.5	0.5	61.85±0.95 ^a	0.52±0.01 ^a	17.41±0.46 ^a	4.63±0.09 ^b
Y1B2	1.0	0.5	60.91±1.03 ^{ab}	0.51±0.01 ^{ab}	16.39±0.48 ^{abc}	4.50±0.04 ^b
Y2B0	0.0	1.0	53.39±0.79 ^{de}	0.42±0.01 ^c	12.58±0.65 ^d	6.23±0.18 ^a
Y2B1	0.5	1.0	59.94±0.49 ^{abc}	0.47±0.01 ^{ab}	17.09±0.86 ^{ab}	4.89±0.01 ^b
Y2B2	1.0	1.0	55.57±0.89 ^{cde}	0.44±0.01 ^c	14.05±0.35 ^{cd}	6.47±0.13 ^a

方差分析(P 值) ANOVA (P-value)

枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	0.000	0.000	0.000	0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)	0.000	0.000	0.000	0.000
交互作用 Interaction	0.010	0.292	0.148	0.000

当酵母培养物水平为 0.5%时, 饲料中添加枯草芽孢杆菌显著降低了肠道 MDA 含量($P<0.05$); 而当酵母培养物水平为 1.0%时, 0.5%枯草芽孢杆菌添加组幼鱼肠道 MDA 含量显著低于未添加组和 1.0%水平组($P<0.05$), 未添加组和 1.0%水平组无显著性差异($P<0.05$)。肠道 MDA 含量在 Y1B2 组达到最低值。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对肠道 MDA 含量的影响表现出显著交互作用($P<0.05$)。

2.4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率的影响

表 5 显示, 在每个酵母培养物水平, 饲料中添加枯草芽孢杆菌提高了鳃弧菌攻毒后幼鱼的存活率, 在枯草芽孢杆菌水平为 0.5%时, 累积存活率显著高于未添加组($P<0.05$)。在每个枯草芽孢杆菌水平, 饲料中添加酵母培养物的幼鱼累积存活率有一定增加, 但各处理组间无显著性影响($P>0.05$)。鳃弧菌攻毒后珍珠龙胆石斑鱼幼鱼累积存活率在 Y1B1 组最高, 显著高于对照组($P<0.05$)。枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼累积存活率的影响没有显著的交互作用($P>0.05$)。

表5 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对鳃弧菌攻毒后幼鱼累积存活率的影响

Tab.5 Effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the cumulative survival rate of juveniles challenged with *V. anguillarum*

项目 Items	枯草芽孢 杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)	酵母培养物 Yeast culture (%)	累积存活率 Cumulative survival rate (%)
Y0B0	0.0	0.0	10.00±5.77 ^c
Y0B1	0.5	0.0	36.67±3.33 ^{ab}
Y0B2	1.0	0.0	23.33±3.33 ^{bc}
Y1B0	0.0	0.5	16.67±3.33 ^c
Y1B1	0.5	0.5	43.33±3.33 ^a
Y1B2	1.0	0.5	40.00±5.77 ^{ab}
Y2B0	0.0	1.0	16.67±3.33 ^c
Y2B1	0.5	1.0	36.67±3.33 ^{ab}
Y2B2	1.0	1.0	26.67±3.33 ^{abc}
方差分析(P 值) ANOVA (P-value)			
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> (%)			0.000
酵母培养物 Yeast culture (%)			0.021
交互作用 Interaction			0.472

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼生长的影响

研究结果显示, 当饲料中添加0.5%酵母培养物、

0.5%或1.0%枯草芽孢杆菌时, 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼能够获得较高的WGR, 表明饲料中添加适宜水平的酵母培养物和枯草芽孢杆菌, 能对鱼体生长产生显著地促进作用。Liu等(2012)在斜带石斑鱼、刘晓勇等(2011)在杂交鲟(*Acipenser baeri*♂×*Acipenser schrenkii*♀)、朱学芝等(2007)在凡纳滨对虾的研究中均表明, 适量枯草芽孢杆菌能够提高鱼体的生长性能。另外, 何远法等(2016)研究证实, 饲料中添加 0.30%~0.50%酵母培养物能够显著提高凡纳滨对虾的 WGR; 姚世彬等(2014)在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)研究中也表明, 酵母培养物在促进鱼体生长方面具有积极作用。产生这一结果的原因可能是, 酵母培养物中含有丰富的氨基酸、葡萄糖、维生素、有机酸等营养物质以及一些未知促生长因子, 可以为肠道内微生物菌群的生长和代谢提供营养物质, 促进有益菌群的代谢和活力, 抑制大肠杆菌等有害菌的繁殖, 从而优化肠道微生物结构, 增强了机体健康水平(郁欢欢等, 2015)。再加上本实验添加的是原籍枯草芽孢杆菌, 在酵母培养物的基础上, 能够更好地在肠道内定植和繁殖, 这就暗示二者在功能上可能形成相互协同的作用, 从而能对幼鱼的生长产生积极效应。

然而, 本实验结果也显示, 当二者添加量较高(1.0%和 1.0%)时, 幼鱼 WGR 会受到抑制, 这可能是由于高剂量添加容易引起肠道微生态系统失衡, 肠道黏膜遭到破坏, 导致机体的免疫能力下降, 进而影响了幼鱼的生长(何远法等, 2016)。其相关原因在讨论中将作进一步论述。

3.2 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼血清生化指标的影响

研究表明, 枯草芽孢杆菌对水产动物免疫机能具有明显促进效果。程远等(2014)在饲料中添加 0.12%~0.18%, 即 2.82×10^{10} ~ 4.23×10^{10} CFU/kg 的枯草芽孢杆菌时, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)血清 AST、ALT 和 AKP 活力均有不同程度的下降, 机体免疫功能得到显著提高; 董春光等(2015)报道, 饲料中适量的枯草芽孢杆菌能够显著增强刺参(*Apostichopus japonicus*)的非特异性免疫酶(SOD、AKP、CAT)活力, 提高刺参的非特异性免疫能力。本研究中, 在每个酵母培养物水平上, 各实验组血清 AST、ALT 和 AKP 活力均在枯草芽孢杆菌添加量为 0.5%时最低, 且显著低于未添加组($P<0.05$)。这同上述研究结果一致, 说明饲料中适量的枯草芽孢杆菌能够对肝脏起到一定的保护作用, 增强机体免疫功能。产生这一结果的原因可能是, 添加进饲料中的原籍枯草芽孢杆菌进入

肠道中,更易在肠道内定植并迅速繁殖,从而能够在肠道内竞争性抑制其他有害菌的生存,改善肠道生态结构,从而能够间接增强机体的免疫功能(惠明等, 2008)。

研究报道,在饲料中添加适宜的酵母培养物能够维持异育银鲫血清 AST 和 ALT 活力水平,有益于鱼体正常肝功能运转(康学会等, 2017);同时,何远法等(2016)在凡纳滨对虾的研究中表明,饲料中添加 0.30%~0.50%酵母培养物,能够显著影响血清中溶菌酶、酚氧化酶和碱性磷酸酶活力,显著提高凡纳滨对虾的非特异性免疫力。本研究结果也表明,饲料中添加 0.5%酵母培养物能够显著降低血清 AST、ALT 和 AKP 活力,提高机体非特异性免疫能力。另外,本研究还发现,当酵母培养物添加量为 1.0%时,幼鱼血清中免疫指标活力受到了抑制,显著低于 0.5%添加组。这同在凡纳滨对虾的研究结果类似,当酵母培养物的添加量超过一定量时,凡纳滨对虾免疫能力并不能得到进一步的改善,而是产生了一定的负面影响(何远法等, 2016)。这可能是酵母培养物中含有非淀粉多糖的原因导致的,非淀粉多糖具有抗营养的作用,随着添加量的增加,饲料中非淀粉多糖含量也随之增高,从而影响了鱼体对饲料中营养成分的吸收,导致维持体内的营养素减少(邱燕, 2010),进而可能导致机体免疫能力降低,但其具体原因有待于进一步研究。

根据分析,本研究中枯草芽孢杆菌和酵母培养物在血清 AST 和 AKP 上表现出显著的交互作用($P < 0.05$)。研究结果表明,当饲料中枯草芽孢杆菌为 0.5%、酵母培养物为 0.5%或 1.0%时,与对照组相比,幼鱼血清中 AST、ALT 和 AKP 活力均处于较低水平,表现出较高的免疫能力,同时在这一添加量下,幼鱼 WGR 也处于较高水平。这也说明适宜水平的枯草芽孢杆菌同酵母培养物存在协同作用,能够在一定程度上维持血清中免疫指标的活力,提高鱼体的免疫能力和生长性能。

3.3 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼抗氧化能力的影响

机体抗氧化能力的强弱与机体健康程度存在密切的关系,SOD、CAT 和 T-AOC 是体内关键性的抗氧化酶。其中,SOD 能够清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,T-AOC 可以反映机体对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态(张滕闲等, 2017; 刘玲等, 2018)。在斜带石斑鱼的实验中发现,投喂添加枯草芽孢杆菌饲料能够显著提高血清中

SOD、CAT 的活力(Liu *et al*, 2012); 刘晓勇等(2011)在饲料中添加 0.25%枯草芽孢杆菌,杂交鲟血清中 SOD 活力和 T-AOC 水平得到显著提高。另外在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)幼鱼(李盈锋等, 2014)、海参(Fan *et al*, 2013)等研究中均证实,枯草芽孢杆菌对水产动物抗氧化能力具有一定的增强作用。本研究结果表明,当饲料中添加 0.5%枯草芽孢杆菌时,能够显著提高幼鱼肠道 SOD、CAT 活力和 T-AOC 水平,同时能有效降低肠道 MDA 含量,这可能是因为当枯草芽孢杆菌随饲料进入鱼体后,可通过自身分泌抗氧化酶或作为激活剂促进机体抗氧化酶分泌,从而增强了鱼体清除自由基的能力和降低脂质过氧化程度,提高了幼鱼的抗氧化能力,这同上述研究结果类似。

本研究表明,在添加枯草芽孢杆菌的基础上,添加 0.5%的酵母培养物能够显著提高 SOD、CAT 活力和 T-AOC 水平,增强机体抗氧化能力,同时能够降低 MDA 含量。这可能与酵母培养物中含有 β -葡聚糖和甘露寡糖(MOS)等有关,研究表明,二者在提高机体的抗氧化能力和抗病力方面均能显著作用(Meshram *et al*, 2015)。 β -葡聚糖能够激活机体先天性免疫和获得性免疫过程,能够直接结合并激活巨噬细胞、中性粒细胞等白细胞,提高集体的免疫能力(Herret *et al*, 2004); MOS 能够显著提高水产动物溶菌酶活力、头肾细胞吞噬活性及促进前列腺素的分泌等,进而增强机体的非特异性免疫能力(Staykov *et al*, 2007)。徐磊等(2010)在异育银鲫、姚世彬等(2014)在草鱼等的研究中均表明,酵母培养物在增强机体抗氧化能力,提高非特异性免疫方面具有积极的作用。

本研究结果显示,幼鱼肠道 SOD 活力和 MDA 含量受枯草芽孢杆菌和酵母培养物的交互作用影响显著,当酵母培养物为 0.5%,枯草芽孢杆菌为 0.5%和 1.0%时,SOD 活力处于较高水平,显著高于对照组与 Y2B2 组,MDA 含量显著低于对照组与 Y2B2 组。这表明饲料中适宜的枯草芽孢杆菌和酵母培养物配比能够在提高珍珠龙胆石斑鱼幼鱼抗氧化水平,增强机体免疫能力方面具有一定的协同作用。

3.4 枯草芽孢杆菌和酵母培养物对幼鱼抗病力的影响

众多报道已证实,枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够显著改善水产动物的抗病力。研究表明,当饲料中添加适量枯草芽孢杆菌时,斑节对虾对哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的抗感染能力增强(Sirirat *et al*, 2000),凡纳滨对虾对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的抗感染能力增强(栗雄高等, 2012)。同时,在条纹鲈(*Morone saxatilis*) (Li *et al*, 2004)、尼罗非鱼

(Mohsen *et al.*, 2008)等研究中均也表明, 枯草芽孢杆菌能够降低攻毒后水产动物的累积死亡率。另外, 张琴(2010)报道, 刺参摄食含有酵母培养物的饲料后, 可以显著降低其感染弧菌后的累积死亡率, 提高抗病力; 同时, 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(温俊, 2007)和凡纳滨对虾(Burgents *et al.*, 2004)中的实验中也表明, 酵母培养物能够提高二者在弧菌感染后的成活率。本研究中, 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物, 均能够提高鳗弧菌攻毒后珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的存活率, 这也同上述众多研究结果一致, 再次证实了枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够提高鱼体的抗病力。这可能是因为枯草芽孢杆菌和酵母培养物能够调节肠道内微生态平衡, 对入侵微生物及病害具有很强的拮抗作用, 发挥出一定的免疫活性作用, 来刺激体内免疫系统的发育, 进而对机体抗氧化能力具有提高作用(曹海鹏, 2013)。

另外, 本研究还发现, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物虽然在攻毒后幼鱼存活率上没有显著地交互作用, 但是当酵母培养物为 0.5%, 枯草芽孢杆菌为 0.5%或 1.0%时, 幼鱼存活率显著高于对照组和 Y2B2 组, 这说明在适当的添加量下, 二者功能上可能存在一定的协同作用, 共同提高机体免疫能力和抗病力, 这一观点在上述幼鱼生长、血清免疫指标及肠道抗氧化能力上也得到了类似的论述。

4 结 论

综上所述, 当饲料中添加适量的枯草芽孢杆菌(0.5%或 1.0%)和酵母培养物(0.5%)时, 能够提高幼鱼 WGR 和血清中部分免疫指标的活力, 增强机体抗氧化能力和降低鳗弧菌感染后幼鱼的死亡率, 提高鱼体的抗病力。同时也表明, 枯草芽孢杆菌和酵母培养物在提高幼鱼非特异性免疫方面可能存在一定的协同作用。

参 考 文 献

- Burgents JE, Burnett KG, Burnett LE, *et al.* Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 1-8
- Cao HP. Antibacterial mechanism study on *Bacillus amyloliquefaciens* antagonistic against *Aeromonas hydrophila* and safety evaluation on its microcapsules. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2013, 48-51 [曹海鹏. 抗嗜水气单胞菌解淀粉芽孢杆菌的抗菌机理研究及其微胶囊制剂的安全性评价. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2013, 48-51]
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MÁ. Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 843-848
- Cheng Y, Huang K, Huang XY, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and anti-oxidation function of juvenile genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(6): 1503-1512 [程远, 黄凯, 黄秀芸, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、免疫力和抗氧化功能的影响. *动物营养学报*, 2014, 26(6): 1503-1512]
- Dong CG, Yang AG, Sun JX, *et al.* The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 109-115 [董春光, 杨爱国, 孙俊秀, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的益生作用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 109-115]
- Dong XZ, Cai MY, *et al.* Common bacterial system identification manual. Beijing: Science Press, 2001, 78-83 [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 78-83]
- Fan Y, Yu XQ, Xu L, *et al.* Synergy of microcapsule polysaccharides and *Bacillus subtilis* on the growth, immunity and resistance of sea cucumber *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection. *Fisheries Science*, 2013, 79(5): 807-814
- He GL, Liu LH, Zhang H. Study on bacillus from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) intestine and its zymogenicities. *Freshwater Fisheries*, 2017, 42(4): 3-8 [贺国龙, 刘立鹤, 张恒. 草鱼肠道芽孢杆菌的鉴定及产酶能力的分析. *淡水渔业*, 2017, 42(4): 3-8]
- He YF, Yu HH, Chi SY, *et al.* Effects of yeast culture on growth performance, nonspecific immunity and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(12): 4063-4072 [何远法, 郁欢欢, 迟淑艳, 等. 酵母培养物对凡纳滨对虾生长性能、非特异性免疫力和抗病力的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(12): 4063-4072]
- Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 869-876
- Hui M, Dou LN, Tian Q, *et al.* Advances in application research of *Bacillus subtilis*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(27): 11623-11627 [惠明, 窦丽娜, 田青, 等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(27): 11623-11627]
- Kang XH, Huo YW, Li YJ, *et al.* Effect of dietary addition of yeast cultures (Baihuikang) in replacement of fish meal on growth performance and blood index of *Carassius auratus gibelio*. *Feed Research*, 2017, 9(31): 31-36 [康学会, 霍雅文, 李永娟, 等. 饲料中添加酵母培养物(百惠康)替代鱼粉对异育银鲫生长性能及血液指标的影响. *饲料研究*, 2017, 9(31): 31-36]
- Li GF. Studies on application of yeast culture in artificial feed of *Megalobrama amblycephala*. Master's Thesis of Soochow University, 2009, 35-37 [李高锋. 酵母培养物在团头鲂伺

- 料中的应用研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2009, 35-37]
- Li P, Gatlin DM III. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 445-456
- Li YF, Qi X, Hua Y, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity and antioxidant function in juvenile of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2014, 35(1): 37-42 [李盈锋, 齐鑫, 华颖, 等. 枯草芽孢杆菌对黑鲷幼鱼生长、消化酶活性及抗氧化功能的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2014, 35(1): 37-42]
- Liu CH, Chui CH, Wang SW, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 699-706
- Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, *et al.* Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(5-6): 837-844
- Liu L, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of short-term temperature stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis Valenciennes* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 59-66 [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期温度胁迫对驼背鲷(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 59-66]
- Liu XY, Zhan Y, Qi Q, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity, and non-specific immunity in hybrid sturgeon (*Acipenser baeri* ♂ × *Acipenser schrenkii* ♀) juveniles. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1315-1320 [刘晓勇, 张颖, 齐茜, 等. 枯草芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼生长性能、消化酶活性及非特异性免疫的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1315-1320]
- Ma AJ, Guo JL, Wang XA, *et al.* Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 484-493 [马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484-493]
- Meshram SJ, Murthy HS, Ali H, *et al.* Effect of dietary β-glucan on immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*, 2015, 23(2): 439-447
- Mohsen AT, Azza M, Abdel R, *et al.* Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 185-189
- Nayak SK. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 2-14
- Qiu Y. Effects of three microecological agents on growth performance, physiological function and intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Soochow University, 2010, 34-39 [邱燕. 三种微生态制剂对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能、生理机能及肠道黏膜的影响. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2010, 34-39]
- Sangma T, Kamilya D. Dietary *Bacillus subtilis* FPTB13 and chitin, single or combined, modulate systemic and cutaneous mucosal immunity and resistance of catla, *Catla catla* (Hamilton) against edwardsiellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, 43(9): 8-15
- Sirirat R, Sombat R, Somkiat P, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4-5): 271-288
- 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*). *Aquaculture International*, 2007, 15(2): 153-161
- Su XG, Li XQ, Leng XJ, *et al.* Effects of yeast culture and *Bacillus* on growth, protease activity and immunity of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 168-176 [粟雄高, 李小勤, 冷向军, 等. 酵母培养物和芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长、蛋白酶活性和免疫性能的影响. 海洋渔业, 2012, 34(2): 168-176]
- Wen J. Effects of dietary probiotics and yeast culture on growth, immune response and disease resistance of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007, 40-45 [温俊. 复合益生菌与酵母培养物对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)生长、免疫及抗病力的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 40-45]
- Xu L, Liu B, Xie J, *et al.* Effects of yeast cultures on growth, blood biochemistry and immunity of *Carassius auratus gibelio*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, 23(6): 371-374 [徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 酵母培养物对异育银鲫生长、血液生化及免疫的影响. 江苏农业科学, 2010, 23(6): 371-374]
- Yao SB, Ye YT, Cai CF, *et al.* Protective effect of water soluble material of yeast culture on malondialdehyde damaged intestinal mucosal cells in *Vitro* of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(9): 2652-2663 [姚世彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 酵母培养物水溶物对丙二醛损伤的离体草鱼肠道黏膜细胞的保护作用. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2652-2663]
- Yang HL, Ma RL, Sun YZ. Assessment of *Psychrobacter* sp. SE6 from the gut of grouper (*Epinephelus coioides*) as a novel probiont in vitro and in vivo. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(2): 129-135 [杨红玲, 马如龙, 孙云章. 石斑鱼肠道原籍嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp.) SE6作为益生菌的体内外评价. 海洋学报, 2012, 34(2): 129-135]
- Yu HH, Zhou WH, Zeng H, *et al.* Application and action mechanism of yeast culture in aquatic animals. *Feed Industry*, 2015, 20(18): 25-29 [郁欢欢, 周文豪, 曾虹, 等. 酵母培养物在水产动物中的应用及作用机理研究进展.

饲料工业, 2015, 20(18): 25–29]

Zhang Q. The selection and application of high-effective immunostimulants for sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 89–92 [张琴. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka) 高效免疫增强剂的筛选与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 89–92]

Zhang TX, Chen Q, Zhang BL, *et al.* The effects of curcumin on the growth, digestion and antioxidant ability of yellow

catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(6): 56–63 [张滕闲, 陈钱, 张宝龙, 等. 姜黄素对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)生长、消化与抗氧化能力的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(6): 56–63]

Zhu XZ, Zheng SX, Pan QJ, *et al.* Effects of *Bacillus* on immunity and biochemical indexes of *Litopenaeus vannamei*. Feed Research, 2007(4): 56–59 [朱学芝, 郑石轩, 潘庆军, 等. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾免疫和生化指标的影响. 饲料研究, 2007(4): 56–59]

(编辑 陈辉)

Effects of Dietary *Bacillus subtilis* and Yeast Culture on Growth, Serum Biochemical Indices and Antioxidant Capacity of Juvenile Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

WANG Chengqiang¹, LI Baoshan¹①, WANG Jiyong¹, HUANG Bingshan¹,
SUN Yongzhi¹, HAO Tiantian¹, MA Changxing², ZHOU Ying²

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract A 2×3 two-factorial experiment was designed to investigate the effects of dietary administration of *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices, antioxidant capacity, and disease resistance of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) [initial weight: (23.41±0.47) g]. Nine isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with three levels of *B. subtilis* [0 (control), 0.5%, and 1.0%], and each *B. subtilis* level was formulated with three yeast culture levels [0 (control), 0.5%, and 1.0%]. Juvenile hybrid groupers were fed for 8 weeks. The results showed that the interaction between *B. subtilis* and yeast culture had no significant effects on the survival (SR) and weight gain rate (WGR) of grouper ($P>0.05$). The WGR of Y1B1 and Y1B2 groups was significantly higher than that of the control and Y2B2 groups ($P<0.05$). The interaction between *B. subtilis* and yeast culture had a significant effect on the aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AKP) in the serum of grouper ($P<0.05$); the AST and AKP activities in the serum of Y1B1 and Y1B2 groups were significantly lower than those in the control and Y2B2 groups ($P<0.05$). The interaction between *B. subtilis* and yeast culture had a significant effect on the superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in the intestinal tract of grouper ($P<0.05$), but no significant interaction with catalase (CAT) or total antioxidant capacity (T-AOC) in the intestinal tract ($P>0.05$). The activities of SOD, CAT, and T-AOC in the intestinal tract of the Y1B1 and Y1B2 groups were significantly higher than those in the control and Y2B2 groups ($P<0.05$), but the MDA content in the intestinal tract showed an opposite trend to SOD ($P<0.05$). There was no interaction between the effects of dietary *B. subtilis* and yeast culture on the cumulative survival rate of juveniles challenged with *Vibrio anguillarum* ($P>0.05$). The highest value of cumulative survival rate of juveniles was found in the Y1B1 group, which was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). In conclusion, supplementation of 0.5% or 1.0% *B. subtilis* and 0.5% yeast culture in diets could promote WGR, antioxidant capacity, and disease resistance in juvenile hybrid grouper.

Key words *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂; *Bacillus subtilis*; Yeast culture; Growth; Antioxidant capacity; Disease resistance

① Corresponding author: LI Baoshan, E-mail: bsleeyt@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180420002

http://www.yykxjz.cn/

樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 马冬梅, 姜鹏. 驯食配合饲料的大口黑鲈3个选育世代的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 57-64

Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, Ma DM, Jiang P. Analysis on genetic diversity of three breeding populations of largemouth bass using formulated feeds. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 57-64

驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析*



樊佳佳 白俊杰 李胜杰^① 马冬梅 姜鹏

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室 广州 510380)

摘要 为了检测驯食配合饲料的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 3 个选育世代群体遗传多样性水平变化, 利用微卫星标记技术对驯食配合饲料大口黑鲈选育基础群体(Sp0)和第二、三和四代选育群体(Sp2、Sp3 和 Sp4)共 240 尾样品进行检测。结果显示, 18 个微卫星位点共获得 44 个等位基因。Sp0、Sp2、Sp3 和 Sp4 的平均观测杂合度(H_o)分别为 0.4895、0.4802、0.4579 和 0.4206, 平均期望杂合度(H_e)分别为 0.4615、0.4454、0.4621 和 0.3916, 平均多态信息含量(PIC)分别为 0.3791、0.3659、0.3764 和 0.3257。4 个群体间的配对比较群体间遗传分化指数(F_{st})值在 0.01612~0.16162 之间、遗传距离(D_a)在 0.0249~0.1434 之间。遗传变异来源(AMOVA)分析显示, 只有 8.38%的变异来自于群体间, 其余遗传变异均来自于个体间。研究表明, 经连续多代选育之后, 易驯食配合饲料的快长大口黑鲈选育群体具有中度遗传多样性, 具备选育潜力, 可继续进行选育。

关键词 大口黑鲈; 配合饲料; 选育群体; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号 Q953+3 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)04-0057-08

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 原产于北美洲。根据地理分布和形态学不同分为2个亚种: 大口黑鲈北方亚种(*M. salmoides salmoides*)和 大口黑鲈佛罗里达亚种(*M. salmoides floridanus*) (Bailey *et al.*, 1949; MacEina *et al.*, 1992)。因该鱼具有适应性强、病害少、易起捕、生长迅速、肉质细嫩、味道鲜美等优点, 20世纪中期被引种到世界各地。中国台湾在20世纪70年代引进, 1983年广东省从台湾引

种并繁殖成功, 目前已成为中国重要的淡水养殖品种之一。樊佳佳等(2009b)通过形态学和分子生物学技术鉴定表明, 国内目前养殖的大口黑鲈群体属于大口黑鲈北方亚种。

传统大口黑鲈成鱼养殖采用冰鲜鱼进行投喂, 据统计, 中国大口黑鲈冰鲜鱼年消耗约 150 万 t, 随着海洋捕捞业产量的下降和冰鲜鱼价格大幅度上升, 大口黑鲈养殖成本大幅增高。冰鲜鱼残饵容易滋生和携

* 渔港建设和渔业产业发展专项(A201601A12)、广东省科技计划项目(2016A020210020; 2015A020209035)、南京市高端人才团队引进计划项目(2016)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZC04; 2018SJ-YZ03)共同资助[This work was supported by the Fishing Port Construction and Fishery Industry Development Project (A201601A12), the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2016A020210020; 2015A020209035), the Top Talent Team Introduction Planning Project of Nanjing (2016), and the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZC04; 2018SJ-YZ03)]. 樊佳佳, E-mail: fanjjiaok@163.com

① 通讯作者: 李胜杰, 副研究员, E-mail: ssjjli@163.com

收稿日期: 2018-04-20, 收修改稿日期: 2018-07-09

带有害病菌,污染养殖水体和导致病害频发,养殖产品质量得不到保障。冰鲜鱼投喂模式需要投入的劳动量大,因此,配合饲料替代冰鲜鱼养殖是大口黑鲈养殖产业的发展趋势。为了降低养殖成本、保护环境,实现大口黑鲈标准化质控养殖进程,选育进食人工配合饲料大口黑鲈新品种,是促进大口黑鲈养殖可持续发展的研究热点之一(吴锐全等,2004;白俊杰等,2013)。针对配合饲料养殖推广中出现的生长慢、鱼苗转食驯化效率和成功率低、个体间表型差异大,2012年珠江水产研究所在以大口黑鲈“优鲈1号”和大口黑鲈北方亚种原种作为选育基础群体,采用传统选育技术和分子标记辅助育种技术经连续多代选育而获得易驯食配合饲料的快长品种。但连续多代的人工定向选择易造成群体遗传多样性降低,导致后代选育潜力不足(张天时等,2005)。

微卫星又称简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),具有分型容易、多态性稳定、共显性且符合孟德尔遗传等特点,现广泛应用于动植物的遗传多样性分析。王军等(2018)利用15个微卫星标记对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)野生“黄海2号”第10代选育群体进行分析,显示选育到10代其遗传多样性仍较高;王日芳等(2017)利用33个微卫星标记对3个脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系进行遗传检测,表明各家系均已构成独立遗传群体;李榕等(2010)利用11个微卫星标记对进食冰鲜鱼快长大口黑鲈第2~4代群体遗传多样性进行分析,选育可以造成群体发生遗传分化;袁文成等(2018)利用13个多态性EST-SSR标记,对4个翘嘴鲮(*Siniperca chuatsi*)群体进行分析,表明选育群体属于中度多态水平。

为进一步做好驯食配合饲料大口黑鲈的选育工作,本研究采用18对微卫星标记对选育基础群体、第二、三和四代选育群体进行遗传多样性分析,监测其变化情况,为后续的人工选育方案制定、遗传改良和种质资源保护等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 2012年3月,从中国水产科学研究院珠江水产研究所九江亲本保种基地挑选体型修长、健康、体重大于0.65 kg的大口黑鲈“优鲈1号”和广州良种保种基地挑选引进的大口黑鲈北方亚种原种各500尾建立选育基础群体。亲本雌雄鱼1:1群体繁殖,生产约500万的水花苗种。鱼苗用小型的浮

游动物开口,当鱼苗长至2 cm左右时,开始驯食人工配合饲料。大口黑鲈幼鱼驯食人工配合饲料的方法为每日4次,少量多次投放幼鱼适口饲料(饲料成分:水分7.4%,粗蛋白44.7%,粗脂肪8.2%,碳水化合物17.6%,灰分12.2%,粗纤维0.6%)。到繁殖季节,选择生长优势前20%的雌雄个体各500尾作为繁殖亲本,群体繁殖后代,后代水花苗种约500万,以此进行连续多代的群体选育。本研究在选育基础群体(简称Sp0)、驯食第二代群体(简称Sp2)、驯食第三代群体(简称Sp3)和驯食第四代群体(简称Sp4)中各随机选择60尾样品,每个选育世代样品均在10 g左右幼鱼阶段进行随机取样,剪取尾鳍,用无水乙醇保存备用。

1.1.2 微卫星引物 该研究采用的大口黑鲈微卫星标记引物均来自文献(梁素娴等,2008; Colbourne *et al.*, 1996; DeWoody *et al.*, 2000; Malloy *et al.*, 2000)。通过扩增验证,共挑选18个扩增稳定、多态性高的微卫星用于该研究。上游引物5'端加上FAM或HEX荧光标记,引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物信息见表1。

1.2 方法

1.2.1 基因组提取 鳍条基因组DNA采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根)提取。采用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA质量,利用紫外分光光度计(Eppendorf公司AG2231型)检测浓度,用ddH₂O稀释至50 ng/μl,保存于-20℃备用。

1.2.2 PCR反应程序 反应体积为20 μl,包含2.0 μl 10×Buffer、2 μl MgCl₂ (25 mmol/L)、0.4 μl dNTP (10 mmol/L)、上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μl、1 μl模板DNA(50 ng/μl)、0.4 μl Taq酶(5 μ/μl) (Fermentas公司)和13.8 μl ddH₂O。PCR扩增反应条件:94℃预变性3 min后进入35个循环,94℃变性15 s,退火15 s,72℃延伸30 s,循环结束后72℃再延伸3 min,4℃保存。

1.2.3 PCR产物检测及分型 PCR扩增产物利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后,根据条带亮度和产物浓度,使用灭菌的ddH₂O将PCR产物稀释5~10倍后,与ROX 500内标混匀,然后置于ABI3730XL测序仪(ABI,美国)样本架上进行毛细管电泳检测。利用Peak Scanner Software V1.0软件读取PCR扩增产物的分子量,按照每个微卫星引物在不同样本中扩增的条带的分子量差异确定各样本各基因座的基因型(樊佳佳等,2019a;李婷等,2016)。

表 1 大口黑鲈微卫星标记引物信息
Tab.1 The primer information of microsatellite markers in largemouth bass

序号 No.	位点 Locus	引物序列(5'~3') Primer sequences	片段长度 Size(bp)	等位基因数 Number of alleles	退火温度 Annealing temperature(°C)	参考文献 Reference
1	JZL12	F: ACTCAGAGCCTCACATTC R: CAGGTGGACTCAAGACAG	202	2	50	梁素娴等(2008)
2	JZL23	F: GTCCGCTGCTTAGTTTAT R: TCCTTTATCCTTCCCTCT	397	3	50	梁素娴等(2008)
3	JZL31	F: TGGACTGAGGCTACAGCAGA R: CCAAGAGAGTCCCAAATGGA	202	2	60	梁素娴等(2008)
4	JZL36	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	2	56	梁素娴等(2008)
5	JZL40	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	2	58	梁素娴等(2008)
6	JZL43	F: GCTGCGAGTGCGTGTAACTA R: GGGAAGCGAGAGTCAGAGTG	215	2	58	梁素娴等(2008)
7	JZL48	F: TCGACGATCAATGGACTGAA R: TCTGGACAACACAGGTGAGG	207	2	56	梁素娴等(2008)
8	JZL59	F: CACAAGGCAAACAGAACGTC R: TTGGCTACCCAGTGATGACA	183	2	55	梁素娴等(2008)
9	JZL60	F: AGTTAACCCGCTTTGTGCTG R: GAAGGCGAAGAAGGGAGAGT	205	2	60	梁素娴等(2008)
10	JZL67	CCGCTAATGAGAGGGAGACA ACAGACTAGCGTCAGCAGCA	248	2	60	梁素娴等(2008)
11	JZL68	F: ACCCACCGTCTTCTCTTCA R: CATTGTGGGTGCATTCTCC	166	3	58	梁素娴等(2008)
12	JZL83	F: TGTGGCAAAGACTGAGTGGA R: ATITCTCAACGTGCCAGGTC	157	3	59	梁素娴等(2008)
13	JZL84	R: GTGCGCAGACAGCTAGACAG F: CAGCTCAATAGTTCTGTCAGG	197	3	56	梁素娴等(2008)
14	JZL85	R: ACTACTGCTGAAGATATTGT F: TCAAACGCACCTTCACTGAC	312	3	58	梁素娴等(2008)
15	Lma21	CAGCTCAATAGTTCTGTGTCAGG ACTACTGCTGAAGATATTGTG	158~183	3	47.5	Colbourne 等(1996)
16	Mdo7	TCAAACGCACCTTCACTGAC GTCACTCCCATCATGCTCCT	156~172	2	53	Malloy 等(2000)
17	Mdo6	TGAAATGTACGCCAGAGCAG TGTGTGGGTGTTTATGTGGG	150	3	55	Malloy 等(2000)
18	Msal21	CACTGTAAATGGCACCTGTGG GTTGTCAAGTCGTAGTCCGC	214~224	4	58	DeWoody 等(2000)

1.3 数据统计与分析

统计每个样品扩增的条带值, 确定基因型, 用 POPGEN 3.2 软件(Nei, 1978)计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、群体间遗传距离(D_a)、固定指数 F_{is} 和 F -统计量群体间遗传分化指数(F_{st})值的 F -分析。利用 MEGA 5.0 软件根据 Nei 氏遗传距离使用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统树(Tamura *et al*, 2011)。用 CERVUS 3.0 软件计算多态信息含量(Polymorphism information

content, PIC)(Kalinowski *et al*, 2007)。ARLEQUIN 3.1 软件计算 F_{st} 和群体分子方差分析(AMOVA)(Excoffier *et al*, 2010; 孙成飞等, 2015)。

2 结果

2.1 各世代间的微卫星遗传多样性

采用 18 对微卫星引物对 4 个大口黑鲈世代共 240 个样本基因组 DNA 进行扩增, 均获得目的条带。分析结果见表 2。18 对引物在 4 个世代中共获得等位

表2 微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量

序号	位点	片段大小(bp)	等位基因数 N_e				观测杂合度 H_o				期望杂合度 H_e				多态信息含量 PIC							
			Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4				
1	JZL12	149/156/199	3	3	3	3	1.91	2.48	2.02	2.57	0.5690	0.6724	0.5345	0.6286	0.4799	0.6058	0.5084	0.6163	0.4016	0.5232	0.4241	0.5426
2	JZL23	369/401/440	3	3	3	3	2.03	2.11	2.18	2.56	0.6379	0.8621	0.6552	0.5143	0.5126	0.5333	0.5463	0.6147	0.4315	0.4614	0.4612	0.5262
3	JZL31	187/200	2	2	2	2	1.95	1.97	2.00	1.60	0.4310	0.5000	0.5517	0.6571	0.4922	0.5006	0.5037	0.3783	0.3689	0.3717	0.3747	0.3047
4	JZL36	210/220/226	3	3	3	3	2.79	2.23	2.75	2.05	0.6552	0.4138	0.4828	0.4857	0.6477	0.5594	0.6424	0.5175	0.5658	0.4592	0.5652	0.3979
5	JZL40	214/222/227	3	3	3	3	2.79	2.23	2.73	2.05	0.6552	0.4138	0.5000	0.4857	0.6477	0.5594	0.6385	0.5175	0.5658	0.4592	0.5617	0.3979
6	JZL43	207/213	2	2	2	2	1.69	1.43	1.51	1.69	0.5690	0.569	0.3966	0.3143	0.4106	0.3068	0.3411	0.4106	0.3242	0.2567	0.2810	0.3242
7	JZL48	209/217	2	2	2	2	1.69	1.54	1.96	1.52	0.4655	0.4172	0.6207	0.2857	0.4106	0.3578	0.4948	0.1720	0.3242	0.2905	0.3702	0.1691
8	JZL59	171/179	2	2	2	2	1.51	1.40	1.96	1.49	0.3276	0.4138	0.4483	0.2286	0.3411	0.2882	0.4948	0.3310	0.2810	0.2437	0.3702	0.2743
9	JZL60	180/206/214/223	3	3	3	4	2.30	2.38	2.92	1.70	0.5517	0.5517	0.6207	0.6000	0.5711	0.5884	0.6628	0.4154	0.4882	0.4981	0.5864	0.3338
10	JZL67	241/249/252	3	3	3	3	2.42	2.85	2.13	2.73	0.4483	0.7759	0.5172	0.6000	0.5921	0.6588	0.5360	0.6385	0.5017	0.5753	0.4223	0.5617
11	JZL68	162/176	2	2	2	2	1.99	1.92	1.99	1.62	0.5345	0.4172	0.4138	0.4000	0.5006	0.4870	0.5019	0.1720	0.3731	0.3648	0.3738	0.1691
12	JZL83	142/155	2	2	2	2	1.93	1.85	2.00	2.00	0.6379	0.6545	0.5862	0.3714	0.4862	0.4658	0.5043	0.5043	0.3659	0.3537	0.3750	0.3750
13	JZL84	196/208	2	2	2	2	1.99	1.92	1.99	1.62	0.5345	0.5172	0.4138	0.4000	0.5006	0.4870	0.5019	0.1720	0.3731	0.3648	0.3738	0.1691
14	JZL85	197/213/222	3	3	3	3	1.94	2.04	1.74	1.58	0.5345	0.4828	0.4138	0.6000	0.4895	0.5180	0.4292	0.3694	0.4368	0.4463	0.3846	0.2992
15	Lma21	159/171/189	3	3	3	3	2.37	2.29	2.12	1.94	0.6034	0.431	0.5862	0.5429	0.5834	0.5710	0.5324	0.4895	0.4882	0.4659	0.4385	0.3757
16	Mdo7	159/176	2	2	2	2	1.51	1.47	1.19	1.62	0.3621	0.5172	0.1724	0.2857	0.3411	0.3246	0.1589	0.3868	0.2810	0.2688	0.1451	0.3099
17	Mdo6	146/151	2	2	2	2	1.42	1.25	1.47	1.25	0.2931	0.0345	0.3276	0.1714	0.2991	0.2054	0.3207	0.3420	0.2525	0.1820	0.2674	0.3324
18	Msal21	196	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	平均值	Mean	2.39	2.39	2.44	2.33	1.96	1.91	1.98	1.81	0.4895	0.4802	0.4579	0.4206	0.4615	0.4454	0.4621	0.3916	0.3791	0.3659	0.3764	0.3257

注: Sp0 为选育基础群体; Sp2 为驯食第二代群体; Sp3 为驯食第三代群体; Sp4 为驯食第四代群体。下同

Notes: Sp0: Foundation group; Sp2: Second generation group; Sp3: Third generation; Sp4: Fourth generation. The same as below

基因44个。Sp0、Sp2、Sp3和Sp4群体平均等位基因数(N_a)分别为2.39、2.39、2.44和2.33; 平均有效等位基因数(N_e)分别为1.96、1.91、1.98和1.81; 平均观测杂合度(H_o)分别为0.4895、0.4802、0.4579和0.4206; 平均期望杂合度(H_e)分别为0.4615、0.4454、0.4621和0.3916; 平均多态信息含量(PIC)分别为0.3791、0.3659、0.3764和0.3257。

2.2 各世代间的 F -检验

利用 POPGEN 3.2 软件进行各世代间 F -检验, 结果见表 3, 对 F_{is} 值的计算显示, 各世代群体均表现出杂合子缺失, Sp0、Sp2、Sp3 和 Sp4 杂合子缺失位点数分别为 10、12、5 和 8 个。分析位点 F_{st} 值, 共 5 个位点达到高度分化程度($0.15 < F_{st} < 0.25$), 4 个位点低度分化 ($F_{st} < 0.05$), 9 个位点中度分化 ($0.05 < F_{st} < 0.15$), 表明 4 个群体之间出现一定遗传分化。

表 3 18 个微卫星位点的 F -检验

Tab.3 The F -statistics of eighteen microsatellite loci

位点 Loci	F_{is}				F_{st} All groups
	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4	
JZL12	-0.1005	-0.1959	-0.0526	-0.0605	0.2265
JZL23	-0.4146	-0.2553	0.0217	-0.2097	0.0201
JZL31	-0.3333	0.1167	-0.3317	-0.1048	0.1240
JZL36	0.1935	-0.0204	0.1192	0.2420	0.1873
JZL40	0.1935	-0.0204	0.1192	0.2101	0.1889
JZL43	-0.3976	-0.3976	-0.0391	-0.1727	0.0284
JZL48	-0.0087	-0.1435	0.1898	-0.2655	0.1020
JZL59	0.2609	0.0312	0.1954	0.0861	0.0953
JZL60	-0.3396	0.0255	-0.0345	0.0554	0.1098
JZL67	0.2256	0.2363	0.0761	0.0266	0.0478
JZL68	-0.0087	-0.0770	0.1667	0.1685	0.2573
JZL83	-1.0000	-0.3235	0.1911	-0.1724	0.1495
JZL84	-0.3182	-0.0770	0.1667	0.1685	0.2573
JZL85	0.1118	-0.1014	-0.1751	0.0276	0.0500
Lma21	-0.3488	-0.0434	0.0355	-0.1107	0.1100
Mdo7	0.0113	-0.0708	0.1071	-0.0943	0.0660
Mdo6	0.0286	0.0115	0.1532	0.0304	0.0725
Msal21	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
平均值 Mean	-0.1247	-0.0725	-0.0505	-0.0097	0.1163

2.3 群体间的遗传分化

利用 ARLEQUIN 3.2 软件分析 4 个大口黑鲈群体间的遗传分化指数(F_{st})值(表 4, 对角线上), 表明 4 个大口黑鲈群体间的 F_{st} 介于 0.01612~0.16162 之间, 为轻度分化或中度分化。在 AMOVA 分析中, 对 4 个大口黑鲈群体进行分析, 结果显示, 有 8.38% 的遗传变异来自于群体间, 91.62% 的遗传变异来自群体内(表 5)。

表 4 4 个大口黑鲈群体的遗传距离(对角线下)和遗传分化指数(对角线上)

Tab.4 Nei's genetic distance (below diagonal) and pairwise F_{st} (above diagonal) among four largemouth bass populations

群体 Population	Sp0	Sp2	Sp3	Sp4
Sp0	****	0.11692	0.15039	0.16162
Sp2	0.0995	****	0.01902	0.01612
Sp3	0.1415	0.0344	****	0.02795
Sp4	0.1434	0.0249	0.0295	****

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传分化指数

Notes: The data below the diagonal represent genetic distance, data above the diagonal represent genetic pairwise F_{st}

2.4 群体间遗传距离和聚类分析

依据 Nei(1978)计算群体间的遗传距离(D_a)结果表明(表 4, 对角线下), 4 个大口黑鲈群体间的遗传距离较近, 其中 Sp2 和 Sp4 群体的遗传距离最近($D_a=0.0249$), Sp0 和 Sp4 群体的遗传距离最远($D_a=0.1434$)。UPGMA 聚类图显示, 4 个大口黑鲈群体, Sp2 和 Sp4 最先聚类, 然后与 Sp3 聚类, 最后与 Sp0 聚在一起(图 1)。



图 1 基于 Nei's 遗传距离构建的 4 个大口黑鲈群体的 NJ 聚类树

Fig.1 NJ clustering using Nei's unbiased genetic distance (1978) of four largemouth bass populations

表 5 4 个大口黑鲈群体的 AMOVA 分析

Tab.5 AMOVA analysis among four largemouth bass populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance component	百分率 Percentage(%)
群体间 Among populations	3	141.600	0.40136	8.38
群体内 Within populations	428	1877.944	4.38772	91.62
总变异 Total	431	2019.544	4.78908	

3 讨论

3.1 选育基础群体的选择

良种是养殖产业的基础,而选择合适的选育基础群体,是良种选育的关键,并直接决定良种选育进程和效果。大口黑鲈“优鲈1号”是在1983年从中国台湾引入大陆经长期养殖自然选留的大口黑鲈群体为奠基种群选育而来,因经长期自然选择,该品种已经很好地适应中国养殖环境和养殖模式,并且生长性状优良,整齐度较好,是进一步良种选育理想的奠基种(李胜杰等,2011)。利用分子标记方法研究国内大口黑鲈遗传多样性显示,中国大口黑鲈群体遗传多样性比原种地低,并出现了一定水平的近交(樊佳佳等,2012)。2010年,本研究团队从美国引进大口黑鲈北方亚种原种,在中国水产科学研究院珠江水产研究所广州良种基地进行隔离繁殖和养殖,经生长对比分析发现,其生长速度较国内养殖群体慢,推测大口黑鲈引进群体还未完全适应中国水产养殖环境和养殖模式(刘海涌等,2015)。樊佳佳等(2012)研究分析了中国和引进的大口黑鲈遗传多样性,表明引进群体多样性水平显著高于国内养殖群体,引进的大口黑鲈北方亚种选育潜力较大,可作为大口黑鲈新品种选育重要的奠基种群(樊佳佳等,2012)。鉴于此,选择大口黑鲈“优鲈1号”和大口黑鲈北方亚种引进群体作为选育基础群体进行培育进食人工配合饲料大口黑鲈新品种。本研究选用 *Mdo6* 和 *Msal21* 这2个亚种特异性标记对4个选育群体进行扩增,结果表明, *Msal21* 在各选育世代个体仅存在196 bp大口黑鲈北方亚种特异条带, *Mdo6* 存在146 bp和151 bp条带,不存在佛罗里达亚种的153 bp特异条带,表明选育的食人工配合饲料大口黑鲈群体均为大口黑鲈北方亚种(Lutz-Carrillo *et al.*, 2006)。

3.2 选育群体的遗传多样性分析

群体的遗传多样性水平,最常用 N_a 、 H_e 和 PIC 等指标来评估,多样性水平高低与群体的遗传潜力的大小相关,所以也是常用来作为品种选育世代遗传潜力趋势的一种常用手段(侯宁等,2007)。本研究选用18个微卫星对4个大口黑鲈选育世代进行遗传多样性监测,所选用的微卫星位点除了 *Msal21* 是单态外,其他 N_a 为2~4个,其中,除了 *JZL60* 标记在 Sp3 群体比其他群体多1个等位基因(180 bp),其他标记等位基因数在4个世代均相同,推测 *JZL60* 标记在 Sp3 部分个体可能发生突变。 H_e 是评价群体遗传变异程度

和遗传结构最适指标之一,是反映群体内所有等位基因的丰富程度和分布状况,揭示群体的生存和适应能力以及进化程度, H_e 的高低与其生命力和适应能力成正相关(Botstein *et al.*, 1980)。本研究 Sp0 的 H_e 为0.4615,梁素娴等(2008)利用相同的微卫星标记对早期国内3个养殖大口黑鲈群体 H_e 分析(分别为0.375、0.403和0.368),表明通过选择引种的北方亚种原种作为选育基础群体,大大提高了选育群体的杂合度。除了 *Msal21* 标记外,其他标记的 PIC 在0.1451~0.5864之间, Sp0 群体的平均 PIC 为0.3791,根据 Botstein 等(1980)对多态信息含量指数的界定,4个群体均处于中度多态水平,高于梁素娴等(2008)用相同微卫星标记评估早期国内养殖大口黑鲈群体 PIC 值(分别为0.2392、0.3047和0.3610),说明国外种质引进一定程度上提高了群体遗传多样性, Sp0、Sp2、Sp3 和 Sp4 群体 PIC 值均为中度多态性,表明大口黑鲈选育群体仍具有选育潜力。

随着大口黑鲈选育世代增加,除了 Sp3 外,选育群体的 H_e 和 PIC 均表现为逐步降低的趋势,反映了人工选择育种会引起群体遗传多样性下降,推测经过人工选育,群体的目标性状相关的遗传基因逐步趋向纯化,最终形成稳定品系。但分析过程发现, Sp3 的 H_e 和 PIC 均比 Sp2 数值高。管云雁等(2013)在分析马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)选育群体4个世代遗传变异中也发现, JCS-3 群体的 H_e (0.361)比 JCS-2 群体 H_e 数值高(0.317)。池喜峰等(2010)分析鲤(*Cyprinus carpio*)易捕性状选育群体不同世代遗传多样性,也存在相同现象,他们分析原因均为实验样本量小造成的,本研究出现这种现象可能也是取样造成的,另外, Sp3 的 *JZL60* 标记比其他群体多1个等位基因,也是造成其 H_e 和 PIC 数值较高的主要因素。

通过对位点进行 F_{is} 分析,发现各群体均表现为杂合子缺失,推测与选育群体亲本被高强度选择有关。分析群体间遗传距离表明, Sp0 与其他群体遗传距离均较远(0.0995~0.1434),而 Sp2、Sp3 和 Sp4 遗传距离较近(0.0249~0.0344),推测通过人工选育,选育基础群体通过饲料驯化,由于其食物由冰鲜鱼转到配合饲料,大部分个体被淘汰,造成 Sp0 与后面选育世代遗传距离较大。分析群体间变异,大部分来自个体之间,仅8.39%的遗传变异来自自世代之间。综上所述,对驯食配合饲料的大口黑鲈4个选育世代进行分析表明,经过选育期望杂合度、遗传多样性水平和遗传距离等均有下降趋势,表明人工选育性状基因趋于纯合。但群体遗传多样性仍为中度多态性,表明其继续人工选育的遗传潜力还是足够的,可以继续遗传选育。

参 考 文 献

- Bai JJ, Li SJ. Current status and development trend on China largemouth bass industry. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31(5): 104–108 [白俊杰, 李胜杰. 我国大口黑鲈产业现状分析与对策. *中国渔业经济*, 2013, 31(5): 104–108]
- Bailey RM, Hubbs CL. The black basses (*Micropterus*) of Florida, with description of a new species. *University of Michigan Museum of Zoology Occasional Papers*, 1949, 516: 1–40
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Chi XF, Jia ZY, Li CT, *et al.* SSR analysis of selected high-harvesting populations of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(3): 308–313 [池喜峰, 贾智英, 李池陶, 等. 鲤易捕性状选育群体不同世代微卫星分析. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(3): 308–313]
- Colbourne JK, Neff BD, Wright JM, *et al.* DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(2): 342–349
- DeWoody JA, Avise JC. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3): 461–473
- Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564–567
- Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of largemouth bass with microsatellite. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4): 600–609 [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星DNA指纹图谱的构建和遗传结构分析. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 600–609]
- Fan JJ, Bai JJ, Li XH, *et al.* Identification of microsatellite markers associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.). *Hereditas*, 2009a, 31(5): 515–522 [樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 等. 大口黑鲈生长性状的微卫星DNA标记筛选. *遗传*, 2009a, 31(5): 515–522]
- Fan JJ, Bai JJ, Ye X, *et al.* Taxonomic status of largemouth bass cultured in China. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009b, 24(1): 83–86 [樊佳佳, 白俊杰, 叶星, 等. 中国养殖大口黑鲈的亚种分类地位探讨. *大连水产学院学报*, 2009b, 24(1): 83–86]
- Guan YY, Liu WG, He MX. Genetic variation during four generations of selective breeding in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 764–770 [管云雁, 刘文广, 何毛贤. 马氏珠母贝选育群体4个世代的遗传变异. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 764–770]
- Hou N, Zhang Y, Lu CY, *et al.* Genetic potential analysis of Germany mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellite markers. *Hereditas*, 2007, 29(12): 1509–1518
- [侯宁, 张研, 鲁翠云, 等. 微卫星DNA标记分析德国镜鲤的遗传潜力. *遗传*, 2007, 29(12): 1509–1518]
- Kalinowski T, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106
- Li R, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Analysis on genetic structure of selected population of largemouth bass by microsatellite DNA markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2010, 30(3): 11–15 [李榕, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈选育群体遗传结构的微卫星分析. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 11–15]
- Li SJ, Bai JJ, Wang HY. The introduction of new varieties in Youlu No.1 largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Scientific Fish Farming*, 2011(9): 46–47 [李胜杰, 白俊杰, 汪洪永. 大口黑鲈“优鲈1号”新品种简介. *科学养鱼*, 2011(9): 46–47]
- Li T, Li W, Zhao J, *et al.* Correlation analysis of the microsatellite DNA markers and growth traits of Chinese soft shell turtle (*Trionyx sinensis*). *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 63–71 [李婷, 李伟, 赵建, 等. 中华鳖(*Trionyx sinensis*)微卫星标记与生长性状的相关分析. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 63–71]
- Liang SX, Sun XW, Bai JJ, *et al.* Genetic analysis for cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China with microsatellites. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(5): 694–700 [梁素娴, 孙效文, 白俊杰, 等. 微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析. *水生生物学报*, 2008, 32(5): 694–700]
- Liu HY, Li SJ, Bai JJ. Comparison and analysis of growth performance of breeding population and imported population of largemouth bass. *Journal of Aquaculture*, 2015(9): 1–5 [刘海涌, 李胜杰, 白俊杰. 大口黑鲈养殖群体和引进群体生长性能的比较分析. *水产养殖*, 2015(9): 1–5]
- Lutz-Carrillo DJ, Nice CC, Bonner TH, *et al.* Admixture analysis of Florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2006, 135(3): 779–791
- MacEina MJ, Murphy BR. Stocking Florida largemouth bass outside its native range. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1992, 121: 686–691
- Malloy TP, van den Bussche RA, Coughlin WD, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in smallmouth bass, *Micropterus dolomieu* (Teleostei: Centrarchidae), and cross-species amplification in spotted bass, *M. punctulatus*. *Molecular Ecology*, 2000, 9(11): 1946–1948
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590
- Sun CF, Ye X, Dong JJ, *et al.* Genetic diversity analysis of six cultured populations of *Macrobrachium rosenbergii* using microsatellite markers. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 20–26 [孙成飞, 叶星, 董浚键, 等. 罗氏沼虾6个养殖群体遗传多样性的微卫星分析. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 20–26]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang J, Wang QY, Kong J, *et al.* SSR analysis on genetic diversity in breeding and wild populations of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 104–111 [王军, 王清印, 孔杰, 等. 中国明对虾人工选育群体与野生群体遗传多样性的 SSR 分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 104–111]
- Wang RF, Li J, Li JT, *et al.* Genetic analysis of 33 microsatellite loci in 3 families of *Exopalaemon carinicauda* inbred line. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 78–86 [王日芳, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)近交系 3 个家系 33 个微卫星座位的遗传分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 78–86]
- Wu RQ, Huang ZH, Lu MX. Nutritional requirements of largemouth bass and prospect of its commercial feed. *Guangdong Feed*, 2004, 13(2): 38–39 [吴锐全, 黄樟翰, 卢迈新. 大口黑鲈营养研究及配合饲料发展前景. *广东饲料*, 2004, 13(2): 38–39]
- Yuan WC, Ye JM, Huang HZ, *et al.* Study on correlation of EST-SSR markers with growth traits and genetic structure of 4 breeding populations in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 224–231 [袁文成, 叶金明, 黄鹤忠, 等. 翘嘴鲻(*Siniperca chuatsi*) EST-SSR 标记与生长性状相关性及其 4 个选育群体遗传结构研究. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 224–231]
- Zhang TS, Wang QY, Liu P, *et al.* Genetic diversity analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellites. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(1): 72–80 [张天时, 王清印, 刘萍, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 72–80]

(编辑 马瑾艳)

Analysis on Genetic Diversity of Three Breeding Populations of Largemouth Bass Using Formulated Feeds

FAN Jiajia, BAI Junjie, LI Shengjie^①, MA Dongmei, JIANG Peng

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is a very important fish in commercial farming. As it is a carnivorous teleost, a large amount of forage fish and fish meal were used as food for largemouth bass every year. Residual forage fish and fish meal not only increase the costs of largemouth bass aquaculture, but also seriously pollute water bodies and farm lands. In order to reduce farming costs and protect the natural environment, selective breeding suitable for formulated feeds was carried out. In 2012, our research team selected the breeding population contain Youlu No.1 largemouth bass and introduced north largemouth bass. The genetic structure of largemouth bass breeding population was analyzed based on microsatellite DNA markers. A total of 240 individuals, from the foundation population (Sp0), the second generation group (Sp2), the third generation group (Sp3), and the fourth generation group (Sp4) (60 individuals per population) were assayed with 18 microsatellites. The results showed that a total of 44 alleles were identified, the numbers of alleles (N_a) were 1~4 in four selected populations, respectively. The observed heterozygosity (H_o) of Sp0, Sp2, Sp3 and Sp4 was 0.4895, 0.4802, 0.4579 and 0.4206, respectively; the expected heterozygosity (H_e) was 0.4615, 0.4454, 0.4621 and 0.3916, respectively; the polymorphism information content (PIC) of Sp0, Sp2, Sp3 and Sp4 was 0.3791, 0.3659, 0.3764 and 0.3257, respectively. The F_{st} value is between 0.01612 and 0.16162, and the genetic distance (D_a) is between 0.0249 and 0.1434. Partitioning of the genetic variation revealed that only 8.38% genetic variation was among the populations, and the other genetic variation was within the populations. The results showed that the artificially selected population using formulated feeds showed moderate genetic diversity, and still had great potential for future selective breeding.

Key words *Micropterus salmoides*; Formulated feed; Breeding population; Microsatellite; Genetic diversity

① Corresponding author: LI Shengjie, E-mail: ssjli@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180529002

http://www.yykxjz.cn/

司飞, 王青林, 于清海, 刘洪波, 姜涛, 杨健, 王俊. 基于投喂法的牙鲆耳石锶标记. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 65–72
Si F, Wang QL, Yu QH, Liu HB, Jiang T, Yang J, Wang J. Use of strontium chloride in otolith marking of Japanese flounder. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 65–72

基于投喂法的牙鲆耳石锶标记*



司 飞¹ 王青林¹ 于清海¹ 刘洪波²
姜 涛² 杨 健² 王 俊^{3①}

(1. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站 秦皇岛 066100; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室(青岛) 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071)

摘要 本研究首次采用投喂标记饲料的方法, 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)耳石锶(Sr)标记进行研究。实验组设置 1、8、64 g/kg (SrCl₂·6H₂O/饲料) 3 个梯度, 无 SrCl₂·6H₂O 添加饲料为对照组, 投喂标记饲料 10 d, 再养殖 30 d 后采样。利用 EPMA 对样本的耳石进行线性定量和面分析, 检测耳石 Sr 标记效果。结果显示, 8、64 g/kg 实验组耳石均出现 Sr 标记。8 g/kg 组耳石 Sr 标记峰值为对照组的 2 倍, 64 g/kg 组耳石 Sr 标记峰值较对照组分别高 6 倍和 18 倍, Sr 标记峰值随着标记饲料浓度增加而增大。对各梯度组生长研究发现, 1、8 g/kg 梯度组全长分别为(11.11±1.32) cm 和(10.88±1.07) cm, 差异不显著($P>0.05$), 1、8 g/kg 梯度组与 0、64 g/kg 梯度组全长差异显著($P<0.05$), 说明摄食适量 Sr 元素, 可促进鱼体生长。标记期间, 各梯度组均未出现实验鱼死亡, 表明 Sr 元素对牙鲆安全无毒。本研究为海水鱼类耳石元素指纹标记探索了新的标记途径, 为科学进行牙鲆增殖放流效果评估积累了参考资料。

关键词 锶标记; 耳石; 牙鲆

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0065-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是亚洲沿岸分布的唯一鲆科鱼类, 因其个体大、味道鲜美, 是东亚各国重要的海水经济鱼类。近年来, 由于沿海污染严重, 加之捕捞过度, 牙鲆自然资源显著减少(陈睿毅等, 2013; 童爱萍等, 2015)。我国在 20 世纪 80 年代开始进行牙鲆增殖放流研究(吴鹤洲等, 1987), 但规模不大, 以放流品种平均年放流量为指标统计, 2004 年牙鲆仅占放流鱼类总量的 7%(刘莉莉, 2007), 累计放流约 70 万尾(张秀梅等, 2009)。从 2005 年开始, 随着政府各部门投入的增加, 牙鲆增殖放流数量增大(宋娜

等, 2010), 目前, 牙鲆已成为我国海水鱼类增殖放流的主要品种之一。但是, 单纯一味追求放流数量的增长并不能一定起到很好的增殖效果, 关键要进行放流策略的研究以及放流效果的评估(刘琦, 2009)。

准确有效地鉴别放流牙鲆是进行放流效果评估的前提。目前, 在牙鲆放流中常用的标记手段包括生态标记、体外标记、体内标记和分子标记(于广宝等, 2016; 刘芝亮等, 2013; 徐永江等, 2017; Sekino *et al*, 2005; Liu *et al*, 2017)。其中, 生态标记、耳石荧光标记存在消退问题(朱学武等, 2017), 体外标记(挂牌法)

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303050)资助 [This work was supported by Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303050)]. 司 飞, E-mail: 15032316117@163.com

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

收稿日期: 2018-05-29, 收修改稿日期: 2018-06-15

适用于大规格苗种,目前,放流牙鲆的规格(体长 5 cm 左右)限制了体外标记的使用。分子标记需要明确所有参与繁殖亲本的遗传学信息(童爱萍, 2015), 目前,我国放流实施单位多、苗种来源不明等,现阶段很难构建参与繁殖亲本群体的遗传学信息数据库(罗刚等, 2016)。因此,急需开发一种适合大规模牙鲆的群体标记方法。

耳石元素指纹标记是鱼类标记放流研究领域中的一项重要技术手段。耳石是鱼类内耳自然生物矿化沉积形成的碳酸钙结构,是鱼类形成最早的硬组织,其微结构可以用来判读鱼类的年龄等生物学信息,而沉积其中的元素信息则记录了鱼类过去生活过的环境信息(王玉堃, 2015)。水环境中的化学元素通过鱼类鳃部等组织进入血液,经过血液传输等一系列生理过程沉积在耳石生长轮上(窦硕增等, 2011),形成不同的生境元素沉积特征,即元素指纹(Elemental fingerprints)。锶(Sr)元素常被用于反演洄游性鱼类的海、淡水生境履历,进而了解并重建其资源的时空动态、产卵场位置、群体关联性等重要渔业信息。因此,人为提高水体中 Sr 浓度,达到异常增加耳石中局部 Sr 含量、形成特殊的 Sr 元素指纹标记的目的。该标记技术在溯河性鱼类中研究较为广泛(Skalski *et al.*, 2009; Schroder *et al.*, 1995),在淡水鱼类中的应用也有报道(李秀启等, 2017),但在海水鱼标记放流中的应用尚未见报道。此外,以往报道多为在养殖

水体中直接添加 Sr 化合物进行标记,但缺乏通过饵料食源进行 Sr 标记的研究。因此,本研究拟探讨通过饵料的应用进行牙鲆耳石 Sr 元素指纹标记的可行性,并获取最适暴露浓度等重要参数,以期科学进行牙鲆增殖放流效果评估、优化牙鲆增殖放流策略提供科学依据,同时,也为海水鱼类耳石微化学标记工作提供重要的基础信息和技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验方法

本实验于 2016 年 6 月 24 日在中国水产科学研究院北戴河中心实验站开始进行,实验鱼为 80 日龄、全长(6.58±0.59) cm 的牙鲆幼鱼。实验鱼养殖在 300 L 玻璃钢圆形水槽内,每天 08:00 和 14:00 各投喂 1 次含氯化锶的配合饲料。实验设 0、1、8、64 g/kg 4 个 Sr 标记饲料梯度(SrCl₂·6H₂O g/颗粒饲料 kg),持续标记 10 d。各梯度组实验鱼规格一致,数量均为 400 尾。标记期间,各梯度投喂量为鱼体总重的 2%,实验鱼摄食完毕后立刻吸底,保证各梯度均无残饵。上午投喂结束后,换水清槽,然后加过滤海水并保持 24 h 流水,换水量为 5 个循环。标记期间记录各梯度实验鱼死亡率,标记后 30 d 测量记录实验鱼生长性状并采集样本,-20℃保存。各梯度组均选取 2 个样本进行耳石微化学分析(表 1)。

表 1 牙鲆耳石微化学分析样品信息

Tab.1 Sampling details of Japanese flounder for otolith microchemical analysis

耳石编号 Otolith code	实验鱼编号 Fish code	饲料标记 Feed marking (g/kg)	恢复时间 Day after marking(d)	全长 Total length (cm)	体重 Body weight (g)
BDHFE01	0-30-1	对照组 Control		9.3	8.7
BDHFE02	0-30-2			9.9	11.1
BDHFE03	1-30-1			9.9	7.7
BDHFE04	1-30-2	1	30	9.2	6.7
BDHFE05	8-30-1	8		9.9	13.6
BDHFE06	8-30-2			9.6	8.7
BDHFE07	64-30-1	64		10.1	9.7
BDHFE08	64-30-2			9.9	9.4

1.2 耳石采集及前处理

由于测试成本较高,各梯度组分别选取大小相对一致的 2 尾实验鱼采集耳石。利用剪刀、尖头镊等工具将矢耳石取出后,用清水、酒精清洗,38℃烘干。

将烘干耳石样本用 AB 胶固定在包埋盒底座上,室温静置 20 min,用环氧树脂(Epofix, 丹麦 Struers 公司; resins 与 hardener 质量比 7:1)包埋,38℃烘干 12 h 以上。用 AB 胶将包埋块固定在载玻片上,经 2 h 凝固后使用装配有金刚石磨轮的碾磨机(Discoplan-TS

型, 丹麦 Struers 公司)切割琢磨。切割后标本经初磨(500 目砂轮)、精磨(1200 目砂纸)打磨至耳石核心暴露, 用磨抛机(LabPol-35, 丹麦 Struers 公司)装备织布机抛光盘配合抛光液抛光, 至耳石表面无明显划痕。样品放入超纯水中超声清洗 5 min 后, 自然条件下晾干 24 h, 完全干燥后, 使用真空镀膜机(JEE-420, 日本电子株式会社)蒸镀碳膜(36 A, 25 s)。为增加可比性, 本实验统一使用左矢耳石进行元素指纹分析。

1.3 耳石元素指纹分析

使用日本电子株式会社的 JXA-8100 型电子探针微区分析仪(EPMA)进行耳石 Sr 和 Ca 的微化学分析。自耳石核心沿最长径至耳石边缘的一条直线进行定量线分析(Line transect analysis)。由于耳石中 Sr 离子含量远小于 Ca 离子含量, 按照国际惯例将 Sr/Ca 离子含量比值标准化, 即统一用 Sr 离子含量与 Ca 离子含量 $\times 10^3$ 的比值表示。EPMA 的参数设定: 加速电压为 15 kV, 电子束电流为 2.0×10^{-8} A; 束斑直径为 2 μm , 每点驻留时间 15 s; 以间距 4 μm 连续进行打点测定。标准样品使用碳酸钙(CaCO_3)和钛酸锶(SrTiO_3)。所有耳石线分析完后再进行面分析(Mapping analysis)。这时, EPMA 加速电压和电子束电流分别为 15 kV, 5.0×10^{-7} A, 束斑直径为 2 μm , 每点驻留时间为 30 ms, 像素为 $4 \times 4 \mu\text{m}$ 。

1.4 数据处理

利用 Excel 2010 对定量线分析检测的 Sr、Ca 含量及 Sr/Ca 比值、测定点、耳石径等数据进行整理及处理, 并对 Sr/Ca 比值作图。使用 SPSS 19.0 软件对各梯度组的不同阶段 Sr/Ca 比值及生长数据进行 Duncan 多重比较, 检验各梯度组的不同阶段与对照组 Sr/Ca 比值及生长差异性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 各梯度组牙鲆耳石定量线分析的 Sr/Ca 比值

图 1 为恢复养殖 30 d 牙鲆耳石定量线分析结果。对照组和 1 g/kg 梯度组均保持相对稳定的 Sr/Ca 值 ($P > 0.05$), 未出现 Sr/Ca 比值高峰, 说明 1 g/kg 梯度组未形成明显的 Sr 元素指纹标记。8 g/kg 和 64 g/kg 梯度组分别形成 1~2 个 Sr/Ca 比值波峰, Sr 峰区 Sr/Ca 比值较对照组差异显著 ($P < 0.05$), 说明 8 g/kg 和 64 g/kg 梯度组均形成了明显的 Sr 元素指纹标记。进一步分析得知, 8 g/kg 梯度组的 BDHFE-5 在距离耳石核心的 780 μm 处开始 Sr/Ca 比值明显增大, 904 μm 处之

后 Sr/Ca 比值趋于平稳, 即 BDHFE-5 在距离耳石核心的 780~904 μm 处耳石区段形成波峰, 最高峰值为 10.18; BDHFE-6 在距离耳石核心的 780~956 μm 处耳石区段形成波峰, 最高峰值为 10.73; 64 g/kg 梯度组的 BDHFE-7 在距离耳石核心的 640~724 μm 处耳石区段形成波峰, 最高峰值为 62.60; BDHFE-8 在距离耳石核心的 560~684 μm 处耳石区段形成波峰, 最高峰值为 143.64。8 g/kg 梯度组 Sr 峰值为正常均值倍数为 2.14~2.22, 64 g/kg 梯度组 Sr 峰值为正常均值倍数上升至 6.60~18.27, 表明随浓度的增加, Sr 元素在耳石上的沉积明显增强(表 2)。

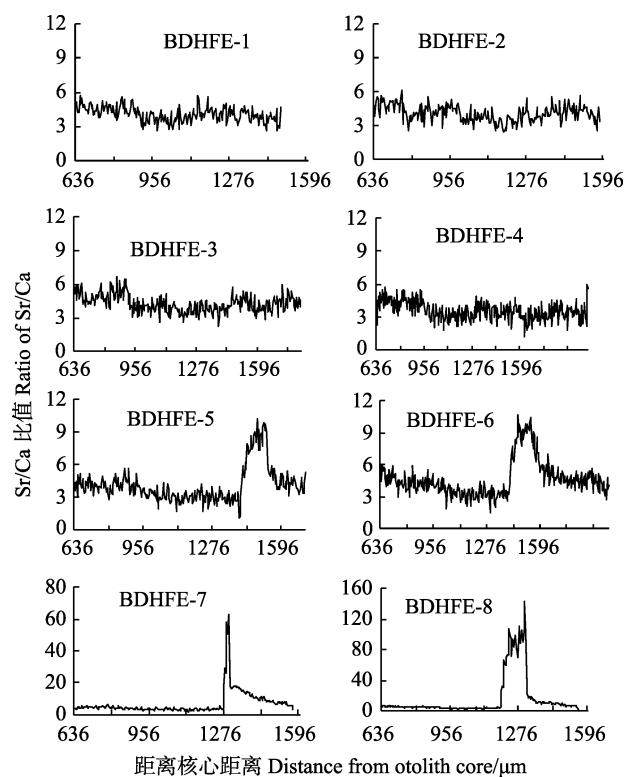


图 1 各梯度组牙鲆耳石定量线分析

Fig.1 Fluctuation of otolith Sr/Ca ratio along line transects from the core (0 μm) to the edge in the otoliths of Japanese flounder (*P. olivaceus*) from different concentration groups

2.2 各梯度组牙鲆耳石上锶元素的面分布

对标记后恢复 30 d 的对照组、1、8、64 g/kg 梯度组 Sr 元素在耳石上沉积的面分布进行上机分析, 结果见图 2。对照组和 1 g/kg 梯度组耳石上未出现“高锶环带”。8 g/kg 和 64 g/kg 梯度组均出现了红色“高锶环带”, 与耳石本底颜色对比明显。即 8 g/kg 和 64 g/kg 梯度组可对牙鲆幼鱼耳石进行明显 Sr 元素指纹标记。但 64 g/kg 梯度组“高锶环带”较 8 g/kg 梯度组的宽, 且 64 g/kg 梯度组“高锶环带”外延至耳石边缘颜色较 8 g/kg 梯度组的黄, Sr 含量较 8 g/kg 梯度组的高。

表2 不同浓度组牙鲆耳石 Sr/Ca 比值微化学变化

Tab.2 Fluctuation of Sr/Ca microchemistry in otoliths of Japanese flounder (*P. olivaceus*) from different concentration groups

饲料标记 Feed marking (g/kg)	耳石编号 Sample code	阶段 Phase	测定点数 Detected points	Sr/Ca 比值 Sr/Ca ratio	Sr 峰区均值为正常均值倍数 Multiples of average values of high Sr area to normal	Sr 峰值为正常均值倍数 Multiples of peak value of Sr to average value of normal
对照组 Control	BDHFE-1	I	215	4.12±0.66 ^a	—	—
	BDHFE-2	I	238	4.07±0.74 ^a	—	—
1	BDHFE-3	I	298	4.28±0.78 ^a	—	—
	BDHFE-4	I	354	3.58±0.82 ^a	—	—
8	BDHFE-5	I	195	3.47±0.81 ^a	2.22	2.93
		II	32	7.72±1.49 ^b		
		III	1(848 μm)	10.18		
		IV	42	4.37±0.70 ^a		
	BDHFE-6	I	195	3.84±0.84 ^a	2.14	2.79
		II	45	8.23±1.38 ^b		
		III	1(828 μm)	10.73		
		IV	104	4.46±0.74 ^a		
64	BDHFE-7	I	160	3.51±0.84 ^a	6.60	17.83
		II	22	23.15±14.06 ^c		
		III	1(660 μm)	62.60		
		IV	53	8.72±2.65 ^{bc}		
	BDHFE-8	I	140	4.27±1.08 ^a	18.27	33.64
		II	32	78.00±29.73 ^d		
		III	1(668 μm)	143.64		
		IV	59	9.64±3.47 ^{bc}		

注: I 为 Sr/Ca 比值相对稳定阶段, II 为 Sr/Ca 比值显著变化阶段, III 为 Sr/Ca 比值显著变化阶段的最高峰值, IV 为 Sr/Ca 比值显著变化后恢复阶段。同列不同上标字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: I: Stabilization stage of Sr/Ca ratio in otoliths; II: Stage of Sr/Ca ratio significantly changed in otoliths; III: Peak value of Sr/Ca ratio in otoliths; IV: Stage of Sr/Ca ratio after significantly changed in otoliths. Values in the same column with different letters are significantly different ($P<0.05$)

2.3 生长与死亡

由表 3 可知, 标记实验前各梯度组全长差异不显著 ($P>0.05$); 恢复 30 d, 1 和 8 g/kg 梯度组全长差异不显著, 对照组、64 g/kg 梯度组全长差异不显著, 1、8 g/kg 梯度组牙鲆全长显著大于对照组、64 g/kg 梯度组全长差异显著 ($P<0.05$)。标记期间, 各梯度组均未出现实验鱼死亡。

3 讨论

3.1 耳石锶标记及检测方法

耳石具有非细胞性和代谢惰性, 即使在饥饿时也不会发生重吸收, 沉积在耳石中的生境元素能永久性保存(熊瑛等, 2015)。因此, 人为适当改变鱼类周围

环境或食物中的元素含量极可能在耳石上产生元素标记, 并永久保存。Judd 等(1965)利用火焰发射光谱法将 Sr 元素检测极限降至 0.1 μg/ml 以下, 使 Sr 元素作为一种标记元素成为可能。

但有报道称, 随着标记鱼的生长, Sr 的相对含量逐渐下降, 最终造成 Sr 标记消失。如 Yamada 等(1979)对银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)进行 Sr 标记时发现, 标记结束后, 处理组 Sr 含量是对照组的 32 倍, 秋季回捕时处理组是对照组的 1.4 倍, 生长至成鱼后, 处理组与对照组无法区分。Steven 等(1995)也报道了此现象。其原因为原子吸收光谱法(AAS)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等检测方法只能检测均一化后的整体耳石样品。因此, 随着鱼体成长, 耳石上 Sr 标记部分所占比重越来越少, 从而限制了耳石上

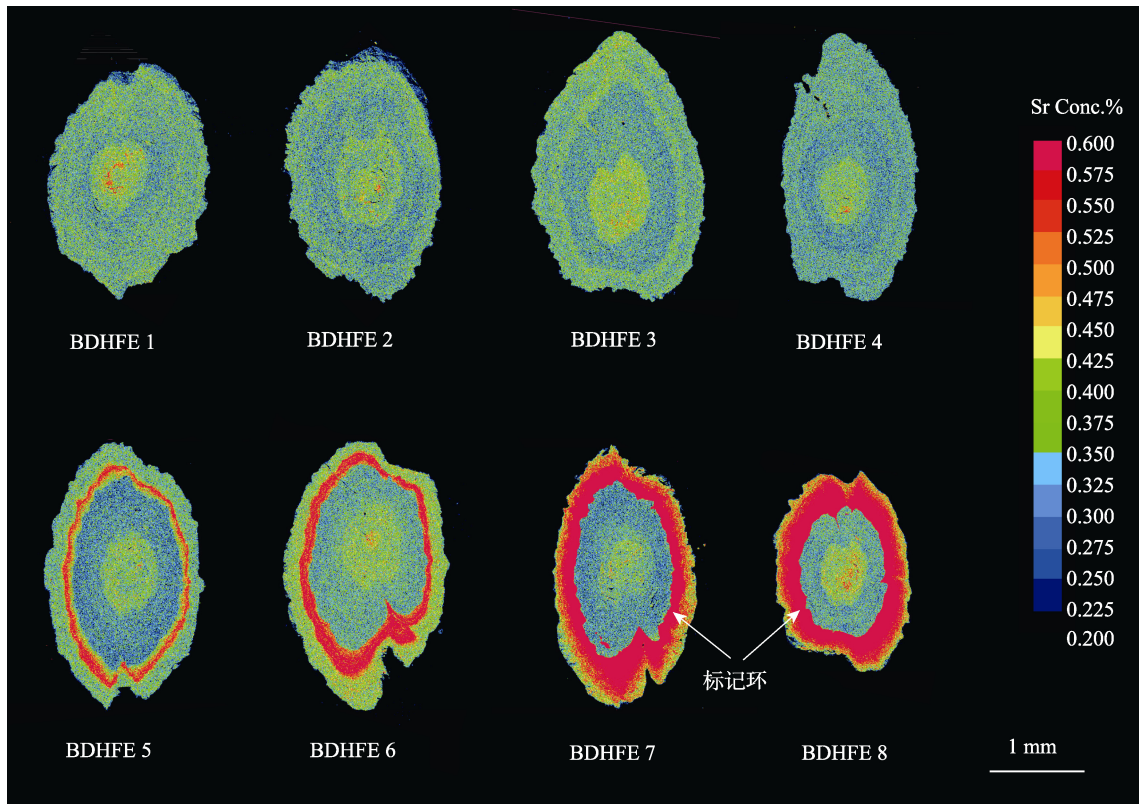


图 2 不同浓度组牙鲆耳石恢复 30 日锶沉积状况面分布

Fig.2 Sr concentration maps in otoliths of Japanese flounder (*P. olivaceus*) from different Sr concentration groups at 30 days after Sr marking experiments

表 3 不同 Sr 浓度组牙鲆全长变化情况($n=30$)

Tab.3 Variations of total length of Japanese flounder (*P. olivaceus*) from different Sr concentration groups ($n=30$)

项目 Items	饲料标记 Feed marking			
	对照组 Control	1 g/kg	8 g/kg	64 g/kg
初始 Initial	6.61±0.81 ^a	6.81±0.59 ^a	6.68±0.56 ^a	6.22±0.41 ^a
恢复 Resume 30 d	10.24±0.91 ^a	11.11±1.32 ^b	10.88±1.07 ^b	10.26±0.41 ^a
日增长率 Daily growth rate (cm/d)	0.12	0.14	0.14	0.13

注: 同行不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Values in the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$)

Sr 标记检出的效果。与之相比, EPMA 可以精确分析耳石剖面上的不同位置的 Sr 含量沉积情况, 从而不受标记鱼生长等限制, 可避免上述局限。通过定量线分析可以准确确定标记位置及标记 Sr 含量的波动; 通过面分布可直观测到 Sr 标记环宽窄、浓度的高低、标记位置等, 是一种检测耳石元素指纹标记的有效方法。

耳石 Sr 标记可在鱼类胚胎、仔稚鱼、幼鱼及成鱼等不同阶段标记, 对标记鱼死亡及生长影响很小, 操作简单, 劳动强度小, 适合大规模标记。耳石 Sr 标记不受年龄、生长等影响, 可通过多次标记、不同发育阶段或结合其他元素标记等方法, 区分不同年份

不同单位放流鱼, 应用前景广阔。

3.2 不同剂量外源锶对锶标记的影响

鱼类通过周围水环境或食物两种途径, 将元素摄入体内, 经过一系列的代谢、循环沉积到耳石上(付自东等, 2007; 王臣等, 2015; Troy *et al.*, 2016)。因此, Sr 标记可以通过浸泡和投喂两种方式完成。张辉等(2015)采用 Sr 含量为 12 mg/L 的海水标记大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 7 d, 标记出现在距离耳石核心的 0.65~0.80 mm 处耳石区段。王臣等(2015)研究表明, 外源 50~400 mg/L 浓度的 Sr 均能在大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)耳石上大量沉积, 50~200 mg/L

浓度组 Sr/Ca 比值极大值逐渐升高, 而 400 mg/L 低于 200 mg/L 组极大值。投喂法 Sr 标记在溯河性鱼类和淡水鱼类中研究较多, 检测对象多为鳞片、脊椎骨和鳃盖骨。Ophel 等(1968)研究发现, 以每 400 g 湿饲料中含 32 g 乳酸锶为标记饲料, 投喂 21 d, 标记金鱼(*Carassius auratus* var)的鳞片, 含 Sr 量大概是对照组的 10 倍。Yamada 等(1979)以 16 月龄的银大麻哈鱼为研究对象, 连续投喂 10000 mg/L 锶标记饲料 60 d 后形成 Sr 标记, 其脊椎骨 Sr 含量是对照组的 32 倍。Guillou 等(1987)研究发现, 全长 20~23 cm 溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)摄食 200~3200 μg Sr/g 的标记饲料 6 周, Sr 可对溪红点鲑鳃盖骨标记, 且鳃盖骨 Sr 含量随标记饲料 Sr 含量增加而增多; 同时其还发现投喂 6 周 200 μg Sr/g 含量的标记饲料, 鳃盖骨 Sr 含量约是对照组的 5 倍, 但投喂 4 周相同 Sr 含量的标记饲料, 鳃盖骨 Sr 含量增长不显著。但投喂法耳石 Sr 标记在海水鱼类中的应用未见报道。本研究首次采用投喂法对海水鱼进行耳石 Sr 标记, 研究发现, 1 g/kg 梯度组牙鲆耳石未出现 Sr 标记, 8、64 g/kg 梯度组牙鲆耳石均形成 Sr 标记, 且 64 g/kg 梯度组 Sr/Ca 比极大值较 8 g/kg 梯度组大, 其标记环较 8 g/kg 梯度组宽。由此可知, 首先, 通过饵料进行标记需要外源 Sr 达到一定剂量后才能在耳石上形成有效地标记; 其次, 在一定剂量范围内, Sr 沉积随外源 Sr 剂量的增加而增强。

本研究发现, 不同梯度组 Sr 标记位置不同, 相同梯度组 Sr 标记数据不稳定。如 8 g/kg 梯度组 Sr/Ca 比值极大值位于距耳石核心 838 μm 左右, 64 g/kg 梯度组 Sr/Ca 比值极大值位于距耳石核心 664 μm 左右。又如, 8 g/kg 梯度组 2 个样本 Sr/Ca 比值极大值分别位于距耳石核心 848、828 μm 处等。一方面高浓度组较低浓度组可能更早的在鱼体内富集到一定浓度水平的 Sr, 从而较早的在耳石上反映出来, 另一方面高浓度组也会导致鱼体内外源 Sr 浓度较高, 使得其恢复时间也要长于低浓度组。

3.3 锶标记对于标记鱼生长死亡的影响

稳定 Sr 是一种对鱼类无害的元素(Yamada, 1979), Skov 等(2001)研究发现, 白斑狗鱼(*Esox lucius*)在 1500 mg/L 氯化锶溶液中浸泡 23 h, 不影响其死亡率。张辉等(2015)研究表明, 加入 6 mg/L 锶的标记组与对照组死亡尾数差异不显著, 并指出了低浓度 Sr 标记大黄鱼是可行的。本研究发现, 处理组和对照组均未出现死亡现象, 即氯化锶对鱼类来说是安全的。因此, 从标记鱼死亡率和安全角度考虑, Sr 标记也是

可行的。

通过对不同梯度组生长数据分析可知, 在初始全长无差异的前提下, 处理组投喂含 Sr 饲料后, 生长发生了变化, 虽然变化不大, 但经 Duncan 多重比较, 低剂量梯度组(1、8 g/kg 组)较高剂量梯度组及对照组生长快, 且差异显著($P < 0.05$)。宋洪建(2013)研究发现, 当 Sr 浓度为 10 mg/L 时, 大麻哈鱼稚鱼的各项生长指标最高。因此, 可以推断在适宜的范围内, 一定剂量的 Sr 可促进鱼类生长。然而, 宋洪建(2013)通过 Sr 对大麻哈鱼稚鱼的生长、存活率、肌肉抗氧化酶、ATP 酶及 AKP 酶活性、肝脏及肾脏组织影响研究发现, 随着 Sr 浓度的升高, Sr 开始对肝组织产生一些毒副作用。Snyder 等(1992)研究指出, 高剂量 Sr 可导致虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)稚鱼眼组织白内障。因此, 在实际标记工作中, 建议选择低剂量 Sr 标记为宜。而结合本研究结果不难发现, 8 g/kg 的饲料标记浓度是牙鲆耳石 Sr 标记的较为可行且效果明显的浓度。

综上所述, 以投喂标记饲料的方式对牙鲆耳石 Sr 标记是可行的。类似的耳石元素指纹标记应该可对拟放流鱼类苗种进行大规模标记, 且一旦标记成功将不会受外界影响, 并一生保存。理论上, 耳石元素指纹标记成本低, 标记方法简便易操作, 对放流苗种损伤小。通过耳石微化学分析, 可区分放流群体和野生群体, 反演放流群体放流后生活史, 为有效评估放流效果提供有力技术支撑。但在后续的工作中还需进一步优化标记时间, 探索多次锶标记、不同元素组合标记等方法制备特有元素指纹标记, 以期大规模标记不同地域、不同年份放流牙鲆, 为科学评估牙鲆放流效果奠定基础, 为海水鱼类标记放流提供数据支撑。

参 考 文 献

- Chen RY, Wang GX, Liu HJ, *et al.* Difference in parental contribution to reproduction in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 698–705 [陈睿毅, 王桂兴, 刘海金, 等. 牙鲆亲本对子代贡献率的实验研究. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 698–705]
- Dou SZ, Yokouchi K, Yu X, *et al.* Reconstructing migratory history of fish using otolith strontium: Calciums ratios by EPMA: A case study. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 512–520 [窦硕增, 横内一树, 于鑫, 等. 基于 EPMA 的耳石 Sr : Ca 比分析及其在鱼类生活履历反演中的应用实例研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(4): 512–520]
- Fu ZD, Xie TM, Song ZB. Studies on elemental fingerprints in otolith of fish. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13(2): 278–283 [付自东, 谢天明, 宋昭彬.

- 鱼类耳石元素指纹研究进展. 应用与环境生物学报, 2007, 13(2): 278–283]
- Guillou A, Noüe JD. Use of strontium as a nutritional marker for farm-reared brook trout. Progressive Fish-Culturist, 1987, 49: 34–39
- Judd JM, Coveart AE. Flame emission spectrophotometric method for the determination of stable strontium and calcium in fish. Atomic Energy of Canada Limited, 1965, 2518: 21
- Li XQ, Cong XR, Shi JH, et al. Feasibility analysis of releasing individuals of *Aristichthys nobilis* identification based on otolith Sr markers. Journal of Lake Sciences, 2017, 29(4): 914–922 [李秀启, 丛旭日, 师吉华, 等. 耳石锶标记在识别鳊(*Aristichthys nobilis*)放流个体的可行性. 湖泊科学, 2017, 29(4): 914–922]
- Liu LL. Status of marine fishery resources enhancement and release in Shandong and the primary study of SD simulation. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [刘莉莉. 山东省海洋渔业资源增殖放流的发展现状及其 SD 仿真的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Liu Q. Japanese flounder marking techniques and juveniles released for stock enhancement. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [刘奇. 褐牙鲆标志技术与增殖放流试验研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Liu YX, Yang RQ, Liu Y, et al. Use of microsatellite DNA profiling to identify Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* of hatchery origin. Journal of the World Aquaculture Society, 2017, 48(2): 353–359
- Liu ZL, Xu YJ, Liu XZ, et al. Tagging of Japanese flounder using T-bar tags. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 80–86 [刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. T 型标志牌标记牙鲆苗种. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 80–86]
- Luo G, Zhuang P, Zhao F, et al. Development status existing issues and countermeasure in the selection of suitable species for stock enhancement. Marine Fisheries, 2016, 38(5): 551–560 [罗刚, 庄平, 赵峰, 等. 我国水生生物增殖放流物种选择发展现状、存在问题及对策. 海洋渔业, 2016, 38(5): 551–560]
- Ophel IL, Judd JM. Marking fish with stable strontium. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1968, 25(7): 1333–1337
- Schroder SL, Knudsen CM, Volk EC. Marking salmon fry with strontium chloride solutions. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52: 1141–1149
- Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. Aquaculture, 2005, 244: 49–61
- Skalski JR, Buchanan RA, Griswold J, et al. Review of marking methods and release-recapture designs for estimating the survival of very small fish: Examples from the assessment of salmonid fry survival. Reviews in Fisheries Science, 2009, 17(3): 391–401
- Skov C, Grønkvær P, Nielsen C. Marking pike fry otoliths with alizarin complexone and strontium: An evaluation of methods. Journal of Fish Biology, 2011, 59(3): 745–750
- Snyder RJ, McKeown BA, Colbow K, et al. Use of dissolved strontium in scale marking of juvenile salmonids: Effects of concentration and exposure time. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1992, 49: 788–782
- Song HJ. Allometric growth of chum salmon larvae and effects of strontium on physiological indices of their juveniles. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2013 [宋洪建. 大麻哈鱼仔鱼异速生长和锶对其稚鱼生理指标的影响. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Song N, Gao TX, Han G. Application of molecular marker in fishery stock enhancement. Chinese Fisheries Economics, 2010, 28(3): 111–117 [宋娜, 高天翔, 韩刚. 分子标记在渔业资源增殖放流中的应用. 中国渔业经济, 2010, 28(3): 111–117]
- Steven LS, Curtis MK, Eric CV. Marking salmon fry with strontium chloride solutions. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52: 1141–1149
- Tong AP, Si F, Liu HJ, et al. Application of mtDNA and microsatellite markers to distinguish the released or non-released Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 630–637 [童爱萍, 司飞, 刘海金, 等. mtDNA 和微卫星标记在放流牙鲆和非放流牙鲆鉴定中的应用. 中国水产科学, 2015, 22(4): 630–637]
- Tong AP. Application of mtDNA and microsatellite markers in Japanese flounder stock enhancement. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [童爱萍. mtDNA 和微卫星标记在放流牙鲆中的应用研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Troy J, Morgan HB, Thomas PQ. Can dietary reliance on Pacific salmon eggs create otolith Sr/Ca signatures that mimic anadromy in resident salmonids? Environmental Biology of Fishes, 2016, 99: 237–247
- Wang C, Liu W, Zhan PR, et al. Exogenous Sr^{2+} sedimentation on otolith of chum salmon embryos. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(10): 3189–3194 [王臣, 刘伟, 战培荣, 等. 外源 Sr^{2+} 在大麻哈鱼胚胎耳石上的沉积. 应用生态学报, 2015, 26(10): 3189–3194]
- Wang YK. Preliminary studies on the population ecology based on fish otolith microstructure and microchemistry. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [王玉堃. 耳石微细结构和微化学示踪技术在鱼类种群生态学中的应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- Wu HZ, Ruan HC, Wang XC, et al. Studies on the ecological basis of resources multiplication and stocking experiment on the false halibut *Paralichthys olivaceus* in Jiaozhou Bay. Marine Sciences, 1987, 6: 52–53 [吴鹤洲, 阮洪超, 王新成, 等. 胶州湾牙鲆资源增殖的生态学基础及种苗放流实验研究. 海洋科学, 1987, 6: 52–53]
- Xiong Y, Liu HB, Tang JH, et al. Application of otolith microchemistry on reconstruction of migratory patterns and stock discrimination in marine fishes. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(7): 953–959 [熊瑛, 刘洪波, 汤建华, 等. 耳石微化学在海洋鱼类回游类型和种群识别研究中的应用. 生命科学, 2015, 27(7): 953–959]
- Xu YJ, Liu XZ, Zhang K, et al. Tagging juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) with coded wire tags.

- Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 168–174 [徐永江, 柳学周, 张凯, 等. 编码金属标签对牙鲆苗种标记的效果. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 168–174]
- Yamada SB, Mulligan TJ, Fairchild SJ. Strontium marking of hatchery-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). Journal of Fish Biology, 1979, 14: 267–275
- Yu GB, Li G. The technology of seed rearing of Japanese flounder based on ecology mark. China Fisheries, 2016(7): 102–105 [于广宝, 李刚. 牙鲆生态标记放流鱼苗培育技术. 中国水产, 2016(7): 102–105]
- Zhang H, Jiang YZ, Yuan XW, *et al.* Strontium marking on otolith of *Larimichthys crocea*. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1270–1277 [张辉, 姜亚洲, 袁兴伟, 等. 大黄鱼耳石锶标志技术. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1270–1277]
- Zhang XM, Wang XJ, Tu Z, *et al.* Current status and prospect of fisheries resource enhancement in Shandong Province. Chinese Fisheries Economics, 2009, 2(27): 51–58 [张秀梅, 王熙杰, 涂中, 等. 山东省渔业资源增殖放流现状与展望. 中国渔业经济, 2009, 2(27): 51–58]
- Zhu XW, Xu YJ, Liu XZ, *et al.* Physiological mechanisms for degeneration of blind-side hypermelanosis in pond-cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 103–110 [朱学武, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)无眼侧体色黑化消褪机理. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 103–110]

(编辑 冯小花)

Use of Strontium Chloride in Otolith Marking of Japanese Flounder

SI Fei¹, WANG Qinglin¹, YU Qinghai¹, LIU Hongbo², JIANG Tao², YANG Jian², WANG Jun^{3①}

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

2. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao 266071)

Abstract In the management of stock enhanced Japanese flounder, it is often necessary to distinguish those that are hatchery-reared, from wild stocks. This study examines the feasibility of marking Japanese flounder by feeding them a diet enriched with strontium. To achieve nominally different concentrations of strontium in the fish food, 1, 8, and 64 g of strontium chloride crystals ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were each dissolved in 1 L of distilled water and sprayed onto 1 kg of pelleted feed. The treatments groups of fish were fed the pellets for 10 d, then farmed for 30 days, and then sampled. Our data shows that both the 8 g SrCl_2/kg feed and 64 g SrCl_2/kg feed resulted in a mark on the otoliths of the Japanese flounder. The peak concentration of strontium (8 g SrCl_2/kg), often resulted in otoliths with concentrations two orders of magnitude higher than those found in the control fish. The concentration of strontium in the 64 g SrCl_2/kg feed, resulted in a 6-fold or 18-fold increases in the otoliths. The strontium value increased with the increased concentration of strontium in the pellet feed. The results also showed that strontium was safe for the fish and did not negatively affect their mortality. The total body length of the treatment groups with 1 and 8 g SrCl_2/kg , were (11.11 ± 1.32) cm and (10.88 ± 1.07) cm, respectively, in which the length growth rate was faster than that of the control group and the treatment group with 64 g SrCl_2/kg feed ($P \leq 0.05$). With appropriate strontium concentrations, the growth of the Japanese flounder youth was enhanced. Our results suggest that feeding a diet enriched in strontium could be an effective means of marking hatchery-reared Japanese flounder for stock enhancement.

Key words Strontium marking; Otolith; Japanese flounder

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

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180730001

http://www.yykxjz.cn/

李振通, 成美玲, 田永胜, 唐江, 马文辉, 侯云霞, 王晓梅, 翟介明. 杂交种“云龙石斑鱼”与亲本的形态差异分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 73-83

Li ZT, Cheng ML, Tian YS, Tang J, Ma WH, Hou YX, Wang XM, Zhai JM. Analysis of the morphological differences between hybrid “*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and its parents. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 73-83

杂交种“云龙石斑鱼”与亲本的形态差异分析*



李振通^{1,2} 成美玲^{2,4} 田永胜^{2,3①} 唐江^{1,2}
马文辉⁵ 侯云霞⁵ 王晓梅⁵ 翟介明⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 5. 莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

摘要 对杂交种“云龙石斑鱼”及其亲本鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*, ♂)和云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*, ♀) 3个群体的7个可数性状和20个可量性状进行统计与测定, 采用聚类分析、主成分分析、判别分析和方差分析法进行比较分析。卡方检验结果显示, 3个石斑鱼群体之间可数性状差异不显著。聚类分析结果显示, 云龙石斑鱼与母本云纹石斑鱼的差异较小, 与父本鞍带石斑鱼的差异较大。主成分分析构建了6个反映形态特征信息的综合性指标, 贡献率分别为24.585%、17.985%、10.410%、9.970%、6.542%和5.542%, 累积贡献率为74.945%, 3个群体之间在形态特征方面存在明显偏离, 云龙石斑鱼有其独特的形态特征。通过判别分析筛选出对判别石斑鱼贡献率最大的4个形态特征, 分别为 X_3 (吻长/头长)、 X_6 (体高/体长)、 X_8 (尾柄高/体长)与 X_{14} (腹鳍基部至臀鳍基部前端/体长), 以此拟合出能够判别以上3个群体的典型判别函数($F_1=21.108X_3+38.413X_6-97.206X_8+2.223X_{14}-6.849$, $F_2=-10.344X_3+21.570X_6+21.931X_8+26.901X_{14}-17.406$)与分类判别函数($Y_1=217.572X_3+750.765X_6+1425.499X_8+413.410X_{14}-336.464$, $Y_2=318.678X_3+839.713X_6+1020.377X_8+358.203X_{14}-319.723$ 与 $Y_3=258.526X_3+672.660X_6+1334.033X_8+311.962X_{14}-269.278$), 综合判别率为96.43%, 认为由逐步判别分析法筛选出的4个形态性状对3个群体的初步鉴定是可行的。方差分析多重比较显示, 除 X_{11} (胸鳍基部至腹鳍基部长/体长)外, 3个石斑鱼的形态差异均达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$), 云龙石斑鱼与鞍带石斑鱼有14个形态性状达到极显著($P<0.01$), 云龙石斑鱼与云纹石斑鱼有12个形态性状达到差异极显著($P<0.01$)。本研究结果为石斑鱼杂交种“云龙石斑鱼”与云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼的种质鉴别提供了丰富的生物学基础数据。

关键词 云龙石斑鱼; 云纹石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 形态差异; 多元统计分析

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0073-11

* 山东省育种工程(2016LZGC009)、烟台市科技发展计划(2016JH021)、烟台市“双百计划”人才项目和黄海水产研究所科研业务费(20603022017013)共同资助 [The work was supported by Shandong Province Agricultural Variety Engineering (2016LZGC009), Yantai Science and Technology Development Plan (2016JH021), Double-Hundred Talent Project of Yantai City, Shandong Province, and Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (20603022017013)]. 李振通, E-mail: 1571835385@qq.com

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-07-30, 收修改稿日期: 2018-09-21

我国有记录的石斑鱼有近 40 种, 均为暖水性鱼类, 主要分布在东海和南海水域(孟庆闻等, 1995)。石斑鱼肉味鲜美、营养丰富, 在我国海水鱼类中的地位举足轻重。2016 年石斑鱼养殖量达 108319 t, 占海水养殖鱼类的 8%, 捕捞量达 128538 t(农业部渔业渔政管理局, 2017)。然而, 在石斑鱼的养殖过程中, 出现了生长速度变慢、产量低、畸形率高和发病率高、种质退化问题, 另外, 由于种质保存、人工繁育及育种技术研究相对滞后、养殖新品种缺乏等原因制约了石斑鱼养殖业的发展。因此, 培育优质、高产的石斑鱼新品种, 对于维持我国石斑鱼养殖业可持续发展的具有重要意义。

近年来, 杂交育种作为培育新品种的方法在鱼类育种中得到广泛应用, 也被应用于石斑鱼新品种培育(Kang *et al.*, 2015)。国内已开展的杂交研究有云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)(♀)×赤点石斑鱼(*E. akaara*)(♂)(杨求华等, 2014)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)(♀)×鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)(♂)(陈超等, 2014)、赤点石斑鱼(♂)×斜带石斑鱼(*E. coioides*)(♀)(刘付永忠等, 2007)等。精子冷冻保存技术是突破地理分布、繁殖时间和温度、雌雄成熟不同步等造成的生殖隔离的有效方法, 前期工作中, 利用鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼卵子培育出具有成活率高、生长快、畸形率低和适温性广的杂交后代“云龙石斑鱼”(田永胜等, 2017)。由于云龙石斑鱼具有优良的生长性能, 已经推广到海南、福建、广州、山东、大连以及韩国和日本等地。

鱼类形态性状包括可数性状(鳃耙数、鳍条数等)与可量性状(全长、头长等)以及利用鱼体形态坐标点与坐标点描述鱼体的形态特征。形态性状是物种遗传特性的外在表现, 是遗传多样性最直观的表现形式。形态性状也是进行鱼类分类、遗传分析的重要依据, 部分指标可以用于优良品种的选育(楼允东, 2001)。通过对鱼类群体间形态特征研究, 有助于了解鱼类群体间的亲缘关系, 可以进一步研究鱼类起源、进化方向等(孟庆闻等, 1989)。对鱼类形态学特征研究主要借助生物学多元统计分析方法, 包括聚类分析、主成分分析、判别分析和方差分析, 近些年来, 在石斑鱼

群体间的遗传差异以及多样性研究中得到广泛应用(区又君等, 2008; 董秋芬等, 2007)。也有对石斑鱼形态性状差异的分析研究(李雷斌等, 2015; 吴水清等, 2017; 李炎璐等, 2014; 王燕等, 2014), 本课题组曾对云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼及杂交 F₁ 代云龙石斑鱼的形态差异进行过初步研究(田永胜等, 2017), 但涉及表型性状少, 结果不够完善。本研究对 3 个石斑鱼的群体形态性状进一步丰富, 利用聚类分析、主成分分析和判别分析 3 种生物多元统计方法, 以及卡方检验和单因子方差分析法对云龙石斑鱼和父母本群体的形态特征进行分析, 旨在为石斑鱼杂交后代的种质鉴别和石斑鱼良种选育工作提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

本研究所用云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及杂交子代云龙石斑鱼均源自莱州明波水产有限公司, 杂交种云龙石斑鱼为鞍带石斑鱼的冷冻精子与云纹石斑鱼的卵受精而成。3 个群体在相同环境中培育, 水温为 23℃~27℃, NH₄-N≤0.15 mg/L, NO₂-N≤0.02 mg/L, COD≤2 mg/L, SS≤10 mg/L, pH 为 7.5~8.2, DO 为 8 mg/L, 盐度为 28~30, 循环水养殖, 分别对 3 个石斑鱼群体的生长性能进行测量。测量前停食一顿, 减轻鱼的应激反应; 测量时使用麻醉剂 MS222(40~80 mg/L)进行麻醉。为减小个体规格差异对统计分析产生的影响, 所测量鱼体的规格相近(表 1)。

1.2 性状测量

1.2.1 可数性状 每个群体选取 30 尾进行统计, 包括背鳍棘数、背鳍软条数、胸鳍条数、腹鳍条数、臀鳍棘数、臀鳍软条数和尾鳍条数共 7 项, 630 个数据。

1.2.2 可量性状 对选取的每个样本进行拍照, 再利用 Adobe Photoshop 软件进行测量分析。可量性状包括全长、体长、吻长、眼径、头长、体高、尾柄长和尾柄高, 框架可量性状参数包括背鳍前端基部至腹鳍基部长、背鳍前端基部至胸鳍基部长、胸鳍基部至

表 1 3 个石斑鱼群体的观测样本数量和规格

Tab.1 The number and size of samples from three different groupers

群体类型 Group type	样本数 Sample size	体长 Body length (cm)		体重 Body weight (g)	
		范围 Range	平均值 Average	范围 Range	平均值 Average
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	68	18.3~26.3	23.6±2.1	250.7~442.5	336.4±60.4
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	91	16.9~22.2	20.3±1.5	203.3~385.8	275.9±49.6
云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀× <i>E. lanceolatus</i> ♂	121	18.8~25.5	22.5±1.7	240.5~420.6	316.7±57.4

腹鳍基部长、背鳍前端基部至臀鳍前端基部长、胸鳍基部至臀鳍前端基部长、腹鳍基部至臀鳍前端基部长、胸鳍基部至尾鳍基部长、腹鳍基部至尾鳍基部长、背鳍前端基部至尾鳍基部长、臀鳍前端基部至尾鳍长、尾鳍长和背鳍基长。3组鱼, 共计280尾, 每尾鱼20项形态特征参数(图1), 共计5600个数据。

1.3 数据处理

1.3.1 可数性状分析 可数性状采用卡方进行检验(杜荣骞, 1990), 利用统计软件 SPSS 17 进行分析。

1.3.2 可量性状分析 为了消除鱼体大小不同对形态特征的影响, 将每尾鱼的吻长、眼径与头长的比值作为形态度量分析的性状值(分别为 X_3 和 X_4), 其他形态性状值与体长的比值作为形态度量分析的性状值, 分别为全长/体长(X_1)、头长/体长(X_5)、体高/

体长(X_6)、尾柄长/体长(X_7)、尾柄高/体长(X_8)、背鳍前端基部至腹鳍基部长/体长(X_9)、背鳍前端基部至胸鳍基部长/体长(X_{10})、胸鳍基部至腹鳍基部长/体长(X_{11})、背鳍前端基部至臀鳍前端基部长/体长(X_{12})、胸鳍基部至臀鳍前端基部长/体长(X_{13})、腹鳍基部至臀鳍前端基部长/体长(X_{14})、胸鳍基部至尾鳍基部长/体长(X_{15})、腹鳍基部至尾鳍基部长/体长(X_{16})、背鳍前端基部至尾鳍基部长/体长(X_{17})、臀鳍前端基部至尾鳍长/体长(X_{18})、尾鳍长/体长(X_{19})和背鳍基部长/体长(X_{20}), 共19项。采用统计软件 SPSS 17 对所得的比例性状数据进行聚类分析、主成分分析、判别分析和单因子方差分析(王新安等, 2008)。

聚类分析: 首先计算出这3种石斑鱼19个比例性状的平均值, 然后利用系统聚类法中的欧式最短距离法对这3种石斑鱼的19个比例性状的平均值进行

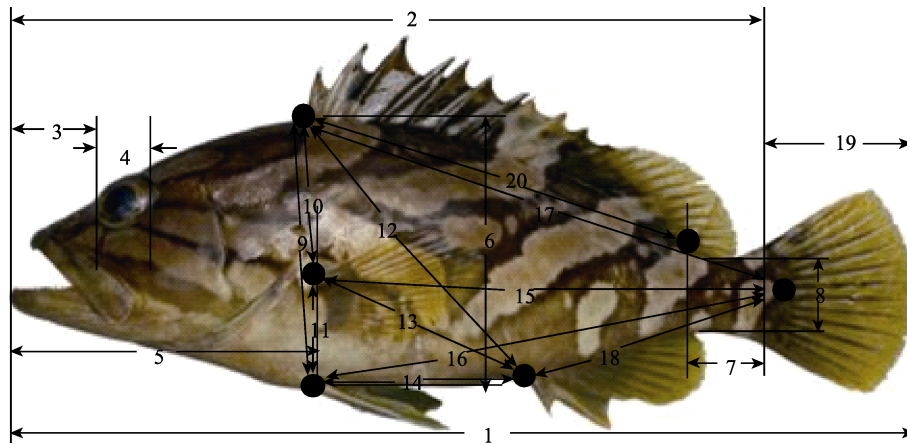


图1 石斑鱼形态学测量位点

Fig.1 The morphological and mark points for measurement of grouper

1: 全长; 2: 体长; 3: 吻长; 4: 眼径; 5: 头长; 6: 体高; 7: 尾柄长; 8: 尾柄高; 9: 背鳍前端基部至腹鳍基部长; 10: 背鳍前端基部至胸鳍基部长; 11: 胸鳍基部至腹鳍基部长; 12: 背鳍前端基部至臀鳍前端基部长; 13: 胸鳍基部至臀鳍前端基部长; 14: 腹鳍基部至臀鳍前端基部长; 15: 胸鳍基部至尾鳍基部长; 16: 腹鳍基部至尾鳍基部长; 17: 背鳍前端基部至尾鳍基部长; 18: 臀鳍前端基部至尾鳍长; 19: 尾鳍长; 20: 背鳍基部长

1: Total length; 2: Body length; 3: Tongue length; 4: Eye diameter; 5: Head length; 6: Body height; 7: Length of caudal peduncle; 8: Height of caudal peduncle; 9: Dorsal fin front base to pelvic fin base; 10: Dorsal fin front base to pectoral fin base; 11: Base of the pectoral fin to the base of the pelvic fin; 12: Front base of the dorsal fin to the front base of the anal fin; 13: Base of the pectoral fin to the base of the front of the anal fin; 14: Base of the pelvic fin to the base of the front of the anal fin; 15: Base of the pectoral fin to the base of the caudal fin; 16: Base of the pelvic fin to the base of the caudal fin; 17: Dorsal fin front base to caudal fin base; 18: Anterior base of the anal fin to the caudal fin; 19: Length of caudal fin; 20: Length of dorsal fin front

聚类分析, 并用树形图显示3个种间的亲疏程度。

主成分分析: 通过软件分析, 利用19项比例性状值得出几个主成分, 并计算出这几个主成分的特征根向量、方差贡献率以及它们的累积方差贡献率。

判别分析: 对每个样本的19个校正参数进行逐步判别分析, 挑选对判别贡献大的参数来建立3种石斑鱼的形态判别函数, 并对所有的样本进行逐个判

别。判别准确率的计算公式为(马爱军, 2016):

判别准确率 $P_1 = (\text{判别正确的某石斑鱼尾数} / \text{实际判别的该群体尾数}) \times 100\%$

判别准确率 $P_2 = (\text{判别正确的某石斑鱼尾数} / \text{判入该群体尾数}) \times 100\%$

综合判别率 $P = (\text{判别正确的石斑鱼总数} / \text{实测的石斑鱼总数}) \times 100\%$

单因子方差分析:运用 SPSS 17 软件,采用单因子方差分析(One-way ANOVA),并用 Duncan 法对不同群体间的形态差异进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 可数性状

3 种石斑鱼的可数性状均值见表 2。经 χ^2 检验, $\chi^2_{1-2}=0.083$, $\chi^2_{1-3}=0.097$, $\chi^2_{2-3}=0.174$, 均小于 $\chi^2_{6, 0.05}=12.59$, 可见这 3 种石斑鱼在形态可数性状上的差异不显著。

2.2 可量性状

2.2.1 聚类分析 利用 SPSS 中的系统聚类分析进行分析。从鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼与云龙石斑鱼间的平均欧氏距离可以看出(表 3), 云龙石斑鱼与云纹石斑鱼的欧氏距离为 2.681, 与鞍带石斑鱼的欧氏距离为 3.487, 云纹石斑鱼与鞍带石斑鱼的欧氏距离为 3.474。从聚类图中可以看出(图 2), 云龙石斑鱼和云纹石斑鱼先聚在一起, 归为一类, 然后再与鞍带石斑鱼聚在一起, 说明云龙石斑鱼与云纹石斑鱼的形态较为相似。

表 2 3 种石斑鱼可数性状的均值(平均值±标准差)
Tab.2 Mean values of meristic characters of three groupers (Mean±SD)

性状 Characters	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂
背鳍硬棘数 Number of dorsal fin spines	11.00±0.00	10.90±0.49	11.00±0.00
背鳍软条数 Number of dorsal fin rays	14.27±0.45	14.79±1.24	13.79±1.37
胸鳍鳍条数 Number of pectoral fin rays	15.03±0.32	16.83±1.00	13.90±2.81
腹鳍鳍条数 Number of ventral fin rays	6.00±0.00	5.86±0.35	5.31±0.47
臀鳍硬棘数 Number of anal fin spines	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
臀鳍软条数 Number of anal fin rays	8.00±0.00	8.72±0.88	7.79±1.35
尾鳍鳍条数 Number of caudal fin rays	14.93±0.83	16.03±1.02	15.28±1.07

表 3 3 种石斑鱼群体间的欧氏距离
Tab.3 The euclidean distance among three groupers

群体类型 Group type	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	—	3.474	3.487
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	3.474	—	2.681
云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂	3.487	2.681	—

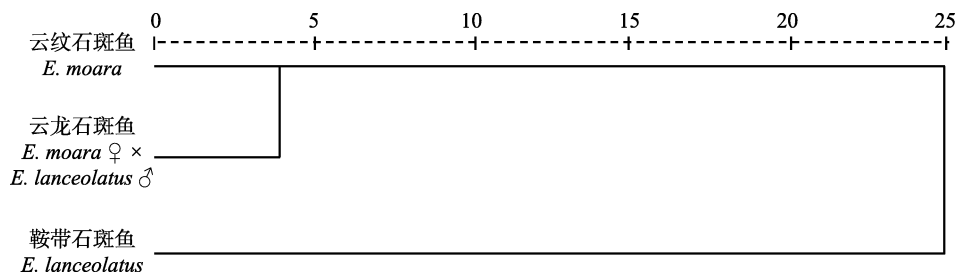


图 2 3 个石斑鱼群体的聚类分析树形图
Fig.2 Hierarchical dendrogram of three groupers

2.2.2 主成分分析 对 3 个石斑鱼群体的 19 个形态比例性状进行主成分分析,保留特征根大于 1 的主成分,共获得 6 个主成分。19 个性状对 6 个主成分的特征向量及 6 个主成分的方差贡献率见(表 4),结果显示,第 1 个主成分贡献率为 24.585%,根据主成分特征向量分量的绝对值可知,主要反映 X_4 、 X_6 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 和 X_{14} 等指标,其中, X_6 、 X_9 、

X_{10} 和 X_{14} 的影响最大,即主要反映鱼体纵向特征;第 2 个主成分贡献率为 17.985%,主要反映 X_3 、 X_5 、 X_{17} 和 X_{20} 等指标,即主要反映鱼体横向特征;第 3 个主成分贡献率为 10.410%,比前 2 个主成分又有所降低,主要反映指标 X_5 和 X_6 ,第 4 个主成分贡献率为 9.970%,反映指标 X_1 和 X_{19} ;第 5 个主成分贡献率为 6.542%,反映指标 X_7 和 X_{18} ;第 6 个主成分贡献率仅

为 5.542%，反映指标 X_{11} 。6 个主成分的累积贡献率为 74.945%，包含了总变异的大部分，说明可以用几个相互独立的因子来概括不同鱼种间的形态差异。

利用 3 个石斑鱼群体的主成分 1、主成分 2 和主成分 3 绘制三维空间主成分分析图(图 3)，可以看出，鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼和云龙石斑鱼 3 种石斑鱼各

有自己特有的形态特征，形成 3 个不同的群体，3 个石斑鱼群体在主成分 1 轴的差异明显比主成分 2 轴、主成分 3 轴上的差异大。图中信息显示，云龙石斑鱼和云纹石斑鱼形态差异较小，和鞍带石斑鱼形态差异较大，说明云龙石斑鱼的形态特征偏向于母本云纹石斑鱼。

表 4 3 种石斑鱼群体的 19 个性状对 6 个主成分的特征向量及主成分的贡献率
Tab.4 Eigenvectors and cumulative contribution rates of six principal components from the 19 traits of three grouper populations

形态比例性状 Morphological proportional traits	主成分 Principal component					
	1	2	3	4	5	6
X_1	-0.432	0.051	-0.181	0.842	0.035	-0.163
X_3	-0.330	-0.647	0.330	0.129	0.016	-0.059
X_4	-0.526	0.052	0.371	0.240	-0.131	-0.104
X_5	-0.187	-0.714	-0.419	-0.029	0.032	0.157
X_6	0.704	-0.447	-0.142	0.274	0.126	0.187
X_7	0.128	0.355	0.069	-0.046	0.733	0.019
X_8	0.544	0.521	-0.169	0.150	0.039	0.311
X_9	0.713	-0.424	-0.268	0.250	0.133	0.157
X_{10}	0.759	-0.236	-0.325	0.139	0.164	-0.304
X_{11}	-0.175	-0.071	0.430	0.318	-0.068	0.785
X_{12}	0.682	0.186	-0.359	0.053	-0.364	0.083
X_{13}	0.603	-0.011	0.364	0.125	-0.230	-0.057
X_{14}	0.763	-0.198	0.281	0.087	-0.113	-0.157
X_{15}	0.484	0.430	0.493	0.213	0.039	-0.152
X_{16}	0.571	0.108	0.588	0.149	0.100	-0.066
X_{17}	-0.017	0.874	-0.142	-0.018	-0.105	-0.019
X_{18}	-0.114	0.396	-0.096	0.025	0.545	0.111
X_{19}	-0.395	0.065	-0.177	0.848	0.021	-0.148
X_{20}	0.005	0.671	-0.343	0.122	-0.312	0.093
各主成分贡献率 Principal component contribution rate (%)	24.585	17.985	10.410	9.970	6.542	5.542
累积贡献率 Cumulative contribution rate (%)	24.585	42.570	52.981	62.951	69.493	74.945

2.2.3 判别分析 利用 SPSS 中载有的逐步判别分析法，对 3 个石斑鱼群体的 19 个比例性状进行判别分析。结果显示，有 4 个贡献率很大的比例性状依次进入了判别公式，分别为 X_3 、 X_6 、 X_8 和 X_{14} ，而且这 4 个比例性状均达到极显著水平($P < 0.01$)(表 5)。根据这 4 个比例性状所建立的 3 个石斑鱼群体的典型判别公式为：

$$F_1 = 21.108X_3 + 38.413X_6 - 97.206X_8 + 2.223X_{14} - 6.849$$

$$F_2 = -10.344X_3 + 21.570X_6 + 21.931X_8 + 26.901X_{14} - 17.406$$

典型判别函数 F_1 与 F_2 的贡献率分别为 55.9% 与 44.1%(表 6)，将 3 个石斑鱼群体的 X_3 、 X_6 、 X_8 与 X_{14} 共 4 个比例性状代入以上 2 个典型判别函数，绘制了

3 个石斑鱼群体的分布图(图 4)，这 2 个典型判别函数可以将鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼与云龙石斑鱼 3 个石斑鱼群体区别开来。

另外，依据 X_3 、 X_6 、 X_8 和 X_{14} 共 4 个形态比例参数以及分类函数相关系数，拟合出 3 个石斑鱼群体的分类判别函数：

$$\text{鞍带石斑鱼} : Y_1 = 217.572X_3 + 750.765X_6 + 1425.499X_8 + 413.410X_{14} - 336.464$$

$$\text{云纹石斑鱼} : Y_2 = 318.678X_3 + 839.713X_6 + 1020.377X_8 + 358.203X_{14} - 319.723$$

$$\text{云龙石斑鱼} : Y_3 = 258.526X_3 + 672.660X_6 + 1334.033X_8 + 311.962X_{14} - 269.278$$

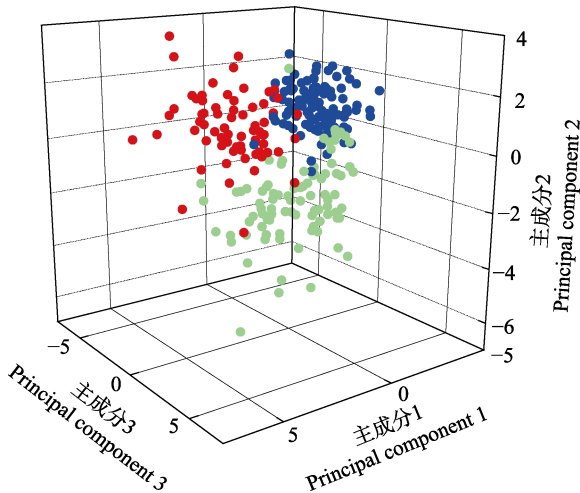


图3 3种石斑鱼群体主成分1、主成分2和主成分3的散布图

Fig.3 Scatter diagram for the first, the second and the third principal components of three groupers

红圈代表鞍带石斑鱼；绿圈代表云纹石斑鱼；
蓝圈代表云龙石斑鱼

The red dot represent *E. lanceolatus*;
the green dot represent *E. moara*; the blue dot
represent *E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂

对测量样本按上述分类判别函数进行预测分类(表7), 3个群体的判别准确率 P_1 分别为 95.59%、93.41%和 99.17%, 判别准确率 P_2 分别为 97.02%、100%和 93.75%, 综合判别率为 96.43%。 F 检验结果显示, 这3个分类判别函数对3个群体的判别效果较好, 群体的判别公式可靠。显然, 利用包含4个形态比例参数的判别函数对个体进行预测的准确率高, 且工作量小, 因此, 在实际应用中是可行的。若要判断某尾石斑鱼所属的种群, 只需要测量出吻长、体高、

尾柄高、腹鳍基部至臀鳍前端基部长以及头长与体长, 分别代入上述3个判别公式, 计算出3个数值, 以数值最大的判别函数所对应的名称作为该个体的鱼名。

2.2.4 单因素方差分析 对鞍带石斑鱼、云纹石斑鱼与云龙石斑鱼3个群体的19个形态比例性状进行单因子方差分析, 并利用最小显著差数法对具有显著差异的形态比例进行多重比较分析(表8), 结果显示, 在这3个群体的19个形态比例性状值中, 除 X_{11} 外 ($P>0.05$), 其余形态比例性状均达到显著水平 ($P<0.05$) 或极显著水平 ($P<0.01$)。多重比较结果显示, 鞍带石斑鱼与云纹石斑鱼有17个形态比例性状之间差异达到显著水平, 15个达到极显著水平, 占总性状的78.95%; 鞍带石斑鱼与云龙石斑鱼之间有15个形态比例性状之间差异达到显著水平, 其中, 有14个达到极显著水平, 占总性状的73.68%; 云纹石斑鱼与云龙石斑鱼之间有12个形态比例性状之间差异达到极显著水平, 占总性状的63.16%。

3 讨论

目前, 有两种方法用于群体间差异的分析, 生物多元统计(徐成等, 2001)和分子生物学(马爱军等, 2008)。20世纪末期, 利用分子生物学如 AFLP、SSR 与测序技术等研究分析生物的遗传性状相当普遍。在利用 RAPD 对5种石斑鱼的遗传差异进行研究分析时, 发现这5种石斑鱼之间的遗传多样性较高, 平均多态性位点为 60.34%~73.94% (区又君等, 2008)。利用分子生物学方法对研究群体间的遗传差异准确度较高, 但表型形态特征数据更容易获得, 操作简单快

表5 3个鱼类群体19个比例性状的逐步判别 Wilks' Lambda 值
Tab.5 Wilks' Lambda values of stepwise discriminant analysis of 19 traits in three groupers

步骤 Step	进入 变量 Entered	统计量 Statistic	df1	df2	df3	精确 F 值 Exact F			
						统计量 Statistic	df1	df2	显著性水平 Sig.
1	X_{14}	0.409	1	2	277	200.375	2	277.000	0.000
2	X_3	0.178	2	2	277	189.139	4	552.000	0.000
3	X_6	0.124	3	2	277	168.403	6	550.000	0.000
4	X_8	0.080	4	2	277	173.409	8	548.000	0.000

表6 典型判别函数(F_1 和 F_2)的特征值与贡献率
Tab.6 Eigenvalues and variance canonical discriminant function

函数 Function	特征值 Eigenvalue	贡献率 Contribution (%)	累积贡献率 Cumulative contribution (%)	典型相关系数 Canonical correlation
1	2.844 ^a	55.9	55.9	0.860
2	2.245 ^a	44.1	100.0	0.832

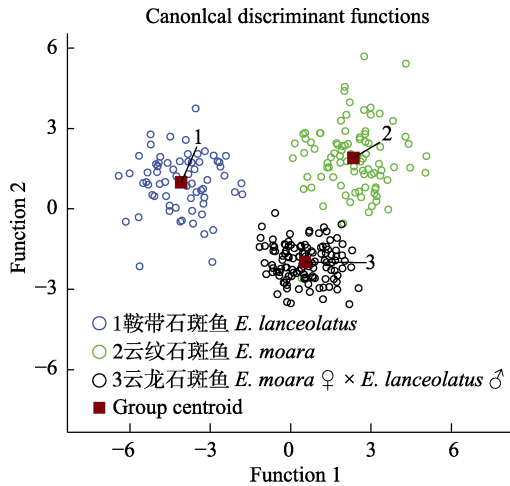


图 4 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和
云龙石斑鱼二维空间分布

Fig.4 Two dimensional spatial distribution of *E. moara*, *E. lanceolatus* and *E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂

捷(田永胜等, 2017), 所以, 利用生物多元统计方法对表型数量性状研究分析依然是遗传育种、种质鉴定和物种分类的主要手段。

所谓生物多元统计, 主要内容就是研究影响事物的多个因素之间的规律。在对生物群体表型差异的研究与分析时, 通常利用聚类分析、主成分分析、判别分析 3 种方法进行判定(钱荣华等, 2003; 董志国等, 2010)。本研究利用聚类分析、判别分析和主成分分析这 3 种常用的生物多元统计方法以及卡方检验、单因子方差分析的方法对云龙石斑鱼以及双亲的形态差异进行了研究。

卡方检验是应用非常广泛的一种假设检验方法, 可以对样本方差作同质性检验。利用卡方检验对 4 种红鲤的可数性状作分析, 发现这 4 种红鲤在可数性状方面的差异不显著(王成辉, 2002)。本研究中, 利用

卡方检验对 3 个石斑鱼群体的可数性状进行分析, 结果表明, 云龙石斑鱼与父母本在可数性状上的差异不明显。鞍带石斑鱼与云纹石斑鱼同为石斑鱼属, 在进化过程中, 二者在个体大小上有所分化, 但它们的表型可数性状上没有变化, 说明控制表型可数性状的基因是比较保守的。由于无法利用表型可数性状作为区分三者的依据, 必须借助于多元统计分析方法对可量性状进行研究。

云龙石斑鱼与云纹石斑鱼及鞍带石斑鱼 3 个群体的聚类分析与主成分分析结果一致, 表明在形态特征上, 既存在相似的地方, 又有一定程度的差异, 杂交种云龙石斑鱼在形态特征上偏向于母本云纹石斑鱼。在聚类分析结果中, 云龙石斑鱼先与云纹石斑鱼聚成一支, 然后与鞍带石斑鱼聚成一支, 说明云龙石斑鱼与云纹石斑鱼相近。在主成分分布图中也得出了相同的结果, 云龙石斑鱼与云纹石斑鱼形态偏离较小, 与鞍带石斑鱼形态偏离较大。云龙石斑鱼与父母本纯种 3 个群体形态差异分化明显, 形成 3 个不同的群体, 杂交种云龙石斑鱼有其特有的形态特征。鱼的形态特征受到遗传与环境两种因素的共同作用, 表现出数量性状的差异(田永胜等, 2017)。云纹石斑鱼与鞍带石斑鱼之间在形态特征上的差异正是由这两个因素造成的, 而相对于鞍带石斑鱼, 杂交种云龙石斑鱼与母本云纹石斑鱼的形态特征相近, 可能与母本效应有关。线粒体基因属于母系遗传, 生物个体的形态特征可能受线粒体基因表达的影响(Bolnick *et al*, 2008)。云龙石斑鱼线粒体基因组与云纹石斑鱼的相似性为 99.8%, 与鞍带石斑鱼的为 89.3%(Gao *et al*, 2017)。在判别分析中, 利用吻长/全长、体高/全长、尾柄高/全长和腹鳍基部至臀鳍前端基部长/全长 4 个贡献率大的参数建立判别函数, 综合判别率达

表 7 基于 4 个贡献显著的比率变量判别函数对 3 个群体判别分析结果

Tab.7 Results of discriminant analysis of three groupers based on three discriminant functions with four significant ratio variables

群体类型 Group type	预测分类 Forecast classification			判别准确率 Discrimination accuracy (%)		综合判别率 Comprehensive discrimination rate (%)
	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂	P_1 (%)	P_2 (%)	
	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	65	0	3	95.59	
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	1	85	5	93.41	100	96.43
云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂	1	0	120	99.17	93.75	
总计 Total	67	85	128			
百分率 Percentage (%)	23.93	30.36	45.71			

表8 3个石斑鱼种群19个形态比例性状的平均值
Tab.8 Means of the 19 morphological traits of three groupers

性状 Traits	鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> ♀ × <i>E. lanceolatus</i> ♂
X_1	1.158±0.025 ^B	1.180±0.021 ^A	1.185±0.016 ^A
X_3	0.180±0.012 ^B	0.267±0.017 ^A	0.212±0.010 ^A
X_4	0.099±0.003 ^C	0.127±0.006 ^A	0.130±0.005 ^B
X_5	0.349±0.028 ^C	0.393±0.044 ^A	0.363±0.019 ^B
X_6	0.364±0.017 ^A	0.362±0.027 ^A	0.326±0.012 ^B
X_7	0.140±0.018 ^A	0.131±0.022 ^B	0.136±0.019 ^{AB}
X_8	0.134±0.008 ^A	0.114±0.010 ^C	0.123±0.005 ^B
X_9	0.351±0.018 ^{Aa}	0.345±0.023 ^{Ab}	0.318±0.010 ^{Bc}
X_{10}	0.242±0.023 ^A	0.226±0.027 ^B	0.201±0.017 ^C
X_{11}	0.132±0.016	0.136±0.020	0.135±0.010
X_{12}	0.487±0.037 ^A	0.440±0.026 ^B	0.443±0.016 ^B
X_{13}	0.438±0.072 ^A	0.404±0.029 ^B	0.377±0.035 ^C
X_{14}	0.404±0.032 ^A	0.368±0.035 ^B	0.316±0.025 ^C
X_{15}	0.696±0.030 ^A	0.656±0.055 ^B	0.660±0.021 ^B
X_{16}	0.678±0.043 ^A	0.657±0.048 ^B	0.639±0.017 ^C
X_{17}	0.639±0.027 ^A	0.598±0.034 ^B	0.646±0.017 ^A
X_{18}	0.334±0.096 ^{Aa}	0.309±0.028 ^{Bc}	0.032±0.020 ^{Ab}
X_{19}	0.164±0.024 ^B	0.180±0.021 ^A	0.185±0.016 ^A
X_{20}	0.523±0.058 ^A	0.477±0.032 ^B	0.526±0.023 ^A

注：同行肩标含有不同小写字母的表示差异显著($P<0.05$)，含有不同大写字母的表示差异极显著($P<0.01$)

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant differences ($P<0.05$); different capital letter superscripts mean extremely significant differences ($P<0.01$)

96.43%，可以将云龙石斑鱼与亲本区分开，为云龙石斑鱼的种质鉴定奠定了基础。这4个形态特征均匀的分布在鱼体上，判别结果比较可靠。对云龙石斑鱼及其亲本间的19个形态比例性状方差分析多重比较结果表明，云龙石斑鱼与鞍带石斑鱼之间有14个参数达到极显著水平，与云纹石斑鱼之间有12个参数达到极显著水平，也说明云龙石斑鱼的形态特征偏向于母本云纹石斑鱼。

综合3种生物多元统计分析方法与方差分析的结果可以看出，聚类分析、主成分分析、判别分析与方差分析的结果是相似的，从不同的角度解读了群体间的形态学差异，其功能都是不容相互代替的。聚类分析是通过将多个生物群体进行分组，定量的分析生物群体间的异同程度(蔡庆华, 1990)，广泛用于生物群体的形态差异分析(胡廷尖等, 2011; 马海涛, 2014)。主成分分析借助降维，将多个相关的因子综合为少数独立的因子，定量的分析群体间差异，并且可以确定各个不同群体在各个主成分上变化较大的参数(魏开建等, 2003)。主成分分析在研究群体差异及新品种性状上应用较广泛(马海涛, 2014; 董志国等, 2010)。判别分析常用于生物种群分类与鉴别，通过对多个性状分

析，以对鉴别贡献率较大的性状建立判别函数，以此判别函数对群体进行判别(Krzanowski *et al.*, 1995)。既可以对不同种生物群体进行鉴别，而且可以对同种不同群体生物进行鉴别(王燕等, 2014; 谷伟等, 2009)

4 结论

利用多元统计分析方法对云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代云龙石斑鱼3个群体的7个可数性状和20个可量性状进行分析，筛选出可判别3个群体的代表性状：吻长、体高、尾柄高和腹鳍基部至臀鳍前端基部长，与父母本相比，云龙石斑鱼具有独特的形态特征，并建立了鉴定杂交种云龙石斑鱼和亲本的判别函数关系式，为云龙石斑鱼及亲本群体的鉴别提供了科学依据。

参 考 文 献

- Bolnick DI, Turelli M, López-Fernández H, *et al.* Accelerated mitochondrial evolution and “Darwin’s corollary”: Asymmetric viability of reciprocal F_1 hybrids in centrarchid fishes. *Genetics*, 2008, 178(2): 1037–1048
- Cai QH. Multivariate analysis of planktonic blooms in Lake

- Donghu, Wuhan. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, 14(1): 22–31 [蔡庆华. 武汉东湖浮游植物水华的多元分析. 水生生物学报, 1990, 14(1): 22–31]
- Chen C, Kong XD, Li YL, *et al.* Embryonic and morphological development in the larva, juvenile, and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 35–144 [陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 35–144]
- Dong QF, Liu CW, Guo YS, *et al.* Isolation and population genetic diversity analysis of microsatellite DNA markers in yellow grouper (*Epinephelus awoara*). *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(6): 841–847 [董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 青石斑鱼微卫星标记的筛选及群体多态性分析. 水产学报, 2007, 31(6): 841–847]
- Dong ZG, Li XY, Yan BL, *et al.* Morphological variation analysis among five populations of the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China Sea areas. *Marine Science Bulletin*, 2010, 29(4): 421–426 [董志国, 李晓英, 阎斌伦, 等. 中国海五种群三疣梭子蟹的形态差异分析. 海洋通报, 2010, 29(4): 421–426]
- Du RQ. *Biostatistics*. Beijing: Higher Education Press, 1990, 164–231 [杜荣骞. 生物统计学. 北京: 高等教育出版社, 1990, 164–231]
- Gao FT, Wei M, Zhu Y, *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of the hybrid *Epinephelus moara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂, and phylogenetic analysis in subfamily Epinephelinae. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(3): 555–563
- Gu W, Gao HJ, Wang BQ. Morphous and discriminatory analysis on the four strains rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Anhui Agricultural University*, 2009, 36(2): 241–246 [谷伟, 高会江, 王炳谦. 虹鳟4个品系的形态变异及判别分析. 安徽农业大学学报, 2009, 36(2): 241–246]
- Hu TJ, Li XL, Huang XH, *et al.* The analysis of morphological differences between *Squaliobarbus curriculus*, grass carp and their F₁ hybrids. *Hebei Fisheries*, 2011(9): 1–4 [胡廷尖, 李训朗, 黄小红, 等. 赤眼鳟(♀) × 草鱼(♂)及其杂交 F₁ 形态差异分析. 河北渔业, 2011(9): 1–4]
- Kang X, Wei D, Xiao J, *et al.* Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 187–201
- Krzanowski WJ, Henry F, Marriott C. *Multivariate analysis (Part II)*. Oxford University Press, 1995, 101
- Li LB, Zhong JX, Huang ZC, *et al.* Studies on the morphological features and the growth performance of hybrid F₁ of *Epinephelus akaara* (♀) × *Epinephelus moara* (♂). *Fishery Research*, 2015, 37(2): 148–152 [李雷斌, 钟建兴, 黄种持, 等. 赤点石斑鱼♀与云纹石斑鱼♂杂交 F₁ 形态特征和生长性能的研究. 渔业研究, 2015, 37(2): 148–152]
- Li YL, Chen C, Wang QY, *et al.* Comparative analysis of the morphological characteristics between hybrid F₁ by *Epinephelus moara* (♀) × *E. septemfasciatus* (♂) and the offspring of its parents. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 104–108 [李炎璐, 陈超, 王清印, 等. 云纹石斑鱼(♀) × 七带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 形态特征与其亲本子代的比较分析. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 104–108]
- Liu FYZ, Zhao HH, Liu XC, *et al.* Preliminary study on the hybrid red-spotted grouper and orange-spotted grouper. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2007, 46(3): 72–75 [刘付永忠, 赵会宏, 刘晓春, 等. 赤点石斑鱼♂与斜带石斑鱼♀杂交的初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 72–75]
- Lou YD. *Fish breeding*. Beijing: China Agricultural Press, 2001 [楼允东. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社, 2001]
- Ma AJ, Wang XA, Lei JL, *et al.* Statistic morphology difference among four turbot (*Scophthalmus maximus*) populations. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(1): 24–29 [马爱军, 王新安, 雷霖霖, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)四个不同地理群体数量形态特征比较. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 24–29]
- Ma AJ, Wang XA, Sun ZB, *et al.* Morphological variations among three different populations of *Takifugu rubripes*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 166–172 [马爱军, 王新安, 孙志宾, 等. 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)三个不同群体的形态差异分析. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 166–172]
- Ma HT, Han CH, Teng ZJ, *et al.* Morphological analysis to *Scophthalmus maximus*, *Platichthys stellatus* and hybrid. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1380–1386 [马海涛, 韩承慧, 滕照军, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)及其杂交种的形态学分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1380–1386]
- Meng QW, Mou XZ, Yu TJ. *Fish science (morphological classification)*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989, 167–180 [孟庆闻, 缪学祖, 俞泰济. 鱼类学(形态·分类). 上海: 上海科学技术出版社, 1989, 167–180]
- Meng QW, Su JX, Mou XZ. *Fish taxonomy*. Beijing: China Agricultural Press, 1995, 606 [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 606]
- Ministry of Agriculture Fisheries and Fisheries Administration. *China fisheries statistical yearbook*. Beijing: China Agricultural Press, 2017 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2017]
- Ou YJ, Wu Y, Li JE, *et al.* RAPD analysis of genetic difference among five species of grouper. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(2): 56–62 [区又君, 吴勇, 李加儿, 等. 5种石斑鱼遗传差异的 RAPD 分析. 南方水产科学, 2008, 4(2): 56–62]
- Qian RH, Li JL, Dong ZG, *et al.* Morphological variations analysis among populations of *Hyriopsis cumingii* in five

- large lakes of China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(4): 436–443 [钱荣华, 李家乐, 董志国, 等. 中国五大湖三角帆蚌形态差异分析. *海洋与湖沼*, 2003, 34(4): 436–443]
- Tian YS, Chen ZF, Duan HM, *et al.* The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* by using cryopreserved sperm and the related genetic effect analysis. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(10): 11–12 [田永胜, 陈张帆, 段会敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应分析. *水产学报*, 2017, 41(10): 11–12]
- Tian YS, Duan HM, Li XK, *et al.* Growth and genetic analysis among three homologous inbred strains of *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 11–21 [田永胜, 段会敏, 李祥孔, 等. 牙鲆三个同源纯系的生长和遗传性状比较. *中国水产科学*, 2017, 24(1): 11–21]
- Tian YS, Duan HM, Tang J, *et al.* Analysis of phenotypic quantitative traits of kelp grouper, giant grouper and hybrid progeny. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(6): 808–817 [田永胜, 段会敏, 唐江, 等. 石斑鱼杂交种“云龙斑”与亲本的表型数量性状判别分析. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(6): 808–817]
- Wang CH. Study on genetic diversity of Chinese red carp. Doctoral Dissertation of Shanghai Fisheries University, 2002, 6 [王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究. 上海: 上海水产大学博士研究生学位论文, 2002, 6]
- Wang XA, Ma AJ, Chen C, *et al.* Morphological variation in two wild population of sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(6): 655–660 [王新安, 马爱军, 陈超, 等. 七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*) 两个野生群体形态差异分析. *海洋与湖沼*, 2008, 39(6): 655–660]
- Wang Y, Zhang Y, Zhang HF, *et al.* Comparison of morphology between two kinds of hybrid groupers and their parents. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 778–785 [王燕, 张勇, 张海发, 等. 两种杂交石斑鱼及其亲本的形态差异分析. *水产学报*, 2014, 38(6): 778–785]
- Wei KJ, Xiong BX, Zhao XH, *et al.* Morphological variations and discriminant analysis of five freshwater unionid species (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(1): 13–18 [魏开建, 熊邦喜, 赵小红, 等. 五种蚌的形态变异与判别分析. *水产学报*, 2003, 27(1): 13–18]
- Wu SQ, Zheng LY, Luo HY, *et al.* Comparison of morphological traits of hybrid groupers (*Epinephelus coioides* ♀ × *E. akaara* ♂) and their parents. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(5): 47–54 [吴水清, 郑乐云, 罗辉玉, 等. 杂交石斑鱼(斜带石斑鱼♀×赤点石斑鱼♂)与其亲本形态性状比较研究. *南方水产科学*, 2017, 13(5): 47–54]
- Xu C, Wang KL, Zhang PJ. Biochemical genetics of *Lateolabrax japonicus* population II. Biochemical genetic structure and variation. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(3): 248–254 [徐成, 王可玲, 张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究 II. 种群生化遗传结构及变异. *海洋与湖沼*, 2001, 32(3): 248–254]
- Yang QH, Hung ZC, Zheng LY, *et al.* Embryonic development and growth of hybrid from the hybridization of *Epinephelus moara* (♀) × *E. akaara* (♂). *Marine Fisheries*, 2014, 36(3): 224–231 [杨求华, 黄种持, 郑乐云, 等. 云纹石斑鱼(♀)×赤点石斑鱼(♂)杂交子代胚胎发育及生长. *海洋渔业*, 2014, 36(3): 224–231]

(编辑 冯小花)

Analysis of the Morphological Differences Between Hybrid “*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and Its Parents

LI Zhentong^{1,2}, CHENG Meiling^{2,4}, TIAN Yongsheng^{2,3①}, TANG Jiang^{1,2},
MA Wenhui⁵, HOU Yunxia⁵, WANG Xiaomei⁵, ZHAI Jieming⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 5. Mingbo Aquatic Co. Ltd., Laizhou 261400)

Abstract Seven countable traits and 20 measurable traits of three populations of the hybrid “*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and its parents, *E. moara* (♀) and *E. lanceolatus* (♂) were measured, and the comparative analysis of morphological characteristics among the three groups were performed by virtue of three kinds of multivariate statistical analysis methods, including cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis and variance analysis methods. Chi-square test results showed that there was no significant difference in the countable traits among the three grouper populations. The result of cluster analysis revealed that, characters of “*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” was more similar to *E. moara* than *E. lanceolatus*. Six comprehensive indexes reflecting morphological characteristics were constructed by principal component analysis. The contribution rates of the six principal components were 24.585%, 17.985%, 10.410%, 9.970%, 6.542%, and 5.542% respectively, and the cumulative contribution rate of those was 74.945%. There were obvious deviations in morphological characteristics among the three groupers, forming three different groups and hybrids. “*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” has its own unique morphological features. By discriminant analysis, four morphological characteristics that have the largest contribution to discriminating grouper, X_3 (tongue length/head length), X_6 (height at withers/body length), X_8 (height at caudal peduncle/body length), X_{14} (ventral fin basal to the front of anal fin basal/body length), were selected to fit the typical discriminant function ($F_1=21.108X_3+38.413X_6-97.206X_8+2.223X_{14}-6.849$, $F_2=-10.344X_3+21.570X_6+21.931X_8+26.901X_{14}-17.406$) and the classification discriminant function ($Y_1=217.572X_3+750.765X_6+1425.499X_8+413.410X_{14}-336.464$, $Y_2=318.678X_3+839.713X_6+1020.377X_8+358.203X_{14}-319.723$ and $Y_3=258.526X_3+672.660X_6+1334.033X_8+311.962X_{14}-269.278$) that can distinguish the above three groupers, the comprehensive discriminant rate was 96.43%. It can be considered that the four morphological characteristics selected by stepwise discriminant analysis are feasible for the preliminary identification of three groupers. The results of variance analysis showed that the morphological differences of the three groupers reached significant or extremely significant levels in all characteristics except for X_{11} (The pectoral fin base to the pelvic fin/body length). Among them, there were 14 morphological traits between “*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and *E. lanceolatus* reached extremely significant levels, and 12 morphological traits between “*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂” and *E. moara* were extremely significant. The results of this study provide biological basic data for the germplasm identification of “*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂”, *E. moara* and *E. lanceolatus*.

Key words *Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂; *Epinephelus moara*; *E. lanceolatus*; Morphological difference; Multivariation analysis

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180507003

http://www.yykxjz.cn/

吴欢欢, 王伟继, 吕丁, 胡玉龙, 孔杰. 应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 84-94

Wu HH, Wang WJ, Lü D, Hu YL, Kong J. Turbot (*Scophthalmus maximus*) biodiversity assessment using high-throughput Illumina sequencing to analyze juvenile turbot intestines and their bacterial cultures. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 84-94

应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构*



吴欢欢^{1,2} 王伟继² 吕丁² 胡玉龙² 孔杰^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业资源可持续利用重点实验室 青岛 266071)

摘要 采用基于 Illumina 测序平台的高通量测序技术, 对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼肠道及其养殖水体、生物饵料中细菌种类及丰度进行研究。测序结果显示, 养殖水体、生物饵料和大菱鲆幼鱼肠道等 19 个样品共获得有效序列 547621 条, 可聚类于 3771 个可分类操作单元(OTUs), 归属于养殖水体、生物饵料、健康幼鱼和发病幼鱼的操作分类单元(OTU)个数分别为 3038、1090、87 和 777, 其中, 健康幼鱼与生物饵料、健康幼鱼与养殖水体特有的 OTU 个数分别为 57 和 0, 发病幼鱼与生物饵料、发病幼鱼与养殖水体特有的 OTU 个数分别为 481 和 31。表明幼鱼肠道微生物多样性与生物饵料密切相关。根据细菌注释结果, 拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)在大菱鲆幼鱼肠道中占优势地位, 其中, 健康幼鱼肠道微生物共聚类为 8 个门, 发病幼鱼的肠道微生物可聚类为 19 个门。与健康幼鱼相比, 发病幼鱼肠道门水平上的 3 种主要优势菌群落结构出现失衡。此外, 对各样品中丰度最高的 100 位 OTU 分析显示, 幼鱼肠道优势菌种类与生物饵料中的优势菌种类密切相关, 而每个发病幼鱼肠道优势菌种类具有一定的独立性。本研究旨在为大菱鲆健康养殖和微生态调控提供实验依据。

关键词 生物多样性; 高通量测序; 大菱鲆

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0084-11

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属于比目鱼类, 在我国市场上称为“多宝鱼”。野生大菱鲆生活于冰岛与摩洛哥附近的欧洲海域(Blanquer *et al*, 1992), 是一种具有耐低温、生长快等特点的大型底栖经济鱼类。近年来, 由于缺乏抗病大菱鲆良种选育, 腹水症成为苗种培育期间的多发病, 对大菱鲆养殖业造成了严重

影响。腹水症病原学的初步研究认为, 细菌是导致腹水症发生的主要原因(景亚运等, 2016)。但多年来, 研究人员对大菱鲆腹水症的致病菌的研究表明, 导致大菱鲆发生腹水症的致病菌却不尽相同, 如迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)(李筠等, 2016)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)(张晓君等, 2006)、灿烂弧菌

* 山东省农业良种工程项目“泰山学者种业计划专家项目”(ZR2014CQ001)和山东省农业良种工程项目“大菱鲆种质资源精准鉴定与选种育种创新利用-子课题”(2016LZGC031-2)共同资助 [This work was supported by Taishan Scholar Program for Seed Industry (ZR2014CQ001), and Accurate Identification and Selection Breeding Creative Utilization of Turbot Germplasm Resources (2016LZGC031-2)]. 吴欢欢, E-mail: 17664080328@163.com

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

收稿日期: 2018-05-07, 收修改稿日期: 2018-07-09

(*Vibrio splendidus*)(Thomson *et al.*, 2005)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)(Austin *et al.*, 2006)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(张伟妮, 2006)等, 腹水症这一特征给该病的诊断和防治造成了困难。有学者利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)研究大菱鲂肠道微生物多样性(邢孟欣等, 2014), 但这种传统方法获得的生物信息较少, 具有一定的局限性, 只能对少数主要的优势微生物进行分析(王贤丰等, 2017), 难以全面解析微生物的组成结构。

高通量测序技术是一种能够对上百万个脱氧核苷酸链同时进行测序的第2代技术。目前, 基于细菌16S rDNA扩增子测序的高通量测序技术成为研究样本生境内环境微生物菌群结构的重要手段, 在水环境(宴妍等, 2016)、土壤(Ligi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016)、空气(李红梅等, 2015)、口腔(Pozhitkov *et al.*, 2011)和植物生境(陈泽斌等, 2016)等方向得到了广泛应用, 全面解析样品生境内的微生物组成和数量。

本研究基于Illumina测序平台的高通量测序技术对山东某大菱鲂养殖场育苗期的养殖水环境、蓄水池中自然海水、生物开口饵料和健康与自然患腹水症的幼鱼样品进行研究, 分析暴发腹水症期间投喂的生物饵料、养殖水体和幼鱼肠道的生物环境内的微生物组成及数量变化, 以期更深入地了解大菱鲂育苗肠道及养殖环境群落结构, 为大菱鲂健康养殖和微生态调控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于2017年4月下旬在山东某养殖场应用工厂化海水半循环养殖系统进行大菱鲂家系苗种培育。苗种培育初期(5月下旬)育苗车间开始流行腹水症, 期间收集了幼鱼(Group_Fish)、生物饵料(Group_Baits)和养殖水体(Group_Water)3类样品。幼鱼分为健康幼鱼组(Group_E)和发病幼鱼组(Group_F), 每组3尾; 生物饵料有来自渤海湾的金海湾小卤虫(*Artemia salina*)和无棣小卤虫(*Artemia salina*)、来自西藏的大卤虫(*Artemia salina*)、轮虫(*Rotifer*)、小球藻(*Chlorella*)和裂壶藻(*Schizochytrium*), 每种饵料1个样品; 养殖水体可分为蓄水池自然海水(Group_B)、健康幼鱼养殖水体(Group_C)和发病幼鱼养殖水体(Group_D), 其中, 自然海水1个, 养殖水体各3个。

1.2 实验方法

1.2.1 样品收集

生物饵料中收集的卤虫和轮虫

均由卵孵化去壳收集得到; 小球藻和裂壶藻为公司培养收集得到; 水样是利用隔膜真空泵抽滤2L水体过0.22 μm孔径的醋酸纤维滤膜得到的。

1.2.2 DNA的提取 水环境DNA使用天根土壤DNA提取试剂盒(TIANamp Soil DNA Kit)提取, 具体操作参照试剂盒说明书; 其余样品DNA采用酚-氯仿法提取。

1.2.3 高通量测序方法 利用细菌通用引物343F: 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'/798R: 5'-CCGTCAATT-CMTTTRAGTTT-3'对细菌的16S rDNA的V3-V4区进行PCR扩增, 送诺和致源生物公司进行基于Illumina平台的高通量测序。

1.2.4 生信分析 对下机后的原始数据(Raw reads)进行双端去杂、拼接和去嵌合体等质控处理, 获得优质的有效序列(Valid tags)。应用VSEARCH(v2.4.2)软件, 对Valid tags依照97%的相似度聚类成为可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU), 而后选取每个归类单元中丰度最高的序列作为该单元的代表序列(Edgar, 2010), 并与Silva的SSU rRNA数据库序列信息比对, 获得生物注释。最后对各样品OTU进行丰度、 α -多样性、 β -多样性以及各分类水平上的细菌群落结构比较分析, 来探究饵料和养殖水体对大菱鲂幼苗生物多样性的影响。

2 结果与分析

2.1 高通量数据统计

19个样品所测的原始序列经去杂、拼接等质控处理共得Clean tags 722213条, 然后再去除嵌合体, 共获得有效序列547621条, 占Clean_tags的75.83%; 使用VSEARCH(v2.4.2)软件, 对有效序列按照97%的相似度共聚类为3771个OTUs。

生物饵料中海大小卤虫(B1)、无棣小卤虫(B2)、无棣大卤虫(B3)、轮虫(B4)、小球藻(B5)和裂壶藻(B6)分别获得的OTU个数为90、743、50、258、277和111, 去重复后饵料组共得1090个OTUs。水体组共获得3080个OTUs。其中, 自然海水的OTU个数为2124, 3个检测的健康幼鱼养殖水体的OTU个数分别为1899、1806和1013, 去重复后健康幼鱼养殖水体组共获得2464个OTUs, 3个检测的发病幼鱼养殖水体的OTU个数分别为520、1374和1320, 去重复后发病幼鱼养殖水体组共获得1560个OTUs。幼鱼组共获得785个OTUs。其中, 3尾健康幼鱼的OTU个数分别为44、51和75, 去重复后健康幼鱼组共获得

87个 OTUs, 3尾发病幼鱼的 OTU 个数分别为 219、634 和 41, 去重复后发病幼鱼组共获得 777 个 OTUs。

根据各样品 OTU 信息, 对各样品组进行统计如表 1 所示。

表 1 各组 OTU 统计分析
Tab.1 Statistical analysis of OTUs in different groups

组别 Group	饵料组 Group_Baits	水体组 Group_Water			幼鱼组 Group_Fish	
		海水 Group_B	健康幼鱼养殖水体 Group_C	发病幼鱼养殖水体 Group_D	健康幼鱼 Group_E	发病幼鱼 Group_F
OTU 统计		2124	2464	1560	87	777
OTU_counts	1090		3038		785	

2.2 自然海水组、健康幼鱼组、发病幼鱼组和饵料组的 OTU Venn 图分析

OTU 的数目可以代表物种的丰富程度(Zhang *et al.*, 2009)。为探究养殖水体、饵料对幼鱼生境内生物多样性的影响程度, 对自然海水组、健康幼鱼组、发病幼鱼组和饵料组的 OTU 进行 Venn 图分析(图 1)。

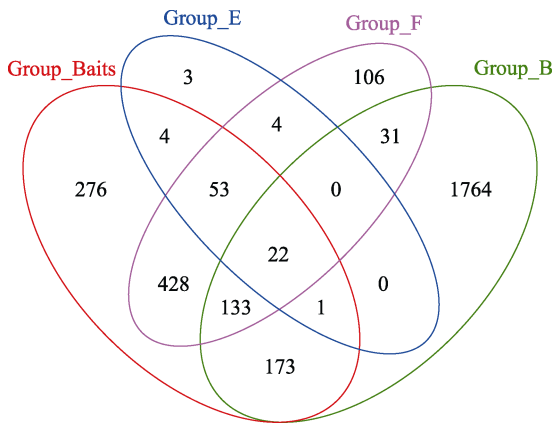


图 1 各组韦恩图

Fig.1 Venn diagram of groups

Group_B: 自然海水组; Group_E: 健康幼鱼组; Group_F: 发病幼鱼组; Group_Baits: 生物饵料组

Group_B: Natural sea water; Group_E: Healthy juvenile fish; Group_F: Diseased juvenile fish; Group_Baits: Living baits

Group_E 和 Group_F: Group_E(健康幼鱼组)和 Group_F(发病幼鱼组)的 OTU 个数分别为 87 和 777, 共有的 OTU 个数为 79 个, 分别占各自组 OTU 数目的 90.80%和 10.17%。

Group_Water: 自然海水组(Group_B)的 OTU 个数为 2124, 健康养殖水体组(Group_C)的 OTU 个数为 2464, 发病养殖水体组(Group_D)的 OTU 数有所降低, 为 1560, Group_Water 总 OTU 数为 3038 个。其中, 健康养殖水体组(Group_C)与自然海水组(Group_B)共有的 OTU 数为 1702 个, 占自然海水组总数的 80.13%; 而发病养殖水体组与自然海水组共

有的 OTU 个数为 681 个, 占自然海水组 OTU 总数的 32.06%。

Group_E、Group_B 和 Group_Baits: 3 组共有的 OTU 数目为 23 个。其中, Group_E 与 Group_Baits 共有的 OTU 数为 80 个, 特有的 OTU 数为 57 个, 分别占 Group_E OTU 数的 91.95%和 65.52%; Group_E 与 Group_B 共有的 OTU 数为 23 个, 特有的 OTU 数为 0, 分别占 Group_E OTU 数的 26.44%和 0。

Group_F、Group_B 和 Group_Baits: 3 组共有的 OTU 数目为 155 个。其中, Group_F 与 Group_Baits 共有的 OTU 数为 636 个, 特有的 OTU 为 481 个, 分别占 Group_F OTU 数的 81.85%和 61.90%; Group_F 与 Group_B 共有的 OTU 数为 186 个, 特有的 OTU 为 31 个, 分别占 Group_E OTU 数的 23.94%和 3.99%。

2.3 微生物多样性分析

2.3.1 生境内多样性(α -Diversity)分析 使用软件 Qiime 计算各样本均一化处理后 OTU 数据的 Goods coverages、Chao1 和 Simpson 指数(表 2), 分别表征数据的测序深度、OTU 丰富度和群落多样性。所有样品的 Good's coverages 指数范围为 0.93~1.00。基于 Chao1 指数绘制的稀释曲线如图 2 所示, 随着抽样数的增加, 各样品稀释曲线斜率均逐渐降低, 后期曲线趋于平缓, Chao1 指数基本与测序获得的 OTU 数目一致, 说明在当前的测序深度下, 得到的测序数据量可以代表样本中的细菌信息。Group_Baits、Group_Water 和 Group_Fish 的 Simpson 指数分别为 0.83 ± 0.094 、 0.95 ± 0.035 和 0.82 ± 0.12 , 利用 SPSS 18.0 软件对 Simpson 指数进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 显示 Group_Water 的微生物多样性程度均显著高于 Group_Baits 和 Group_Fish 两组($P<0.05$)。

2.3.2 生境间多样性(β -Diversity)分析 微生物群落聚类分析根据样本相似性进行非加权组平均法(Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)分析, 采用 Jackknifed 重复抽样对 UPGMA

表 2 各样品 α 多样性指数
Tab.2 α -Diversity indices of each sample

样品 Sample	样品编号 Sample ID	α 多样性指数 α -Diversity indices		
		Good's coverage	Chao1	Simpson
金海湾小卤虫 <i>Artemia salina</i> in Jinhaiwan	B1	1.00	88.25	0.75
无棣小卤虫 <i>Artemia salina</i> in Wudi	B2	0.97	753.12	0.98
西藏大卤虫 <i>Artemia salina</i> in Tibet	B3	1.00	34.60	0.73
轮虫 <i>Rotifer</i>	B4	0.99	245.94	0.89
小球藻 <i>Chlorella</i>	B5	0.99	249.73	0.82
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i>	B6	1.00	116.75	0.79
蓄水池自然海水 Sea water	W18	0.91	2013.70	0.97
健康幼鱼养殖水体 Aquaculture water of healthy juvenile fish	W16.1	0.93	1723.52	0.99
	W16.2	0.93	1729.30	0.98
	W16.3	0.96	977.22	0.93
发病幼鱼养殖水体 Aquaculture water of diseased juvenile fish	W17.1	0.98	452.53	0.89
	W17.2	0.95	1232.16	0.97
	W17.3	0.95	1233.65	0.96
健康幼鱼 Healthy juvenile fish	F14.1	1.00	39.00	0.74
	F14.2	1.00	67.00	0.75
	F14.3	1.00	86.00	0.74
发病幼鱼 Diseased juvenile fish	F15.1	1.00	259.07	0.96
	F15.2	0.98	646.17	0.98
	F15.3	1.00	35.33	0.74

的可靠性进行检验(图 3)。结果显示, 75%~100%可信度认为水体组中的各样本单独聚为一支; 50%~75%可信度认为饵料组中 B2、B4 和 B5 与发病幼鱼组中 F15.1 和 F15.2 聚为一支; 75%~100%可信度认为饵料组中的 B1、B3 和 B6、发病幼鱼组中 F15.3 与健康幼鱼组所有样品聚为一支。

利用主成分分析(PCA, Principal component analysis)对反应样本差异的 OTU 组成进行方差剖析, 降维成 2 个反映方差的 2 个特征值, 并以此作为二维坐标 PCA 图的横纵坐标, 基于 Unifrac 距离进行 PCA 分析。从图 4 可明显看出, 所有样品大致聚为 5 簇: 饵料与鱼体组(Group_Baits、Group_E and Group_F) 2 簇, 自然海水组(Group_B)、健康养殖水体组(Group_C)、

发病养殖水体组(Group_D)各一簇。Group_Baits、Group_C 和 Group_D 大部分样品均重叠在一簇。

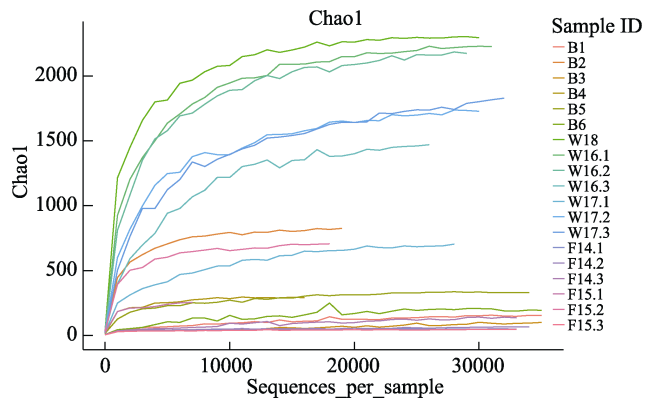


图 2 基于 Chao1 指数的稀释曲线
Fig.2 The dilution curve based on the Chao1 index

B1: 金海湾小鲁虫; B2: 无棣小鲁虫; B3: 西藏大鲁虫; B4: 轮虫; B5: 小球藻; B6: 裂弧藻; W18: 自然海水; W16: 健康幼鱼养殖水体; W17: 发病幼鱼养殖水体; F14: 健康幼鱼; F15: 发病幼鱼。同图 3、图 5 和图 6
B1: *Artemia salina* in Jinhaiwan; B2: *Artemia salina* in Wudi; B3: *Artemia salina* in Tibet; B4: *Rotifer*; B5: *Chlorella*; B6: *Schizochytrium*; W18: Sea water; W16: Aquaculture water of healthy juvenile fish; W17: Aquaculture water of diseased juvenile fish; F14: Healthy juvenile fish; F15: Diseased juvenile fish. The same as in Fig.3, Fig.5, and Fig.6

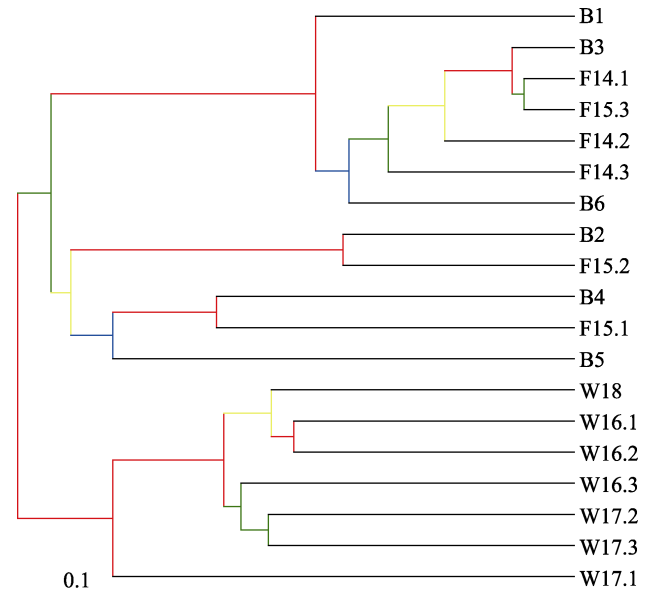


图 3 UPGMA 聚类分析及可信度检验
Fig.3 UPGMA cluster analysis and reliability test

红色、黄色、绿色、蓝色分别代表 UPGMA 分析可信度的 75%~100%、50%~75%、25%~50%和 25%
Red, yellow, green, and blue represent 75%~100%, 50%~75%, 25%~50% and 25% of UPGMA analysis reliability

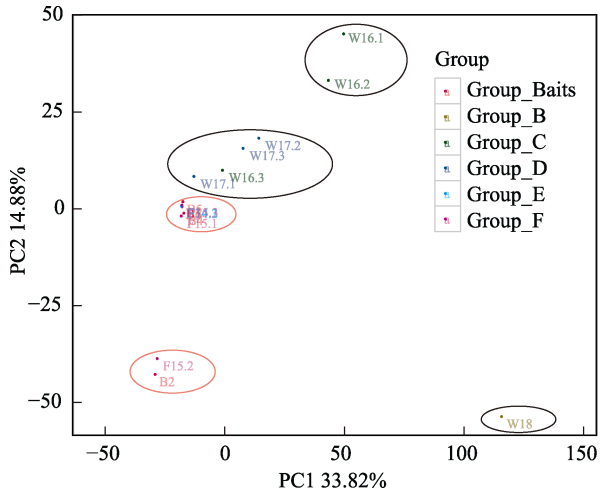


图4 主成分分析

Fig.4 Principal component analysis (PCA)

Group_B: 自然海水组; Group_C: 健康幼鱼养殖水体;
 Group_D: 发病幼鱼养殖水体; Group_E: 健康幼鱼组;
 Group_F: 发病幼鱼组; Group_Baits: 生物饵料组
 Group_B: Natural sea water; Group_C: Sea water of healthy
 juvenile fish; Group_D: Sea water of diseased juvenile fish;
 Group_E: Healthy juvenile fish; Group_F: Diseased juvenile
 fish; Group_Baits: Living baits

2.3.3 门、科、属三种分类水平下的群落结构分析

根据注释结果,所有样本在本次测序中检测的微生物有细菌和古细菌,其中,细菌归于37个门、100个纲、225个目、459个科和959个属。

在门水平上,纤维杆菌门(Fibrobacteres)、迷踪菌门(Elusimicrobia)、黏胶球菌门(Lentisphaerae)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Latescibacteria、Cloacimonetes、Aminicenantes、装甲菌门(Armatimonadetes)、Saccharibacteria、衣原体门(Chlamydiae)、螺旋菌门(Spirochaetae)、Synergistetes、Candidate_division_SR1、Marinimicrobia_(SAR406_clade)、TM6、PAUC34f、JL_ETNP_Z39、GOUTA4、SHA_109、WCHB1_60和TA06等22个门细菌含量较低,占比不足细菌总量的1%;酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿菌门(Chlorobi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacter)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽孢单菌门(Gemmatimonades)、Gracilibacteria、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、Parcubacteria、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)和柔膜菌门(Tenericutes)等15个优势门占细菌总量的97.09%以上。

15个优势菌门的菌群结构如图5所示,鱼体组中细菌在门水平上的菌群结构差异不大,占比前3的优势菌门为拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门,与饵料生物的门类细菌组成及其比例较为相似。经统计,健康幼鱼组共检测出8个门,占比前3的优势菌门比例依次为51.84%±0.63%、26.17%±0.84%和15.11%±0.40%,标准差均小于1%,表明健康幼鱼的菌群结构非常稳

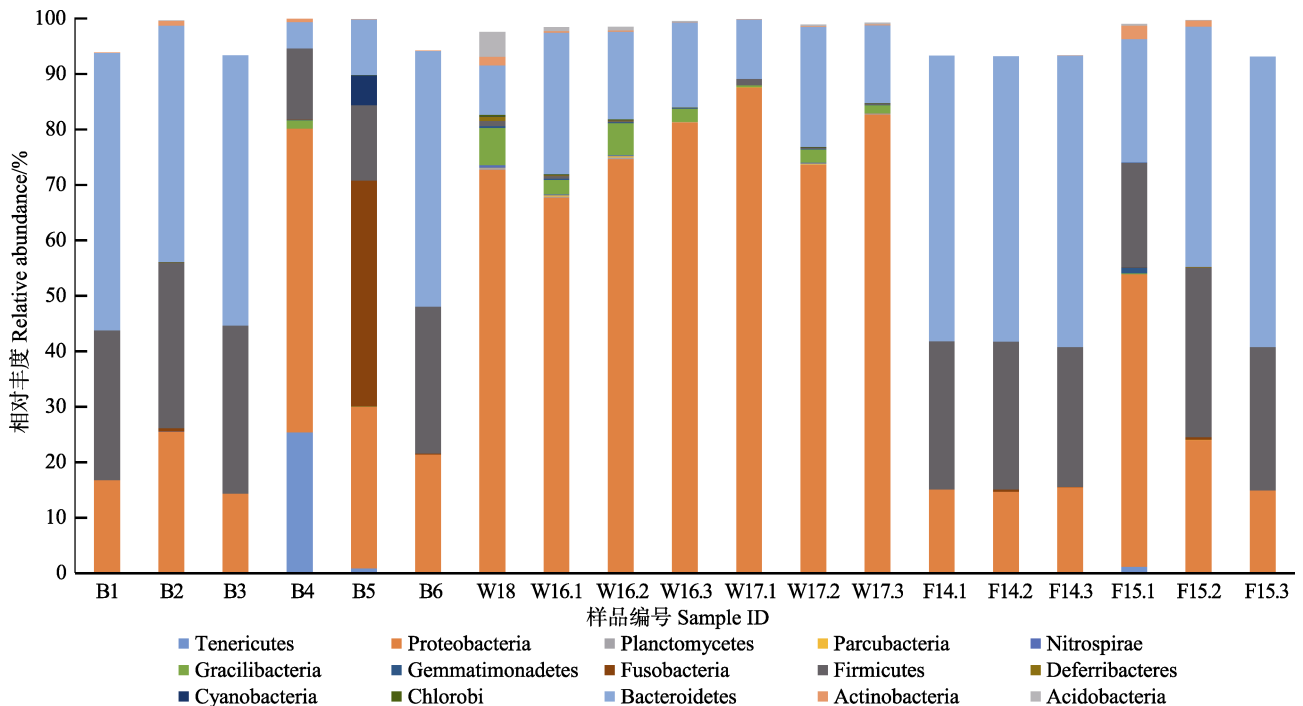


图5 各样品门水平下细菌相对丰度

Fig.5 Relative abundance at phylum level of bacterial communities of samples

定;发病幼鱼组共检测到的细菌门数为19个,3种优势菌门的比例范围依次为22.31%~52.31%、18.77%~30.53%和14.93%~52.77%,组内比例波动较大。

基于OTU注释结果,丰度较高的15个优势菌科分别为弧菌科(Vibrionaceae)、Rhodobacteraceae、假交替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)、紫单胞菌科(Porphryomonadaceae)、海洋螺菌科(Oceanospirillaceae)、支原体(Mycoplasmataceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)、Flavobacteriaceae、科尔韦尔氏菌科(Colwelliaceae)、拟杆菌目某科(Bacteroidales_S24_7_group)、拟杆菌科(Bacteroidaceae)、交替单胞菌科(Alteromonadaceae)、产碱杆菌科(Alcaligenaceae)和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。菌群结构如图6所示,15个科包含的细菌占总细菌含量的67.95%,样品间科水平的种类和细菌量各不相同。健康幼鱼组(Group_E)共检测出7个科,其中,至少在2个重复样品都检测到的科为6个,分别为紫单胞菌科(51.64%±0.56%)、毛螺菌科(23.82%±1.03%)、产碱杆菌科(12.20%±0.32%)、肠杆菌科(2.89%±0.28%)、拟杆菌科(0.031%±0.019%)和拟杆菌目某科(0.022%±0.0097%),其6个科的细菌量占总细菌量的(90.59%±1.09%),与饵料组B1、B3和B6的菌群结构较为相似。与健康幼鱼组(Group_E)相比,发病幼鱼组(Group_F)组内菌属多样性和菌群结构差异均较大,F15.3菌群结构与健康幼鱼较为相似,而F15.1和F15.2中紫单胞菌科(2.71%±1.89%)、毛螺菌科(7.13%±5.12%)和产碱杆菌科(0.51%±0.10%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,肠杆菌科(18.81%±2.41%)、拟杆菌科(11.78%±13.58%)

和拟杆菌目某科(13.27%±4.29%)的细菌比重显著高于健康幼鱼组;除此之外,还有9个科只存在于发病幼鱼组,其中,至少在2个重复样品检测到的科有5个,分别为弧菌科(1.10%±0.11%)、Rhodobacteraceae(0.22%±0.30%)、支原体(0.48%±0.67%)、梭杆菌科(0.05%±0.03%)和Flavobacteriaceae(0.10%±0.13%)。

在属水平上,19个样品中细菌丰度最高的15个属分别为副杆菌属(*Parabacteroides*)、*Lachnoclostridium*、*Parasutterella*、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、大肠志贺氏杆菌属(*Escherichia shigella*)、嗜冷菌属(*Psychrilyobacter*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、科尔韦尔氏菌属(*Colwellia*)、*Ruegeria*、*Olleya*、弧菌属(*Vibrio*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、*Methylophaga*、冷杆菌属(*Psychrobacter*)、*Reinekea*。

15种优势菌属在各样品中的菌群分布及结构特征见图7,健康幼鱼组组内属水平菌群结构稳定,含有5个菌属,分别为副杆菌属(59.13%±0.77%)、*Lachnoclostridium*(25.03%±0.84%)、*Parasutterella*(13.97%±0.21%)、假交替单胞菌属(1.83%±0.18%)和拟杆菌属(0.036%±0.022%)。与健康幼鱼组相比,发病幼鱼组组内菌属多样性和菌群结构差异均较大,F15.3菌群结构与健康幼鱼较为相似,而F15.1和F15.2中的副杆菌属(2.57%±1.70%)、*Lachnoclostridium*(0.88%±0.42%)和*Parasutterella*(0.19%±0.12%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,拟杆菌属(13.27%±4.29%)和大肠志贺氏杆菌属(8.50%±2.11%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,除此之外,还有6个属只存在于发病幼鱼组,其中,至少在2个重复样品都检测到的属有4个,分别为弧

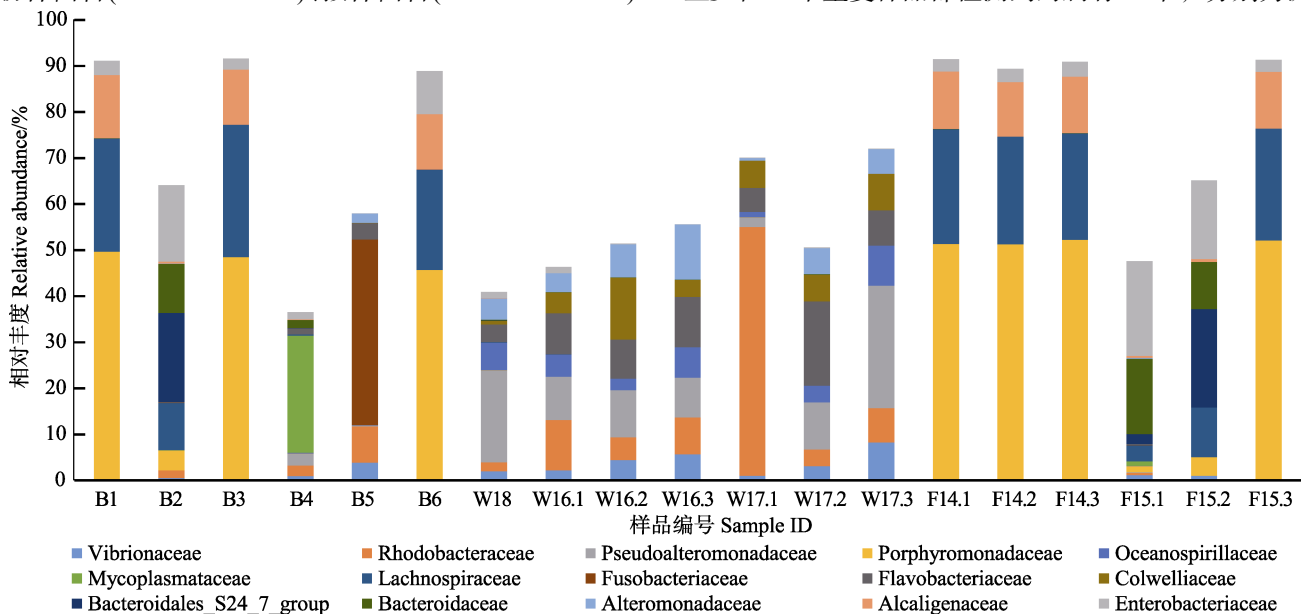


图6 各样品科水平下细菌相对丰度

Fig.6 Relative abundance at phylum level of bacterial communities of samples

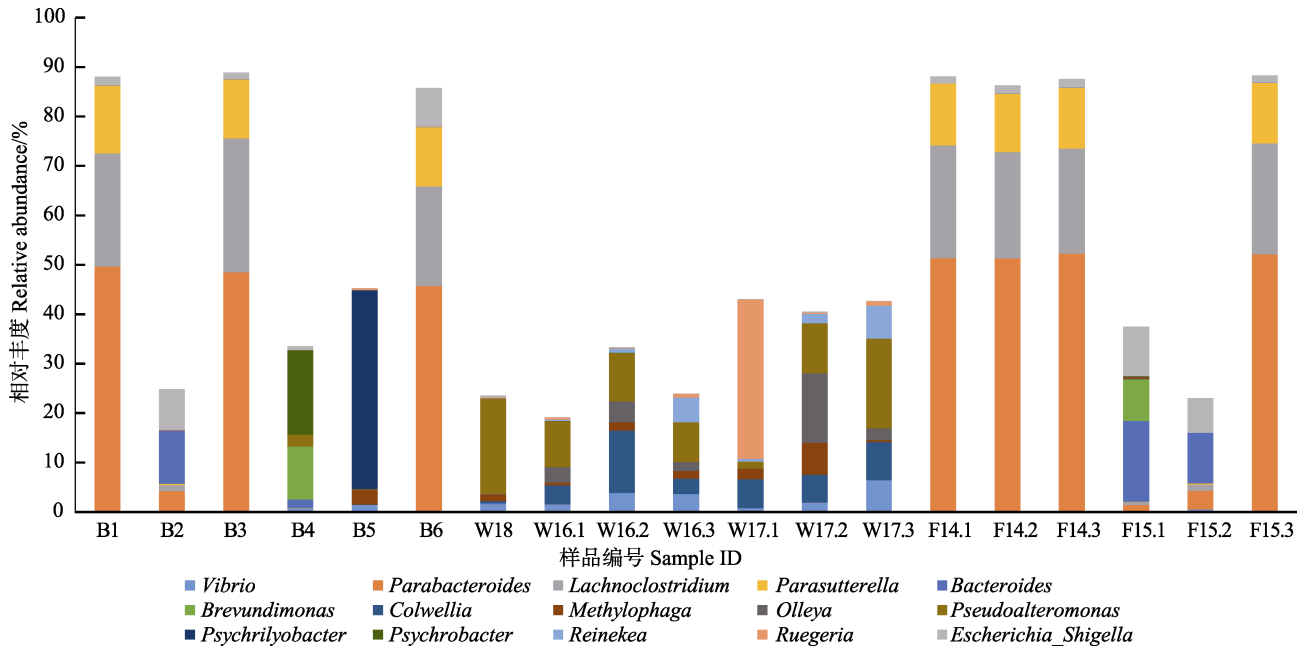


图7 各样品属水平下细菌相对丰度

Fig.7 Relative abundance at genus level of bacterial communities of samples

菌属(0.31%±0.35%)、短波单胞菌属(4.25%±5.97%)、*Olleya*(0.03%±0.04%)和冷杆菌属(0.01%±0.01%)。

2.3.4 丰度 Top100 的微生物的系统进化树分析

对OTU的丰度进行统计,选出丰度最高的100个OTU构建系统进化树,并以热图形式展示OTU在不同样品中的分布(图8)。经统计,这100条reads共归于6个门:变形菌门(63.54%)、拟杆菌门(21.88%)、厚壁菌门(8.33%)、梭杆菌门(1.56%)、蓝细菌门(1.56%)和Gracilibacteria(3.13%)。由图8可知,编号为F14.1、F14.2和F14.3的健康幼鱼和编号为F15.3的发病幼鱼与饵料组所属的金海湾小卤虫(B1)、西藏大卤虫(B3)和裂壶藻(B6)的高丰度OTU一致,主要为副杆菌属(*Parabacteroides*)、*Parasutterella*属、布劳特氏菌属(*Blautia*)、*Lachnoclostridium*属、梭菌目(Clostridiales)和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)等细菌。

编号为F15.1和F15.2的2条病鱼与生物饵料中无棣小卤虫(B2)、轮虫(B4)和小球藻(B5)中的高丰度OTU一致,主要为拟杆菌属(*Bacteroides*)、拟杆菌目某科(*Bacteroidales_S24_7_group*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、大肠志贺氏杆菌属(*Escherichia shigella*)和奇异变形杆菌。

3 讨论

本研究利用 Illumina Miseq 平台对山东某育苗场

暴发腹水症的30日龄大菱鲂幼苗及同期健康的幼苗、自然海水、养殖水体和生物饵料等共计19个样品内的细菌16S rDNA进行了高通量测序,所有样品OTU的Good's coverages指数范围在0.93~1.00之间,说明测序深度足够大,数据可以全面解读各样品中细菌的组成及丰度,可以反映绝大多数的微生物信息。

对Simpson指数的计算可知,幼鱼、生物饵料和养殖水体的细菌丰度和多样性依次升高。有关半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(张正等,2015)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)(孙振丽等,2016)的研究结果与本研究结果一致,即养殖水体的微生物多样性比动物的肠道微生物多样性高。健康幼鱼和发病幼鱼共有的OTU分别占各自OTU总数的90.80%和10.17%。这说明健康的大菱鲂和发生腹水的大菱鲂肠道细菌多样性存在较大的差异,发病幼鱼会受到外界细菌的侵袭。为了溯源大菱鲂幼鱼肠道微生物,基于OTU对生物饵料、自然海水、健康幼鱼和发病幼鱼进行Venn图分析(图1),显示健康幼鱼和发病幼鱼分别与生物饵料共有的OTU个数为80和636,分别占幼鱼OTU总数的91.95%和81.85%。有研究认为,养殖环境中的微生物能够影响养殖动物肠道内的微生物多样性(Li et al, 2012),丰度较低的某些细菌会定植到鱼体肠道(Navarrete et al, 2009)。由此可知,水体的微生物多样性非常高,自然海水OUT的数目达到2124个,但其与健康幼鱼特有的OTU数为0,即使是与发病幼鱼特有的OTU数也仅为31。由此推测,在大菱鲂

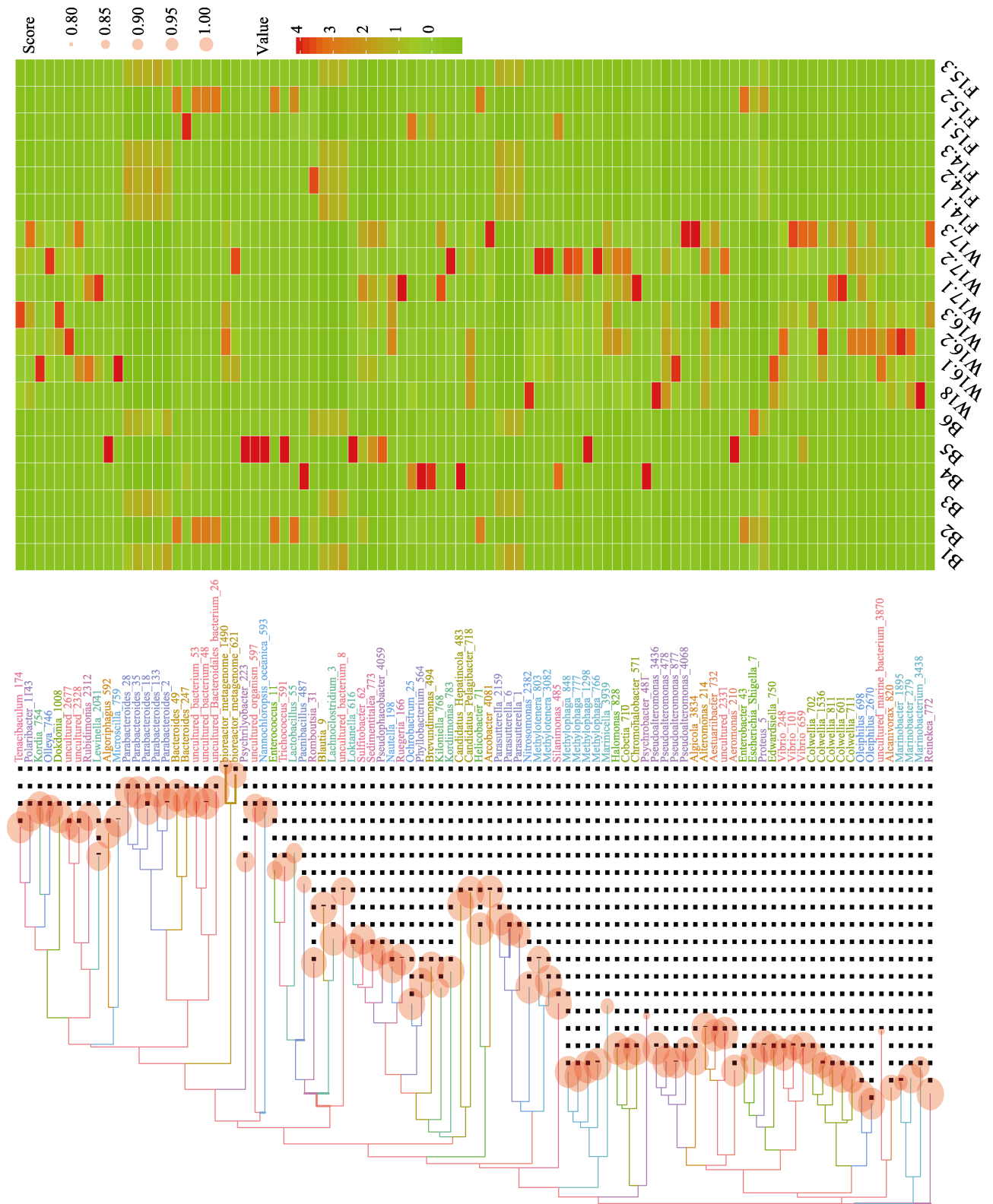


图 8 基于丰度最高的 100 个 OTU 的系统进化树及其在各样品中的分布热图

Fig.8 The phylogenetic tree based on the top 100 OTU and its heat map in each sample

B1: 金海湾小鲁虫; B2: 无棣小鲁虫; B3: 西藏大鲁虫; B4: 轮虫; B5: 小球藻; B6: 裂弧藻; W18: 自然海水; W16: 健康幼鱼养殖水体; W17: 发病幼鱼养殖水体; F14: 健康幼鱼; F15: 发病幼鱼

B1: *Artemia salina* in Jinhaiwan; B2: *Artemia salina* in Wudi; B3: *Artemia salina* in Tibet; B4: *Rotifer*; B5: *Chlorella*; B6: *Schizochytrium*; W18: Sea water; W16: Aquaculture water of healthy juvenile fish; W17: Aquaculture water of diseased juvenile fish; F14: Healthy juvenile fish; F15: Diseased juvenile fish

肠道微生物群落结构形成初期,生物饵料发挥了关键的作用。根据 OTU 注释结果,健康幼鱼的肠道微生物共聚类为 8 个门,发病幼鱼的肠道微生物可聚类为 19 个门。经统计,发病幼鱼组增加的 11 个门类细菌丰度均较小,细菌总量仅占 $3.91\% \pm 2.57\%$,如酸杆菌门、放线菌门、蓝藻门、Saccharibacteria 门和螺旋藻门等。说明当幼鱼发病时,饵料中某些丰度较低的细菌会趁机植入肠道。

根据细菌分类结果,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门在大菱鲆幼鱼肠道中占优势地位。有学者研究了体长 6 cm 大菱鲆幼鱼(朱鹏飞, 2015)和体重 700 g 大菱鲆成鱼(邢孟欣等, 2014)的肠道菌群,显示变形菌门细菌是丰度最高的门类。而本研究对 30 日龄(体长为 1 cm)健康幼鱼的肠道菌群研究结果显示,拟杆菌门是主要优势菌门,占细菌总量的 50%以上;其中,变形菌门细菌仅占 $15.11\% \pm 0.40\%$ 。值得注意的是,与健康幼鱼相比,发病幼鱼中变形菌门的细菌丰度明显提高($30.56\% \pm 19.76\%$)。变形菌门因其细菌形态多样而得名,是细菌中最大的一个门,主要包括 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲和 ϵ -变形菌纲,近年又确立一个 ζ -变形菌纲(Emerson *et al.*, 2007)。本研究发现, β -变形菌纲、伯克氏菌目、产碱杆菌科、*Parasutterella* 属中的 4 种未知菌种广泛存在于健康大菱鲆幼苗体内,该属 reads 总数为 12471 条,占健康幼鱼体内变形菌纲细菌总量的 80.79%。*Parasutterella* 属细菌首次是从健康的人类粪便中分离出来(Nagai *et al.*, 2009)。*Parasutterella* 属的细菌是否参与大菱鲆幼苗正常的肠道代谢活动,还有待进一步研究。与健康幼鱼相比,发病幼鱼 β -变形菌纲占比明显降低,仅占 33.62%。

γ -变形菌纲是目前已知细菌种类最多的一个纲,包含许多能引起人类致病的细菌,如沙门氏菌属(*Salmonella*)能造成人类伤寒和肠炎。注释结果发现,健康幼鱼肠道含有的 γ -变形菌纲的细菌较为单一,全部属于肠杆菌目肠杆菌科,占健康幼鱼变形菌纲细菌总数的 19.12%;而发病幼鱼肠道中 γ -变形菌纲的细菌较为多样,主要有肠杆菌目、交替单胞菌目(Alteromonadales)、Cellvibrionales 目、着色菌目(Chromatiales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、咸水球星菌目(Salinisphaerales)、硫发菌目(Thiotrichales)、弧菌目(Vibrionales)和黄色单胞菌目(Xanthomonadales)等,细菌丰度显著提高,占发病幼鱼变形菌纲细菌总数的 51.19%。其中,肠杆菌科、假交替单胞菌目和弧菌目含有许多的致病菌。

对所有样品(饵料、水体和幼鱼)中丰度较高的

100 个 OTU 进行进化树-热图分析发现(图 8),健康幼鱼肠道中高丰度菌属在饵料中的产自渤海的金海湾小卤虫、产自西藏的大卤虫和裂壶藻中含量颇丰。这些菌属中大多属于环境或动物肠道正常菌群,除了少量奇异变形杆菌。奇异变形杆菌属于肠杆菌科,是一种条件致病菌,能引起大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)体表溃烂(张庆华等, 2005)、棘胸蛙(*Rana spinosa*)烂皮病(王瑞君等, 2012)和中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)腮腺炎病(林亚歌等, 2104)等多种水产动物疾病。从图 8 也可看出,该菌在发病幼鱼生境内检测量有所提高。其次,发病幼鱼生境内高丰度菌属在饵料中的产自渤海的无棣小卤虫、轮虫和小球藻中颇丰。这些菌属中除了环境中广泛存在的化能自养类细菌和奇异变形杆菌外,还有一种致病菌属——大肠志贺氏杆菌属。大肠志贺氏杆菌属是一种肠道感染致病菌(刘蔚等, 1999),能引起人类痢疾(刘汉明, 1991)。而 3 种商品化卤虫和裂壶藻中大肠志贺氏杆菌属和奇异变形杆菌的含量都极其丰富。在生产上,卤虫需要摄食裂壶藻进行营养强化,然后才作为饵料投喂幼鱼,而裂壶藻和 3 种卤虫在门水平的菌群结构均较为相似,故推测鱼体内的大肠志贺氏杆菌属和奇异变形杆菌均来自裂壶藻。从细菌进化地位来说,大肠志贺氏杆菌属、奇异变形杆菌与迟缓爱德华氏菌同属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae),而肠杆菌科除菊花欧文氏菌都含有肠杆菌科共同抗原(何晓青, 1980)。由此可知,发病大菱鲆幼鱼肠道除了增加许多的有害菌群外,其肠道含量较低的致病菌也存在丰度升高现象。

4 小结

本研究利用高通量测序技术对暴发腹水症的大菱鲆幼苗及其养殖环境的微生物多样性进行了研究。结果显示,生物饵料中的微生物参与大菱鲆幼鱼肠道早期菌群的形成,并起主要作用,也会引起发病幼鱼肠道有害菌群大量滋生。因此,为了有效预防大菱鲆幼鱼疾病的暴发,在育苗过程中,应规范养殖,减少应激,并加强开口饵料中病原菌的检查及防控力度。

参 考 文 献

- Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119-124
- Blanquer A, Alayse JP, Berrada-Rkhami O, *et al.* Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectoformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *Journal of Fish Biology*,

- 1992, 41(5): 725–736
- Chen ZB, Li B, Wang ZB, *et al.* Study on the diversity of endophytic bacteria in Maize using Illumina MiSeq high-throughput sequencing system. *Modern Food Science and Technology*, 2016(2): 113–120 [陈泽斌, 李冰, 王定康, 等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性. *现代食品科技*, 2016(2): 113–120]
- Dou Y, Zhao XW, Ding J, *et al.* Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 122–129]
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460
- Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, *et al.* A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS One*, 2007, 2(7): e667
- He XQ. Sanitary inspection (bacterial examination) (second volume). Health and epidemic prevention station in Jiangxi Province, 1980 [何晓青. 卫生防疫检验(细菌检验)(下册). 江西省卫生防疫站, 1980]
- Jing YY, Zhang Z, Wang YG, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacterium associate with ascites disease of cultured *Scophthalmus maximus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(24): 106–108 [景亚运, 张正, 王印庚, 等. 养殖大菱鲂腹水病原菌的分离与鉴定. *安徽农业科学*, 2016, 44(24): 106–108]
- Ligi T, Oopkaup K, Truu M, *et al.* Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 56–66
- Li HM, Bai L, Jiang DM, *et al.* Microbial diversity of piggery air detected by 16S rDNA high-throughput sequencing. *Animal Science and Biotechnology*, 2015, 51(3): 81–84 [李红梅, 白林, 姜冬梅, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序方法检测猪舍空气微生物多样性. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(3): 81–84]
- Li J, Yan XH, Chen JX, *et al.* Studies on the characteristics of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Scophthalmus maximus*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(4): 649–654 [李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲂腹水病原菌的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(4): 649–654]
- Lin YG, Ye J, Shi TT, *et al.* Isolation and identification of pathogen *Proteus mirabilis* from diseased Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Fisheries Science*, 2014, 33(12): 800–803 [林亚歌, 叶键, 石婷婷, 等. 中华鳖源奇异变形杆菌的分离鉴定与致病性研究. *水产科学*, 2014, 33(12): 800–803]
- Li S, Sun L, Wu H, *et al.* The intestinal microbial diversity in mud crab (*Scylla paramamosain*) as determined by PCR-DGGE and clone library analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(6): 1341–1351
- Liu HM. Some advances in the epidemiology and molecular biology of *Shigella* in China. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1991, 7(2): 7–8 [刘汉明. 中国志贺氏菌属流行病学和分子生物学的某些进展. *中国人兽共患病学报*, 1991, 7(2): 7–8]
- Liu W, Zhao SH, Yang SQ, *et al.* Proper identification of *Shigella*. *Practical Preventive Medicine*, 1999, 6(1): 80–81 [刘蔚, 赵树红, 杨淑其, 等. 正确鉴定志贺氏菌属. *实用预防医学*, 1999, 6(1): 80–81]
- Nagai F, Morotomi M, Sakon H, *et al.* *Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Alcaligenaceae isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(7): 1793
- Navarrete P, Espejo RT, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, 2009, 57(3): 550–561
- Pozhitkov AE, Beikler T, Flemmig T, *et al.* High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontology*, 2011, 55(1): 70
- Sun ZL, Xuan YM, Zhang H, *et al.* Bacterial diversity in the *Penaeus vannamei* boone intestine and aquaculture environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 594–605 [孙振丽, 宣引明, 张皓, 等. 南美白对虾养殖环境其肠道细菌多样性分析. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 594–605]
- Thomson R, Macpherson HL, Riaza A, *et al.* *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 243–250
- Wang RJ, Xiong XJ. Isolation, identification and drug sensitivity tests of *Proteus mirabilis* from rotten-skin disease of *Rana spinosa*. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(4): 31–34 [王瑞君, 熊筱娟. 棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究. *淡水渔业*, 2012, 42(4): 31–34]
- Wang XF, Zhao YF, Song XF, *et al.* Application of high-throughput sequencing techniques for analyzing bacterial communities in pond-raised mud crab (*Scylla paramamosain*) intestine and its aquaculture environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1245–1253 [王贤丰, 赵艳飞, 宋志飞, 等. 应用高通量测序技术分析拟穴青蟹肠道及其养殖环境菌群结构. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1245–1253]
- Xing MX, Li GY, Hou ZH, *et al.* Different taxonomic distribution of gastrointestinal tract microbiome of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) individuals. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 14(20): 3801–3805 [邢孟欣, 李贵阳, 侯战辉, 等. 不同大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)个体肠道菌群结构差异研究. *现代生物医学进展*, 2014, 14(20): 3801–3805]
- Zhang ML, Zhang MH, Zhang CH, *et al.* Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 21
- Zhang QH, Xiong QM, Xiao LL, *et al.* A pathogen isolated from skin-ulcer *Pseudosciaena crocea*—*Proteus mirabilis* ZXS02 strain. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(6): 824–830 [张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病菌——奇异变形杆菌 ZXS02 菌株. *水产学报*, 2005, 29(6): 824–830]
- Zhang WN. Identification of a pathogen associated with swollen abdomen of cultured turbot and antigenicity of its outer membrane proteins. Master's Thesis of Ocean University of

- China, 2006 [张伟妮. 大菱鲆腹水症病原菌的鉴定及其外膜蛋白的抗原性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Zhang XJ, Chen CZ, Fang H, *et al.* *Edwardsiellasis* and its pathogen in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A case report. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(5): 417–423 [张晓君, 陈翠珍, 房海, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)病原鳃利斯顿氏菌的鉴定. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 417–423]
- Zhang Z, Li B, Wang YG, *et al.* The microflora structure in digestive tract of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) cultured in outdoor pond basing on high-through sequencing technique. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 38–45 [张正, 李彬, 王印庚, 等. 基于高通量测序的池塘养殖半滑舌鳎消化道菌群的结构特征分析. 水生生物学报, 2015, 39(1): 38–45]
- Zhang ZD, Gu MY, Wang W, *et al.* Analysis of bacterial community in radiation polluted soils by high-throughput sequencing. *Microbiology China*, 2016
- Zhu PF. Analysis of bacterial communities from turbot (*Scophthalmus maximus*) aquaculture system and construction of DNA microarray detection system for aquaculture pathogenic bacteria. Master's Thesis of First Institute of Oceanography, SOA, 2015 [朱鹏飞. 大菱鲆养殖环境细菌多样性分析及水产病原菌基因芯片检测体系的构建. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2015]

(编辑 冯小花)

Turbot (*Scophthalmus maximus*) Biodiversity Assessment Using High-Throughput Illumina Sequencing to Analyze Juvenile Turbot Intestines and Their Bacterial Cultures

WU Huanhuan^{1,2}, WANG Weiji², LÜ Ding², HU Yulong², KONG Jie^{1,2①}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract In order to study the effects of environmental factors on the intestinal flora structure of turbot (*Scophthalmus maximus*), we used high-throughput sequencing to explore the bacterial community structure and diversity in juvenile turbot intestines, the culture environment, and biological baits. The results showed that 547621 effective sequences were detected in nineteen samples, and they could be classified into 3771 operational taxonomic units (OTUs), among which 3038, 1090, 87, and 777 originated from the aquaculture water, the biological baits, healthy juvenile turbot intestine, and diseased juvenile fish intestine, respectively. There were 57 OTUs shared between the healthy juvenile turbot intestine and the biological baits, 0 OTU shared between the healthy juvenile turbot intestine and aquaculture water, 481 OTUs shared between the diseased juvenile fish intestine and the biological baits, 31 OTUs shared between the diseased juvenile fish intestine and the aquaculture water. The effect of biological bait on microbial diversity of intestinal tract of juvenile fish was much greater than that of environment. In total, the predominant phyla in the turbot intestine were Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria. The intestinal microflora of healthy juvenile turbot can be clustered into 8 phyla, and the intestinal microflora of the diseased juvenile fish could be clustered into 19 phyla. Compared with the healthy juveniles, the community structure of the predominant phyla was imbalanced at the intestinal level of the diseased juvenile fish. Furthermore, analysis of the 100 most abundant bacterial OTUs in the different samples revealed that the species dominant in the intestinal bacteria of juvenile fish was closely related to the dominant species in the biological baits. Meanwhile, the intestinal dominant bacteria species of each diseased juvenile are different. This study provided the basis for healthy culture and micro-ecological regulation of turbot.

Key words Biodiversity; High throughput sequencing; Turbot (*Scophthalmus maximus*)

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180625001

http://www.yykxjz.cn/

刘莹莹, 于珊珊, 柴迎梅, 林啸鹏, 祝茜. 松江鲈白介素15(TfIL-15)的结构特征与重组表达. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 95-103

Liu YY, Yu SS, Chai YM, Lin XP, Zhu Q. Characterization and recombinant protein expression of Interleukin-15 from roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 95-103

松江鲈白介素 15(TfIL-15)的结构特征 与重组表达*



刘莹莹 于珊珊 柴迎梅 林啸鹏 祝茜^①

(山东大学(威海)海洋学院 威海 264209)

摘要 为研究白介素 15(Interleukin-15, IL-15)在松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)先天免疫中的功能,本研究利用 RACE 技术克隆得到松江鲈 IL-15 基因(命名为 TfIL-15)的全长 cDNA 序列,其长度为 1140 bp,包括 5'-非编码区(5'-UTR) 165 bp、开放阅读框(ORF) 522 bp 和 3'UTR 453 bp。在 5'UTR 区域,存在 4 个读码框外的 AUG 翻译起始位点。基因 ORF 编码 173 个氨基酸(aa),其中,前 59 aa 为信号肽序列。成熟肽全长为 114 aa,预测分子量为 12.975 kDa,理论等电点为 5.15。同源比对发现,鱼类 IL-15 变异程度较高,TfIL-15 与其他鱼类 IL-15 同源性在 23%~61%之间。多序列比对和三维结构构建结果显示,TfIL-15 具有典型 4 个 α 螺旋二级结构,形成二硫键的 4 个半胱氨酸高度保守。qRT-PCR 分析表明,TfIL-15 广泛表达于松江鲈各组织中。腹腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)后,TfIL-15 mRNA 在血液、皮肤、肝脏和脾脏中均上调表达。在皮肤和血液中,刺激后 2 h 表达量迅速上调至最高峰,分别为对照组的 74 倍和 41 倍。脾脏和肝脏在刺激后 12 h 分别达到对照组的 3 倍和 18 倍。肝脏中,刺激后 96 h,表达量再次上调至对照组的 86 倍。上述结果表明,TfIL-15 可能参与了松江鲈抵抗外界刺激的先天免疫过程。另外,通过构建 TfIL-15 成熟肽的原核表达载体,成功获得重组蛋白,为进一步研究 TfIL-15 蛋白的功能奠定了基础。

关键词 松江鲈; 白介素 15(IL-15); 克隆; 基因表达; 重组蛋白表达

中图分类号 Q78; S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0095-09

IL-15 是白介素(Interleukin, IL)家族的重要成员之一,它与 IL-2、GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、G-CSF(粒细胞集落刺激因子)等,同属于 4 α 螺旋细胞因子家族(Lodolce *et al*, 2002)。转录水平的 IL-15 存在于多种类型细胞和组织器官中,包括表皮细胞、上皮细胞、神经细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞及心脏、肺、脾和骨骼肌等(Carson *et al*,

1995; Lee *et al*, 1996)。但蛋白水平的 IL-15 在血清或培养细胞的上清液中却很难被检测到。这种现象与 IL-15 基因的蛋白表达受严谨调控相关,这些调控方式包括 5'-UTR 多个翻译起始位点的存在、特殊的信号肽及羧基末端的某些结构等(Bamford *et al*, 1996、1998; Kurys *et al*, 2000)。IL-15 是一种多效细胞因子,具有增强淋巴细胞活性、促进粒细胞吞噬(Rathé *et al*,

* 山东省自然科学基金(ZR2016CP10)和威海市科技局项目(1070413421706)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CP10), and Weihai Science and Technology Bureau (1070413421706)]. 刘莹莹, E-mail: liuying0631@163.com

① 通讯作者: 祝茜, 教授, E-mail: qianzhu@sdu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-25, 收修改稿日期: 2018-07-31

2004)和 NK 细胞发育并增强其细胞毒性的作用(Fehniger *et al*, 2001; Lodolce *et al*, 2002)。此外, IL-15 还具有刺激 T 细胞/B 细胞增殖、诱导免疫球蛋白分泌、刺激特异性抗原产生、诱导信号转导和转录激活蛋白表达等多种功能(王东勇等, 1996)。

尽管功能多样,但由于白介素等细胞因子在趋异进化过程中的变异程度相当高,导致鱼类相关基因的开发难度加大,免疫功能研究相对滞后(贝锦新, 2006)。2004 年之前,硬骨鱼 IL-15 的相关研究工作几乎未见报道。随着红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)和斑马鱼(*Danio rerio*)等物种基因组计划的完成,一系列细胞因子包括 IL-15 才开始被陆续发现和鉴定(Bei *et al*, 2006; Fang *et al*, 2006; Gunimaladevi *et al*, 2007)。除了以上 3 种鱼,目前,IL-15 也仅在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、露斯塔野鲮(*Labeo rohita*, Hamilton)等少数鱼类中克隆得到(方玮, 2009; Das *et al*, 2015; Pérez-Cordón *et al*, 2014; Wang *et al*, 2007)。研究发现,鱼类 IL-15 可以由多种组织和细胞产生,组织分布广泛;受到不同诱导物免疫刺激后,IL-15 表达上调,但上调时间和不同组织的表现有所不同(贝锦新, 2006; 方玮, 2009)。此外,IL-15 还参与了鱼体对抗寄生虫的免疫反应(Pérez-Cordón *et al*, 2014; Das *et al*, 2015)。虹鳟体外重组表达 IL-15 蛋白能诱导虹鳟脾脏细胞产生 IFN- γ (Wang *et al*, 2007)。红鳍东方鲀重组表达的 IL-15,能活化鱼的外周血白细胞、小鼠 T 淋巴细胞(CTLL-2)、鱼的头肾细胞和胸腺细胞,说明重组蛋白具有活化增殖免疫细胞的生物学功能(贝锦新, 2006; 孙赛红等, 2015)。这些研究为今后进一步深入开展重组 IL-15 在鱼类健康养殖上的应用研究提供了基础。

松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel),隶属于鲈形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼科(Cottidae)、松江鲈属(*Trachidermus*),是一种近海溯河洄游的肉食性鱼类(于诗群等, 2008; 陈学昭等, 2016)。近年来,由于种群数量剧减,被列为国家 II 级保护动物(陈学昭等, 2016)。目前,关于 IL-15 基因在松江鲈体内的研究尚未开展,本研究克隆了松江鲈 IL-15(命名为 TfIL-15)的基因,分析了序列结构特征,应用实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术研究了其在鱼体内的分布和免疫刺激后基因应答情况,并利用原核表达系统体外表达了 IL-15 成熟肽的重组蛋白。研究结果可进一步丰富鱼类细胞因子的研究内容,有利于阐明鱼类细胞因子与鱼类免疫系统

的关系。重组蛋白的表达为进一步开展对 TfIL-15 的功能研究和抗体制备奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与组织样品制备

9~10 月龄的松江鲈(体重约 15~23 g)取自山东文登埠口松江鲈自然保护区,实验前置于充气海水中(12℃~14℃)饲养 1 周。选取正常健康个体,麻醉后心脏取血,然后解剖取其心脏、肝脏、鳃、肠、皮肤、肾脏、脾脏、脑、卵等组织,立即放入 Trizol 中研磨,用于提取正常组织 RNA。

LPS (Lipopolysaccharides, 脂多糖)刺激实验,将松江鲈平均分成 2 组(每组 50 条),一组腹腔注 50 μ l (0.04 mg/kg)的 LPS,对照组注射等体积无菌生理盐水。刺激后 0、2、6、12、24、48、72、96 h 麻醉取样(每次 6 条),分别取其血、皮肤、肝脏和脾脏用于组织总 RNA 提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

依据 Trizol (Invitrogen 公司)操作说明提取各样品的组织总 mRNA。cDNA 第一链的合成参照 Clontech 公司 SMART(Switching mechanism at 5' end of RNA template)的指导说明进行(表 1)(史晓丽等, 2018)。

1.3 TfIL-15 cDNA 的全长克隆

根据 LPS 刺激后 cDNA 文库的构建获得 TfIL-15 基因的 EST 序列,利用 Primer 5.0 设计特异性后引物 15R 与 5' primer 配对进行 5' RACE 克隆;设计特异性前引物 15F 与 3' anchor R 配对进行 3' RACE 克隆。所用模板为松江鲈刺激后肝脏 cDNA,反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 40 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。然后将 PCR 纯化产物与 pMD-18T 载体连接,克隆测序,得到 5'端和 3'端序列片段。

1.4 TfIL-15 基因的序列分析

利用软件 BioEdit 对 RACE 获得的两端 cDNA 序列进行拼接,以获得 TfIL-15 的 cDNA 全长序列;通过在线软件 ExPASy(<http://www.au.expasy.org/>)对 TfIL-15 的 cDNA 序列进行蛋白翻译、等电点及分子量预测;TfIL-15 编码蛋白的信号肽、糖基化位点分别应用 SignalIP 4.1 和 NetNGlyc1.0 Server 进行分析;蛋白的三级结构预测在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行,然后用 PyMol 软件进行三维结构的

建构与标注;在 NCBI 下载同源序列,利用 ClustalW、BioEdit 和 DNAMAN 进行同源序列比对分析,利用 MEGA5.0 软件以邻位法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

1.5 组织表达分析

TfIL-15 的组成型表达及刺激后表达模式的变化通过 qRT-PCR 分析来进行。根据 TfIL-15 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物(表 1),以正常各组织及刺激组和对照组的在不同时间点 cDNA 为模板,进行反应。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 15 s,60℃ 60 s,40 个循环(陈学昭等,2016),结束后进行熔解曲线分析。以 β -actin 作为内参基因,每个样品 cDNA 设 3 个平行实验。反应和分析使用 7300 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行。基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示(马慧鑫等,2018)。差异显著性使用 T 检验的

方法分析,当差异显著性水平 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

1.6 TfIL-15 重组蛋白表达

TfIL-15 基因成熟肽的两端引物分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,插入到 pET-30a(+)表达载体的多克隆位点中,构建 pET-30a(+)/TfIL-15 表达载体转化入大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 中。经阳性克隆筛选后,提取构建好的质粒载体转化表达菌株 BL21(DE3)并进行阳性筛选。

将筛选出的菌落分别置于 LB 液体培养基中过夜培养。次日,将过夜菌转培养(1:100 的比例)至新的液体 LB 培养基中约 3 h。待其 OD_{600nm} 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。诱导结束后,收集菌体,通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。进一步的超声破碎检测发现,蛋白以包涵体形式表达。

表 1 PCR 引物名称及序列
Tab.1 PCR primers and the sequences

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
15F	ACTACCCTGTTGACTGTCCACC	5' RACE and 3' RACE
15R	CACAGAAGTACTCAGGAGGC	
3' anchor R	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	反转录 PCR Reverse transcription PCR
5' Primer	TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAA	
Oligo-anchor R	GACCACGCGTATCGATGTCGACT16(A/C/G)	
Smart F	TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAAGGG	qRT-PCR
15RTF	CTGACGCTATGCTGTATGCTCCG	
15RTR	CGTTGTCCGACTATTCATTTCTTGC	qRT-PCR
ActinF	TGAGACCACCTACAACAGCATC	
ActinR	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	蛋白表达 Protein expression
15EMF	TACTCAGAATTCGCTGAGCGTCCTTCGGTTTAT	
15EMR	TACTCACTCGAGTTACGTTGTCGACTATTCAT	

在确定重组蛋白表达的情况下,进行蛋白的大规模培养表达,表达结束用 PBS 重悬菌体超声破碎 1 h。将超声破碎后沉淀进行包涵体洗涤,然后用 GenScript 的 His-tag 亲和层析柱进行纯化,具体操作步骤参见 Yu 等(2013)的方法。重组蛋白的复性采用尿素梯度透析法,每个梯度 4℃ 透析 16 h(王彤等,2013)。透析结束后,通过 SDS-PAGE 检测重组蛋白的纯化结果。

2 结果

2.1 TfIL-15 基因克隆及序列分析

松江鲈 IL-15 全长 cDNA 序列(图 1, GenBank 登录号为 MH299805)为 1140 bp,其中,5'-非编码区

(5'-UTR) 165 bp, 开放阅读框(ORF)522 bp, 3'-UTR 453 bp。在 5'-UTR 区域,存在 4 个读码框外的 AUG 翻译起始位点。基因 ORF 编码 173 个氨基酸(aa),其中,前 59 aa 为信号肽序列。成熟肽全长为 114 aa,预测分子量为 12.975 kDa,理论等电点为 5.15。成熟肽含有 2 个可能的 N 糖基化位点:NASM,132~134;NITV,153~155。

将 TfIL-15 与其他物种同源序列进行比对,发现 TfIL-15 与条石鲷(BAN84544.1)的同源性最高为 61%,其次为三刺鱼(NP_001254613.1) 59%,与斑马鱼同源性为 23%,与鱼类序列同源性在 23%~61%之间。与鸡(*Gallus gallus*, AAF61446.1)同源性为 24%,与人类 IL-15(*Homo sapiens*, AAA21551.1)同源性为

```

1  GTGCTGGAGCCTCATCTGGACCGCAATAACGCTCTCAAGCGTACACAACACAGGACATGGACTACTGAGACAAA
76  AAAAAAGCTTTATCGGAATAAGCGAAATGCAAAAATGCTGAGCTTGGCTTATTGCTCCGCTGGGAAGGAGAACGACC
151  ACGGCCGCTACGCAGATGACAGCCTTACGACGCGGTCCCGGTGATCCAGCTCCAGCCCGCATGGCCCGGAGAG
1  M T A F T T A S P V I H V Q P A W P G E
226  CAGCGCGCAAAGGGTCCAGTTCAGTTGACCTGTCTCTTTCAGAGAGAGTACAAAACTAAGGTCTGGCTT
21  Q R A K G V Q F Q L T C H L C R E S H K T K V W L
301  TGTTTCTAGTCTGAGCCTCCTGAGTACTCTGTGTGTGCTGCTGAGCGTCTCGGTTTATCTACTGAATTGC
46  C F L V L S L L S T S V C A A E R P S V Y L L N C
376  TTGGGGTCGAAAGACTGAAAAATGCCATTAAGAGATCTGACGCTATGCTGTATGCTCCGTCAGTACTGACGTT
71  L G S E R L K N A I K R S D A M L Y A P S T S D V
451  AAAGAAAACGTAAAGAGTCATCGCTCAAATGTACATATTGGAGCTGATGGTGGTTCATCGTTGAAGAAGAAATT
96  K E N C K E S S L K C Y I L E L M V V I V E E E I
526  CAGGATAAAAAAGCACATTGCATCTTTGACTTCAATGCCTCCATGCCAACAACTACCCTGTTGACTGTCCACCA
121  Q D K K A H C I F D F N A S M P T N Y P V D C P P
601  TGTGAAGCATTCTCACTAAAAATATTACAGTATTCTGGATAGACTCTTTAGCCTTTTGAAGAAATGAATAGT
146  C E A F S L K N I T V F L D R L F S L L Q E M N S
676  CGGACAACGTAATGATGTATACAATGTGCATTTGTAATAATTTGTAATAATTTGGTGGTTTTTATTTTGTAT
171  R T T *
751  ATATCACACTATAACTATGCCAACCTGTGAAAAAGCATACCGTCTGTATTTTAAAAATATAGCTTTAAATCGATG
826  AAAGAAGTGAATGGAAGCCATTGATTGTTTGAACAAATTTGTAATATGTACATGAAGCCTCTGCCACTG
901  CGTTGAAGAATTTGCCTTTTGGTTTTACAGTTTGGAGACAAGTAGCCAACAGTAGCAGCATGTATGAAATCCAGA
976  ATGTATATAAATGTGTGTATATATATATATATAGCTCAGCTAAACACTACTGAATGTGACACCTATTTATAC
1051  AGTATACACATAATGAACCTCTAGTATCTTCAGAATAGCTTCTCACTCCATTAATAATACCATAACTATGAAAA
1126  AAAAAAAAAAAAAA

```

图1 TfIL-15的cDNA序列及其编码序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of TfIL-15

下划线标出的分别为起始密码子和终止密码子。阴影部分为N-糖基化位点。箭头表示信号肽切割位点。

方框内为5'-UTR区读码框外的ATG翻译起始位点

The start codon and stop codon are underlined, the N-glycosylation sites are shadowed by gray, the arrow indicates the signal peptide cleavage site, and the four out-of-frame ATG initiation codons in the 5' UTR are indicated in the boxes

25%，与哺乳类同源性在20%~25%之间(表2)。氨基酸序列多序列比对发现，鱼类IL-15与鸟类和哺乳类IL-15的成熟肽区域的同源性较信号肽高，鱼类IL-15同源序列含有与鸟类和哺乳类相同的4个保守的半胱氨酸残基(图2)。

用SWISS-MODEL软件进行三维结构预测，发现TfIL-15具有典型4个 α 螺旋二级结构(图3A)。将TfIL-15与人类的IL-15叠合时(图3B)，发现蛋白结构较吻合，并且二硫键形成位点相互重合。此外，松江鲈另外2个半胱氨酸形成了第3个二硫键(图3A)，TfIL-15成熟肽起始氨基酸丙氨酸(A)与人类成熟肽起始氨基酸天冬酰胺(N)重合。

系统进化分析表明，所有鱼类的IL-15聚为一大支，鸟类和哺乳动物的IL-15聚为另外一大支(图4)。

2.2 TfIL-15组织表达分析

qRT-PCR结果表明，TfIL-15 mRNA广泛表达于松江鲈各组织中。其中，在心脏中的表达量最高，其次为鳃(图5)。

2.3 LPS刺激后各组织中TfIL-15基因的表达变化

腹腔注射LPS后，TfIL-15 mRNA在血液、皮肤、肝脏和脾脏中均呈上调表达(图6)。在皮肤中，刺激后2h表达量迅速上调至最高峰，为对照组的74倍，

表2 脊椎动物IL-15同源性比对分析

Tab.2 Amino acid identity of TfIL-15 with other vertebrate IL-15s

物种 Species	同源性 Identity (%)	物种 Species	同源性 Identity (%)
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	61	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	28
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	59	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	23
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	51	人 <i>Homo sapiens</i>	25
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	49	鸡 <i>Gallus gallus</i>	24
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	47	牛 <i>Bos taurus</i>	23
黑青斑河豚 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	42	野猪 <i>Sus scrofa</i>	23
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	31	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	20

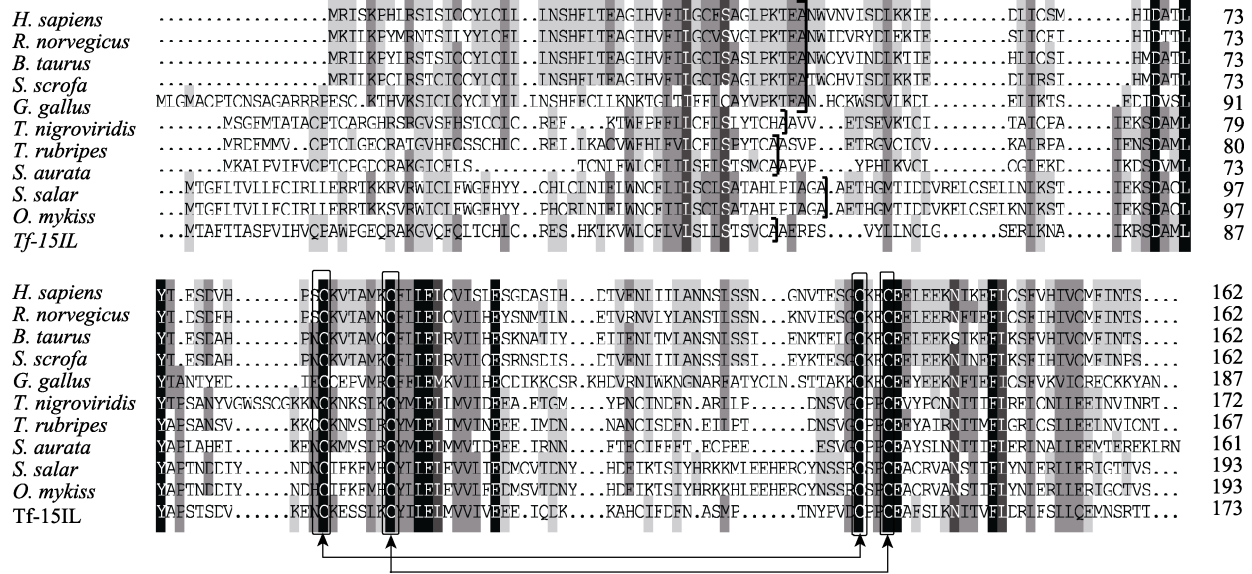


图 2 不同物种 IL-15 氨基酸序列的多序列比对

Fig.2 Alignment of the amino acids of IL-15 protein sequences

保守的半胱氨酸以方框表示, 箭头表示形成的二硫键结构, 信号肽切割位点以]表示。序列的 GenBank 登录号分别为: 人 *H. sapiens* (AAA21551.1), 褐家鼠 *R. norvegicus* (AAB94536.1), 牛 *B. taurus* (AAA85130.1), 野猪 *S. scrofa* (ABI81495.1), 鸡 *G. gallus* (AAF61446.1), 黑青斑河豚 *T. nigroviridis* (AAR25702.1), 红鳍东方鲀 *T. rubripes* (CAF28987.2), 金头鲷 *S. aurata* (AGS55349.1), 大西洋鲑 *S. salar* (AFB81536.1), 虹鳟鱼 *O. mykiss* (CAD88594.1)

The letters in box are the four conserved cysteine residues, the arrows indicate the formed two potential disulphide bonds, and semi square bracket indicates the potential signal peptide cleavage site

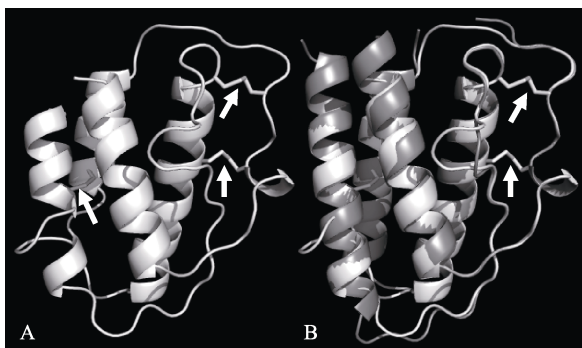


图 3 理论预测的 TfIL-15 蛋白(A)及与人类 IL-15(灰色)结构叠合图(白色) (B)

Fig.3 Three-dimensional structure of modeled TfIL-15 protein (A) and the structural superposition of TfIL-15 protein (white) with human IL-15 (Grey) (B)

二硫键位置以白色箭头表示

The disulfides are indicated with arrows

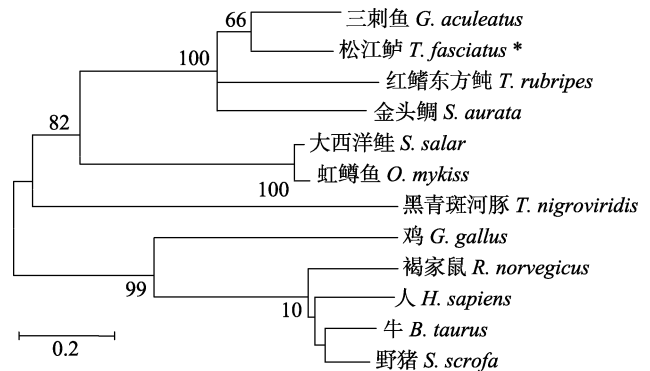


图 4 基于不同物种 IL-15 的氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed with amino acid sequences of IL-15 from various species

三刺鱼 *G. aculeatus* 的 GenBank 登录号为 NP_001254613.1, 其余物种的 GenBank 登录号同图 2, 星号表示本研究物种 GenBank accession number of *G. aculeatus* is NP_001254613.1, and the others accession numbers are the same as in Fig.2.

The position of TfIL-15 is marked by an asterisk

之后一直呈现较高的表达水平直至刺激后 96 h; 在血液中, 刺激后 2 h 表达量上调至对照组的 41 倍, 6 h 表达量下降至对照组的 0.23 倍, 之后表达量一直显著低于对照组直至实验结束; 在脾脏中, 刺激后 2 h

表达量开始上调至对照组的 1.3 倍, 6 h 略有下调, 12 h 达到对照组的 3 倍左右, 之后恢复至对照组水平。在肝脏中, 刺激后表达量逐渐上调, 2 h、6 h 表达量分别上调至对照组的 2.2 倍和 2.4 倍, 12 h 达到对照

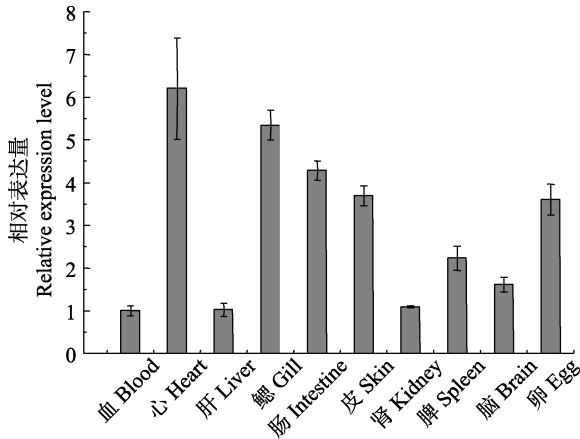


图5 TfIL-15 基因在正常组织中的表达模式
Fig.5 The constitutive expression of TfIL-15 mRNA in different tissues of normal roughskin sculpin

组的 18 倍，后恢复对照组水平；但在刺激后 96 h，表达量再次上调至在对照组的 86 倍。

2.4 TfIL-15 的原核表达及纯化

将构建的 TfIL-15 原核表达菌株经 IPTG 诱导后

进行 SDS-PAGE，在 19 kDa 处出现一条高表达蛋白的特异性条带，与预期大小相符(图 7)。将以包涵体形式表达的重组蛋白经亲和层析柱纯化、尿素梯度透析复性，可用于后续的活性检测。

3 讨论

本研究成功克隆到松江鲈 IL-15 基因 cDNA 全长序列，跟其他鱼类、哺乳类和鸟类的 IL-15 基因一样，TfIL-15 的 5'-UTR 含有多个(4个)读码框外的 AUG 翻译起始位点(红鳍东方鲀 2 个，斑马鱼 4 个，黑青斑河豚 2 个，虹鳟 7 个)。TfIL-15 含有一段很长的信号肽序列，这也与其他鱼类(松江鲈 59 aa，红鳍东方鲀 53 aa，斑马鱼 68 aa，虹鳟 65 aa，黑青斑河豚 53 aa)以及哺乳类和鸟类相似(人类含有 48 aa 信号肽，鸟类 66 aa)。脊椎动物 IL-15 这种现象的存在可能与 IL-15 的转录后表达受到严谨的调控有关(Bamford *et al*, 1996、1998; Kurys *et al*, 2000)。TfIL-15 与条石鲷 IL-15 的同源性最高，尽管如此，也只有 61%。与鱼类同源

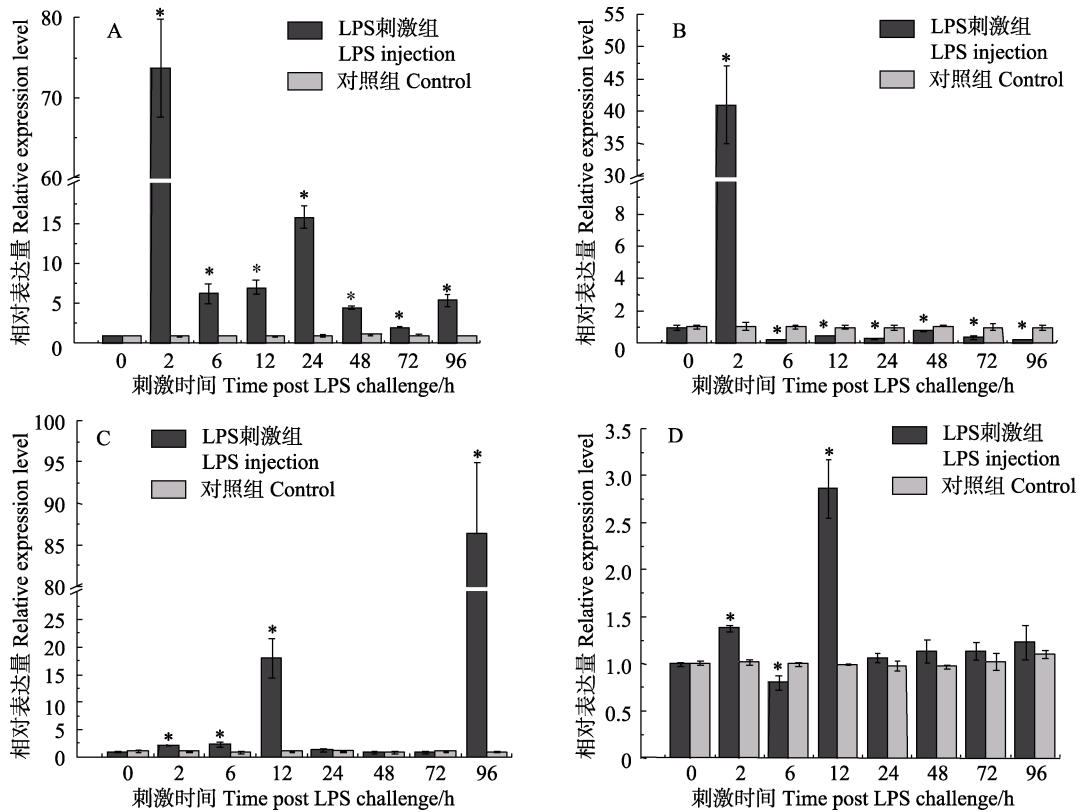


图6 LPS 刺激后 TfIL-15 在不同组织的表达模式变化
Fig.6 The temporary expression of TfIL-15 mRNA in different tissues post LPS challenge

A: 皮肤; B: 血; C: 肝脏 D: 脾。“*”表示实验组与对照组差异显著($P < 0.05$)
A: Skin; B: Blood; C: Liver; D: Spleen. The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$)

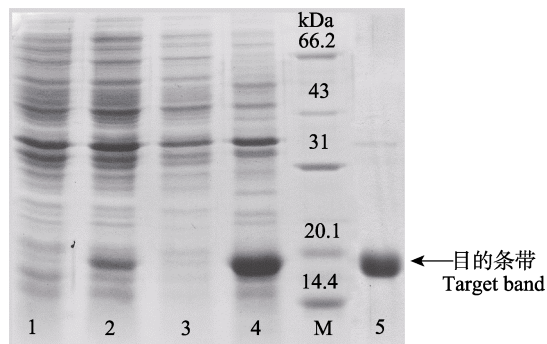


图7 TfIL-15的原核表达
Fig.7 Prokaryotic expression of TfIL-15

1: 诱导前细菌总蛋白; 2: 诱导后细菌总蛋白; 3: 超声破碎上清液; 4: 破碎后的包涵体; M: 蛋白 Marker; 5: 纯化蛋白
Lane 1: Lysate of *E. coli* without induction; Lane 2: Lysate of *E. coli* with induced with IPTG; Lane 3: Supernatant of recombinant pET-30a(+)/TfIL-15 after ultrasonication; Lane 4: Sedimentation of recombinant pET-30a(+)/TfIL-15 after ultrasonication; M: Protein marker; 5: Purified protein

性在 23%~61%之间, 可以看出不同物种鱼类 IL-15 变异程度比较大, 这可能是为了适应不同的生长环境而进化所致(TfIL-15 与同为海水或者咸淡水鱼类同源性高于淡水鱼类), 同时这可能也是目前鱼类 IL-15 研究较少的原因之一。

氨基酸序列多序列比对结果显示, 不同物种动物 IL-15 的成熟肽区域的同源性较信号肽区域高, 这可能由于成熟肽参与执行细胞因子的功能, 而信号肽仅参与引导 IL-15 的胞内转运与分泌。在人类 IL-15 成熟肽序列中存在 4 个半胱氨酸残基, 能形成两对二硫键(Bernard *et al.*, 2004)。这 4 个半胱氨酸在鱼类 IL-15 同源蛋白序列中高度保守。蛋白质三级结构预测结果显示, TfIL-15 与人类 IL-15 三级结构基本吻合, 同属于 4 α 螺旋家族, TfIL-15 的 2 个二硫键位置与人类二硫键位置重合。这说明这些保守残基对于维持脊椎动物 IL-15 空间构象的形成和功能发挥可能起重要作用。三刺鱼、红鳍东方鲀、金头鲷和本研究松江鲈中, 还含有另外的 2 个半胱氨酸, 在三维结构预测中, 这 2 个半胱氨酸形成了第 3 个二硫键(图 3A)。这 2 个半胱氨酸是否确实形成新的二硫键, 对于维持构象起到怎样的作用, 尚需要进一步验证。

qRT-PCR 结果显示, TfIL-15 广泛表达于松江鲈各个组织器官中, 这与以往研究鱼类 IL-15 的表达模式相同, 并且类似于人类 IL-15 的广泛分布特征, 这表明 IL-15 可能在多个生理过程中发挥重要的作用。值得注意的是, 在卵中, IL-15 也表现出了较高的转录水平表达。在对红鳍东方鲀的研究中也发现, IL-15 在性腺中表达量较高。Das 等(2015)在对露斯塔野鲮

IL-15 的研究中发现, IL-15 在卵巢组织和未受精卵中也呈现出较高的表达量, 而且在受精后发育初期表达量持续上调, 都表明了 IL-15 转录本以母系遗传的形式给予待发育的后代被动免疫保护。IL-15 在卵中遗传性的组成型高表达在卵排出体外、受精卵或幼体尚未获得自身免疫的时候, 对于鱼类的体外受精及幼体发育过程中对抗水体复杂的病原微生物侵袭起着至关重要的作用。

为了进一步探讨 TfIL-15 在机体免疫中的作用, 对 LPS 刺激后 TfIL-15 在松江鲈主要免疫组织内的表达情况进行了检测。结果发现, 在血液和皮肤中, LPS 刺激后 2 h, TfIL-15 迅速上调至最高峰, 在肝脏和脾中 12 h 达到表达高峰, 比皮肤和血液稍有延迟。这可能是因为血液作为承载各种免疫细胞和细胞因子的全身免疫器官, 皮肤作为机体接触外界复杂水体环境的首个免疫组织, 是最直接和快速的 LPS 应答和反应器官; 而脾脏是鱼类红细胞、中性粒细胞和粒性白细胞等各种免疫细胞生产、贮存和成熟的主要场所, 肝脏是鱼类多种重要免疫相关蛋白的合成场所, 因而上调时间与皮肤和血液相比有所滞后。肝脏 TfIL-15 mRNA 在刺激后 96 h 又出现一个新的高峰, 这在对转铁蛋白、C-型凝集素、白介素 1 β 等的研究中也发现(Liu *et al.*, 2012a、b; Yu *et al.*, 2013), 原因可能是首次免疫激活的免疫细胞产生的新的信号分子, 又激活了新的免疫细胞类型, 从而再次上调表达 TfIL-15 基因。在对红鳍东方鲀的研究中发现, 在 LPS 刺激对 IL-15 的表达没有明显的影响。而在黑青斑河豚的研究中, LPS 可引起几乎所有组织 IL-15 表达量的上调。本结果与黑青斑河豚的研究类似, 推测可能 IL-15 在不同鱼体内的功能存在一定的差异。鱼类作为低等脊椎动物, 其适应性免疫机制相对不完善, 因此在抵御外界病原体入侵时主要依靠先天免疫发挥作用。细胞因子 IL-15 的上调表达正是适应了机体所需, 通过其激活淋巴细胞、促进免疫相关蛋白表达等作用, 在机体对抗外来病原入侵过程中发挥重要的抵御作用。鉴于 TfIL-15 可能在鱼类抵抗外界刺激的免疫反应中的作用, 本研究成功地对松江鲈 IL-15 的成熟肽进行了体外表达, 这为进一步研究 TfIL-15 蛋白的功能奠定了基础。

参 考 文 献

Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, *et al.* The 5'-untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *Journal of Immunology*, 1998, 160(9):

- 4418–4426
- Bamford RN, Battiata AP, Waldmann TA. IL-15: The role of translational regulation in their expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 59(4): 476–480
- Bei JX. The homologues of interleukin (IL)-15 and IL-15 receptor subunits in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*): Cloning, identification and functional characterization. Doctoral Dissertation of Sun Yat-Sen University, 2006 [贝锦新. 红鳍东方鲀白细胞介素(IL)-15 及其受体亚基同源基因的克隆鉴定和功能研究. 中山大学博士研究生学位论文, 2006]
- Bei JX, Suetake H, Araki K, *et al.* Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins. *Molecular Immunology*, 2006, 43(7): 860–869
- Bernard J, Harb C, Mortier E, *et al.* Identification of an interleukin-15 alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(23): 24313–24322
- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, *et al.* Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96(6): 2578–2582
- Chen XZ, Zhang L, Yu SS, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2-D2 in roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 37(10): 133–140 [陈学昭, 张雷, 于珊珊, 等. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)泛素结合酶 E2-D2 基因的分子克隆及组织表达分析. *海洋学报*, 2016, 37(10): 133–140]
- Das S, Mohapatra A, Kar B, *et al.* Molecular characterization of interleukin 15 mRNA from rohu, *Labeo rohita* (Hamilton): Its prominent role during parasitic infection as indicated from infection studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 25–35
- Fang W, Xiang LX, Shao JZ, *et al.* Identification and characterization of an interleukin-15 homologue from *Tetraodon nigroviridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 143: 335–343
- Fang W. Molecular cloning, evolution and functional analyses of IL-15 subfamily and IL-15 receptor alpha chain family in teleost fish. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009 [方玮. 鱼类 IL-15 及其受体 α 链基因家族的分子克隆、进化和功能研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009]
- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: Biology and relevance to human disease. *Blood*, 2001, 97(1): 14–32
- Gunimaladevi I, Savan R, Sato K, *et al.* Characterization of an interleukin-15 like (IL-15L) gene from zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 351–362
- Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, *et al.* The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(39): 30653–30659
- Lee YB, Satoh J, Walker DG, *et al.* Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport*, 1996, 7(5): 1062–1066
- Liu YY, Yu SS, Chai YM, *et al.* Transferrin gene expression in response to LPS challenge and heavy metal exposure in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012a, 32(1): 223–229
- Liu YY, Yu SS, Chai YM, *et al.* Lipopolysaccharide-induced gene expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and interleukin-1 β in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012b, 33(4): 690–698
- Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, *et al.* Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002, 13(6): 429–439
- Ma HX, Wang L, Wang LQ, *et al.* The different expression patterns of the gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the correlation between its expression and *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 44–52 [马慧鑫, 王磊, 汪林庆, 等. 牙鲆精氨酸酶 II 基因的克隆以及免疫应答表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 44–52]
- Pérez-Cordón G, Estensoro I, Benedito-Palos L, *et al.* Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 37(2): 201–208
- Rathé C, Girard D. Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: Importance of the IL-15 alpha chain. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 76(1): 162–168
- Shi XL, Meng XH, Kong J, *et al.* cDNA cloning of the FBA gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analysis after WSSV infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 112–119 [史晓丽, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国明对虾 FBA 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 112–119]
- Sun SH, Ma P, Li H, *et al.* Prokaryotic expression and biological activity evaluation of recombinant IL15 from tiger pufferfish *Takifugu rubripes*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(6): 598–603 [孙赛红, 马普, 李慧, 等. 红鳍东方鲀白介素 15 的原核表达及其活性测定. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(6): 598–603]
- Wang DY, Huang JS, Guo MQ. Interleukin 15. *Chemistry of Life*, 1996, 16(3): 26–28 [王东勇, 黄建生, 郭明秋. 白介素 15. *生命的化学*, 1996, 16(3): 26–28]
- Wang T, Holland JW, Carrington A, *et al.* Molecular and functional characterization of IL-15 in rainbow trout

- Oncorhynchus mykiss*: A potent inducer of IFN- γ expression in spleen leukocytes. *Journal of Immunology*, 2007, 179(3): 1475–1488
- Wang T, Zhang J, Li DJ, *et al.* Optimization on expression of recombinant human interleukin 21 and its biological activity analysis in vitro. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 20(4): 283–287 [王彤, 张娟, 厉道娟, 等. 重组人白介素 21 的原核表达与体外活性研究的优化. *药物生物技术*, 2013, 20(4): 283–287]
- Yu SQ, Wang SD. Characterization and breeding technology of roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. *Journal of Beijing Fisheries*, 2008, 25(8): 50–52 [于诗群, 王世党. 松江鲈鱼的生物学特征及养殖技术. *北京水产*, 2008, 25(8): 50–52]
- Yu SS, Yang H, Chai YM, *et al.* Molecular cloning and characterization of a C-type lectin in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 582–592

(编辑 冯小花)

Characterization and Recombinant Protein Expression of Interleukin-15 from Roughskin Sculpin, *Trachidermus fasciatus*

LIU Yingying, YU Shanshan, CHAI Yingmei, LIN Xiaopeng, ZHU Qian^①

(School of Marine Science, Shandong University (Weihai), Weihai 264209)

Abstract Interleukin 15 (IL-15) is an important cytokine of fish immune system. In the present study, the IL-15 cDNA named as TfIL-15 was cloned from roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. The full-length of TfIL-15 cDNA is 1140 bp, which contains a 5'-UTR (untranslated region) of 165 bp, a 3'-UTR of 453 bp and an open reading frame (ORF) of 522 bp, encoding a polypeptide of 173 amino acids (aa) with a putative 59 aa-long signal peptide. Four out-of-frame AUG initiation codons, the negative translational regulators of mammalian IL-15 genes were also detected in the 5'-UTR of TfIL-15. The protein sequence shared 23%~61% identity with reported fish IL-15s, displaying relatively high degree of variation. TfIL-15 homologues also contained four highly conserved cysteine residues allowing the formation of two disulfide bridges along with four predicted α -helices. Phylogenetic analysis grouped roughskin sculpin with other fish on a separated branch, excluded from mammalian and avian IL-15s. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that TfIL-15 was widely expressed in all detected tissues, with the highest expression in the heart. Post LPS challenge, TfIL-15 increased rapidly to the maximum of 74 folds and 41 folds compared with that of the control group at 2 h post challenge (hpc) in the skin and blood. The induction of TfIL-15 mRNA in the spleen and liver was 3 folds and 18 folds at 12 hpc. Interestingly, at 96 hpc, the expression of TfIL-15 in the liver was up-regulated again to the 86 folds higher than that of the control group. These results indicate that TfIL-15 may play an important role in fish innate immune response against microbial infections. Furthermore, the mature peptide of TfIL-15 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells successfully, laying a foundation for further research on the function of TfIL-15 protein.

Key words Roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*); Interleukin-15 (IL-15); Gene clone; Relative expression; Recombinant protein expression

① Corresponding author: ZHU Qian, E-mail: qianzhu@sdu.edu.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180518002

http://www.yykxjz.cn/

武和英, 王秀华, 杨冰, 于党辉, 黄健. 一对虾养殖场的多病原跟踪. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 104–114
Wu HY, Wang XH, Yang B, Yu DH, Huang J. Tracking of shrimp multiple pathogens in a shrimp farm. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 104–114

一对虾养殖场的多病原跟踪*

武和英^{1,2} 王秀华^{2,3①} 杨冰^{2,3} 于党辉² 黄健^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究通过对一对虾养殖场定期采样, 采用分子生物学鉴定方法, 分别对对虾体内及水环境中弧菌(*Vibrio* sp.)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)及主要病毒性病原进行了跟踪检测, 同时, 检测了水环境中的氨氮及亚硝基氮含量的变化趋势。结果显示, 该对虾养殖场中存在的主要病原为多种致病弧菌和EHP, 未检测出对虾白斑综合征病毒(WSSV)、传染性肌肉坏死病毒(IMNV)、偷死野田村病毒(CMNV)及传染性皮下和造血组织坏死病毒(IHHNV); 该养殖场中弧菌检出种类达到16种, 其中, 主要的弧菌种类有副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、欧文氏弧菌(*V. owensii*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*), 且存在导致急性肝胰腺坏死病的副溶血弧菌(VP_{AHPND}); 养殖中期大棚养殖池水体氨氮及亚硝基氮浓度分别达到(3.5±2.0)、(8.2±0.7) mg/L, 显著高于室外养殖池水体氨氮及亚硝基氮浓度($P<0.05$)。养殖期跟踪的7个虾池中, 出现严重对虾病害的大棚养殖池比例达到100%, 而室外养殖池仅出现轻度对虾病害, 发病池比例为25%。根据研究结果推测, 造成大棚养殖池对虾发病死亡的主要原因为养殖对虾感染弧菌及虾肝肠胞虫, 同时, 养殖密度大、水体氨氮及亚硝基氮浓度过高等在对虾病害发生中起到了协同作用。本研究结果可为当前对虾养殖病害防控技术提供理论支持和科学依据。

关键词 凡纳滨对虾; 病原; 弧菌; 虾肝肠胞虫; 病毒病; 病原跟踪

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0104-11

近年来, 对虾病害给国内外对虾养殖业造成了巨大的损失, 其特点表现为对虾发病期提前(Tran *et al*, 2013), 病原种类繁多(韩琳等, 2018), 虾病发生区域广(Lightner *et al*, 2012; Nunan *et al*, 2014; Soto-Rodriguez *et al*, 2015; 王博雅等, 2017; 陈禄芝等, 2016), 且患病对虾死亡率高(Han *et al*, 2015; Hernández-Palomares *et al*, 2018)。研究发现, 目前

中国对虾养殖中主要存在的病毒性病原有白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)(Hernández-Palomares *et al*, 2018)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)(Yan *et al*, 2016; 李秋璇等, 2015)、传染性肌肉坏死病毒(Infectious myonecrosis virus, IMNV)(Kurcheti *et al*,

* 广西创新驱动发展专项(桂科 AA17204044)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022018001)共同资助[This work was supported by Guangxi Innovation-Driven Development Project (AA17204044), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS(20603022018001)]. 武和英, E-mail: 1450847915@qq.com

① 通讯作者: 王秀华, 研究员, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-18, 收修改稿日期: 2018-05-30

2017)及偷死野田村病毒(Covert mortality nodavirus, CMNV)(Zhang *et al*, 2017), 最新报道还存在对虾黄头病毒(Sinnuengnong *et al*, 2018; 朱罗罗等, 2016)、对虾虹彩病毒(Qiu *et al*, 2017); 细菌性疾病主要为急性肝胰腺坏死综合症(Hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)(Han *et al*, 2015; 孙明玉等, 2018)和微孢子虫病原虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)导致的虾肝肠胞虫病(Prasertsri *et al*, 2009)。

在对虾疾病防控方面, 无论对虾种苗场还是养殖场都已采取了防控措施, 减少对虾病原感染率、降低养殖水体中的病原数量, 采用各种水质改良剂、微生物制剂改善水质, 提高对虾抗病力(Warneke *et al*, 2011; 王春迪等, 2016), 对虾病害发生率依然没有显著下降(王筱珊等, 2017; 陈禄芝等, 2016; 王博雅等, 2017; 施慧等, 2017), 且国内对虾养殖产量呈逐年下降趋势。

为查明当前对虾养殖中病害形成的原因, 本研究选择山东潍坊沿海1个具备大棚养殖池、室外养殖池的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖场作为虾病调查研究的采样点, 采取定期取样的方

法, 跟踪监测了对虾及水体中的主要病原的种类数量, 水中氨氮及亚硝基氮浓度的变化及对虾病害发生情况, 以期通过分析养殖场的对虾疾病感染过程、发病特点, 找出患病死亡的原因, 为对虾养殖的疾病防控提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 养殖场基本资料收集

1.1.1 养殖场基本情况 对虾养殖场位于山东省潍坊市北部近海的内陆盐碱地区域, 养殖用水为近海河口区水源。养殖场现有水面13.8 hm², 其中, 养殖用室外池塘30个(小型池塘12个, 每个面积为0.2 hm²; 中型池塘18个, 每个面积为0.3 hm²); 大棚养虾池4个(小型棚2个, 每个0.1 hm²; 大型棚2个, 每个0.5 hm²)。另有大型池塘6个, 每个面积为0.8 hm², 用于水处理。室外养殖池平均有效水深为1.6 m, 大棚养殖池平均有效水深为1.4 m。从中随机抽取池塘7个为跟踪取样虾池, 池塘编号、面积、放苗时间及密度等信息见表1。

表1 养殖池的基本情况
Tab.1 Basic information of the shrimp ponds

池塘编号 Ponds No.	池塘面积 Pond area(hm ²)	放苗密度 Stocking density (ind./m ²)	放苗规格 Body length of shrimp (cm)	放苗时间 Time of stocking Year-month-day	虾苗来源 Shrimp hatcheries
G1	0.5	350	2.1±0.2	2017-05-25	C1
G2	0.5	350	0.6±0.1	2017-05-25	C2
G3	0.1	350	0.7±0.1	2017-06-25 2017-06-18	C3 C4
W1	0.2	70	0.7±0.1	2017-06-18	C3
W2	0.2	70	0.7±0.1	2017-06-10	C4
W3	0.3	70	0.7±0.1	2017-06-25	C4
W4	0.3	70	0.7±0.1	2017-06-25	C1

注: C1~C4: 育苗场; G1~G3: 大棚养殖池; W1~W4: 室外养殖池

Note: C1~C4: Shrimp hatcheries; G1~G3: Indoor ponds; W1~W4: Outdoor ponds

1.1.2 养殖管理 养殖用水先经漂白粉(30 mg/L)处理, 再曝气脱氯后使用, 养殖期间, 水体盐度为11±3.6, pH为7.8~8.5, 大棚养殖池水温为26.2°C~32.5°C, 室外养殖池水温为23°C~28.5°C。大棚养殖池配备底部增氧管(3 W/m²)及水车式增氧机(1.5 W/m²), 室外养殖池配备水车式增氧机(1.5 W/m²)。在养殖期间, 室外养殖池水体中的DO>5 mg/L, 大棚养殖池水体DO>4 mg/L。养殖投喂人工配合饵料, 虾苗体长为3 cm以前, 日投喂

6次, 日投饵量为对虾体重的5%; 3 cm后, 日投喂4次, 日投饵量为对虾体重的3%。大棚养殖池日换水量为(20±5)%, 外塘养殖池每10 d换水1次, 每次20%。

1.1.3 数据采集 自放苗开始, 每20 d跟踪检测虾池及进水渠的水质指标(温度、盐度、pH、DO、氨氮、亚硝基氮)的变化情况, 采集水样、对虾样品进行细菌分离鉴定、病原检测, 并观察记录对虾发病症状。

1.2 样品采集及处理

1.2.1 水样采集 用无菌瓶于换水前,在每个采样池中取水样 100 ml,低温带回实验室,用于氨氮及亚硝基氮分析。

1.2.2 细菌分离 从养殖场水源和养殖池水体中分别取100 μ l的水样,灭菌海水10倍梯度稀释,无菌状态下涂布2216E和TCBS固体培养基;无菌取对虾肠道及肝胰腺混合研磨后,用生理盐水10倍梯度稀释,分别涂布2216E和TCBS的固体培养基,于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养24 h。

1.2.3 病原检测样品采集 每个池塘每次取对虾30尾,鳃丝、步足、肌肉及肝胰腺样品合并为1个独立样品,放入95%的乙醇中保存带回实验室,用TIANGEN试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit)提取样品全基因组DNA, -80 $^{\circ}$ C保存备用;用RNAiso Plus (TaKaRa)提取样品总RNA, -80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 可培养细菌分析及弧菌的占有率

1.3.1 可培养细菌的分离鉴定 取接种培养后的2216E平板,根据细菌的形态、大小、颜色等进行分离纯化。用细菌16S rDNA序列扩增方法对所分离的细菌进行初步鉴定(Bikrol, *et al*, 2010),扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司分析,所得序列在NCBI数据库中进行同源性比对。

1.3.2 水体中可培养细菌数及总弧菌数评估 根据某水样在一定稀释度下涂布2216E平板形成的菌落数,推算该原始水样每毫升中的总细菌数为单位水体中可培养细菌数;根据某水样在一定稀释度下涂布TCBS平板形成的菌落数,推算该原始水样总弧菌数量,单位为CFU/ml。

1.3.3 某种弧菌占有率 根据TCBS平板所分离弧菌的菌落数、鉴定结果及样品稀释度,分别统计大棚养殖池和室外养殖池中各种弧菌(*Vibrio sp.*)的数量。弧菌占有率=单位水体中某种弧菌数量/单位水体中可培养细菌数 \times 100%。

1.4 对虾多病原检测

EHP及AHPND的检测方法分别参照Jaroenlak等(2016)和Dangtip等(2015)的方法;WSSV、IHHNV及IMNV的检测采用国际兽疫局(Office International des Epizooties, OIE 2016)推荐的检测方法,

CMNV检测参照Zhang等(2014)的方法。其中,WSSV、IMNV及CMNV均为套式PCR,IHHNV采用常规PCR 2对物检测。

1.5 水质指标检测

使用YSI556便携式水质测定仪(Xylem, 美国),每个取样日的09:00测量养殖池水体温度、盐度、溶解氧和pH。水体中氨氮和亚硝基氮的浓度测定分别采用靛酚蓝分光光度法(GB17378.4-2007)和萘乙二胺分光光度法(GB17378.4-2007)。

1.6 数据分析

实验结果用平均值 \pm 标准差($X\pm SD$, $n=3$)表示,运用SPSS 18.0软件,经单因素方差分析(One-way ANOVA),采用Duncan's多重检验分析实验结果的差异显著性,设置差异水平 $\alpha=0.05$ ($P<0.05$ 为差异显著)。

2 结果

2.1 对虾生长及病害发生情况

观察各采样池塘中的对虾发病情况,记录发病时间,各虾池病症初次发生时间见表2。该养殖场大棚虾池在发病前10 d已表现出摄食减少、生长缓慢的症状,之后陆续出现对虾不摄食、空肠空胃、肠道细、趴边,末期对虾腹部和尾节变白,1周后出现死亡,且死亡率升高,最后出池;G2对虾症状与死亡情况与G1完全相似,相应的症状出现的

表2 各池对虾发病情况
Tab.2 Occurrence of shrimp disease in different ponds

池号 Ponds No.	发病起始时间 Onset date of disease (month-day)			
	07-26	07-30	08-05	09-25
G1	□/※			
G2	-	□/※		
G3	-		□/※	
W1	-	-	-	+
W2	-	-	-	-
W3	-	-	-	-
W4	-	-	-	-

注: □/※: 对虾发病出现死亡,检测确认感染弧菌及肠胞虫; -: 对虾正常; +?: 对虾发病但没有检测

Note: □/※: Shrimp infected by AHPND and EHP in the same time and appeared death; -: Shrimp is normal; +?: Dead shrimp appeared but without detection

时间仅较G1池晚4 d左右; G3的对虾发病较为迅速, 症状表现为对虾不摄食, 空肠空胃, 发病1周后, 对虾死亡率近50%, 消毒排塘。根据对虾的发病特点及检测结果, 初步判定大棚养殖池中的对虾发病为弧菌与虾肝肠胞虫混合感染所致, 且与水体中氨氮、亚硝氮浓度过高有关; 室外养殖池整个养殖周期发病较轻, 个别池塘在养殖后期出现一定的发病症状, 表现为对虾趴边, 空肠空胃, 但数量较少, 跟踪的4个室外养殖池中, 仅W1在9月25日出现病症, 死亡率极低, 因为已到收获季节, 采取了

收虾处理。

2.2 整个检测期养殖水体及对虾体内可培养细菌组成

整个检测期间, 共分离单菌落 305 个, 对所分离的细菌进行初步鉴定, 共成功鉴定细菌 258 株, 其中, 养殖水体中 164 株, 对虾体内 94 株。比对结果显示, 养殖水体中 164 株菌中含有菌株 49 种, 对虾体内有菌株 31 种, 对虾体内和水质主要细菌组成见表 3。由表 3 可知, 养殖水体中菌群种类比对虾体内的种类多。

表 3 对虾体内和养殖水体中的菌群组成
Tab.3 Component of predominant bacterial communities isolated from shrimp and water

细菌分类(属) Genus of bacteria	对虾体内的菌种 Bacteria isolated from shrimp	首次分离时间 First time of bacteria isolation (month-day)	水体中的菌种 Bacteria isolated from culture water	首次分离时间 First time of bacteria isolation (month-day)
假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	06-14	河豚毒素假交替单胞菌 <i>P.tetraodonis</i>	05-05
			杀鱼假交替单胞菌 <i>P.piscicida</i>	05-05
			食鹿角菜假交替单胞菌 <i>P.carrageenovora</i>	05-05
			酚性假交替单胞菌 <i>P.phenolica</i>	05-05
			假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	05-05
交替单胞菌属 <i>Alteromonas</i>	麦氏交替单胞菌 <i>A. macleodii</i>	06-14	麦氏交替单胞菌 <i>A.macleodii</i>	07-24
			塔格交替单胞菌 <i>A. tagae</i>	05-25
			交替单胞菌 <i>Alteromonas</i> sp.	05-25
嗜冷菌属 <i>Algoriphagus</i>			嗜冷菌 <i>Algoriphagus</i> sp.	05-25
海单胞菌属 <i>Marinomonas</i>			普通海单胞菌 <i>M.communis</i>	05-05
希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	鲍希瓦氏菌 <i>S. haliotis</i>	08-13		
	亚马孙河希瓦氏菌 <i>S.amazonensis</i>	07-24	亚马孙河希瓦氏菌 <i>S.amazonensis</i>	07-24
	希瓦氏菌 <i>Shewanella</i> sp.	07-04	希瓦氏菌 <i>Shewanella</i> sp.	06-14
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i>	08-13	松鼠葡萄球菌亚种 <i>S. sciuri</i> subsp.	07-24
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	07-04	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	07-04
	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	06-14	弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i>	08-13
	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	07-04	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	05-05
微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	06-14	深海微小杆菌 <i>E. profundum</i>	08-13
	微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i> sp.	06-14	乙酰微小杆菌 <i>E. acetylicum</i>	07-04

续表 3

细菌分类(属) Genus of bacteria	对虾体内的菌种 Bacteria isolated from shrimp	首次分离时间 First time of bacteria isolation (month-day)	水体中的菌种 Bacteria isolated from culture water	首次分离时间 First time of bacteria isolation (month-day)
			印度微小杆菌 <i>E. indicum</i>	06-14
			金橙黄微小杆菌 <i>E. aurantiacum</i>	05-25
			微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i> sp.	06-14
鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	鲁杰氏菌 <i>Ruegeria</i> sp.	07-04	鲁杰氏菌 <i>Ruegeria</i> sp.	07-04
	中间鲁杰氏菌 <i>R. intermedia</i>	07-24		
科贝特菌属 <i>Cobetia</i>	海科贝特菌 <i>C. marina</i>	08-13	海科贝特菌 <i>C. marina</i>	08-13
柠檬胞菌属 <i>Citricella</i>	柠檬胞菌 <i>Citricella</i> sp.	07-04	柠檬胞菌 <i>Citricella</i> sp.	07-04
盐弧菌属 <i>Salinivibrio</i>			盐弧菌 <i>Salinivibrio</i> sp.	05-05
潮间带杆菌属 <i>Aestuariibacter</i>			潮间带杆菌 <i>Aestuariibacter</i> sp.	05-05
海洋细菌属 <i>Marinobacterium</i>			海洋细菌 <i>Marinobacterium</i> sp.	05-25
			斯塔尼尔海洋菌 <i>M. stanieri</i>	07-04
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>			假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	05-25
冷单胞菌属 <i>Psychromonas</i>	海特斯冷单胞菌 <i>P. heitensis</i>	06-14	海特斯冷单胞菌 <i>P. heitensis</i>	06-14
	速生冷单胞菌 <i>P. celer</i>	06-14	速生冷单胞菌 <i>P. celer</i>	06-14
动性球菌属 <i>Planococcus</i>	莱比托动性球菌 <i>P. rifietoensis</i>	06-14		
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>			葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i> sp.	07-24
副球菌属 <i>Paracoccus</i>	产玉米黄质副球菌 <i>P. zeaxanthinifaciens</i>	06-14		
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	美人鱼发光杆菌亚种 <i>P. damsela</i> subsp.	07-24	美人鱼发光杆菌亚种 <i>P. damsela</i> subsp.	07-24
弧菌属 <i>Vibrio</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	07-04	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	05-05
	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	07-24	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	05-05
	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	07-24	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	05-25
	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	06-14	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	05-05
	欧文氏弧菌 <i>V. owensii</i>	07-24	欧文氏弧菌 <i>V. owensii</i>	05-05
	远青弧菌 <i>V. azureus</i>	06-14	远青弧菌 <i>V. azureus</i>	06-14
	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	08-13	需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	07-04
	施罗尼氏弧菌 <i>V. shilonii</i>	07-04	施罗尼氏弧菌 <i>V. shilonii</i>	07-24
	坎贝氏弧菌 <i>V. campbellii</i>	06-14	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	05-05
	肝弧菌 <i>V. hepatarius</i>	06-14	普通弧菌 <i>V. communis</i>	05-05
			灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	05-05
			锡那罗州弧菌 <i>V. sinaloensis</i>	07-24
			盐湖弧菌 <i>V. salilacus</i>	05-05
			鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	05-05
			稻弧菌 <i>V. porteresiae</i>	08-13

2.3 不同养殖期大棚养殖池与室外养殖池中总弧菌密度

分别统计不同采样时间所有跟踪的大棚及室外养殖池中弧菌平均数量(图 1)。由图 1 可知, 经过漂白粉处理后, 再经过脱氯曝气的水, 进入养殖池后其内的弧菌数量在 10 CFU/ml 左右, 随着养殖时间的增长, 无论室外养殖池还是大棚养殖池, 水体中的弧菌数量都持续增多。且在各个采样时间内大棚养殖池中的弧菌数量均高于室外养殖池, 至最后一次采样(8 月 13 日), 大棚养殖池中弧菌的平均密度达到了 $(3.7 \pm 0.9) \times 10^4$ CFU/ml; 而室外养殖池仅为 $(6.3 \pm 4.0) \times 10^2$ CFU/ml。

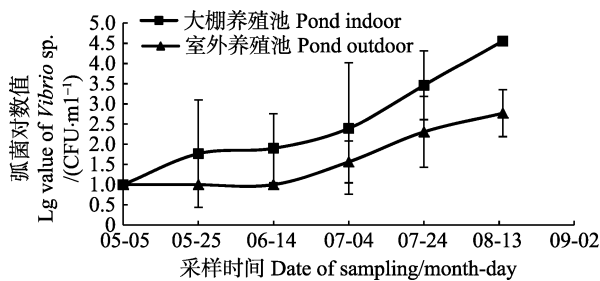


图 1 大棚养殖池及室外养殖池中弧菌数量的变化趋势
Fig.1 Changes of *Vibrio* density in the ponds indoor and outdoor

2.4 室外养殖池与大棚养殖池中不同采样时间内水体中主要弧菌种类占有率

分别统计大棚和室外养殖池养殖水体不同采样时间各种弧菌的占有率(图2和图3)。由图2和图3可知, 无论大棚养殖池还是室外养殖池, 均存在副溶血弧菌、溶藻弧菌、欧文氏弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌。大棚养殖池中, 各种弧菌于6月14日前

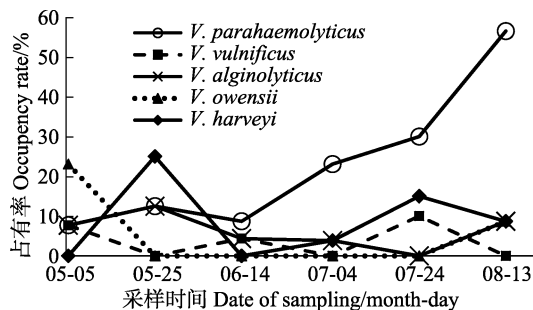


图 2 不同采样时间内大棚养殖水体中 5 种主要弧菌的占有率

Fig.2 Ratio of 5 *Vibrio* to total culturable bacteria in ponds indoor at different sampling time

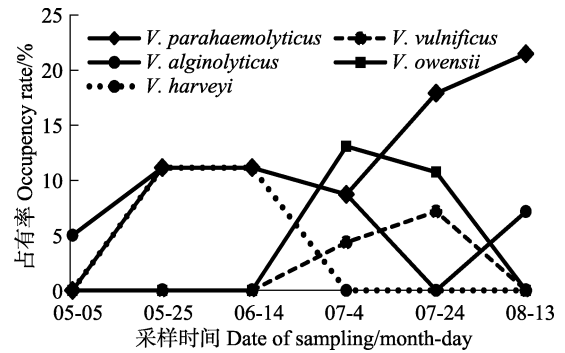


图 3 不同采样时间内外塘养殖水体中 5 种主要弧菌的占有率

Fig.3 Ratio of 5 *Vibrio* to total culturable bacteria in ponds outdoor at different sampling time

的占有率变化不大, 之后, 水体中的副溶血弧菌占有率持续升高, 至采样末期达到了 56.5%; 室外养殖池养殖水体中 7 月 4 日之前, 各种弧菌占有率均较低(13%以下), 随后, 副溶血弧菌的占有率快速上升, 至采样末期达 21.4%。

2.5 EHP 的检测结果

所跟踪的养殖池中, 对虾感染 EHP 的检测结果见表 4。由表 4 可知, 养殖场于 6 月 14 日首次检出 EHP, 出现在大棚养殖池 G1, 另外 2 个大棚养殖池分别于 7 月 4 日与 24 日检出 EHP。所有的 4 个外塘池仅在最后一次取样时, 有 3 个池中检出 EHP。代表性 EHP 检测结果见图 4。

表 4 EHP 检测结果
Tab.4 Detection results of EHP

池塘编号 Ponds No.	采样时间 Date of sampling (month-day)				
	05-25	06-14	07-04	07-24	08-13
G1	-	+++	+++	+++	+++
G2	-	-	+++	+++	+++
G3	/	/	-	++	++
W1	/	/	-	-	-
W2	/	/	+	-	+++
W3	/	/	-	-	+
W4	/	/	-	-	++

注: G1~G3: 大棚养殖池; W1~W4: 室外养殖池; +: 弱阳性; ++: 阳性; +++: 强阳性; -: 阴性; /: 未放苗。下同

Note: G1~G3: Ponds indoor; W1~W4: Ponds outdoor; +: Weak positive; ++: Positive; +++: Strong positive; -: Negative; /: Not stocking. The same as below

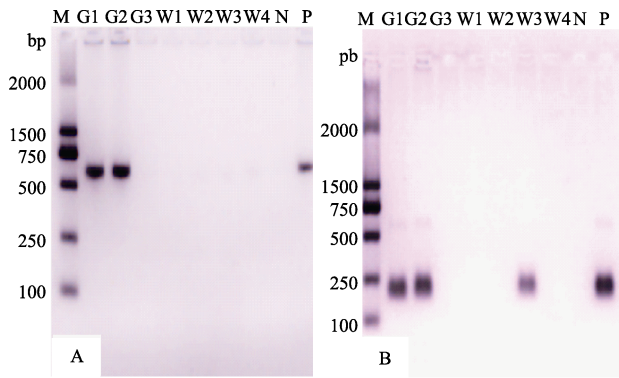


图4 7月4日各池样品 EHP PCR 扩增产物

Fig.4 PCR products for detection of EHP in the sample of date 4th July

A: 第1轮 PCR 产物; B: 第2轮 PCR 产物; M: DL2000 DNA 分子标准; G1~G3: 大棚养殖池; W1~W4: 室外养殖池; N: 阴性对照; P: 阳性对照。下同

A: PCR products of first round; B: PCR products of second round; M: DL2000 DNA marker; G1~G3: Ponds indoor; W1~W4: Ponds outdoor; N: Negative control; P: Positive control. The same as below

2.6 AHPND 检测结果

AHPND跟踪监测的结果见表5。由表5可知,在7月4日检测时,所有检测池中的对虾AHPND均为阴性,至7月24日,除了室外养殖池W4外,均检出AHPND;8月13日检测显示,所用跟踪的养殖池中的对虾均有AHPND检出。代表性AHPND检测结果见图5。

表5 AHPND 检测结果
Tab.5 Test results of AHPND

池塘编号 Ponds No.	采样时间 Date of sampling (month-day)				
	05-25	06-14	07-04	07-24	08-13
G1	-	-	-	+	+
G2	-	-	-	+	+
G3	/	/	-	+	+
W1	/	/	-	+	+
W2	/	/	-	+	+
W3	/	/	-	+	+
W4	/	/	-	-	+

2.7 WSSV、IHHNV、CMNV、IMNV 的检测结果

对各采样期对虾样品进行PCR扩增,检测WSSV、IHHNV、CMNV、IMNV 4种对虾病毒,均未有出现阳性条带,部分代表性PCR结果分别见

图6。说明该养殖场养殖凡纳滨对虾感染这4种病原的几率很低。

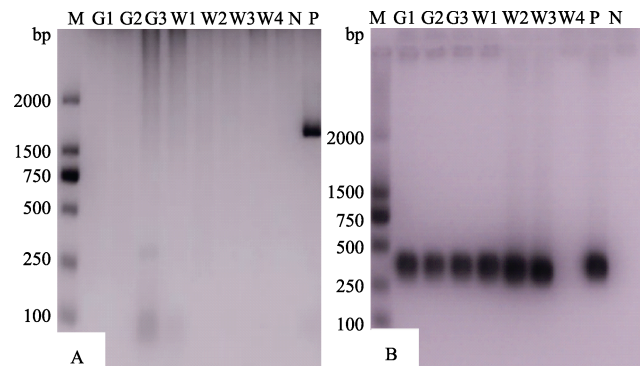


图5 7月24日各池样品 AHPND PCR 扩增产物

Fig.5 PCR products for detection of AHPND in the sample of date 24th July

2.8 养殖水体中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的浓度变化

检测各期大棚养殖池及室外养殖池水体中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 平均浓度,结果分别见图7、图8。在大棚养殖池中,无论 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 还是 $\text{NO}_2^-\text{-N}$,其变化的幅度较大,而室外养殖池中,变化相对平稳。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的最高值出现在7月上旬的大棚养殖池中,平均浓度达到 (3.5 ± 2.0) mg/L,而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度在养殖中后期的大棚养殖池中持续提高,至8月14日,平均浓度已达到 (8.2 ± 0.7) mg/ml。

3 讨论

近几年来,国内外养殖的凡纳滨对虾病害发生较为普遍,导致养殖产量降低,效益下滑,而对虾病原的多样化给对虾病害防控带来了较大的难度。特别是 EHP 的暴发流行,给产业带来的冲击较大。EHP 是一种细胞内寄生虫,首次发现于泰国 (Tourtip *et al*, 2009)。近年来,在中国养殖的日本囊对虾 (*Penaeus japonicus*)、凡纳滨对虾以及罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中也有检出 (刘珍等, 2016), 对虾感染 EHP 后可导致生长迟缓 (Rajendran, *et al*, 2016; Chayaburakul, *et al*, 2004)。Aranguren 等 (2017) 研究表明,对虾感染 EHP 后,易受敏感性细菌的侵染。本研究结果表明,所跟踪的养殖场,随着养殖过程的持续, EHP 病原存在扩散的可能,最初的 EHP 发现于大棚养殖池中,至养殖末期,除了 W1 外,其他所有跟踪的池塘中均

检出 EHP 感染。尽管该养殖场的养殖用水采用漂白粉消毒处理,但由于该养殖场进排水采用同一条

水渠,对养殖废水并没有进行消毒处理,为病原扩散提供了条件。

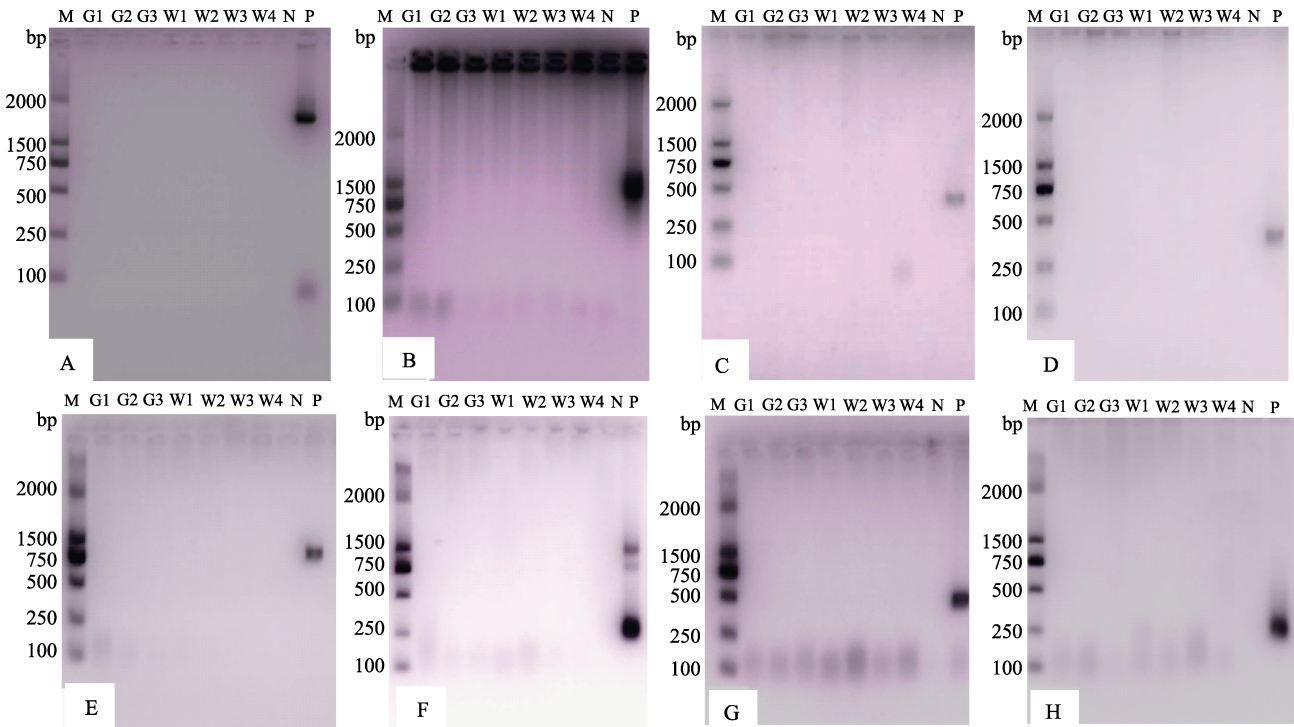


图 6 8月13日各池样品 WSSV、IHNV、CMNV 及 IMNV 4种对虾病毒 PCR 扩增产物
Fig.6 PCR products of WSSV、IHNV、CMNV and IMNV in the sample of date 13th August

A、B 分别为 WSSV 第 1 轮及第 2 轮 PCR 产物; C、D 分别为引物 389F/389R 及 309F/309R 检测 IHNV PCR 产物;
E、F 分别为 CMNV 第 1 轮及第 2 轮 PCR 产物, G、H 分别为 IMNV 第 1 轮及第 2 轮 PCR 产物
A: First round PCR products for WSSV; B: Second round PCR products for WSSV; C: PCR products for IHNV by primer 389F/389R; D: PCR products for IHNV by primer 309F/309R; E: First round PCR products for CMNV; F: Second round PCR products for CMNV; G: First round PCR products for IMNV, H: Second round PCR products for IMNV

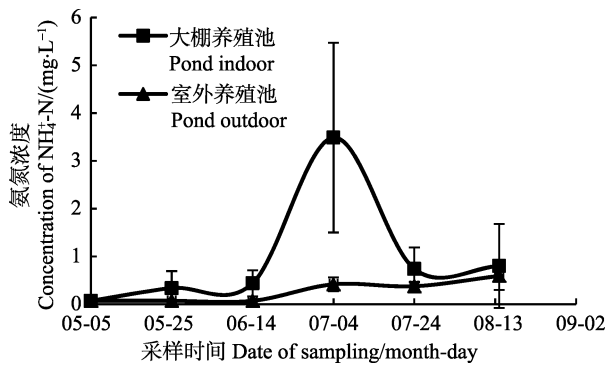


图 7 对虾养殖水体中 NH₄⁺-N 浓度的变化趋势
Fig.7 Variation of the concentration of NH₄⁺-N in the shrimp ponds

早期的研究发现,对虾 AHPND 的发生与感染含有 PirA 及 PirB 质粒的副溶血弧菌有关(Lee, *et al*, 2015; Tran, *et al*, 2013; 孙明玉等, 2018),最近研究表明,对虾感染坎氏弧菌(Han *et al*, 2017)、哈维氏

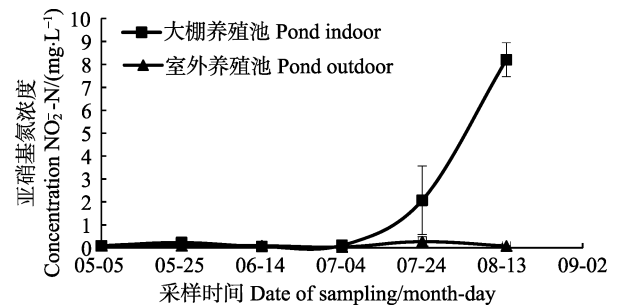


图 8 对虾养殖水体中 NO₂-N 浓度的变化趋势
Fig.8 Variation of the concentration of NO₂-N in the shrimp ponds

弧菌(Kondo *et al*, 2015)后也表现出AHPND症状。本研究跟踪检测AHPND的结果显示,在养殖前期(7月4日前)养殖场中并未检测出该病菌,但在7月24日后,几乎在所有跟踪的养殖池中检测到了AHPND的弱阳性信号,且持续到末期感染均为弱

阳性,结合养殖对虾发病特点及其他弧菌的检测结果认为,该养殖场中对虾存在诱发AHPND的副溶血弧菌,特别是在大棚养殖池中,但副溶血弧菌并不是唯一导致对虾发病的因素,因在养殖水体中及对虾体内也检测出其他的致病弧菌,如溶藻弧菌、欧文氏弧菌、创伤弧菌和哈维氏弧菌,对该类弧菌的致病力评估尚待研究。

在跟踪的7个养殖池中,出现明显病害的3个池塘均为大棚养殖池,尽管所放的对虾种苗来源及养殖用水与室外养殖池相似,因大棚养殖池投苗密度是室外养殖池的5倍,相应的饵料投喂量也远高于室外养殖池,由此可导致水体中氨氮及亚硝基氮的浓度在养殖中后期出现超标现象(图4、图5),达到了危害对虾的范围(魏俊利等,2012)。表明,大棚养殖池中水质管理存在欠缺,导致养殖废物排放不彻底,水质变差。已有研究表明,较高的氨氮浓度能降低凡纳滨对虾的抵抗力(黄翔鹤等,2006),增加对副溶血弧菌的易感性(葛红星等,2014)。

综合分析本研究所检测的各种对虾病原及养殖环境条件认为,该凡纳滨对虾养殖场存在多种对虾病原,其中,多种弧菌与EHP共感染是导致大棚养殖对虾发病的原因之一。结合大棚养殖池与室外养殖池的发病特点,可以推断,大棚养殖池中因放养密度高,水质管理不善,氨氮及亚硝基氮浓度过高,是导致大棚养殖池对虾发病的主要因素。本研究跟踪调查的WSSV、IHHNV、IMNV、CMNV 4种对虾病毒,是近年来在凡纳滨对虾养殖中危害较为严重的病原,但是,在本场并没有阳性样品检出,表明这些病毒性病原不是该对虾养殖场的致病因子。提示在未来的对虾养殖中,对EHP、细菌病的防控及水环境管理也应引起高度的重视。

参 考 文 献

- Aranguren LF, Han JE, Tang KFJ, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2017, 471: 37–42
- Bikrol A, Saxena N, Singh K. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from different varieties of soybean with 16SrDNA RFLP from agricultural land of Madhya Pradesh, India. *Indian Journal of Microbiology*, 2010, 50(4): 404–411
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89–96
- Chen LZ, Yu XY, Hu YC, *et al.* Preliminary investigation of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) from *Litopenaeus vannamei* in west Guangdong Province. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(4): 273–280 [陈禄芝, 余霞艳, 胡一丞, 等. 粤西地区凡纳滨对虾肝肠胞虫、传染性皮下和造血组织坏死病毒感染情况的初步调查. *渔业研究*, 2016, 38(4): 273–280]
- Dangtip S, Sirikharin R, Sanguanrut P, *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 158–162
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* The Immune Response of *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* under stress caused by ammonia nitrogen at different concentrations. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 76–82 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 76–82]
- Han JE, Tang KF, Aranguren LF, *et al.* Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, *pirAB_{vp}(-)* *V. parahaemolyticus*, and *pirAB_{vp}(+)* *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 2017, 470: 84–90
- Han JE, Tang KFJ, Pantoja CR, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2015, 442: 12–15
- Han L, Wang XH, Yang B, *et al.* Analysis of pathogen in an outbreak death of *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 431–441 [韩琳, 王秀华, 杨冰, 等. 一例日本囊对虾暴发性死亡的病原分析. *水产学报*, 2018, 42(3): 431–441]
- Hernández-Palomares MLE, Godoy-Lugo JA, Gómez-Jiménez S, *et al.* Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 401–409
- Huang XH, Li CL, Deng L, *et al.* The toxicity of NO₂-N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 466–471 [黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响. *水生生物学报*. 2006, 30(4): 466–471]
- Jaroenlak P, Sanguanrut P, Williams BA, *et al.* A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0166320
- Kondo H, Van PT, Dang LT, *et al.* Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic

- necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcement*, 2015, 3(5): e00978-15
- Kurcheti PP, Shyam KU, Banu H, *et al.* Infectious myonecrosis virus (IMNV)—An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. *Aquaculture*. 2017, 477: 99–105
- Lee CT, Chen IT, Yang YT, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- Li QX, Fei RM. The prokaryotic expression for ORF3 gene of infections hypodermal and hematopoietic necrosis virus NJ strain and its bioinformatics analysis. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 439–446 [李秋璇, 费荣梅. 传染性皮下及造血组织坏死病毒NJ株ORF3基因的原核表达及生物信息学分析. *水产学报*, 2015, 39(3): 439–446]
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量PCR检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Nunan L, Lightner D, Pantoja C, *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 81–86
- Prasertsri S, Limsuwan C, Chuchird N. The effects of microsporidian (*Thelohania*) infection on the growth and histopathological changes in pondreared Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart Journal-Natural Science*, 2009, 43: 680–668
- Qiu L, Chen MM, Wan XY, *et al.* Characterization of a new member of *Iridoviridae*, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11834
- Rajendran KV, Shivam S, Praveena EP, *et al.* Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 2016, 454: 272–280
- Shi H, Xu WJ, Xie JJ, *et al.* Pathogenicity of *Penaeus vannamei* slow growth syndrome in intensively cultured penaeid shrimp in Zhoushan. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 387–394 [施慧, 许文军, 谢建军, 等. 舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 387–394]
- Sinnuengnong R, Attasart P, Smith DR, *et al.* Administration of co-expressed *Penaeus stylirostris* densovirus-like particles and dsRNA-YHV-Pro provide protection against yellow head virus in shrimp. *Journal of Biotechnology*, 2018, 267: 63–70
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689–1699
- Sun MY, Feng B, Zhang ZH, *et al.* New sequence type isolates of AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus* from *Litopenaeus vannamei* by multilocus sequence typing. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3) 410–418 [孙明玉, 冯博, 张昭寰, 等. 引起凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病的副溶血弧菌MLST新序列型. *水产学报*, 2018, 42(3): 410–418]
- Tourtirp S, Wongtripop S, Stentiford GD, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29
- Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45–55
- Wang BY, Wang L, Liu MR, *et al.* Epidemiological investigation of three major viruses and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in Liaoning Province. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2017, 32(2): 150–154 [王博雅, 王力, 刘美如, 等. 凡纳滨对虾3种主要病毒和虾肝肠胞虫在辽宁地区的流行情况分析. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(2): 150–154]
- Wang CD, Song XL, Zhang XJ, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 146–155 [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌PC465对凡纳滨对虾抗病力的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 146–155]
- Wang XS, Hu ZB, Fei RM. Prevalence of three viruses in Pacific white leg shrimp in Jiangsu Province and the analysis of coding sequence of five strains of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(10): 1623–1630 [王筱珊, 胡智博, 费荣梅. 江苏地区对虾3种病毒病的流行病学调查及5株IHNV的编码区基因序列分析. *水产学报*, 2017, 41(10): 1623–1630]
- Warneke S, Schipper LA, Bruesewitz DA, *et al.* Rates, controls and potential adverse effects of nitrate removal in a denitrification bed. *Ecological Engineering*, 2011, 37(3): 511–522
- Wei JL, Sun JS, Li X, *et al.* Acute toxic effects of ammonia nitrogen on *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Tianjin*

- Agricultural University, 2012, 19(3): 58–61 [魏俊利, 孙金生, 李翔, 等. 氨氮对凡纳滨对虾稚虾的急性毒性作用. 天津农学院学报, 2012, 19(3): 58–61]
- World Organization for Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2016. Paris, French: World Organization for Animal Health, 2010, 110–186
- Yan DC, Huang J, Yang B, *et al.* Competition of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) with white spot syndrome virus (WSSV) for binding to shrimp cellular membrane. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(10): 1225–1229
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 2014, 95(12): 2700–2709
- Zhang QL, Xu TT, Wan XY, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Research*, 2017, 233: 113–119
- Zhu LL, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Molecular epidemiology of a new yellow head virus strain in China. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 68–77 [朱罗罗, 张庆利, 万晓媛, 等. 我国一株新型黄头病毒的分子流行病学. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 68–77]

(编辑 马瑾艳)

Tracking of Shrimp Multiple Pathogens in a Shrimp Farm

WU Heying^{1,2}, WANG Xiuhua^{2,3①}, YANG Bing^{2,3}, YU Danghui², HUANG Jie^{2,3}

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

Abstract In order to clarify the shrimp disease occurred currently in the shrimp farms, shrimp pathogens including vibrio, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and four viral pathogens(WSSV、IMNV、CMNV and IHHNV) were detected using molecular biological detect methods under a regular sampling pattern, meanwhile the concentration of ammonia nitrogen and nitrogenous nitrogen in water body were also detected. The results showed that the main pathogens in the shrimp farm comprised various pathogenic vibrio and EHP. However the shrimp virus WSSV、IMNV、CMNV and IHHNV were not detected. The vibrio species isolated and identified reached 16 totally, and the main species were *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. owensii*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*. Furthermore the *V. parahaemolyticus* that could cause acute hepatopancreatic necrosis disease (V_{AHPND}) was found out. The concentration of ammonia nitrogen and nitrate nitrogen in the indoor pond reaching (3.5 ± 2.0) mg/L and (8.2 ± 0.7) mg/L, were significantly higher than that in the outdoor pond respectively ($P < 0.05$) in the medium-term (July 24) of crop cycle. The intensity of infection of V_{AHPND} and EHP show a growing trend in the culture period. In the seven ponds monitored, the ponds indoor had a higher incidence rate (100%), while the ponds outdoor had a lower incidence rate (25%). The results indicated that shrimp disease onset in the pond indoor might be caused by the infection of various vibrio and EHP, also the higher stocking density, higher concentration of the ammonia nitrogen and nitrate nitrogen in the water body played a synergy role in outbreak of shrimp disease. The results of this study could provide theoretical support and scientific data for the prevention and control of shrimp diseases.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Pathogen; *Vibrio*; *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP); Viral pathogens; Pathogen tracking

① Corresponding author: WANG Xiuhua, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180523002

http://www.yykxjz.cn/

梁洲瑞, 刘福利, 杜欣欣, 袁艳敏, 梁启迪, 汪文俊, 孙修涛, 王飞久. 光强对极北海带幼苗生长和生化特性的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 115-122

Liang ZR, Liu FL, Du XX, Yuan YM, Liang QD, Wang WJ, Sun XT, Wang FJ. Effects of light intensities on the growth and biochemical characteristics of *Laminaria hyperborea* young seedling. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 115-122

光强对极北海带幼苗生长和生化特性的影响*

梁洲瑞^{1,2} 刘福利^{1,2①} 杜欣欣³ 袁艳敏⁴ 梁启迪¹
汪文俊^{1,2} 孙修涛^{1,2} 王飞久^{1,2}

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 青岛 266109; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 通过探讨极北海带(*Laminaria hyperborea*)幼苗在不同光强下的相对生长速率(RGR)及生化指标的变化规律,以期获得适宜极北海带幼苗生长的光照范围,并揭示其对光照胁迫的生化响应机制。结果显示,在40~80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强下,极北海带幼苗的RGR较高,表明此光强范围对其生长较有利,而RGR与丙二醛(MDA)含量呈显著负相关关系,表明细胞膜脂的过氧化作用可能是导致极北海带幼苗RGR降低的原因之一。极北海带幼苗中超氧阴离子(SA)含量与MDA含量呈极显著正相关关系,而超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)的比活力与SA含量及MDA含量均呈负相关关系(其中,CAT比活力与SA含量的相关性达到显著水平),且过氧化物酶(POD)与SOD的比活力呈极显著正相关关系,表明SOD、CAT及POD对于极北海带幼苗中活性氧的清除均发挥着重要的作用,且SOD与POD有明显的协同作用。高光和弱光逆境均不利于极北海带幼苗中可溶性蛋白的积累,且均造成藻体中MDA的积累,表明在光照胁迫下幼苗的总代谢水平降低,而活性氧水平升高。在高光下,幼苗可通过增加类胡萝卜素含量及显著提高SOD及POD的比活力来降低藻体内活性氧水平,从而减轻光氧化伤害。在弱光下,幼苗可通过增加体内叶绿素a的含量以高效地捕获有限光能,但藻体的抗氧化酶比活力显著下降,从而造成其活性氧代谢发生了严重失衡,进而导致其细胞膜脂过氧化程度的加重。上述结果可为极北海带的人工育苗及海上养殖提供参考。

关键词 极北海带; 光强; 生长; 生化组分; 抗氧化系统

中图分类号 Q945.79 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0115-08

极北海带(*Laminaria hyperborea*)是一种具有重要经济和生态价值的大型经济海藻,广泛分布于大西

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016PT03; 2016HY-JC0302)、青岛市民生科技计划项目(17-3-3-65-nsh)、农业农村部农业国际合作交流项目——“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作项目和现代农业产业技术体系(CARS-50)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016PT03; 2016HY-JC0302), Qingdao Science and Technology Project of People's Livelihood (17-3-3-65-nsh), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries along the Belt and Road, and China Agriculture Research System (CARS-50)]. 梁洲瑞, E-mail: liangzr@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 刘福利, 副研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-23, 收修改稿日期: 2018-06-26

洋东北海域,包括葡萄牙至巴伦支海的沿岸以及英国、法罗群岛和冰岛的沿岸(Kain, 1967、1971; Schoschina, 1997)。极北海带柄和叶片的褐藻胶含量分别为 25%~30%和 17%~33%,属于褐藻胶含量较高的种类(Qin, 2008)。与其他褐藻相比,极北海带有较低的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值(M/G),从而表现出较高的凝胶强度(Phillips *et al.*, 2009; Qin, 2008; 曲艳艳等, 2016)。因此,极北海带在法国、挪威和英国等国家常被用作提取褐藻胶的原料(Bixler *et al.*, 2011)。另外,因矿物元素和维生素等营养成分丰富,极北海带也用作动物饲料添加剂及海藻肥(范晓, 1991; Schiener *et al.*, 2015)。极北海带的生态价值体现在其藻体较大(叶+柄的长度可达 2~5 m)(Jupp *et al.*, 1974; Kain, 1962、1971),多年生(平均寿命一般为 8~15 年)(Kelly, 2005; Sjøtun *et al.*, 1993),是形成“海藻森林”的优势种,为海洋生物提供索饵场、产卵场或栖息地,对维护海洋生物多样性发挥重要作用(Smale *et al.*, 2013)。另外,极北海带藻场具有重要的碳汇功能,是地球上具有较高生产力的植被系统之一(Pedersen *et al.*, 2012)。综上可知,极北海带在海洋藻场建设及人工养殖方面具有重要的开发前景。

极北海带在幼苗期对光照的适应能力是决定其存活的关键因素之一(Kain *et al.*, 1965),也是其应用于藻场建设及人工养殖中需考虑的首要问题之一。大型海藻对光照的适应性一般可从生长、生理、生化等方面的指标进行综合评价。对于极北海带的游孢子、配子体、幼苗、成藻等不同生长发育阶段的光合生理方面,已有学者做了一些初步探索(Drew *et al.*, 1976; Kain *et al.*, 1965; Kremer, 1984; Lüning, 1971; Willenbrink *et al.*, 1975),他们主要测定了极北海带的光合速率、光饱和点、光补偿点、固碳强度等参数。许多研究表明,大型海藻的藻体生化组分(如色素、可溶性蛋白、丙二醛、抗氧化酶等)的含量或活性,会发生明显的变化以适应不同的光环境条件(姜宏波等, 2009; 卢晓等, 2013; 芦薇薇等, 2016),光照是造成海藻体内生化组分呈季节性变化的主要因素之一(Lapointe *et al.*, 1984),而极北海带对不同光照强度的生化响应还没有相关的文献报道。本研究以基于配子体克隆系培育的极北海带幼苗为研究对象,探讨其生长及相关生化指标对不同光强的反应规律,以期探明适宜其生长的光照范围,并揭示其对光照胁迫的生化响应机制,进而为极北海带苗种规模化生产、人工增殖及海藻场构建提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究所用极北海带幼苗是通过配子体克隆育苗技术获得,极北海带配子体采集于法国布列塔尼半岛海区。由配子体培育成幼苗过程中的培养条件:温度为 11℃~13℃,光合有效辐射(Photosynthetically active radiation, PAR)为 40~50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期为 12L:12D,用灭菌天然海水作为培养液,并添加营养盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$: 0.4 mg/L; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 4 mg/L)。用到的主要仪器:智能光照培养箱(宁波江南仪器厂),352 型酶标仪(Labsystems Multiskan MS 公司,芬兰),AC8 洗板机(Thermo Labsystems 公司,芬兰),电热恒温培养箱(武汉一恒苏净科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

以下各个处理组均添加相同浓度的氮/磷营养盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$: 0.4 mg/L; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 4 mg/L),每个测量实验均至少 3 个平行。

1.2.1 不同光强下极北海带幼苗的相对生长速率的测定 挑选 2~4 cm 的极北海带幼苗,置于 GXZ 智能型光照培养箱,进行相对生长速率的测定实验:在温度为 9℃条件下,分别在 PAR 为 20、40、60、80 和 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下持续培养 10 d。实验开始前,挑选藻体完整、无损伤腐烂的极北海带幼苗,各处理组平均鲜重为(1.04±0.05) g,鲜重差异性不显著($P>0.05$)。每隔 2 d 换水 1 次,10 d 后称量鲜重,计算相对生长速率(Relative growth rate, RGR),计算公式如下:

$$\text{RGR}=[\ln(W_t/W_0)/t]\times 100\%$$

式中, W_0 为初始藻的鲜重(g), W_t 为实验结束时藻的鲜重(g), t 为实验持续的时间(d)。

1.2.2 生化指标的测定 相对生长速率测定结束后,立刻用液氮把不同处理组的极北海带幼苗冷冻并储存在超低温冰箱中,待进行生化指标的测定。本研究测定的指标包括:叶绿素a和类胡萝卜素、可溶性蛋白质(Soluble protein)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和超氧阴离子(Superoxide anion, SA)。

参考文献进行叶绿素 a (王丽梅等, 2011)和类胡萝卜素含量(Chouhan *et al.*, 2011)的测定,其他指标的测定均采用酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。酶联免疫分析检测试

剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行各个指标的测定。SOD、POD 和 CAT 的比活力单位(U/mg prot)以酶活性单位(U)每毫克蛋白表示(李合生, 2000)。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 数据统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、Duncan 多重比较及 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, 用 Excel 软件绘制图形。

2 结果

2.1 不同光强下极北海带幼苗的相对生长速率

方差分析结果表明, 光强对极北海带幼苗的相对生长速率(RGR)有显著影响($P < 0.05$)。图 1 显示, 在 9°C 时, 40、60 和 80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的 RGR 均较大, 三者相比无显著差异($P > 0.05$)。20 和 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的 RGR 均较小, 它们与 60 和 80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组相比均呈显著性差异($P < 0.05$)。

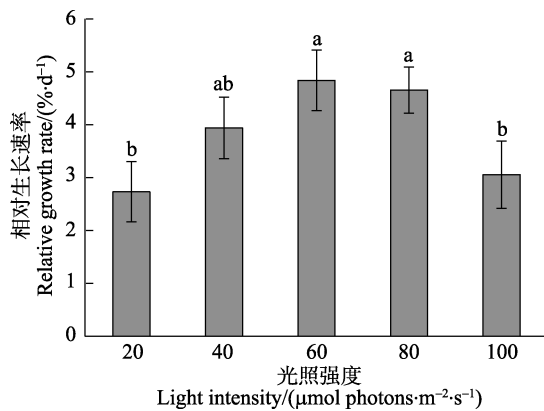


图 1 不同光强下处理 10 d 后极北海带幼苗的相对生长速率(温度为 9°C)

Fig.1 The relative growth rates (RGR) of young *L. hyperborea* seedlings cultivated for 10 d under different light intensities ($T=9^{\circ}\text{C}$)

不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同

Different letters indicate significant difference, $P < 0.05$, the same as below

2.2 不同光强下极北海带幼苗的色素(叶绿素 a 和类胡萝卜素)含量

方差分析结果表明, 光强对极北海带幼苗的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量均有显著影响($P < 0.05$)。图 2 显

示, 极北海带幼苗的叶绿素 a 含量随着光强的升高而逐渐降低。20 和 40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 处理组的幼苗叶绿素 a 含量均较高, 二者无显著差异($P > 0.05$)。光强 ≥ 60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的处理组与光强为 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组均差异显著($P < 0.05$)。光强 ≥ 40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的处理组之间无显著差异($P > 0.05$)。

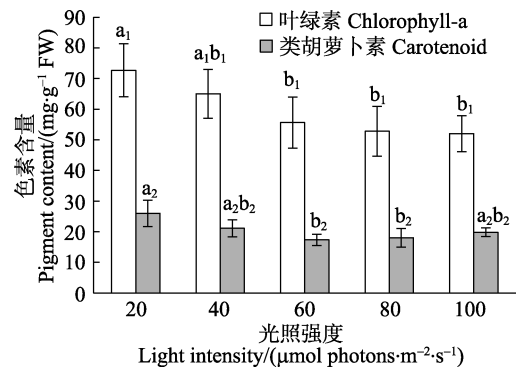


图 2 极北海带幼苗在不同光强下的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量

Fig.2 Chlorophyll-a and carotenoid content of young *L. hyperborea* seedlings under different light intensities

柱状图上的字母下标为相同数字的作为同一组进行多重比较, 同一组的不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异, 下同

The same subscript number at the letters represent the same group. The measured value in the same group are compared. The different letters in the same group represent significant differences, $P < 0.05$, the same as below

图 2 显示, 在 20~80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强范围内, 极北海带幼苗的类胡萝卜素含量随着光强的升高逐渐降低。当光强升高到 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 幼苗的类胡萝卜素含量有所增加。20、40 和 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的类胡萝卜素含量均较高, 三者无显著差异($P > 0.05$)。40~100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组之间无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 不同光强下极北海带幼苗的可溶性蛋白含量

图 3 显示, 在本研究光强范围内, 随着光强的升高, 极北海带幼苗的可溶性蛋白含量呈先升高后降低的趋势。40、60 和 80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的可溶性蛋白含量均较高, 三者相比无显著差异($P > 0.05$), 20、40、80 和 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的可溶性蛋白含量之间相比亦无显著差异($P > 0.05$)。Pearson 相关性分析表明, 可溶性蛋白含量与 RGR 呈极显著正相关关系(相关系数为 $r = 0.712$, $P < 0.01$)。

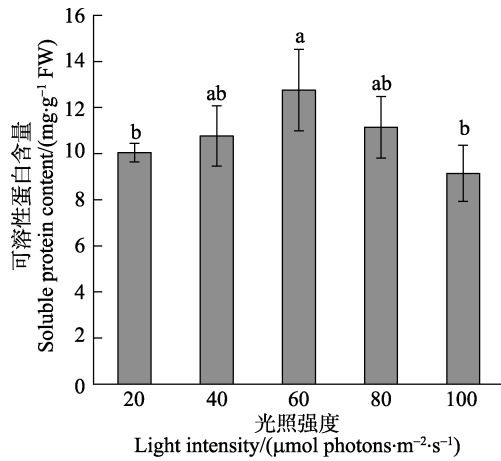


图3 极北海带幼苗在不同光强下的可溶性蛋白含量
Fig.3 Soluble protein content of young *L. hyperborea* seedlings under different light intensities

2.4 不同光强下极北海带幼苗的丙二醛(MDA)和超氧阴离子(SA)含量

方差分析表明,光强对极北海带幼苗的MDA含量有显著影响($P<0.05$)。图4显示,20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的MDA含量最大,80和100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组次之,40和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的MDA含量均较低。20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的MDA含量与其他光强组的相比差异显著($P<0.05$)。Pearson相关性分析表明,MDA含量与RGR呈显著负相关关系(相关系数为 $r=-0.58$, $P<0.05$)。

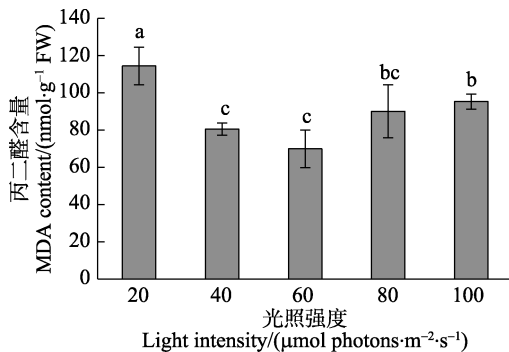


图4 极北海带幼苗在不同光强下的丙二醛(MDA)含量
Fig.4 MDA content of young *L. hyperborea* seedlings under different light intensities

方差分析结果表明,光强对极北海带幼苗的SA含量有显著影响($P<0.05$)。图5显示,20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的SA含量最大,与其他光强组相比均显著差异($P<0.05$)。40~100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强范围内各组的SA含量之间相比无显著差异($P>0.05$)。Pearson相关性分析表明,SA含量与MDA含量呈极

显著正相关关系(相关系数为 $r=0.829$, $P<0.01$)。

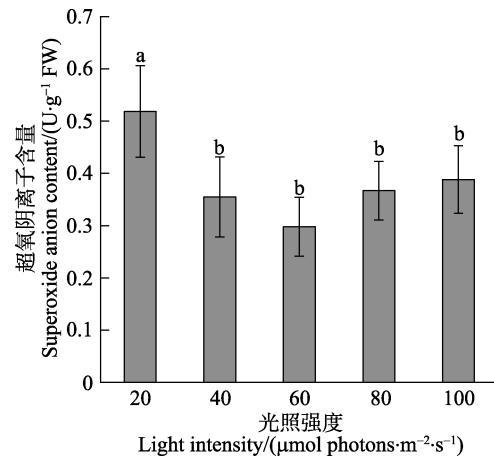


图5 极北海带幼苗在不同光强下的超氧阴离子含量
Fig.5 Superoxide anion content of young *L. hyperborea* seedlings under different light intensities

2.5 不同光强下极北海带幼苗的抗氧化酶(SOD、POD和CAT)比活力

方差分析表明,光强对极北海带幼苗的SOD、POD和CAT的比活力均有显著影响($P<0.05$)。图6显示,100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的SOD和POD

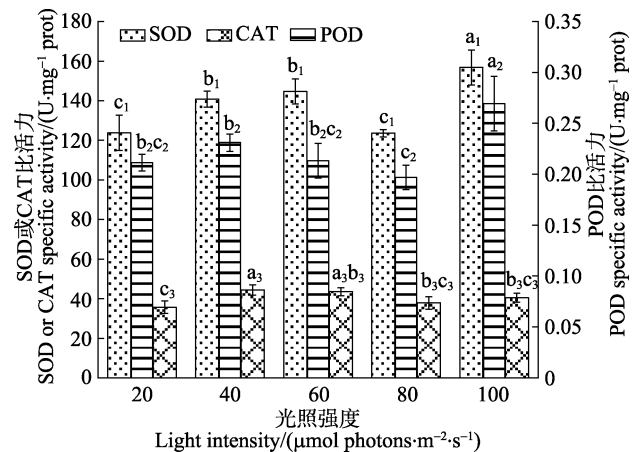


图6 极北海带幼苗在不同光强下的SOD、POD和CAT比活力

Fig.6 SOD、POD and CAT specific activity of young *L. hyperborea* seedlings under different light intensities

比活力均较大,与其他光强组相比均差异显著($P<0.05$)。20和80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的SOD比活力均较低,与其他光强组相比均差异显著($P<0.05$)。40和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的SOD比活力无显著差异($P>0.05$)。80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强组的POD比活力最低,与40和100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$

光强组相比均差异显著($P < 0.05$), 而与20和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组相比均无显著差异($P > 0.05$)。20、40和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的POD比活力之间无显著差异($P > 0.05$)。40和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的CAT比活力均较大, 二者无显著差异($P > 0.05$)。20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组的CAT比活力最小, 与40和60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组相比均差异显著($P < 0.05$), 而与80和100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强组相比均无显著差异($P > 0.05$)。

Pearson 相关性分析表明, SOD 比活力与 MDA 含量及 SA 含量均呈负相关关系(相关系数分别为 $r = -0.337$, $r = -0.331$), 而相关性均未达到显著水平($P > 0.05$)。POD 与 SOD 比活力呈极显著正相关关系(相关系数为 $r = 0.706$, $P < 0.01$)。CAT 比活力与 MDA 含量及 SA 含量均呈负相关关系(相关系数分别为 $r = -0.466$, $r = -0.546$), 其中, CAT 比活力与 SA 含量的相关性达到显著水平($P < 0.05$)。

3 讨论

生长于水深 5 m 及以下的极北海带个体一般小于生长于水深 2~3 m 的个体, 如在水深 2 m 和 12 m 处, 年龄约为 2 年的极北海带的平均柄长度分别为 34 cm 和 9 cm (Jupp *et al.*, 1974; Kain *et al.*, 1963; Kain, 1971; Larkum, 1972)。极北海带垂直分布上限是略高于最低天文潮位处, 而垂直分布下限因地而异, 如在英格兰西南部透明度很高的海域, 极北海带分布下限可达 36 m, 而在海水浑浊的环境中仅为 1~2.5 m (Kain, 1971)。由此可知, 光照是影响极北海带个体大小和垂直分布的重要因素之一。因此, 若要把极北海带应用于藻场建设及人工养殖, 了解其适宜的光照范围尤为重要。

植物体内可溶性蛋白质大多数是参与各种代谢的酶类, 其含量可反映植物体内总代谢水平(詹冬梅等, 2013)。本研究中, 在 40~80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强范围内, RGR 及可溶性蛋白含量均较高, 表明该光强范围对极北海带幼苗的生长有利。从 RGR 及可溶性蛋白含量的相关性可推测, 极北海带幼苗代谢水平与其生长速率密切相关。活性氧(Reactive oxygen species, ROS), 如 SA 自由基(O_2^-)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)与单线态氧($^1\text{O}_2$)等, 是植物有氧代谢的副产物。大量活性氧可导致蛋白质、膜脂和其他细胞组分的严重损伤。MDA 是活性氧攻击膜脂而形成的最终降解产物, 其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度(杜秀敏等, 2001)。本研究显示, SA 含量与

MDA 含量呈极显著正相关关系, 且 MDA 含量与 RGR 呈显著负相关关系, 由此可推测, 极北海带幼苗中 SA 含量与 MDA 含量密切相关, 膜脂的过氧化可能是导致极北海带幼苗相对生长速率降低的原因之一。

在正常生理条件下, 植物本身的抗氧化系统(分为酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统)可对活性氧进行有效清除, 酶促抗氧化系统包括 SOD、POD、CAT 及谷胱甘肽还原酶(GR)等各种抗氧化酶, 非酶促抗氧化系统包括维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素等各种抗氧化剂(薛鑫等, 2013)。植物体内活性氧处于不断产生和清除的动态平衡中, 抗氧化系统是维持这种平衡的关键。一旦遭受环境胁迫, 这种平衡可能会被破坏, 使植物细胞中积累大量的活性氧(薛鑫等, 2013; 尹永强等, 2007)。过饱和光强是植物产生大量活性氧的重要诱因之一, 可对植物造成光氧化损害(郭连旺等, 1996)。研究表明, 极北海带成体的新生叶片饱和光强在 80~100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围内(Lüning, 1971), 而对于长度为 1~15 cm 的极北海带幼苗, 在 5°C~17°C 内其饱和光强范围为 52.4~100.3 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (梁洲瑞等, 2108)。由此可推测, 本研究中的光强 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 对极北海带幼苗来说可能已达到过饱和光强水平, 即处于高光逆境中。

本研究中, 当光强升高到 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 幼苗的类胡萝卜素含量有所增加, 这可能与幼苗对高光强的适应性有关。据报道, 类胡萝卜素可直接猝灭单线态氧或通过猝灭三线态叶绿素而阻止单线态氧的形成(单线态氧是由 O_2 和三线态叶绿素作用产生的), 从而消除单线态氧对光合作用结构的破坏(郭连旺等, 1996; 尹永强等, 2007)。由此推测, 类胡萝卜素在极北海带幼苗对抗高光胁迫过程中发挥重要作用。SOD 是生物体内特异清除 SA 自由基(O_2^-)的酶, 其与 O_2^- 反应产生 H_2O_2 和 O_2 , 是抗氧化的第一道保护层; POD 是以 H_2O_2 为电子受体催化底物氧化的酶, CAT 可与 H_2O_2 专一结合, 即 POD 和 CAT 均可消除 H_2O_2 (阎成士等, 1999)。本研究中, SOD 及 CAT 的比活力与 SA 和 MDA 含量均呈负相关关系, 其中, CAT 比活力与 SA 含量的相关性达到显著水平, 表明 SOD 及 CAT 对于极北海带幼苗中活性氧的清除、降低膜脂的过氧化伤害发挥着关键作用。在 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的高光强环境下, SOD 和 POD 的比活力均较大, 与其他光强组相比均呈显著差异, 且 POD 比活力与 SOD 比活力呈极显著正相关关系, 由此可推测, 在极北海带幼苗的酶促抗氧化系统中, SOD 和 POD 可对高光逆境产生积极响应, 可协同作用清

除细胞内由高光强诱发引起的过量活性氧。CAT 主要定位于线粒体、过氧化物体与乙醛酸循环体中,而叶绿体中 H_2O_2 的清除主要是通过 Halliwell-Asada 途径进行的,该途径主要是由抗坏血酸过氧化物酶(APX)和 GR 等抗氧化酶发挥关键作用(阎成士等,1999)。因此,本研究中,在高光强环境下幼苗却没有表现出最高的 CAT 比活力,这可能与 CAT 在细胞中的位置和其他抗氧化酶的作用有关,即高光强直接对极北海带幼苗叶绿体产生了光氧化损害,而 APX 和 GR 对高光强诱发引起的幼苗叶绿体中过量的 H_2O_2 进行了有效清除,该猜测有待于下一步进行研究验证。综合上述结果可推测,极北海带幼苗的酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统均可对高光逆境作出积极应答,它们可相互辅助以清除活性氧,降低光氧化伤害。

研究表明,极北海带成体的新生叶片光补偿点约为 $12 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (Lüning, 1971),而对于长度为 1~15 cm 的极北海带幼苗,在 $5^\circ\text{C} \sim 17^\circ\text{C}$ 范围内其光补偿点范围为 $4.6 \sim 15.4 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (梁洲瑞等,2018)。战吉成等(2003)研究认为,环境光强持久低于或短时间显著低于植物光饱和点,但不低于限制其生存的最低光照强度时的光环境,可以称为弱光逆境。由此推测,极北海带幼苗在 $20 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强下可能已处于弱光逆境中。弱光逆境可影响植物的光合作用、光合产物的运输和分配、营养元素的吸收、内源激素水平和抗氧化酶活性等生理生化过程(王明等,2007)。本研究中,在 $20 \sim 80 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强范围内,极北海带幼苗的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量随着光强的减弱均呈现出逐渐降低的趋势。许多大型海藻在一定光强范围内色素含量也会呈现出这种变化趋势(陈伟洲等,2015;姜宏波等,2009;林贞贤等,2007;刘静雯等,2001)。研究认为,这是植物表现出的生长补偿效应,即植物可通过增加细胞色素含量来更有效地捕获光能,以适应弱光环境(Beale *et al.*, 1971; 王艺等,2010)。弱光逆境可导致植物体内 MDA 含量的升高,受不同弱光胁迫强度和胁迫时间的影响,不同抗氧化酶的活性会有所差异(王明等,2007)。本研究中,在 $20 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的弱光环境下,极北海带幼苗的 SA 含量和 MDA 含量均显著高于其他处理组,且 SOD、POD 和 CAT 的比活力均较低。综合上述结果可推测,在弱光逆境下,极北海带幼苗虽然能通过增加体内叶绿素 a 的含量以更有效地捕获有限的光能,但幼苗的可溶性蛋白合成效率及抗氧化酶比活力均显著下降,从而造成其活性氧代谢发生了较严重的失衡,进而造成较严重的细胞膜脂

过氧化损害,该氧化损害是导致极北海带幼苗相对生长速率降低的原因之一。

参 考 文 献

- Beale SI, Appleman D. Chlorophyll synthesis in chlorella: Regulation by degree of light limitation of growth. *Plant Physiology*, 1971, 47(2): 230-235
- Bixler HJ, Porse H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(3): 321-335
- Chen WZ, Zhong ZH, Liu T, *et al.* Effects of different light intensities and temperatures on growth and chemical constituents of *Gracilaria chilensis*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(1): 28-34 [陈伟洲, 钟志海, 刘涛, 等. 光照强度和温度对智利江蓠生长及生化组分的影响. *海洋湖沼通报*, 2015(1): 28-34]
- Chouhan A, Iqbal S, Maheshwari RS, *et al.* Study of effect of air pollution on photosynthetic pigment of some plants growing in Pithampur Industrial Area, Dhar (M.P.). *International Journal of Current Scientific Research*, 2011, 1(4): 187-190
- Drew EA, Jupp BP, Robertson WAA. Photosynthesis and growth of *Laminaria hyperborea* in British waters. *Underwater Research*, 1976, 369-379
- Du XM, Yin WX, Zhao YX, *et al.* The production and scavenging of reactive oxygen species in plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 121-125 [杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125]
- Fan X. Research and utilization of algae as feed additives. *Feed Industry*, 1991, 12(11): 14-16 [范晓. 海藻作为饲料添加剂的研究和利用. *饲料工业*, 1991, 12(11): 14-16]
- Guo LW, Shen YG. Protective mechanisms against photodamage in photosynthetic apparatus of higher plants. *Plant Physiology Communications*, 1996, 32(1): 1-8 [郭连旺, 沈允钢. 高等植物光合机构避免强光破坏的保护机制. *植物生理学通讯*, 1996, 32(1): 1-8]
- Jiang HB, Tian XL, Dong SL, *et al.* Effects of temperature and light intensity on the growth and biochemical composition of *Sargassum thunbergii*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(1): 185-189 [姜宏波, 田相利, 董双林, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(1): 185-189]
- Jupp BP, Drew EA. Studies on the growth of *Laminaria hyperborea*, (Gunn.) Fosl. I. Biomass and productivity. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1974, 15(2): 185-196
- Kain JM, Jones NS. Aspects of the biology of *Laminaria hyperborea* II. Age, weight and length. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1963, 43(1): 129-151
- Kain JM, Jones NS. Aspects of the biology of *Laminaria hyperborea* IV. Growth of early sporophytes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1965, 45(1): 129-143
- Kain JM. Aspects of the biology of *Laminaria hyperborea* I. vertical distribution. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1962, 42(2): 377-385

- Kain JM. Populations of *Laminaria hyperborea* at various latitudes. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1967, 15(1-4): 489-499
- Kain JM. Synopsis of biological data on *Laminaria hyperborea*. FAO Fisheries Synopsis No. 87, 1971
- Kelly E. The role of kelp in the marine environment. *Irish Wildlife Manuals* No. 17, 2005
- Kremer BP. Carbohydrate reserve and dark carbon fixation in the brown macroalga, *Laminaria hyperborea*. *Journal of Plant Physiology*, 1984, 117(3): 233-242
- Lapointe BE, Tenore KR, Dawes CJ. Interactions between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales: Rhodophyta). *Marine Biology*, 1984, 80(2): 161-170
- Larkum AWD. Frond structure and growth in *Laminaria hyperborea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1972, 52(2): 405-418
- Li HS. Principle and technology of plant physiology and biochemistry experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000, 169 [李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000, 169]
- Liang ZR, Liu FL, Yuan YM, et al. Effect of different temperatures on growth and photosynthetic characteristic of *Laminaria hyperborea* young seedling. *Marine Sciences*, 2018, 42(4): 71-78 [梁洲瑞, 刘福利, 袁艳敏, 等. 不同温度对极北海带幼苗生长及光合特性的影响. 海洋科学, 2018, 42(4): 71-78]
- Lin ZX, Gong XZ, Li DP. Effects of light and the stress of nutrients deficiency on the growth and levels of chemical constituents of *Gracilaria lemaneiformis*. *Marine Sciences*, 2007, 31(11): 22-26 [林贞贤, 宫相忠, 李大鹏. 光照和营养胁迫对龙须菜生长及生化组成的影响. 海洋科学, 2007, 31(11): 22-26]
- Liu JW, Dong SL. Interactions between light and temperature on the growth and levels of chemical constituents of *Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(3): 332-338 [刘静雯, 董双林. 光照和温度对细基江蓠繁枝变型的生长及生化组成影响. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(3): 332-338]
- Lu WW, Wang QH, Gong QL. Effects of light and temperature on growth and biochemical composition of a marine macroalga (*Macrocystis pyrifera*) young sporophyte. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(1): 40-48 [芦薇薇, 王巧晗, 宫庆礼. 光照强度和温度对巨藻幼孢子体的生长和生化组成的影响. 中国海洋大学学报, 2016, 46(1): 40-48]
- Lu X, Li MZ, Xu ZG, et al. Impact of light intensity on growth and levels of photosynthetic pigments of *Gracilaria chouae*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 145-150 [卢晓, 李美真, 徐智广, 等. 光照对脆江蓠生长及光合色素含量的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 145-150]
- Lüning K. Seasonal growth of *Laminaria hyperborea* under recorded underwater light conditions near Helgoland. *Proceedings of the 4th European Marine Biology Symposium*, 1971, 347-361
- Pedersen MF, Nejrup LB, Fredriksen S, et al. Effects of wave exposure on population structure, demography, biomass and productivity of the kelp *Laminaria hyperborea*. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, 451(1): 45-60
- Phillips GO, Williams PA. *Handbook of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing, 2009, 807-828
- Qin Y. Alginate fibres: An overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 2008, 57(2): 171-180
- Qu YY, Wang WW, Cao ZM, et al. Determining the ratio of mannuronic acid to guluronic acid(M/G) of five species of brown algae. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 160-164 [曲艳艳, 王伟伟, 曹增梅, 等. 5种褐藻的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值测定. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 160-164]
- Schiener P, Black KD, Stanley MS, et al. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima*, and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 363-373
- Schoschina EV. On *Laminaria hyperborea* (Laminariales, Phaeophyceae) on the murman coast of the barents sea. *Sarsia North Atlantic Marine Science*, 1997, 82(4): 371-373
- Sjøtun K, Fredriksen S, Lein TE, et al. Population studies of *Laminaria hyperborea* from its northern range of distribution in Norway. *Proceedings of the International Seaweed Symposium*, 1993, 14: 215-221
- Smale DA, Burrows MT, Moore P, et al. Threats and knowledge gaps for ecosystem services provided by kelp forests: A northeast Atlantic perspective. *Ecology & Evolution*, 2013, 3(11): 4016-4038
- Wang LM, Li SG, Chai Y, et al. Indoor culture and sexual reproduction synchronization of *Sargassum thunbergii* young seedlings. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 395-404 [王丽梅, 李世国, 柴雨, 等. 鼠尾藻幼苗的室内培养及有性生殖同步化. 水产学报, 2011, 35(3): 395-404]
- Wang M, Jiang WJ, Yu HJ. Effect of low light stress on plant physiology and its control measures. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2007, 28(3): 198-203 [王明, 蒋卫杰, 余宏军. 弱光逆境对植株生理特性的影响及其调控措施. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(3): 198-203]
- Wang Y, Wei XL. Advance on the effects of different light environments on growth, physiological biochemistry and morphostructure of plant. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2010, 29(4): 353-359, 370 [王艺, 韦小丽. 不同光照对植物生长、生理生化和形态结构影响的研究进展. 山地农业生物学报, 2010, 29(4): 353-359, 370]
- Willenbrink J, Rangoni-Kübbeler M, Tersky B. Frond development and CO₂-fixation in *Laminaria hyperborea*. *Planta*, 1975, 125(2): 161-170
- Xue X, Zhang Q, Wu JX. Research of reactive oxygen species in plants and its application on stress tolerance. *Biotechnology Bulletin*, 2013(10): 6-11 [薛鑫, 张芊, 吴金霞. 植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用. 生物技术通报, 2013(10): 6-11]
- Yan CS, Li DQ, Zhang JH. Plant leaf senescence and oxidative stress. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 398-404 [阎成士, 李德全, 张建华. 植物叶片衰老与氧化胁迫. 植物学通报, 1999, 16(4): 398-404]
- Yin YQ, Hu JB, Deng MJ. Latest development of antioxidant system and responses to stress in plant leaves. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(1): 105-110 [尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫

迫的响应研究进展. 中国农学通报, 2007, 23(1): 105–110]
Zhan DM, Wu HY, Liu MX, *et al.* Impact of irradiances on growth and biochemical composition of *Sargassum muticum*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 140–144 [詹冬梅, 吴海一, 刘梦侠, 等. 光照强度对海黍子生长及部分生化

指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 140–144]
Zhan JC, Huang WD, Wang LJ. Research of weak light stress physiology in plants. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20(1): 43–50 [战吉宸, 黄卫东, 王利军. 植物弱光逆境生理研究综述. 植物学通报, 2003, 20(1): 43–50]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Light Intensities on the Growth and Biochemical Characteristics of *Laminaria hyperborea* Young Seedling

LIANG Zhouui^{1,2}, LIU Fuli^{1,2①}, DU Xinxin³, YUAN Yanmin⁴, LIANG Qidi¹,
WANG Wenjun^{1,2}, SUN Xiutao^{1,2}, WANG Feijiu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Laminaria hyperborea* is an important commercial seaweed, which has great potential for seaweed bed construction and artificial cultivation in China. To verify the suitable light for the growth of *L. hyperborea* young seedlings and clarify the biochemical response mechanism under light stress, the relative growth rate and biochemical responses under different light intensities were studied. Under these experimental conditions, the main conclusions are as follows: Light was beneficial for the growth of *L. hyperborea* young seedlings in the range of 40~80 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. The relative growth rate showed significant negative interrelation with the content of malondialdehyde (MDA), which indicates that membrane lipid peroxidation may be one of the reasons contributing to the low relative growth rate of *L. hyperborea* young seedlings. An extremely significant positive correlation was found between the content of superoxide anion (SA) and the content of MDA of *L. hyperborea* young seedlings. The specific activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were negatively correlated with the content of SA and MDA, respectively. And the negative relationship between the specific activity of CAT and the content of SA was significant. Moreover, an extremely significant and positive correlation was found between specific activity of peroxidase (POD) and SOD. It can be inferred from the above correlation analysis results that SOD, CAT and POD play important roles in removing reactive oxygen species (ROS) and there is a significant synergy between SOD and POD in *L. hyperborea* young seedlings. The light stress environment was not conducive to the accumulation of soluble protein resulting in the accumulation of MDA in *L. hyperborea* young seedlings, which indicates that the total metabolic level was reduced and the ROS level was increased in this environment. The content of carotenoid and the specific activity of SOD and POD in *L. hyperborea* young seedlings will increase so that the ROS level can be reduced under high light stress, thus relieving light oxidative damage. The content of chlorophyll-a of *L. hyperborea* young seedlings will increase so that it can capture the limited light energy more effectively under low light stress. However, the antioxidant enzyme activity was significantly decreased as a result that led to a serious imbalance of ROS metabolism under low light stress, which resulted in more severe membrane lipid peroxidation damage. These results can provide the theoretical basis for the artificial breeding and cultivation of *L. hyperborea* in the future.

Key words *Laminaria hyperborea*; Light intensity; Growth; Biochemical composition; Antioxidant system

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180126001

http://www.yykxjz.cn/

栾青, 吕芳, 吴海一, 丁刚, 詹冬梅. 不同培养条件对铜藻生长和营养组分的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 123-130
Luan Q, Lü F, Wu HY, Ding G, Zhan DM. Effects of culture conditions on nutrient composition of *Sargassum horneri*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 123-130

不同培养条件对铜藻生长和营养组分的影响*

栾青¹ 吕芳² 吴海一² 丁刚² 詹冬梅^{2①}

(1. 烟台大学生命科学学院 烟台 264005; 2. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104)

摘要 研究了不同温度(5℃、10℃、15℃、20℃、25℃)和光照[50、100、200、300 μmol/(m²·s)]对铜藻(*Sargassum horneri*)生长、光合色素和生化组分的影响。结果显示, 温度和光照对这3个方面均有显著影响($P < 0.05$)。铜藻在5℃~20℃、50~300 μmol/(m²·s)时均可生长, 且最适生长条件为20℃、200~300 μmol/(m²·s), 特定生长率较高。温度高于25℃, 藻体基本停止生长并出现腐烂现象。25℃、50 μmol/(m²·s)时, 铜藻色素积累较多。可溶性蛋白和可溶性糖的含量分别在10℃、20℃时最高, 不同光照间无显著性差异($P > 0.05$)。灰分和粗蛋白含量在5℃~10℃、50 μmol/(m²·s)时最高。粗脂肪含量在10℃和25℃时最低, 不同光照间无显著性差异($P > 0.05$)。褐藻胶含量在10℃、100 μmol/(m²·s)时最高, 岩藻黄素含量在10℃、50 μmol/(m²·s)时达到最大。褐藻多酚含量在低温为5℃或高温25℃、200~300 μmol/(m²·s)高光下达到最大。研究表明, 室内培养铜藻在20℃左右、200~300 μmol/(m²·s)时, 生长速率最快, 而铜藻在10℃、100 μmol/(m²·s)环境条件下, 藻体色泽及健壮程度更好, 铜藻个体大, 生长速度快, 可进行大规模的养殖生产。本研究结果对铜藻养殖及其活性物质提取具有重要的参考价值。

关键词 铜藻; 温度; 光照强度; 生长; 营养组成

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)04-0123-08

我国海藻化工原料短缺问题日渐凸显, 铜藻(*Sargassum horneri*)等经济褐藻的生产得到瞩目, 但受环境变化的影响, 定生型铜藻资源却不断衰退。铜藻不连续分布在我国暖温带, 生长于潮间带(曾呈奎等, 1959), 受温度和光照等环境因子影响, 其富含褐藻胶(Alginate)、岩藻黄素(Fucoxanthin)、褐藻多酚(Phlorotannin)等多种活性物质(杨金生等, 2017; Liaaen-Jensen *et al*, 1978; Hosokawa *et al*, 2010; 秦绪龙等, 2007; Liu *et al*, 2012), 具有重要的开发和应用前景(曾呈奎, 2000; 詹冬梅等, 2016)。为了更好开展铜藻的综合利用, 有必要对铜藻的生长和营养组分积累的

影响因素进行研究。

目前, 国内已对一些马尾藻(*Scagassum*)类海藻的营养组分开展了研究, 如詹冬梅等(2016)和胡斌(2015a,b)对鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、海黍子(*Sargassum miyabei*)和铜藻进行营养分析和评价; 付贵权等(2015)研究了金属胁迫对马尾藻生长及生化特性影响; 姜宏波等(2009)研究了温度及光强对鼠尾藻组成的影响; 张建伟(2014)研究了环境因子对瓦氏马尾藻(*Sargassum vachellianum*)生长及光合作用的影响; 詹冬梅等(2013)研究了光照及温度对海黍子组分的影响。铜藻在该方面研究资料较少, 在不同培养

* 海洋公益性行业科研专项(201505022)和山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT26-01)共同资助[This work was supported by the National Special Research Fund for Non-Profit Marine Sector (201505022), and Technical System of Modern Agricultural Industry in Shandong Province (SDAIT26-01)]. 栾青, E-mail: luanqing0517@163.com

① 通讯作者: 詹冬梅, 研究员, E-mail: zdm1011@126.com

收稿日期: 2018-01-26, 收修改稿日期: 2018-07-12

条件下,铜藻生长及组分变化对它的养殖生产及其综合利用有着重要参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

2017年1月,在山东荣成海域(37°15'N, 122°35'E)海带(*Laminaria japonica*)养殖筏架上采集铜藻。去除杂藻和污垢,在10℃、100 μmol/(m²·s)室内水族箱中适应3 d。适应后,选择生长状态良好的藻体作为实验材料。

1.2 实验设计

光照实验 因铜藻在室内培养,10℃时,虽长得不是最快,但该温度下培养的藻体色泽好、藻体健壮,因此,光照实验的温度设定为10℃。取健康藻体250 g放入水族箱中,设置光照为50、100、200、300 μmol/(m²·s),3个平行,光照周期为24 L,充气悬浮培养,每隔1 d换水1次,实验周期为15 d,结束时,藻体于80℃烘干,密封袋冷冻保存。

温度实验 设置温度为5℃、10℃、15℃、20℃、25℃,培养光照为150 μmol/(m²·s)。其余培养条件同光照组。

光照组和温度组的藻体生长 取约3 g健康铜藻放入1 L锥形瓶中,加入800 ml过滤海水,在光照培养箱培养,设置3个平行,分别在光照组和温度组进行培养,3 d换水1次并称重记录。称重时,用滤纸吸干藻体表面多余水分。

1.3 测定方法

1.3.1 铜藻比生长速率 (Relative growth rate, RGR, %) 的测定 比生长速率的计算公式:

$$RGR = [(W_t/W_0)^{1/t} - 1] \times 100$$

式中, W_t 为实验中期或结束时藻体鲜重(g), W_0 为实验开始时藻体鲜重(g), t 为培养时间(d)。

1.3.2 灰分、粗脂肪、粗蛋白含量的测定 灰分采用560℃煅烧法;粗脂肪采用索氏提取法;粗蛋白称取铜藻干粉1 g,精确至0.0001 g,移入250 ml干燥的定氮瓶中,加入1000 kjeltabs Cu/45一粒(4.5 g K₂SO₄, 0.5 g CuSO₄·5H₂O),加入10 ml浓硫酸,定氮瓶口上放置小漏斗反应10 min,待样品变黑放置消化炉上,420℃消化2 h,待样品成透明蓝绿荧光色即消化完成,冷却片刻,放入蛋白质检测仪测定。

1.3.3 光合色素含量的测定 可溶性蛋白(Soluble)采用南京建成蛋白检测试剂盒(A045-2)考马斯亮蓝

法测定。准确称取待测藻体0.5 g,液氮冻存研磨,加入可溶性蛋白提取液,6000 r/min离心30 min,取上清液,定容至5 ml,采用酶标仪测定波长为595 nm处的吸光值。

可溶性多糖(Soluble sugar)采用南京建成植物可溶性糖检测试剂盒(50T)蒽酮比色法测定。取铜藻干粉0.1 g放入10 ml离心管中,加入1 ml蒸馏水,盖紧离心管盖,沸水浴10 min,冷却后,4000 r/min离心10 min,取上清液,定容至10 ml,用酶标仪测定波长为620 nm处的吸光值。

光合色素参照 Wellburn(1994)的方法提取。取0.1 g藻体研磨,4℃用8 ml 80%丙酮避光浸泡24 h后,4000 r/min离心10 min,取上清液,定容至10 ml,用酶标仪在665、652、510、480 nm处测定。叶绿素a(Chl-a)和类胡萝卜素(Carotenoid,Car)的计算公式:

$$w(\text{Chl-a}) = (16.29 \times \text{OD}_{665 \text{ nm}} - 8.54 \times \text{OD}_{652 \text{ nm}}) \times V/W/1000$$

$$w(\text{Car}) = 7.6 \times (\text{OD}_{480 \text{ nm}} - 1.49 \times \text{OD}_{510 \text{ nm}}) \times V/W/1000$$

式中, V 为浸提丙酮的体积(ml), W 为藻体鲜重量(g),单位为mg/g。

1.3.4 特有成分含量的测定 褐藻胶参照尚德荣等(2011)方法。准确称取1.0 g铜藻干粉于50 ml小烧杯中,加入2.0 mol/L HCl 30 ml过夜,次日用纱绢将其水洗,蒸馏水4次,双蒸水1次,直至无氯离子为止,将水洗后的样品再用0.1 mol/L醋酸钙溶液30 ml浸泡2 h,用蒸馏水洗5次,将洗下的水溶液混合混匀,用0.1 mol/L的NaOH溶液滴定,指示剂为酚酞,按照下述公式即可得到褐藻胶的含量。

$$\text{褐藻胶含量}(\%) = (C \times V \times 0.2160) \times 100/m$$

式中, C 为NaOH的摩尔浓度(mol/L), V 为滴定消耗的NaOH体积数(ml),0.2160为1.0 ml 0.1 mol/L NaOH标准溶液,相当于0.2160 g褐藻酸钠, m 为海藻样品的重量(g)。

岩藻黄素参照闫相勇等(2014)的方法测定。准确称取1.0 g铜藻干粉,在60℃的条件下,用20 ml甲醇避光静置,浸提2次,每次1 h。取浸提液,4000 r/min,离心10 min后取上清液,转入梨形分液漏斗中,加入正己烷充分震荡混匀,静置分层,保留上清液,下层甲醇水溶液再次转入分液漏斗进行萃取,直至甲醇水溶液不再出现黄色为止。将所有上清液汇合混匀定容。在岩藻黄素特定吸收波长为450 nm下测吸光度值,并按以下公式计算岩藻黄素的含量。

$$\text{岩藻黄素}(\text{mg/g}) = (\text{OD}_{455 \text{ nm}} \times n \times V \times 1000) / (A_{1 \text{ cm}}^{1\%} \times M \times 100)$$

式中, n 为稀释倍数, $A_{1 \text{ cm}}^{1\%}$ 为在1 cm光程长的比色皿中1 g/L岩藻黄素的理论吸收值,即1600, M

为样品重量(g), V 为岩藻黄素提取液体积(ml)。

褐藻多酚参照严小军等(2000)的方法测定。铜藻干粉过40目筛后,准确称取0.1~0.15g于25ml试管中,加入15%的乙醇3ml浸泡24~48h,采用微波提取法,微波辐射功率为700MHz,微波辐射时间为10s。6000r/min离心10min,取上清液,定容至3ml,混匀后取50 μ l水样置于1.5ml Ep管中,加水稀释至700 μ l,混合均匀,加入100 μ l Folin-Denis试剂混匀,3min后加入200 μ l饱和碳酸钠溶液,充分混匀,3h后用酶标仪在710nm处测定吸光值。将1%(W/V)间苯三酚标准液稀释200倍成标准液,呈梯度将不同体积的1%间苯三酚标准液置于15ml试管中,按照上述方式测定吸光值绘制出标准工作曲线。样品测得的吸光值代入标准工作曲线公式即可得到褐藻多酚的含量。

1.4 数据分析

采用Microsoft Excel 2013软件整理数据,SPSS 13.0软件进行单因子方差分析(One way, ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著,数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用Origin 8.5软件制图。

2 结果与分析

2.1 温度对铜藻生长及营养成分的影响

2.1.1 温度对铜藻生长的影响 温度对铜藻生长有着重要的影响。从图1可以看出,5 $^{\circ}$ C~15 $^{\circ}$ C对铜藻生长无影响,20 $^{\circ}$ C时,RGR明显比5 $^{\circ}$ C~15 $^{\circ}$ C组高,生长迅速,25 $^{\circ}$ C时0~3d生长迅速,3~9d时,RGR明显减少,后期铜藻出现了掉叶、腐烂、产生黏膜的现象,不适宜铜藻生长。温度对铜藻的生长有着明显的影响($P < 0.05$)。由此看出,铜藻在20 $^{\circ}$ C左右时生长速率更快。

2.1.2 温度对铜藻一般营养成分的影响 从图2可以看出,5 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C灰分含量最高,矿物质积累明显增加,温度升高时含量减少,说明10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C对灰分有明显影响($P < 0.05$)。5 $^{\circ}$ C时粗蛋白含量最多,为21.76%,差异显著($P < 0.05$),随着温度增加,粗蛋白含量呈逐渐减少趋势,后平稳至17%左右。粗脂肪在10 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C含量最少,其他温度组含量在0.3%~0.4%左右,差异显著($P < 0.05$)。

2.1.3 温度对光合色素的影响 从图3可以看出,25 $^{\circ}$ C时叶绿素a含量最高,为0.248mg/g,差异显著。类胡萝卜素同样25 $^{\circ}$ C含量最高,为0.048mg/g,差异显著。可溶性蛋白受温度影响显著($P < 0.05$),20 $^{\circ}$ C最小,25 $^{\circ}$ C含量突增至3.283mg/g。20 $^{\circ}$ C可溶性糖含量最高,

达到14.986mg/g,其他组含量在7~9mg/g之间,差异显著($P < 0.05$)。

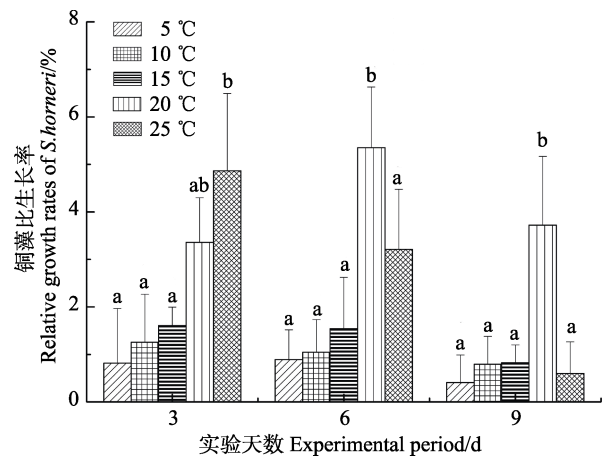


图1 温度对铜藻比生长速率的影响

Fig.1 Effects of different temperature on relative growth rate of *S. horneri*

同组中标有不同小写字母表示组间有显著性差异

($P < 0.05$), 标有相同小写字母者表示组间

无显著性差异($P > 0.05$),下同

The means with different letters being significantly different at the 0.05 probability level, and the means with the same letters within the same column are not significantly different. The same as below

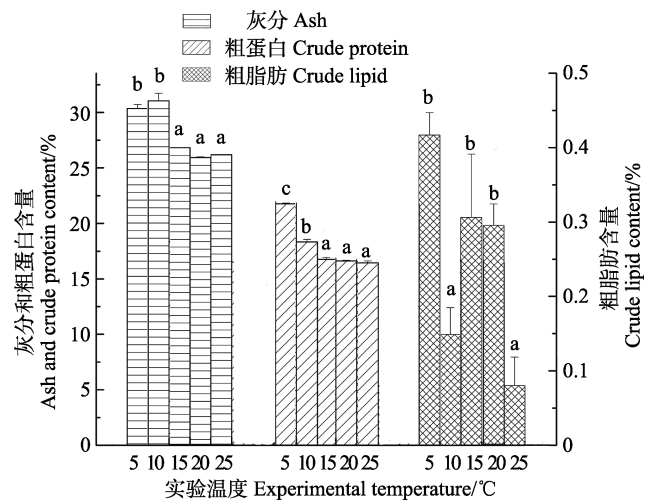


图2 不同温度对灰分、粗蛋白、粗脂肪含量的影响

Fig.2 Effects of different temperature on ash, crude lipid and crude protein content of *S. horneri*

2.1.4 温度对褐藻胶、岩藻黄素和褐藻多酚含量的影响

从图4可以看出,10 $^{\circ}$ C时,褐藻胶含量最多,为31.269%,5 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C时,含量基本相同,与10 $^{\circ}$ C相比差异显著($P < 0.05$)。10 $^{\circ}$ C时,岩藻黄素最高为0.558mg/g,除了10 $^{\circ}$ C时激增外,其他各组随温度呈显著增加趋势($P < 0.05$)。而褐藻多酚含量在5 $^{\circ}$ C时

最高, 为 4.289 mg/g, 各温度间差异显著($P < 0.05$), 10℃时最低, 为 2.416 mg/g, 随着温度的上升含量逐渐增高, 至 25℃时, 褐藻多酚含量为 4.170 mg/g, 与 5℃时含量接近。

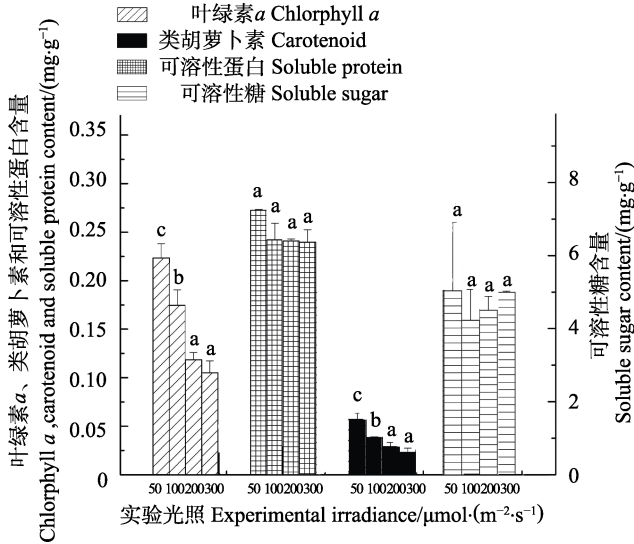


图 3 不同温度对铜藻叶绿素 a、类胡萝卜素、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of different temperature on Chl-a, carotenoid, soluble sugar and soluble protein content of *S. horneri*

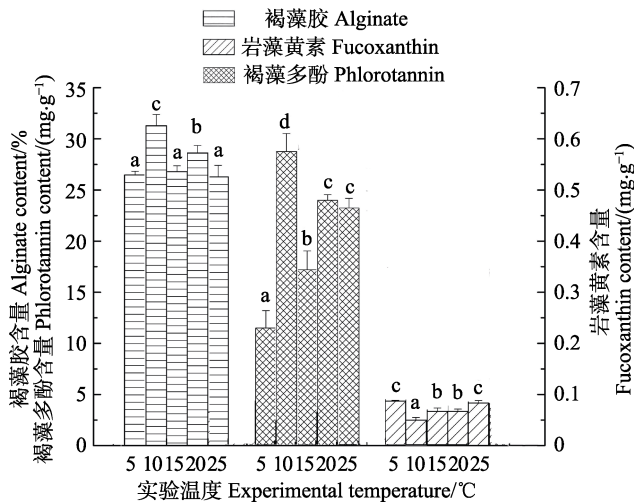


图 4 不同温度对褐藻胶、褐藻多酚、岩藻黄素含量的影响

Fig.4 Effects of different temperature on alginate, phlorotannin and fucoxanthin content of *S. horneri*

2.2 光照对铜藻生长及营养成分的影响

2.2.1 光照对铜藻生长的影响 不同光照下, 铜藻 RGR 见图 5。从图 5 可以看出, 光照的变化对藻体生长影响大体一致, $t_0 \sim t_3$ 期间, 光强为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 铜藻 RGR 最快, 差异显著($P < 0.05$), 而其他光照组间

差异不显著($P > 0.05$)。 $t_3 \sim t_{12}$, 铜藻总体生长缓慢, RGR 缓慢增加。从实验各时段可以看出, 铜藻适宜较高光强生活, 高光在前期对铜藻生长有明显促进作用, 中期在不同光照下, 无显著差异($P > 0.05$), 之后, 高光照较低光照 RGR 增长幅度更大。

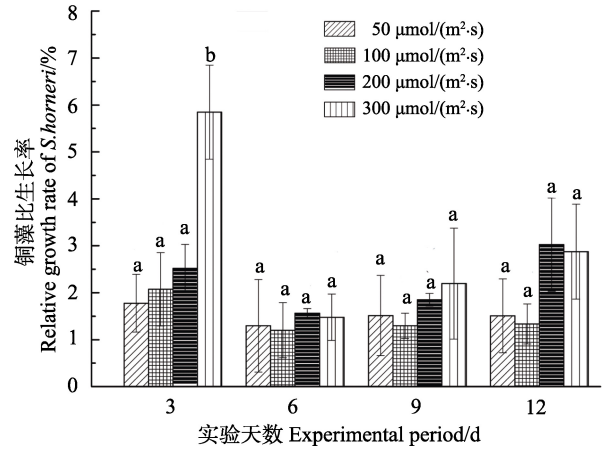


图 5 不同光照对铜藻比生长速率的影响

Fig.5 Effects of different irradiances on relative growth rate of *S. horneri*

2.2.2 光照对铜藻一般营养成分的影响 不同光照对铜藻基础组分含量的影响见图 6。从图 6 可以看出, 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组藻体灰分含量最高, 为 30.767%, 且差异显著, 含矿物质最多, 200、300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下的灰分分别为 25.956%、26.481%。50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组粗蛋白含量最高, 为 14.427%, 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 粗蛋白含量为 10.527%。200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 组粗脂肪含量最低, 显著低于其他各组($P < 0.05$), 而其他光照组间差异不显著($P > 0.05$)。

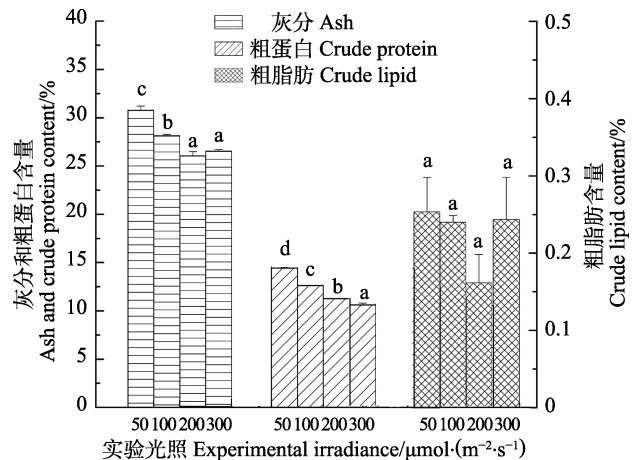


图 6 不同光照强度对灰分、蛋白质、脂肪含量的影响

Fig.6 Effects of different irradiances on ash crude lipid and crude protein content of *S. horneri*

2.2.3 光照对光合色素、可溶性糖和可溶性蛋白的影响 光照对铜藻光合色素含量的影响见图7。从图7可以看出, Chl-*a* 含量随光照的增加而减少($P < 0.05$), 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时 Chl-*a* 含量最高, 为 0.293 mg/g, 逐渐减少到 0.105 mg/g。类胡萝卜素与 Chl-*a* 的含量变化趋势一致, 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时含量最多。光照对可溶性蛋白和可溶性多糖含量没有显著影响。

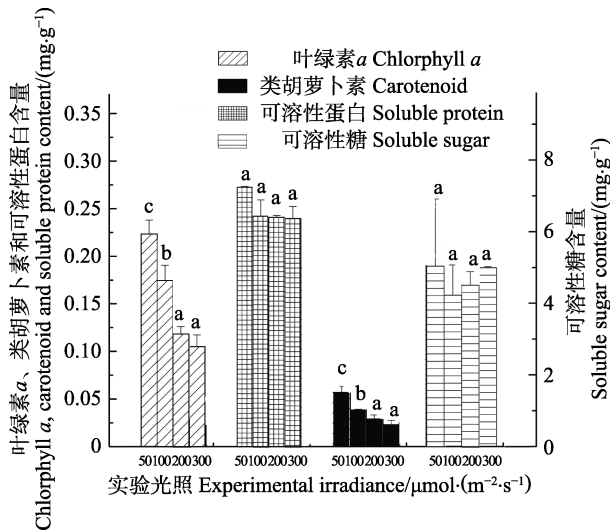


图7 不同光照强度对铜藻叶绿素*a*、类胡萝卜素、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响

Fig.7 Effects of different irradiance on Chl-*a*, carotenoid, soluble sugar and soluble protein content of *S. horneri*

2.2.4 光照对褐藻胶、岩藻黄素和褐藻多酚含量的影响 褐藻胶含量在 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照时最高, 为 32.785%, 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时褐藻胶含量最低, 为 26.726%。岩藻黄素含量随光照增加而减少($P < 0.05$), 光照为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 岩藻黄素含量最高, 为 0.669 mg/g, 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 含量最低。褐藻多酚含量随光照增加而增加($P < 0.05$), 光照为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, 褐藻多酚含量最高, 为 12.073 mg/g, 远高于光照为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的 3.390 mg/g (图8)。

3 讨论

3.1 温度和光照对铜藻生长的影响

海藻生长对温度及光照变化敏感(Jones *et al.*, 1984; Glenn *et al.*, 1990)。本研究结果表明, 较强光照 [200~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]及温度(约为 20°C)有利于铜藻生长, 人工养殖中可考虑适当提高光强从而增加产量。超过适宜温度(25°C)藻体出现掉叶、变深、产生

黏液现象; 铜藻生长随光照增加而增加, 在一定温度下增加光照, 铜藻可获得较快的生长速率。孙建璋等(2016)在南麂列岛进行铜藻人工栽培研究显示, 水温为 17~20°C、表层强光下, 铜藻生长较快, 与本研究结果一致。姜宏波等(2009)研究表明, 适宜温度下, 较高光照时, 瓦氏马尾藻和鼠尾藻的生长出现停滞。产生这种原因可能是由于铜藻比瓦氏马尾藻和鼠尾藻有更高的光照需求。

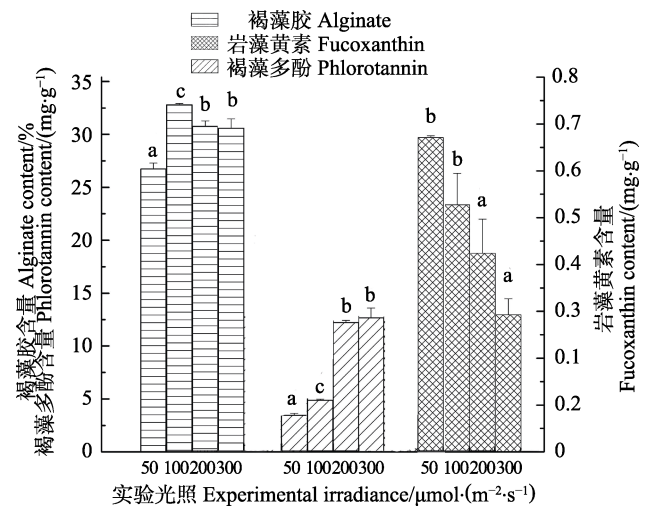


图8 不同光照强度对褐藻胶、褐藻多酚、岩藻黄素含量的影响

Fig.8 Effects of different irradiance on alginate, phlorotannin and fucoxanthin content of *S. horneri*

3.2 铜藻组分随温度和光照的变化

可溶性蛋白大多是一些酶和功能性蛋白, 参与大多数的代谢反应, 可溶性糖有维持藻体体内渗透势的作用, 是衡量植物代谢水平的一个重要指标, 二者皆影响着藻体的生命活动(Xu *et al.*, 2006)。研究结果显示, 在适宜的温度及光照下, 可溶性糖及可溶性蛋白含量较高。

岩藻黄素作为捕光复合物, 在光合作用的光化学系统中起着重要的作用(Bertrand, 2010)。10°C时, 铜藻类内的岩藻黄素达到最高, 高温及高光照不利于铜藻产生岩藻黄素。

铜藻中褐藻胶不是在生长最快速的环境条件下含量最高, 铜藻在 10°C、100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 环境条件下, 产生较多的褐藻胶, 受温度和光照影响显著。在对鼠尾藻中褐藻胶含量随季节变化的研究发现, 在鼠尾藻生长快速的 6 月, 褐藻胶含量较高(詹冬梅等, 2018)。在室内培养时发现, 稍低一些温度及光照强度下培养

的铜藻,在色泽及健壮程度比生长速率最高时的铜藻要好一些。由此推测,铜藻中褐藻胶含量可能与铜藻生长速度及其藻体健壮程度都相关。

褐藻多酚是发现于褐藻且仅存于褐藻中的一族天然产物,抗氧化活性极强,是褐藻在遇到不适环境时的一种化学抵御物质(魏玉西等, 2002; Barwell *et al.*, 1989)。本研究中,在高光为 200、300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、低温和高温下,褐藻多酚的含量均有上升,推测原因可能是由于环境不适宜,铜藻为了保护藻体的健康生长而产生的一种防御机制。

4 结 论

光照强度、周期和光质等都对光合作用有着直接的影响,温度影响光合作用暗反应和呼吸作用的酶活性,这也是自然条件下,藻体体内生化组成呈季节性变化的原因(纪明侯, 1963; 王志芳等, 2008)。本研究结果显示,室内培养铜藻在 20℃左右、200~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 环境条件下,生长速率最快,而铜藻在 10℃、100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 环境条件下,藻体色泽及健壮程度更好,各组分随温度及光照强度变化而变化。研究结果对铜藻养殖及其活性物质提取具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- Barwell CJ, Blunden G, Manandhar PD. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of α -amylase, lipase and trypsin. *Journal of Applied Phycology*, 1989, 1(4): 319–323
- Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynthesis Research*, 2010, 106(1–2): 89–102
- Fu GQ, Han TT, Gong XY, *et al.* Effect of Cu^{2+} stress on growth and physiological biochemical characteristics of *Sargassum hemiphyllum*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 34–39 [付贵权, 韩婷婷, 巩秀玉, 等. 重金属 Cu^{2+} 胁迫对半叶马尾藻生长及生理生化特性的影响. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 34–39]
- Glenn EP, Smith CM, Doty MS. Influence of antecedent water temperatures on standing crop of a *Sargassum* spp. dominated reef flat in Hawaii. *Marine Biology*, 1990, 105(2): 323–328
- Hosokawa M, Miyashita T, Nishikawa S, *et al.* Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-A^y mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 504(1): 17–25
- Hu B, Song LP, Mao SQ, *et al.* Nutrient analysis of *Sargassum horneri* and its nutritional evaluation. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2015a, 35(06): 100–104 [胡斌, 宋理平, 冒树泉, 等. 铜藻的营养成分分析与营养学评价. *广东海洋大学学报*, 2015a, 35(6): 100–104]
- Hu B, Song LP, Zhang YH, *et al.* Nutrient analysis and nutritional evaluation of *Sargassum kjellmanianum* along the coast of Rongcheng, Shandong Province. *Journal of Yangtze University(Natural Science)*, 2015b, 12(33): 21–24 [胡斌, 宋理平, 张延华, 等. 荣成沿海海黍子的营养成分分析与营养学评价. *长江大学学报(自科科学)*, 2015b, 12(33): 21–24]
- Hu B, Wan BL, Xu P, *et al.* Research progress in nutrition of seaweed *Sargassum*. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(1): 48–53 [胡斌, 王秉利, 许鹏, 等. 马尾藻营养成分研究进展. *水产学杂志*, 2016, 29(1): 48–53]
- Ji MH. Studies on the chemical composition of the Chinese economic brown seaweeds II. Seasonal variations in the main chemical components of *Laminaria japonica*, *Sargassum pallidum* and *Sargassum kjellmanianum* from the North China. *Oceanology et Limnology Sinica*, 1963, 5(1): 1–10 [纪明侯. 我国经济褐藻的化学成分研究—II. 北方产海带、海蒿子和海黍子的主要化学成分季节变化. *海洋与湖沼*, 1963, 5(1): 1–10]
- Jiang HB, Tian XL, Dong SL, *et al.* Effects of temperature and light intensity on the growth and biochemical composition of *Sargassum thunbergii*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(1): 185–189 [姜宏波, 田相利, 董双林, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(1): 185–189]
- Jones RI, Reynolds CS. The ecology of freshwater phytoplankton. London: Cambridge University Press, 1984
- Liaaen-Jensen S. Chapter 1—marine carotenoids. *Marine Natural Products*, 1978, 1–73
- Liu L, Heinrich M, Myers S, *et al.* Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 142(3): 591–619
- Qin XL, Wan SB, Jiang T. Research progresses in eckols of phlorotannins. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007(S1): 176–181 [秦绪龙, 万升标, 江涛. Eckol 类褐藻多酚的研究进展. *海洋湖沼通报*, 2007(S1): 176–181]
- Shang DR, Ning JS, Zhao YF, *et al.* Establishment of the determination on kelp alginate. *Food Science and Technology*, 2011, 36(8): 252–254 [尚德荣, 宁劲松, 赵艳芳, 等. 海带中褐藻胶含量测定方法的建立. *食品安全与检测*, 2011, 36(8): 252–254]
- Sun JZ, Zhuang DG, Yang JB, *et al.* Primary study on enhancement technique of *Sargassum horneri* around Nanji Islands. *Modern Fisheries Information*, 2010, 25(1): 23–27 [孙建璋, 庄定根, 杨加波, 等. 南麂列岛铜藻增殖技术的初步研究. *现代渔业信息*, 2010, 25(1): 23–27]
- Wang ZF, Zhang QS, Pan JH. Seasonal variation of population structure in *Sargassum thunbergii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(6): 992–998 [王志芳, 张全胜,

- 潘金华. 烟台芦洋湾鼠尾藻种群生物量结构的季节变化. 中国水产科学, 2008, 15(6): 992-998]
- Wei YX, Guo DS. Researching progress in brown algal polyphenolics. Marine Sciences, 2002, 26(10): 18-20 [魏玉西, 郭道森. 褐藻中多酚化合物的研究进展. 海洋科学, 2002, 26(10): 18-20]
- Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 1994, 144(3): 307-313
- Yan XJ, Zhou TC, Lou QX, *et al.* Seasonal changes of content of phlorotannins. Marine Sciences, 1996, 20(5): 39-42 [严小军, 周天成, 娄清香, 等. 褐藻多酚含量的季节变化. 海洋科学, 1996, 20(5): 39-42]
- Yan XJ, Lou QX, Wu ZZ, *et al.* Determination of vicinal phenolic hydroxyl in brown algal polyphenol. Marine Sciences, 2000, 24(12): 3-5 [严小军, 娄清香, 吴真真, 等. 褐藻多酚连三羟基的测定. 海洋科学, 2000, 24(12): 3-5]
- Yan XY, Liu YX, Wu YP, *et al.* Optimizing the processes of extracting and purifying fucoxanthin from *Laminaria japonica*. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(3): 115-121 [闫相勇, 刘翼翔, 吴永沛, 等. 海带岩藻黄素的提取及纯化工艺研究. 中国食品学报, 2014, 14(3): 115-121]
- Yang JS, Chen JJ, Pan YY. Application of alginate biological activity and recent research progress. Rural Economy and Science-Technology, 2017, 28(5): 90-91 [杨金生, 陈晶晶, 潘玉英. 褐藻胶生物活性应用及最新研究进展. 农村经济与科技, 2017, 28(5): 90-91]
- Xu RY, Niimi Y, Han DS. Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy-release in bulbs of *Lilium rubellum*. Scientia Horticulturae, 2006, 111(1): 68-72
- Zhan DM, Wang XY, Xin ML, *et al.* Nutritional constituents of three kinds of *Sargassum*. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2016, 32(3): 221-225 [詹冬梅, 王翔宇, 辛美丽, 等. 三种马尾藻的营养组成分析. 广西科学院学报, 2016, 32(3): 221-225]
- Zhan DM, Wu HY, Liu MX, *et al.* Impact of illumination on growth and biochemical composition of *Sargassum muticum*. Progress in Fishery Science, 2013, 34(1): 140-144 [詹冬梅, 吴海一, 刘梦侠, 等. 光照强度对海黍子生长及部分生化指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 140-144]
- Zhan DM, Lv F, Luan Q, *et al.* The growth's and constituent ingredients's seasonal variations of *Sargassum thunbergii* on different tidal zone in Rongcheng, Shandong. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(3): 295-299 [詹冬梅, 吕芳, 栾青, 等. 山东荣成不同潮位鼠尾藻生长及化学组分的季节性变化. 大连海洋大学学报, 2018, 33(3): 295-299]
- Zhang JW, Liu YY, Wu HL, *et al.* Effects of different environmental factors on growth and photosynthesis of *Sargassum vachellianum*. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 1(6): 1227-1235 [张建伟, 刘媛媛, 吴海龙, 等. 环境因子对瓦氏马尾藻生长及光合作用的影响. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1227-1235]
- Zeng CK. Seaweed in China. Third Volumes, Phaeophyceae. Beijing: Science Press, 2000 [曾呈奎. 中国海藻志. 第三卷, 褐藻门. 北京: 科学出版社, 2000]
- Zeng CK, Zhang JF. On the discontinuous distribution of some brown algae on the China coast. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1959(2): 86-92 [曾呈奎, 张峻甫. 关于几种褐藻在中国沿岸的不连续分布. 海洋与湖沼, 1959(2): 86-92]

(编辑 陈严)

Effects of Culture Conditions on Nutrient Composition of *Sargassum horneri*

LUAN Qing¹, LÜ Fang², WU Haiyi², DING Gang², ZHAN Dongmei^{2①}

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005;

2. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104)

Abstract We studied the effects of temperature and light intensity on growth, photosynthetic pigment content, and nutrient components in *Sargassum horneri*. These factors had significant effects ($P < 0.05$) on all three aspects. *S. horneri* survived at 5°C~20°C and 50~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. The optimal conditions, at which specific growth rate was the highest, were 20°C and 200~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. At temperatures above 25°C, the blades stopped growing, became pale, and rotted. *S. horneri* accumulated the most photosynthetic pigment at 25°C and 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. The effects of light intensity were not significant. Soluble sugar content and soluble protein content were the highest at 10°C~20°C, and ash and crude protein content were the highest at 5°C~10°C and 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Ether extract yield was low at 10°C and 25°C, peaked between these values, and did not vary significantly with light intensity. Alginate content was the highest at 10°C and 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, and fucoxanthin content was the highest at 10°C and 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Phlorotannin content increased with increasing light intensity from 200 to 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, where it reached a maximum; it reached local maxima at 5°C and 25°C, and was lower between these values. *S. horneri* grew faster at 20°C and 200~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, whereas color and vigor were better at 10°C and 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Its long body length and fast growth make it ideal for large-scale culturing. The nutrient components varied with culture conditions. *S. horneri* is a health food of moderate protein and low fat content, with high levels of functional components such as alginate, fucoxanthin, and polyphenols. It can therefore be used to provide raw material for food additives and to obtain its active components. These findings provide reference values for culturing *S. horneri* and extracting its components.

Key words *Sargassum horneri*; Temperature; Light intensity; Growth; Nutrient composition

① Corresponding author: ZHAN Dongmei, E-mail: zdm1011@126.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180510001

http://www.yykxjz.cn/

曾俊, 陈伟洲, 陈泽攀, 刘浩然. 广东紫菜 *Hsp70* 基因 cDNA 克隆与表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 131-139
Zeng J, Chen WZ, Chen ZP, Liu HR. The cDNA cloning and expression analysis of the *Hsp70* gene from *Pyropia guangdongensis*.
Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 131-139

广东紫菜 *Hsp70* 基因 cDNA 克隆与表达分析*

曾俊 陈伟洲^① 陈泽攀 刘浩然

(汕头大学 广东省海洋生物技术重点实验室 汕头 515063)



摘要 为探索广东紫菜(*Pyropia guangdongensis*)叶状体 *Hsp70* 基因在温度刺激下机体耐温相关分子机制, 为广东紫菜的栽培生产提供技术参考, 本研究利用 RACE 技术获得了广东紫菜 *Hsp70* 基因(*PgHsp70*)全长序列, 并在此基础上采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究广东紫菜叶状体分别在不同温度(22℃、27℃和 31℃)条件下处理 0、1/6、1/2、1、6、12、24 和 36 h 后 *PgHsp70* 基因的差异表达。结果显示, *PgHsp70* 基因序列长 2004 bp, 包含一个 1866 bp 的开放阅读框, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87。基因表达水平定量分析表明, 温度对 *PgHsp70* 基因表达水平有显著影响, *PgHsp70* 基因在不同温度的表达水平变化趋势基本一致, 均呈现先上调后下降的趋势, 且均于 1 h 表达量到达最高水平, 其中, 在 31℃ 1 h 表达量最高, 为未经高温处理组的 11 倍, 说明 *PgHsp70* 基因在应答高温胁迫中发挥着重要的作用。

关键词 广东紫菜; 高温胁迫; *Hsp70*; cDNA 末端快速扩增技术(RACE); qRT-PCR

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0131-09

生物有机体受到外界有害因素刺激时, 很多基因表达会受到抑制, 而热休克基因在刺激下表达增强, 产生的蛋白称热休克蛋白或热激蛋白(Hsp)(王宇萍等, 2010)。Hsp 在果蝇(*Drosophila*)中首次发现(Ritossa, 1962)。Tisserers 等(1974)从果蝇幼体中分离出 6 种新的蛋白质, 命名为热激蛋白。至今, 大量研究证明, 主要的热激蛋白都有分子伴侣的功能。而 *Hsp70* 是 Hsp 家族中进化上最保守和研究最多的一类热激蛋白, 按表达情况可将 *Hsp70* 蛋白分为结构型热激蛋白 Hsc70 和诱导型热激蛋白 *Hsp70* 两大类; 按定位情况可将 *Hsp70* 蛋白分为定位于细胞质、内质网、线粒体和质体的 4 个亚家族(Guy *et al*, 1998)。*Hsp70* 蛋白的功能十分广泛, 具有多种生物学功能, 例如, *Hsp70* 是主要分子伴侣蛋白之一(Bukau *et al*, 2013; Mayer, 2013), 与肿瘤的发生相关, 具有调控细胞增殖的功

能(Zhang *et al*, 2002), 参与细胞保护、提高细胞应激耐受性(Mayer *et al*, 2005), 抗细胞凋亡(Snoeckx *et al*, 2001)等。目前, 对紫菜属海藻 *Hsp70* 基因的研究工作主要集中在栽培种类坛紫菜(*Pyropia haitanensis*) (赖晓娟等, 2014)和条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) (周向红等, 2011)以及非传统栽培种长紫菜(*Pyropia dentata*)、皱紫菜(*Pyropia crispata*) (郑红妍, 2017)和列紫菜(*Pyropia seriata*) (San *et al*, 2015), 为深入研究紫菜 *Hsp70* 基因的功能奠定了基础, 而对广东紫菜(*Pyropia guangdongensis*)*Hsp70* 基因的研究尚未见相关报道。

广东紫菜属红藻门(Phodophyta)、红藻纲(Rhodophyceae)、红毛菜亚纲(Bangiophycidae)、红毛菜目(Bangiiales)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*), 主要分布于广东等沿岸海区(郑宝福等, 2009; Tseng *et al*, 1978)。在自然环境中, 影响紫菜生长的环境因

* 现代农业产业技术体系专项(CARS-50)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50)]. 曾俊, E-mail: 1207615382@qq.com

^① 通讯作者: 陈伟洲, 教授, E-mail: wzchen@stu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-10, 收修改稿日期: 2018-05-30

素很多,如高温、盐胁迫的、干出失水等(李晓蕾等,2017)。其中,温度是影响紫菜生长的最重要的环境因子,直接影响紫菜的生长状态以及品质(李兵等,2013)。广东紫菜有一定的高温适应性(王永川等,1978、1982),而大量证据表明,Hsp70 蛋白家族在藻类适应环境的过程中起重要的作用,例如,坛紫菜在 29℃ 高温胁迫 3 h 后,5 条 *Hsp70* 基因的表达水平都显著升高;在极度干燥的条件下,坛紫菜 *Hsp70* 基因表达水平显著上升,表现出适应高温胁迫和干燥胁迫的作用(Ji *et al*, 2015)。Hsp70 蛋白家族与广东紫菜的高温适应性也直接相关,因此,研究广东紫菜 *Hsp70*(*PgHsp70*)基因具有重要意义。本研究开展 *PgHsp70* 基因的全长克隆,并在此基础上,研究分析其在不同温度胁迫过程中的差异表达,以期从 *Hsp70* 基因表达水平初步揭示广东紫菜对高温胁迫的响应特点,为广东紫菜的栽培生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料预培养与胁迫处理

广东紫菜于 2016 年 11 月采集于广东省汕头市南澳县深澳湾海区(23°28'52"N, 117°06'35"E)的人工栽培网帘,快速运回实验室,挑选健康、长度一致(约为

10~15 cm)的藻体进行灭菌海水清洗处理,在温度 20℃ 和光照强度约 90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下用砂滤后抽滤的自然海水(盐度 30)暂养 2 d。

取 1 组广东紫菜用滤纸吸干,液氮迅速预冷,保存至 -80℃ 冰箱,用于 *PgHsp70* 基因的全长克隆。另取一组广东紫菜在智能光照培养箱内进行高温胁迫实验,用于基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析。参照南澳岛海区广东紫菜自然生长的特性,以 22℃ 为对照组,海水盐度为 30,光照强度为 90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,设置 2 个高温组:27℃ 和 31℃,在智能光照培养箱中进行高温胁迫处理 0、1/6、1/2、1、6、12、24 和 36 h 后分别取样,液氮迅速保存后至 -80℃ 冰箱,每个处理设置 3 个平行。

1.2 实验方法

1.2.1 引物及序列 同源扩增、RACE 扩增、阳性克隆筛选以及荧光定量 PCR 分析所采用的引物用 Primer Premier 5 软件设计,由北京六合华大基因科技有限公司合成,引物序列见表 1。200 μl UPM: Long UPM (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 8 μl , Short UPM (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 40 μl , ddH₂O 152 μl 。

1.2.2 广东紫菜总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 用于全长克隆的总 RNA 提取按照 RNAiso Plus

表 1 实验中引物的名称和序列

Tab.1 Name and sequence of primers used in the experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
PF	CCCGAAGAGATTCCGCTCAAGTA	同源扩增
PR	AACTTCAATTTGAGGAACGCCTCT	Homologous amplification
5'RACE1	CCATTCCACAATTTGTTGGTCAAAGTCATC	5'RACE
5'RACE2	CATCTAAACCGGCTATTTTACCGGCATC	
5'RACE3	CAACAAGTTTTCTGAGTACTTGAGCGGA	
5'RACE4	GGTTTACCTCCTTCCATAACAGCAATCACA	
3'RACE1	CTGCTACACAAGATGGTCCCAAGCACTT	3'RACE
3'RACE2	ACCCAGATGAAGTTGTTGCTATTGGAGC	
3'RACE3	GGAGTAGAACTTTAGGTGGGGTAATGACG	
3'RACE4	AGATGGTATTATGCCTGCACCTAGAGGCGT	
3'RACE5	TATTGATACTAAGAATCAAGCAGAATCTTTATGT	
QF	CCCGAAGAGATTCCGCTCAAGTA	实时荧光定量 PCR
QR	CTAAACCGGCTATTTTACCGGCAT	qRT-PCR
UBCF	TCACAACGAGGATTACCACC	内参基因
UBCR	GAGGAGCACCTTGGAACG	Reference gene
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	阳性克隆筛选
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	Positive clones screening
Long UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
Short UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

Total RNA(TaKaRa)提取试剂说明书(Raha *et al*, 1990)进行操作, 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检查完整性, 并利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。选取质量良好的 RNA 按照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)和 SMARTer RACE 5'/3' cDNA Kit Components(TaKaRa)的操作说明书(Tian *et al*, 2013; Tang *et al*, 2013; Freeman, 2013)进行反转录, 分别得到 cDNA、5'RACE cDNA 及 3'RACE cDNA, 保存至-20℃冰箱, 分别用于 *PgHsp70* 基因中间片段的克隆以及 5'RACE 和 3'RACE 扩增。

用于荧光定量检测的总 RNA 提取按照 RNAfast200-总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)的说明书(武荣等, 2011)进行操作, 利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值, 选取质量良好的 RNA 根据 PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa)的说明书(Zhang *et al*, 2013)进行反转录(以 RNA 900 ng 为基准), 所得的 cDNA 用 UBC 引物进行检验, 保存至-20℃冰箱备用。

1.2.3 *PgHsp70* 基因的全长克隆 从 NCBI 中搜索条斑紫菜(GenBank No.: DQ497595.1), 坛紫菜(GenBank No.: DQ480726)的 *Hsp70* 基因的核酸序列, 进行序列比对并找出保守区域, 设计引物 PF 和 PR (表 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶回收试剂盒回收, 利用 T-A 克隆方法克隆到 pMD19-T 载体上, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 用含 Amp 的 LA 固体培养基进行 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落于 1 ml LA 培养液中 37℃ 200 r/min 震荡培养 6 h, 进行菌液 PCR 检测, 挑取阳性克隆。将含有目的片段的阳性菌落交由北京六合华大基因科技有限公司进行测序。测序结果与 NCBI 上其他物种的 *Hsp70* 基因进行比对和同源性分析, 确定为 *PgHsp70* 基因中间片段。

根据克隆得到的 *PgHsp70* 基因片段序列, 分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性扩增引物(表 1)。分别以 5'cDNA 和 3'cDNA 模板进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增, 将 RACE 扩增的目的片段切胶回收、连接、转化、阳性克隆筛选、送样测序。

根据基因测序获得的 *PgHsp70* 基因 5'和 3'及中间片段序列, 利用 DNAMAN V6.0 软件进行拼接, 获得 *PgHsp70* 基因全长序列。

1.2.4 *PgHsp70* 基因的生物信息学分析 采用 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析获得的 *PgHsp70* 基因的开放阅读框和所编码氨基酸

序列; 利用在线工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测该基因氨基酸序列的分子量和等电点; 用在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测该基因氨基酸序列功能结构域; 利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)在线软件分析该基因编码的氨基酸序列保守位点及特征序列; 利用 PrediSi (<http://www.Predisi.de>)预测所得蛋白是否含有信号肽; 利用 NCBI 网站上 BLAST 序列分析工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索用于同源性比对分析与系统进化树构建的氨基酸序列; 采用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸多重序列比对; 通过 MEGA 5.1 软件, 构建 NJ 系统进化树。

1.2.5 高温胁迫下 *PgHsp70* 基因的表达分析 根据 *PgHsp70* 基因全长序列设计 qRT-PCR 正反向引物 QF 和 QR, 并以 *UBC* 作为内参基因(表 1)。以广东紫菜叶状体在不同高温胁迫条件下各时间的 cDNA 为模板, 在 Roche light Cycler 480 II 仪器进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)。20 μ l 反应体系: Tip Green 10 μ l, Q₁F 0.8 μ l, Q₁R 0.8 μ l, cDNA 2 μ l, ddH₂O 6.4 μ l。每次反应均设阴性对照和无模板对照, 每个反应设 3 个重复。扩增程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 40 个循环; 循环结束后从 60℃ 缓慢升温至 95℃; 40℃ 冷却 30 s。所得实验数据采用相对 CT 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)进行 *PgHsp70* 基因 mRNA 的表达量计算。

1.3 数据处理

应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对实验数据进行处理与统计分析, 并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 *PgHsp70* 基因的克隆及序列分析

以广东紫菜 cDNA 为模板, 用引物 PF/PR 进行普通 PCR 扩增, 1% 的琼脂糖凝胶电泳扩增产物, 观察到 1 条扩增条带, 约为 1100 bp(图 1a), 将其切胶回收, 克隆并送去测序, 得到一段 1061 bp 的基因序列。进行 BLAST 比对发现, 其与 *P. haitanensis* (GenBank No.: DQ480726)的 *Hsp70* 基因核酸序列同源性达 99%, 与 *P. yezoensis* (GenBank No.: DQ497595.1)的 *Hsp70* 基因核酸序列同源性达到 90%, 进而推断该片段为 *PgHsp70* 的基因片段。

广东紫菜通过 RACE 技术扩增并测序, 分别获得长为 337 bp 的 5'序列和 606 bp 的 3'序列(图 1b、c)。

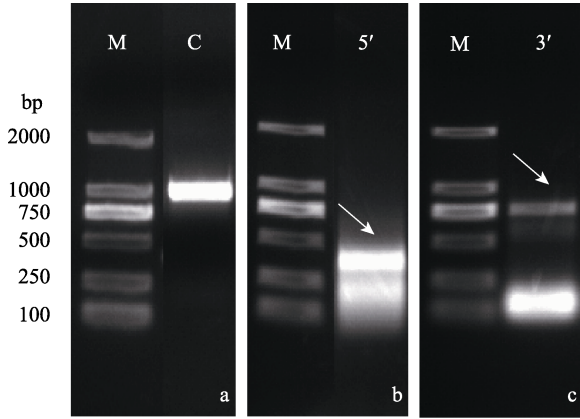


图1 *PgHsp70* 基因克隆产物凝胶电泳
Fig.1 Agarose electrophoresis of RACE or PCR products of *PgHsp70* genes

a: *PgHsp70* 基因的中间片段扩增产物; b: *PgHsp70* 基因的5'RACE 扩增产物(箭头); c: *PgHsp70* 基因的3'RACE 扩增产物(箭头). M: DNA marker DL 2000; C: 对照
a: Core fragment amplification product of *PgHsp70* genes;
b: 5'RACE amplification products of *PgHsp70* (arrow);
c: 3'RACE amplification products of *PgHsp70* (arrow);
M: DNA marker DL 2000; C: Control

将2条序列与之前克隆得到的 *Hsp70* 基因部分序列进行拼接, 获得长为 2004 bp 的 *Hsp70* 基因全长序列。经过 Blast 比对, 确认其为广东紫菜的 *Hsp70* 基因, 命名为 *PgHsp70*。通过 ORF Finder 软件分析发现, 广东紫菜 *Hsp70* 基因开放阅读框为 1866 bp, 以 ATG 为起始密码子, TAA 为终止子, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量约为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87。5'非编码区(5' TR)7 bp, 3'非编码区(3' UTR)131 bp(图 2)。利用 InterProScan 软件分析克隆得到的 *PgHsp70* 基因氨基酸序列, 378~534 位点是多肽结合域(Peptide-binding domain), 527~595 位点是 C 末端结构域(C-terminal domain)(图 2)。使用 Prosite 在线软件分析发现, 该基因编码的氨基酸序列有 *HSP70* 家族的 3 条特征性序列: IDLGTNS, VFDLGGGTFDVSVL, VVLVGGSTRIPAIQQ(图 2)。PrediSi 预测软件并未在该基因中发现信号肽序列。

2.2 *PgHsp70* 基因多序列比对及系统进化树分析

广东紫菜 *Hsp70* 基因编码的氨基酸序列经 BLAST 比对发现, 与其他物种的 *Hsp70* 基因有较高同源性。利

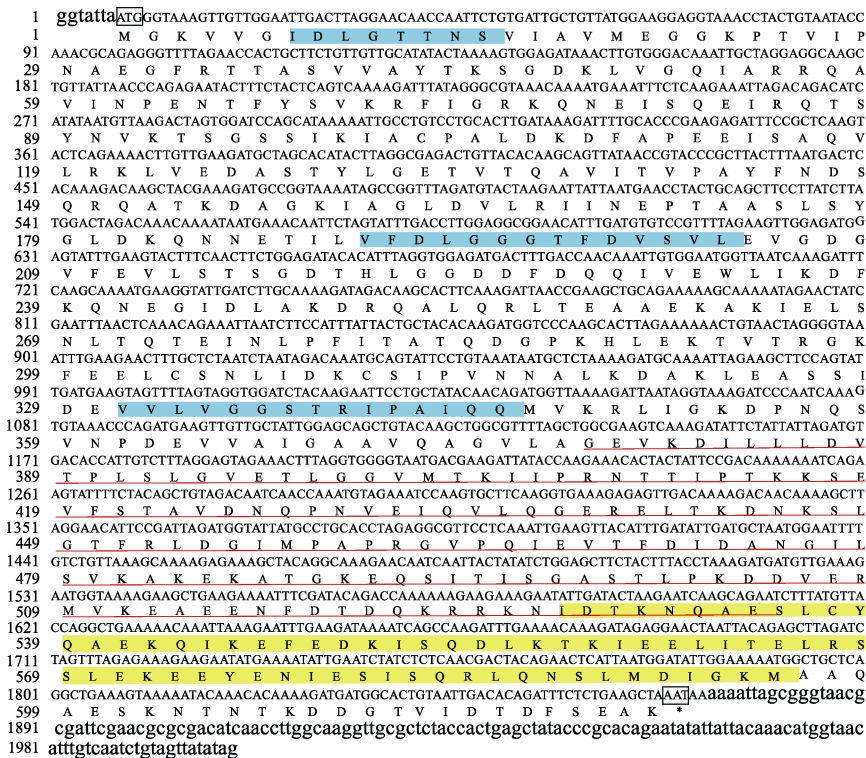


图2 广东紫菜 *Hsp70* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列
Fig.2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *PgHsp70*

蓝色方框区域表示 *Hsp70* 蛋白家族的序列特征; 黄色方框区域表示 C 末端结构域, 红色“—”表示多肽结合域; 方框所示为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)

Blue boxes represent sequences of *HSP70* protein family, Yellow boxes represent C-terminal domain, Polypeptide binding domain is underlined with red “—”, Start codon(ATG) and termination codon(TAA) are shown in the box

用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸多重序列比对分析结果显示,不同物种间的 *Hsp70* 序列非常保守,其中, *PgHsp70* 氨基酸序列与坛紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性最高(99%), 其次分别与条斑紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性

达 98%, 与 *P. perforate* 的 *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 97%, 与脐形紫菜(*P. umbilicalis*) *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 94%, 与细基江蓠繁枝变种(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*) *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 78%(图 3)。

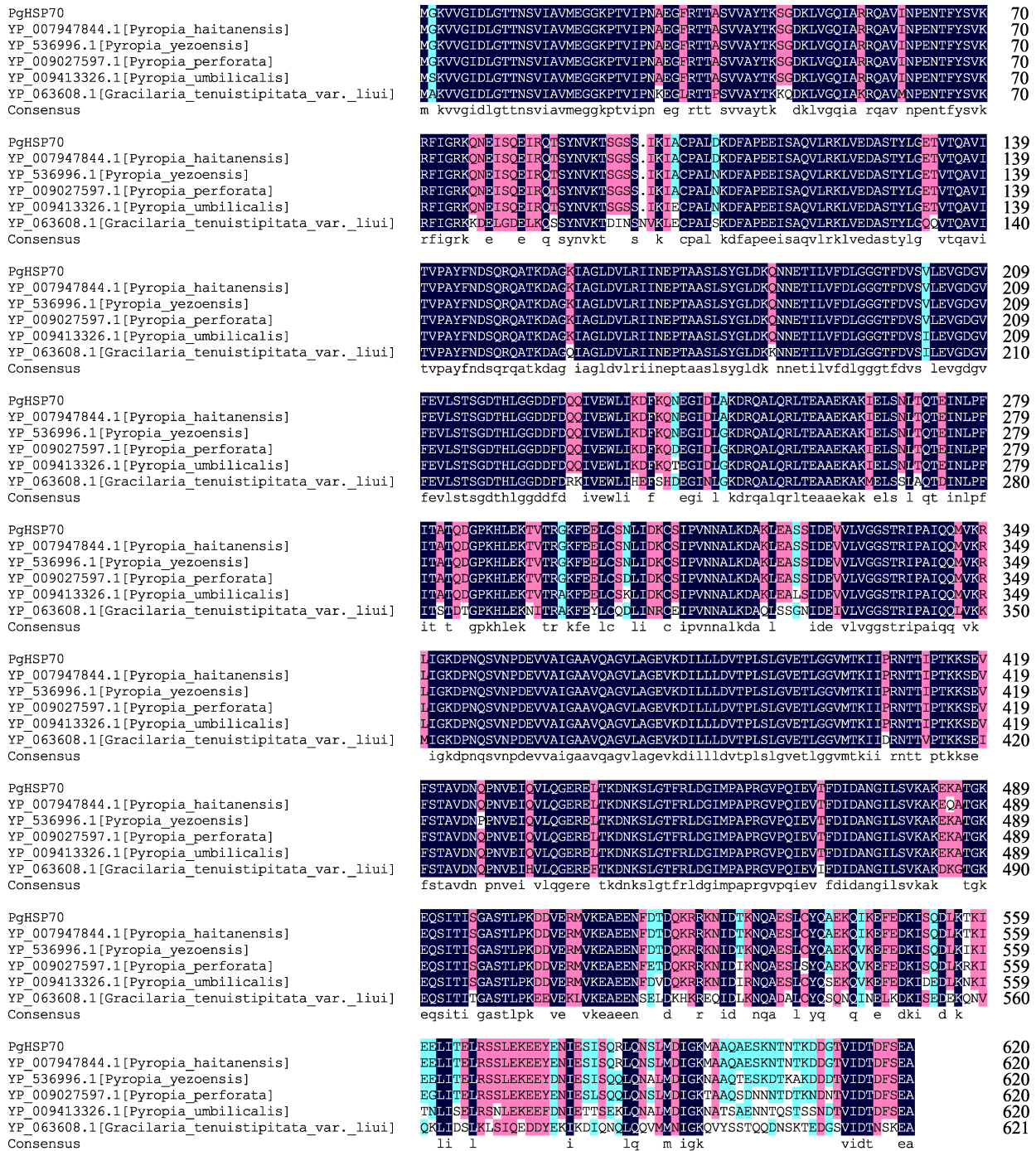


图 3 *Hsp70* 的氨基酸序列多重序列比对

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences of *Hsp70*

黑色区域: 相似性 100%; 粉红区域: 相似性≥75%; 蓝色区域: ≥50%
 Black area: Similarity is 100%; Pink area: Similarity is greater than or equal to 75%;
 Blue area: Similarity is greater than or equal to 50%

为了确定 *PgHsp70* 的系统进化关系,通过 MEGA 5.1 软件,采用 Neighbor-Joining 法构建了 *PgHsp70* 及选取的 17 条代表性的 *Hsp70* 氨基酸序列系统进化树。进化树结果显示(图 4),红藻和蓝藻亲缘关系较近且聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白,绿藻、褐藻和

陆生植物则聚类于细胞质定位的 *Hsp70* 蛋白。其中, *PgHsp70* 蛋白聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白,与坛紫菜亲缘关系最近,与同属红藻门的其他物种亲缘关系较近,与蓝藻亲缘关系次之,而其他藻类及陆生植物则明显地被区分开来。

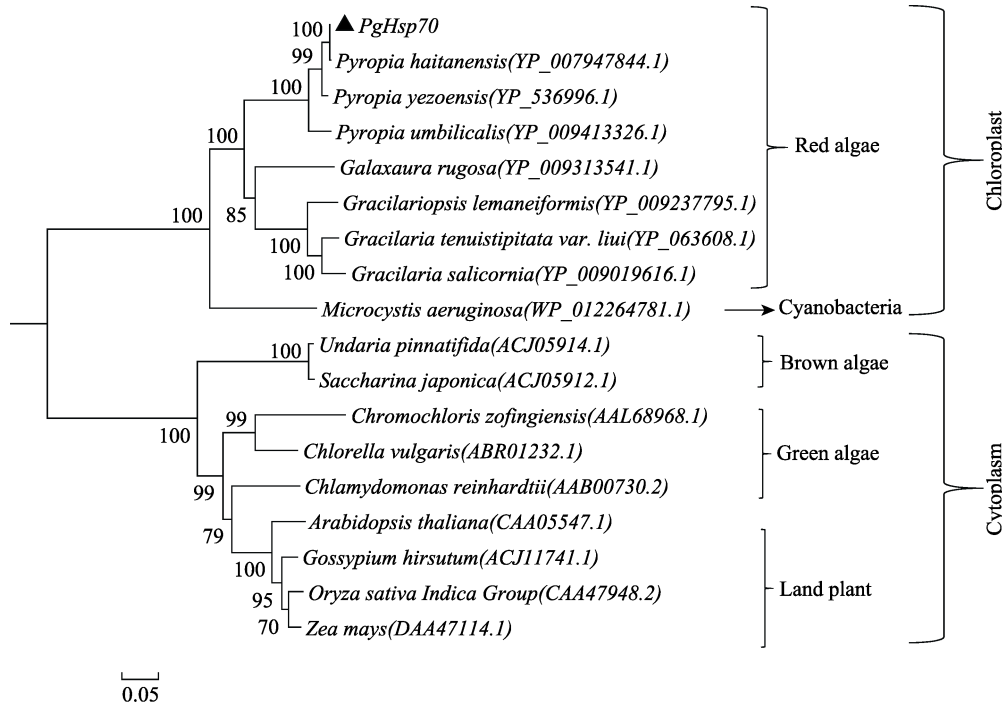


图 4 采用 NJ 法构建的基于 *PgHsp70* 基因所编码氨基酸序列的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree based on *PgHsp70* amino acid sequences by the NJ method

2.3 *PgHsp70* 基因在高温胁迫下的表达

基因在特定条件下表达水平的变化有助于了解相关基因的功能。为研究广东紫菜 *Hsp70* 对高温胁迫的功能响应,本研究采用荧光定量 PCR 技术检测 *PgHsp70* 基因在不同温度(22℃、27℃和 31℃)处理下,不同时间水平(0、1/6、1/2、1、6、12、24、36 h)基因相对表达水平变化。*PgHsp70* 基因在高温胁迫过程中相对表达变化趋势见图 5,内参为 *UBC*。检测结果显示,温度对 *PgHsp70* 基因表达水平有显著影响, *PgHsp70* 基因表达量在不同温度胁迫下随时间变化趋势基本一致,均呈现 1 h 之前先上调、1 h 之后下调的趋势,且均于 1 h 表达量到达最高水平,分别为未经高温处理组的 3.9 倍、7.1 倍和 11.1 倍。在温度胁迫 0~1 h 时, *PgHsp70* 基因表达量显著升高 ($P<0.05$), 31℃ 温度组基因表达水平一直高于其他温度组, 27℃ 温度组基因表达水平在 1/6~1/2 h 间低于 22℃, 在 1 h 时高于 22℃; 随着胁迫时间的增加(1 h 之后), 不同温度 *PgHsp70* 基因表达量均显著下调

($P<0.05$),但在高温胁迫 6~36 h 之间, *PgHsp70* 基因表达水平无显著性差异($P>0.05$)。因此, *PgHsp70* 基因在应答高温胁迫中发挥着重要的作用,短时间内迅速大量表达以适应高温环境,在一定胁迫时间内温度越高,反应越灵敏,但应对高温胁迫的能力有限。

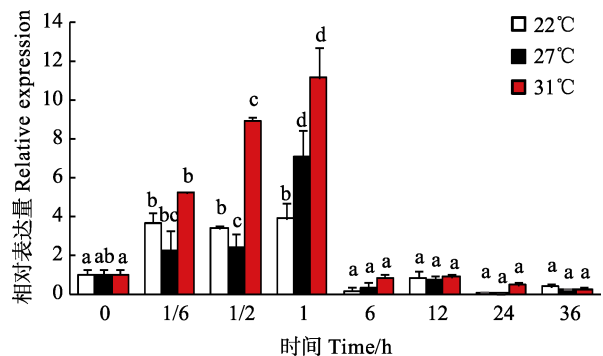


图 5 广东紫菜 *Hsp70* 基因在高温胁迫过程中相对表达变化
Fig.5 The relative expression of *Hsp70* gene in *P. guangdongensis* during high temperature stress

3 讨论

热激蛋白是细胞受到不良环境(如干旱、洪涝、低温、高温、盐渍等)刺激时被激活并表达增强的一类蛋白(待真真等, 2014; 陈玉婷等, 2015)。其中, *Hsp70* 是研究最多、在生物体内分布最广、进化上最保守及生物学功能多样的一类热激蛋白(齐妍等, 2013)。通常可分为 2 个区域: 含有 ATP 酶结构域的 N-端高度保守区和含有多肽结合结构的 C-端区域, 2 个区域之间由绞链相连(Genevaux *et al.*, 2007)。编码的氨基酸序列则一般有 3 条特征性序列: IDLGTTNS, VFDLGGGTFDVSVL, VVLVGGSTRIPAIQQ(郑红妍, 2017)。作者从广东紫菜叶状体中成功克隆了 2004 bp 的 *Hsp70* 基因, ORF 长度为 1866 bp, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87(图 2)。克隆获得的 *PgHsp70* 推导出来的氨基酸序列与其他大多数紫菜相似, 378~534 位点是多肽结合域, 527~595 位点是 C 末端结构域, 也含有 3 条特征性序列(图 2)。该序列与其他物种的 *Hsp70* 基因氨基酸序列对比显示(图 3), 与同为南方的坛紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性更是高达 99%, 表明其高度的保守性, 其次才与北方条斑紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 98%, 表明地域位置更近, 同源性可能更高。而与不同属的细基江蓠繁枝变种 *Hsp70* 氨基酸序列相似性只有 78%。与陆生植物相似性则更低, 在系统进化树中 *PgHsp70* 明显地与陆生植物区分开来(图 4), 说明亲缘关系越相近的物种和生境越接近的物种同源性可能越高, 反之则同源性越低, 可作为分子进化的一种依据, 这与刘伟等(2012)对坛紫菜 *Hsp70* 基因的研究结果基本一致。系统进化树结果还表明(图 4), *Hsp70* 蛋白按亚细胞定位不同分别聚类于一支, *PgHsp70* 蛋白与红藻、蓝藻亲缘关系较近聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白, 说明 *PgHsp70* 蛋白定位于叶绿体中。

温度是影响藻类生长分布的重要因素, 李恒等(2013)研究表明, 温度的变化对大型海藻的生长具有显著影响。对紫菜来说, 高温是制约粤东沿海紫菜养殖生产发展的主要因素, 近年来在汕头地区更是多次发生高温烂菜烂苗事件, 严重威胁当地紫菜栽培业的发展。已有大量文献报道和证据表明, *Hsp70* 在逆境胁迫响应中发挥着重要的调控作用, 具有提高机体抗热能力, 例如, 顾颖慧(2011)研究发现, 耐高温品种 981 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)在热激后, *Hsp70* 的表达量明显高于野生型龙须菜, 说明 *Hsp70* 是 981 龙须菜较野生型龙须菜耐高温的重要因素。

韩俊英等(2011)对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的研究证明, 温度可以引起脊尾白虾 *Hsp70* 的高表达, 说明 *Hsp70* 在动植物中均扮演抗逆境胁迫的角色。为探究 *Hsp70* 在广东紫菜高温适应性的作用, 作者从广东紫菜 *Hsp70* 基因着手, 分别在不同温度下对广东紫菜叶状体进行高温胁迫实验, 分析了不同温度胁迫过程中 *Hsp70* 基因表达变化趋势。图 5 的研究结果显示, *PgHsp70* 基因表达量在不同温度胁迫下均呈现 1 h 之前先上调、1 h 之后下调的趋势, 且均于 1 h 表达量到达最高水平。在温度胁迫 0~1 h 时, *PgHsp70* 基因表达量显著升高($P<0.05$), 31℃ 温度组基因表达水平一直高于其他温度组, 27℃ 温度组基因表达水平在 1/6~1/2 h 间低于 22℃, 在 1 h 时高于 22℃; 胁迫 1 h 之后, 不同温度 *PgHsp70* 基因表达量均显著下调($P<0.05$)。说明 *PgHsp70* 对于高温胁迫反应非常迅速, 短时间内大量积累表达, 温度越高, 反应越强烈, 随着胁迫时间的推移, *PgHsp70* 表达量下降, 该研究结果与现有的多数文献报道情况基本一致(Ji *et al.*, 2015)。由此, 作者认为 *Hsp70* 应答高温胁迫的调节作用机制可能一样。当高温胁迫时, 机体受到温度刺激造成某些功能蛋白受到抑制, 从而激活 *Hsp70* 基因, 并使其表达量快速大量上调以维持功能蛋白稳态, 一方面, 当 *Hsp70* 大量表达时受到自身的反馈抑制, 使其开始下调, 另一方面, 胁迫持续进行使机体长时间处于亚健康状态时, 超越了 *Hsp70* 维持机体功能蛋白稳态的限度, 各种生理功能开始受到影响, *Hsp70* 表达量出现下调。当然, 一个机体的响应调控是复杂多变的, 远远比作者所述的复杂, 但无论如何, *Hsp70* 对维持生物体抗胁迫动态平衡的作用十分重要, 其开发利用对高温地区紫菜栽培生产乃至各个领域都有不容忽视的现实意义。

参 考 文 献

- Bukau B, Horwich AL. The *Hsp70* and *Hsp60* chaperone machines. *Cell*, 2013, 92(3): 351-366
- Chen YT, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of two small heat shock protein (*sHsp*) genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 182-192 [陈玉婷, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜两种小分子热激蛋白(*sHsp*)基因的克隆及表达特征分析. 水产学报, 2015, 39(2): 182-192]
- Dai ZZ, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of two heat shock protein (*Hsp90*) genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 340-349 [待真真, 李兵, 徐燕, 等. 坛紫菜两种 *Hsp90* 基因的克隆及表达特征分析. 水产学报, 2014,

- 38(3): 340–349]
- Freeman LA. Cloning full-length transcripts and transcript variants using 5' and 3' RACE lipoproteins and cardiovascular disease. Humana Press, 2013: 3–17
- Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: A paradigm for the repartition of chaperone functions. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(4): 840–857
- Gu YH. Molecular cloning and expression analysis of heat-shock-protein 70 (HSP70) genes from *Gracilaria lemaneiformis* under heat shock. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011, 2–4 [顾颖慧. 龙须菜热激蛋白 70(HSP70)基因克隆及热激下的表达模式分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 2–4]
- Guy CL, Li QB. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 1998, 10(4): 539–556
- Han JY, Li J, Li JT, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1130–1138 [韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 2011, 35(8): 1130–1138]
- Ji DH, Li B, Xu Y, et al. Cloning and quantitative analysis of five heat shock protein 70 genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 499–509
- Lai XJ, Yan XJ, Yang R, et al. Digital gene expression profiling analysis of *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) under high temperature stress. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(6): 104–111 [赖晓娟, 严小军, 杨锐, 等. 高温胁迫下坛紫菜的数字基因表达谱研究. 海洋学报, 2014, 36(6): 104–111]
- Li B, Xu Y, Ji DH, et al. Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 104–110 [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 104–110]
- Li H, Li MZ, Cao J, et al. Effects of temperature on nitrogen uptake and growth in several species of macroalgae. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 159–165 [李恒, 李美珍, 曹婧, 等. 温度对几种大型海藻硝氮吸收及其生长的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 159–165]
- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, et al. Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 156–163]
- Liu W, Yang R, Xu LN, et al. Cloning and expression of *hsp70* for *Porphyra haitanensis*. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering)*, 2012, 25(2): 17–25 [刘伟, 杨锐, 徐丽宁, 等. 坛紫菜 *hsp70* 基因克隆与表达. 宁波大学学报(理工版), 2012, 25(2): 17–25]
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 670–684
- Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(10): 507–514
- Qi Y, Xu ZS, Li PS, et al. Research progress on molecular mechanism and application of HSP70 in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(3): 507–511 [齐妍, 徐兆师, 李盼松, 等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 507–511]
- Raha S, Merante F, Proteau G, et al. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Analysis Techniques*, 1990, 7(7): 173–177
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18(12): 571–573
- San C, Sunhee K, Sungoh I, et al. The heat shock protein 70a from *Pyropia seriata* increases heat tolerance in *Chlamydomonas*. *Plant Omics*, 2015, 8(4): 327–334
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, van Nieuwenhoven FA, et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews*, 2001, 81(4): 1461–1497
- Tang Q, Li S, Zhang H, et al. Correlation of the cyclin A expression level with porcine circovirus type 2 propagation efficiency. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2553–2560
- Tian L, Yang J, Hou W, et al. Molecular cloning and characterization of a P-glycoprotein from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11): 22891–22905
- Tisseres A, Mitchell AK. Some new proteins induced by temperature shock in *Drosophila*. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 84: 389–398
- Tseng CK, Chang TJ. On two new *Porphyra* from China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1978, 9(1): 76–83
- Wang YC, Li G, Pan GY, et al. Comparative study on the temperature adaptability of *Porphyra guangdongensis* and *P. haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 1982, 6(4): 307–312 [王永川, 李刚, 潘国瑛, 等. 广东紫菜和坛紫菜温度适应性的比较研究. 水产学报, 1982, 6(4): 307–312]
- Wang YC, Pan GY, Jiang FK, et al. On artificial cultivation of *Porphyra guangdongensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1978, 9(1): 85–88 [王永川, 潘国瑛, 蒋福康, 等. 广东紫菜的人工养殖试验. 海洋与湖沼, 1978, 9(1): 85–88]
- Wang YP, Jiang JD. The structure and function of heat shock protein 70. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(2): 305–313 [王宇萍, 蒋建东. 热休克蛋白 70 的结构和功能. 中国细胞生物学报, 2010, 32(2): 305–313]
- Wu R, Zhang JT, Zhao X, et al. Comparative the effect which Trizol method and RNA Fast1000 kit method has been used to extract the total RNA from the peripheral blood. *National*

- Medical Frontiers of China, 2011, 6(5): 60–61 [武荣, 张俊涛, 赵霞, 等. Trizol 与 RNA Fast1000 试剂盒提取外周抗凝血总 RNA 的方法比较. 中国医疗前沿, 2011, 6(5): 60–61]
- Zhang J, Wei XL, Chen LP, *et al.* Sequence analysis and expression differentiation of chemokine receptor CXCR4b among three populations of *Megalobrama amblycephala*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 195–201
- Zhang S, Wei J, Li J, *et al.* Immunohistochemical study of heat shock protein 70 in mouse endometrium during early pregnancy. *Chinese Journal of Anatomy*, 2002, 25: 21–24
- Zheng BF, Li J. *Flora Algarum Marinarum Sinicarum* (Tomus II Rhodophyta, No.1 Porphyridiales Erythropeltidales Goniotrichales Bandiales). Beijing: Science Press, 2009, 65–105 [郑宝福, 李钧. 中国海藻志(第二卷红藻门, 第1册紫球藻目, 红盾藻目, 角毛藻目, 红毛菜目). 北京: 科学出版社, 2009, 65–105]
- Zheng HY. The evolution of heat shock protein in algae and study on the *HSP70* gene from three species of *Pyropia* by cloning and expression. Master's Thesis of Shantou University, 2017, 60–63 [郑红妍. 藻类热激蛋白系统进化研究及三种紫菜 *HSP70* 基因的克隆及表达. 汕头大学硕士研究生学位论文, 2017, 60–63]
- Zhou XH, Li XS, Wang P, *et al.* Expression profiles of *HSP70* gene in gametophytic blade of laver *Porphyra yezoensis* ueda by high temperature stress. *Fisheries Science*, 2011, 30(4): 233–237 [周向红, 李信书, 王萍, 等. 高温胁迫下条斑紫菜叶状体 *HSP70* 基因的表达谱分析. 水产科学, 2011, 30(4): 233–237]

(编辑 冯小花)

The cDNA Cloning and Expression Analysis of the *Hsp70* Gene from *Pyropia guangdongensis*

ZENG Jun, CHEN Weizhou^①, CHEN Zepan, LIU Haoran

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063)

Abstract In order to explore the molecular mechanisms of the *Hsp70* gene in *Pyropia guangdongensis*, we have stimulated it with high temperature stresses. The aim was to provide technical references for the cultivation of *P. guangdongensis*. The full-length of *PgHsp70* was obtained by rapid amplification of cDNA ends technical (RACE). On this basis, the expression of *PgHsp70* with the different temperature (22°C, 27°C, and 31°C) stresses after 0, 1/6, 1/2, 1, 6, 12, 24, and 36 h were detected using quantitative real-time PCR. The results showed that the full-length cDNA of *PgHsp70* was 2004 bp, including an open reading frame (ORF) of 1866 bp, encoding a polypeptide of 621 amino acids. The molecular mass of the deduced amino acid sequence was 67.7 kDa, with an estimated pI of 4.87. The expression of the *PgHsp70*, as measured by qRT-PCR, can be significantly induced by high-temperature stress. The three kinds of expression profiles for *PgHsp70* were similar at different times, and all of them significantly increased first and then reached their maximum levels after one hour, and then dramatically decreased. Compared to the temperature stress of 22°C and 27°C, the expression of the *P. guangdongensis* with the 31°C temperature stress reached the highest level after being challenged for 1 h and was 11-fold higher than the normal. These results suggested that *PgHsp70* plays an essential role in response to high-temperature stresses.

Key words *Pyropia guangdongensis*; High temperature stress; *Hsp70*; Rapid amplification of cDNA ends (RACE); Quantitative real-time PCR

① Corresponding author: CHEN Weizhou, E-mail: wzchen@stu.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180710002

http://www.yykxjz.cn/

李杰, 牟宗娟, 杨慧超, 茅云翔, 阎永伟, 莫照兰. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病原菌的分离鉴定. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 140-146
Li J, Mou ZJ, Yang HC, Mao YX, Yan YW, Mo ZL. Isolation and identification the pathogen of *Pyropia yezoensis* green spot disease. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 140-146

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病 病原菌的分离鉴定*



李 杰¹ 牟宗娟^{1,2} 杨慧超^{1,3} 茅云翔² 阎永伟¹ 莫照兰^{1,3}①

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 绿斑病(Green spot disease)是一种常见的海区栽培条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)病害,在整个紫菜栽培期间都可能发生,以每年 11~12 月份最为严重,主要出现在幼叶期和成叶期。首先,在叶状体上出现红色或淡红色小斑,而后逐渐转变为绿色,病斑继续扩展,在叶状体表面形成若干孔洞,后期几乎整个藻体变绿。本研究对日照地区患绿斑病的条斑紫菜进行病原菌分离纯化,得到 5 株优势菌(编号为 Y1~Y5),人工回感实验结果显示, Y1 可以引起健康条斑紫菜发生绿斑病。对 Y1 进行了生理生化检测、16S rRNA、*dnaA* 和 *dnaN* 基因序列分析,确定病原菌为海洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)。对绿斑病的发病进程进行了观察,并检测了培养温度、海水比重和养殖密度等环境因子对绿斑病发生的影响,结果显示,高温和高密度养殖会加速绿斑病病情的发展,海水比重为 1.022 时,绿斑病发病较严重。本研究确定了一株引起条斑紫菜绿斑病的病原菌,并分析了部分理化因子对感染的影响,为条斑紫菜绿斑病的防控提供了基础数据。

关键词 条斑紫菜; 叶状体; 绿斑病; 海洋假交替单胞菌

中图分类号 S946.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0140-07

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)是大型潮间带藻类,自然分布较广,自辽宁至浙江,适合紫菜生长的岩礁海域均可发现其踪迹(曾呈奎等, 1985)。条斑紫菜的栽培主要集中在中国、日本和韩国,其味鲜美,含有丰富的必需氨基酸、维生素和矿物质,是中国两大紫菜栽培品种之一。

随着条斑紫菜栽培规模的扩大,密集栽培技术的发展,其病害问题表现越来越突出,严重影响紫菜的产量和商品质量。据不完全统计,条斑紫菜育苗和栽培过程中现已发现病害 16 种,已报道和发现的包括绿斑病、赤腐病、拟油壶菌病、丝状细菌症、癌肿病、缩曲症、黄斑病和色圈病等多种紫菜病害(Nakao *et al.*,

* 现代农业产业技术体系(CARS-50)、国家高技术研究发展计划(2012AA10A406)、国家科技基础条件平台建设运行项目(2018DKA30470)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50), National High-Tech R&D Program (2012AA10A406), National Science and Technology Infrastructure Platform Construction (2018DKA30470), and Aoshan Technology Innovation Program (2015ASKJ02)]

李 杰, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-07-10, 收修改稿日期: 2018-07-30

1972; Fujita, 1973; Lin *et al*, 1984; 陈秋萍等, 1991; 马家海, 1992、1996; 马家海等, 1999; 闫咏等, 2002)。紫菜的病害是由多方面原因引起的, 致病机理非常复杂, 微生物是不可忽视的重要因素之一。本研究针对山东省日照地区条斑紫菜叶状体绿斑病, 开展了病原分离鉴定、致病性检测、发病进程及环境因子影响等一系列研究, 旨在探明绿斑病的病因和病理, 并为该病的防治提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验用条斑紫菜

患绿斑病条斑紫菜于2010年11月采自山东省日照岚山海区条斑紫菜养殖场, 水温为18℃; 健康条斑紫菜采自山东省青岛汇泉湾以及团岛, 养殖于PES海藻培养基中(马家海, 1996)。

1.2 细菌分离

选择症状明显的条斑紫菜叶状体, 无菌海水漂洗数次, 剪取病斑藻段、匀浆, 用无菌海水梯度稀释匀浆液, 涂布2216E海水培养基于28℃培养5d, 挑取菌落形态一致的优势菌, 采用15%的甘油保种、保存于-80℃冰箱备用。

1.3 人工感染

挑选颜色正常的健康条斑紫菜叶状体, 除去藻体表面杂质, 置于0.7% KI溶液中浸泡15 min(方文雅, 2010), 用灭菌海水冲洗后用于回感实验。

将分离得到的疑似病原菌在2216E液体培养基中培养过夜, 离心收集菌体, 用灭菌PES-海水冲洗3次后重悬。吸取一定量菌悬液加到灭菌PES-海水中, 制备细菌终浓度为 10^8 和 10^7 CFU/ml的PES-海水, 以灭菌PES-海水作为阴性对照。每个浓度感染5片紫菜叶状体, 培养温度为15℃, 光照周期L:D=12:12(h), 光强为 $62.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ (5000 lx)。每个感染组和对照组设置3个平行, 观察紫菜叶状体的病理发展过程, 实验结束时, 选择具有病症的紫菜进行细菌分离鉴定, 以确证病原菌。

1.4 病原菌鉴定

采用革兰氏染色法对细菌进行染色, 镜检; 采用Vitek 2-GN和API-ID32E生理生化检测试剂盒(生物梅里埃公司, 法国), 参照产品使用说明书对病原菌进行生理生化特征测定; 利用16S rRNA基因引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-

CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), PCR扩增Y1 16S rRNA基因序列; 根据NCBI中20余种假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)的*dnaA*和*dnaN*基因序列, 通过BioEdit软件对比序列分析, 选择保守区设计2对简并引物*dnaAF*(5'-GTGTATYTGTCGGTTTGGC-3')、*dnaAR*(5'-TNARYTCTTTWGAYARHGCC-3')和*dnaNF*(5'-CCDYTRRTRCARGTDTCDGGYGC-3')、*dnaNR*(5'-AYARDCGCATHGGCATSACNAC-3'), PCR扩增Y1 *dnaA*和*dnaN*基因片段, 片段长度分别为1301和1124 bp, PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 35个循环, 72℃延伸7 min。将扩增得到的PCR产物送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序, 获得的序列信息在GenBank中用Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比较, 利用MEGA 5.0软件, 采用邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

1.5 环境因子对感染的影响

培养温度分别设置为8℃、15℃、18℃和22℃, 检测温度对绿斑病发病的影响; 条斑紫菜密度分别设置为0.05 g/100 ml、0.1 g/100 ml和0.2 g/100 ml, 检测紫菜养殖密度对绿斑病发病的影响; 用无菌超纯水调节海水比重为1.019、1.022和1.025(相对应的海水盐度分别为24.5、29.1和32.7), 检测海水比重对绿斑病发病的影响。每个实验组设置3个平行, 除变化的环境因子, 其他培养条件: 温度为18℃、密度为0.1 g/100 ml, 海水比重为1.022。实验组分别加入终浓度为 10^8 CFU/ml的病原菌, 对照组在同样条件下不加入病原菌培养。观察叶片的变化, 并计算感染1周后病烂部分面积所占整个叶片面积的百分比和培养体系中细菌数量的变化。

2 结果与分析

2.1 绿斑病及细菌分离

条斑紫菜绿斑病发病部位多位于叶状体的中部和边缘, 初期发病紫菜叶片出现红色小点, 扩大后逐渐转变成灰绿色, 在叶状体表面形成若干孔洞, 叶片腐烂变绿(图1A)。在2216E培养基上共分离得到5株优势菌, 分别编号为Y1、Y2、Y3、Y4和Y5。

2.2 人工感染

菌株Y1感染紫菜可以产生明显绿斑病症状(图1B), Y2、Y3、Y4和Y5各个浓度梯度感染的条斑

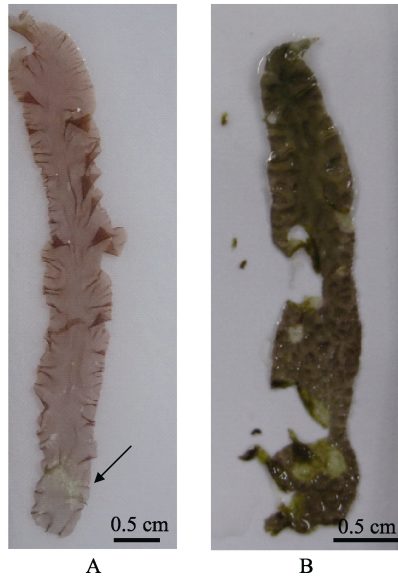


图1 海区自然发病条斑紫菜(A)和人工感染发病条斑紫菜(B)

Fig.1 Naturally infected *P. yezoensis* (A) in the sea area and experimentally infected *P. yezoensis*(B)

紫菜均未观察到发病。Y1菌株 10^8 CFU/ml感染组紫菜在培养2 d后出现病症, 10^7 CFU/ml感染组在10 d出现病症。显微镜观察可见, 在病斑形成位置, 最初单个紫菜细胞发生明显变化, 原生质浓缩, 颜色由正常的紫褐色变为紫红色, 细胞形状变成不规则状(图2A),

进一步周围的细胞渐渐失去细胞正常结构(图2B), 后期以这些病变细胞为中心, 呈放射状蔓延(图2C), 边缘的细胞颜色渐渐变绿并最终形成肉眼可见的病斑(图2D)。条斑紫菜叶状体病变部分与健康部分区别明显, 且病变部分细胞由于颜色不同可以清晰地分为多个不同状态的细胞层(图2E、图2F)。

2.3 病原菌的鉴定

革兰氏染色结果显示, Y1 属于革兰氏阴性短杆菌。Vitek 2 GN 鉴定结果显示, 其丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶(APPA)、 β -半乳糖苷酶(β -GAL)、脂酶(LIP)、酪氨酸芳胺酶(TyrA)、 α -半乳糖苷酶(α -GAL)、磷酸酶(PHOS)以及 ELLM 反应为阳性, 其他均为阴性。经 ID-32E 鉴定, α -葡萄糖(α -GLU)、 α -麦芽糖苷酶(α -MAL)和 L-天门冬素芳胺酶(ASPA)反应为阳性, 其他反应为阴性。ATB 系统分析结果显示, Y1 为假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)。

对Y1的16S rRNA、*dnaA*和*dnaN*基因进行扩增测序和GenBank比对, 并构建系统发育进化树, 结果显示, Y1 的基因序列与海洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)相似度均为99%~100%, 且系统进化树与海洋假交替单胞菌聚为一支(图3), 表明Y1与海洋假交替单胞菌进化关系最为相近,

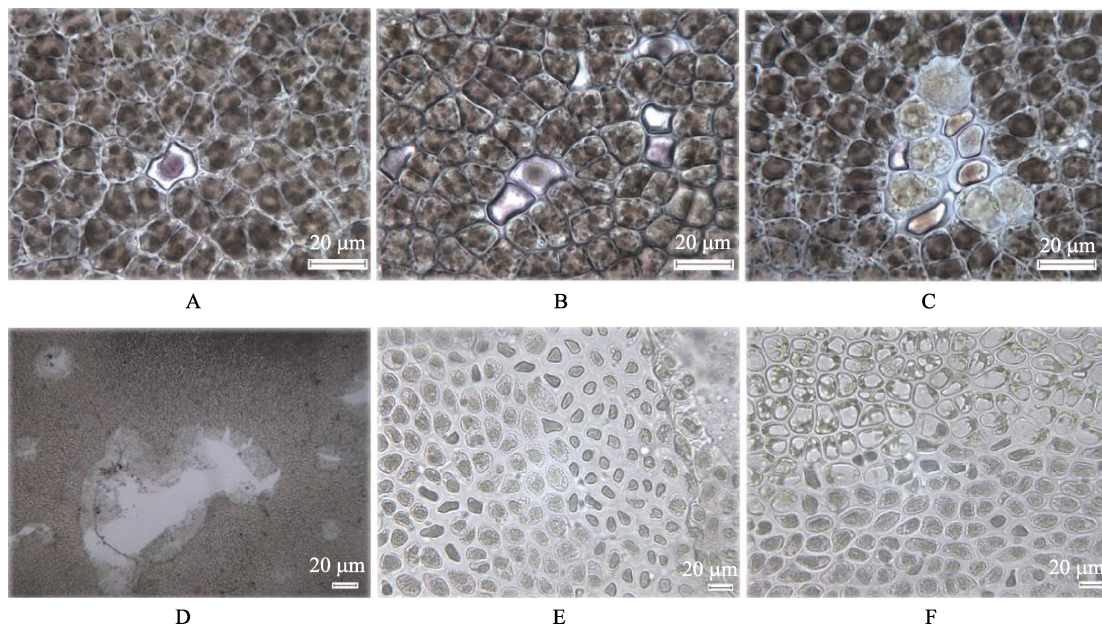


图2 人工感染条斑紫菜

Fig.2 Experimentally infected *P. yezoensis*

A: 单个紫菜细胞浓缩变色; B: 多个紫菜细胞浓缩变色; C: 初期形成的绿斑; D: 叶片破碎形成孔洞; E和F: 绿斑和正常细胞交界处细胞质颗粒降解的细胞层

A: Concentration and discoloration of *Porphyra* single cell; B: Concentration and discoloration of *Porphyra* cells; C: Early stage of green spot disease; D: Holes on laver; E and F: Cytoplasmic granules degradation at the junction of diseased and normal cells

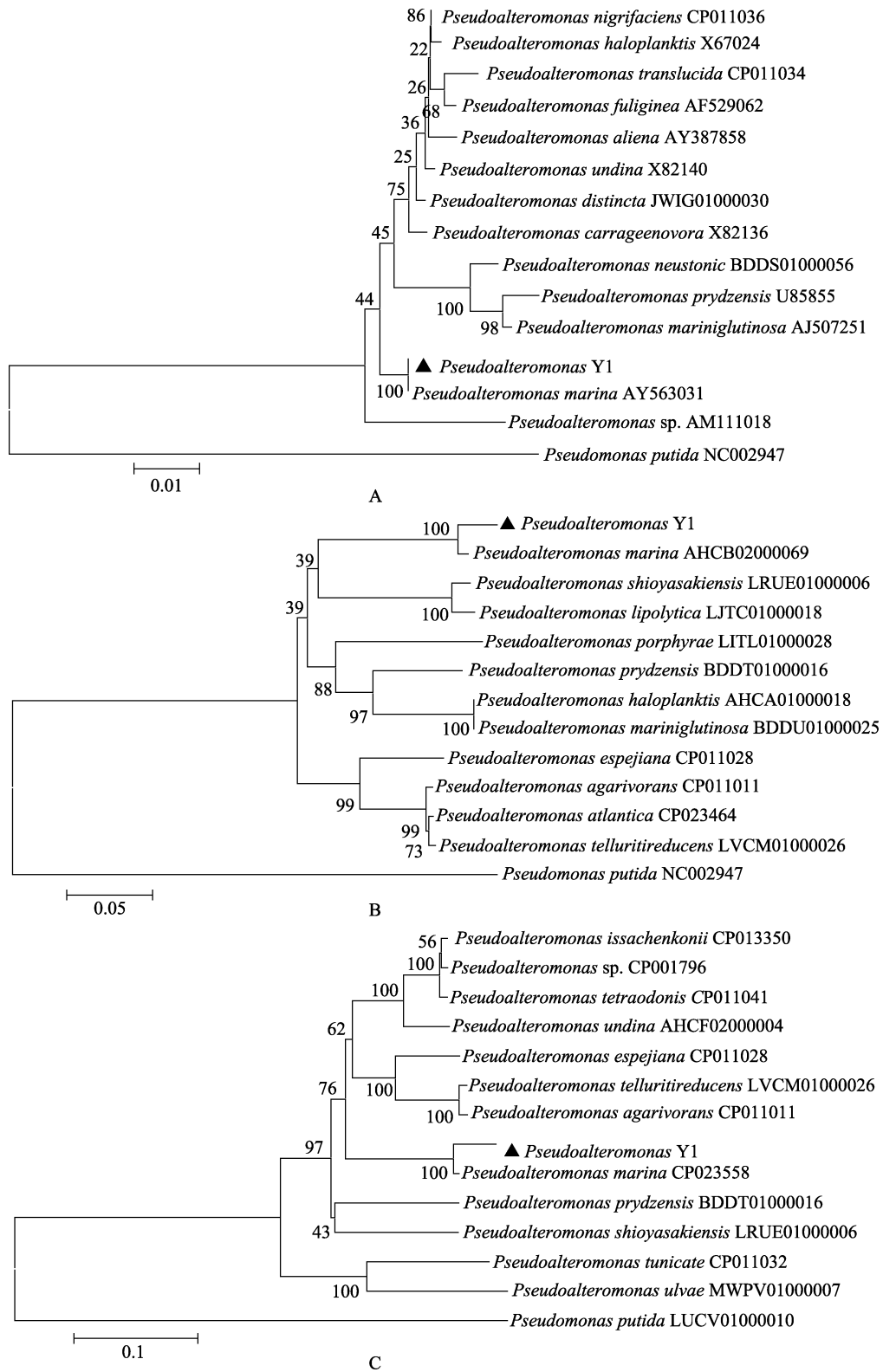


图 3 Y1 系统进化发育分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of strain Y1

A: 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树; B: 基于 *dnaA* 序列构建的系统发育进化树;

C: 基于 *dnaN* 序列构建的系统发育进化树

A: Phylogenetic tree constructed for isolates based on 16S rRNA gene sequences; B: Phylogenetic tree constructed for isolates based on *dnaA* sequences; C: Phylogenetic tree constructed for isolates based on *dnaN* sequences

确定引起此次条斑紫菜绿斑病的病原为海洋假交替单胞菌。

2.4 环境因子对感染的影响

设置4个不同的感染温度,检测了温度对条斑紫菜绿斑病发病的影响。结果显示,在感染温度为18℃时,条斑紫菜发病最快,感染36 h后,可观察到红色斑点;感染温度为15℃和22℃时,感染48 h后出现症状;感染温度为8℃时发病较慢,感染72 h后出现1~2个很小的斑点。除22℃高温组,各组的对照组在整个实验过程中未观察到明显病烂症状。感染培养7 d后,除8℃组仅有几个斑点外,其余各实验组叶状体均可见多个病烂区,并伴有组织脱落。各实验组叶状体病烂部分面积所占总面积的比例如图4A所示,当感染温度为22℃时,叶状体病烂最严重,几乎看不到正常的叶片部分。

设置3个不同的养殖密度,检测了密度对条斑紫

菜绿斑病发病的影响。低密度条件下病烂部分最少,随着养殖密度的增大,病烂程度有所加剧。感染72 h后,0.2 g/100 ml组出现多个明显的病斑,0.1 g/100 ml组仅出现1~2个病斑,0.05 g/100 ml组没有出现病斑。感染7 d后,各组都出现严重病烂。经计算,各实验组叶状体病烂部分面积所占总面积的比例如图4B所示,0.05 g/100 ml实验组病烂面积最小,约45%的叶片出现病烂;0.1 g/100 ml组与0.2 g/100 ml组病烂面积较大,超过60%的叶片出现病烂。

设置3个不同比重的海水,检测海水比重对条斑紫菜绿斑病发病的影响。正常海水比重组叶状体(1.022)在感染2 d后出现红色斑点,7 d后明显病烂;低海水比重组(1.019)和高海水比重组(1.025)分别在感染4 d和5 d之后,出现红色斑点,且发生病烂的面积较小。7 d后,各实验组叶状体病烂部分面积所占总面积的比例如图4C所示,1.019低海水比重组和1.025高海水比重组海水都能一定程度上延缓病情的发展。

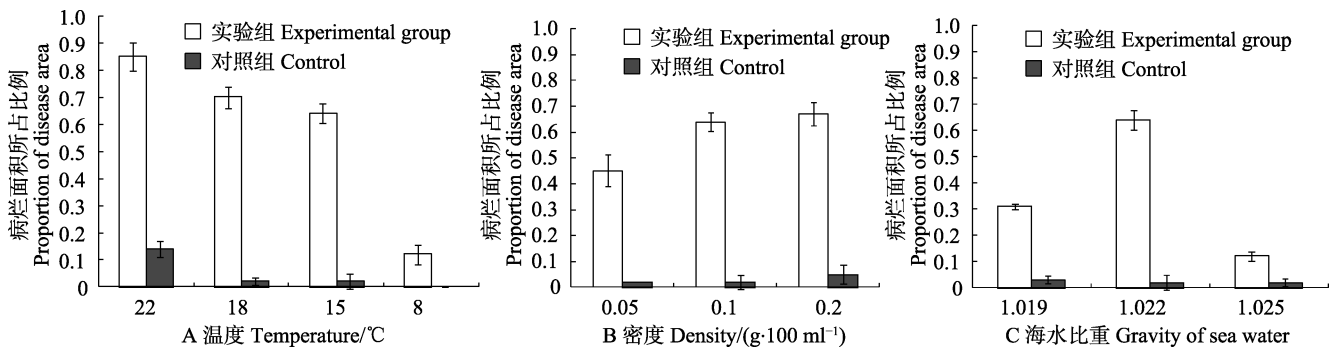


图4 环境因子对条斑紫菜绿斑病发病的影响

Fig.4 Effects of environmental factors on green spot disease of *P. yezoensis*

3 讨论

绿斑病是紫菜栽培过程中的常见疾病,在整个紫菜栽培期都可能发生,但以每年11、12月份最为严重(丁怀宇,2008)。绿斑病多发生于栽培密度较大的海区,尤其是在高温后极易发生,病变的部位不定,在条斑紫菜叶状体的梢部、中部、基部、中央和边缘部位均可出现病斑。绿斑病一旦发生,传染的速度极快,病斑可在短时间内连成一片,并迅速变绿,在适宜条件下,藻体1周即可全部溃烂,严重时,网帘上紫菜完全脱落。绿斑病会使紫菜表面粗糙、无光泽,影响其商品价值。2013~2014年,韩国舒川郡紫菜养殖场绿斑病爆发造成110万美元的损失,相当于总销售额的10.7%(Kim *et al.*, 2014)。

1968年绿斑病在日本首次发现,其病原较为广泛,从患病紫菜中可以分离出微球菌(*Micrococcus*

sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)以及弧菌(*Vibrio sp.*)(Nakao *et al.*, 1972),中国已报道柠檬假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas citrea*)引起的条斑紫菜绿斑病(闫咏等,2002),本实验室在前期研究中发现弧菌也可以引起坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)绿斑病(韩晓娟等,2015)。目前报道的绿斑病病原菌大部分具有较强的胞外酶活性,这些胞外酶导致的宿主损伤可能是引起紫菜叶片绿斑的重要原因。近年来研究发现,叶绿体病毒(*Chloroplast virus*)也可以引起条斑紫菜绿斑病的发生(Kim *et al.*, 2016)。

绿斑病只是一种表现特征,多种因素造成的藻体破坏、藻红素溶出,均可呈现绿斑病症状。海水温度异常升高、降雨或有机质污染引起藻体代谢失常都可能引起紫菜绿斑病(Gachon *et al.*, 2010),但环境胁迫条件下导致的附生微生物菌群失控是引起紫菜病烂的主要因素(Egan *et al.*, 2016)。通过环境因子实验结

果,发现高温、高密度养殖是引起紫菜绿斑病发生的主要因子,而海水比重的变化在一定程度上可以减缓病烂速度,这也与海区栽培情况相印证。每年11、12月份,海区紫菜进入快速生长期,此时网帘上紫菜密度较大,为致病菌提供了丰富的营养和良好的环境。在正常养殖条件下,条件致病菌数量一般维持在一定范围内,不具备致病力。当出现升温或降雨等环境变化,条件致病菌的致病性可能增强,造成紫菜绿斑病的发生。合理控制养殖密度,及时疏苗,密切注意水温等气象环境的变化,充足的干出以改变紫菜表面海水比重等方法可以有效抑制绿斑病的发生。

本研究通过人工回接感染实验、细菌生理生化和基因序列分析,发现海洋假交替单胞菌可以引起条斑紫菜的绿斑病,养殖密度、温度和海水比重等环境因子会影响绿斑病的发病进程,其具体感染和致病机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- Chen QP, Jiang ZX. A preliminary analysis of the causes of extensive rotting from diseases of *P. haitanensis* in Tong Tou prefecture. *Journal of Zhejiang College of Fisheries*, 1991, 10(2): 144–148 [陈秋萍, 江最新. 洞头县坛紫菜大面积病烂原因分析. *浙江水产学院学报*, 1991, 10(2): 144–148]
- Ding HY. Study on development process of green-spot disease in *Porphyra yezoensis*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(11): 4626–4628 [丁怀宇. 条斑紫菜绿斑病发病进程研究. *安徽农业科学*, 2008, 36(11): 4626–4628]
- Egan S, Gardiner M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(505): 991
- Fang WY. Preliminary study of the platform to study the interaction of *Porphyra* spp. and their phycospheres. Master's Thesis of Ningbo University, 2010 [方文雅. 紫菜与藻际微生物互作研究平台的初步研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Fujita Y. Maceration of laver frond by enzymes of bacteria causing green spot rotting-like deterioration. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1973, 39(8): 911–915
- Gachon CM, Sime-Ngando T, Strittmatter M, et al. Algal diseases: Spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(11): 633–640
- Han XJ, Mao YX, Li J, et al. Identification and pathogenicity of a pathogen causing green rot disease in *Porphyra haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1721–1729 [韩晓娟, 茅云翔, 李杰, 等. 一株引起坛紫菜绿斑病原的分离鉴定及致病性研究. *水产学报*, 2015, 39(11): 1721–1729]
- Kim GH, Klochkova TA, Lee DJ, et al. Chloroplast virus causes green-spot disease in cultivated *Pyropia* of Korea. *Algal Research*, 2016, 17: 293–299
- Kim GH, Moon KH, Kim JY, et al. A reevaluation of algal diseases in Korean *Pyropia* (*Porphyra*) sea farms and their economic impact. *Algae*, 2014, 29(4): 249–265
- Lin DH, Lin YS. Studies on the green disease of *Porphyra haitanensis* Chang & Zheng caused by nitrogen deficiency. *Hydrobiologia*, 1984, 116–117(1): 453–455
- Ma JH, Zhang LM, Ji CL, et al. Studies on crape disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(2): 82–88 [马家海, 张礼明, 吉传礼, 等. 条斑紫菜缩曲症的研究. *中国水产科学*, 1999, 6(2): 82–88]
- Ma JH. A preliminary study on the red rot disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Shanghai Fisheries Univeristy*, 1996, 5(1): 1–7 [马家海. 条斑紫菜赤腐病的初步研究. *上海水产大学学报*, 1996, 5(1): 1–7]
- Ma JH. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu. *Journal of Shanghai Fisheries Univeristy*, 1992, 1(3–4): 185–188 [马家海. 江苏省南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究. *上海水产大学学报*, 1992, 1(3–4): 185–188]
- Nakao Y, Onohara T, Matsubara T, et al. Bacteriological studies on diseases of cultured laver-I: Green spot rotting-like deterioration of laver frond by bacteria, *in vitro*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1972, 38(6): 561–564
- Yan Y, Ma JH, Xu P, et al. *Pseudoalteromonas citrea*, the causative agent of green-spot disease of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 353–358 [闫咏, 马家海, 许璞, 等. 1株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 353–358]
- Zeng CK, Wang SJ, Liu SJ, et al. *Marine algae culture science*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publisher, 1985 [曾呈奎, 王素娟, 刘思俭. 海藻栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985]

Isolation and Identification the Pathogen of *Pyropia yezoensis* Green Spot Disease

LI Jie¹, MOU Zongjuan^{1,2}, YANG Huichao^{1,3}, MAO Yunxiang², YAN Yongwei¹, MO Zhaolan^{1,3}①

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003;

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

Abstract Green spot disease is one of the major disease considerations in the farming of *Pyropia yezoensis*. Green spot disease could be found in all the periods of thallus, and outbreaks usually occur in November and December. At the start of infection, small light red spots could be found on the thallus, and then the spots gradually turned green and expanded quickly. Holes from lesions formed later in the surface of thallus. At last, the entire thallus became green and fell off. In this research, bacteria strains were isolated from *P. yezoensis* with green spot disease farmed in Rizhao. Experimental infection showed that the strain Y1 could cause *P. yezoensis* green spot disease. Biochemical characterization and genes analysis of 16S rRNA, *dnaA* and *dnaN* indicated that the pathogen Y1 was *Pseudoalteromonas marina*. Influence of environmental factors on the outbreak of disease were also characterized by experimental infection with different temperature, stocking density and gravity of sea water. The results showed that higher temperature and stocking density will accelerate the spread of the disease, but gravity of sea water within a certain range did not affect the occurrence of the disease. In this study, we described the green spot disease caused by *P. marina*, which provides information for disease control in *P. yezoensis* cultivation.

Key words *Pyropia yezoensis*; Thallus; Green spot disease; *Pseudoalteromonas marina*

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180531001

http://www.yykxjz.cn/

毛磊磊, 鄢庆枇, 黄力行, 张梅梅, 王素云, 张萌萌, 覃映雪. *luxR* 基因调控嗜水气单胞菌耐药性的分子机制初探. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 147–155

Mao LL, Yan QP, Huang LX, Zhang MM, Wang SY, Zhang MM, Qin YX. Molecular mechanism of *luxR* regulation of drug resistance of *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 147–155

luxR 基因调控嗜水气单胞菌耐药性的 分子机制初探*



毛磊磊 鄢庆枇 黄力行 张梅梅 王素云 张萌萌 覃映雪^①

(农业农村部东海海水健康养殖重点实验室 集美大学水产学院 厦门 361021)

摘要 LuxR 家族蛋白是一类在革兰氏阴性细菌中发挥重要作用的调控蛋白, 参与细菌多项重要生理活动。采用 RNAi 技术构建嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) *luxR*₀₅₇₃₅ 稳定沉默菌株 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi, 并利用 qRT-PCR 检测基因沉默效果。结果显示, 与野生株相比, 沉默株中 *luxR*₀₅₇₃₅ 的表达量降低了 96.8%。药物敏感性实验表明, 与野生株相比, *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 对庆大霉素、诺氟沙星、卡那霉素、吡哌酸的耐药性显著降低。对野生株与沉默株 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 的转录组数据进行分析发现, 表达差异显著的基因共有 1286 个, 其中, 上调基因 353 个, 下调基因 933 个; 显著富集的通路 4 条, 分别是核糖体通路、精氨酸生物合成通路、硫代谢通路、硒化合物代谢通路; 在这 4 条通路中可能与嗜水气单胞菌耐药性相关的重要功能基因包括 *metE*、*glnA*、*rplB*、*rplX*、*rpsA*、*rpsJ* 等, 这些功能基因编码的蛋白主要与细菌的生物成膜及核糖体蛋白合成相关。综合以上研究结果, 可以推测嗜水气单胞菌的 *luxR*₀₅₇₃₅ 通过调控细菌的生物膜形成相关基因及核糖体蛋白相关基因的表达, 从而调控细菌对药物的耐受性。

关键词 嗜水气单胞菌; LuxR 调控蛋白; 耐药; 转录组

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0147-09

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)隶属气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*), 是一种革兰氏阴性短杆菌(邵光富等, 2013), 是近年来淡水养殖动物的主要病原菌之一(张国亮等, 2016; 秦莉等, 2014)。目前, 水产业中防治嗜水气单胞菌引发的病害主要还是依靠抗生素, 然而, 由于抗生素的使用方法不科学不规范, 导致嗜水气单胞菌耐药菌株大量出现(Del Castillo *et al*, 2013)。如李绍戊等(2013)检测 28 株鱼源嗜水气单胞菌对 18 种抗生素的耐药性, 结果表明, 分离到的鱼源嗜水气单胞菌呈多重耐

药性, 对氯霉素类和四环素类的耐药率超过 60%, 对氨基糖苷类的耐药率为 28.6%~53.6%。方一风等(2014)检测 23 株嗜水气单胞菌的耐药性, 结果显示, 31.9% 的嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药。耐药性菌株的出现导致嗜水气单胞菌引发的水产动物疾病更难以控制, 因此, 阐明嗜水气单胞菌的耐药机制成为防控嗜水气单胞菌的关键。

LuxR 家族调控蛋白是革兰氏阴性细菌最重要的调控因子之一, 对其重要性的认识始于该蛋白在细菌群体感应信号系统中的枢纽作用(Fuqua *et al*, 1994;

* 国家自然科学基金(31502194)和福建省自然科学基金(2017J01451)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31502194), and Natural Science Foundation of Fujian Province of China (2017J01451)]

毛磊磊, E-mail: 865014883@qq.com

① 通讯作者: 覃映雪, 教授, E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-31, 收修改稿日期: 2018-07-05

Zeng *et al.*, 2011)。随着研究的深入, 越来越多细菌 LuxR 家族调控蛋白被发现和鉴定, 研究证实, 该蛋白家族除了参与细菌群感应系统调控外, 还在细菌胞外酶合成、致病性、抗药性等多个生物学过程中扮演极其关键的角色(Malott *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2014)。

本研究在前期研究的基础上, 采用 RNAi 技术研究分离自鳗鲡(*Anguilla* spp.)的病原性嗜水气单胞菌 B11 菌株的 *luxR*₀₅₇₃₅ 对该菌耐药性的影响, 并结合转录组分析, 探讨嗜水气单胞菌耐药的分子机制, 为防控嗜水气单胞菌引发的病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基 37℃ 条件下培养, 嗜水气单胞菌在 TSB 培养基 28℃ 条件下培养。各菌株培养根据需要加入相应抗生素, 抗生素浓度为链霉素(Sm) 100 μg/ml, 氯霉素(Cm) 34 μg/ml。在转录组测序时为避免抗生素对转录组数据造成影响, 对嗜水气单胞菌 B11 菌株和 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株进行培养时均不使用抗生素。菌株基因型和/或表形特性见表 1。

表 1 实验菌株和质粒
Tab.1 Experimental strains and plasmids

菌株或质粒 Strain or plasmid	基因型和/或表形 Genotype and/or phenotype	来源 Source
质粒 Plasmid		
pACYC184	氯霉素、四环素抗性(Cm ^r Tc ^r)	由聂品教授提供 Provided by Prof. Nie Pin
pACYC184-luxR	pACYC184 衍生物, 包含一个靶向 LuxR mRNA 和 orf(Cm ^r)的编码区的 60 bp 短发夹 RNA 序列 pACYC184 derived, containing 60 bp fragment of short-hairpin RNA sequence targeting the coding region of LuxR mRNA and ORF (Cm ^r)	本研究 This study
菌株 Strain		
B11	嗜水气单胞菌野生型菌株(链霉素抗性) <i>A. hydrophila</i> wild-type strain (Sm ^r)	本研究 This study
<i>luxR</i> ₀₅₇₃₅ -RNAi	以具有链霉素和氯霉素抗性的 shRNA 沉默 <i>luxR</i> ₀₅₇₃₅ 基因 <i>luxR</i> ₀₅₇₃₅ was silenced by shRNA (Sm ^r , Cm ^r)	本研究 This study
DH5α	F ⁻ , φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TaKaRa

1.2 基因稳定沉默株的构建和鉴定

参考 Darsigny 等(2010)的方法, 首先从大肠杆菌中提取 pACYC184 质粒, 并用 *Bam*H I 和 *Sph* I 将 pACYC184 酶切、回收, 回收产物与携带相同酶切位点粘末端的小干扰 RNA(表 2)连接, 构建重组质粒 pACYC-LuxR。然后, 将重组质粒热击转化入 DH5α 感受态细胞中, 在氯霉素抗性平板(34 μg/ml)上筛选阳性单克隆, 将阳性单克隆送测序公司测序。测序正确的

重组质粒电击转化入嗜水气单胞菌野生株 B11, 构建嗜水气单胞菌 *luxR*₀₅₇₃₅ 稳定沉默菌株 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi。

1.3 qRT-PCR

B11 和 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株培养至对数生长期, 收集菌体提取 RNA, 测定其浓度, 电泳检测后进行反转录, 以 B11 菌株作为对照, 选取稳定表达的 16S rRNA 基因作为内参, 进行 qRT-PCR, 具体引物序列见表 3。反转录和荧光定量 PCR 过程严格按照试剂盒

表 2 稳定基因沉默的 shRNA 序列
Tab.2 shRNA sequence for stable gene silence

目的基因 Target gene	稳定基因沉默的 shRNA 序列 shRNA sequence for stable gene silence
<i>luxR</i> ₀₅₇₃₅	F: 5'GATCCACCTCGGAAGATGCGGTGGATTCAAGAGATCCACCGCATCTTCCGAGGTTTTTTTGCATG 3' R:5'CAAAAAAACCTCGGAAGATGCGGTGGATCTCTTGAATCCACCGCATCTTCCGAGGTG3'

表3 qRT-PCR引物
Tab.3 Primers for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>luxR</i> ₀₅₇₃₅	F:5'-CATGCTCGGCGTCTGGATGC-3' R:5'-GCTCGCACCCTCGAACATCA-3'
16S rRNA	F:5'-TAATACCGCATACGCCCTAC-3' R:5'-GGACCGTGTCTCAGTTCCAG-3'

说明书进行操作。qRT-PCR反应体系为10 μl: q-PCR Mix 5 μl、ddH₂O 4 μl、cDNA模版0.5 μl、上、下游引物各0.25 μl。PCR反应条件: 95℃预变性10 min; 95℃变性20 s, 58℃退火20 s, 72℃延伸20 s, 40个循环。

1.4 耐药实验

参考王印庚等(2012)的方法,将固体培养基倒入玻璃平板一层,使培养基覆盖玻璃平板底部即可,待凝固后放入牛津杯,然后倒入第2层培养基,约占整个平板高度的2/3,等到冷却凝固后取出牛津杯,即为打孔培养基。向小孔内分别加入100 μl药物(药物浓度参照美国CLSI的抗微生物药物敏感性实验操作方法和判断标准),向小孔周围的平板上加200 μl菌液,并用无菌棉签涂满小孔周围的平板。处理完后,在28℃培养箱内培养16 h。

1.5 转录组分析

从菌液(每个样本3个重复)中提取总RNA,采用NanoDrop 2000检测提取的RNA浓度和纯度,然后利用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,并利用Agilent2100测定RIN值。单次建库要求RNA总量为2 μg,浓度≥100 ng/μl,OD_{260 nm/280 nm}介于1.8~2.2之间。然后,以TruSeq™ Stranded Total RNA Library Prep Kit试剂构建文库,在合成cDNA第2链的dNTPs试剂中用dUTP代替dTTP,从而使cDNA第2链中碱基包含A/U/C/G。在PCR扩增前,用UNG酶把cDNA第2链消化,就使文库中仅包含cDNA第1链。之后,交上海美吉公司采用Illumina HiSeq进行转录组测序。为保证后续的生物信息分析的准确性,首先对原始测序数据进行过滤,去除原始测序数据中包含的测序接头序列、低质量读段、N率较高序列及长度过短序列,从而得到高质量的测序数据(Clean data)。使用Bowtie软件将质控后得到的高质量序列与指定的参考基因组比对。筛选差异表达基因(在实验组与对照组之间RNA水平的表达有显著性差异的基因。差异基因的筛选条件为, $P \leq 0.05$, $|\log FC| \geq 1$,即校正后 $P \leq 0.05$,差异倍

数大于2倍的基因认为差异显著)。针对2组的差异表达基因进行GO注释的统计,以其中一个样本为对照,可以统计出具有某个功能的基因列表及基因数目。再对差异基因进行GO功能显著性富集分析,以说明差异基因的功能富集情况,在基因功能水平阐明样本间的差异。最后,使用KOBAS软件进行KEGG Pathway富集分析,其计算原理与GO功能富集分析相同,并使用Fisher精确检验进行计算。为了控制计算假阳性率,采用BH(FDR)方法进行多重检验,经过校正的P值(Corrected P-value)把0.05设为阈值,满足这一条件的通路定义为在差异表达基因中显著富集的KEGG通路。

2 结果

2.1 *luxR*₀₅₇₃₅ 沉默效果

从图1可以看出,与野生株B11相比,*luxR*₀₅₇₃₅被稳定沉默后,基因的表达水平降低了96.8%,证实已成功构建稳定沉默株*luxR*₀₅₇₃₅-RNAi,可用于后续研究。

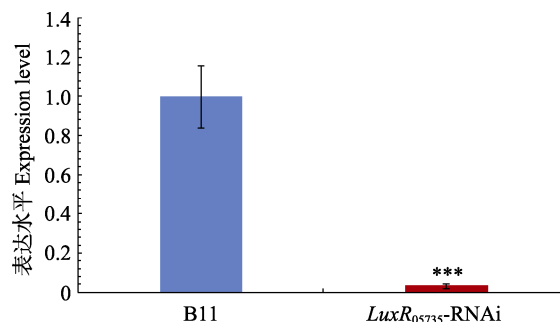


图1 *luxR*₀₅₇₃₅的沉默效果

Fig.1 Silence effects of *luxR*₀₅₇₃₅

***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $0.01 < P < 0.05$

下同 The same as beowl

2.2 野生株和沉默株的药物敏感性实验

如图2所示,与B11菌株相比,*luxR*₀₅₇₃₅-RNAi菌株对庆大霉素的耐药性减弱了约28.45%,对诺氟沙星的耐药性减弱了约4.22%,对卡那霉素的耐药性减弱了约44.25%,对吡哌酸的耐药性减弱了约6.23%,均具有显著差异。而对四环素的耐药性减弱了约1.83%、对强力霉素的耐药性减弱了约1.49%、对氟苯尼考的耐药性减弱了约1.75%,且均无显著差异。

2.3 野生株和沉默株的转录组分析

以基因库中标准菌株嗜水气单胞菌亚种 ATCC

7966 的基因组(Accession number CP000462)为参考,使用 Bowtie 软件将质控后得到的高质量序列与参考基因组比对(图 3),由图 3 可知,2 个菌株样品分别获得 20771885 和 23017733 条 Reads,占总读数的 81.61%和 80.41%,2 个菌株样品的 Reads 与参考基因组的比对效率较高。

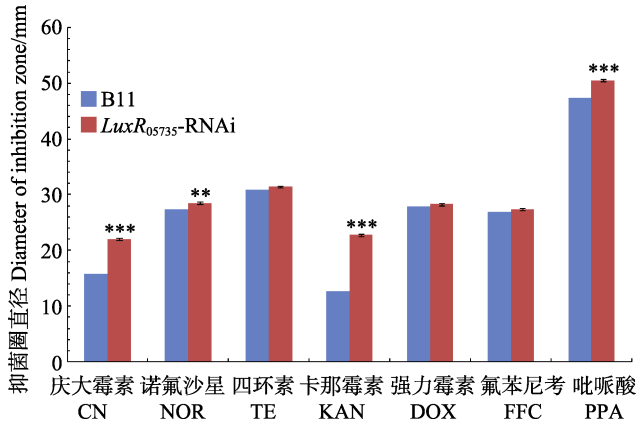


图 2 B11 菌株和 luxR05735-RNAi 菌株对抗生素的耐药性
Fig.2 Antibiotic resistance of B11 and luxR05735-RNAi strains

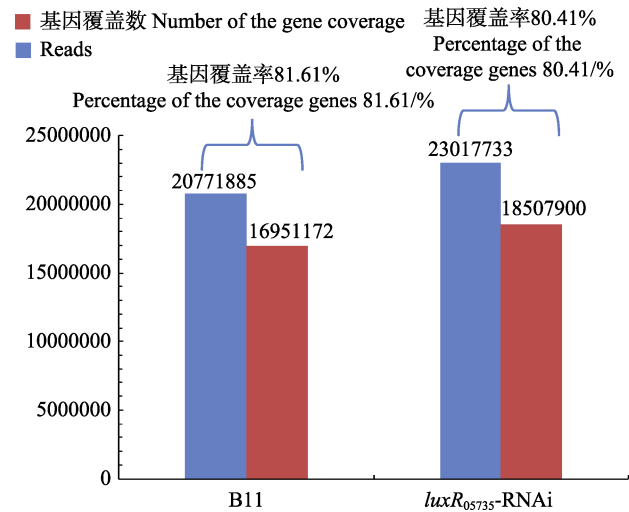


图 3 测序数据评估统计
Fig.3 Statistic assessment of sequencing data

2.4 差异表达基因数量统计分析及功能分类

2.4.1 差异表达基因数量统计分析 通过对B11菌株和luxR05735-RNAi菌株的数据进行标准化处理,使用edgeR软件进行差异分析。将B11菌株和luxR05735-RNAi菌株的数据进行比较(图4)。由图4可知,差异显著的基因共有1286个,其中,上调基因353个,下调基因933个。

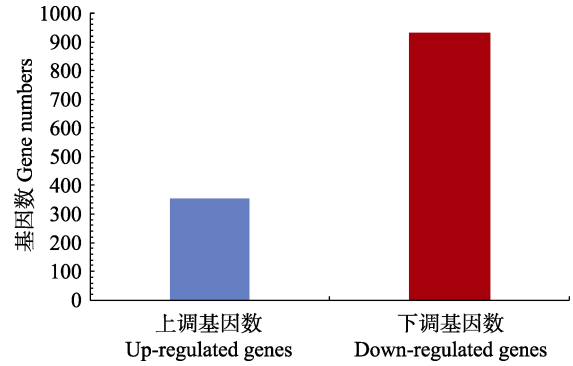


图 4 差异表达基因统计
Fig.4 Statistics analysis of differentially expressed genes

2.4.2 差异基因功能分类 利用 GO 数据库,可将基因按照其参与的生物学过程、构成细胞的组分、实现的分子功能进行分类。可分为生物过程、细胞组分、分子功能 3 部分。

由图5可知,在生物学过程功能分类的代谢过程中差异基因数量最多,为584个,其次为细胞过程,差异基因数量为552个。另外,单一生物过程、生物调节、局部构建、应激反应的差异基因数量也较多。

由图 6 可知,细胞和细胞组分在细胞组分分类中所占比例在最大(同为 289 个),大分子复合物为 156 个、膜为 188 个、膜组分为 119 个,反映膜和膜组分都在耐药过程中发挥重要作用。

图 7 显示,在分子功能分类中,催化活性差异基因的数量最多为 477 个,结合和转运蛋白活性的差异基因数为 375 个和 115 个,反映具有催化活性的酶类以及结合和转运蛋白均与嗜水气单胞菌的耐药性密切相关。

2.5 差异基因 GO 功能富集结果

为了获得基因完善的功能信息,对显著差异表达的基因进行功能富集分析显示,1286 个显著差异基因显著富集到 152 个 GO 条目。以差异基因数目为筛选条件,筛选出富集差异基因数目最多的 5 类功能,分别是生物过程、分子功能、细胞过程、结合、细胞代谢过程(表 4)。

2.6 差异基因 KEGG 富集结果

分析结果显示,显著富集的通路分别是硒化合物代谢、精氨酸生物合成、核糖体、硫代谢 4 条通路,反映这 4 条通路与嗜水气单胞菌耐药性关系最为紧密(表 5)。对这 4 条通路中的功能基因进行分析,结合文献报道,筛选出这 4 条通路中可能与细菌耐药性关系密切的功能基因,如表 6 所示,这些基因的功能主要涉及生物成膜和核糖体蛋白合成。

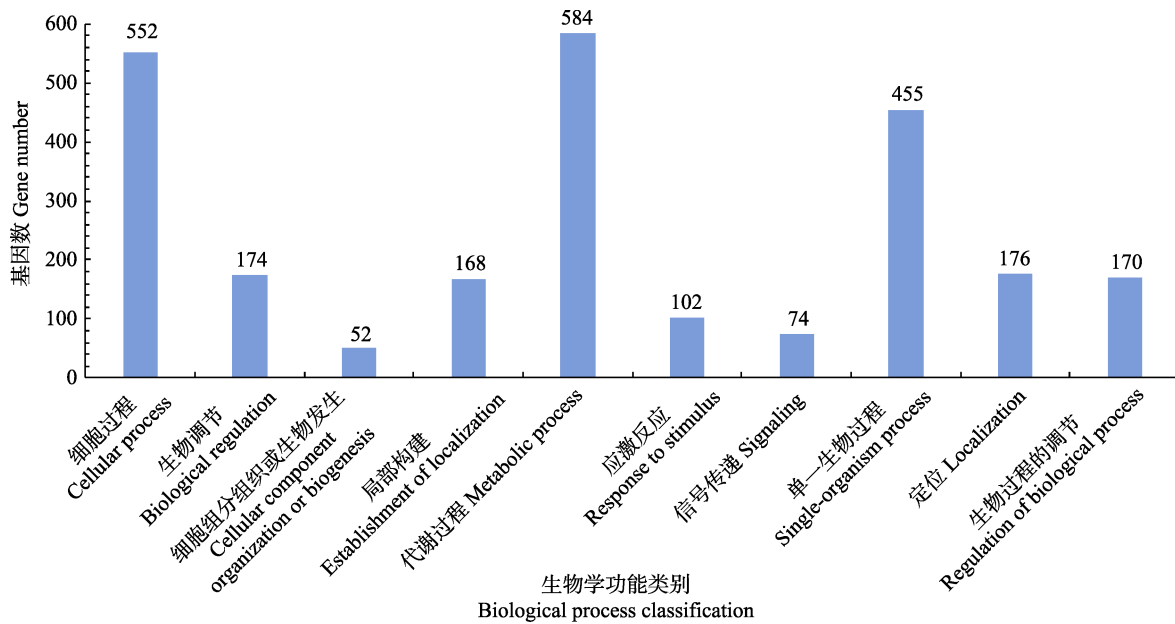


图 5 差异表达基因的生物学过程功能分类

Fig.5 Biological process classification of differentially expressed genes

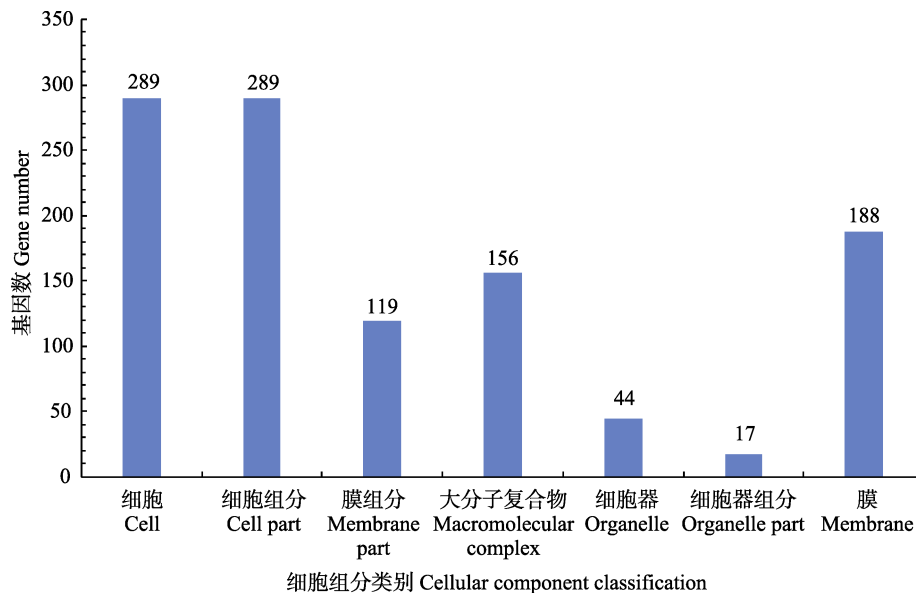


图 6 差异表达基因的细胞组分分类

Fig.6 Cellular component classification of differentially expressed genes

3 讨论

本研究发现,嗜水气单胞菌 *luxR*₀₅₇₃₅ 沉默后,细菌对庆大霉素、诺氟沙星、卡那霉素和吡哌酸的耐药性均显著降低。转录组分析发现,嗜水气单胞菌的耐药性可能与硒化合物代谢、精氨酸生物合成、核糖体、硫代谢 4 条通路有关。其中,可能与这 4 条通路中的功能基因 *metE*、*glnA*、*rplB*、*rplX*、*rpsA*、*rpsJ* 等关系最为密切,这些功能基因中,*metE* 和 *glnA* 编码功

能性酶,参与细菌生物膜的形成,*rplB*、*rplX*、*rpsA*、*rpsJ* 则均是编码核糖体蛋白的基因,参与细菌蛋白的合成。

研究发现,生物被膜的形成与细菌耐药性直接相关。如 Stewart(1996)曾报道称,生物被膜的耐药作用与被膜的厚度呈线性关系。张吉红等(2003)研究表明,嗜水气单胞菌的生物成膜能力与细菌的耐药性密切相关,其研究结果显示,形成生物膜的细菌对抗生素的耐受性显著高于浮游细菌。生物被膜中细菌的耐药

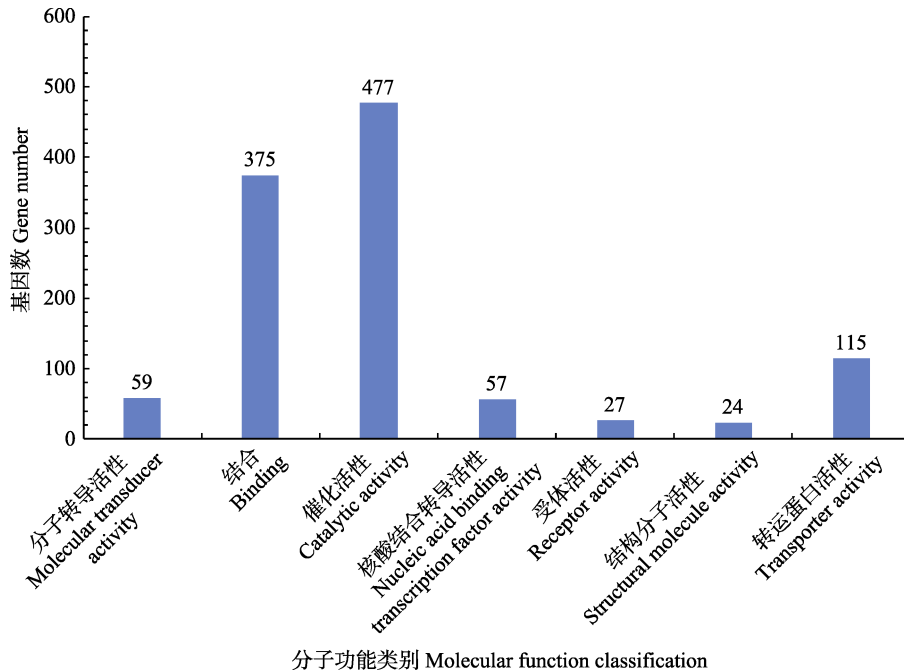


图 7 差异表达基因的分子功能分类

Fig.7 Molecular function classification of differentially expressed genes

表 4 差异基因 GO 富集列表

Tab.4 List of GO enrichment differential genes

GO 编号 GO accession	功能名称 Term type	P 值 P-value	差异基因数目 Differential gene number	差异基因总数目 Total number of differential genes
GO:0008150	生物过程 Biological process	0.00119	735	1286
GO:0003674	分子功能 Molecular function	0.000163	710	1286
GO:0009987	细胞过程 Cellular process	0.0453	413	1286
GO:0005488	结合 Binding	0.00157	375	1286
GO:0044237	细胞代谢过程 Cellular metabolic process	0.0355	338	1286

表 5 差异基因 KEGG 富集列表

Tab.5 List of KEGG enrichment differential genes

通路 Term	编号 ID	差异基因数目 Input number	背景基因数目 Background number	P 值 P-value
硒化合物代谢 Selenocompound metabolism	ko00220	12	19	0.040325226
精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	ko00920	19	31	0.014071768
核糖体 Ribosome	ko03010	35	55	0.000630827
硫代谢 Sulfur metabolism	ko00450	11	16	0.033417057

性主要来自 2 个方面,一方面是生物被膜内细菌的代谢降低,进入一种非生长状态,可以保护细菌不被抗生素杀死;另一方面是形成生物被膜的细菌可以表达特有的生物被膜表型,并促进抗性基因的表达,从而对抗生素产生抗性。本研究发现,嗜水气单胞菌的耐药性与 *metE* 和 *glnA* 的表达关系密切,而这 2 个基因

又参与生物膜的形成。如李霞等(2013)研究发现, *metE* 是耶尔森菌(*Yersinia*)的生物膜合成的主要影响因素,对耶尔森菌生物膜形成的贡献率均超过 25%;杨艳北(2017)研究结果也显示,精氨酸生物合成通路中 *glnA* 也参与细菌成膜, *glnA* 缺失,生物成膜能力下降。结合本研究结果可以推测, *luxR*₀₅₇₃₅ 调控 *metE*

和 *glnA* 的表达, 当 *luxR*₀₅₇₃₅ 被沉默后, *metE* 和 *glnA* 的表达显著下降, 直接导致细菌生物成膜能力的显著

下降, 而生物成膜能力的下降又直接降低细菌对抗生素的耐受性。

表6 4条通路中与嗜水气单胞菌耐药性相关的功能基因
Tab.6 Functional genes associated with *A. hydrophila* resistance in the four pathways

通路 Term	基因名称 Gene name	上调/下调 Up/down	编码蛋白 Encoded protein	功能 Function
硒化合物代谢 Selenocompound metabolism	<i>metE</i>	下调 Down	编码甲硫氨酸合成酶	与生物成膜密切相关(李霞等, 2013)
精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	<i>glnA</i>	下调 Down	编码谷氨酸生物合成酶	与细菌粘附、成膜、毒力相关(杨艳北, 2017)
核糖体 Ribosome	<i>rplB</i>	上调 Up	编码核糖体蛋白 L2	核糖体蛋白 L2 是 50S 亚基中最大的蛋白质组分(Mikulik <i>et al</i> , 2001)
核糖体 Ribosome	<i>rplX</i>	上调 Up	编码核糖体蛋白 L24	核糖体蛋白 L24 是 50S 亚基组装的起始蛋白质之一(李沐阳等, 1993)
核糖体 Ribosome	<i>rpsA</i>	下调 Down	编码核糖体蛋白 S1	核糖体蛋白 S1 负责启动 30S 亚基同 mRNA 的结合参与蛋白质翻译
核糖体 Ribosome	<i>rpsJ</i>	上调 Up	编码核糖体蛋白 S10	可能参与核糖体蛋白合成的延伸, 与对替加环素的耐药有关(梁雨横, 2009; Haim <i>et al</i> , 2017)

研究还发现, 核糖体蛋白对细菌耐药性有重要影响。本研究中发现的差异表达基因 *rpsA*、*rplB*、*rplX*、*rpsJ* 分别编码核糖体蛋白 S1、L2、L24 和 S10 (胡族琼等, 2014; Mikulik *et al*, 2001; 李沐阳等, 1993; Haim *et al*, 2017)。已知核糖体蛋白 S1 在翻译起始中起重要作用, 直接参与 30S 核糖体蛋白对 mRNA 的识别和结合。*rpsA* 表达量下调会降低核糖体蛋白 S1 的产量, 从而减少 30S 亚基同 mRNA 的结合; 核糖体蛋白 L2 是 50S 亚基中最大的蛋白质组分(Mikulik *et al*, 2001), 核糖体蛋白 L24 是 50S 亚基组装的起始蛋白质之一(李沐阳等, 1993); 核糖体蛋白 S10 可能参与核糖体蛋白合成的延伸(梁雨横, 2009)。Xiao 等(2015)研究发现, 氨基糖苷类抗生素主要是通过作用于细菌 30S 核糖体的 16S rRNA 解码区 A 部位, 抑制细菌蛋白质的合成或诱导合成错误蛋白, 抑制已经合成蛋白的释放, 而导致细菌的死亡。由此推测, *luxR*₀₅₇₃₅ 沉默后 *rpsA* 表达量下调, 抑制 30S 亚基同 mRNA 的结合, 进一步加强硫酸庆大霉素和卡那霉素的杀菌效果。因此, 在本研究中与 B11 菌株相比, *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株对硫酸庆大霉素和卡那霉素更加敏感。核糖体通路中 *rpsJ* 与对替加环素的耐药有关(Haim *et al*, 2017), 替加环素属于四环素类药物, 且杀菌机制与四环素和强力霉素相同, 能特异性与细菌核糖体 30S 亚基的亚单位结合, 阻滞氨酰基转移 RNA 与信使 RNA 核蛋白体的位点结合, 抑制肽链增长和影响细菌蛋白质合成(曹俊敏等,

2013), 该基因表达量上调与四环素和强力霉素耐药性降低不显著的实验结果相符。推测是由于 *rpsJ* 表达量上调, 增加了细菌对药物的耐受性, 虽然生物成膜能力下降增加了药物与细菌的接触, 但细菌对药物的耐受能力增强, 抵消了药物对细菌的作用。核糖体通路中 *rplB* 和 *rplX* 分别编码核糖体蛋白 L2 和核糖体蛋白 L24。而氟苯尼考杀菌机制是通过与 50S 核糖体亚基结合, 抑制蛋白质合成所需的关键酶——肽酰转移酶, 从而特异性地阻止氨酰 tRNA 与核糖体上的受体结合, 抑制肽链的延长而使菌体蛋白不能合成(Cannon *et al*, 1990)。核糖体通路中, *rplB* 和 *rplX* 表达量上调, 50S 亚基含量会增高。结合实验结果, 与 B11 菌株相比, *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株虽然对氟苯尼考的敏感性有所增加, 但差异并不显著, 可能是由于氟苯尼考的杀菌机制是通过与 50S 核糖体亚基结合, 而 50S 亚基含量增高消耗了氟苯尼考的药性, 使生物成膜能力下降, 对耐药性的影响效果不显著。综合以上因素, 就导致 *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株对氟苯尼考的耐药性虽然有所下降, 但效果并不显著。

诺氟沙星和吡哌酸同属于喹诺酮类药物, 2 种药物的杀菌机制均为通过作用于细菌 DNA 旋转酶, 干扰细菌 DNA 的合成, 从而导致细菌死亡(王洁等, 2008)。结果显示, *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi 菌株对诺氟沙星和吡哌酸的敏感性显著增加, 推测可能是由于生物成膜能力下降, 引起药物与细菌的接触更加直接, 导致药效增加,

从而引起*luxR*₀₅₇₃₅-RNAi菌株对诺氟沙星和吡哌酸敏感性显著增加。

4 结 论

本研究利用RNAi技术构建嗜水气单胞菌基因稳定沉默株*luxR*₀₅₇₃₅-RNAi, 与B11菌株相比, 其*luxR*₀₅₇₃₅的表达量下调96.8%。耐药性结果显示, 与B11菌株相比, *luxR*₀₅₇₃₅-RNAi菌株对庆大霉素的耐药性降低了28.45%、对诺氟沙星的耐药性降低了4.22%, 对卡那霉素的耐药性降低了44.25%, 对吡哌酸的耐药性降低了6.23%。差异基因KEGG富集结果显示, 与嗜水气单胞菌耐药性相关性最显著的通路为核糖体、精氨酸生物合成、硫代谢、硒化合物代谢4条通路。在这4条通路中, 可能与嗜水气单胞菌耐药性相关的重要功能基因包括*metE*、*glnA*、*rplB*、*rplX*、*rpsA*、*rpsJ*等, 这些功能基因编码的蛋白主要与细菌的生物成膜及核糖体蛋白合成相关。因此, 推测嗜水气单胞菌的*luxR*₀₅₇₃₅通过调控细菌的生物膜形成相关基因及核糖体蛋白相关基因的表达, 从而调控细菌对药物的耐受性。

参 考 文 献

- Cannon M, Harford S, Davies J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1990, 26: 307–317
- Cao JM, Yang XJ, Wang Y. Methodology of identification of *Corynebacterium* and the drug resistant mechanisms to tetracycline and macrolides antibiotics. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2013, 23(2): 241–244 [曹俊敏, 杨雪静, 王原. 棒杆菌属细菌分类鉴定的方法学比较及对四环素与大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(2): 241–244]
- Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, *et al.* A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(1): 46–55
- Darsigny M, Babeu JP, Seidman EG, *et al.* Hepatocyte nuclear factor-4 α promotes gut neoplasia in mice and protects against the production of reactive oxygen species. *Cancer Research*, 2010, 70(22): 9423–9433
- Del Castillo CS, Hikima JI, Jang HB, *et al.* Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(1): 120–129
- Fang YF, Pan XY, Lin LY, *et al.* Molecular mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas hydrophila*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(2): 174–182 [方一风, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 嗜水气单胞菌对喹诺酮类药物耐药的分子机制. *微生物学报*, 2014, 54(2): 174–182]
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 269–275
- Haim MS, Di Gregorio S, Galanternik L, *et al.* First description of *rpsJ* and *mepA* mutations associated with tigecycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from a cystic fibrosis patient during antibiotic therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2017, 50(6): 739–741
- Hu ZQ, Cai XS, Xie WS, *et al.* Characterization of *pncA* and *rpsA* mutations in pyrazinamide-resistant *M. tuberculosis*. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 37(4): 285–289 [胡族琼, 蔡杏珊, 谢伟胜, 等. 吡嗪酰胺耐药结核分枝杆菌*pncA*及*rpsA*基因突变特征分析. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(4): 285–289]
- Li MY, Weng ML, Tong KZ. A new point mutation in the L24 gene (*rplX*) of the *Escherichia coli* ribosome. *Chinese Science Bulletin*, 1993, 38(22): 2085–2088 [李沐阳, 翁曼丽, 童克忠. 大肠杆菌核糖体蛋白质 L24 基因(*rplX*)的一个新的点突变. *科学通报*, 1993, 38(22): 2085–2088]
- Li SW, Wang D, Liu HB, *et al.* Molecular characterization of integron-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1015–1022 [李绍成, 王荻, 刘红柏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 1015–1022]
- Li X, Li Y, Huang JH, *et al.* Effect of different biofilm-forming genes on *Yersinia* biofilm. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2013, 41(9): 159–163 [李霞, 李艺, 黄金海, 等. 耶尔森菌不同成膜基因对其生物膜形成的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(9): 159–163]
- Liang YH. Methylation of ribosomal protein S10 affects its interaction with B23. Master's Thesis of Lanzhou University, 2009 [梁雨横. 核糖体蛋白S10的甲基化对其与B23相互作用的影响. 兰州大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Malott RJ, O'Grady EP, Toller J, *et al.* A *Burkholderia cenocepacia* orphan LuxR homolog is involved in quorum-sensing regulation. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(8): 2447–2460
- Mikulik K, Man P, Halada P. Characterization of the *rplB* gene from *Streptomyces collinus* and its protein product by mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285(5): 1344–1349
- Qin L, Yin JG, Zhang W, *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from *Esox lucius* around Urumqi in Xinjiang. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 40–45 [秦莉, 殷建国, 张薇, 等. 白斑狗鱼(*Esox lucius*)致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 40–45]
- Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1996, 40(11): 2517–2522
- Tai GF, Yan QP, Xu XJ, *et al.* Establishment of quantitative model on eel peripheral blood leukocytes phagocytosing

- Aeromonas hydrophila* in vitro. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 68–74 [邵光富, 鄢庆彬, 徐晓津, 等. 鳗鲡外周血白细胞体外吞噬嗜水气单胞菌数量模型的建立. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 68–74]
- Wang J, Shao HF. Plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. Journal of Medical Postgraduates, 2008, 21(1): 91–94 [王洁, 邵海枫. 肠杆菌科质粒介导喹诺酮类抗菌药耐药的研究. 医学研究生学报, 2008, 21(1): 91–94]
- Wang YG, Ren H, Zhang Z, et al. Causative pathogen of dark-thin syndrome in cultured *Scophthalmus maximus* and Chinese herbal medicine screening for the bactericidal effect. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(4): 57–63 [王印庚, 任海, 张正, 等. 养殖大菱鲆黑瘦症的病原菌鉴定及杀菌中草药筛选. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 57–63]
- Xiao SZ, Han LZ, Chu HQ, et al. Detection of aminoglycoside resistance related genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a single institute of Shanghai, China. Panminerva Medica, 2015, 57(1): 49–53
- Yang YB. Base on glutamine synthetase target to investigate mechanism of erythromycin against *Staphylococcus Xylosus* biofilm formation. Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2017 [杨艳北. 基于谷氨酰胺合成酶靶标探讨红霉素干预木糖葡萄糖球菌生物被膜形成的机制. 东北农业大学博士研究生学位论文, 2017]
- Zeng L, Xie J. Molecular basis underlying LuxR family transcription factors and function diversity and implications for novel antibiotic drug targets. Journal of Cellular Biochemistry, 2011, 112(11): 3079–3084
- Zhang GL, Wang H, Zhang Y, et al. Whole-genome sequencing and comparative analysis of *Aeromonas hydrophila* AH10 (CCTCC AB2014155). Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 995–1005 [张国亮, 王浩, 张也, 等. 嗜水气单胞菌 AH10(CCTCC AB2014155)的全基因组测序及比较分析. 中国水产科学, 2016, 23(5): 995–1005]
- Zhang JH, Lu CP. Effects of *Aeromonas hydrophila* biofilm on the drug resistance. Acta microbiologica Sinica, 2003, 43(4): 498–502 [张吉红, 陆承平. 嗜水气单胞菌生物被膜对其耐药性的影响. 微生物学报, 2003, 43(4): 498–502]

(编辑 马瑾艳)

Molecular Mechanism of *luxR* Regulation of Drug Resistance of *Aeromonas hydrophila*

MAO Leilei, YAN Qingpi, HUANG Lixing, ZHANG Meimei,
WANG Suyun, ZHANG Mengmeng, QIN Yingxue^①

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract LuxR family proteins play a key role in various important physiological activities of gram-negative bacteria. In this study, RNAi technology was used to construct a stable silenced strain *Aeromonas hydrophila luxR₀₅₇₃₅-RNAi*. The expression of *luxR₀₅₇₃₅* in wild-type strain and *luxR₀₅₇₃₅-RNAi* was detected by qRT-PCR. The results showed that the expression of *luxR₀₅₇₃₅* in strain *luxR₀₅₇₃₅-RNAi* was reduced by 96.8% compared to that of the wild-type strain. Drug sensitivity tests showed that *luxR₀₅₇₃₅-RNAi* significantly reduced bacterial resistance to gentamicin, norfloxacin, kanamycin, and pipemidic acid compared with the wild-type strain. The transcriptome analysis of the wild-type strain and *luxR₀₅₇₃₅-RNAi* revealed that there were 1286 genes with significant differences in expression, of which 353 genes were up-regulated and 933 genes were down-regulated. There are four significantly enriched pathways, which are ribosome, arginine biosynthesis, sulfur metabolism and selenocompound metabolism. In the four pathways, some important functional genes, including *metE*, *glnA*, *rplB*, *rplX*, *rpsA*, *rpsJ* were found to be associated with drugs resistance of *A. hydrophila*. These genes encode the proteins that were mainly involved in bacteria biofilm formation and ribosomal protein synthesis. It can be speculated from the above results that the *luxR₀₅₇₃₅* of *A. hydrophila* regulates the expression of the genes that encode bacteria biofilm formation and ribosomal protein synthesis, and then further regulates the drugs resistance of *A. hydrophila*.

Key words *Aeromonas hydrophila*; LuxR regulatory protein; Drug resistance; Transcriptome

① Corresponding author: QIN Yingxue, E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180604001

http://www.yykxjz.cn/

王中一, 刘庆慧, 卢翠玉, 黄捷. 利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 156-162
Wang ZY, Liu QH, Lu CY, Huang J. Identification of the host interactors of wsv112 of WSSV by yeast two-hybrid. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 156-162

利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白*



王中一^{1,2} 刘庆慧^{1①} 卢翠玉^{1,2} 黄捷¹

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾白斑综合征病毒(WSSV)开放阅读框 wsv112 编码脱氧尿苷焦磷酸酶(dUTP pyrophosphatase, dUTPase)。为研究 wsv112 与宿主的互作关系,本研究采用酵母双杂交 Gal4 系统从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道 cDNA 文库中筛选与 wsv112 互作的候选蛋白。以 WSSV 为模板,构建 pGBKT7-112 诱饵载体,转化到 Y2H Gold 酵母菌感受态细胞中,转化菌液涂布到不同缺陷型培养基上,检测诱饵载体的自激性和毒性。将凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库与诱饵菌株 pGBKT7-112 接合,通过筛选力度不同的缺陷型培养基、颜色反应、PCR、测序鉴定等步骤筛选阳性克隆,将阳性菌株提取质粒,再经过回复杂交实验验证筛选出的阳性质粒与诱饵载体的作用。研究表明,诱饵载体 pGBKT7-112 无自激性和毒性,可用于酵母双杂交实验;经初筛和回复杂交实验最终得到 2 个阳性质粒,经过 NCBI 数据库对比,其编码的蛋白分别与日本囊对虾(*Penaeus japonicus*) C 型凝集素(AGW27416.1)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 40S 核糖体蛋白 S20 小亚基蛋白(ALE99171.1)具有 37%和 98%同源性。本研究为 wsv112 的调控机制提供新的线索。

关键词 对虾白斑综合征病毒; wsv112; dUTPase; 酵母双杂交

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0156-07

酵母双杂交技术最初是由 Fields 等(1989)在进行真核基因转录调控研究中用来检测酵母体内蛋白与蛋白相互作用的系统,目前,主要用于研究蛋白与蛋白之间的相互作用。酵母双杂交系统包括 2 个相互独立的功能结构——DNA 结合域(DNA-BD)和转录激活域(AD),这 2 个结构在细胞内相距较远时不能激活转录,当二者通过某种作用在空间上相互接近时,才

能激活报告基因的转录(Ozenberger *et al*, 1995)。由于酵母双杂交技术具有高灵敏度、简便操作等优点,所以,该技术越来越广泛地应用于蛋白质相互作用的研究(Yu *et al*, 2012)。

对虾白斑综合征病毒(WSSV)是水产养殖中主要的病原,给水产养殖行业造成了巨大的经济损失。研究表明,其开放阅读框 wsv112 编码脱氧尿苷焦磷酸

* 国家自然科学基金(31672679)、国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助[This work was supported by National Science Foundation of China (31672679), National Key Basic Research Development Plan(2012CB114401), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 王中一, E-mail: liangwang06@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-06-04, 收修改稿日期: 2018-07-11

酶(dUTP pyrophosphatase, dUTPase)(Liu *et al.*, 2005)。自 20 世纪 90 年代在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现 dUTPase 以来,一直为学术界研究的热点,其广泛存在于真核生物(植物、动物)、原核生物(细菌)和病毒中。dUTPase 是一种水解酶,能够水解脱氧尿苷三磷酸(dUTP),形成脱氧尿苷单磷酸(dUMP)和无机焦磷酸(PPi)。甲基化的 dUMP 可形成胸腺嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸(dTTP),dTTP 是 DNA 合成的主要成分,因此,dUTPase 对 WSSV 的生存具有重要的作用,维持低水平的 dUTP/ dTTP 比例,可降低 dUTP 在 DNA 合成中的插入和错配,减少突变频率(Payne *et al.*, 2001;Chen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005)。McGeoch(1990)研究发现,不同生物中 dUTPase 分子量差别很大,但在 N 末端含有 5 个高度保守的序列,分别为 motif 1(A GFDL)、motif 2 (GKSS)、motif 3(GIIDFGYTG)、motif 4 (GQKFAQL)和 motif 5(RGDKGFGS)(招丽婵等, 2008)。一些病毒尤其是逆转录病毒编码的 dUTPase 协助病毒完成侵染的过程,并且与毒力有关,可作为病毒治疗的靶位点(陈巧林等, 2002; Cottone *et al.*, 2002)。dUTPase 在病毒的生命周期中发挥独特的作用,但关于 dUTPase 在 WSSV 与宿主细胞的相互作用以及表达调控机制仍不清楚。

本研究利用酵母双杂交技术初步筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白,为深入研究 wsv112 的功能,揭示 WSSV 侵染宿主细胞的途径提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂与主要材料

酵母菌株 Y2H Gold 和 Y187、YPDA 培养基、营养缺陷型培养基 [SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu (DDO)、SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA(DDO/X/A)]、X- α -Gal 和 YeastmakerTM Yeast Transformation System 购自 Clontech 公司; pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7、pGBKT-53、pGBKT7-lam 质粒甘油菌由本实验室保存; *E.coli* Top10、酵母菌质粒小提试剂盒购自天根科技生物公司; 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)和质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 诱饵载体的构建 根据 wsv112 基因的 ORF 设计带有 *Nde* I 和 *Pst* I 酶切位点的引物 w112s (5'-GAC ATATGATGGACTCATCTGCATC-3') 和 w112a (5'-ATC

TGCAGTGTATACTCCTCCACGC-3'), 以 WSSV 提取的 DNA 为模板, PCR 扩增目的序列。PCR 产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳后回收, 将胶回收的产物和酵母表达载体 pGBKT7 分别经过 *Nde* I 和 *Pst* I 双酶切后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达载体 pGBKT7-112, 将其转化到 *E. coli* Top10 感受态细胞中。挑单克隆, 进行菌液 PCR, 筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序验证。

1.2.2 酵母菌阴性及阳性接合对照 感受态 Y2H Gold、Y187 的制备及相关转化步骤参照 Clontech 公司 YeastmakerTM Yeast Transformation System 转化手册进行。按照表 1 所列进行阳性和阴性质粒转化, 转化菌液分别稀释 10、100 和 1000 倍后, 涂布于对应的单缺培养基上, 37℃ 培养 5 d, 观察菌落生长情况。

表 1 阴性和阳性对照质粒转化
Tab.1 Transformation of negative and positive plasmid

菌株 Strain	质粒 Plasmid	培养基 Medium
Y2H Gold	pGBKT7-53	SD/-Trp
Y2H Gold	pGBKT7-lam	SD/-Trp
Y187	pGADT7-T	SD/-Leu

分别挑取单克隆 Y2H Gold(pGBKT7-53) 和 Y187 (pGADT7-T) 加入同一个含有 500 μ l 2 \times YPDA 的 1.5 ml 离心管中, 涡旋混匀, 30℃, 250 r/min 过夜培养, 作为酵母双杂交的阳性对照(P); 以 Y2H Gold(pGBKT7-Lam) 和 Y187(pGADT7-T) 作为阴性对照(N)。将菌液稀释 10、100、1000 倍后涂布于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu(DDO)、SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal(40 μ g/ml)/AbA(200 ng/ml)(DDO/X/A) 培养基上, 30℃ 倒置培养 5 d, 观察菌落生长情况。从 DDO 平板挑取含有 2 种质粒的菌株保种作为后续实验阴、阳性对照。

1.2.3 诱饵载体 pGBKT7-112 毒性和自激性的检测

感受态酵母菌 Y2H Gold 制备及相关转化步骤按照 Clontech 公司 YeastmakerTM Yeast Transformation System 转化手册。将重组质粒 pGBKT7-112 和空质粒 pGBKT7 分别转入 Y2H Gold 感受态细胞。转化菌液分别稀释 10、100 和 1000 倍后涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基上, 30℃ 倒置培养 3~4 d, 观察各平板酵母菌菌落的数量、大小、颜色, 进行诱饵质粒 pGBKT7-112 的毒性和自激性检测。

1.2.4 酵母双杂交筛选与 wsv112 互作的基因

挑取含有 pGBKT7-112 质粒的 Y2H Gold 单克隆于 50 ml SD/-Trp 液体培养基中 30℃, 250 r/min 培养

至 OD_{600 nm} 达到 0.8, 1000×g 离心 5 min, 用 4 ml SD/-Trp 重悬沉淀, 加入 1 ml 构建好的文库和 45 ml 2×YPDA/Kan(50 μg/ml), 30℃ 30 r/min 振荡培养 20 h, 显微镜观察结合情况, 当视野中出现“米老鼠头”或“三叶草”形状时, 结束接合。1000×g 离心 10 min 后用 0.5×YPDA/Kan 重悬沉淀, 共收集到 10 ml 悬浮细胞。100 μl 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 倍的稀释液铺在 100 mm SD/-Trp、SD/-Leu、DDO 固体培养基上, 30℃, 培养 3~5 d; 剩余所有菌液涂布于 DDO/X 平板上, 30℃ 倒置培养 5~7 d, 直至长出克隆。用灭菌的牙签将 DDO/X 培养基上生长的蓝色克隆转移至筛选力度更强的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA(QDO/X/A) 培养基上, 30℃ 培养 3 d。为排除假阳性和多种质粒融合现象, 将蓝色克隆在 QDO/X/A 上反复筛选至少 3 次。

将筛选出的蓝色克隆编号, 并接种于 1 ml QDO/A 液体培养基中, 30℃ 250 r/min 培养, 用 PGADT7 通用引物进行菌液 PCR, 检测蓝色克隆中插入 cDNA 片段的大小。PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司测序, 分析测序结果。

1.2.5 获得与 wsv112 互作基因的质粒 按照酵母质粒小提试剂盒提取筛选的酵母质粒, 并转化到 *E.coli* Top10 感受态细胞中, 经 Amp⁺ 和菌液 PCR 筛选出阳性克隆测序。选取含有正确序列的质粒, 扩大培养后抽提质粒, 得到插入片段的质粒。

1.2.6 回复杂交验证互作蛋白 为进一步排除实验的假阳性, 将上述得到的质粒 pGADT7-X 转化到含有 pGBKT7-112 诱饵载体的 Y2H Gold 菌株中(各质粒转化情况如表 2 所示), 以 pGADT7-T+pGBKT7-lam 作为阴性对照, 以 pGADT7-T+pGBKT7-53 为阳性对照。以 pGADT7-X+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-112、pGADT7+pGBKT7 为空质粒对照, pGADT7-X 与 pGBKT7-112 共转化组在 QDO/A/X 培养基上如果不生长或菌落为白色, 则 pGADT7-X 判断为假阳性; 如果生长且菌落为蓝色, 各阴性对照培养板无菌落生长则为阳性。

表 2 回复杂交转化
Tab.2 The grouping of reply hybrid

Y2H Gold	PGADT7-X	PGADT7	PGADT7-T
pGBKT7-112	√	√	-
pGBKT7-lam	-	-	√
pGBKT7-53	-	-	√
pGBKT7	√	√	-

注: √代表有; -代表无

Note: √ denoted positive; - denoted negative

2 结果

2.1 诱饵载体的构建

表达载体 pGBKT7 和 wsv112 双酶切连接后构建重组质粒, 菌落 PCR 检测结果如图 1 所示, 条带在 1500~2000 bp 之间与理论值相符, 与 wsv112 标准序列对比后无碱基突变和移码现象。

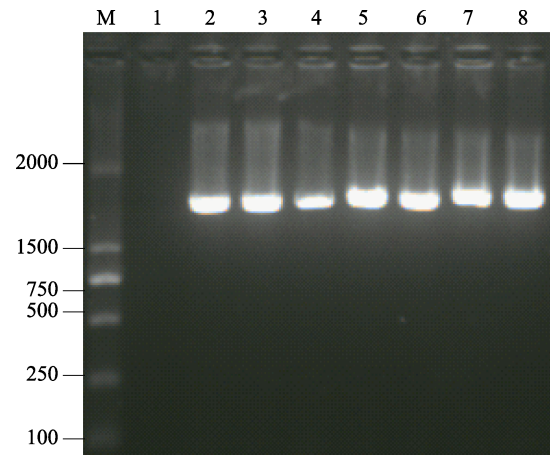


图 1 重组载体 pGBKT7-112 菌液 PCR 检测
Fig.1 PCR identification of recombinant plasmids

M: DNA 标准分子量 2000; 1: 阴性对照; 2~8: 重组质粒;
M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control
2~8: Recombinant plasmids

2.2 酵母菌阴性及阳性接合对照

将 pGBKT7-53、pGBKT7-lam、pGADT7-T 转化到相应的酵母菌株后, 将菌液稀释 10、100 和 1000 倍涂布到对应的缺陷型培养基上, 30℃ 培养 5 d, 观察菌落生长情况, 结果如图 2A~图 2C 所示, 每一种菌株生长状态完好, 可用于后续实验。挑取单克隆菌株 Y2H Gold(pGBKT7-53) 和 Y187(pGADT7-T) 进行接合, 作为阳性对照; Y2H Gold(pGBKT7-Lam) 和 Y187(pGADT7-T) 接合为阴性对照, 涂布到相应的缺陷型培养基上, 30℃ 培养 5 d, 观察菌落生长情况, 结果如图 2D~图 2F 所示。阳性对照菌株在 DDO/X/A 培养基上生长且为蓝色, 说明该菌株可以激活 AbA 和 X-α-Gal 报告基因, 可作为阳性对照; 阴性对照菌株在 DDO 培养基上生长良好, 在 DDO/X/A 培养基上无法生长, 说明阴性菌株不能激活 AbA 和 X-α-Gal 报告基因, 可作为阴性对照。

2.3 诱饵蛋白毒性和自激性的检测

将构建成功的诱饵载体 pGBKT7-112 和空质粒 pGBKT7 分别转入 Y2H Gold 感受态细胞中, 30℃ 倒

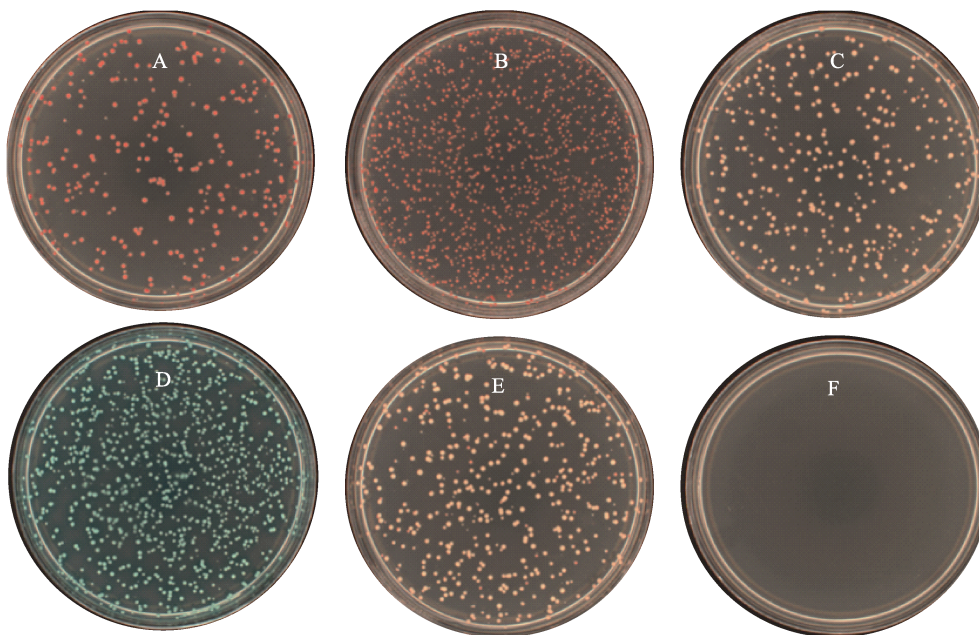


图2 对照菌株在不同缺陷型培养基上的生长情况
Fig.2 The growth of control groups on different culture medium

A: pGBKT7-53 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上; B: pGBKT7-lam 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上;
C: pGADT7-T 转化到 Y187 在 SD/-Leu 培养基上; D: 阳性对照在 DDO/X/A 培养基上;
E: 阴性对照在 DDO 培养基上; F: 阴性对照在 DDO/X/A 培养基上

A: Y2H Gold transformants with pGBKT7-53 grow on SD/-Trp plates; B: Y2H Gold transformants with pGBKT7-lam grow on SD/-Trp plates; C: Y187 transformants with pGADT7-T grow on SD/-Leu plates; D: The positive control grow on DDO/X/A plates; E: The negative control grow on DDO plates; F: The negative control grow on DDO/X/A plates

置培养于SD/-Trp、SD/-Trp/X、SD/-Trp/X/A固体培养基上5 d后,观察培养基克隆生长状况(图3A~图3C)。结果发现,菌落只有在SD/-Trp、SD/-Trp/X培养基上生长,在SD/-Trp/-Ade-X培养基上没有菌落生长,说明诱饵质粒不能激活Aba报告基因,没有自激性;含有pGBKT7质粒的菌落和含有pGBKT7-112的菌落大小和数目差别不大(图3A和图3D),说明诱饵菌株也没有毒性,可用于酵母双杂交实验。

2.4 酵母双杂交筛选与 wsv112 互作的基因

将剩余的杂交菌液全部涂布在 DDO/X 固体培养基上,30℃培养 5 d 后。将长出的蓝色克隆全部划线到筛选力更强的 QDO/X/A 固体培养基上,反复筛选 3 次后,共得到 526 株蓝色克隆。利用 pGADT7 通用引物扩增 PCR 检测蓝色克隆中插入的片段,将 PCR 产物测序,经分析共筛选出 6 株具有意义的序列,其编号分别是 1-5、4-7、6-35、8-23、8-39、8-45。

2.5 回复杂交验证互作基因

将筛选得到的 6 个质粒 pGADT7-X 与 pGBKT7-112 共同转化到 Y2H Gold 酵母菌中进行回复杂交实验,同时,设置阴、阳对照组和空质粒对照组,回复

杂交的实验结果如图 4 所示,阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T)能够激活报告基因的表达,在 QDO/X/A 培养基上长出蓝色克隆;阴性对照(pGBKT7-lam+pGADT7-T)、空白质粒对照(pGADT7+pGBKT7)不能激活报告基因的表达,在 QDO/X/A 培养基上不生长;证明实验体系完好。pGADT7-1-5+pGBKT7、pGADT7-4-7+pGBKT7、pGADT7-6-35+pGBKT7、pGADT7-8-23+pGBKT7、pGADT7-8-39+pGBKT7、pGADT7-8-45+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7112 酵母菌株在 QDO/X/A 培养基上不生长,说明编号 1-5、4-7、6-35、8-23、8-39、8-45 及 wsv12 基因无自激性。pGBKT7-112+pGADT7-4-7、pGBKT7-112+pGADT7-8-23 菌株能够在 QDO/X/A 培养基上生长出蓝色克隆,说明 wsv112 与编号 4-7 和 8-23 基因能够相互作用。pGBKT7-112+pGADT7-1-5、pGBKT7-112+pGADT7-6-35、pGBKT7-112+pGADT7-8-39、pGBKT7-112+pGADT7-8-45 菌株不能在 QDO/X/A 培养基上生长,说明 wsv112 不与编号 1-5、6-35、8-39 和 8-45 的基因相互作用。综上所述,本研究共筛选出 2 个阳性质粒,编号分别为 4-7 和 8-23,测序分析其基因编码蛋白分别与日本囊对虾(*Penaeus japonicus*) C 型凝集素

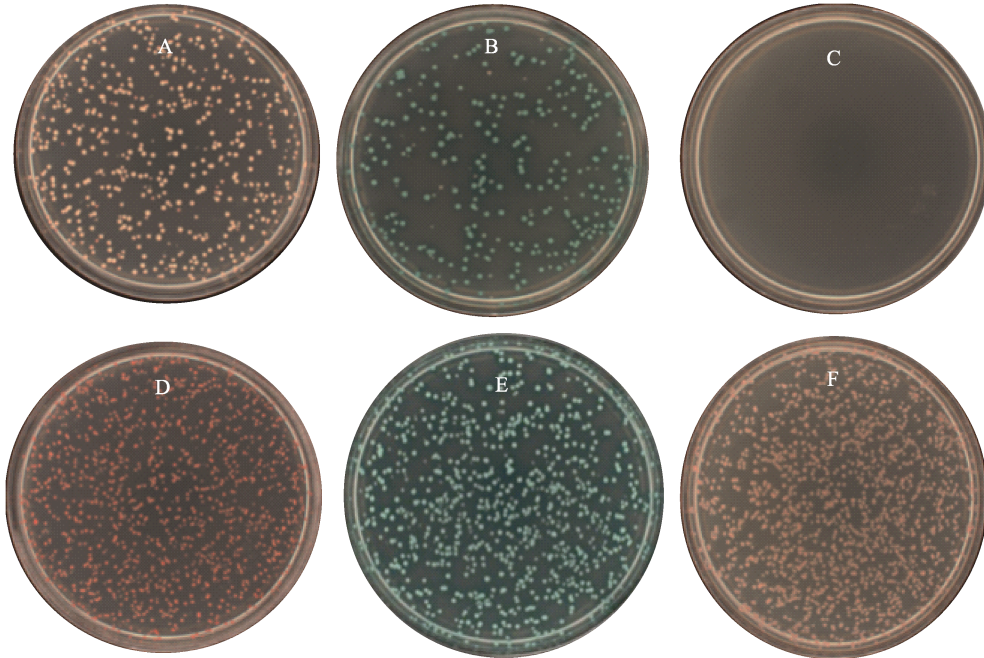


图3 诱饵载体 pGBKT7-112 转录自激性的检测

Fig.3 Assay of self-transcriptional activation and toxicity of pGBKT7-112

- A: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上; B: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp/X 培养基上; C: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp/X/A 培养基上; D: pGBKT7 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上; E: 阳性对照在 SD/-Trp/X/A 培养基上; F: 阴性对照在 SD/-Trp 培养基上
- A: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp plates; B: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp/X plates; C: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp/X/A plates; D: Y2H Gold transformants with pGBKT7 grow on SD/-Trp plates; E: The positive control grow on SD/-Trp/X/A plates; F: The negative control grow on SD/-Trp plates

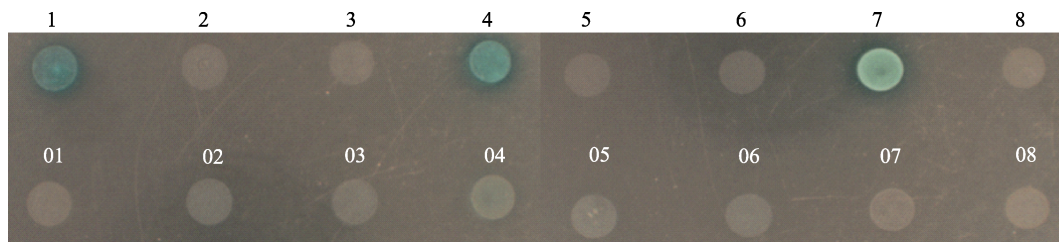


图4 回复杂交的 16 个转化组在 QDO/X/A 平板上生长的情况

Fig.4 The growth of 16 transformants on highly selective medium in retest

- 1~8: Y2H Gold (pGBKT7-112+pGADT7-4-7, pGBKT7-112+pGADT7-1-5, pGBKT7-112+pGADT7-6-35, pGBKT7-112+pGADT7-8-23, pGBKT7-112+pGADT7-8-39, pGBKT7-112+pGADT7-8-45, pGBKT7-53+ pGADT7-T(P), pGBKT7-lam+pGADT7-T(N))
- 01~08: Y2H Gold(pGADT7-4-7+pGBKT7, pGADT7-1-5+pGBKT7, pGADT7-6-35+pGBKT7, pGADT7-8-23+pGBKT7, pGADT7-8-39+pGBKT7, pGADT7-8-45+pGBKT7, pGADT7+pGBKT7112, pGADT7+pGBKT7)

(AGW27416.1)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 40S 核糖体蛋白 S20 小亚基蛋白(ALE99171.1)具有 37%和 98%的同源性。

3 讨论

为进一步探讨 wsv112 在 WSSV 侵染过程中的作

用机制, 本研究以 wsv112 为诱饵利用酵母双杂交技术从凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库中筛选出与 wsv112 互作的蛋白。根据 wsv112 的序列设计特异性引物构建诱饵表达载体并转入到 Y2H Gold 酵母菌中, 观察菌株在不同缺陷型培养基上的生长情况, 证明诱饵载体没有自激性和毒性, 可利用酵母双杂交技术筛选与

之互作的蛋白。将含有诱饵质粒 pGBKT7-112 的 Y2HGold 菌株与凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库融合, 利用缺陷型培养基、颜色反应、PCR 检测、回复杂交等实验环节逐步筛选阳性克隆, 最终得到 2 个与 wsv112 互作的蛋白, 分别与日本囊对虾的 C 型凝集素和克氏原螯虾 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白具有同源性。

肝胰腺和血组织是甲壳动物表达 C 型凝集素最丰富的部位, 因其含有能识别入侵病原表面糖类的 C 型凝集素样结构域(CTLD), 因此, 被认为是一类模式识别受体, 在先天免疫识别中发挥重要作用(Weis *et al*, 1998; Dodd *et al*, 2011), 如细胞粘附、酚氧化酶的激活、结节形成、吞噬和包被作用等(Lis *et al*, 1998; Koizumi *et al*, 1999; Yu *et al*, 1999、2004)。有些 C 型凝集素还具有抑菌或抗病毒的作用(Luo *et al*, 2003; Sun *et al*, 2008; 高焕等, 2012; 于金红等, 2013)。对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)敏感的 C 型凝集素在感染的前期发挥作用, 针对 WSSV 敏感的 C 型凝集素在感染后期起作用(王显伟, 2012)。由此推测, wsv112 可能在感染的后期发挥作用。

核糖体是所有生物进行蛋白质合成的场所, 是具有复杂结构的蛋白核酸复合物。哺乳动物的核糖体由 79 个核糖体蛋白(RP)和 4 种 RNA 组成; 其中, 40S 核糖体包含 32 种 RPs, 60S 核糖体含有 47 种 RPs (Wool, 1979; Wool *et al*, 1995)。由于从细菌到高等生物的广泛物种中都存在, 核糖体已经成为研究分子进化的重要大分子。关于人类所有的 79 个 RPs 的结构域功能都已基本清楚, 关于甲壳动物的 RPs, 虽然已有一些研究, 但是针对 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白的结构和功能还未被了解透彻。本研究初步确定 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白及 C 型凝集素与 wsv112 的作用, 为进一步揭示 WSSV 的侵染机制提供了一个新线索, 其相互作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- Chen QL, Ren HW, Ru BG. Progresses on the study of dUTP pyrophosphatase. *Chemistry of Life*, 2002, 22(4): 356–359 [陈巧林, 任宏伟, 茹炳根. dUTP 焦磷酸酶研究进展. *生命的化学*, 2002, 22(4): 356–359]
- Chen RX, Wang HT, Mansky LM. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *Journal of General Virology*, 2002, 83(10): 2339–2345
- Cottone R, Büttner M, McInnes CJ, *et al*. Orf virus encodes a functional dUTPases gene. *Journal of General Virology*, 2002, 83(5): 1043–1048
- Dodd RB, Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 2011, 11(5): 71–79
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246
- Gao H, Lai XF, Wang WJ, *et al*. Expression of seven kinds of lectins after WSSV challenge in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 53–58 [高焕, 赖晓芳, 王伟继, 等. 中国对虾不同凝集素基因应答 WSSV 侵染的表达差异. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 53–58]
- Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, *et al*. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Letters*, 1999, 443(2): 139–143
- Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 1998, 98(2): 637–674
- Liu XQ, Yang F. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase. *Virus Research*, 2005, 110(1–2): 21–30
- Luo T, Zhang X, Shao Z, *et al*. *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*, 2003, 551(1–3): 53–57
- McGeoch DJ. Protein sequence comparisons show that the ‘pseudoproteases’ encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(14): 4105–4110
- Ozenberger BA, Young KH. Functional interaction of ligands and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast. *Molecular Endocrinology*, 1995, 9(10): 1321–1329
- Payne SL, Elder JH. The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Current Protein & Peptide Science*, 2001, 2(4): 381–388
- Sun YD, Fu LD, Jia YP, *et al*. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, 2008, 45(2): 348–361
- Yu JH, Pan LQ. Prokaryotic expression of C-type lectin like-domain protein gene of *Portunus trituberculatus* and activity analysis of recombinant protein. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 58–63 [于金红, 潘鲁青. 三疣梭子蟹 C-型凝集素的原核表达和活性检测. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 58–63]
- Yu X, Liu X, Liu T, *et al*. Identification of a novel binding protein of FAT₁₀: Eukaryotic translation elongation factor _{1A1}. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(9): 2347–2354
- Yu XQ, Gan H, Kanost MR, *et al*. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(7): 585–597

- Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(9): 891–900
- Wang XW. Functional study of C-type lectins from decapoda crustaceans. Doctoral Dissertation of Shandong University, 2012 [王显伟. 十足目甲壳动物 C 型凝集素功能研究. 山东大学博士研究生学位论文, 2012]
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectins superfamily in the immune system. *Immunological Reviews*, 1998, 163: 19–34
- Wool IG. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, 48: 719–754
- Wool IG, Chan YL, Glück A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 1995, 73(11–12): 933–947
- Zhao LC, Chen AC, Wang MS, *et al.* Progress on the viral dUTPase. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2008, 20(2): 304–304 [招丽婵, 程安春, 汪铭书, 等. 病毒 dUTPase 研究进展. *生命科学*, 2008, 20(2): 304–304]

(编辑 马瑾艳)

Identification of the Host Interactors of wsv112 of WSSV by Yeast Two-Hybrid

WANG Zhongyi^{1,2}, LIU Qinghui¹⊙, LU Cuiyu^{1,2}, HUANG Jie¹

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The ORF wsv112 of white spot syndrome virus (WSSV) encodes a dUTPases. It plays an essential role in nucleotide biosynthesis. Hydrolysis of dUTP by UTPase produces dUMP, required for the de novo synthesis of dTTP, and maintains low cellular ratios of dUTP/dTTP, thus preventing the mis-incorporation of uracil into chromosomal DNA. In order to identify the host interactors of wsv112, wsv112 was cloned into the bait vector pGBKT7 and used to screen an intestine cDNA library of *Litopenaeus vannamei*, which had previously been constructed by yeast two-hybrid sequencing transformation. The positive clone was identified through different culture media, color change, polymerase chain reaction (PCR), and sequencing. The result showed that the bait plasmid pGBKT7-112 showed no virulence or self-activating effect on yeast strain Y2H Gold. A total of 526 blue clones were screened, which were analyzed by PCR and homology analysis using the BLAST in NCBI, and 6 possible interaction proteins of *Litopenaeus vannamei* were obtained. Then through the Yeast two-hybrid reply hybridization experiment, only two gene interactions were confirmed with the wsv112. They were identified as lectin C gene of *Marsupenaeus japonicas* (AGW27416.1) and 40S ribosomal protein S20 gene of *Procambarus clarkia* (ALE99171.1) with 37% and 98% identity. This study may provide a theoretical basis for further study of the wsv112 interaction mechanisms.

Key words WSSV; wsv112; dUTPase; Yeast two-hybrid

⊙ Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180518001

http://www.yykxjz.cn/

王震, 公丕海, 关长涛, 李娇, 史佰佰. 青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 163-171

Wang Z, Gong PH, Guan CT, Li J, Shi BB. Effect of different artificial reefs on the community structure of organisms in Shique Beach of Qingdao. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 163-171

青岛石雀滩海域人工鱼礁材料对附着生物群落结构的影响*



王震^{1,2} 公丕海² 关长涛² 李娇^{2①} 史佰佰^{1,2}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 为研究不同礁体材料对附着生物群落结构的影响,本研究在山东青岛石雀滩海域进行附着生物挂板实验,挂板材料包括普通硅酸盐水泥(P)、添加贝壳粉硅酸盐水泥(S)、钢板(F)。结果显示,共鉴定出附着生物69种,其中,贝壳粉硅酸盐水泥挂板最多(53种),其次是普通硅酸盐水泥挂板(51种),钢板最少(31种)。普通硅酸盐水泥挂板和粉硅酸盐水泥挂板的优势种均为褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)、紫贻贝(*Mytilus gallo provincialis*)和麦秆虫(*Caprella* sp.);钢板的优势种为紫贻贝、麦秆虫和青岛板钩虾(*Stenothoe qingdaoensis*)。9~11月为生物附着高峰期。粉硅酸盐水泥挂板的平均生物量最高,达到4717.50 g/m²,普通硅酸盐水泥挂板次之,为2621.12 g/m²,钢板最小,为163.85 g/m²。附着生物Shannon-Wiener多样性指数(*H'*)和Pielou均匀度指数(*J*)平均值均为钢板>普通硅酸盐水泥>粉硅酸盐水泥。研究表明,添加贝壳粉硅酸盐水泥的生物种类和生物量最大,生物附着效果最好。本研究为人工鱼礁附着生物群落特征的研究和人工鱼礁材料的选择提供了参考依据。

关键词 人工鱼礁; 附着生物; 群落结构; 多样性指数

中图分类号 S835 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)04-0163-09

随着海洋生态环境的恶化和海洋渔业资源的匮乏,人工鱼礁建设成为当前改善海洋生态环境和养护渔业资源的有效途径之一。人工鱼礁本身是一种附着基,投入海中会附着大量生物,用来改善海域生态环境,而附着生物是礁区鱼类和其他生物的饵料来源(张伟等, 2008),礁体上附着生物种类和数量的变化是人工鱼礁饵料效应的重要体现(张伟等, 2015),因此,附着生物是影响礁区聚集鱼类的重要因素之一。礁体附着生物的丰富度和多样性越高,诱集鱼类数量越多(黄宗国等, 1981),生物种类更加丰富。附着生

物的种类和数量变化直接影响人工鱼礁的生态效应。

混凝土鱼礁是常见的人工鱼礁类型,造价便宜而且稳定,可以为附着生物提供良好的附着基和栖息地,还可以为其他无脊椎动物和鱼类提供饵料和避难所。国内外已对混凝土人工鱼礁对生物附着的影响开展了一些研究,江艳娥等(2013)对比不同材料的生物诱集效果研究表明,水泥材料的诱集效果比天然礁好。Oyamada等(2008)和Kress等(2002)研究发现,混凝土混合材料礁体的附着效果显著高于纯混凝土礁体。钢制鱼礁是一种制作和使用便捷的结构,近年

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016HY-ZD0103)资助[This work was supported by Central Research Institutes of Basic Research and Public Service Special Operations (2016HY-ZD0103)]. 王震, E-mail: 1693817621@qq.com

① 通讯作者: 李娇, 高级工程师, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-18, 收修改稿日期: 2018-06-04

来,国外大力发展钢制鱼礁,钢材在水中溶解的铁离子容易使生物附着。Fitzhardinge等(1989)比较了混凝土、轮胎和金属3种材料的生物附着效果,钢板的生物附着效果最好。王莲莲等(2015)对圆洲岛人工鱼礁的附着生物群落研究表明,表面经过处理的混凝土礁体上附着生物的生物量和丰度都较高。

目前,虽然对人工鱼礁材料的研究和利用较多,但在国内添加辅助材料的混凝土人工鱼礁和钢制鱼礁对附着生物群落结构的影响却很少。本研究通过海区挂板实验,分析了普通硅酸盐水泥、添加贝壳粉硅酸盐水泥和钢板3种不同人工鱼礁材料的生物附着效果及其附着生物群落结构,以期为人工鱼礁材料的选择和石雀滩海域附着生物群落特征研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 挂板制作

3种人工鱼礁挂板包括普通硅酸盐水泥挂板(P)、添加贝壳粉硅酸盐水泥挂板(S)和钢板(F),每种材料挂板制作36个(表1)。普通硅酸盐水泥挂板和添加贝壳粉硅酸盐水泥挂板在2017年4月7日制作并开始进行养护,养护周期为28d。

1.2 实验海域

2017年5月10日在山东省青岛市石雀滩海域投放。

1.3 挂样及采样方法

将3种材料挂板用聚乙烯绳直接吊挂在空网箱

上,每条绳上3个挂板,使挂板分别沉降于海面以下0.5、2和9m水深处。2017年7、9、11月和2018年1月分别进行附着生物采样。每次采样每组材料的挂板各取3组样品,采样流程按照《海洋调查规范》(GB/T12763.6-2007)进行。采集的样品装入密封袋内并用5%的甲醛溶液固定,带回实验室鉴定分析。

1.4 数据分析

Shannon-Wiener多样性指数(H')和Pielou均匀度指数(J)的计算公式:

$$H' = - \sum_{n_i}^S (n_i / N) \log_2 (n_i / N)$$

$$J = H' / \log_2 S$$

式中, S 为样品的种类数, N 为样品的总丰度, n_i/N 为第*i*种的个数与样品总个数的比值, H' 为多样性指数。

优势度(Y)的计算公式:

$$Y = \frac{n_i}{N} f_i$$

式中, n_i/N 为第*i*种的个数与样品总个数的比值。 f_i 为该种在各样品中出现的频率。将 $Y \geq 0.02$ 的生物定为优势种, $Y \geq 0.006$ 的生物定为常见种。

采用SPSS16.0软件进行主成分分析和统计分析。主成分分析法是利用降维的思想将多个相互关联的数值转换成少数互不相关的综合指标。单因素方差分析(One-way ANOVA)检验组内差异, $P < 0.05$ 为差异显著。

表1 鱼礁挂板尺寸及数量

Tab.1 Size and quantity of artificial reef

鱼礁类型 Type of reef	代号 Code	尺寸 Size(cm)	组数 Groups
普通硅酸盐水泥 Ordinary portland cement	P	20×20×3	12
添加贝壳粉硅酸盐水泥 Scallop portland cement	S	20×20×3	12
钢板 Iron plate	F	20×20×0.3	12

2 结果

2.1 种类组成

本研究综合4次采集样品,共鉴定出附着生物69种(表2),其中,藻类9种、多毛类12种、软体动物15种、甲壳动物25种、苔藓动物3种、棘皮动物1种、脊索动物1种、扁平动物1种、刺胞动物2种。本研究中优势种为麦秆虫(*Caprella* sp.)、褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、孔石莼(*Ulva pertusa*)、青岛板钩虾(*Stenothoe qingdaoensis*);常见种为疣荔枝螺(*Thais clavigera*)、独齿围沙蚕

(*Perinereis nuntia*)、强壮藻钩虾(*Ampithoe valida*)、毛日藻钩虾(*Sunamphitoe plumosa*)、纹藤壶(*Balanus amphitrite teamphitrite*)、施氏玻璃钩虾(*Hyale schmidti*)等。

2.2 主成分分析

根据3种材料附着生物的个体数矩阵,通过主成分分析得出,每种挂板材料附着生物的主成分的个数、特征值、贡献率和代表生物见表3。从表3可以看出,3种材料挂板的第1主成分生物种类基本一致,但其他主成分中出现的生物种类存在差异。

表 2 不同材料人工鱼礁挂板附着生物种类
Tab.2 Species of attachment organisms on different-material artificial reefs

种类 Species	人工鱼礁材料 Material of artificial reef		
	普通硅酸盐水泥挂板 P	粉硅酸盐水泥挂板 S	钢板 F
浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i>	+	+	-
海蒿子 <i>S. pallidum</i>	+	+	+
褐藻 1 种 Phaeophyta	+	+	+
肠浒苔 <i>Enteromorpha intestinalis</i>	-	+	+
拟钩虾属 <i>Gammarus</i>	-	-	-
独齿围沙蚕 <i>Perinereis nuntia</i>	+	+	+
背褶沙蚕 <i>Tambalagamia fauveli</i>	-	+	+
裂虫科 1 种 Amphileptidae	+	+	-
乳突半突虫 <i>Phyllodoce papillosa</i>	+	+	-
狭细蛇潜虫 <i>Ophiodromus angustifrons</i>	-	+	-
多丝独毛虫 <i>Tharyx multifilis</i>	-	+	-
褶牡蛎 <i>O. plicatula</i>	+	+	+
圆楔樱蛤 <i>Cadella narutoensis</i>	+	+	+
扇贝 <i>Placopecta magellanicus</i>	-	+	-
东方缝栖蛤 <i>Hiatella orientalis</i>	+	+	+
梯螺科 1 种 Janthinidae	+	+	-
太平洋牡蛎 <i>Grassostrea gigas</i>	+	+	-
中华近方蟹 <i>Hemigrapsus inensis</i>	+	+	-
嫁蛾 <i>Cellana toreuma</i>	+	-	-
青岛板钩虾 <i>S. qingdaoensis</i>	+	+	+
毛日藻钩虾 <i>S. plumosa</i>	+	+	+
强壮藻钩虾 <i>A. valida</i>	+	+	+
东方小藤壶 <i>Chthamalus challengeri</i>	+	+	-
施氏玻璃钩虾 <i>H. schmidti</i>	+	+	+
理石叶钩虾 <i>Jassamarmorata</i>	-	-	+
锯齿利尔钩虾 <i>Liljeborgia serata</i>	-	+	-
高脊藤壶 <i>Balanus cristatus</i>	+	+	-
日本大螯蜚 <i>Grandidierella japonica</i>	+	+	-
豆形拳蟹 <i>Pyrhila pisum</i>	+	-	-
瓷蟹 <i>Porcellanidae</i>	-	+	-
谭氏泥蟹 <i>Ilyoplax deschampsin</i>	+	-	-
多室草苔虫 <i>Bugula neritina</i>	+	+	+
近辐蛇尾 <i>Ophiactis affinis</i>	+	+	+
纵条矾海葵 <i>Haliplanella luciae</i>	+	+	-
异管藻 <i>Heterosiphonia japonica</i>	+	+	-
孔石莼 <i>U. pertusa</i>	+	+	+
石莼 <i>U. lactuca</i>	-	+	+
水云 <i>Ectocarpus</i> sp.	-	-	+
鼠尾藻 <i>Sargassum thunbergii</i>	-	-	-
强刺鳞虫 <i>Sthenolepis japonica</i>	+	+	+
软背鳞虫 <i>Lepidonotus helotypus</i>	+	+	+
围沙蚕 <i>Perinereis</i> sp.	-	+	-
多齿围沙蚕 <i>Pernereis cultrifera</i>	+	-	+
长双须虫 <i>Phyllodocimorpha</i>	+	-	-
日本刺沙蚕 <i>Neanthes japonica</i>	+	-	-

续表 2

种类 Species	人工鱼礁材料 Material of artificial reef		
	普通硅酸盐水泥挂板 P	粉硅酸盐水泥挂板 S	钢板 F
紫贻贝 <i>M. provincialis</i>	+	+	+
翡翠贻贝 <i>Pernaviridis</i>	+	-	+
锈笔螺 <i>Mitraferruginea Lamarck</i>	+	+	+
疣荔枝螺 <i>T. clavigera</i>	+	-	+
脉红螺 <i>Rapanavenosa</i>	+	+	-
秀丽织纹螺 <i>Nassarius festiva</i>	+	-	-
短滨螺 <i>Littorina brevicula</i>	+	+	-
麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.	+	+	+
纹藤壶 <i>B.amphitri teamphitrite</i>	+	+	+
长尾亮钩虾 <i>Photislongi caudata</i>	+	+	+
瘤突地钩虾 <i>Podocerus tuberculosus</i>	+	+	-
平角涡虫 <i>Planocerareticulate</i>	-	-	-
中华原钩虾 <i>Eogammarus sinensis</i>	+	+	+
镰形叶钩虾 <i>Jassafalcata</i>	-	+	-
等足目 1 种 Isopoda	-	+	-
螺赢蜚 <i>Corophium sinense</i>	+	+	-
肉球近方蟹 <i>Hemigrapsus sanguineus</i>	+	-	-
绒毛细足蟹 <i>Raphidopus ciliates</i>	-	+	-
孔苔虫 1 种 <i>Membran iporidae</i>	+	+	-
加州草苔虫 <i>Bugula californica</i>	+	+	+
海鞘 1 种 <i>Asciacea</i> sp.	+	+	-
水媳 <i>Hydroidae</i>	+	+	-
网纹平涡虫 <i>Planocera reticulata</i>	+	+	+

表 3 附着生物种类主成分分析结果及附着生物代表种类
Tab.3 Principal component analysis results of attachment organisms and species

鱼礁材料 Material of artificial reef	主成分 Component	特征值 Eigenvalue	贡献率 Contribution rate (%)	代表生物 Representative species of attaching organisms
普通硅酸 盐水泥挂板 P	主成分 1	3.406	42.571	褶牡蛎 <i>O. plicatula</i> 、紫贻贝 <i>M. provincialis</i> 、麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.、 强壮藻钩虾 <i>A. valida</i>
	主成分 2	2.139	26.732	褶牡蛎 <i>O. plicatula</i> 、紫贻贝 <i>M. provincialis</i> 、麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.
	主成分 3	1.366	17.081	孔石莼 <i>U. pertusa</i> 、独齿围沙蚕 <i>P. nuntia</i> 、长尾亮钩虾 <i>Photislongi caudata</i>
粉硅酸盐 水泥挂板 S	主成分 1	3.785	42.051	褶牡蛎 <i>O. plicatula</i> 、青岛板钩虾 <i>S. qingdaoensis</i> 、紫贻贝 <i>M. provincialis</i> 、 麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.
	主成分 2	1.727	19.190	褶牡蛎 <i>O. plicatula</i> 、紫贻贝 <i>M. provincialis</i> 、纹藤壶 <i>B.amphitri teamphitrite</i>
	主成分 3	1.386	15.396	毛日藻钩虾 <i>S. plumosa</i> 、孔石莼 <i>U. pertusa</i> 、纹藤壶 <i>B.amphitri teamphitrite</i>
钢板 F	主成分 4	0.979	10.878	孔石莼 <i>U. pertusa</i> 、褶牡蛎 <i>O. plicatula</i> 、紫贻贝 <i>M. provincialis</i>
	主成分 1	3.285	36.505	紫贻贝 <i>M. provincialis</i> 、麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.、独齿围沙蚕 <i>P. nuntia</i> 、 圆楔樱蛤 <i>Cadella narutoensis</i> 、青岛板钩虾 <i>S. qingdaoensis</i>
	主成分 2	2.146	23.847	麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.、青岛板钩虾 <i>S. qingdaoensis</i> 、多室草苔虫 <i>Bugula neritina</i>
	主成分 3	1.772	19.687	麦秆虫 <i>Caprella</i> sp.、青岛板钩虾 <i>S. qingdaoensis</i> 、长尾亮钩虾 <i>Photislongi caudata</i>

普通硅酸盐水泥挂板提取出3个主成分,3个主成分的累积贡献率达86.384%。在第1主成分中,载荷系数最大的是强壮藻钩虾,达到0.860;在第2主成分中,载荷系数最大的为褶牡蛎,高达0.844;在第3主成分中,载荷系数最大的为独齿围沙蚕,高达0.729。

粉硅酸盐水泥挂板提取出4个主成分,4个主成分的累积贡献率达87.516%。在第1主成分中,载荷系数最大的是麦秆虫,达到0.981,青岛板钩虾次之,为0.974;在第2主成分中,载荷系数最大的是褶牡蛎,达到0.746,紫贻贝次之,为0.656;在第3主成分中,载荷系数最大的是毛日藻钩虾,达到0.774;在第4主成分中,载荷系数最大的是紫贻贝,为0.609。

钢板提取出3个主成分,3个主成分的累积贡献率达80.039%。在第1主成分中,载荷系数最大的是紫贻贝,高达0.925,圆楔樱蛤次之,为0.914;在第2主成分中,载荷系数最大的是多室草苔虫;在第3主成分中,青岛板钩虾的载荷系数最大,为0.696。

2.3 种类数量及生物量

综合4次采集样品,粉硅酸盐水泥挂板附着生物种数最高(53种),普通硅酸盐水泥挂板次之(51种),钢板最低(31种)。按月分析,2017年7月附着生物种数以粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低;9月附着生物种数以粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低;11月附着生物种数以粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低;2018年1月附着生物种数以钢板最高,粉硅酸盐水泥挂板最低(表4)。

表4 不同材料人工鱼礁挂板的附着生物种类数量
Tab.4 The species of the attachment organisms on different artificial reefs

人工鱼礁材料 Material of artificial reef	附着生物种类 Species of attachment organisms			
	2017-07	2017-09	2017-11	2018-01
普通硅酸盐水泥挂板 P	33	17	19	18
粉硅酸盐水泥挂板 S	38	25	20	16
钢板 F	21	12	6	20

综合4次采集样品,粉硅酸盐水泥挂板的平均生物量最大(4717.50 g/m²),其次是普通硅酸盐水泥挂板(2621.12 g/m²),钢板最小(163.86 g/m²)。按月分析,2017年7月生物量钢板最高,粉硅酸盐水泥挂板最低;9月生物量以粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低;11月生物量粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低;2018年

1月生物量粉硅酸盐水泥挂板最高,钢板最低(表5)。生物附着盛期为9~11月。

2.4 附着生物优势种及优势度

2017年7月,普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板2组分别有7个优势种,钢板有6个优势种。麦秆虫在普通硅酸盐水泥挂板和粉硅酸盐水泥挂板占绝对优势,优势度分别为0.56、0.65。紫贻贝在钢板中占绝对优势,优势度为0.52。2017年9月,普通硅酸盐水泥挂板有2个优势种,粉硅酸盐水泥挂板有3个优势种,钢板有4个优势种。褶牡蛎在普通硅酸盐水泥挂板和粉硅酸盐水泥挂板中占绝对优势,优势度分别为0.57、0.44。麦秆虫在钢板中占绝对优势,优势度为0.58。2017年11月,普通硅酸盐水泥挂板有4个优势种,粉硅酸盐水泥挂板有7个优势种,钢板有3个优势种。褶牡蛎在普通硅酸盐水泥挂板和粉硅酸盐水泥挂板占绝对优势,优势度分别为0.65、0.68。孔石莼在钢板中占绝对优势,优势度为0.76。2018年1月,普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板2组分别有7个优势种,钢板有8个优势种。褶牡蛎在普通硅酸盐水泥挂板和粉硅酸盐水泥挂板占绝对优势,优势度分别为0.40、0.52。麦秆虫在钢板占优势地位,优势度为0.16。

表5 不同材料人工鱼礁挂板的附着生物生物量
Tab.5 The biomass of the attachment organisms on different artificial reefs

人工鱼礁材料 Material of artificial reef	附着生物量 Biomass of attachment organisms (g/m ²)			
	2017-07	2017-09	2017-11	2018-01
普通硅酸盐水泥挂板 P	9.88	4801.09	4766.41	907.09
粉硅酸盐水泥挂板 S	7.92	7585.13	10246.10	1030.84
钢板 F	21.59	347.16	214.65	72.02

2.5 群落多样性

从图1a可以看出,Shannon-Wiener多样性指数(H')在2017年7月为普通硅酸盐水泥挂板(2.41) > 粉硅酸盐水泥挂板(2.22) > 钢板(2.21),钢板与粉硅酸盐水泥挂板差异不显著($P > 0.05$),但都与普通硅酸盐水泥挂板均有显著差异($P < 0.05$)。9月为粉硅酸盐水泥挂板(1.71) > 普通硅酸盐水泥挂板(1.33) > 钢板(1.31),差异显著($P < 0.05$)。11月为普通硅酸盐水泥挂板(1.95) > 粉硅酸盐水泥挂板(1.94) > 钢板(1.41),

普通硅酸盐水泥挂板与粉硅酸盐水泥挂板差异不显著($P>0.05$),但都与钢板均有显著差异($P<0.05$)。2018年1月为钢板(3.69)>普通硅酸盐水泥挂板(2.73)>粉

硅酸盐水泥(2.32),显著差异($P<0.05$)。4次采样多样性指数取平均值为钢板(2.16)>普通硅酸盐水泥挂板(2.11)>粉硅酸盐水泥挂板(2.05)。

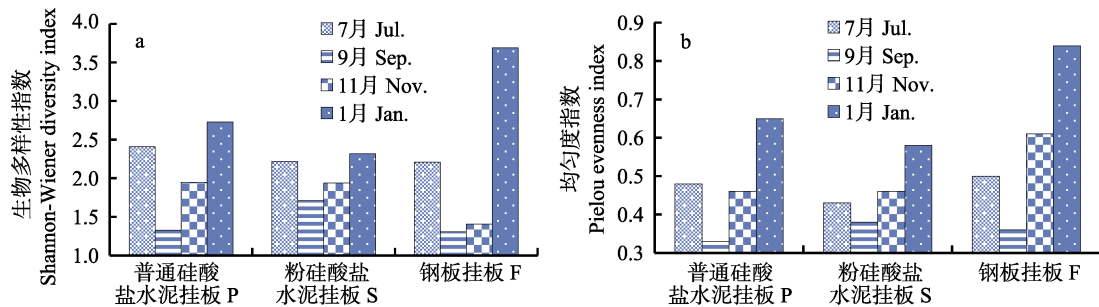


图1 不同材料挂板附着生物多样性指数变化

Fig.1 Changes of biodiversity index of attachment organisms to different material reefs

从图1可以看出, Pielou 均匀度指数(J), 在2017年7月为钢板(0.50)>普通硅酸盐水泥挂板(0.48)>粉硅酸盐水泥挂板(0.43), 差异显著($P<0.05$)。9月为粉硅酸盐水泥挂板(0.38)>钢板(0.36)>普通硅酸盐水泥挂板(0.33), 差异显著($P<0.05$)。11月为钢板(0.61)>粉硅酸盐水泥挂板(0.46)>普通硅酸盐水泥挂板(0.45), 普通硅酸盐水泥挂板与粉硅酸盐水泥挂板差异不显著($P>0.05$), 但与钢板均有显著差异($P<0.05$)。2018年1月为钢板(0.84)>普通硅酸盐水泥挂板(0.65)>粉硅酸盐水泥挂板(0.58), 差异显著($P<0.05$)。4次采样均匀度指数取平均值为钢板(0.58)>普通硅酸盐水泥挂板(0.48)>粉硅酸盐水泥挂板(0.46)。

3 讨论

青岛石雀滩海域附着生物种类主要为温水种和广温种, 褶牡蛎(王琦等, 2000)、紫贻贝(孔泳滔等, 2000)、纹藤壶(李太武等, 2001)、麦秆虫(曹善茂等, 1999)、石莼和浒苔(郝允碧等, 1990)为黄海主要的附着种类。本研究中, 普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板优势种均为褶牡蛎、紫贻贝和麦秆虫, 其中, 褶牡蛎的生物量分别占39%和36%; 钢板优势种为紫贻贝、麦秆虫和青岛板钩虾。褶牡蛎容易附着在质材坚硬、表面粗糙的附着基上, 随着普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板下水周期的延长, 褶牡蛎不断生长并逐渐在稳定群落中占据优势地位(周斌等, 2016; 孙大鹏等, 2010)。钢板附着生物主要以藻类和甲壳动物为主, 受温度影响变化大, 海藻的附着期主要在冬、春水温较低的月份, 麦秆虫各次采样中均有出现, 钢板的研究结果与以往研究不同季节的优势种存在差别的结论是一致的(方芳等, 2004; 李传燕等,

1991; 严颂凯等, 1992)。

挂板附着生物群落的组成和数量与环境因子(温度、盐度、溶解氧等)相关(Su *et al*, 2009)。7月以后, 随着温度的升高, 生物种类增多, 但个体较小造成生物量较低(Callow, 1984)。在7~11月, 褶牡蛎成为优势种, 随着褶牡蛎的生长, 附着生物群落生物量不断升高。在1月, 水温降低造成褶牡蛎和紫贻贝的新陈代谢减缓或者停止(谷进进等, 1998; 林军等, 2016)是群落生物量降低的主要原因。通过分析得出, 同种材料不同航次调查取样的附着生物种类、数量、生物量和优势种均存在差异, 这与黄梓荣等(2006)和Menon等(1971)的研究结果一致。群落在种类组成、结构功能上都与群落的多样性密切相关, 并在多样性指数上得以体现(曾呈奎等, 1959、1964)。一般来说, 多样性指数和均匀度指数越高, 该群落结构越稳定。7月多样性指数较高, 主要是由于个体小的生物占据了挂板的较大空间。7~9月, 主要优势种逐步占据挂板空间, 导致物种多样性降低, 多样性指数和均匀度指数从9月~翌年1月不断升高, 说明生物群落更加稳定和成熟。

本研究结果表明, 普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板的生物量最大且生物种类较多, 比钢板的生物附着效果好, 这与江艳娥等(2013)、Oyamada等(2008)、Kress等(2002)的研究结果一致, 表现为混凝土鱼礁比铁质鱼礁更适合附着生物生长。而Fitzhardinge等(1989)研究表明, 钢板的附着效果最好, 与本研究结果有所不同, 其主要原因是前者只是检测礁板上珊瑚的数量, 而本研究检测的是挂板上的所有附着生物的数量。同时, 粉硅酸盐水泥挂板的生物量、种数相对于普通硅酸盐水泥挂板更具优势, 说明粉硅酸盐水泥挂板的附着效果较好。Warren等

(2000)研究显示, 牡蛎贝壳礁相对于混凝土鱼礁对鱼类具有更好的诱集效果, 这与本研究结果具有一致性。粉硅酸盐水泥挂板的多样性指数和均匀度指数相对较低, 而钢板却有较高的多样性指数和均匀度指数, 可能是由于附着生物在生物量大的环境下, 通常是一种或多种生物占优势种, 相对多样性指数较小, 对此, 赵文等(2000)也有相同结论。

张伟等(2008)对混凝土鱼礁和铁质鱼礁附着生物进行了比较, 结果表明, 混凝土鱼礁比铁质鱼礁的附着效果更好。普通硅酸盐水泥挂板、粉硅酸盐水泥挂板的表面粗糙, 有利于生物的附着且对环境无污染, 而钢板作为废弃船舶和海上平台的主要材料, 虽能实现废弃物的循环利用, 但废弃物数量少且包含的有害物质会对海洋环境造成一定影响(张永波等, 2016)。粉硅酸盐水泥挂板中添加了常见的天然海洋生物材料牡蛎壳和扇贝壳, 降低了制作礁板的成本, 而且生物附着效果较好, 经济效益和生态效益均占优势。王波等(2013)研究发现, 硅酸盐水泥中添加5%~15%的贝壳混合材料后具有强度高、性能好等特点。另外, 添加扇贝粉的硅酸盐水泥鱼礁能增加鱼礁的生物亲和性, 缩短了人工鱼礁发挥生态效应的周期, 有助于生物的附着(王莲莲等, 2015)。综上所述, 添加贝壳粉硅酸盐水泥制作的人工鱼礁充分利用牡蛎壳和扇贝壳等废弃资源, 减少扇贝壳、牡蛎壳对环境的污染, 同时, 作为人工鱼礁材料其生物附着效果较好, 具有较高的生态效益和开发应用前景。

参 考 文 献

- Callow ME. A world-wide survey of fouling on non-toxic and three anti-fouling paint surfaces. 6th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, 1984, 6: 235-346
- Cao SM, Zhou YB, Mou HM. Study on species composition and distribution of fouling organisms in the water of Dalian coast. Journal of Dalian Fisheries University, 1999, 14(4): 36-42 [曹善茂, 周一兵, 牟红梅. 大连市沿海污损生物种类及分布的研究. 大连水产学院学报, 1999, 14(4): 36-42]
- Fang F, Yan T. Status quo and prospects of marine fouling studies in South China Sea. Journal of Tropical Oceanography, 2004, 23(1): 76-85 [方芳, 严涛. 南海污损生物研究的现状及展望. 热带海洋学报, 2004, 23(1): 76-85]
- Fitzhardinge RC, Bailey-Brock JH. Colonization of artificial reef materials by corals and other sessile organisms. Bulletin of Marine Science, 1989, 44(2): 567-579
- Gu JJ, Li JW. Reproductive cycle of *Ostrea plicatula* Gmelin in Zhejiang Xiangshan Harbour. Journal of Ningbo University (NSEE), 1998(1): 51-60 [谷进进, 李建伟. 象山港褶牡蛎的生殖周期研究. 宁波大学学报(理工版), 1998(1): 51-60]
- Hao YB, Sun BY, Zhu CS. The characteristics and control of fouling organisms on the lantern nets for cultivating scallops (*Peeten maximus*) in Penglai and Changdao cultivating farms. Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas, 1990, 8(1): 57-62 [郝允碧, 孙炳寅, 朱长生. 山东省烟台市蓬莱、长岛养殖场扇贝笼网上污损生物特点及其防涂的研究. 黄渤海海洋, 1990, 8(1): 57-62]
- Huang ZG, Cai RX, Xu YY. On the distributional characteristics of fouling organisms in Dongshan Bay. Acta Oceanologica Sinica, 1981, 8(2): 291-299 [黄宗国, 蔡如星, 许由焰. 东山湾附着生物分布特点. 海洋学报, 1981, 8(2): 291-299]
- Huang ZR, Liang XY, Zeng J. Preliminary study on effects of accrete organisms of artificial reef material. South China Fisheries Science, 2006, 2(1): 35-38 [黄梓荣, 梁小芸, 曾嘉. 人工鱼礁材料生物附着效果的初步研究. 南方水产, 2006, 2(1): 35-38]
- Jiang YE, Chen PM, Lin ZJ, et al. Comparison of effectiveness of various artificial reef materials for fish attraction. Journal of Applied Oceanography, 2013, 32(3): 418-424 [江艳娥, 陈丕茂, 林昭进, 等. 不同材料人工鱼礁生物诱集效果的比较. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 418-424]
- Kong YT, Wang Q, Cheng ZM, et al. Fouling organisms and control in ocean-based cultivation of abalone (*Haliotis discus hannai*). Marine Environmental Science, 2000, 19(1): 40-43 [孔泳滔, 王琦, 程振明, 等. 皱纹盘鲍筏式养殖中的污损生物及其防治. 海洋环境科学, 2000, 19(1): 40-43]
- Kress N, Tom M, Spanier E. The use of coal fly ash in concrete for marine artificial reefs in the southeastern Mediterranean: compressive strength, sessile biota, and chemical composition. ICES Journal of Marine Science, 2002, 59(s1): 231-237
- Li CY, Huang ZG, Zheng ZX, et al. A preliminary study attaching organisms on artificial reef in Daya Bay. Chinese Journal of Applied Ecology, 1991, 2(1): 63-69 [李传燕, 黄宗国, 郑成兴, 等. 大亚湾人工鱼礁附着生物的初步研究. 应用生态学报, 1991, 2(1): 63-69]
- Lin J, Deng MX, Zhang SY, et al. Seasonal variation of surface water temperature and its ecological impacts in a mussel aquaculture farm. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(6): 918-926 [林军, 邓明星, 章守宇, 等. 贻贝养殖海域表层水温季节变化及其对紫贻贝生长的影响. 上海海洋大学学报, 2016, 25(6): 918-926]
- Li TW, Su XR, Chi QH, et al. Preliminary study of marine harmful fouling organisms and control in cultivation of shellfish. Fisheries Science, 2001, 20(6): 12-14 [李太武, 苏秀榕, 迟庆宏, 等. 养殖贝类附着敌害生物的初步研究. 水产科学, 2001, 20(6): 12-14]

- Menon NR, Nair NB. Ecology of fouling bryozoans in Cochin waters. *Marine Biology*, 1971, 8(4): 280–307
- Oyamada K, Tsukidate M, Watanabe K, *et al.* A field test of porous carbonated blocks used as artificial reef in seaweed beds of *Ecklonia cava*. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5): 413–418
- Su ZX, Xiao H, Huang LM. Effect of fouling in Daya Bay scallop *Chlamys nobilis* (Reeve) cultivation: Food competition and nutrient release. *Marine Science Bulletin*, 2009, 11(2): 37–44
- Sun DP, Shao MY, Ma YB, *et al.* Research on species composition and distribution of large-scale fouling organisms on scallop farming cages using test panels. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2010, 40(9): 84–90 [孙大鹏, 邵明瑜, 马玉彬, 等. 扇贝养殖笼大型污损生物种类组成及分布的挂板研究. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2010, 40(9): 84–90]
- Wang B, Shang F, Li XT, *et al.* Effects of shell admixture on properties of Portland cement. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2013, 26(3): 231–234 [王波, 尚飞, 李学亭, 等. 贝壳混合材对硅酸盐水泥性能的影响. *烟台大学学报 (自然科学与工程版)*, 2013, 26(3): 231–234]
- Wang LL, Chen PM, Li XG, *et al.* Attaching organism community characteristics of different surface on artificial reef templates inshore of Yuanzhou island. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2015, 43(3): 171–174, 178 [王莲莲, 陈丕茂, 黎小国, 等. 圆洲岛近岸不同表面处理的鱼礁模板附着生物群落特征. *安徽农业科学*, 2015, 43(3): 171–174, 178]
- Wang Q, Kong YT, Cheng ZM, *et al.* Studies on ocean-based poly-culture of abalone (*Haliotis discus hannai*) and sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *Fisheries Science*, 2000, 19(3): 15–18 [王琦, 孔泳滔, 程振明, 等. 皱纹盘鲍与光棘球海胆筏式混养研究. *水产科学*, 2000, 19(3): 15–18]
- Warren J, McCall R, Hendon L, *et al.* Assessment and monitoring of artificial inshore low profile reefs located adjacent to Mississippi's coastal marshes// Final Report Submitted to Mississippi Department of Marine Resources. Washington DC: Department of Environment, 2000, 279
- Yan SK, Huang ZG. Destruction biota of piers in Daya Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 1992(3): 114–120 [严颂凯, 黄宗国. 大亚湾码头桩柱的污损生物群落. *海洋学报*, 1992(3): 114–120]
- Zeng CK, Zhang JF. Reviews of benthic algae records in the western Yellow Sea. *Marine Science Journal*, 1964(6): 1–25 [曾呈奎, 张峻甫. 黄海西部底栖藻类记录的评论. *海洋科学集刊*, 1964(6): 1–25]
- Zeng CK, Zhang JF. On the economic marine algal flora of the Yellow Sea and the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1959, 2(1): 43–52 [曾呈奎, 张峻甫. 黄海和东海的海藻区系. *海洋与湖沼*, 1959, 2(1): 43–52]
- Zhang YB, Wang JY, Xin JF. A review of studies on artificial reef engineering technology. *China Academic Journal Electronic Publishing House*, 2016, 43(6): 70–75 [张永波, 王继业, 辛峻峰. 人工鱼礁工程技术进展研究. *渔业现代化*, 2016, 43(6): 70–75]
- Zhang W, Li CH, Jia XP, *et al.* A review on influential factors of fouling organisms on artificial reef. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(1): 64–68 [张伟, 李纯厚, 贾晓平, 等. 人工鱼礁附着生物影响因素研究进展. *南方水产*, 2008, 4(1): 64–68]
- Zhang W, Li CH, Jia XP, *et al.* Seasonal variation of biofouling communities on concrete and steel reefs in Daya Bay. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(1): 9–17 [张伟, 李纯厚, 贾晓平, 等. 大亚湾混凝土鱼礁和铁质鱼礁附着生物群落结构的季节变化. *南方水产科学*, 2015, 11(1): 9–17]
- Zhao W, Dong SL, Zheng WG, *et al.* Effects of Nile tilapia on plankton in enclosures with different treatments in saline-alkaline ponds. *Zoological Research*, 2000, 21(2): 108–114 [赵文, 董双林, 郑伟刚, 等. 罗非鱼对盐碱池塘围隔浮游生物群落的影响. *动物学研究*, 2000, 21(2): 108–114]
- Zhou B, Feng CH, Liu W, *et al.* Ecological research of fouling organisms on the offshore platform in Bohai Sea. *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(3): 9–13 [周斌, 冯春辉, 刘伟, 等. 渤海石油平台污损生物生态研究. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 9–13]

(编辑 陈 严)

Effect of Different Artificial Reefs on the Community Structure of Organisms in Shique Beach of Qingdao

WANG Zhen^{1,2}, GONG Pihai², GUAN Changtao², LI Jiao²^①, SHI Baibai^{1,2}

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

Abstract To study the structure of organism attachment on artificial reefs made of different materials, we prepared artificial reefs with three types of materials: Ordinary portland cement(P), scallop shell portland cement (S), and iron plates(F). The artificial reefs were exposed to the marine environment near Shique Beach, Qingdao, in May 2017. We collected samples to analyze the effect of different reef materials on organism attachment on the artificial reef in July, September, November, 2017 and January 2018. The results showed that, in total, 69 species of attached organisms were identified. The numbers of species on ordinary portland cement, scallop portland cement, and iron plate reefs were 51, 53, and 31, respectively. The dominant species on the ordinary portland cement and scallop portland cement reefs were *Caprella* sp., *Ostrea plicatula*, and *Mytilusgallo provincialis*; the dominant species on iron plate reefs were *Caprella* sp., *M. provincialis*, and *Stenothoe qingdaoensis*. Biological attachment peaked between September and November. We found the highest average biomass of fouling organisms on scallop portland cement (4717.50 g/m²), followed by ordinary portland cement (2621.12 g/m²), and iron plates (163.85 g/m²). In July 2017, the Shannon-Wiener diversity index (*H'*) of fouling organisms was observed to follow the order P>S>F; in September 2017, the order was S>P>F; in November 2017, the order was P>S>F; and in January 2018, the order was F>P>S. In July 2017, the Pielou evenness index (*J*) followed the order F>P>S. In September 2017, the order was S>F>P; in November 2017, the order was F>S>P; and in January 2018, the order was F>P>S. Our study showed that scallop portland cement attracted the largest biological species and biomass, and was most suitable for organism attachment. This study provides a reference for the evaluation of the characteristics of biological communities attached to artificial reefs and the selection of artificial reef materials.

Key words Artificial reef; Organisms attachment; Community structure; Diversity index

① Corresponding author: LI Jiao, E-mail: lijiao@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180425002

http://www.yykxjz.cn/

梁述章, 宋炜, 蒋科技, 谌微, 李羽, 马凌波. 棘头梅童鱼染色体核型分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 172-177

Liang SZ, Song W, Jiang KJ, Chen W, Li Y, Ma LB. Karyotype analysis of *Collichthys lucidus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 172-177

棘头梅童鱼染色体核型分析*



梁述章^{1,2} 宋炜^{1,2①} 蒋科技^{1,2} 谌微¹ 李羽^{1,2} 马凌波¹

(1. 农业农村部远洋与极地渔业创新重点实验室 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 以棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)为实验材料,经胸腔注射植物血球凝集素(PHA)和秋水仙素,取其头肾组织,进行低渗、固定,采用空气干燥法制片,吉姆萨染液染色,观察棘头梅童鱼染色体核型和特征。结果显示,棘头梅童鱼染色体数目为 $2n=48$,占所观察分裂相的83.3%;核型公式为 $2n=48t$,染色体臂数NF为48,染色体相对长度范围为 $(5.694\pm 0.514)\sim(3.039\pm 0.161)$,属于鲈形目原始核型,且符合典型的高位类鱼类核型特征。研究中未发现与性别相关的异型染色体、次缢痕及随体等。本研究为棘头梅童鱼的细胞遗传学研究提供了基础资料,并为其种质鉴定提供参考数据。

关键词 棘头梅童鱼; 染色体; 核型

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0172-06

棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)属鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、梅童鱼属(*Collichthys*),是近海常见的底栖性小型经济鱼类,广泛分布于黄渤海、东海和南海(朱元鼎等,1963b;宋炜等,2017)。棘头梅童鱼是大黄鱼、小黄鱼、带鱼、乌贼等主要经济鱼类的重要饵料,在海洋生态系统食物链中扮演重要角色;其肉质细嫩可口,营养丰富,深受消费者的青睐,具有较高的经济价值和潜在的开发前景(吴常文等,1991; Song *et al.*, 2016)。

染色体是生物遗传信息的载体,特定的生物体具有特定数目、形态特征的染色体。研究鱼类的染色体,对研究鱼类的遗传变异规律、系统演化与分类、发育机制以及杂交育种等均有重要意义(周伯春等,2009; Amores *et al.*, 2014; 史宝等,2017)。目前,国内外对棘头梅童鱼的研究主要集中在形态分类(朱元鼎等,

1963a; 区又君等,2012)、资源评估(沈新强等,2011; 胡艳等,2015)、遗传分化(Song *et al.*, 2014; 赵明等,2015)和功能基因克隆(Song *et al.*, 2016)等方面,有关棘头梅童鱼染色体的细胞遗传学研究报道仅见于Zhang等(2018)。本研究对棘头梅童鱼的染色体核型进行分析,旨在丰富棘头梅童鱼的细胞遗传学知识,同时,为棘头梅童鱼种质鉴定和我国石首鱼类系统演化研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于2017年6月在福建宁德市富发水产有限公司进行,所用棘头梅童鱼体长为13~15 cm,体重为50~60 g,雌雄各6尾,活力良好。

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(东 2018Z01)和国家种质平台项目(DKA30470)共同资助 [This work supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (East 2018Z01), and National Infrastructure Project of Germplasm Resources (DKA30470)]. 梁述章, E-mail: szlianglst@163.com

① 通讯作者: 宋炜, 副研究员, E-mail: swift83@sina.com

收稿日期: 2018-04-25, 收修改稿日期: 2018-06-25

1.2 染色体标本制备

将实验用鱼进行麻醉,于胸鳍基部注射植物血球凝集素(PHA),剂量为 $2\ \mu\text{g/g}$ (鱼的体重)。注射后放回暂养池,6 h后在相同部位注射秋水仙素溶液,剂量为 $1\ \mu\text{g/g}$ (鱼的体重)。分别在2 h和5 h后断尾放血10 min(每次雌雄各3尾),取头肾组织于烧杯中剪碎,加入适量生理盐水搅拌均匀后静置15 min,用吸管吸取上层细胞悬液,离心收集细胞。用 $0.075\ \text{mol/L}$ KCl溶液低渗处理35 min,离心得到沉淀后,加入新鲜配制的卡诺氏固定液(甲醇:乙酸=3:1)固定3次(依次为30、20和10 min),每次固定后,离心弃去固定液,加入新鲜预冷的固定液4 ml。PHA及秋水仙素溶液均使用0.75%的生理盐水配制,棕色瓶避光保存。离心均为1500 r/min,5 min。

将沉淀轻轻吹打均匀后用干净的预冷冻玻片进行滴片,滴片高度为50 cm以上,滴片后迅速在酒精灯火焰上方短暂烘烤2次,室温自然干燥。干燥后的染色体玻片用吉姆萨染色液染色25 min。

1.3 核型分析

通过显微镜观察,选取染色体分散良好的中期分裂相进行染色体数目统计,显微照相记录,根据众数确定染色体数目。选取20个染色体数目完整、分散良好并且形态清晰的分裂相进行显微摄影、测量和分析。按照Levan等(1964)提出的标准进行核型分析,按臂比将染色体分为4组:(1)中部着丝点染色体为m组,臂比为1.00~1.70;(2)亚中部着丝点染色体为sm组,臂比为1.71~3.00;(3)亚端部着丝点染色体为st组,臂比为3.01~7.00;(4)端部着丝点染色体为

t组,臂比 ≥ 7.00 。m和sm型染色体的臂数为2,t和st型染色体的臂数为1,染色体相对长度=(单条染色体长度 $\times 2$ /全部染色体总长度) $\times 100$ 。

2 结果

2.1 染色体数目

镜检102个染色体分散良好的中期分裂相(图1),并进行计数统计。结果显示,染色体数目为48的有85个,占全部计数细胞的83.3%,据此确定棘头梅童鱼染色体数目 $2n=48$ (表1)。

表1 棘头梅童鱼染色体数目
Tab.1 The chromosome number of *C. lucidus*

染色体数目(2n) Number of chromosomes	< 46	46	47	48	> 48
分裂相数目 Number of metaphase	5	1	6	85	5
所占百分比(%) Percentage of metaphase	4.9	0.98	5.88	83.3	4.9

2.2 染色体核型

选取20个数目完整、形态清晰且着丝点清楚的中期分裂相进行观察和测量,并计算其相对长度及臂比,结果见表2。棘头梅童鱼染色体臂比值均为 ∞ ,为端部着丝粒染色体(t型),相对长度范围为 $(5.694 \pm 0.514) \sim (3.039 \pm 0.161)$ 。棘头梅童鱼的核型公式为 $2n=48, 48t$,臂数 $NF=48$;未发现异型性染色体、随体染色体和次溢痕(图1)。

表2 棘头梅童鱼染色体的相对长度和臂比值(平均值 \pm 标准差)

Tab.2 The relative length and arm ratio of chromosome *C. lucidus* (Mean \pm SD)

编号 No.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type	编号 No.	相对长度 Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Type
1	5.694 \pm 0.514	∞	t	13	4.092 \pm 0.102	∞	t
2	5.269 \pm 0.412	∞	t	14	4.049 \pm 0.097	∞	t
3	4.989 \pm 0.278	∞	t	15	3.970 \pm 0.119	∞	t
4	4.795 \pm 0.125	∞	t	16	3.893 \pm 0.101	∞	t
5	4.671 \pm 0.115	∞	t	17	3.831 \pm 0.103	∞	t
6	4.586 \pm 0.109	∞	t	18	3.759 \pm 0.120	∞	t
7	4.490 \pm 0.101	∞	t	19	3.689 \pm 0.123	∞	t
8	4.404 \pm 0.098	∞	t	20	3.617 \pm 0.144	∞	t
9	4.326 \pm 0.089	∞	t	21	3.522 \pm 0.140	∞	t
10	4.267 \pm 0.079	∞	t	22	3.409 \pm 0.134	∞	t
11	4.212 \pm 0.079	∞	t	23	3.274 \pm 0.151	∞	t
12	4.153 \pm 0.090	∞	t	24	3.039 \pm 0.161	∞	t



图1 棘头梅童鱼染色体中期分裂相(A)及核型(B)

Fig.1 The metaphase chromosomes (A) and karyotype (B) of *C. lucidus*

3 讨论

近年来,随着海水鱼类养殖业迅速发展和研究深入,海水鱼类染色体核型的研究也不断增加。据报道,我国已有 100 多种海水鱼类染色体核型被研究分析,且多为我国近海水域的经济鱼类(赵金良, 2000; 卓孝磊等, 2007), 其中, 鲈形目种类最多。本研究参考众多鲈形目鱼类的染色体研究方法(全成干等, 2000; 尤峰等, 1998; 孟庆磊等, 2010; 黄永春等, 2011), 确定低渗时间为 35 min。由于棘头梅童鱼严重的应激反应, 将 PHA 作用时间减短为 6 h。秋水仙素浓度高、作用时间过长会使染色体有不同程度的皱缩现象, 反之, 又很难富集中期分裂相, 为使用合适浓度和处理时间的秋水仙素处理, 查阅石首鱼科的染色体研究资料(全成干等, 2000; 尤峰等, 1998; 王金星等, 1994), 确定秋水仙素浓度为 1 $\mu\text{g/g}$ (鱼的体重), 将秋水仙素的作用时间分为 2 h 和 5 h。结果显示, 2 h 秋水仙素处理获得的染色体分裂相较理想。

表3 部分鲈形目海水鱼类的染色体核型
Tab.3 Karyotype of some marine fishes of Perciformes

科 Family	种 Species	$2n$	核型公式 Karyotype formulae	臂比 NF	异型染色体 Heterosomal chromosomes	参考文献 Reference
石首鱼科 Sciaenidae	大黄鱼	48	48t	48	未发现	邹曙明等(2003)
	<i>Larimichthys crocea</i>	48	46t+2st	48	未发现	全成干等(2000)
	小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	48	48t	48	第 1 对染色体有次缢痕	王金星等(1994)
	黄姑鱼 <i>Albiflora croaker</i>	48	48t	48	第 1 对染色体有次缢痕	王金星等(1994)
		48	48t	48	第 3 对染色体有次缢痕	喻子牛等(1996)
	皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belangerii</i>	48	48t	48	第 1 对染色体有次缢痕	王金星等(1994)
	美国红鱼 <i>Sciaenops ocellatus</i>	48	48t	48	未发现	尤峰等(1998)
						王晓燕等(2012)
	鳊鱼 <i>Miichthys miiuy</i>	48	48t	48	未发现	阳芳等(2016)
						邹禹等(2018)
		48	2m+2sm+44t	52	未发现	郑天伦等(2013)
	鳊状黄姑鱼 <i>Nibea miichthioides</i>	48	48t	48	未发现	王德祥等(2006)
	棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	48/47	48t 46t+1m	48	$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	Zhang 等(2018)
		48	48t	48	未发现	本研究
篮子鱼科 Siganidae	长鳍篮子鱼 <i>Siganus canaliculatus</i>	48	48t	48	未发现	舒琥等(2010)
金梭鱼科 Sphyraenidae	梭鱼 <i>Sphyraenus</i>	48	48t	48	未发现	喻子牛等(1995)
鲷科 Serranidae	花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	48	48t	48	未发现	王金星等(1994)
	七带石斑鱼 <i>Epinephelus septemfasciatus</i>	48	48t	48	未发现	钟声平等(2010)

小島吉雄(1979)通过对鱼类染色体核型统计研究, 在 Gosline(1971)划分演化类群的基础上, 将真骨

鱼分为低位类、中位类和高位类三个演化类群, 高位类群的染色体数目分布收敛, 在 42~48 的范围内, 峰

值 $2n=48$, M 型染色体(m 型和 sm 型)少, A 型染色体(t 型和 st 型)多, 且主要为端着丝粒染色体(t 型), 臂比少。棘头梅童鱼染色体数目为 $2n=48$, 且全部为 t 型染色体, $NF=48$, 符合典型的高位类群核型特征。王德祥等(2006)认为在特定的演化类群中, 染色体数目 $2n=48$ 且全部为 t 或 st 染色体的是原始核型, 由此判定, 棘头梅童鱼染色体在进化上也属于原始核型。已有核型报道的海水鱼类中, 符合原始核型的海水鱼类有 64 种, 其中, 鲈形目 45 种, $2n=48t$ 的有 25 种, 占 55.6%, 说明鲈形目海水鱼类核型相对稳定, 大部分属于高位类群原始核型, 与鲤形目等臂比多且 A 型染色体比例低的低位类群核型存在显著差异(蒋进等, 2009), 这可能与海洋鱼类生活的环境较为稳定有关, 故多数鱼类保持着原始核型。

虽然海水鱼类核型比淡水鱼核型稳定, 但结构与演化过程却较为复杂, 物种的核型演化主要是通过染色体重组, 由原始核型通过罗伯逊易位、着丝点融合等形成其他核型(王梅林等, 2000)。如表 3 所示, 石首鱼科海洋鱼类染色体以 $2n=48t$ 、 $NF=48$ 为主, 与篮子鱼科的长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)(舒琰等, 2010)、金梭鱼科的梭鱼(*Sphyrænus*)(喻子牛等, 1995)以及鲷科的花鲈(*Lateolabrax maculatus*)(王金星等, 1994)等核型一致, 说明海洋鱼类核型演化具有保守性和趋同性, 这可能与海洋环境的稳定以及海洋生物染色体演化速率慢有关。本研究中, 棘头梅童鱼核型公式为 $2n=48t$, 而 Zhang 等(2018)研究所得棘头梅童鱼核型公式为 $2n=48t$ (雌鱼)和 $2n=46t+1m$ (雄鱼), 在不同报道中同一物种的核型有所差异较为常见, 例如表 3 中列出的大黄鱼和鲉鱼的研究结果也有不一致性, 这说明核型演化具有多态性特点, 不同地理分布、同一物种的核型不一定相同, 甚至差别显著, 也可能与实验方法和染色体存在变异有关。今后有必要收集棘头梅童鱼不同地理群体, 特别是繁殖季节成熟的雌、雄鱼, 通过不同的方法进一步分析和验证棘头梅童鱼核型结构。

参 考 文 献

- Amores AA, Catchen J, Nanda I, *et al.* A RAD-tag genetic map for the platyfish (*Xiphophorus maculatus*) reveals mechanisms of karyotype evolution among teleost fish. *Genetics*, 2014, 197(2): 625–641
- Gosline WA. Teleosts. Book reviews: Functional morphology and classification of Teleostean fishes). *Science*, 1972, 176
- Hu Y, Zhang T, Yang G, *et al.* Assessment of resource situation of *Collichthys lucidus* in coastal waters of the Yangtze estuary. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(9): 2867–2873 [胡艳, 张涛, 杨刚, 等. 长江口近岸水域棘头梅童鱼资源现状的评估. *应用生态学报*, 2015, 26(9): 2867–2873]
- Huang YC, Li WJ, Lin XR, *et al.* Morphology, chromosome karyotype and nuclear DNA contents of red tilapia. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(5): 3–8 [黄永春, 李文静, 林祥日, 等. 星洲红鱼形态、染色体组型及细胞核 DNA 含量的分析. *淡水渔业*, 2011, 41(5): 3–8]
- Jiang J, Li MY, Wu EM. Karyotype analysis of *Acrossocheilus fasciatus*. *Freshwater Fisheries*, 2009(3): 77–79 [蒋进, 李明月, 吴尔苗. 光唇鱼染色体核型分析. *淡水渔业*, 2009(3): 77–79]
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201–220
- Meng QL, An L, Wang CW, *et al.* Karyotype analysis in the black bream (*Hephaestus fuliginosus*). *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(3): 76–79 [孟庆磊, 安丽, 王成武, 等. 淡水黑鲷染色体核型分析. *淡水渔业*, 2010, 40(3): 76–79]
- Ojima. *Aquatic biology and genetic breeding*. Tokyo: Water Delivery Press, 1979, 46–62 [小島吉雄. 水生生物及遗传育种. 东京: 水交出版社, 1979, 46–62]
- Ou YJ, Liao R, Li JE, *et al.* Application of otolith morphology in species discrimination for *Bahaba flavolabiata*, *Pseudosciaena crocea*, *Wak tingi* and *Collichthys lucidus*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 24: 143–147 [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 耳石形态在黄唇鱼、大黄鱼、丁氏鲷和棘头梅童鱼种类识别中的应用. *广东农业科学*, 2012, 24: 143–147]
- Quan CG, Wang J, Ding SX, *et al.* The karyotypes of *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2000, 39(1): 107–110 [全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼染色体核型研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(1): 107–110]
- Shen XQ, Shi YR, Chao M, *et al.* Fish community structure of the Yangtze River estuary in summer and autumn. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(5): 700–710 [沈新强, 史赞荣, 晁敏, 等. 夏、秋季长江口鱼类群落结构. *水产学报*, 2011, 35(5): 700–710]
- Shi B, Liu YS, Liu XZ, *et al.* Study on the karyotype of Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 136–141 [史宝, 刘永山, 柳学周, 等. 黄条鲷染色体核型分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 136–141]
- Shu H, Huang CY, Zhang HF, *et al.* Study on the karyotypes of *Siganus canaliculatus*. *Journal of Guangzhou University (Natural Science)*, 2010, 9(1): 90–93 [舒琰, 黄萃莹, 张海发, 等. 长鳍篮子鱼的染色体组型研究. *广州大学学报(自然科学版)*, 2010, 9(1): 90–93]
- Song N, Ma GQ, Zhang XM, *et al.* Genetic structure and historical demography of *Collichthys lucidus* inferred from mtDNA sequence analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 2014, 97(1): 69–77

- Song W, Jiang KJ, Zhang FY, *et al.* Characterization, molecular cloning, and expression analysis of Ecsit in the spinyhead croaker, *Collichthys lucidus*. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(1): gmr 15017193
- Song W, Meng YY, Jiang KJ, *et al.* Analysis of genetic diversity among seven wild *Collichthys lucidus* populations by using microsatellite marker. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(1): 31–39 [宋炜, 孟永永, 蒋科技, 等. 棘头梅童鱼七个野生群体遗传多样性的微卫星分析. *水产学报*, 2017, 41(1): 31–39]
- Song W, Zhao MD, Jiang KJ, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a matrix Gla protein gene in spinyhead croaker, *Collichthys lucidus*. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(4): gmr 15049028
- Wang DX, Su YQ, Wang SF, *et al.* The karyotypes and their polymorphisms of the *Pseudosciaena crocea* from different populations. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28(6): 176–178 [王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 不同地理种群大黄鱼染色体核型的比较研究. *海洋学报*, 2006, 28(6): 176–178]
- Wang JX, Zhao XF, Wang XM, *et al.* Karyotype analysis for seven species of Clupeiform and Perciform fishes. *Zoological Research*, 1994, 15(2): 76–79 [王金星, 赵小凡, 王相民, 等. 鲱形目和鲈形目七种鱼的核型分析. *动物学研究*, 1994, 15(2): 76–79]
- Wang ML, Zheng JS, Zhu LY, *et al.* Advances on karyotype study of marine fish and shellfish in China. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2000, 30(2): 277–284 [王梅林, 郑家声, 朱丽岩, 等. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2000, 30(2): 277–284]
- Wang XY, Wang SF, Zhang JS, *et al.* The karyotype, Ag-NORs and C-banding of *Sciaenops ocellata*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 84–87 [王晓艳, 王世锋, 张建设, 等. 美国红鱼(*Sciaenops ocellata*)的核型、Ag-NORs 和 C-带分析. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 84–87]
- Wu CW, Wang WH. The biology distribution and resources changes of *Collichthys lucidus* in Zhejiang offshore. *Marine Fishery*, 1991(1): 6–10 [吴常文, 王伟宏. 浙江近海棘头梅童鱼的分布、生物学与资源变动. *海洋渔业*, 1991(1): 6–10]
- Yang F, Chen RY, Zhan W, *et al.* Karyotype analysis of *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2016, 35(4): 291–294 [阳芳, 陈睿毅, 詹炜, 等. 鲢鱼染色体核型分析. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2016, 35(4): 291–294]
- You F, Liu J, Xu C. Study on the karyotypes in the red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Marine Sciences*, 1998, 2: 51–53 [尤峰, 刘静, 徐成. 美国红鱼的核型研究. *海洋科学*, 1998, 2: 51–53]
- Yu ZN, Kong XY, Xie ZY, *et al.* Studies on the chromosomes of five species of marine fish. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1996, 26(1): 44–48 [喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗墉, 等. 五种经济海水鱼类的染色体研究. *青岛海洋大学学报*, 1996, 26(1): 44–48]
- Yu ZN, Kong XY, Xie ZY. Studies on karyotype of fishes of economic importance in coastal waters of Shandong Peninsula. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1995, 2(2): 1–6 [喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗墉. 山东近海 21 种经济鱼类的核型研究. *中国水产科学*, 1995, 2(2): 1–6]
- Zhang SK, Zheng J, Zhang J, *et al.* Cytogenetic characterization and description of an $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Collichthys lucidus* (Richardson, 1844). *Acta Oceanologica Sinica*, 2018, 37(4): 34–39
- Zhao JL. A review of studies on karyotypes of marine fish and salted freshwater fish in China. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2000, 9(4): 344–347 [赵金良. 我国海水鱼和咸淡水鱼染色体组型研究概述. *上海海洋大学学报*, 2000, 9(4): 344–347]
- Zhao M, Song W, Ma CY, *et al.* Population genetic structure of *Collichthys lucidus* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 sequence. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 233–242 [赵明, 宋炜, 马春艳, 等. 基于线粒体 *COI* 基因序列的棘头梅童鱼 7 个野生群体遗传结构分析. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 233–242]
- Zheng TL, Zhang HQ, Zhang XH. Genetic diversity and conservation strategies of *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2013(9): 1183–1186 [郑天伦, 张海琪, 张晓辉. 鲢鱼的遗传多样性现状及保护策略. *浙江农业科学*, 2013(9): 1183–1186]
- Zhong SP, Chen C, Wang J, *et al.* Chromosome karyotype of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 150–155 [钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 150–155]
- Zhou BC, Shu H, Liu F, *et al.* Karyotypes in three marine important fish species. *Fisheries Science*, 2009, 28(6): 325–328 [周伯春, 舒琥, 刘锋, 等. 3 种海产经济鱼类的染色体组型研究. *水产科学*, 2009, 28(6): 325–328]
- Zhu YD, Luo YL, Wu HL. Study on the classification system of Chinese Sciaenidae and the narration of new families and new species. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1963a, 70–73 [朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述. 上海: 上海科学技术出版社, 1963a, 70–73]
- Zhu YD, Wu HL. *Fishes annals of East China Sea*. Beijing: Science Press, 1963b, 286–293 [朱元鼎, 伍汉霖. 东海鱼类志. 北京: 科学出版社, 1963b, 286–293]
- Zhuo XL, Zou JX. Advances in karyotype and chromosome banding studies of marine fish in China. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 26(5): 73–80 [卓孝磊, 邹记兴. 我国海水鱼类核型及染色体显带研究进展. *热带海洋学报*, 2007, 26(5): 73–80]
- Zou SM, Li SF, Zhao JL, *et al.* Karyotype of *Pseudosciaena crocea* in Guanjingyang of Fujian. *Journal of Shanghai*

Ocean University, 2003, 12(2): 179–181 [邹曙明, 李思发, 赵金良, 等. 福建官井洋海区大黄鱼的染色体核型分析. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 179–181]
Zou Y, Zheng J, Zhang J, *et al.* Chromosome identification and

karyotype characterization of *Miichthys miuy*. Journal of Xiamen University(Natural Science), 2018, 57(2): 208–213 [邹禹, 郑娇, 张静, 等. 鳎染色体的识别及核型特征分析. 厦门大学学报(自然科学版), 2018, 57(2): 208–213]

(编辑 冯小花)

Karyotype Analysis of *Collichthys lucidus*

LIANG Shuzhang^{1,2}, SONG Wei^{1,2}①, JIANG Keji^{1,2}, CHEN Wei¹, LI Yu^{1,2}, MA Lingbo¹

(1. Key Laboratory of Oceanic and Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In this study, the metaphase chromosomes of *Collichthys lucidus* were obtained from kidney tissue by the method of PHA and colchicine injection-air drying method. The experimental fishes were taken from Ningde coast of China. Because of their strong stress, we adjusted the drug treatment time (PHA: 6 h; Colchicine: 2 h, 5 h). In order to identify whether there were heteromorphic chromosomes, we separated the female from the male. The results showed that there were 48 chromosomes in *C. lucidus* and its karyotype formula was $2n=48t$, $NF=48$. The relative length of chromosome was in the range of $(5.694\pm 0.514)\sim(3.039\pm 0.161)$, which suggested that *C. lucidus* was in accordance with the original karyotype of perciformes and the higher group of fish evolutionary taxonomy. Sex chromosome, satellite chromosome and secondary constrictions were not found in *C. lucidus*. This study provides basic data for cytogenetics and germplasm identification for *C. lucidus*.

Key words *Collichthys lucidus*; Chromosome; Karyotype

① Corresponding author: SONG Wei, E-mail: swift83@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180324001

http://www.yykxjz.cn/

焦奎, 高翔, 于佳, 魏玉西, 高洁, 张雪梅, 王金梅, 李钰金. 酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 178-184

Jiao K, Gao X, Yu J, Wei YX, Gao J, Zhang XM, Wang JM, Li YJ. Study of the preparation of compound amino acid-chelated calcium by protease hydrolysis of scallop skirts. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 178-184

酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究*

焦 奎¹ 高 翔¹ 于 佳¹ 魏玉西^{1①} 高 洁¹
张雪梅¹ 王金梅² 李钰金²

(1. 青岛大学生命科学学院 青岛 266071; 2. 荣成泰祥食品股份有限公司 荣成 264309)

摘要 扇贝裙边富含蛋白质、脂质等营养成分。为了高值化利用扇贝裙边,本研究选用中性蛋白酶、动物蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶 5 种酶,以酶解液中游离氨基酸态氮为考察指标,对扇贝裙边进行酶解工艺条件探讨。首先,将 5 种酶制成复合蛋白酶进行正交实验,确定最佳酶解时间、温度、pH 及加酶量,经检验,氨基酸转化率为 77%;然后,通过实验确定 CaCl₂ 为最适钙源,以贝壳为原料,通过水飞法和酸法转化可制得贝壳源 CaCl₂。将扇贝裙边酶解液中复合氨基酸与来源于贝壳的钙螯合制备复合氨基酸螯合钙,以正交实验筛选出最佳螯合条件。经检验,该螯合反应螯合率达 92%。

关键词 扇贝裙边; 脱脂; 酶解; 氨基酸转化率; 复合氨基酸螯合钙; 螯合率

中图分类号 S985.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0178-07

扇贝隶属珍珠贝目(Pterioida),广泛分布于世界各个海域(刘天红等, 2013)。我国现在扇贝年产量 1400 万 t,占海水养殖动物总产量的 22%。扇贝裙边是扇贝加工后的下脚料(包括扇贝边、性腺和肠腺等),由于受现有加工技术水平的限制,尚未得到大规模高值化利用,是亟待深度开发利用的重要海洋生物资源(魏玉西等, 2009)。扇贝裙边蛋白质含量高,对扇贝裙边进行酶解转变为复合氨基酸,可以提高其生物利用率及营养价值。目前,已有学者将扇贝裙边用于加工生产海鲜酱油、贝裙脆片和扇贝酱(严超等, 2016)等。关于蛋白质降解制备复合氨基酸的方法一般采用 HCl 水解法,但该方法破坏某些氨基酸(如色氨酸),且 HCl 挥发性强,对设备的要求较高并容易污染环境(熊竹, 2016)。因此,利用蛋白酶酶解法制备复

合氨基酸,被认为是一种更好的加工方式(桑亚新等, 2012; 宋惠平等, 2015)。

Ca 是人体必需的营养素,占人体体重的 1.5%~2.2%,其中大部分(约 99%)以 Ca₃(PO₄)₂ 的形式存在于骨中。中国人的饮食结构以植物性食物为主,不足以满足人体对 Ca 的需求,需要额外补充 Ca(赵妍嫣等, 2011),而且对骨骼正常生长和体内生理调节来说, Ca 是一种非常重要矿物元素,即使膳食 Ca 摄入量足够,但是由于 Ca²⁺在肠道碱性环境内容易形成沉淀(Vavrusova *et al*, 2014),从而无法被小肠吸收,因此,生物利用率较低(Bao *et al*, 2008),且对胃有刺激作用(Straub, 2007)。

研究发现,蛋白质酶解得到的氨基酸具有较强的 Ca²⁺结合活性,如鸡蛋壳粉氨基酸螯合钙(杜冰等,

* 山东省重点研发计划(重大关键技术)项目(2016ZDJS06A01)和青岛市民生科技计划项目(17-3-3-68-nsh)共同资助 [This work was supported by Shandong Province Key Research and Development Project (2016ZDJS06A01), and Qingdao People's Livelihood Technology Project (17-3-3-68-nsh)]. 焦 奎, E-mail: 312596995@qq.com

① 通讯作者: 魏玉西, E-mail: yuxiw729@163.com

收稿日期: 2018-03-24, 收修改稿日期: 2018-06-02

2011)、罗非鱼骨粉氨基酸螯合钙(胡振珠等, 2010)、米渣蛋白氨基酸螯合钙(郭艳, 2006)以及文蛤氨基酸螯合钙(郑清等, 2009)等。这类补钙剂可以促进钙离子的生物利用度, 因而 Ca 吸收率较高(丁媛媛等, 2017)。本研究旨在采用复合蛋白酶酶解法, 将扇贝裙边蛋白质酶解成为游离氨基酸, 探索最佳酶解条件, 并进一步将酶解得到的氨基酸与无机钙离子进行螯合制备复合氨基酸螯合钙, 以提高扇贝裙边利用附加值, 为扇贝裙边作为功能性食品提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验用的扇贝裙边: 栉孔扇贝, 购自山东省青岛市沙子口; 食品级酶制剂: 中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、动物蛋白酶, 购自广西南宁庞博生物工程有限公司; 酸性蛋白酶, 购自北京索莱宝生物科技公司。分析纯级试剂: 石油醚, NaOH, EDTA-Na₂ 自制复合酶制作过程: 将中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、动物蛋白酶和酸性蛋白酶按等质量均匀混合后, 放于 4℃ 冰箱直至使用。

1.2 仪器与设备

索氏脂肪抽提器; PHS-3C pH 计, 上海雷磁仪器厂; GL-20G-II 冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; SYKAM 全自动氨基酸分析仪 S-433D, SYKAM 公司, 德国; K9840 全自动凯氏定氮仪, 济南海能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 贝壳为钙源的 CaCl₂ 制备 将扇贝壳刷洗干净, 先以 0.05 mol/L HCl 浸泡 2 h, 以自来水洗净后粉碎至 60~80 目, 水飞法除去密度大的部分后烘干得钙源贝壳粉。取适量钙源贝壳粉, 先加适量 HCl 使贝壳粉完全溶解, 再继续加钙源贝壳粉至加入的贝壳粉不再溶解为止。过滤, 将滤液经浓缩、酒精沉淀、烘干即得贝壳源氯化钙(魏玉西等, 2013)。

1.3.2 氨基酸态氮的测定 甲醛滴定法(杨佩荣, 2003); 总氮(粗蛋白)的测定: 凯氏定氮法(杨佩荣, 2003); pH 测定: pH 酸度计; 钙离子的测定: EDTA 滴定法(金其荣等, 1989); 粗脂肪的测定: 索氏抽提法(GB 5009.6-2016)。氨基酸分析方法: 茚三酮法(GB 5009.124-2016)。

1.4 工艺优化实验

1.4.1 扇贝裙边的预处理 新鲜的扇贝裙边去杂后加入 2 倍体积蒸馏水煮沸 5 min, 沥干并于 96℃ 干燥 6 h, 粉碎, 过 100 目筛, 即得均匀扇贝裙边粉末。

1.4.2 裙边粉末的脱脂 参考罗舜菁等(2017)、郑建明等(2017)方法并加适当改进。取 3 份、每份 10 g 扇贝裙边粉, 各加入 100 ml 无水乙醇, 60℃ 恒温水浴摇床 6 min, 抽滤, 重复 2 次, 过滤、晾干即得脱脂后的扇贝裙边粉末。脂含量测定结果取平均值。

1.4.3 酶解工艺流程 酶解工艺参魏玉西等(2009)并加适当改进。将脱脂后的扇贝裙边粉末加入 20 倍体积的蒸馏水, 加入自制复合酶进行正交酶解实验。酶解完毕以后, 立即升温至 100℃ 灭酶 5 min, 冷却至室温以后, 3500 r/min 离心 30 min, 上清液即为酶解液。测定酶解液中氨基酸态氮含量并计算氨基酸转化率(杨佩荣, 2003)。

1.4.4 螯合钙制备工艺流程 首先对螯合钙的钙源的选择进行了优化, 最后确定以贝壳粉制备的 CaCl₂ 为最优钙源, 然后对螯合过程的时间、pH 及温度因素进行了单因素和正交实验的优化, 用 EDTA 滴定法测螯合率最终, 确定了最优的螯合工艺。

1.4.5 氨基酸组成分析 分别取扇贝裙边粉末、酶解液和复合氨基酸螯合钙样品, 采用 SYKAM 全自动氨基酸分析仪 S-433D 进行氨基酸组成分析(付萍等, 2016)。

2 结果与分析

2.1 脱脂效果分析

扇贝裙边脱脂结果见表 1。经脱脂处理以后, 扇贝裙边粉末脂肪含量明显降低, 有利于下一步酶解, 并且腥臭味消失, 呈现出扇贝固有的鲜甜味。

2.2 正交实验结果

正交实验选取时间、加酶量、温度和 pH 4 个因素(刘淇等, 2013), 通过预实验确定正交实验的因素和水平, 进而进行正交实验。自制蛋白酶正交设计因素与水平排列见表 2, 正交实验结果见表 3。总体来说, 酶解 pH 的影响最主要, 其次是酶解温度, 而酶解时间和加酶量影响较小, 实验结果与魏玉西等(2009)的研究结果相吻合。根据正交实验的结果, 最后确定最佳酶解条件为: 添加扇贝裙边粉末量 0.15%(w/w) 自制复合蛋白酶, 介质 pH=8, 温度 65℃, 酶解 7 h 后在 100℃ 水浴加热 10 min 灭酶, 即得到复合氨基酸酶解液, 氨基酸转化率达 77%。

表1 脱脂次数与样品脂肪含量
Tab.1 Degreasing times and sample fat content (%)

材料 Raw material	未脱脂裙边粉 Non-degreasing scallop skirt powder	1次脱脂裙边粉 One time of degreasing scallop skirt powder	2次脱脂裙边粉 Two times of degreasing scallop skirt powder
脂肪含量 Fat content	16.60	2.10	0.55

表2 蛋白酶正交设计因素与水平排列
Tab.2 Protease orthogonal experimental design

水平 Levels	因素 Factors			
	A 酶解时间 Enzymolysis time (h)	B 酶解温度 Enzymolysis temperature(°C)	C 酸碱度 pH	D 加酶量 Enzyme dosage(%)
1	5	55	6	0.05
2	6	60	7	0.10
3	7	65	8	0.15

表3 蛋白酶正交实验方案及结果分析
Tab.3 Orthogonal experiment design and results

实验号 No.	酶解条件 Conditions of enzyme hydrolysis				氨基酸转化率 Amino acid conversion rate (%)		
	A	B	C	D	第1次 First time	第2次 Second time	第3次 Third time
	1	2	3	4			
1	1	1	1	1	72.55	72.50	72.55
2	2	2	1	2	75.25	75.20	75.25
3	3	3	1	3	76.65	76.65	76.60
4	2	1	2	3	75.25	75.25	75.30
5	3	2	2	1	77.05	77.05	77.10
6	1	3	2	2	76.50	76.50	76.55
7	3	1	3	2	76.55	76.50	76.60
8	1	2	3	3	76.55	75.55	76.50
9	2	3	3	1	75.75	75.75	75.70
均值 1 \bar{K}_1	74.817	74.783	75.200	75.117			
均值 2 \bar{K}_2	76.267	76.283	75.417	76.100			
均值 3 \bar{K}_3	76.283	76.300	76.750	76.150			
极差 R	1.466	1.517	1.550	0.973			

2.3 螯合因素分析

2.3.1 钙源的选择 不同钙源参与的螯合反应螯合率见表4。由表4可见,5种不同钙源对螯合率的影响差别较大,其中CaCl₂参与螯合反应螯合率最高(达89%)。因此,本研究螯合反应选用CaCl₂为钙源。这与文献(甘林火等,2008)所报道的结果一致。同时为增加贝可利用度,选用贝壳为原料制备CaCl₂。将扇贝壳刷洗干净,先以0.05 mol/L HCl浸泡2 h,以自来水充净后粉碎至60~80目,水飞法除去密度大的部分后,烘干得钙源贝壳粉。取适量钙源贝壳粉,先加适量HCl使贝壳粉完全溶解,再继续加钙源贝壳粉至

表4 钙离子与螯合率的关系

钙离子来源 Source of calcium ion	螯合率 Chelation rate (%)
Ca(OH) ₂	57
CaCl ₂	89
CaCO ₃	38
Ca(C ₆ H ₁₁ O ₇) ₂	65
C ₆ H ₁₀ CaO ₆	33

加入的贝壳粉不再溶解为止。过滤,将滤液经浓缩、酒精沉淀、烘干即得贝壳源CaCl₂。经实验证明,经该方法制备的CaCl₂的螯合率,与分析纯级CaCl₂效果相同。

因此, 以下螯合实验均使用贝壳 CaCl_2 为钙源。

2.3.2 螯合反应单因素实验结果 螯合反应单因素实验结果见图 1、图 2 和图 3。可见, 螯合过程的最佳温度为 40°C , 最佳时间为 40 min, 超过 40 min 以后, 螯合率下降, 最佳 pH 为 9。

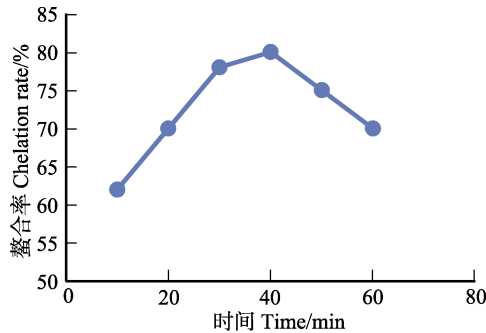


图 1 反应时间对螯合率的影响

Fig.1 The effect of time on the chelation rate

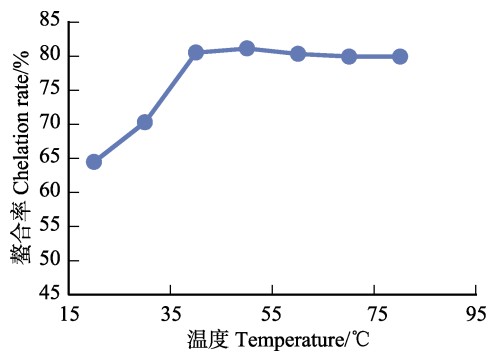


图 2 温度对螯合率的影响

Fig.2 The effect of temperature on the chelation rate

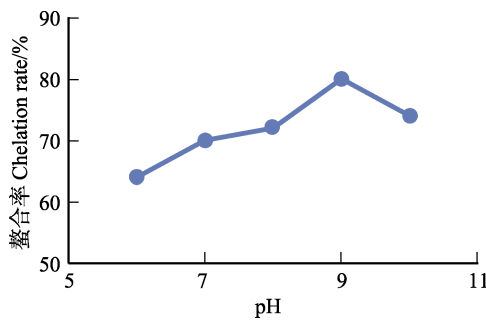


图 3 pH 对螯合率的影响

Fig.3 The effect of pH on the chelation rate

2.3.3 螯合反应正交实验结果 螯合反应正交设计因素与水平排列见表 5, 正交实验方案及结果见表 6。由表 6 可见, 反应时间和介质 pH 对螯合率的影响最主要, 而温度影响最小。具体地说, 最佳螯合反应条件: 反应温度为 40°C , 反应时间为 40 min, 介质 pH 为 9。在此最佳工艺条件下进行螯合反应,

螯合率可达 92%。

2.4 氨基酸组成分析

扇贝裙边粉末中含有丰富的氨基酸, 且含有 7 种人体必需氨基酸(魏玉西等, 2009)。本研究就扇贝裙边粉末、扇贝裙边粉末酶解液以及复合氨基酸螯合钙进行了氨基酸组成及含量测定, 结果见表 7。由表 7 可见, 在扇贝裙边粉末酶解液中, 末中含有较多谷氨酸和天冬氨酸, 因此酶解液有浓郁的鲜味。选用贝壳制备的 CaCl_2 为钙源, 进一步提升了扇贝的利用度, 降低了生产成本。由于酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)更容易与钙离子进行螯合(Liu *et al.*, 2013), 在复合

表 5 螯合反应正交实验设计因素与水平排列

Tab.5 Factors and levels arrangement of chelation orthogonal experimental design

水平 Levels	因素 Factors		
	A 酶解温度 Enzymolysis time ($^\circ\text{C}$)	B 酶解时间 Enzymolysis temperature(h)	C 酸碱度 pH
1	30	20	8
2	40	30	9
3	50	40	10

表 6 螯合反应正交实验结果

Tab.6 Chelating reaction orthogonal experimental design and results

实验号 No.	酶解条件 Conditions of enzyme hydrolysis			实验结果 Result of orthogonal design (%)		
	A	B	C	第 1 次 First time	第 2 次 Second time	第 3 次 Third time
	1	2	3			
1	1	1	1	77	76	77
2	2	2	1	85	84	84
3	3	3	1	83	84	83
4	2	1	2	84	83	82
5	3	2	2	90	90	89
6	1	3	2	85	86	85
7	3	1	3	79	79	78
8	1	2	3	80	82	81
9	2	3	3	88	87	86
均值 1 \bar{K}_1	81.667	80.000	80.667			
均值 2 \bar{K}_2	86.333	85.000	85.667			
均值 3 \bar{K}_3	82.333	85.333	84.000			
极差 R	4.666	5.333	5.000			
R^2	20800	20747	20732			

表7 氨基酸组分及含量分析
Tab.7 Analysis of amino acid composition and content

氨基酸 Amino acids	氨基酸所占百分比 Percentage of amino acids		
	扇贝裙边 Scallop skirt	酶解液 Hydrolysate	螯合钙 Chelate calcium
天冬氨酸 Asp	10.61	10.98	22.23
苏氨酸 Thr	4.84	1.54	3.48
丝氨酸 Ser	4.92	5.41	10.76
谷氨酸 Glu	15.72	20.32	33.87
甘氨酸 Gly	9.40	3.64	9.97
丙氨酸 Ala	5.92	2.39	3.21
胱氨酸 Cys	0.36	11.67	0.70
缬氨酸 Val	4.92	0.39	2.37
甲硫氨酸 Met	0.41	0.89	0.69
异亮氨酸 Ile	4.81	0.57	1.53
亮氨酸 Leu	7.84	0.58	1.60
酪氨酸 Tyr	3.39	0.62	0.42
苯丙氨酸 Phe	4.06	0.97	0.84
组氨酸 His	3.22	7.17	4.32
赖氨酸 Lys	6.75	15.48	3.83
精氨酸 Arg	7.23	12.86	1.95
脯氨酸 Pro	5.58	0.17	3.90

注：色氨酸未测

Note: Tryptophan is not detected

氨基酸螯合钙产品中，酸性氨基酸的含量相对于酶解液进一步提升，使天冬氨酸由 10.89% 上升到 22.23%，谷氨酸由 20.32% 上升到 33.87%，因而使得复合氨基酸螯合钙产品有较显著的鲜味；但对于碱性氨基酸，如精氨酸、赖氨酸和组氨酸来说，因它们不易与钙离子进行螯合，所以在复合氨基酸螯合钙产品中其含量均有所下降；对中性氨基酸来说，在复合氨基酸螯合钙产品中的含量均无较大改变。

3 结论

本研究采用多种蛋白酶，对扇贝裙边进行复合蛋白酶酶解，采用正交实验设计进行优化酶解条件，使最终氨基酸转化率达到 77%，较目前所报道的酶解条件(Choi *et al.*, 2012)有更高的氨基酸转化率，且复合氨基酸中含有较多人体必需氨基酸。因为氨基酸的羧基存在钙离子结合能力(Bao *et al.*, 2008)，在酶解之后将氨基酸酶解液与来源于贝壳的无机钙离子进行螯合，制备复合氨基酸螯合钙，通过优化螯合反应条件，最

终使螯合率达到 92%，该产品可以提高人体对钙离子的生物利用率(Hou *et al.*, 2015; Jeon *et al.*, 2010)。因此，本研究结果不仅高值化利用扇贝裙边，将其中氨基酸游离出来并转化为复合氨基酸螯合钙，而且利用贝壳将其中钙质作为复合氨基酸螯合钙的钙源，将扇贝加工废弃物变废为宝，生产出的复合氨基酸螯合钙不仅具有补钙功能，而且具有鲜美的味感，可以作为补钙剂或功能性调味品食用。这对提高扇贝加工下角料的附加值，同时也为我们高值化利用其他水产加工废弃物、减少环境污染，促进蓝色经济的可持续健康发展提供了新的思路和方法。

参 考 文 献

- Bao XL, Lü Y, Yang BC, *et al.* A Study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 2008, 73(3): 117–121
- Choi DW, Lee JH, Chun HH, *et al.* Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(6): 1663–1667
- Ding YY, Wang L, Zhang XX, *et al.* Optimized preparation and structural characterization of calcium-chelating polypeptides from wheat germ protein hydrolysate. *Food Science*, 2017, 38(10): 215–221 [丁媛媛, 王莉, 张新霞, 等. 麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征. *食品科学*, 2017, 38(10): 215–221]
- Du B, Cai XK, Xie YC, *et al.* Study on preparation technology of calcium amino acid chelate from eggshell power. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(4): 287–289 [杜冰, 蔡巽楷, 谢伊澄, 等. 蛋壳粉制备氨基酸螯合钙工艺优化. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 287–289]
- Fu P, Lü JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinities on the free amino acids composition in the gill of *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 122–126 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)鳃中游离氨基酸含量的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 122–126]
- Gan LH, Weng LJ, Deng AH. Progress in preparation of calcium acid chelate. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2008, 30(1): 44–46 [甘林火, 翁连进, 邓爱华. 制备氨基酸螯合钙的研究进展. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(1): 44–46]
- Guo Y. Hydrolysis of rice residue protein and synthesis of complex amino acid with calcium. Master's Thesis of Sichuan University, 2006, 1–73 [郭艳. 水解米渣蛋白及制备氨基酸螯合钙的工艺研究. *四川大学硕士研究生学位论文*, 2006, 1–73]
- Hou T, Wang C, Ma ZL, *et al.* Desalted duck egg white peptides: Promotion of calcium uptake and structure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(37): 8170–8176
- Hu ZZ, Yang XQ, Ma HX, *et al.* Preparation and antioxidant

- activity evaluation of amino acid chelated calcium from tilapia scraps. *Food Science*, 2010, 31(20): 141–145 [胡振珠, 杨贤庆, 马海霞, 等. 罗非鱼骨粉制备氨基酸螯合钙及其抗氧化性研究. *食品科学*, 2010, 31(20): 141–145]
- Jeon SJ, Lee JH, Song KB. Isolation of a calcium-binding peptide from chlorella protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Nutrition*, 2010, 15(4): 282–286
- Jin QR, Zhang JM, Xu Q. *Organic acid fermentation technology*. China Light Industry Press, 1989 [金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学. 中国轻工业出版社, 1989]
- Luo SJ, Geng Q, Yan XY, *et al.* Structural and functional properties of rice dreg protein prepared by different degreasing methods. *Food Science*, 2017, 38(5): 202–207 [罗舜菁, 耿勤, 颜小燕, 等. 不同脱脂条件下米渣蛋白的结构及功能性质. *食品科学*, 2017, 38(5): 202–207]
- Liu Q, Xie S, Zhao L, *et al.* Antimicrobial activity of hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 109–113 [刘淇, 谢沙, 赵玲, 等. 菲律宾蛤仔酶解产物的抑菌活性. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 109–113]
- Liu TH, Yu XQ, Sun FX, *et al.* Accumulation and depuration of mercury and MeHg in the tissue of *Chlamys farreri*. *Progress in Fisheries Science*, 2013, 34(5): 119–128 [刘天红, 于晓清, 孙福新, 等. 汞及甲基汞在栉孔扇贝全组织内的积累与净化. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 119–128]
- Straub DA. Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 2007, 22(3): 286–296
- Sang YX, Wang XH, Wang S, *et al.* Research on the process optimization of scallop skirt enzymatic hydrolysis and its amino acid analysis. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(8): 78–86 [桑亚新, 王向红, 王苏, 等. 扇贝裙边酶解工艺优化及其氨基酸分析研究. *中国食品学报*, 2012, 12(8): 78–86]
- Song HP, Yu J, Li S, *et al.* The antibacterial activity of peptides from *Porphyra yezoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 36(2): 140–145 [宋惠平, 于佳, 李钊, 等. 条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 140–145]
- Vavrusova M, Skibsted LH. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 59(2): 1198–1204
- Wei YX, Cui YQ, Wang WX, *et al.* Preparation technology of calcium bis-L-calcium-pyroglutamate from clam shell. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2013, 32(6): 83–86 [魏玉西, 崔育倩, 王文秀, 等. 以蛤蜊壳为钙源的 L-焦谷氨酸钙制备工艺. *中国海洋药物*, 2013, 32(6): 83–86]
- Wei YX, Yin BZ, Liu Q, *et al.* Study on the preparation of amino acid nutrition powder with scallop skirt. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(3): 112–116 [魏玉西, 殷邦忠, 刘淇, 等. 扇贝裙边氨基酸营养粉的制备工艺研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 112–116]
- Xiong Z. Study on preparation of complex amino acid chelated calcium from shrimp powder. *Agricultural Technology Service*, 2016, 33(5): 107–107 [熊竹. 虾粉制备复合氨基酸螯合钙工艺研究. *农技服务*, 2016, 33(5): 107–107]
- Yan C, Mu JL, Wang J, *et al.* Fermentation technology of scallop bean paste. *Food Science and Technology*, 2016, 41(12): 245–249 [严超, 牟建楼, 王颀, 等. 扇贝豆酱发酵工艺条件的研究. *食品科技*, 2016, 41(12): 245–249]
- Yang PR. Development of compound amino acids. *Science and Technology of Food Industry*, 2003, 24 (10): 114–115 [杨佩荣. 复合氨基酸的研制. *食品工业科技*, 2003, 24(10): 114–115]
- Zhao YY, Hu LL, Jiang ST. Optimum conditions of producing collagen polypeptide chelated Ca using pig bone. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27(S2): 277–281 [赵妍嫣, 胡林林, 姜绍通. 猪骨粉制备胶原蛋白多肽螯合钙工艺优化. *农业工程学报*, 2011, 27 (s2): 277–281]
- Zheng JM, Yan JL, Chen SQ, *et al.* Effects of dietary skimmed krill meal on the growth, non-specific immunity and serum physiological metabolism indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5) : 107–113 [郑建明, 严俊丽, 陈四清, 等. 脱脂磷虾粉对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼生长、非特异性免疫力和血清生理代谢指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 107–113]
- Zheng Q, Wang YQ. Preparation of composite amino acids calcium copper from shell of *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Anhui Chemical Industry*, 2009, 35(1): 25–28 [郑清, 王玉琴. 利用文蛤壳制备复合氨基酸螯合钙. *安徽化工*, 2009, 35(1): 25–28]

Study of the Preparation of Compound Amino Acid-Chelated Calcium by Protease Hydrolysis of Scallop Skirts

JIAO Kui¹, GAO Xiang¹, YU Jia¹, WEI Yuxi¹①, GAO Jie¹,
ZHANG Xuemei¹, WANG Jinmei², LI Yujin²

(1. School of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071; 2. Rongcheng Taixiang Food Co. Ltd, Rongcheng 264309)

Abstract Scallop skirts are by-products of scallop processing that are rich in nutrients such as proteins and lipids. Owing to the limitations of the existing processing technology, they have not been used on a large scale and are not currently of much value. In this study, to effectively utilize the scallop skirt, neutral protease, animal-complex protease, flavor protease, papain, and acidic proteinase were used to hydrolyze the scallop skirt. The free amino acid nitrogen content in the hydrolysate was used as an indicator for optimized reaction conditions. First, alcohol was used to degrease the scallop skirt, which increased the degree of enzymatic hydrolysis. Subsequently, single-factor experiments were performed on five enzymes to select the optimize enzymatic hydrolysis time, temperature, pH, and enzyme dosage. Subsequently, orthogonal experiments were performed to determine the optimum hydrolysis conditions for the five enzymes. The results showed that the amino acid conversion rate of the hydrolysate prepared under the optimum hydrolysis conditions was as high as 77%. In previous studies, calcium chloride was determined to be the most suitable calcium source. The scallop shell was used as a raw material to obtain calcium chloride by acid treatment and water flying, and then calcium chloride was mixed with compound amino acids in the hydrolysate to prepare complex amino acid-chelated calcium. The calcium ion content in the chelated calcium was chosen as an index; subsequently, single factor experiments were performed to determine the time, temperature, and pH of the chelation process. The optimum chelating conditions were screened by an orthogonal experiment. A chelation rate of up to 92% was obtained in the final products. The compound amino acid-chelated calcium not only functions as a calcium supplement, but also has a delicious taste; it can be used as a calcium supplement or functional condiment. Our findings will assist in achieving additional value from scallop-processing waste, and also provide us with novel insights and methods for high-value utilization of other aquatic processing waste.

Key words Scallop skirts; Degrease; Enzymatic hydrolysis; Amino acids conversion rate; Amino acid chelated calcium; Chelation rate

① Corresponding author: WEI Yuxi, E-mail: yuxiw729@163.com

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 金显仕 JIN Xianshi

委 员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔 杰 KONG Jie	包振民 BAO Zhenmin	曲克明 QU Keming	任胜民 (新西兰)REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄 平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李 健 LI Jian	李 军 (美国)LI Jun
李来好 LI Laihao	李家乐 LI Jiale	李 琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
肖 放 XIAO Fang	何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng
张士璀 ZHANG Shicui	张国范 ZHANG Guofan	陈松林 CHEN Songlin	陈 勇 (美国)CHEN Yong
林 洪 LIN Hong	岳根华 (新加坡)YUE Genhua	周永灿 ZHOU Yongcan	赵宪勇 ZHAO Xianyong
俞志明 YU Zhiming	秦 松 QIN Song	秦启伟 QIN Qiwei	徐 跑 XU Pao
徐 皓 XU Hao	黄 健 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
崔利锋 CUI Lifeng	解绶启 XIE Shouqi	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	薛长湖 XUE Changhu

主 编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副 主 编 Associate Editor-in-Chief 李 健 LI Jian 孔 杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常 青 CHANG Qing

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第40卷 第4期 2019年8月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.40 No.4 Aug. 2019

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 **科学出版社**
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>
E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕
印 刷 青岛国彩印刷有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发行

定 价: 40.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986194