

中国水产科学

Zhongguo Shuichan Kexue

第 29 卷 第 2 期 2022 年 2 月

目 次

研究论文

- DNA 条形码在鲷属鱼类物种鉴定和系统进化分析中的适用性 王开杰, 徐永江, 柳学周, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 方璐 (171)
- 瓦氏雅罗鱼盐碱适应相关 InDels 位点的挖掘与分析 王双毅, 梁利群, 常玉梅, 孙博 (184)
- 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因克隆及其对急性低温的应答 陈自强, 张志勇, 张志伟, 卫明亮, 林志杰, 祝斐, 贾超峰, 陈淑吟, 孟乾 (200)
- 中华绒螯蟹交配系统的形态功能 宣富君, 鲍成满, 付龙龙, 张悦, 王刚, 王坤, 张建光, 唐伯平, 管卫兵, 成永旭 (211)
- 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与棕点石斑鱼低氧耐受能力初步研究 段鹏飞, 田永胜, 李振通, 李子奇, 陈帅, 黎琳琳, 王心怡, 王林娜, 刘阳, 李文升, 王晓梅, 李波 (220)
- 刀鲚染色体核型及不同组织中的 LDH 同工酶 蒋俊, 宋超, 周丽青, 胡丽娟, 谢志伟, 刘若晖, 庄平, 张涛 (234)
- 简单回归尺度转换实现半滑舌鲷性逆转基因的高效定位 黄岩, 宋禹昕, 蒋丽, 杨润清 (245)
- 营养代谢过程中黄条鲈幼鱼消化道菌群的演变趋势 姜燕, 于超勇, 徐永江, 柳学周, 王滨, 崔爱君, 薛致勇 (252)
- 温度对中间球海胆生存、生长和行为的影响 郑定发, 王慧妍, 丁靖芸, 孙江南, 赵冲, 常亚青 (264)
- 饲料中发酵啤酒酵母添加水平对大口黑鲈生长、饲料利用效率和水质的影响 崔正贺, 余聪, 李云梦, 王岩 (274)
- 降解亚硝酸盐的大山芽孢杆菌 JY-1 的分离、鉴定及其作用 周敏, 宁文, 陈红菊, 季相山, 赵燕 (284)
- 长江口盐沼湿地 3 种亚生境中国花鲈的碳、氮稳定同位素特征及基础食源差异 彭彪彪, 王思凯, 赵峰, 杨刚, 庄平 (295)
- 澜沧江西藏段鱼类群落结构及多样性 朱挺兵, 胡飞飞, 龚进玲, 王旭歌, 陈康, 杜红春, 杨德国, 吴兴兵 (304)
- 长江安庆段草鱼仔稚鱼资源时空动态特征与水文因子的相关性 彭云鑫, 方弟安, 徐东坡, 丁隆强, 黎加胜, 任鹏, 何晓辉, 罗宇婷 (314)
- 异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗对罗非鱼的免疫效果 祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 肖炜, 喻杰, 陈炳霖, 马文静, 杨弘, 沈锦玉 (325)

Journal of Fishery Sciences of China

Vol. 29 No.2 Feb. 2022

Contents

Species identification and phylogenetic relationships in <i>Seriola</i> based on DNA barcoding	
..... WANG Kaijie, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, CUI Aijun, JIANG Yan, WANG Bin, FANG Lu	(183)
Mining and analysis of InDels in response to alkali-saline stress in Amur ide (<i>Leuciscus waleckii</i>)	
..... WANG Shuangyi, LIANG Liquan, CHANG Yumei, SUN Bo	(199)
Cloning of <i>Acanthopagrus schlegelii scd1a</i> and <i>scd1b</i> genes associated with response to acute low temperature	
..... CHEN Ziqiang, ZHANG Zhiyong, ZHANG Zhiwei, WEI Mingliang, LIN Zhijie, ZHU Fei, JIA Chaofeng, CHEN Shuyin, MENG Qian	(210)
Functional morphology of the copulatory system of the Chinese mitten crab (<i>Eriocheir sinensis</i>)	
..... XUAN Fujun, BAO Chengman, FU Longlong, ZHANG Yue, WANG Gang, WANG Kun, ZHANG Jianguang, TANG Boping, GUAN Weibing, CHENG Yongxu	(219)
Hypoxia tolerance of <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. tukula</i> (♂) hybrids and <i>E. fuscoguttatus</i>	
..... DUAN Pengfei, TIAN Yongsheng, LI Zhentong, LI Ziqi, CHEN Shuai, LI Linlin, WANG Xinyi, WANG Linna, LIU Yang, LI Wensheng, WANG Xiaomei, LI Bo	(233)
Chromosome karyotype and LDH isoenzyme in different tissues of <i>Coilia nasus</i>	
..... JIANG Jun, SONG Chao, ZHOU Liqing, HU Lijuan, XIE Zhiwei, LIU Ruohui, ZHUANG Ping, ZHANG Tao	(244)
Efficiently mapping the sex reversal genes of half-smooth tongue sole, <i>Cynoglossus semilaevis</i> using simple regression scale transformation	
..... HUANG Yan, SONG Yuxin, JIANG Li, YANG Runqing	(251)
Analysis of the evolution trend of gastrointestinal tract microflora of juvenile yellowtail kingfish, <i>Seriola lalandi</i> during nutrient metabolism	
..... JIANG Yan, YU Chaoyong, XU Yongjiang, LIU Xuezhou, WANG Bin, CUI Aijun, XUE Zhiyong	(263)
Effects of water temperature on survival, behavior, and growth of the sea urchin (<i>Strongylocentrotus intermedius</i>)	
..... ZHENG Dingfa, WANG Huiyan, DING Jingyun, SUN Jiangnan, ZHAO Chong, CHANG Yaqing	(273)
Effect of fermented brewer's yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) supplementation on growth, feed utilization, and water quality in largemouth bass (<i>Micropterus salmoides</i>) farming	
..... CUI Zhenghe, YU Cong, LI Yunmeng, WANG Yan	(283)
Isolation, identification and function of a nitrite-degrading strain JY-1	
..... ZHOU Min, NING Wen, CHEN Hongju, JI Xiangshan, ZHAO Yan	(294)
Carbon and nitrogen isotopic characteristics and food source differences of <i>Lateolabrax maculatus</i> in three sub habitats of salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary	
..... PENG Biaobiao, WANG Sikai, ZHAO Feng, YANG Gang, ZHUANG Ping	(303)
Community structure and species diversity of fishes in the Tibet reach of the Lancang River, China	
..... ZHU Tingbing, HU Feifei, GONG Jinling, WANG Xuge, CHEN Kang, DU Hongchun, YANG Deguo, WU Xingbing	(313)
Correlation between the temporal and spatial characteristics of larval <i>Ctenopharyngodon idellus</i> resource and hydrological factors in the Anqing section of the Yangtze River	
..... PENG Yunxin, FANG Di'an, XU Dongpo, DING Longqiang, LI Jiasheng, REN Peng, HE Xiaohui, LUO Yuting	(324)
Immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous <i>Streptococcus agalactiae</i> extracellular product in hybrid tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> ♀ × <i>O. aureus</i> ♂)	
..... ZHU Jinglin, ZOU Zhiying, LI Dayu, XIAO Wei, YU Jie, CHEN Binglin, MA Wenjing, YANG Hong, SHEN Jinyu	(340)

DOI: 10.12264/JFSC2021-0295

DNA 条形码在鲷属鱼类物种鉴定和系统进化分析中的适用性

王开杰^{1,2}, 徐永江¹, 柳学周¹, 崔爱君¹, 姜燕¹, 王滨¹, 方璐¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室, 山东 青岛 266071;
2. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022

摘要: 为了探讨线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I、II (CO I、CO II) 和 16S rRNA 基因在鲷属鱼类物种鉴定和群体划分中的适用性, 在黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)等鲷属鱼类中克隆了 3 种基因, 并进行序列比对与系统进化分析。结果显示, CO I、CO II 和 16S rRNA 的基因序列均表现出明显的 A+T 偏倚性; 16S rRNA 序列最为保守, 变异率仅为 5.06%; CO I 序列的平均核苷酸差异数(k)和核酸多样性指数(P_i)高于 CO II 和 16S rRNA, CO II 的单倍型多样性指数最高, CO I 序列分化程度更高。比较了鲷属鱼类 3 种基因的扩增序列, 发现 CO I、CO II 和 16S rRNA 均能对我国分布的 3 种鲷属鱼类进行有效鉴别。另外, CO I、CO II 还可作为不同地理群体黄条鲷的鉴别 DNA 条形码, 而 16S rRNA 对于不同地理群体的黄条鲷识别能力不足。在鲷属鱼类中, 基于 CO I、CO II、16S rRNA 基因计算的种间遗传距离都大于种内遗传距离的 10 倍以上, 系统进化分析显示每个物种都形成单系, 表明 CO I、CO II、16S rRNA 基因不仅可作为鲷属鱼类物种鉴定和多样性保护的有效 DNA 条形码, CO I、CO II 还可作为黄条鲷不同地理种群划分和国际资源判别的依据。

关键词: 鲷属鱼类; DNA 条形码; 遗传距离; 系统进化树

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0171-13

2002 年, Tautz 等^[1]首次提出了 DNA 分类学的概念, 他认为将传统分类学与 DNA 序列结合起来, 利用 DNA 序列表现出的差异进行物种划分, 可克服传统形态学鉴别技术主观性强、要求样本个体完整性高等局限性, 具有重复性好、灵敏度高等优点^[2]。DNA 条形码(DNA barcode)最早由 Barrent 等^[3]提出, 是一种标准的、有足够变异的、易扩增且能够代表该物种的 DNA 短片段, 可广泛应用于物种鉴定和进化分析^[4], 并且具有所需组织块小、不受发育阶段限制、鉴定准确性高、操作简便、成本低、效率高等优势, 可快速鉴定

大量样本^[5]。与核 DNA 相比, 线粒体 DNA 具有长度短、含量丰富、偏母性遗传和进化速度快等特点^[6], 是物种分类、遗传多样性分析、进化分类和水产品鉴定等方面理想的分子标记^[7-8]。据不完全统计, 鱼类生命条形码计划已对已知的 3 万余种鱼类中 8000 种商业物种鱼类的细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I)进行了测定, 发现 CO I 条形码可以有效区分约 98%的海洋鱼类和 93%的淡水鱼类^[9]。

鲷是鲈形目(Perciformes)、鲷科(Carangidae)、鲷属(*Seriola*)鱼类的统称, 是一类栖息在海洋中

收稿日期: 2021-06-28; 修订日期: 2021-08-27.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900901, 2018YFD0901204); 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0303-1); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(TD47, 2021GH05); 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(20603022021011); 国家海洋水产种质资源库项目; 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-47).

作者简介: 王开杰(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类多样性评价与保护技术. E-mail: jasions@qq.com

通信作者: 徐永江, 研究员, 研究方向为海水鱼类繁育理论与技术. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

上层的暖温性大型鱼类,具有全球水域长距离洄游的特性,其个体大、生长快,特别适合深远海大型设施化养殖,是我国近年来发展深远海养殖的优良适养鱼类。鲷属鱼类全球共有 9 种^[10-11],且存在“同种异名”、“同种异形”的现象,现已查明在我国分布有 3 种,分别为黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)和五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)。三种鲷属鱼类在形态上具有相似的体色和条纹,利用传统的形态观察法难以准确判别,受精卵和苗种在形态上更难区分,为资源调查中种群判别等带来了较大困难。另外,作为一种全球分布且深受消费者喜爱的重要经济鱼类,鲷属鱼类种苗、受精卵、商品鱼的国际流通与贸易较为旺盛,为防止外来物种入侵事件发生以及肌肉品质的鉴定依据不足等问题发生^[12],亟需建立一种实用、快速、高效的鲷属鱼类物种鉴别方法。目前,国际上通用的 DNA 条形码中,CO I 在鱼类物种鉴定中的应用最为广泛^[13];Lakra 等^[14]利用 CO I 基因对印度洋水域 115 种鱼类进行了系统进化研究,结果表明 NJ 进化树上基于 CO I 序列得到的聚类与传统形态学分类相一致,并能清晰地反映这些鱼类的系统发育关系;CO II 基因序列较短,也被作为物种鉴定的条形码^[15-16];线粒体 16S rRNA 序列保守,变异率低,通常用于分析不同阶元的系统发育关系^[17]。本研究探讨了线粒体 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因在鲷属鱼类物种鉴定和群体划分中的适用性,以期鲷属鱼类物种鉴别、种群划分和种质资源保护及可持续利用提供技术支持,助力我国鲷养殖产业的持续健康发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国鲷属鱼类样品采集于福建宁德(26°62'N, 119°75'E),黄条鲷(*Seriola lalandi*, SL)、高体鲷(*Seriola dumerili*, SD)、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*, SQ) 2 龄鱼各 3 尾,体重 2.93~4.20 kg。另外,采集了澳大利亚黄条鲷(*Seriola lalandi*, ASL)(33°44'S, 151°45'E)和日本黄条鲷(*Seriola lalandi*, JSL)(32°45'N, 128°27'E)野生群体样品各 2 尾。所有实验鱼用 MS222 麻醉后,取胸鳍放入无水乙醇中保存,用于基因组 DNA 的提取。采集的样本通过形态学方法进行分类确认,国际水域采集的黄条鲷样本通过采集者和图片资料确认。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取鳍条样品 20 mg,剪碎后置于离心管中,利用 TIANGEN 海洋动物组织 DNA 试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取 DNA,按照说明书进行操作。通过琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度,置于-20 ℃保存。

1.2.2 PCR 扩增 设计基因扩增引物 3 对,CO I 基因扩增采用 Ward 等^[18]的通用引物,根据序列比对设计 CO II 和 16S rRNA 基因扩增特异引物(表 1)。3 个基因的 PCR 扩增体系为 50 μL,包括 rTaq 酶 25 μL,模板 2 μL,正反向引物各 1 μL,ddH₂O 21 μL,PCR 扩增程序如表 2。

将 PCR 产物在 1.0%琼脂糖凝胶电泳并回收,连接到 T1-Simple 载体,在转化到大肠杆菌感受态细胞中之后涂布于培养皿中,在 37 ℃培养箱中

表 1 三种鲷线粒体 DNA 条形码 PCR 引物
Tab. 1 Mitochondrial DNA barcode PCR primers of three *Seriola* species

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	PCR 产物/bp PCR product
CO I	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	59	655
	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		
CO II	ATGGCACATCCCTCCCAACT	54	646
	AAGCGTCTTCAACTATTAGTGATGT		
16S rRNA	CTCCAAGACAGCCTAACAATA	53	750
	CGTGGTGCCATTTCATACAG		

表 2 本研究 3 种基因 PCR 扩增程序
Tab. 2 PCR amplification programs of three genes in the study

基因 gene	扩增条件 PCR amplification program				
	变性 initial denaturation	退火 annealing	72 °C 延伸 extension	循环数 cycles	最后延伸 final extension
CO I		59 °C, 40 s	60 s	36	72 °C 5 min
CO II	95 °C 5 min	54 °C, 50 s	60 s	38	4 °C Forever
16S rRNA		53 °C, 60 s	70 s	38	

倒置培养 12~16 h, 挑取单克隆菌落进行阳性检测, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 序列比对与建树分析 从 GenBank 数据库下载与本研究 3 种基因扩增区段一致的 15 种 5 属鲷科鱼类 CO I、CO II、16S rRNA 基因序列, 通过 BOLD 数据库对下载序列进行准确性验证, 同时在 FishBase 中检验种名的有效性, 最终采用的基因序列为 35 条。将得到的测序结果采用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 其中 CO I 基因在 BOLD (生命条形码数据系统 www.boldsystems.org)和中国重要渔业生物 DNA 条形码信息平台标准库(<http://www.fishery-barcode.cn>)中进行比对校验。采用 DnaSP5.10 软件进行遗传多样性参数分析, 包括单倍型数(h)、单倍型多样性指数(H_d)、核苷酸多样性指数(P_i)、平均核苷酸差异数(k)等。运用 Mega7.0 软件, 统计序列碱基组成, 计算序列保守位点(C-conserved sites)、简约信息位点(Parsimony-informative sites)和变异位点(V-variable

sites)等, 运用最大似然法(maximum likelihood, ML), 采用 Kimura 2-parameter 模型计算其遗传距离, 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

在三种鲷属鱼类的样本中均扩增出 3 个基因的目的片段, 共获得 65 条序列, 测序得到的片段大小为 655 bp (CO I)、646 bp (CO II)、750 bp (16S rRNA), 与预测结果一致。

三种鲷属鱼类的 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因片段中 T、C、A 和 G 平均含量见表 3。CO I 基因中 A+T 平均含量为 51.3%, 稍高于 G+C 平均含量(48.7%), 表现出 A+T 偏倚性; CO II 基因中 A+T 平均含量为 56.7%, 高于 G+C 平均含量(43.3%); 16S rRNA 基因中 A+T 平均含量为 51.6%, 稍高于 G+C 平均含量(48.4%); 3 种基因的 GC 平均含量在 43.4%~48.7%之间, 在不同鲷属鱼类间差异不显著, 其中 CO II 基因 GC 含量最低(43.3%), CO I 基因 GC

表 3 三种鲷 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因碱基组成
Tab. 3 Base composition of CO I、CO II and 16S rRNA genes in three *Seriola* species

组编号 group number	CO I 碱基含量 CO I base content				CO II 碱基含量 CO II base content				16S rRNA 碱基含量 16S rRNA base content			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
SL	28.2	29.2	23.1	19.5	28.3	26.3	28.9	16.4	20.4	26.4	30.9	22.3
JSL	28.2	29.2	23.2	19.4	28.2	26.4	28.9	16.5	20.4	26.4	30.9	22.3
ASL	28.1	29.0	23.3	19.6	28.1	26.7	28.3	16.9	20.5	26.5	30.8	22.2
SD	28.7	29.0	23.2	19.1	28.1	27.0	28.3	16.6	21.1	25.2	31.3	22.4
SQ	28.4	29.2	22.3	20.1	27.6	27.1	28.6	16.8	20.4	26.5	31.3	21.7
平均 average	28.3	29.1	23.0	19.6	28.1	26.7	28.6	16.6	20.6	26.2	31.0	22.2

注: SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SD 为高体鲷; SQ 为五条鲷。
Note: SL is *Seriola lalandi*; JSL is *Seriola lalandi* from Japan; ASL is *Seriola lalandi* from Australia; SD is *Seriola dumerili*; SQ is *Seriola quinqueradiata*.

含量最高(48.7%)。3 种基因均表现出 A+T 偏倚性。各密码子的碱基含量结果显示(表 4), CO I 序列中, 第 2 密码子位点 GC 含量(56.5%)高于第 1 和第 3 密码子位点(47.7%和 42.0%), 且第 1 密码子变异位点最低(23); CO II 序列中, 第 2 密码子位点 GC 含量(57.6%)显著高于第 1 和第 3 密码子位点(39.4%和 33.0%); 16S rRNA 序列中, 第 1 密码子位点 GC 含量(50.0%)略高于第 2 和第 3 密码子位点(48.5%和 46.3%), CO II (30)和 16S rRNA (20)的第 1 密码子变异位点最高, 碱基使用频率表现出明显 A+T 偏倚性。

三种鲷属鱼类遗传多样性参数统计见表 5。CO I 基因序列的变异率为 13.58%, 高于 CO II (12.22%)和 16S rRNA (5.06%); CO I 序列转换/颠换比 R 为 16.60, 远高于 CO II (6.78)和 16S rRNA (3.22)。16S rRNA 的保守位点所占比率为 94.93%, 是 3 种基因序列中最保守的, 表明其遗传物质稳定, 核苷酸变异低。从平均核苷酸差异数(k)和核酸多样性指数(P_i)来看, CO I 序列要高于 CO II 和 16S rRNA, 而 CO II 是三种基因中单倍型多样性指数最高的, 表明其遗传多样性较高, 且 CO I 序列分化程度更高。

表 4 三种鲷 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列片段各密码子碱基组成及变异位点
Tab. 4 The sequence composition and variation of CO I, CO II and 16S rRNA genes in three *Seriola* species

位点 site	CO I						CO II						16S rRNA					
	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V
第一位点 1st site	23.8	35.3	28.5	12.4	47.7	23	27.8	32.3	32.8	7.1	39.4	25	19.7	26.1	30.3	23.9	50.0	5
第二位点 2nd site	18.3	24.8	25.2	31.7	56.5	31	17.2	26.5	25.2	31.1	57.6	30	17.2	24.0	34.2	24.5	48.5	20
第三位点 3rd site	42.9	27.3	15.1	14.7	42.0	35	39.1	21.4	27.9	11.6	33.0	24	24.8	28.4	28.9	17.9	46.3	13

注: V 表示变异位点数。
Note: V indicates variable site number.

表 5 三种基因片段的遗传多样性参数
Tab. 5 Genetic diversity parameters of three gene fragments

基因 gene	序列长度 sequence length	遗传多样性参数 genetic diversity parameter							
		C	V	PI	R	h	H_d	k	P_i
CO I	655	566	89	88	16.60	9	0.913	32.585	0.04990
CO II	646	567	79	70	6.78	10	0.918	29.251	0.04528
16S rRNA	750	712	38	37	3.22	5	0.742	14.332	0.01961

注: C 为保守位点; V 为变异位点; PI 为简约信息位点; R 为转换/颠换比; h 为单倍型数; H_d 为单倍型多样性指数; k 为平均核苷酸差异数; P_i 为核苷酸多样性指数。
Note: C is conserved site; V is variable site; PI is parsimony-informative site; R is transitions/transversions ratio; h is number of haplotypes; H_d is haplotype diversity; k is average number of nucleoside difference; P_i is nucleotide diversity.

2.2 遗传距离分析

基于 CO I 基因, 依据 K_2P 模型计算得到鲷属鱼类 8 个物种和 4 种鲷亚科近缘属鱼类的种内与种间遗传距离(表 6)。结果显示, 种内遗传距离为 0.00~0.0046 (平均为 0.0013), 均低于 Hebert 等^[19]提出的最大种内距离为 0.02 的标准; 种间的平均遗传距离为 0.0785, 为种内平均遗传距离的 60 倍, 符合 Hebert 等^[19]提出的“10×规则”。中国和日本黄条鲷的平均遗传距离为 0.004, 而中国与澳大利亚黄条鲷的遗传距离为 0.022~0.025, 中国与智

利黄条鲷遗传距离为 0.029~0.031, 日本与澳大利亚黄条鲷遗传距离为 0.022, 可见, CO I 基因能够有效区分中国、日本与澳大利亚和智利黄条鲷群体。鲷属内, 高体鲷与几内亚鲷、斑纹鲷和环带鲷之间的遗传距离最大, 平均遗传距离为 0.13, 与长鳍鲷亲缘关系最近, 为 0.061; 黄条鲷与五条鲷遗传距离平均为 0.068, 亲缘关系最近。另外, 鲷属鱼类与其他 4 种鲷科鱼类之间的遗传距离均大于 0.14, 表明 CO I 基因还能用于鲷属鱼类与其他鲷科鱼类的区分。

表 6 基于 CO I 的遗传距离分析
Tab. 6 Genetic distance analysis based on CO I

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1																							
2	0.006																						
3	0.031	0.029																					
4	0.029	0.027	0.002																				
5	0.107	0.105	0.115	0.112																			
6	0.107	0.105	0.115	0.112	0.000																		
7	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110																	
8	0.029	0.027	0.006	0.004	0.112	0.112	0.002																
9	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110	0.000	0.002															
10	0.107	0.105	0.115	0.112	0.000	0.000	0.110	0.112	0.110														
11	0.027	0.025	0.004	0.002	0.110	0.110	0.000	0.002	0.000	0.110													
12	0.004	0.002	0.027	0.025	0.103	0.103	0.023	0.025	0.023	0.103	0.023												
13	0.070	0.068	0.068	0.066	0.114	0.114	0.064	0.066	0.064	0.114	0.064	0.066											
14	0.070	0.068	0.068	0.066	0.114	0.114	0.064	0.066	0.064	0.114	0.064	0.066	0.000										
15	0.183	0.180	0.181	0.178	0.180	0.180	0.176	0.178	0.176	0.180	0.176	0.178	0.196	0.196									
16	0.202	0.199	0.205	0.202	0.202	0.202	0.199	0.202	0.199	0.202	0.199	0.197	0.199	0.199	0.163								
17	0.129	0.126	0.122	0.120	0.138	0.138	0.117	0.120	0.117	0.138	0.117	0.124	0.112	0.112	0.204	0.209							
18	0.087	0.085	0.085	0.083	0.103	0.103	0.081	0.083	0.081	0.103	0.081	0.083	0.083	0.165	0.176	0.103							
19	0.008	0.006	0.031	0.029	0.103	0.103	0.027	0.029	0.027	0.103	0.027	0.004	0.070	0.070	0.178	0.197	0.129	0.087					
20	0.068	0.066	0.070	0.068	0.107	0.107	0.066	0.068	0.066	0.107	0.066	0.064	0.006	0.006	0.196	0.199	0.110	0.076	0.068				
21	0.115	0.113	0.113	0.110	0.061	0.061	0.108	0.110	0.108	0.061	0.108	0.110	0.106	0.106	0.165	0.181	0.124	0.094	0.110	0.108			
22	0.165	0.163	0.171	0.168	0.173	0.173	0.165	0.168	0.165	0.173	0.165	0.160	0.148	0.148	0.197	0.210	0.171	0.150	0.155	0.141	0.173		
23	0.211	0.209	0.212	0.209	0.200	0.200	0.206	0.204	0.206	0.200	0.206	0.206	0.209	0.209	0.111	0.152	0.208	0.185	0.211	0.209	0.190	0.198	
24	0.105	0.103	0.117	0.115	0.134	0.134	0.113	0.115	0.113	0.134	0.113	0.101	0.110	0.110	0.165	0.184	0.092	0.081	0.101	0.103	0.117	0.155	0.180
25	0.098	0.096	0.101	0.098	0.126	0.126	0.096	0.098	0.096	0.126	0.096	0.094	0.100	0.100	0.199	0.195	0.131	0.103	0.094	0.096	0.124	0.142	0.193

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9 为中国黄条鲷(MH211123); 10 为日本高体鲷(AB517558); 11 为日本黄条鲷(AB517557); 12 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 13-14 为中国五条鲷; 15 为长身圆鲷(KF841444); 16 为乌鲷(KJ192332); 17 为几内亚鲷(KX512706); 18 为马鲷(EF609459); 19 为智利黄条鲷(KU312964); 20 为日本五条鲷(AB517556); 21 为长鳍鲷(KP347126); 22 为小甘鲷(KT591876); 23 为竹荚鱼(AB108498); 24 为斑纹鲷(DQ197998); 25 为环带鲷(MT455069).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumerili* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9. *Seriola lalandi* (MH211123) from China; 10. *Seriola dumerili* (AB517558); 11. *Seriola lalandi* (AB517557); 12. *Seriola lalandi* (LC597109); 13-14. *Seriola quinqueradiata* from China; 15. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 16. *Parastromateus niger* (KJ192332); 17. *Seriola carpenteri* (KX512706); 18. *Seriola hippos* (EF609459); 19. *Seriola lalandi* (KU312964); 20. *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 21. *Seriola rivoliana* (KP347126); 22. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 23 *Trachurus trachurus* (AB108498); 24. *Seriola fasciata* (DQ197998); 25. *Seriola zonata* (MT455069).

由表 7 可见, 基于 CO II 基因, 鲷属鱼类种内遗传距离为 0.00~0.006, 平均遗传距离为 0.003。属内种间遗传距离为 0.044~0.098, 平均遗传距离为 0.047, 为种内平均遗传距离的 16 倍, 其中黄条鲷与五条鲷遗传距离最小(0.044), 高体鲷和五条鲷遗传距离最大(0.098)。中国和日本种群的黄条鲷遗传距离较小(0.00~0.003), 中国与澳大利亚

黄条鲷遗传距离较大(0.025)。鲷属鱼类与其他鲷科鱼类比较发现, 小甘鲷(条鲷属)与鲷属鱼的亲缘关系较近, 二者之间遗传距为(0.041~0.069), 其中长身圆鲷与五条鲷的亲缘关系较远, 遗传距离最大, 为 0.180。表明 CO II 基因能有效将鲷属鱼类不同种区分, 还可用于鲷科鱼类属间高阶分类单元。

表 7 基于 CO II 的遗传距离分析
Tab. 7 Genetic distance analysis based on CO II

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1																		
2	0.003																	
3	0.025	0.025																
4	0.022	0.022	0.003															
5	0.085	0.085	0.078	0.076														
6	0.085	0.085	0.078	0.076	0.000													
7	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076												
8	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000											
9	0.052	0.052	0.049	0.045	0.098	0.098	0.045	0.045										
10	0.052	0.052	0.049	0.045	0.098	0.098	0.045	0.045	0.000									
11	0.187	0.185	0.189	0.185	0.168	0.168	0.185	0.185	0.182	0.182								
12	0.058	0.058	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.069	0.069	0.166							
13	0.171	0.169	0.169	0.169	0.175	0.175	0.169	0.169	0.172	0.172	0.142	0.174						
14	0.184	0.182	0.180	0.178	0.179	0.179	0.178	0.178	0.186	0.186	0.120	0.169	0.161					
15	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000	0.000	0.045	0.045	0.185	0.043	0.169	0.178				
16	0.083	0.083	0.076	0.074	0.002	0.002	0.074	0.074	0.096	0.096	0.166	0.041	0.173	0.176	0.074			
17	0.022	0.022	0.003	0.000	0.076	0.076	0.000	0.000	0.045	0.045	0.185	0.043	0.169	0.178	0.000	0.074		
18	0.002	0.002	0.024	0.021	0.083	0.083	0.021	0.021	0.050	0.050	0.185	0.057	0.169	0.182	0.021	0.081	0.021	
19	0.062	0.062	0.069	0.066	0.057	0.057	0.066	0.066	0.082	0.082	0.173	0.058	0.165	0.172	0.066	0.055	0.066	0.060
20	0.048	0.048	0.045	0.042	0.094	0.094	0.042	0.042	0.003	0.003	0.180	0.066	0.170	0.188	0.042	0.092	0.042	0.047 0.078

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9-10 为中国五条鲷; 11 为竹荚鱼(AB108498); 12 为小甘鲷(KT591876); 13 为乌鲷(KJ192332); 14 为长身圆鲷(KF841444); 15 为中国黄条鲷(MH211123); 16 为日本高体鲷(AB517558); 17 为日本黄条鲷(AB517557); 18 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 19 为长鳍鲷(KP347126); 20 为日本五条鲷(AB517556).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumeril* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9-10. *Seriola quinqueradiata* from China; 11. *Trachurus trachurus* (AB108498); 12. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 13. *Parastromateus niger* (KJ192332); 14. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 15. *Seriola lalandi* (MH211123) from China; 16. *Seriola dumerili* (AB517558); 17. *Seriola lalandi* (AB517557); 18. *Seriola lalandi* (LC597109); 19. *Seriola rivoliana* (KP347126); 20. *Seriola quinqueradiata* (AB517556).

如表 8 所示, 基于 16S rRNA 基因, 鲷属鱼类种内遗传距离为 0.00~0.005, 4 种鲷属鱼类的遗传距离相差不大(小于 0.05); 种间的平均遗传距离为 0.0583, 为种内平均遗传距离的 19 倍; 除了鲷科鱼类中小甘鲷(条鲷属)与鲷属鱼类亲缘关系最近, 其他 3 种鲷科鱼类平均遗传距离都在 0.10 以上。基于 16S rRNA 计算, 中国与澳大利亚黄条鲷的遗传距离在 0.01 以内, 其对于不同地理群体的黄条鲷辨识力不足。

2.3 系统进化树分析

由图 1、图 2、图 3 可知, 基于 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列构建了鲷属鱼类与 4 种鲷

科鱼类的系统进化树, 发现可分为两个类群, 以鲷属鱼类和小甘鲷组成的一大类, 另一类则是以长身圆鲷、乌鲷和竹荚鱼组成。系统进化分析显示, 每个鱼种都聚为独立分支, 各物种均能得到有效区分且具有很高的支持度。同时, 其中基于 CO I、CO II 构建的进化树显示中国和日本黄条鲷聚为单系分支, 可有效区分中国、日本、澳大利亚和智利黄条鲷群体, 但基于 16S rRNA 的系统进化分析, 无法有效区分中国与澳大利亚黄条鲷群体。同时发现, 黄条鲷和五条鲷聚为一支, 高体鲷和长鳍鲷聚为一支, 表现出彼此相近的亲缘关系。在 CO II 基因进化树中, 小甘鲷与黄条鲷和五

表 8 基于 16S rRNA 的遗传距离分析
Tab. 8 Genetic distance analysis based on 16S rRNA

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																			
2	0.001																		
3	0.008	0.007																	
4	0.008	0.007	0.000																
5	0.036	0.035	0.036	0.036															
6	0.036	0.035	0.036	0.036	0.000														
7	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036													
8	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036	0.000												
9	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021											
10	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021	0.000										
11	0.056	0.058	0.058	0.058	0.062	0.062	0.058	0.058	0.059	0.059									
12	0.033	0.035	0.038	0.038	0.026	0.026	0.038	0.038	0.042	0.042	0.059								
13	0.021	0.019	0.021	0.021	0.040	0.040	0.021	0.021	0.000	0.000	0.059	0.042							
14	0.001	0.002	0.010	0.010	0.035	0.035	0.010	0.010	0.019	0.019	0.055	0.032	0.019						
15	0.008	0.007	0.000	0.000	0.036	0.036	0.000	0.000	0.021	0.021	0.058	0.038	0.021	0.010					
16	0.035	0.033	0.035	0.035	0.001	0.001	0.035	0.035	0.039	0.039	0.061	0.025	0.039	0.033	0.035				
17	0.010	0.010	0.001	0.001	0.038	0.038	0.001	0.001	0.022	0.022	0.056	0.039	0.022	0.011	0.001	0.036			
18	0.127	0.128	0.127	0.127	0.127	0.128	0.128	0.128	0.130	0.130	0.135	0.125	0.130	0.125	0.128	0.127	0.130		
19	0.157	0.157	0.154	0.154	0.151	0.151	0.154	0.154	0.155	0.155	0.155	0.149	0.155	0.157	0.154	0.151	0.152	0.090	
20	0.155	0.155	0.157	0.157	0.147	0.147	0.155	0.155	0.150	0.150	0.146	0.145	0.150	0.153	0.155	0.145	0.153	0.084	0.058

注: 1-2 为澳大利亚黄条鲷; 3-4 为中国黄条鲷; 5-6 为中国高体鲷; 7-8 为日本黄条鲷; 9-10 为中国五条鲷; 11 为小甘鲷(KT591876); 12 为长鳍鲷(KP347126); 13 为日本五条鲷(AB517556); 14 为澳大利亚黄条鲷(LC597109); 15 为日本黄条鲷(AB517557); 16 为日本高体鲷(AB517558); 17 为中国黄条鲷(MH211123); 18 为乌鲂(KJ192332); 19 为长身圆鲂(KF841444); 20 为竹荚鱼(AB108498).

Note: 1-2. *Seriola lalandi* from Australia; 3-4. *Seriola lalandi* from China; 5-6. *Seriola dumerili* from China; 7-8. *Seriola lalandi* from Japan; 9-10. *Seriola quinqueradiata* from China; 11. *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 12. *Seriola rivoliana* (KP347126); 13. *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 14. *Seriola lalandi* (LC597109); 15. *Seriola lalandi* (AB517557); 16. *Seriola dumerili* (AB517558); 17. *Seriola lalandi* (MH211123); 18. *Parastromateus niger* (KJ192332); 19. *Decapterus macrosoma* (KF841444); 20. *Trachurus trachurus* (AB108498).

条鲷亲缘关系更近一步。16S rRNA 基因序列较 CO I 和 CO II 分化程度较低, 遗传差异较小。综上所述, 基于 3 种基因所建的 ML 进化树对鲷属鱼类的不同鱼种具有准确的辨识力。

3 讨论

DNA 作为生物的遗传信息载体, 含有丰富的多态性信息, 受外界因素的影响较小, 使其能够准确地反映物种间的遗传关系, 随着线粒体 DNA 研究的不断深入, 其作为分子标记被广泛应用于不同鱼类种群系统发育分析中^[20]。线粒体基因组中不同蛋白编码基因的进化速率是不同的, 各基

因所传递的遗传信息量也不同^[21], 根据研究需要, 选择合适的分子标记位点进行分析。本研究共分析了 CO I、CO II 与 16S rRNA 三个线粒体基因在鲷属鱼类物种以及不同地理种群黄条鲷鉴别方面的应用, 结果表明其对鲷属鱼类的物种判别方面具有较好的适用性, 但 16S rRNA 在黄条鲷地理种群水平层面的鉴别能力不足。因此, 利用 2 个或 3 个基因序列可以提升 DNA 条形码技术在鲷属鱼类群体鉴别、种质资源多样性保护与利用方面的可靠性。

CO I 基因是最早且目前应用最为广泛的 DNA 条形码, 具有丰富的遗传变异信息, 在鱼类

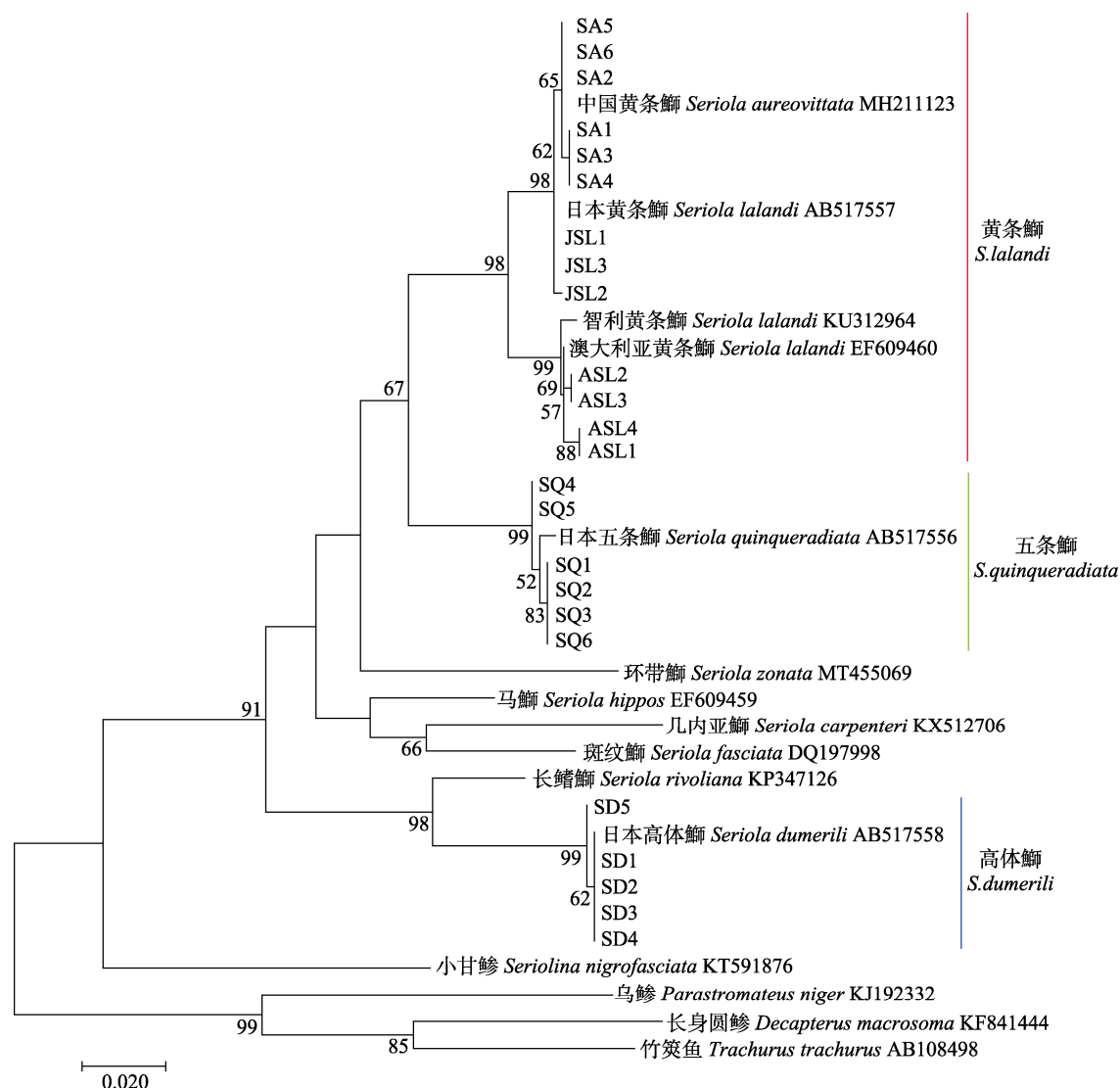


图 1 基于 CO I 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鰺; JSL 为日本黄条鰺; ASL 为澳大利亚黄条鰺; SQ 为中国五条鰺; SD 为中国高体鰺。节点处数字为置信度值。

Fig. 1 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on CO I gene

SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia;

SQ represents *Seriola quinquerradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.

The number on branch is confidence value.

的物种鉴定和系统进化发育研究领域取得了诸多进展^[22]。同 CO I 基因一样, CO II 也具有进化信息位点多、易扩增且相对较短的特点,也是一种理想的 DNA 分子标记。对昆虫的研究表明, CO II 基因在对属内不同种、种内不同亚种或不同地理区域之间的物种鉴定方面,是一种非常有效的分子标记^[23-24]。另外, 16S rRNA 基因序列相对保守, 也具备条形码的准则, 通常作用于种以上的分类阶元进行物种鉴定, 在鲷形目鱼类^[25]和石斑鱼^[26]分类鉴定与系统进化分析中已经得到广泛的应

用。在本研究中, 基于 CO I 基因分析, 三种鰺属鱼类的平均碱基含量为(T: 28.3, C: 29.1, A: 23.0, G: 19.6), AT 平均含量(51.3%)显著高于 GC 平均含量(48.7%); 其中, CO I 基因第二密码子位点 GC 含量最高(56.5%), 第三密码子位点 GC 含量最低(42.0%), 表现明显的 AT 偏倚性, 与柳淑芳等^[27]研究结果一致; Ward 等^[28]报道了硬骨鱼中 CO I 基因第一密码子 GC 含量最高, 第三密码子 GC 含量最低; 姜郦轩等^[29]分析了南极鱼亚目 CO I 基因的第一密码子 GC 含量最高, 第二密码子 GC

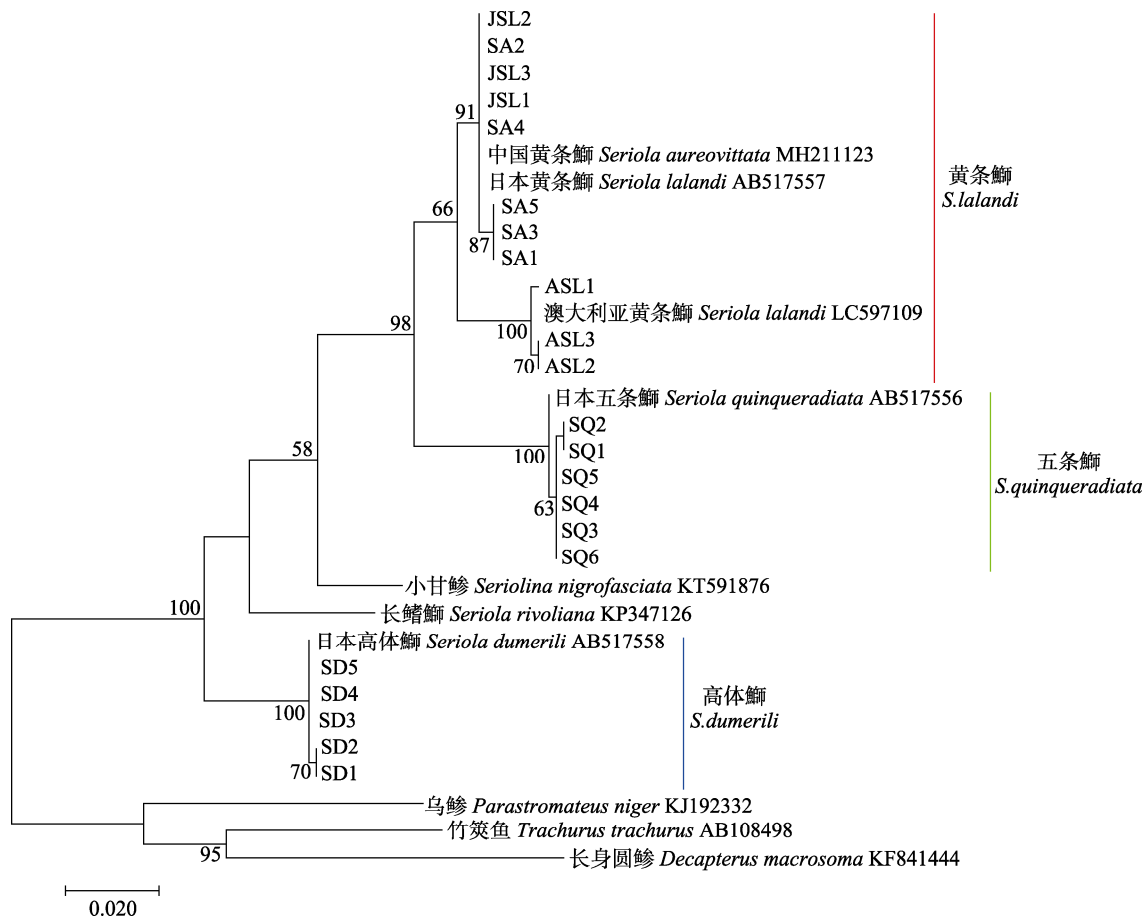


图 2 基于 CO II 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SQ 为中国五条鲷; SD 为中国高体鲷. 节点处数字为置信度值.

Fig. 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on CO II gene

SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia; SQ represents *Seriola quinqueradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.

The number on branch is confidence value.

含量最低。以上研究表明, 不同类群鱼种其 CO I 基因碱基组成不同, GC 向 AT 进化过程中具有选择压力。本研究结果显示, 三种基因序列中的转换频率均高于颠换, CO I 基因转换与颠换比值 R 平均为 16.60, 远大于 CO II (6.78)、16S rRNA (3.22), 由于 R 值大于 2.0, 表明三种基因序列的突变均未达到饱和, 在物种进化中还存在着巨大的进化潜能^[30]。

本研究发现基于 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因分析的鲷属鱼类种间遗传距离均低于 0.02 的标准, 种间的平均遗传距离为种内平均遗传距离的 16 倍以上, 符合 Hebert 等^[19]提出的“10×规则”, 因此均可作为鲷属鱼类物种鉴别的 DNA 条形码。本研究还构建了鲷科鱼类 5 属 15 种鱼类系统进化

树, 结果显示每个物种都独立分支, 单系性得到了很好的支持。其中, 鲷属鱼类与小甘鲷聚为一支, 遗传距离较近, 黄条鲷与五条鲷遗传距离最小, 亲缘关系最近, 这与郑文娟等^[31]对 12 种鲷科鱼类进行系统发育分析的结果一致; 鲷属鱼类中 CO I 序列的平均种间遗传距离与种内平均遗传距离的比值远大于 CO II 和 16S rRNA, 表明 CO I 序列比其他序列拥有更多的系统发育信息, 更适合解析亲缘关系密切的分类类群^[32]。CO I、CO II 基因不仅能有效辨识几种鲷属鱼类之间的亲缘关系, 还可用于鲷科鱼类不同属间的鉴别, 为鲷科鱼类高阶分类单元的确定提供参考。基于 16S rRNA 计算的鲷属鱼类在进化时间上基本相似, 遗传差异不显著, 可能是由于所研究物种不同组

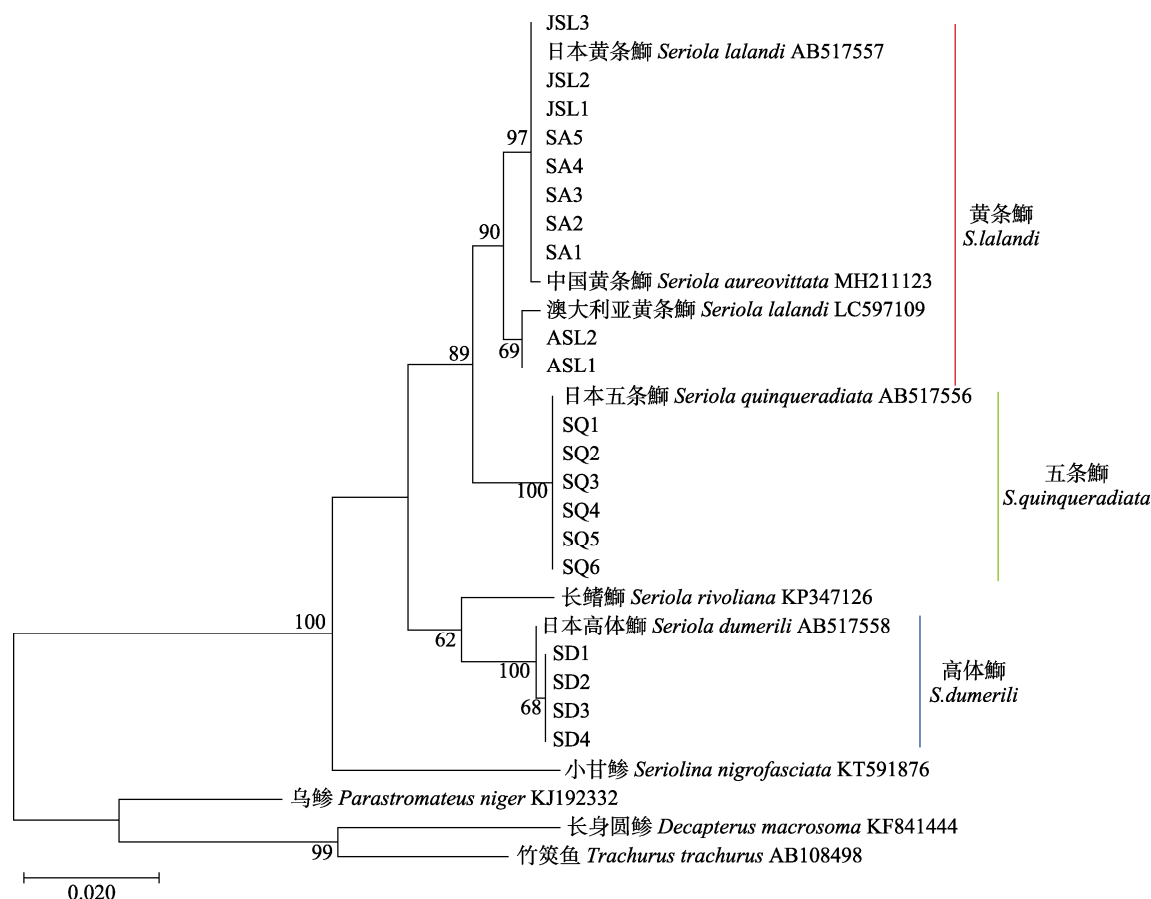


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的 ML 系统进化树

SL 为中国黄条鲷; JSL 为日本黄条鲷; ASL 为澳大利亚黄条鲷; SQ 为中国五条鲷; SD 为中国高体鲷. 节点处数字为置信度值.

Fig. 3 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S Rrna gene

SL represents *Seriola lalandi* from China; JSL represents *Seriola lalandi* from Japan; ASL represents *Seriola lalandi* from Australia; SQ represents *Seriola quinqueradiata* from China; SD represents *Seriola dumerili* from China.

The number on branch is confidence value

织分化迅速而所选取的标记基因进化速率较慢, 一些变异得不到及时累积而引起^[33-34]。

线粒体 DNA 在检测地理隔离对鱼类群体遗传结构的应用中发挥着重要作用, Premachandra 等^[35]利用基因组测序、线粒体 DNA、微卫星标记分析等方法研究认为太平洋海域的黄条鲷分为三个明显地理隔离的群体, 分别是东北、西北和南太平洋群体, 并且群体间基本不存在基因交流。本研究发现, CO I、CO II 基因能够有效辨识中国与澳大利亚、智利种群的黄条鲷, 对于中国和日本海域黄条鲷不能有效区分, 这与崔爱君^[36]采用 SNP 分子标记、基因组分析的结果一致, 进一步支持了中国与日本黄条鲷可能属于同一群体, 而与澳大利亚、智利黄条鲷种群存在显著的地理隔离。对于不同地理种群的黄条鲷, 16S rRNA 基因

无法有效区分, 与陆键萍等^[37]在金枪鱼群体中研究结果相似。由遗传多样性表明, 16S rRNA 各项参数都是最低的, 变异率仅为 5.06%, 表明其进化速率慢, 遗传物质具有稳定性。CO I 序列的平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数均高于 CO II, 而 CO II 序列的单倍型多样性指数却是三种序列最高的, 表明在鲷属鱼类中 CO I 较 CO II 基因序列变异速度快, 这与鳗鲡属(*Anguilla*)鱼类中规律类似^[38]。将 16S rRNA 与 CO I、CO II 基因结合起来, 可为不同种群黄条鲷的鉴定提供有效的辅助依据。

综上所述, 本研究发现 CO I、CO II 和 16S rRNA 基因序列均可作为鲷属鱼类物种鉴定的有效 DNA 条形码。另外, CO I、CO II 可作为不同地理群体黄条鲷的鉴别 DNA 条形码, 而 16S

rRNA 对于不同地理群体的黄条鲷识别能力不足。在 DNA 条形码应用于物种鉴定或隐藏种分析时,可采用多 DNA 条形码联合验证的方法,以提高技术应用的准确性和可靠性。

参考文献:

- [1] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 479.
- [2] Curole J P, Kocher T D. Mitogenomics: Digging deeper with complete mitochondrial genomes[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, 14(10): 394-398.
- [3] Barrett R D H, Hebert P D N. Identifying spiders through DNA barcodes[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2005, 83(3): 481-491.
- [4] Wang N, Xing R R, Ma C C, et al. Application of DNA barcoding technology for authentication of salmonids[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 232-240. [王楠, 邢冉冉, 马聪聪, 等. DNA 条形码技术在鲑科鱼类真伪鉴别中的应用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 232-240.]
- [5] Lü Y C, Zuo T, Tang Q J, et al. Construction and application of DNA barcoding in sea cucumber Holothurians[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 782-789. [律迎春, 左涛, 唐庆娟, 等. 海参 DNA 条形码的构建及应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 782-789.]
- [6] Sun C, Su Y P, Liu H B, et al. The identification of closely related species and origin of aquatic organisms by molecular approaches[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(3): 53-59. [孙超, 苏彦平, 刘洪波, 等. 水生生物近缘种和产地的分子生物学判别[J]. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 53-59.]
- [7] Mackie I M, Pryde S E, Gonzales-Sotelo C, et al. Challenges in the identification of species of canned fish[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10(1): 9-14.
- [8] Takeyama H, Chow S, Tsuzuki H, et al. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(6): 1646-1657.
- [9] Bakke I, Johansen S D. Molecular phylogenetics of Gadidae and related Gadiformes based on mitochondrial DNA sequences[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(1): 61-69.
- [10] Balanov A A. On the species composition of fish of the genus *Seriola* (Carangidae) in the northwestern part of the sea of Japan[J]. *Journal of Ichthyology*, 2008, 48(6): 415-421.
- [11] Meng Q W, Su J X, Miao X Z. Systematics of Fishes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 672-673. [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 672-673.]
- [12] Iguchi J, Takashima Y, Namikoshi A, et al. Species identification method for marine products of *Seriola* and related species[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(1): 197-206.
- [13] Wang M, Liu H, Huang H, et al. Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding[J]. *Food Science*, 2015, 36(20): 247-251. [王敏, 刘荭, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用[J]. *食品科学*, 2015, 36(20): 247-251.]
- [14] Lakra W S, Verma M S, Goswami M, et al. DNA barcoding Indian marine fishes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(1): 60-71.
- [15] Wang C H, Li S F. Genetic variability and relationships in mitochondrial DNA CO II gene sequence of red common carps in China[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(11): 1226-1231.
- [16] Shao A H, Zhu J, Chen K, et al. Cloning and sequence analysis of mitochondrial CO II and its connected tRNA in *Takifugu fasciatus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(6): 1-8. [邵爱华, 朱江, 陈葵, 等. 暗纹东方鲀线粒体 CO II 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(6): 1-8.]
- [17] Wang S Y, Shi W, Jiang J X, et al. Applicability of mitochondrial CO I and 16S rRNA gene sequences in species identification of sole fish (Pleuronectiformes: Soleidae)[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2014, 33(3): 57-65. [王淑英, 时伟, 江金霞, 等. CO I 和 16S rRNA 基因序列在鲆科 (Soleidae) 鱼类种类鉴定中的适用性研究[J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(3): 57-65.]
- [18] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL[J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(2): 329-356.
- [19] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [20] Qiao H Y. Phylogeny of Schizothoracinae fishes and genetic structure of *Pampus argenteus* population based on mitochondrial DNA sequences[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 16-17. [乔慧莹. 基于线粒体基因序列分析裂腹鱼亚科的系统进化关系及中国沿海银鲴群体的遗传结构[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 16-17.]
- [21] Zhao K. Mitochondrial DNA (mtDNA) of fish and application in molecular phylogenetic[J]. *Journal of Qinghai University (Nature Science)*, 2006, 24(2): 49-53. [赵凯. 鱼类线粒体 DNA(mtDNA)及其在分子系统学中的应用[J]. *青海大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(2): 49-53.]
- [22] Šegvić-Bubić T, Marrone F, Grubišić L, et al. Two seas, two

- lineages: How genetic diversity is structured in Atlantic and Mediterranean greater amberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810 (Perciformes, Carangidae)[J]. Fisheries Research, 2016, 179: 271-279.
- [23] Shao H G, Zhang Y P, Ke X, et al. *Cryptopygus nanjiensis* mitochondrial CO II gene sequence and molecular evolution of wingless insects[J]. Science in China (Series C), 2000, 30(3): 330-336. [邵红光, 张亚平, 柯欣, 等. 南极隐鲱线粒体 CO II 基因序列及无翅类昆虫分子进化[J]. 中国科学 (C 辑), 2000, 30(3): 330-336.]
- [24] Chen F S, Wei Z J, Li Q B, et al. Molecular characterization of the cytochrome oxidase subunit II gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm *Samia cynthia ricini*[J]. Acta Sericologica Sinica, 2004, 30(1): 38-43. [陈复生, 魏兆军, 李庆宝, 等. 蓖麻蚕线粒体 *cox2* 基因的克隆、序列测定和分子系统学分析[J]. 蚕业科学, 2004, 30(1): 38-43.]
- [25] Craig M T, Pondella D J II, Franck J P C II, et al. On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 19(1): 121-130.
- [26] Meng Z N, Zhuang Z M, Ding S X, et al. Sequence variation and molecular phylogeny of mitochondrial 16S rRNA genes in eight species of Sciaenidae from offshore China[J]. Progress in Natural Science, 2004, 14(5): 514-521 [蒙子宁, 庄志猛, 丁少雄, 等. 中国近海 8 种石首鱼类的线粒体 16S rRNA 基因序列变异及其分子系统进化[J]. 自然科学进展, 2004, 14(5): 514-521.]
- [27] Liu S F, Chen L L, Dai F Q, et al. Application of DNA barcoding gene CO I for classifying family Sciaenidae[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(2): 223-232. [柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.]
- [28] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [29] Jiang L X, Zhang J C, Fan G Z, et al. DNA barcoding and molecular systematics of Notothenioidei[J]. Journal of Fishery Sciences of China, (2021-05-11). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20210511.0951.002.html>. [姜郦轩, 张吉昌, 樊钢洲, 等. 南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码及分子系统学[J]. 中国水产学, (2021-05-11). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20210511.0951.002.html>.]
- [30] Huang Y. Molecular Phylogenetics: Principle, Method and Application[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 70-76. [黄原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 70-76.]
- [31] Zheng W J, Zhu S H, Zou J X, et al. Molecular phylogenetic relationship of Carangidae based on partial sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 847-854. [郑文娟, 朱世华, 邹记兴, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨 12 种鲹科鱼类的分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 847-854.]
- [32] Liu J, Cao J B, Liu C L, et al. Relationship analysis and species identification of three common pomfrets using mitochondrial CO III gene[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2018, 33(6): 20-26, 72. [刘军, 曹佳宝, 刘彩玲, 等. 线粒体 CO III 基因分析三种常见鲷鱼的亲缘关系[J]. 天津科技大学学报, 2018, 33(6): 20-26, 72.]
- [33] Chen S H, Qu Y J, Li J E. Mitochondrial DNA and its progresses in fish[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(3): 13-20. [陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(3): 13-20.]
- [34] Shadel G S, Clayton D A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 409-435.
- [35] Premachandra H K A, la Cruz F L D, Takeuchi Y, et al. Genomic DNA variation confirmed *Seriola lalandi* comprises three different populations in the Pacific, but with recent divergence[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 9386.
- [36] Cui A J. Study on the population genetics of the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 5-6. [崔爱君. 黄条鲷种群遗传特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 5-6.]
- [37] Lu J P, Yao L, Xin H M, et al. Applicability analysis of mitochondrial CO I, Cyt b and 16S rRNA genes in identification of six tuna species[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 73-81. [陆键萍, 姚琳, 信红梅, 等. 线粒体 CO I、Cyt b 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 73-81.]
- [38] Gong X L, Yue L J, Cui Z K, et al. The sequencing analysis and taxonomic effectiveness of *Anguilla* six eels based on mtDNA CO I and CO II gene sequence[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(4): 524-530. [龚小玲, 岳丽佳, 崔忠凯, 等. 鳗鲡属 6 种鱼类线粒体 CO I 和 CO II 基因序列分析和分类的有效性[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4): 524-530.]

Species identification and phylogenetic relationships in *Seriola* based on DNA barcoding

WANG Kaijie^{1,2}, XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou¹, CUI Aijun¹, JIANG Yan¹, WANG Bin¹, FANG Lu¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) for Deep Blue Fishery Engineering, Qingdao 266071, China;

2. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: *Seriola* has three species that are highly similar morphologically and are difficult to distinguish. Therefore, it is necessary to distinguish them by molecular biology methods. In this study, we explored the applicability of cytochrome oxidase subunit I (CO I), cytochrome oxidase subunit II (CO II), and 16S rRNA in identification and evolutionary analysis of the three species of *Seriola*, namely, *S. lalandi* (Chinese, Australian and Japanese populations), *S. dumerili*, and *S. quinqueradiata*. Three pairs of primers were designed for PCR amplification and sequencing of CO I, CO II, and 16S rRNA sequences of the three *Seriola* species. Dnasp5.10 and Mega7.0 software were used for DNA sequencing, genetic difference analysis, and phylogenetic tree analysis. The results showed that the CO I, CO II, and 16S rRNA sequences had a significant A+T bias. The mitochondrial 16S rRNA sequence was the most conservative, with a variation rate of 5.06%. The average number of nucleotide differences (k) and nucleotide diversity (P_i) according to the CO I sequence were higher than those of CO II and 16S rRNA. CO II had the highest haplotype diversity index among the three genes, indicating its high genetic diversity. The CO I sequence had higher differentiation and more abundant genetic resources than the 16S rRNA and CO II sequences. Thus, CO I and CO II sequences could be used to identify the three *Seriola* species in China and effectively identify the populations of *S. lalandi* from the three different waters (Northeast, Northwest and South Pacific waters). In the *Seriola* species, the interspecific genetic distances of CO I and CO II were more than 10 times the intraspecific genetic distances. The phylogenetic tree analysis showed that each species had independent branches. *S. lalandi* and *S. quinqueradiata* had a closer relationship than the others in the tree. The phylogenetic tree constructed using the three gene sequences could reflect the evolutionary relationship among the species. These results indicated that CO I and CO II gene sequences could be used as effective DNA barcodes for species identification and population division of *Seriola* species and provide efficient molecular tools for classification identification, resource screening, and diversity protection.

Key words: *Seriola* species; DNA barcoding; genetic distance; phylogenetic tree

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

DOI: 10.12264/JFSC2021-0251

瓦氏雅罗鱼盐碱适应相关 InDels 位点的挖掘与分析

王双毅^{1,2}, 梁利群², 常玉梅², 孙博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黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业农村部淡水水产生物技术
与遗传育种重点实验室, 黑龙江省特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070

摘要: 为了探究瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)极端盐碱环境下的适应机制, 采用比较基因组学的研究方法, 分别对来自内蒙古高盐碱湖泊达里湖(53.57 mmol/L, pH 9.6)和来自松花江流域的瓦氏雅罗鱼各 5 尾样本进行了基因组重测序, 重点对两个种群全基因组水平的插入/缺失(insertion-deletion, InDels)位点进行了比较分析。测序共得到 486.57 G 高质量数据, 3243686532 个 clean reads, 平均测序深度为 51.34 X。序列比对后进行 InDels 调用共获得非冗余 InDels 位点 983528 个。种群比较分析获得差异 InDels 位点 8176 个, 整合差异 InDels 和两个种群基因组强选择信号区域, 共获得与盐碱适应相关的 InDels 位点 325 个, 关联候选基因 176 个。富集分析显示, 176 个候选基因主要在离子转运、酸碱平衡和炎症免疫反应等生物学过程发挥重要作用。利用 EasyCodeML、MEME 和 FEL 3 种模型, 对离子转运和酸碱平衡等盐碱适应关键调控过程的候选基因 *abcc1*、*atp2b1*、*slc4a4*、*slc7a2* 和 *aqp4* 进行了进化分析和选择压力检测, 结果显示净化选择均对候选基因起主导作用, 但 *abcc1*、*atp2b1*、*slc4a4* 和 *slc7a2* 的受选择位点表现出不同程度的正向选择, 并且部分位点处于关键功能结构域中。蛋白三维结构分析显示, SLC4A4 和 SLC7A2 两个蛋白的少数位点与配体结合位点重合或非常接近, 推测盐碱胁迫环境介导的正向选择压力驱动了对这些位点的选择。本研究可为瓦氏雅罗鱼盐碱适应候选基因的深入挖掘及育种新型分子标记的开发提供参考和依据。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 全基因组重测序; 插入/缺失; 盐碱适应性; 选择压力; 适应性进化

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0184-16

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、雅罗鱼属, 是我国北方知名的土著鱼类, 主要分布于黑龙江流域、辽河、黄河、内陆淡水及盐碱湖泊。瓦氏雅罗鱼具有极强的盐碱耐受能力, 能够耐受内蒙古达里湖碱度 53.57 mmol/L, pH 9.6 的极端不良环境, 并形成优势种^[1]。据地质学和地理学考证, 达里湖在更新世早期(11500~7600 CAL.BP)是一个淡水湖泊, 和古辽河水系相连; 到更新世中晚期(3450 CAL. BP 至今), 由于气候干燥, 降水减少, 地质下陷等原

因, 演变为封闭的内陆盐碱湖泊^[2]。而栖息于此的瓦氏雅罗鱼(碱水种), 被逐渐升高的碱度胁迫和选择, 在不足 1 万年的时间里实现了对达里湖高碱度高 pH 环境的快速适应^[3]。室内碳酸盐碱度急性毒理研究发现, 瓦氏雅罗鱼碱水种的耐碱能力是淡水种的 1.5 倍^[4]。群体遗传学研究表明, 瓦氏雅罗鱼碱水种和淡水种出现了明显的群体遗传结构分化, 推测地理隔离和局域适应(local adaptation)可能是造成二者分化的主要原因^[1,5-6]。因此, 瓦氏雅罗鱼独特的地质和演化历史为揭示硬骨鱼类在古环境中适应极端环境的分子机制研究提供

收稿日期: 2021-05-22; 修订日期: 2021-07-07.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900405); 国家自然科学基金项目(31602136); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019ZD0601, 2020TD22).

作者简介: 王双毅(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类生物信息学. E-mail: 18266810085@163.com

通信作者: 常玉梅, 研究员, 研究方向为鱼类分子生物学. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

了理想的研究模型。

全基因组高通量测序技术的发展,使从基因组尺度解析瓦氏雅罗鱼盐碱适应的遗传基础成为可能。Xu 等^[6]通过对瓦氏雅罗鱼达里湖和黑龙江种群基因组 SNP 多态性进行扫描和比较分析,发现了一系列与硬骨鱼适应极端碱性环境相关的候选基因,功能分析发现这些基因参与了酸碱调节、离子转运、含氮废物排泄等多种调控通路。笔者近期通过消除地理隔离和空间背景差异,聚焦碱水和淡水两种异质环境,基于全基因组差异的 SNP 位点筛选鉴定了 21 个受盐碱正向选择的候选基因^[5]。这些研究表明达里湖种群已进化出独特的基因组适应性机制以应对极端盐碱环境。

相比于 SNP,插入缺失(insertion-deletion, InDel)作为第二种最常见的基因组变异类型,在稳定性和多态性上的表现更加突出^[7]。目前在动植物中这种分子标记已经开始应用于种群遗传结构分析以及通过全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)开展的分子辅助育种^[8-10],但在鱼类基因组中相关研究报道相对较少。

本研究选取瓦氏雅罗鱼达里湖和松花江种群为研究对象,利用全基因组重测序技术,筛选碱水种和淡水种基因组差异 InDel 突变位点,结合基因组选择清除分析和基因选择压力分析筛选受盐碱正向选择的 InDel 位点及其关联基因,并对候选 InDel 关联基因进行选择压力及蛋白质结构预测分析。旨在通过全基因组重测序挖掘 InDel 变异位点,为瓦氏雅罗鱼适应极端盐碱环境提供全面的、潜在的遗传基础证据,也为鱼类育种新型分子标记的开发提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源及 DNA 提取

瓦氏雅罗鱼分别采自内蒙古达里湖和松花江流域绥滨段,两个采样点的水质参数参照 Chang 等^[1]和常玉梅等^[11]的报道。每个群体各采集 5 尾样本,达里湖种群(碱水种, DL)平均体重和体长分别为(139.18±10.96) g 和(20.90±0.68) cm; 松花江种群(淡水种, SH)平均体重和体长分别为(125.85±3.67) g 和(20.10±0.24) cm。鱼体经 MS-222 (Sigma-

Aldrich, 美国)麻醉后用肝素钠浸润过的 1.5 mL 注射器从尾静脉采集血液,放入液氮保存备用。血液基因组 DNA 使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, 德国)试剂盒进行提取,1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,并使用 Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, 美国)检测 DNA 浓度和纯度。检测合格的 DNA 置于-20 °C 保存备用。

1.2 DNA 文库构建及高通量测序

检验合格的 DNA 样品(>1 µg)通过 CovarisS2 随机打断成长度为 350 bp 的片段。采用 TruSeq Library Construction Kit (Illumina, 美国)进行建库,严格使用说明书推荐的试剂和耗材。DNA 片段经末端修复、加 ployA 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备过程。构建好的文库经质检后在 Illumina Hiseq4000 平台上进行 PE150 双末端测序。文库构建及高通量测序由北京诺禾致源科技股份有限公司合作完成。

1.3 测序数据质量评估

原始测序数据经过 FastX-Toolkit 软件(v0.0.14) (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)进行过滤,过滤流程如下: (1) 过滤掉总体质量偏低(碱基质量分数 $Q < 20$)的 reads 序列; (2) 过滤去除 $Q > 20$ 但有效碱基数含量小于 50%的 reads 序列; (3) 过滤掉 3'端 $Q < 10$ 的碱基序列,确保测序碱基错误率小于 0.1; (4) 过滤掉所有 reads 序列中的接头序列; (5) 过滤掉测序深度不足而无法识别的碱基占比大于 10%的 reads 序列; (6) 过滤掉长度 < 20 bp 的 reads 序列。

1.4 InDel calling 和统计分析

使用 Burrows-Wheeler Alignment 软件(BWA, v0.7.17)^[12]以默认参数将过滤后的数据与瓦氏雅罗鱼参考基因组(NCBI: GCA_900092035.1)^[6]进行比对,使用 NGS QC 工具包^[13]对过滤 reads 进行进一步的质量控制; 采用 Samtools 软件(v1.9)^[14]中的 rmdump 去除重复序列,使用基因组 GATK 工具包(v3.5)^[15]对 InDel 周围的 reads 进行比对,其中 RealignerTargetCreator 查找需要进行精细比对的位置信息; InDelRealigner 对初始比对文件进行精细比对; 最后使用 BaseRecalibrator 进行碱基质量分数的重新校准。

1.5 差异 InDel 位点挖掘

使用 Samtools 软件^[14] mpileup 鉴定 InDel 变异位点, 过滤标准如下: (1) $Q \geq 20$; (2) 每个个体测序覆盖深度(QualByDepth) >3 ; (3) 序列比对质量分数均方根(RMSMappingQuality) >20 。

使用 SnpEff 软件(v4.1)^[16]根据瓦氏雅罗鱼参考基因组和注释文件创建本地数据库, 对获得的高质量 InDel 突变位点进行位置和效应信息注释。完成注释后, 首先收集达里湖和松花江种群基因组上所有位置坐标相同的 InDel 区域位点, 其次与松花江种群个体间共享位点(同一种群个体间 InDel 位点变化一致)比较, 筛选出达里湖种群差异共享位点及其对应基因。此外, 笔者前期基于遗传分化指数(fixation index, F_{st})和种群核苷酸多样性比值 π ratio (SH/DL)进行了达里湖种群和松花江种群基因组上的选择信号检测, 将 F_{st} 和 π ratio (SH/DL)占前 5%的部分($F_{st} \geq 0.375$, π ratio ≥ 4.160)作为基因组具有强选择性扫描信号的区域^[5]。在本研究中, 笔者以强选择扫描信号区域的 F_{st} 和 π ratio (SH/DL)值为参考, 过滤得到位于该区域的达里湖种群 InDel 差异共享位点及其候选基因。

1.6 基因功能富集分析

将候选基因递交至 KOBAS 3.0^[17] (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)进行 GO 和 KEGG 富集分析^[18-19]。在 Fisher 精确检验的基础上, 采用 Benjamini-Hochberg 多重测试对 P 值进行调整, 设定 0.05 为显著性阈值。

1.7 进化选择压力分析

根据富集分析结果, 选择参与离子转运和酸碱平衡关键调控过程的候选基因 mRNA 序列进行选择压力分析。首先从雅罗鱼基因组数据库 (<http://www.fishbrowser.org/database/amur-ide/>)中调取达里湖种群候选基因 mRNA 序列, 然后检索 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)收集底鳉(*Fundulus heteroclitus*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)等 12 种硬骨鱼对应基因 mRNA 序列(表 1)。将每

个物种所得序列与达里湖种群序列进行 Blast 比对以确保序列相似性。通过 MEGA X 软件 ClustalW 程序^[20]以默认比对参数进行多序列比对, 比对结果利用 TBtools 软件^[21]进行修剪后通过最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树确定各物种间的系统发育关系, 自验值设定为 1000 以验证进化树的可信程度。使用 EasyCodeml 软件(v4.8)^[22]中的 CodeML 算法估算候选基因的非同义/同义替换率比率 dN/dS (ω), 系统发育树(.tree)和转换为 .phy 的多序列比对文件作为输入数据。基于该软件中的位点模型检验候选基因的正向选择假设, 该模型允许选择压力随位点的不同而变化, 即假设系统发育树的不同分支所受选择压力相同, 但不同氨基酸位点经历的选择压力不同。本研究考虑了 4 对替换模型, M0 (one ratio) vs M3 (discrete), M1a (Nearly Neutral) vs M2a (Positive Selection), M7 (β) vs M8 (β and $\omega > 1$)以及 M8 (β and $\omega > 1$) vs M8a (β and $\omega = 1$), 与模型 M1a、M0、M7 相对应的 M2a、M3、M8s 假定条件均允许 $\omega > 1$ 。使用似然比检验(LRT)比较了模型的拟合度, 以模型中的 Bayes Empirical Bayes (BEB)标准来确定正向选择压力位点, 若后验概率 ≥ 0.95 , 表明该位点受到显著的正向选择压力。此外, 为避免假阳性正向选择位点的出现, 本研究还考虑了同义率变化和重组的其他测试, 包括混合效应模型(MEME)和固定效应模型(FEL)。两种测试方法通过 Datamonkey 在线服务器(<http://www.datamonkey.org>)完成, 满足以下条件的位点鉴定为正向选择位点: (1) $\beta > \alpha$; (2) 似然比检验 $P < 0.1$ 。通过 EasyCodeML、MEME 和 FEL 其中两种或两种以上测试的位点被认为是强正向选择压力位点。

1.8 正向选择位点功能预测

为了确定受正向选择氨基酸位点的功能, 将瓦氏雅罗鱼候选基因氨基酸序列使用 HMMER^[23]与斑马鱼序列进行同源搜索; 使用 MEGAX 软件的 MUSCLE 程序进行比对以确定瓦氏雅罗鱼正向选择位点在斑马鱼上的等效位置; 使用 Pfam 在线分析系统^[24]确定斑马鱼同源序列上的等效位

表 1 不同物种 mRNA 序列登录号
Tab. 1 mRNA accession number of different species

物种 species	基因 gene				
	<i>abcc1</i>	<i>atp2b1</i>	<i>slc4a4</i>	<i>slc7a2</i>	<i>aqp4</i>
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	XM_001341859.7	XM_021474965.1	XM_009301742.3	NM_001008584.1	NM_001358313.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	XM_019063140.1	LHQP_01004580.1	LHQP_01006640.1	LHQP_01044284.1	XM_019126192.1
太平洋鲑 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	XM_031814424.1	N.A.	XM_031816383.1	XM_020502083.2	XM_031833596.1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XM_020705549.1	XM_020714117.2	XM_023958122.1	XM_011480522.3	XM_011486891.3
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XM_005461613.4	XM_019346817.2	XM_005451543.4	XM_005460484.4	XM_005476355.4
金线鲃 <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	XM_016441595.1	XM_016272439.1	XM_016481766.1	XM_016446453.1	XM_016532039.1
鲫 <i>Carassius auratus</i>	MH_420555.1	XM_026236876.1	XM_026211369.1	XM_026281018.1	XM_026195121.1
斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>	XM_017490307.1	XM_017494455.1	XM_017452158.1	XM_017474119.1	XM_017455409.1
金鲈 <i>Perca flavescens</i>	XM_028598933.1	N.A.	XM_028577137.1	XM_028589476.1	XM_028592985.1
底鳉 <i>Fundulus heteroclitus</i>	XM_012860936.3	XM_021309511.2	N.A.	XM_021318690.2	XM_012875407.3
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XM_010755057.3	XM_027291879.1	XM_010736564.3	XM_010732897.3	XM_010730011.3
遮目鱼 <i>Chanos chanos</i>	XM_030790406.1	XM_030778801.1	XM_030772709.1	XM_030765002.1	XM_030770711.1

点是否处于功能结构域或功能结构域位点周围。此外,使用蛋白空间结构分析服务器 I-TASSER^[25]通过折叠辨识模拟的方法预测候选基因的蛋白质三维结构,进一步了解基因编码蛋白的功能意义,模型评估通过 C-score 和 TM-score 完成。对于 C-score,可信度区间为[-5,2];对于 TM-score,大于 0.5 表明拓扑结构具有较高的准确性,而小于 0.17 表明拓扑结构准确性较差^[25-26]。最终的蛋白质三维结构模型通过 PyMOL 软件(<https://www.schrodinger.com/pymol/>)进行展示。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计

样品经过测序和质控共产生了 3243686532 个高质量 clean reads, 包含 486.57 G 的测序数据。其中 DL 组有 1659962056 reads 和 249 G 碱基数, SH 组有 1583724476 reads 和 237.57 G 碱基数(表 2)。与初始 reads 相比,保留下来的高质量 clean

reads 占 96.7%, 其中, phred score>20 的 reads 占 97.3%, phred score>30 的 reads 数占 92.6%。GC 含量较稳定,在 39.30~39.88 之间浮动。reads 比对至参考基因组后,统计结果显示,DL 组总的 Mapping reads 数为 1364105229,平均比对率为 82.17%,平均测序深度约为 54.4 X; SH 组总的 Mapping reads 数为 1287038455,平均比对率为 81.27%,平均测序深度约为 51.34 X (表 2)。

2.2 InDel 检测与分布统计

DL 和 SH 两组所有个体共有 983528 个 InDels 被保留下来,在各个染色体上,分布的 InDels 数量为 21244~67765 (图 1)。总体上各个染色体上分布的 InDels 数量有所差异或偏倚,平均每条染色体上每 Mb 分布 2.16~6.89 个(图 2)。在保留的 983528 个 InDels 中,DL 组有 420095 个,SH 组有 563433 个。InDels 长度为 1~29 bp,插入多于缺失,主要以 1~8 bp 的小片段为主。单碱基 InDels 最多,其中 DL 组插入数和缺失数分别为 294851 个和

表 2 瓦氏雅罗鱼达里湖和松花江种群个体测序数据及比对结果统计

Tab. 2 Summary of sequencing and mapping statistics of *Leuciscus waleckii* individuals from Lake Dali Nor (DL) and Songhua River (SH) populations

样品 sample	过滤碱基数/G clean bases	过滤读长 clean reads	比对读长 mapped reads	唯一比对读长率/% uniquely mapped reads	测序深度/X sequencing depth
DL1	48.49	323299350	265765182	82.20	53.00
DL2	48.22	321441642	263095847	81.85	52.50
DL3	47.74	318252248	261486938	82.16	52.10
DL4	55.94	372930972	307344683	82.41	61.30
DL5	48.61	324037844	266412579	82.22	53.10
合计 total	249	1659962056	1364105229	N.A.	N.A.
平均 average	49.8	331992411	272821046	82.17	54.40
SH1	48.35	322305900	260945026	80.96	52.00
SH2	47.90	319304476	259156951	81.16	51.70
SH3	46.85	312324164	254561923	81.51	50.80
SH4	46.06	307058642	251545155	81.92	50.20
SH5	48.41	322731294	260829400	80.82	52.00
合计 total	237.57	1583724476	1287038455	N.A.	N.A.
平均 average	47.51	316744895	257407691	81.27	51.34

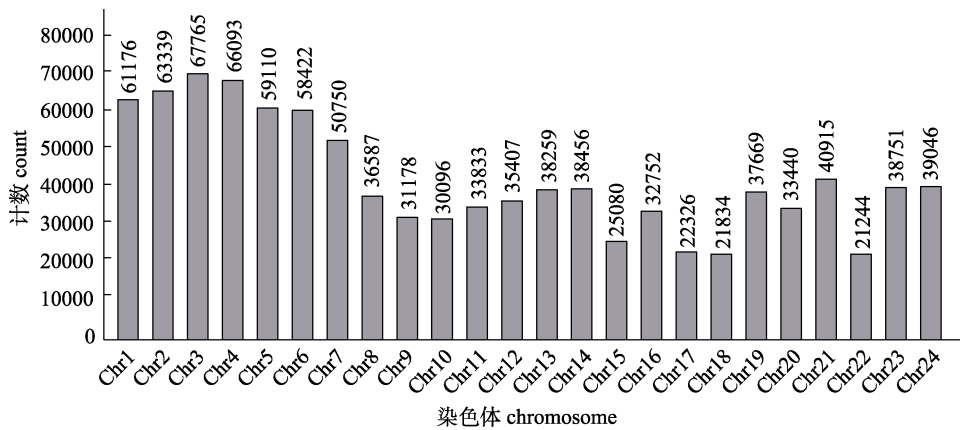


图 1 瓦氏雅罗鱼每条染色体上的插入/缺失位点(InDels)数量分布

Fig. 1 The number of insertion-deletion sites (InDels) on each chromosome of *Leuciscus waleckii*

30515 个, SH 组分别为 353277 个和 26539 个。其次为双碱基 InDels, 其中 DL 组插入数和缺失数分别为 18584 个和 13097 个, SH 组分别为 30870 个和 21302 个。随着 InDels 碱基数的增加, InDels 数量整体呈下降趋势(图 3)。

2.3 InDels 注释

DL 组总 InDels 数量为 420095 个。大多数 InDels 位于基因间区域(328682 个, 78.24%), 少部分位于基因区域(76289 个, 18.16%)、基因上游(8906 个, 2.12%)和下游(6218 个, 1.48%), 其中基因区域包括内含子(66173, 86.74%)、外显子(6340,

8.31%) 和非翻译区(3'-UTR, 2609 个, 3.42%; 5'-UTR, 1169 个, 1.53%)。编码区内移码插入总数(frameshift insertion)为 1818 个(28.68%), 编码区内移码缺失总数(frameshift deletion)为 2191 个(34.56%), 编码区内 InDels 突变获得终止子总数(stop-gain)为 186 个(2.94%), 编码区内 InDels 突变丢失终止子总数(stop-lost)为 280 个(4.41%); 非编码区内移码插入总数(non-frameshift insertion)和非编码区内移码缺失总数(non-frameshift deletion)分别为 793 个(12.50%)和 1072 个(16.91%) (图 4a)。

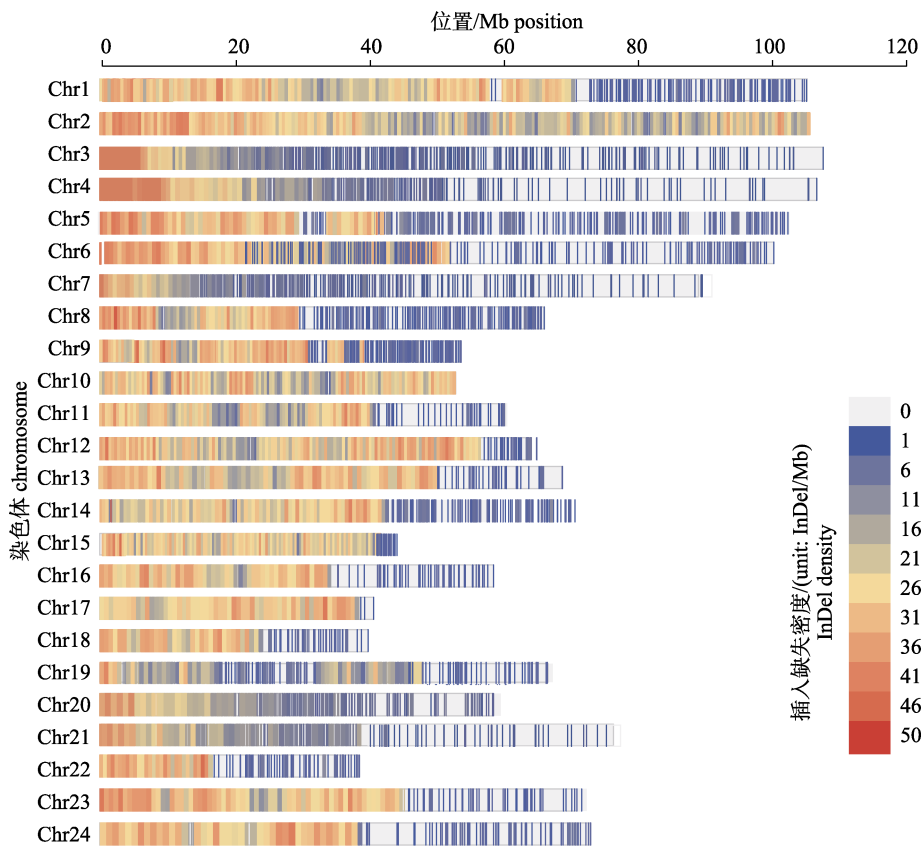


图 2 插入/缺失位点(InDels)在瓦氏雅罗鱼各染色体的分布情况

Fig. 2 Insertion-deletion sites (InDels) distribution on the chromosomes of *Leuciscus waleckii*

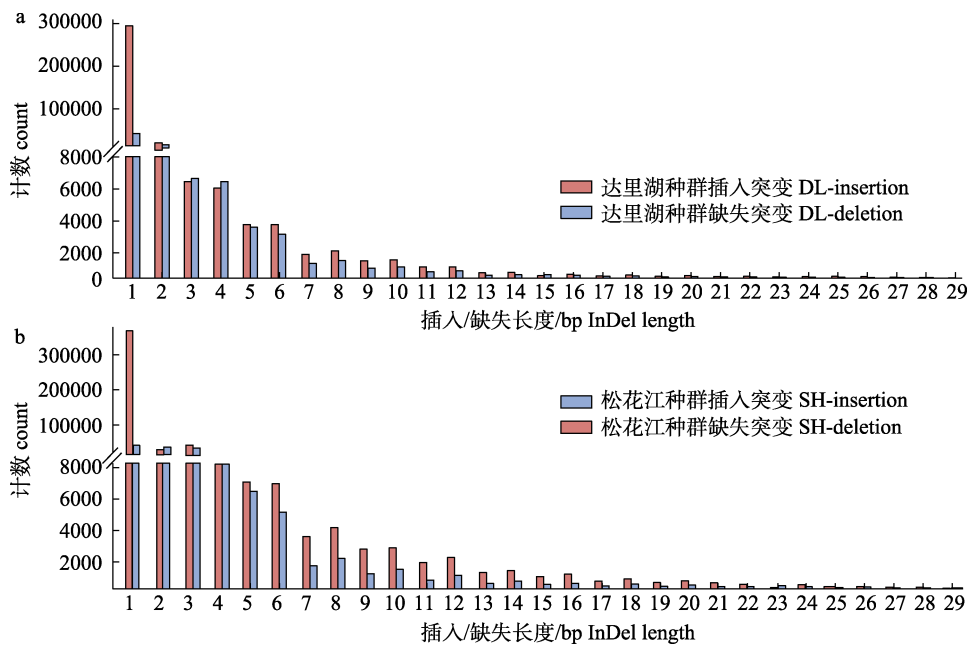


图 3 不同长度插入/缺失位点(InDels)在瓦氏雅罗鱼基因组的分布

a. 瓦氏雅罗鱼达里湖种群不同长度 InDels 基因组分布; b. 瓦氏雅罗鱼松花江种群不同长度 InDels 基因组分布.

Fig. 3 The distribution of different size insertion-deletion sites (InDels) in *Leuciscus waleckii* genome

a. The distribution of InDels length in *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor (DL) population;

b. The distribution of InDels length in *Leuciscus waleckii* from Songhua River (SH) population.

SH 组总 InDel 数量为 563433 个。与 DL 组分布相似, 大多数 InDels 位于基因间区域(430068 个, 76.33%), 少部分位于基因区域(120743 个, 21.43%)、基因上游(7043 个, 1.25%)和下游(5579 个, 0.99%), 其中基因区域包括内含子(93709 个, 77.61%)、外显子(20164 个, 16.70%)和非翻译区(3'-UTR, 3513 个, 2.91%; 5'-UTR, 3357 个, 2.78%)。

编码区内移码插入总数为 5767 个(28.60%), 编码区内移码缺失总数为 6769 个(33.57%), 编码区内 InDels 突变获得终止子总数为 645 个(3.20%), 编码区内 InDel 突变丢失终止子总数为 250 个(1.24%); 非编码区内移码插入总数和非编码区内移码缺失总数分别为 3438 个(17.05%)和 3295 个(16.34%)(图 4b)。

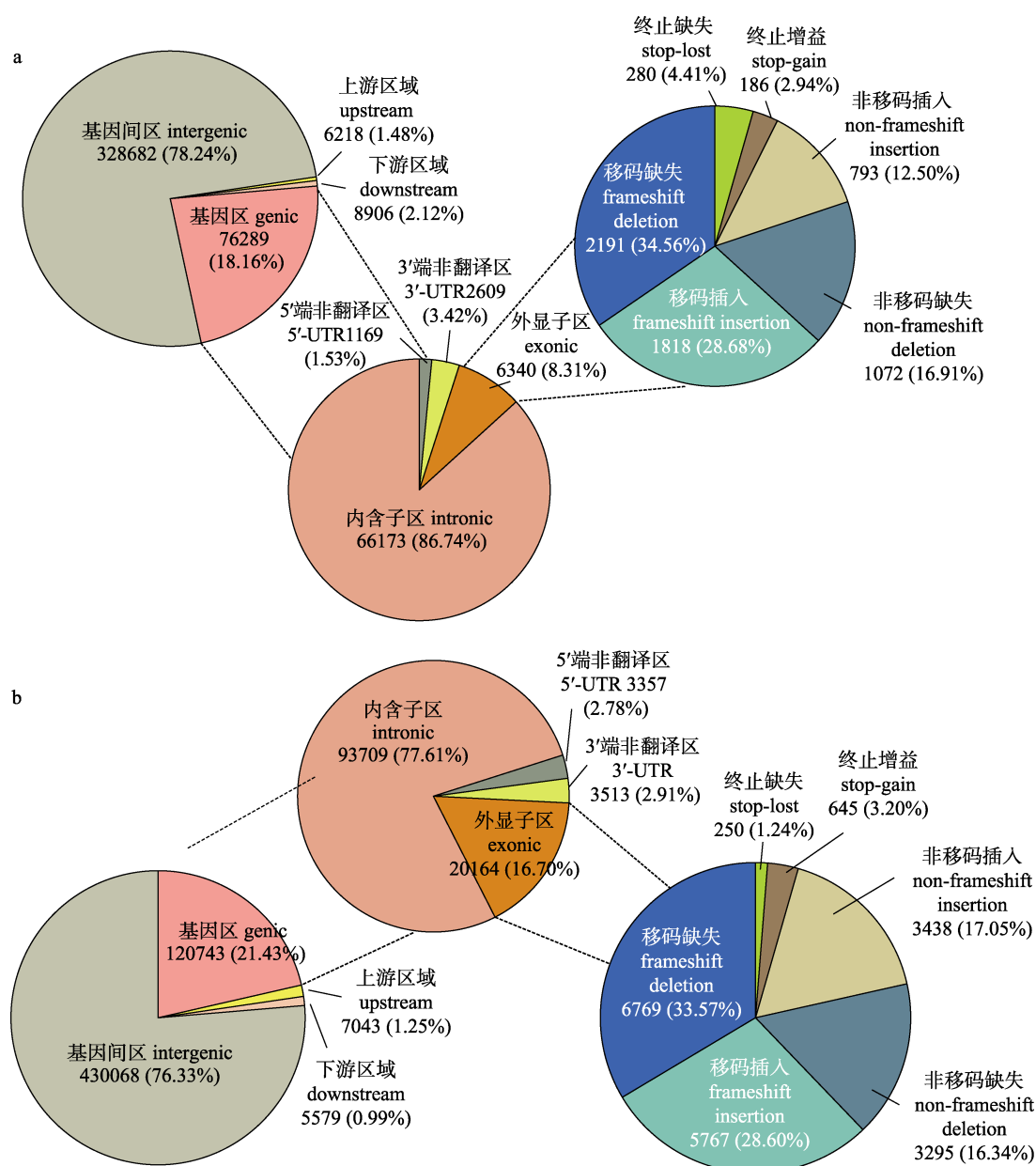


图 4 瓦氏雅罗鱼不同种群插入/缺失位点(InDels)区域功能分类

a. 瓦氏雅罗鱼达里湖种群 InDels 区域功能分类; b. 瓦氏雅罗鱼松花江种群 InDels 区域功能分类。

Fig. 4 Functional classification of the detected InDels for different *Leuciscus waleckii* population groups

a. Functional classification of the detected InDels for *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor (DL);

b. Functional classification of the detected InDels for *Leuciscus waleckii* from Songhua River (SH).

2.4 差异 InDels 位点筛选

DL 组与 SH 组共筛选得到 8176 个差异共享 InDels 位点, 其中基因间区域为 5755 个(70.39%), 基因上游和下游分别为 60 个(0.74%)和 55 个(0.68%), 基因区域中非翻译区 3'-UTR 为 23 个(0.29%), 5'-UTR 为 22 个(0.27%), 内含子为 2074 个(25.37%), 外显子为 187 个(2.26%)。通过计算 F_{st} 和 π ratio (SH/DL) 在两个种群中共筛选到 3259 个强选择信号区域^[5], 将 DL 差异共享位点与强选择信号区域取交集, 共得到 325 个差异共享位点关联到 176 个基因, 将这些基因确定为最终的功能候选基因。

2.5 基因功能富集分析

176 个候选基因共富集到 1613 个 GO 条目和 181 个 KEGG 通路中, 其中显著富集的 GO 条目有 193 个, KEGG 通路有 27 个($P < 0.05$)。GO 分析显示生物过程(biological process, BP)相关的候选基因富集程度较高的为免疫系统, 包括凋亡正调控(GO: 0043065)、免疫应答(GO: 0045087)、白血

细胞介素-2 合成正调控(GO: 0032743)等过程; 其次为离子跨膜转运(GO: 0034220)和碱性氨基酸转运体活性(GO: 0015174)相关过程的候选基因也存在显著富集。细胞组分(cellular component, CC)中与能量代谢有关的候选基因存在显著富集, 包括线粒体(GO: 0005739)、线粒体内膜(GO: 000743)、呼吸链复合物 IV (GO: 0045277)等过程。分子功能(molecular function, MF)中转运调节基因富集程度较高, 包括 Na^+ 跨膜转运活性(GO: 0015081)和 ABC 型转运蛋白活性(GO: 0140359)等(图 5)。KEGG 分析显示参与细胞凋亡与免疫应答相关的功能区域显著富集, 包括 NOD 样受体通路(04621)、Toll 样受体通路(04620)、自噬(04215)、TNF 信号通路(04668)和 p53 信号通路(04115)等; 此外, 可能与逆境生境适应相关的功能区域也有显著富集, 包括 Ca^{2+} 信号通路(04020)、心肌收缩通路(04260)、肾素-血管紧张素系统(04614)以及应激激素区域, 如催乳素通路(04917)等(图 6)。

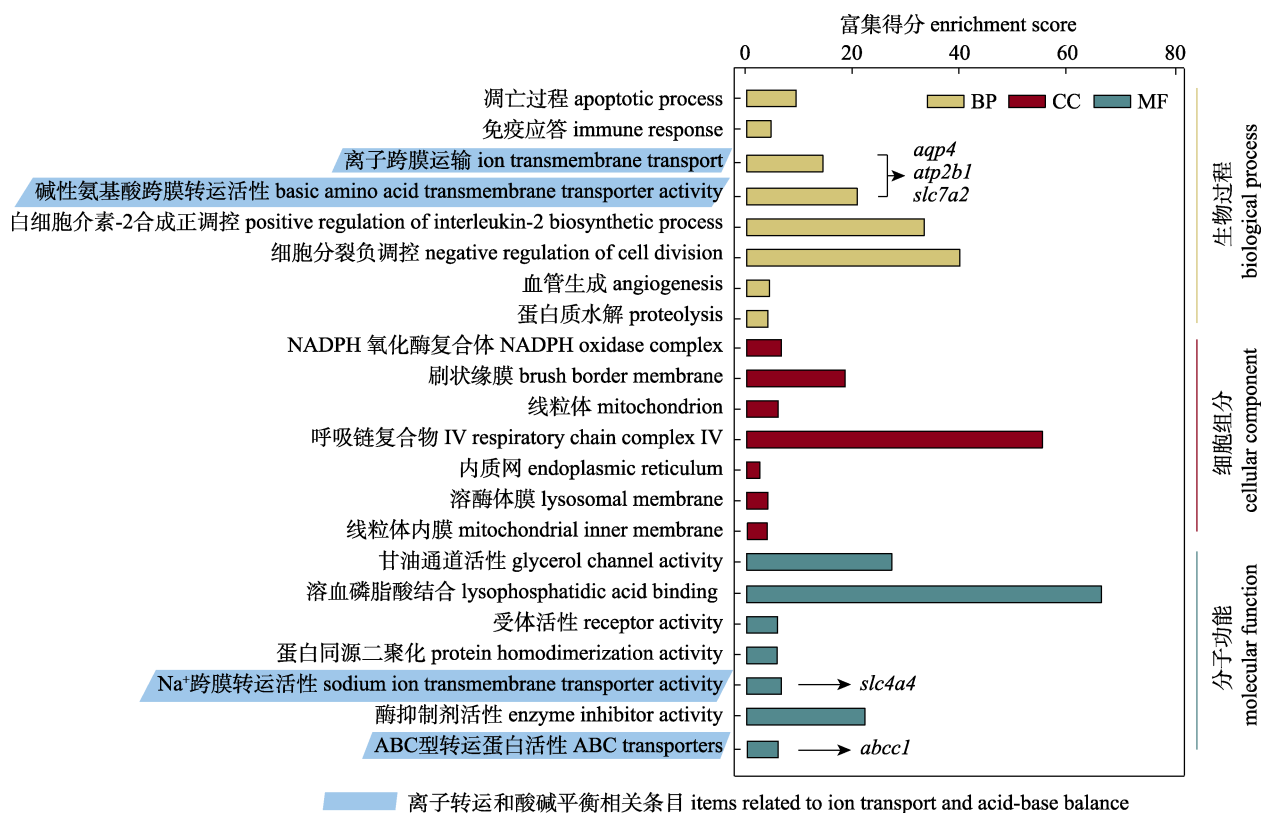


图5 达里湖瓦氏雅罗鱼种群盐碱适应候选基因 GO 分析

Fig. 5 GO annotation of candidate genes for alkali-saline adaptation in *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor population

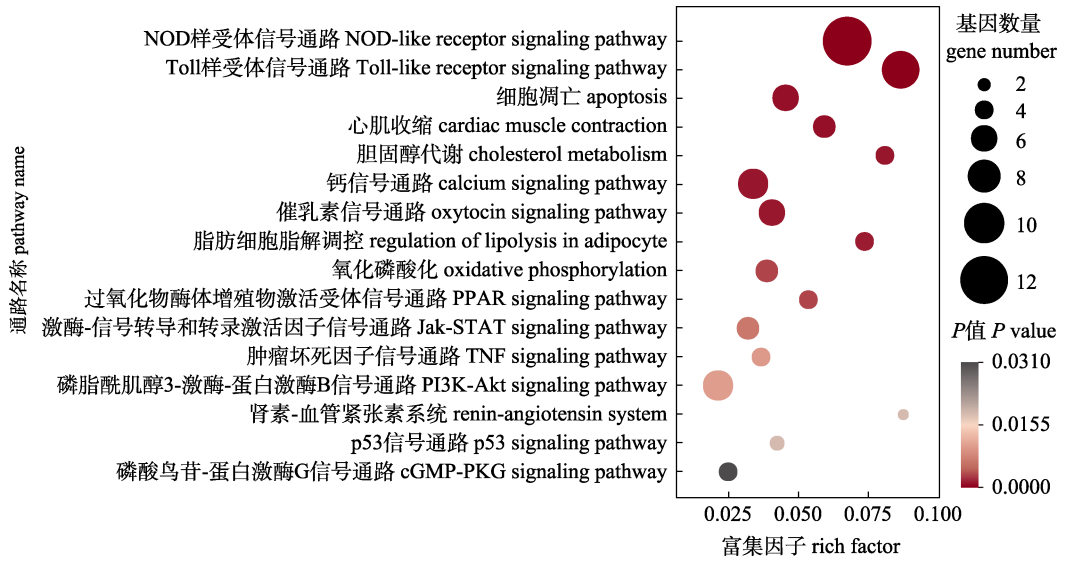


图 6 达里湖瓦氏雅罗鱼种群盐碱适应候选基因 KEGG 分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis of candidate genes for alkali-saline adaptation in *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor populations

2.6 关键调控基因选择压力分析

基于种群强选择信号区域、InDels 差异共享位点、富集的 GO 条目类型(图 5)以及基因生物学功能, *abcc1*、*atp2b1*、*slc4a4*、*slc7a2*、*aqp4* 被确定为与 DL 组离子转运和酸碱平衡等过程相关的关键调控基因, 这 5 个基因都处于强选择信号区域中, 并且都至少包含有一个差异共享 InDel 突变位点(表 3)。将这些关键调控基因首先利用 EasyCodeML 软件进行选择压力分析。对于 *aqp4*, 在 M0 模型下, $\omega=0.39436$, ω 值远小于 1, 没有直接的证据表明存在正向选择(表 4), 比较 M1a 和 M2a, 似然比检验 $2\Delta\ln L=0$, P 值为 1, 说明 M2a

并不优于 M1a, 分别比较 M7 vs M8 和 M8a vs M8, 似然比检验分别为 $2\Delta\ln L=9.44$ ($P<0.01$)和 $2\Delta\ln L=0.015$ ($P>0.5$), 说明 M8a 模型并不优于 M8, 综合表明 *aqp4* 基因主要受到较强的净化选择约束, 具有很高的保守性。对于基因 *atp2b1*, 在模型 M0 中, 进化速率 $\omega_0=1.10315$, 说明 *atp2b1* 在进化过程中受到了一定的正向选择, 对 4 个位点模型进行似然比检验发现, M3、M2a 和 M8 模型明显优于其相应的假设模型 M0、M1a、M7 与 M8a ($P<0.01$)(表 4), 表明各点之间的选择压力存在差异。其余基因 *slc4a4*、*slc7a2*、*abcc1* 的 M0 模型表明它们在进化过程中都受到了不同程度的净化选

表 3 达里湖瓦氏雅罗鱼种群盐碱适应关键调控基因插入/缺失位点信息

Tab. 3 The detailed information of the key regulatory genes and the related InDel loci for alkali-saline adaptation in *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor (DL) populations

基因名 gene name	位置 position (scaffold_bp)	达里湖种群插入/缺失位点 InDel genotypes in DL	松花江种群插入/缺失位点 InDel genotypes in SH	F_{st}	π ratio (SH/DL)
<i>abcc1</i>	S2372_280895	ins (G->GA)	del (GTTTT->GTTTT)	0.496	6.187
<i>atp2b1</i>	S2457_79727	ins (TG->TGG)	del (TG->T)	0.550	8.135
	S2457_81204	ins (ATA->ATATACTTACTTA)	ins (ATA->ATAT)		
<i>slc4a4</i>	S156_79063	del (GAAT->G)	del (GAA->GA)	0.452	6.632
<i>slc7a2</i>	S2183_243547	ins (A->AT)	ins (AT->ATT)	0.617	11.743
	S2183_253398	ins (CG->CGG)	ins (CGG->CGGG)		
<i>aqp4</i>	S916_402279	del (AC->A)	del (ACTCT->ACT)	0.500	7.771

注: ins 表示插入, del 表示缺失。
Note: ins indicates insertion; del indicates deletion.

表 4 达里湖瓦氏雅罗鱼种群盐碱适应关键调控基因适应性进化分析

Tab. 4 Adaptive evolution analysis of key regulatory genes for alkali-saline adaptation in *Leuciscus waleckii* from Lake Dali Nor (DL) populations

基因 gene	M0	M1a	M2a	M3	M7	M8	M8a
<i>abcc1</i>	$\omega_0=0.93169$	$p_0=0.26242$	$p_0=0.23566$	$p_0=0.17768$	$p=0.11023$	$p_0=0.71712$	$p_0=0.27672$
		$p_1=0.73758$	$p_1=0.55983$	$p_1=0.49885$	$q=0.02848$	$p=0.37729$	$p=1.33245$
		$\omega_0=0.09249$	$p_2=0.20451$	$p_2=0.32346$		$q=0.22021$	$q=9.96033$
		$\omega_1=1.00000$	$\omega_0=0.09014$	$\omega_0=0.03549$		$(p_1=0.28288)$	$(p_1=0.72328)$
			$\omega_1=1.00000$	$\omega_1=0.76786$		$\omega=1.96411$	$\omega=1.00000$
			$\omega_2=2.19622$	$\omega_2=1.91167$			
<i>atp2b1</i>	$\omega_0=1.10315$	$p_0=0.22325$	$p_0=0.18519$	$p_0=0.22534$	$p=0.10641$	$p_0=0.80477$	$p_0=0.22325$
		$p_1=0.77675$	$p_1=0.66442$	$p_1=0.68357$	$q=0.02828$	$p=0.13154$	$p=0.00500$
		$\omega_0=0.00000$	$p_2=0.15039$	$p_2=0.09109$		$q=0.03480$	$q=6.06544$
		$\omega_1=1.00000$	$\omega_0=0.0000$	$\omega_0=0.00000$		$(p_1=0.19523)$	$(p_1=0.77675)$
			$\omega_1=1.00000$	$\omega_1=1.21228$		$\omega=3.17244$	$\omega=1.00000$
			$\omega_2=3.58350$	$\omega_2=4.39876$			
<i>slc4a4</i>	$\omega_0=0.49123$	$p_0=0.50319$	$p_0=0.48233$	$p_0=0.31338$	$p=0.42151$	$p_0=0.93159$	$p_0=0.66534$
		$p_1=0.49681$	$p_1=0.48557$	$p_1=0.52293$	$q=0.45488$	$p=0.45765$	$p=0.65833$
		$\omega_0=0.13607$	$p_2=0.03210$	$p_2=0.16369$		$q=0.54920$	$q=1.86869$
		$\omega_1=1.00000$	$\omega_0=0.13430$	$\omega_0=0.04725$		$(p_1=0.06841)$	$(p_1=0.33466)$
			$\omega_1=1.00000$	$\omega_1=0.56022$		$\omega=2.19614$	$\omega=1.00000$
			$\omega_2=3.09276$	$\omega_2=1.65694$			
<i>slc7a2</i>	$\omega_0=0.49050$	$p_0=0.49617$	$p_0=0.47347$	$p_0=0.35821$	$p=0.40579$	$p_0=0.93723$	$p_0=0.63033$
		$p_1=0.50383$	$p_1=0.48966$	$p_1=0.53030$	$q=0.42093$	$p=0.43899$	$p=0.67283$
		$\omega_0=0.12074$	$p_2=0.03686$	$p_2=0.11150$		$q=0.49897$	$q=2.27849$
		$\omega_1=1.00000$	$\omega_0=0.11839$	$\omega_0=0.05744$		$(p_1=0.06277)$	$(p_1=0.36967)$
			$\omega_1=1.00000$	$\omega_1=0.65093$		$\omega=2.53772$	$\omega=1.00000$
			$\omega_2=3.46105$	$\omega_2=2.06412$			
<i>aqp4</i>	$\omega_0=0.39436$	$p_0=0.56763$	$p_0=0.56763$	$p_0=0.53514$	$p=0.53076$	$p_0=0.58813$	$p_0=0.58857$
		$p_1=0.43237$	$p_1=0.03445$	$p_1=0.09459$	$q=0.63520$	$p=3.47112$	$p=4.59178$
		$\omega_0=0.12665$	$p_2=0.39791$	$p_2=0.37027$		$q=20.77246$	$q=28.01053$
		$\omega_1=1.00000$	$\omega_0=0.12665$	$\omega_0=0.10716$		$(p_1=0.41187)$	$(p_1=0.41143)$
			$\omega_1=1.00000$	$\omega_1=0.84815$		$\omega=1.00000$	$\omega=1.00000$
			$\omega_2=1.00000$	$\omega_2=0.84815$			

注: M0 表示单一比率; M1a 表示近中性; M2a 表示正选择; M3 表示离散; M7 表示 β 分布; M8 表示 β 与 $\omega>1$; M8a 表示 β 与 $\omega=1$ 。
Note: M0 (one ratio), M1a (neutral), M2a (positive selection), M3 (discrete), M7 (β), M8 (β & $\omega>1$), M8a (β & $\omega=1$).

择($\omega<1$), 但 M3、M2a 和 M8 模型明显优于其相应的假设模型 M0、M1a、M7 与 M8a ($P<0.01$), 因此尽管在进化过程中受到不同程度的净化选择, 但在这些基因 M8 模型中也存在着发生正向选择的氨基酸位点。在模型 M8 中, 分别以 EasyCodeML、MEME 和 FEL 计算检测了 *abcc1*、*atp2b1*、*slc4a4*、*slc7a2* 和 *aqp4* 5 个候选基因的正向选择位点, 分别检测到 2、16、16、8 和 0 个强正向选择位点, 其中 *abcc1* 的两个位点达到极显著水平, 其余的位点均为显著水平(表 5)。

2.7 正向选择位点功能分析和蛋白质三维结构预测

将上述正向选择位点所在氨基酸序列与斑马鱼同源序列比对后确定了瓦氏雅罗鱼在斑马鱼正向选择位点的等效位置。*abcc1* 的两个氨基酸位点虽然达到了极显著水平, 但未发现与斑马鱼相关功能结构域及其附近位点的重合区域。*atp2b1* 受选择位点主要集中在阳离子转运 ATP 酶功能域的两端(N 端和 C 端)以及 E1-E2ATP 酶功能域。*slc4a4* 受选择位点与斑马鱼功能重叠区域主要集

中在带 3 蛋白胞质段和 HCO₃共转运结构域。选择位点处于共转运和跨膜载体蛋白等关键调控结构域中, 因此本研究将这两个基因的氨基酸序列提交至 I-TASSER 进行三维蛋白结构预测。在

表 5 正向选择氨基酸位点
Tab. 5 Amino acid sites undergoing positive selection

	M0 vs M3	M1a vs M2a	M7 vs M8	M8a vs M8	EasyCodeML (M8) vs MEME vs FEL
	$2\Delta\ln L^{P\text{-value}}$				
<i>abcc1</i>	660.16**	126.71**	138.17**	126.28**	32 th 128 th
<i>atp2b1</i>	144.55**	80.21**	90.10**	78.27**	33 th 39 th 40 th 43 th 57 th 65 th 141 th 151 th 242 th 279 th 328 th 407 th 619 th 840 th 877 th 972 th
<i>slc4a4</i>	1050.6**	60.43**	79.09**	57.41**	4 th 16 th 25 th 51 th 74 th 112 th 144 th 230 th 309 th 506 th 517 th 530 th 536 th 660 th 890 th 905 th
<i>slc7a2</i>	537.53**	36.22**	46.28**	37.47**	1 th 3 th 45 th 51 th 58 th 125 th 224 th 284 th
<i>aqp4</i>	126.95**	0	9.44**	0.015	not allowed

注: M0 表示单一比率; M1a 表示近中性; M2a 表示正选择; M3 表示离散; M7 表示 β 分布; M8 表示 β & $\omega>1$; M8a 表示 β & $\omega=1$. **表示似然比检验 $P<0.01$.
Note: M0 (one ratio), M1a (neutral), M2a (positive selection), M3 (discrete), M7 (β), M8 (β & $\omega>1$), M8a (β & $\omega=1$). ** indicates likelihood ratio $P<0.01$.

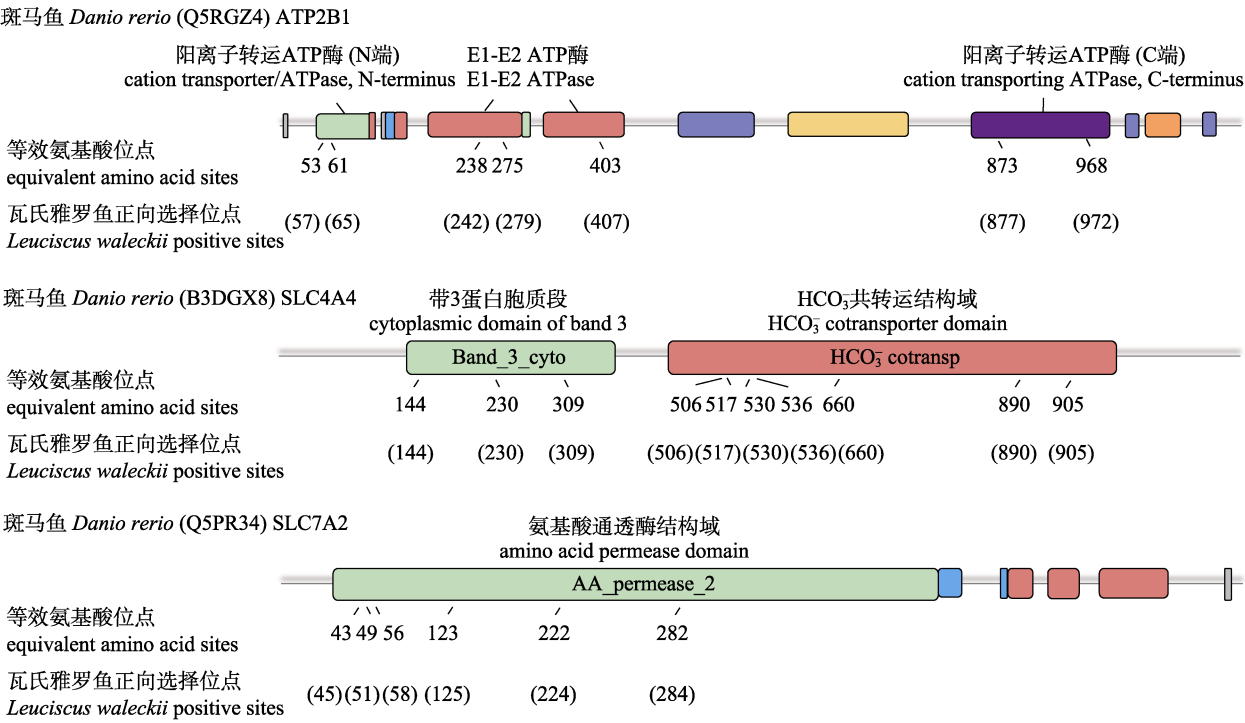


图 7 基于瓦氏雅罗鱼正向选择位点预测斑马鱼功能结构域等效位置
Fig. 7 Prediction of equivalent sites of *Danio rerio*'s functional domains based on positive selection sites of *Leuciscus waleckii*

SLC4A4 蛋白结构中, 检测到的正向选择氨基酸位点 660th (Phe)与配体结合位点重合, 144th (Phe)位点非常接近配体结合位点。在 SLC7A2 蛋白结

构中, 正向选择位点 45th (Leu)接近配体结合位点, 这些位点可能在配体结合中起关键作用, 此外, 在两个蛋白结构预测中均未发现酶激活位点(图 8)。

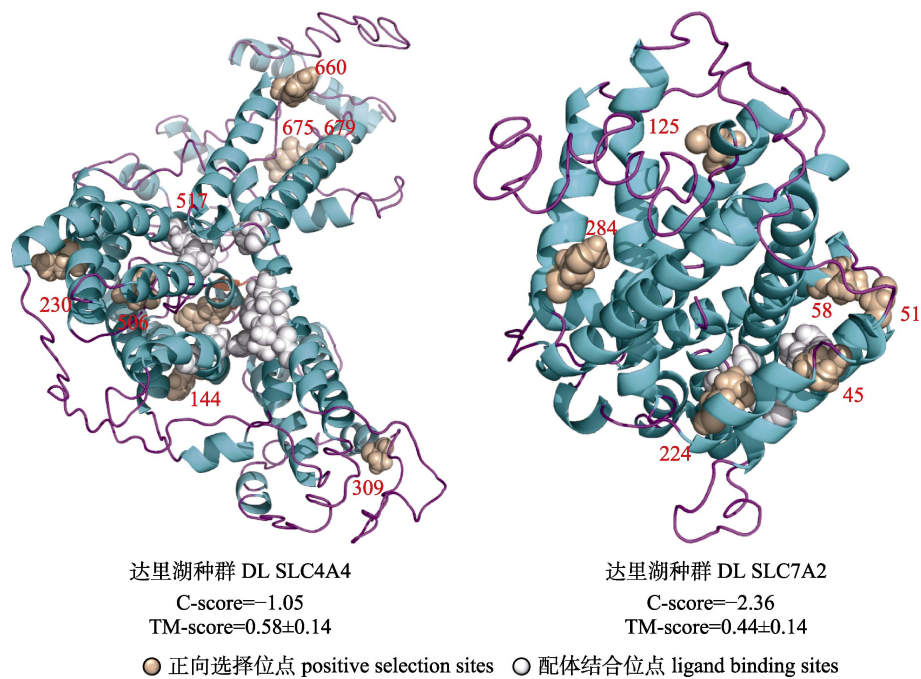


图 8 SLC4A4 和 SLC7A2 三维蛋白结构及正向选择位点所处位置
Fig. 8 Positive selection sites and three dimensional structure of SLC4A4 and SLC7A2

3 讨论

本研究借助于高通量测序技术, 筛选鉴定了瓦氏雅罗鱼两个生态种群的 InDels 位点, 得到的 InDels 数量与类型基本一致, 说明两个种群基因组上的 InDels 分布均匀, 没有因为起源背景或生活环境差异呈现偏态。总体来看, InDels 插入数大于缺失数, 数量集中在 1~8 bp, 其中 1~3 bp 最多。此外, 两个种群 InDels 注释变体大部分分布于基因间区和内含子等非编码区域, 编码区中分布的位点最少, 这与人类^[27]、荷斯坦牛^[28]、藏酋猴^[29]基因组数据上观察到的结果类似。

在 InDel 注释结果的基础上, 通过每个种群个体间共享 InDels 位点信息筛选得到瓦氏雅罗鱼达里湖种群差异共享 InDels 位点, 通过与前期基于 SNP 位点筛选得到的差异基因组区域整合^[5], 确定了在基因组上一些可能与盐碱适应相关的候选基因。生物体对非生物胁迫的应答通常涉及多

种机制^[30], 筛选得到的候选基因在功能富集分析中显著富集于几个不同的功能区域, 这与瓦氏雅罗鱼盐碱适应机制复杂、多样、系统性强的特点相符^[11]。

通路富集分析发现与离子转运相关的基因显著富集, 其编码蛋白在细胞膜的流动性和渗透性方面发挥重要作用。如受正向选择压力较强的 *slc7a2* 和 *slc4a4*。研究显示, SLC7A2 作为渗透酶参与跨质膜转运和吸收阳离子氨基酸, 这种不依赖于 Na⁺的渗透调节系统被证实可通过氨基酸的有效转运使哺乳动物能够在胁迫环境下维持细胞的正常功能^[31]。NBC1 是基因 *slc4a4* 的表达产物, 属于 Na⁺/HCO₃⁻共转运蛋白, 是重要的 HCO₃⁻转运家族成员之一, 对维持鱼类血液酸碱平衡发挥重要作用^[32-33]。相比于淡水种, 达里湖种群受到了包括总碱度、pH 值以及氨氮代谢变化产生的协同毒性^[11], 使得血液中 HCO₃⁻浓度增加, 破坏体内酸碱平衡。课题组前期研究发现, 在相同碱度胁

迫下,随着胁迫时间的延长,*NBC1* mRNA 在达里湖种群中显著高表达,而在松花江种群表达量显著降低^[34],表明达里湖瓦氏雅罗鱼通过积极主动地排碱保持体内离子和酸碱平衡。关键调控基因 *atp2b1* 编码质膜钙泵蛋白,能够将 Ca^{2+} 从细胞质转运到细胞外来维持跨质膜的钙浓度梯度,更重要的是,质膜钙泵与渗透调节过程密切相关^[35],一项尼罗罗非鱼盐度耐受实验表明,在 0~32 的盐度递增条件下尼罗罗非鱼鳃和脑组织 *atp2b1* 和 Na^+/K^+ ATPase (NKA) mRNA 均显著高表达,从而实现在高渗环境下 Na^+/Cl^- 转运和 Ca^{2+} 内流^[36]。课题组前期关于达里湖瓦氏雅罗鱼的碱度耐受实验同样发现 *NKA* 随着碱度耐受时间的延长呈现显著高表达^[34],因此 ATP2B1 参与的 Ca^{2+} 泵激活可能与 *NKA* 的表达变化存在密切关系。此外,水体 pH 的升高将导致 H^+ 浓度的降低,使得鱼体排氨 ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ = \text{NH}_4^+$) 受阻,最终导致“氨中毒”^[37],本研究鉴定得到的关键调控基因 *abcc1* 的表达产物是一种转运谷胱甘肽结合物的膜转运蛋白^[38],在欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 和尼罗罗非鱼中,ABCC1 定位在细胞底端,将内容物运输至血液,对排出细胞内积累的环境毒物以及组织防御等过程至关重要^[39-41]。达里湖瓦氏雅罗鱼能够对抗 P_{NH_3} 梯度继续主动排氨^[11],推测 ABCC1 对于防止细胞内氨中毒发挥重要作用,但细胞解毒机制以及与氨氮代谢之间的关系仍需进一步探索。

通路分析还筛选到与免疫过程相关的基因显著富集,如 *xiap*、*ube2l*、*ube2d2*、*psme4b* 属于泛素-蛋白酶体系统,这一系统提供了控制蛋白质质量的基本方式,即增加蛋白的水解作用,加快蛋白质的更新速率,从而有选择性地清除在极端环境下由于生物合成错误、氧自由基或变性而引起的异常折叠或损坏^[42],表明修复细胞和清除坏死的细胞器也是瓦氏雅罗鱼盐碱适应的重要机制。

除了离子交换、转运及免疫的基因显著富集外,本研究还发现部分候选基因富集到了钙离子信号通路,包括编码钙黏蛋白 (*cdh4*, *cdh7*, *cdh11*, *cdhr1*), 紧密连接蛋白 (*cldn1*) 和细胞骨架蛋白 (*camsap1*) 相关的基因。其中 *cldn1* 在生物体处于压力环境时能够通过维持上皮细胞的完整性来充

当物理屏障,防止溶质和水自由通过上皮细胞和内皮细胞之间的细胞间隙。*camsap1* 编码细胞骨架蛋白,当细胞暴露于应激环境时,细胞可通过快速重组各种细胞骨架网络从而做出应答^[43]。

适应性进化(正向选择)是通过环境变化对蛋白质施加选择压力,以提高生物体在局域环境中的适应性^[44]。本研究推测达里湖瓦氏雅罗鱼在盐碱适应的进化过程中,可能通过调控基因的 SNP 或 InDel 等序列多态性,促使基因编码或调控序列的功能发生变化,以此达到对极端环境的适应。因此,除了对盐碱适应相关基因的功能研究外,本研究还重点关注了这些抗性相关基因在进化过程中受到的自然选择压力,对参与离子转运和酸碱平衡过程的关键调控基因进化速率进行了分析。笔者在选择压力检测分析中首先采用了 EasyCodeML 中的位点模型,因为在自然界的进化过程中,选择压力可能只是作用于某些位点,而不是作用于整个基因中^[45]。研究结果显示,*slc4a4*、*slc7a2*、*abcc1* 虽然主要经历了净化选择,但仍检测到小部分的正向选择氨基酸位点,并且 *slc4a4* 和 *slc7a2* 部分正向选择位点处于 HCO_3^- 共转运蛋白和氨基酸渗透关键功能结构域中。推测虽然整条基因在进化过程中受到较强的净化选择,但某些功能结构域的正向选择位点可能与盐碱胁迫环境的适应性进化、基因结构的改变有着重要的联系,盐碱环境胁迫可能是进化的主要驱动力。

4 结论

本研究对瓦氏雅罗鱼达里湖种群和松花江种群各 5 尾个体进行了基因组重测序,共鉴定得到 983528 个 InDels 位点。通过比较两个种群之间的差异 InDels 位点并整合已知的基因组强选择信号区域,筛选得到与盐碱适应相关的 325 个 InDels 位点及其关联候选基因 176 个。富集分析显示候选基因主要在离子转运、酸碱平衡及炎症免疫反应等生物学过程发挥重要作用。进一步的选择压力分析显示,关键调控基因 *abcc1*、*atp2b1*、*slc4a4*、*slc7a2* 和 *aqp4* 在进化过程中净化选择均起主导作用,但处于关键功能结构域的正向选择状态位点可能有助于瓦氏雅罗鱼达里湖种群快速

适应极端盐碱环境。本研究结果将为瓦氏雅罗鱼盐碱适应相关基因或标记的开发提供重要参考。

参考文献:

- [1] Chang Y M, Tang R, Sun X W, et al. Genetic analysis of population differentiation and adaptation in *Leuciscus waleckii*[J]. *Genetica*, 2013, 141(10-12): 417-429.
- [2] Geng K, Zhang Z C. The geomorphic characteristics and evolution of the lakes in Dalairuoer area of Neimenggu Plateau during the Holocene[J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 1988, 24(4): 94-101. [耿侃, 张振春. 内蒙古达来诺尔地区全新世湖群地貌特征及其演化[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 1988, 24(4): 94-101.]
- [3] Chi B J, Chang Y M, Yan X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Wusuli River and Dali Lake[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(2): 228-235. [池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 228-235.]
- [4] Chi B J. Genetic variability of *Leuciscus waleckii* (Dybowski) and construction of the cDNA subtractive library of saline-alkaline tolerance[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010: 12-17. [池炳杰. 瓦氏雅罗鱼遗传多样性分析和耐盐碱 cDNA 消减文库的构建[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010: 12-17.]
- [5] Wang S Y, Kuang Y Y, Liang L Q, et al. Resequencing and SNP discovery of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) provides insights into local adaptations to extreme environments[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 5064.
- [6] Xu J, Li J T, Jiang Y L, et al. Genomic basis of adaptive evolution: The survival of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(1): 145-159.
- [7] Adedze Y M N, Lu X, Xia Y C, et al. Agarose-resolvable InDel markers based on whole genome re-sequencing in cucumber[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 3872.
- [8] Misra G, Badoni S, Anacleto R, et al. Whole genome sequencing-based association study to unravel genetic architecture of cooked grain width and length traits in rice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12478.
- [9] Grobet L, Royo Martin L J, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(1): 71-74.
- [10] Chen M Y, Yan H L, Wang K, et al. Goat SPEF2: Expression profile, indel variants identification and association analysis with litter size[J]. *Theriogenology*, 2019, 139: 147-155.
- [11] Chang Y M, Liang L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 798-812. [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展[J]. *水产学报*, 2021, 45(5): 798-812.]
- [12] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [13] Patel R K, Jain M. NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30619.
- [14] Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2987-2993.
- [15] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [16] Cingolani P, Platts A, Wang L L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff[J]. *Fly*, 2012, 6(2): 80-92.
- [17] Xie C, Mao X Z, Huang J J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl_2): W316-W322.
- [18] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [19] Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms[J]. *Protein Science*, 2019, 28(11): 1947-1951.
- [20] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [21] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] Gao F L, Chen C J, Arab D A, et al. EasyCodeML: A visual tool for analysis of selection using CodeML[J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(7): 3891-3898.
- [23] Finn R D, Clements J, Eddy S R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl_2): W29-W37.
- [24] Mistry J, Chuguransky S, Williams L, et al. Pfam: The protein families database in 2021[J]. *Nucleic Acids Research*,

- 2021, 49(D1): D412-D419.
- [25] Yang J Y, Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [26] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 40.
- [27] Fujimoto A, Nakagawa H, Hosono N, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive variant analysis of a Japanese individual using massively parallel sequencing[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(11): 931-936.
- [28] Jiang J P, Gao Y H, Hou Y L, et al. Whole-genome resequencing of Holstein bulls for indel discovery and identification of genes associated with milk composition traits in dairy cattle[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168946.
- [29] Fan Z X, Zhao G, Li P, et al. Whole-genome sequencing of Tibetan macaque (*Macaca thibetana*) provides new insight into the macaque evolutionary history[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(6): 1475-1489.
- [30] White C R, Alton L A, Frappell P B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 279(1734): 1740-1747.
- [31] Ellingsen S, Narawane S, Fjose A, et al. Sequence analysis and spatiotemporal developmental distribution of the Cat-1-type transporter *slc7a1a* in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(6): 2281-2298.
- [32] Esbaugh A J, Heuer R, Grosell M. Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(7): 921-934.
- [33] Lee Y C, Yan J J, Cruz S A, et al. Anion exchanger 1b, but not sodium-bicarbonate cotransporter 1b, plays a role in transport functions of zebrafish H⁺-ATPase-rich cells[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2011, 300(2): C295-C307.
- [34] Chang Y M, Zhao X F, Liew H J, et al. Effects of Bicarbonate Stress on Serum Ions and Gill Transporters in Alkali and Freshwater Forms of Amur Ide (*Leuciscus waleckii*)[J]. *Frontiers in physiology*, 2021, 12: 676096.
- [35] Verboost P M, Schoenmakers T J, Flik G, et al. Kinetics of ATP- and Na⁺-gradient driven Ca²⁺ transport in basolateral membranes from gills of freshwater- and seawater-adapted tilapia[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, 186: 95-108.
- [36] Rengmark A H, Slettan A, Lee W J, et al. Identification and mapping of genes associated with salt tolerance in tilapia[J]. *Journal of Fish Biology*, 2007, 71(sc): 409-422.
- [37] Chen S G, Hou J L, Yao N, et al. Comparative transcriptome analysis of *Triplophysa yarkandensis* in response to salinity and alkalinity stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 33: 100629.
- [38] Keppler D, Cui Y, König J, et al. Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes[J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 1999, 39: 237-246.
- [39] Ferreira M, Costa J, Reis-Henriques M A. ABC transporters in fish species: A review[J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 266.
- [40] Costa J, Reis-Henriques M A, Wilson J M, et al. P-glycoprotein and CYP1A protein expression patterns in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) tissues after waterborne exposure to benzo(a)pyrene (BaP)[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(2): 611-625.
- [41] Ferreira M, Santos P, Rey-Salgueiro L, et al. The first demonstration of CYP1A and the ABC protein(s) gene expression and activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) primary hepatocytes[J]. *Chemosphere*, 2014, 100: 152-159.
- [42] Benedito-Palos L, Ballester-Lozano G F, Simó P, et al. Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 8-18.
- [43] Kim S, Coulombe P A. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(1): 75-81.
- [44] Morgan C C, Loughran N B, Walsh T A, et al. Positive selection neighboring functionally essential sites and disease-implicated regions of mammalian reproductive proteins[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 39.
- [45] Kamath P L, Getz W M. Adaptive molecular evolution of the Major Histocompatibility Complex genes, *DRA* and *DQA*, in the genus *Equus*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11: 128.

Mining and analysis of InDels in response to alkali-saline stress in Amur ide (*Leuciscus waleckii*)

WANG Shuangyi^{1,2}, LIANG Liqun², CHANG Yumei², SUN Bo²

1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. National & Local United Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Heilongjiang Province's Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: To uncover the adaptative mechanism of the alkaline Amur ide (*Leuciscus waleckii*) population in Lake Dali Nor, Inner Mongolia, China, five samples of two populations, including one alkali form from Lake Dali Nor (DL), and one freshwater form from the Songhua River (SH), Heilongjiang, China, i.e., its historical origin, were analyzed using whole-genome resequencing technology. A total of 983528 nonredundant short insertions and deletions (InDels, 1–29 base pairs) were obtained. Among them, 8176 InDels that were polymorphic between the DL and SH populations were identified. Then, using integrated analysis of the known strong positive selection signal regions between the DL and SH populations, we identified a total of 176 potential candidate genes potentially affecting alkali-saline adaptation. Enrichment analysis showed that the genes were enriched mainly in inflammatory immune responses, ion transport, and osmotic regulation. Furthermore, the candidate genes *abcc1*, *atp2b1*, *slc4a4*, *slc7a2*, and *aqp4* for key regulatory processes of alkali-saline adaptation, such as osmotic regulation and acid-base balance, were identified via selective pressure analysis using EasyCodeML, MEME, and FEL. Analysis showed that purifying selection played a dominative role for all of these genes, but a few amino sites could be identified to be under positive selection in the selection model. Prediction of three-dimensional structure revealed that some sites of the two proteins SLC4A4 and SLC7A2 coincided or were very close to the ligand-binding sites, indicating that the positive selection pressure mediated by the alkali-saline stress may contribute to the development of rapidly adaptive evolution in Amur ide. Our findings provide a basis for further study and reveal key genes for alkali-saline adaptation in Amur ide.

Key words: *Leuciscus waleckii*; whole-genome resequencing; insertions and deletions (InDels); alkali-saline adaptation; selective pressure; adaptive evolution

Corresponding author: CHANG Yumei. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0186

黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因克隆及其对急性低温的应答

陈自强^{1,2}, 张志勇¹, 张志伟¹, 卫明亮^{1,2}, 林志杰^{1,2}, 祝斐¹, 贾超峰^{1,2}, 陈淑吟¹, 孟乾¹

1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏省鱼类遗传育种重点实验室, 江苏 南通 226007;
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: 为探究硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)响应低温过程中的作用, 利用 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得了黑鲷 *scd1a* (*Asscd1a*)和 *scd1b* (*Asscd1b*)基因的 cDNA 全长序列, 并检测了其在急性低温胁迫下不同组织中的表达情况。以 19.8 °C 为对照组, 6 °C 为胁迫组进行低温胁迫(以 1 °C/h 的速度降温, 下降至 6 °C 并保持 24 h), 在胁迫状态下能正常游动的为耐受组, 失衡状态的黑鲷为敏感组。结果表明, *scd1a* 的 cDNA 全长为 3281 bp (GenBank No. MZ004439), 包括 111 bp 的 5'UTR、2162 bp 的 3'UTR 和 1008 bp 完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸; *scd1b* 基因 cDNA 全长为 1560 bp (GenBank No. MZ004440), 包括 152 bp 的 5'UTR、400 bp 的 3'UTR 和 1008 bp 完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸。多重序列比对结果显示, 黑鲷与其他硬骨鱼类 *scd* 基因的氨基酸序列有较高的相似度(70%~98%), 均含有 3 个高度保守的组氨酸元件。系统进化树分析表明, 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因编码氨基酸序列分别与黄鳍鲷的 SCD 和 SCD b 聚为一簇, 两者之间有着较近的进化关系。正常水温下, *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 主要在肝脏中表达, 脑中弱表达, 鳃中不表达; 低温胁迫下, *Asscd1a* 在肝脏中的表达前期受到抑制, 后期显著上调, 而 *Asscd1b* 在肝脏中则呈现表达持续上调的趋势, 且上调幅度远高于 *scd1a*; *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 在脑的表达均受到抑制; 鳃中 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 均显著上调; 耐受组 *Asscd1* 基因的两种亚型在肝脏、脑和鳃 3 个组织中的表达均比敏感组变化更为迅速。*Asscd1a* 和 *Asscd1b* 剧烈变化的表达量说明其在黑鲷低温响应过程中发挥重要作用。

关键词: 黑鲷; *scd1* 基因; 低温胁迫; 基因克隆

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0200-11

鱼类作为变温动物, 由于缺乏体温调节的机制, 鱼体的温度随着环境温度的变化而变化, 而体温对机体的生命活动有着重大的影响。长期生活在昼夜和季节水温波动的环境中, 鱼类已经进化出适应性反应机制^[1]。有研究表明, 当大黄鱼(*Larimichthys crocea*)遭受低温胁迫时, 可以通过肌醇-1-磷酸合成酶的过表达来维持细胞膜的稳定性, 从而提高自身的抗寒能力^[2]; 而美洲鲈(*Alosa sapidissima*)则可以通过诱导抗氧化酶的表

达来抵御低温造成的细胞氧化损伤和凋亡^[3]。不同鱼类有着相同或独特的低温适应机制。

细胞膜是细胞内外的联系界面, 细胞膜的流动性对于能量转换、物质运输和信号传递等功能具有重要意义。而当鱼类处在低温环境中时, 细胞膜的膜相由液晶相变为凝胶相, 使得膜的流动性下降导致细胞膜的部分功能丧失, 从而造成应激性生理反应^[4]。鱼类能够通过改变细胞膜中的脂肪酸比例来应对这种情况, 主要为上调不饱和脂

收稿日期: 2021-04-29; 修订日期: 2021-06-08.

基金项目: 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201744); 江苏省“333 工程”科研资助项目(BRA2020372); 江苏省自然科学基金项目(BK20181202); 江苏省水产良种保种及亲本更新项目(2021-SJ-032).

作者简介: 陈自强(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生物遗传育种. E-mail: 810780548@qq.com

通信作者: 张志伟, 博士, 研究员, 研究方向为水生生物遗传育种. E-mail: zhzhwei2005@126.com

肪酸的比例, 从而降低细胞膜的相变温度, 维持细胞膜的流动性, 达到提高抗寒能力的目的。这种低温调控响应在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)以及鲤(*Cyprinus carpio*)的低温适应性研究中均有发现^[5-7]。有研究表明, 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD1)作为单不饱和脂肪酸合成的限速酶, 是调节细胞膜中不饱和和脂肪酸比例的关键基因之一^[8]。在对 *scd1* 基因的进一步研究中发现, *scd1* 基因在大黄鱼和鲤中存在两种亚型 *scd1a* 和 *scd1b*, 在不同的低温胁迫条件下, 两种亚型呈现出不同的调节方式, 说明不同刺激下可能存在不同的调节机制^[9-10]。探究鱼类的 *scd1* 基因在低温环境下的应答机制具有重要的意义。

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)隶属鲷科(Sparidae), 棘鲷属, 是中国南北沿海地区养殖的重要海水经济鱼类。但是由于黑鲷难以在 4 °C 以下的水体长期生存, 而江苏以北地区的冬季水温一般都在 4 °C 以下, 尤其在寒潮等天气下, 水温将降至 0 °C 以下, 养殖黑鲷难以在室外自然越冬, 需要进行室内越冬, 这严重限制着黑鲷养殖业的发展^[11]。目前黑鲷的研究主要集中在遗传育种和营养成分等方面, 与黑鲷低温响应机制相关的报道较少^[12-13]。本实验室为探究黑鲷在低温胁迫下的响应机制, 对黑鲷低温胁迫下的抗氧化酶、热休克蛋白以及转录组测序等方面进行了探究, 发现黑鲷在低温响应过程中关键的耐寒相关基因 *scd1* 的转录本调节模式与根据别人的研究所预测的趋势相反, 在黑鲷肝脏中还发现 *scd1* 基因存在 *scd1a* 和 *scd1b* 两种亚型并均与低温响应相关^[14]。本研究通过对黑鲷 *scd1* 基因的两种亚型(*Asscd1a* 和 *Asscd1b*)进行 cDNA 全长克隆以及测定其在低温胁迫下的表达变化趋势, 拟从分子水平阐述黑鲷的低温响应机制, 为黑鲷低温响应机制的探索以及黑鲷耐寒品种的选育提供参考和数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用鱼来自江苏省海洋水产研究所吕四养殖基地。体长为(12.1±0.3) cm, 体重为(58.58±2.56) g

的 8 月龄黑鲷, 共计 200 尾。暂养在长×宽×高为 3.9 m×2.6 m×1.6 m 的水泥池中, 水温为 19.8 °C, 持续充气并保持溶解氧≥6 mg/L, 每日投喂 1 次, 每 3 天换水 1 次, 换水量约 1/3, 实验前 48 h 停止投喂。暂养两周后, 随机挑选 108 尾健康黑鲷进行实验。

SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)购自天根生化公司(北京); SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit、La Taq 酶、pMD19-T 载体和 *E.coli* DH5α 感受态细胞均购自美国 Clontech 公司; 柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒、RNase-Free DNA 清除试剂盒、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒以及实验中所有使用的引物均来自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 低温胁迫实验

在预实验中发现, 将正常水温以 1 °C/h 的速度降温到 6.0 °C 时, 约半数黑鲷出现倒游或侧躺的失衡现象, 而降至 5 °C 时, 黑鲷基本都处于失衡侧躺状态, 无法正常游动, 因此本实验设置 6 °C 为冷胁迫温度。将黑鲷随机分配到 9 个规格为 90 cm×65 cm×55 cm (长×宽×高)的泡沫箱中, 每个箱子 12 尾, 其中 6 个为冷胁迫组, 3 个为常温组。将黑鲷转移至泡沫箱 12 h 后, 利用制冷加热循环器(CW-1500A 型, RESUN, 中国)对低温胁迫组采取 1 °C/h 的速度降温, 待水温降到 6 °C 后维持并开始计时, 分别在 0 h、6 h、12 h、18 h 以及 24 h 进行取样。实验期间保持充足供氧, 低温胁迫组水温维持在(6±0.2) °C, 对照组水温为 19.8 °C。同一时间点分别从不同泡沫箱各取出一条进行采样, 耐受组(正常游动)、敏感组(失衡侧躺)和对照组(常温)各取 3 尾, 取样前使用 MS-222 麻醉剂将其快速麻醉后进行解剖, 取其肝脏、鳃和脑 3 种组织, 生理盐水洗净并分别放置在 1.5 mL 的离心管中, 使用液氮快速冷冻后保存在-80 °C 冰箱。

1.3 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因 cDNA 克隆

使用总 RNA 抽提纯化试剂盒与 RNase-Free DNA 清除试剂盒将样品进行 RNA 提取, 并使用 Nano-drop 2000 型核酸分析仪(Thermo Fisher 公司)和琼脂糖凝胶电泳对 RNA 提取质量进行检测, 采用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(生工生物,

上海)将质量合格的 RNA 进行第一链 cDNA 合成。根据先前实验测定的黑鲷肝脏转录组数据库中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因部分序列设计引物 SCD1aF、SCD1aR、SCD1bF 和 SCD1bR (表 1), 使用黑鲷肝脏 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经过琼脂糖电泳确认条带后送公司测序, 获得黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的中间片段。

根据测得的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因 cDNA 中间序列分别设计出用于 3'端和 5'末端扩增的特异性引物(表 1)。通过 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 试剂盒进行 3'RACE 和 5'RACE, 按照说明书的操作和步骤, 扩增黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 3'UTR 和 5'UTR 片段, 以稀释 20 倍后的 RACE 产物作为模板, 进行第二轮 PCR 扩增(巢式 PCR)。

扩增产物经过电泳检验后, 利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对目的条带进行回收与纯化, 并连接至 pMD19-T 载体中, 然后转化到 DH5 α 感受态细胞, 使用通用引物 M13-F 和 M13-R 对挑选出来的阳性克隆菌进行 PCR 验证, 对插入目的条带的阳性克隆菌送测序。所有测序工作均由上海

生工生物工程有限公司进行, 本研究所用引物均使用 Oligo 7 软件设计。

1.4 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因的生物信息学分析

使用 SeqMan 软件去除测序结果中的载体序列并进行拼接, 利用 Edit Seq 软件预测拼接后的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因 cDNA 序列的开放阅读框(ORF)和氨基酸序列; 采用 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)和 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)对信号肽和跨膜结构进行预测; 运用 ExPASy Proteomics Server (<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白质理化性质推导分析; 在 NCBI 上下载其他物种 *scd1* 的 cDNA 序列, 利用 Clustal W 和 MEGA 6.06 软件进行多重序列比对和系统进化树构建(邻位相接法)。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测及数据处理

根据测得的黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列, 使用软件 AlleleID 6.0 设计扩增引物 SCD1a-RT 和 SCD1b-RT (表 1), 对反应体系优化后, 通过

表 1 本研究所用引物信息
Tab. 1 Information of primers used in the study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	目的 purpose
SCD1a-RT	F: CCACGGGAGAACAAGTTTG R: CCAGGTAGCACATCAGGTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
SCD1b-RT	F: TGTTCCAGAGACGGCACTAC R: GGGCACGATGAAGCAAAGG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
β -actin-RT	F: CGACGGTCAGGTCATCAC R: GCCAGCAGACTCCATTCC	内参基因 reference gene
SCD1a	F: AGAAGAAGCAGCACAAGTCCA R: GACACTCTCTTGCGGTCTT	部分序列扩增 partial sequence amplification
SCD1b	F: CATGGCAGCAGAAACATCGAC R: CCCATGAAGCACATCAAGTCT	部分序列扩增 partial sequence amplification
M13	F: GTTGTAACACGACGGCCAG R: CAGGAAACAGCTATGAC	载体引物 vector primer
A-3'GSP Outer	TCATCCCTTCCGCATCTCCTTTGACCT	3'RACE
A-3'GSP Inter	ATGACAAGAACATCAACCCACGGGAG	3'RACE
A-5'GSP Outer	TCCCTCACCTATGGCACTGAACGTGAC	5'RACE
A-5'GSP Inter	GAGTTCCAGCTTGCGTCCTTCTCGA	5'RACE
B-3'GSP Outer	TATTGATGACCCTCTGCACGTCGCTTC	3'RACE
B-3'GSP Inter	GCTACCTCTTCAGTGCCCTCGGTGT	3'RACE
B-5'GSP Outer	TTGATGACCCTCTGCACGTCGCTTC	5'RACE
B-5'GSP Inter	CTACCTCTTCAGTGCCCTCGGTGT	5'RACE

标准曲线法计算引物扩增效率在 91%~97%。使用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂, 在 ABI 公司的 7300 plus Real-Time PCR system 仪器上采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行 qPCR, 并设置 3 个重复的扩增和 3 个阴性对照。以 β -actin 为内参基因, 测定黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在不同时间点和不同组织之间的相对表达量, 并使用 SPSS 22.0 软件的单因素方差分析(one-way-ANOVA)和 Duncan 检验, 进行多重比较和显著性分析, $P < 0.05$ 时为差异显著。利用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因 cDNA 序列及结构分析

将 5'RACE (*scd1a*: 933 bp, *scd1b*: 796 bp)、3'RACE (*scd1a*: 2416 bp, *scd1b*: 1161 bp)与中间序列(*scd1a*: 690 bp, *scd1b*: 686 bp)使用 SeqMan 软件拼接后获得黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列。*Asscd1a* 的 cDNA 全长为 3281 bp (GenBank 登录号 MZ004439), 包括 111 bp 的 5'端非编码区(5'UTR)、2162 bp 的 3'端非编码区(3'UTR)和 1008 bp 的完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸(图 1)。预测其编码蛋白质的分子量约为 38.5 kD, 分子式为 $C_{1761}H_{2684}N_{472}O_{470}S_{16}$, 碱性氨基酸(Arg+Lys)有 38 个, 酸性氨基酸(Asp+Glu)有 31 个, 理论等电点为 9.04, 总平均亲水性为 -0.125, 属于亲水性蛋白, 不稳定系数为 35.04, 属于稳定蛋白, 脂溶指数为 87.61。*Asscd1b* 的 cDNA 全长为 1560 bp (GenBank 登录号 MZ004440), 包括 1008 bp 的完整开放阅读框, 共编码 335 个氨基酸以及 152 bp 的 5'UTR 和 400 bp 的 3'UTR (图 2), 其分子量约为 38 kD, 分子式为 $C_{1740}H_{2660}N_{470}O_{468}S_{12}$, 理论等电点为 9.20, 碱性氨基酸(Arg+Lys)有 38 个, 酸性氨基酸(Asp+Glu)有 30 个, 不稳定系数为 31.96, 为稳定蛋白, 脂溶指数为 87.64, 总平均亲水性为 -0.102, 是亲水性蛋白。*Asscd1a* 和 *Asscd1b* 均未检测到信号肽, 说明二者均不属于分泌蛋白, 且均有 3 个高度保守的组氨酸元件和 4 个跨膜结构。

2.2 多重序列比对和进化树分析

利用黑鲷(MZ004439 和 MZ004440)、乌鳢

(*Channa argus*, KAF3708188.1)、黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*, XP_036978990.1 和 XP_036937428.1)、金头鲷(*Sparus aurata*, AFP97552.1); 棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*, TKS85683.1)、青鳞(*Oryzias melastigma*, KAF6716482.1)、斑纹隐小鲈(*Kryptolebias marmoratus*, XP_017289154.1)、新西兰背

```

1  ACATGGGGACTGTAGTTTGGGATAAGCGGACCTGCTTCATCTCCGTTAAACACCCCCCAAAATATCTACTACT
76  CGTCTCGTCTTGAGCATACCAAAACCGCTGCCACGTGACGGAGCGGAGCGTTGGAGAGAAGCAGCACAAAG
1  M T E A E A L E K K Q H K
151  TCCAGTAACCAAAATGGGATGTTCTCCAGAGGCCACAGAGAAGAGTGTTGATCACACATACAAGAGAA
14  S S N Q N G D V L P E A T R E D V F D H T Y K E K
226  GAGGGCCCAAAACCTGGCAGATAATCTGCTGGAAAGATGTCATGTTGATGACTGTATATACATATAGATGCCCTG
39  E G P K P G T I I V W K N V M L M T V L H I G A L
301  TACGCCATCTCCCTCATCCTTCCGATCTCTTTGACCTTGCTTTGGTCCGTACTTGTGTTTGTAGATAGTGT
64  Y A I S L I P S A S P L T L L W S V L C F L I S A
376  TTAGAGTCACTGCAGGAGCTATCGCTGTGGAGTACAGATCTACAAGGCCCTATTACCTCTGAGGATCTT
89  L G V T A G A H R L W S H R S Y K A S L P L R I F
451  CTGTGTTGTTCACTCCATGGCATTTCAGATGATATCTTGAATGGGCCGGGACACAGGGTTCACCAACAAA
114  L G V A N S M A F Q N D I F E W A R D H R V H J K
526  TATTCAGAGACAGATGCTGACCCCTACAACGCCGTGGGGGCTCTCTTTGCTACATCGCTGGCTGCTGGTG
139  Y S E T D A D P H N A V R G F F F A H I G W L L V
601  CGCAACACCCGACGTCATCGAGAAGGACGCAAGCTGGAACCTACTGACCTGCTGTGACAAAAGTGTATG
164  R K H P D V I E K G R K L E L T D L S D K V V M
676  TTTCAAAGGAAGTATTACAAGCTGTCTGTCTGCTGCTGCTCTGCTCCCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
189  F Q R K Y Y K L S V L L M C F F V P M S V P V W L
751  TGGGGGAGTCCCTGTGGGTGGCTACTTCGTCGGCGCCCTGCTGAGGTACACCTGTTGTAACGCCACCTGG
214  W G E S L W V A Y F V P A L L R Y T L V L N A T W
826  CTGTGCAACAGCGCCGCTACATGTGGGGGAACCGTCCATGACAAAGAACACACCCAGGGAGAACAGTGT
239  L V N S A A H M W G N R P Y D K N I N P R E N K F
901  GTACAGTTCAGTGCATAGGTGAGGGATCCCAATATACACTCTTCCCTACGACTATGCTACCCAGCGGAG
264  V T F S A I G E G F H N Y Y H S F P Y D Y A T S E
976  TTGGTCTCAAGATGAACCTTACCCTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
289  F G C K M N L T T C T F I D L M C Y L G L A K D R K
1051  AGAGTGTCCACGAGATGGTCTGCGCCGAATACGCGCTCGGAGCGGAAGCCACCGGAAGTGTAGCTGTG
314  R V I Q R T G D G S H R S G *
1126  TGGAGTGTGGTTCAGTTCGAGGCAAAACCAACGAAAGAGAGCTTCACAGCTCTTGACAGCTCTACATTT
1201  CTCATCTCTGAGGATAAAAGTACGCTTCATGAGGCTCAACCAATTTGCTGTGTTTGTGGTTTGTGAGC
1276  TGTATCTTAACAAAAATTTGTTCAAGATGATAACAAACACATTTGCTAAGCCCTTGGCTCAGTTTGTATGTT
1351  CGAGTCAGGCAAGGCTTCGAAAGATGTTTGAATTTGAAGTATGAGTGTGTAAGAAAAAGTCACTTCATCC
1426  TCCGCTGTTTGGCCATTTGGTGTGCTTCTCATGCAAAAGTATGAGCGATCATTTTATGTAAGTATTAAT
1501  CAATATTAATCAAACTAGACAAGAAAGTGGAGCTGAAATGAGGAGTAACTGCTGATGATGAGTGTGAGTGT
1576  TGCTTTATCGCAGTTTACAGCAAGTTTTCATGCTGATATAGTTCATTTATGAGCGCTCAAGAGTCTGAA
1651  AATAAAGGGATGAGAGTTTGAACATATTTTGTAAAGAAAGAAAGTGTGCTTAATGAATATGACACA
1726  TGATAGAAGATGAGGGAACCCAGACCATTTATAAAGTCTGACTAGAGTACGCAAAACCTATGAGGAACCGAGA
1801  GTCATGCTGTGTGTTTGTCTGTGTGTAACCTGGTTTCTTCAACCAAAACCAATGATGATGCAACCGCTGAT
1876  TTAGTGTGTGTATGATAGAGTTTTCGAGACAATATAAGGACACATATATCATGAATTTAAATGCTCCGTT
1951  CGATATGTATAACAGAAATGATAAATGTAATTTATAGAGCCCTGCAAGTGTGTTGACGTTTGTGATGTTTGT
2026  TTACCAATACATCGCAGTGCCAAAGAGCGTGCCATCTGTCGACATATTTAATCAATCTCAATGCTCCATGAG
2101  CACTAAAGTGCATGCTCTTCTCACTCATGCTGGAAGTTTAAACATTGTGGCATCATGCTGCTGCTCTC
2176  TTCTCTCTTTTCAATCCGAAACATCTGACAGAGCGATCCGTTGGTGGCTGGCGCCGACCGCTGCGGA
2251  CAGTCCCGGTGTACAAAACAGCTGCCACCATCATGATGATATCTGTAGTAGGTGTGCTGATGAGGTGTTT
2326  TTCTGCGGCAACCGCTGTCTATTTTGAAGTGTGCGGAGCGCATCACTTTTGGATCATGAGAACAGTGTG
2401  CCGTGTGATTTCTGAGGCGGGGTCTGTTCCCTTTGATGTCCCAACAAAGTGTGATGATCAAGCAGGAAATC
2476  AGGTGCATCGATGCTTATGTTATCTCAATCTCGGTGTGAGGAATGCTAATCTATTATGATTTATTTCAAA
2551  AAATGTTTATCCCTTTTGACCTAAATAATATGCTGTAACTGAACTGCTGTTTCTGCTATCCAAAGATTG
2626  ACAGTCTGTAACAAAATAATATCAATTTAGCACTGTTGTTTATACCCCAAGAGTCAAGGATAC
2701  AACTAATGCTTATGACTTGCATCTCTGATCTCTTCACTGTTTGGCAATTTAAACAAAAAAGGTCCA
2776  AAGTACCACAAAACAGTCTGACCGAGTCCATGTTTACAGGCTGAGGACCGAGTGGAAAGCTATTTTATCT
2851  GAAACCGCATTTAATTAGGCAATGGTATGATGACACATTAAGTACTGTAAATGCAAAATAGAGGACAGAGGT
2926  TAATCTACTGACGCTGGTGAACGTTCACTGTGAGATTAACCTTGAACCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
3001  CAACATGCTCAACCCATCATGGAACCTTCAAGCAAAAGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
3076  ACCGCAATGAAAAATATCAAGCAAGCAAACTCTGCTGCAAGAGCGGCAAAATCAACGCTTATGA
3151  CGAAGAGGATCAAAAGGTTGTCCCTCTGAATGATGATGCTCAAACTGATTTCTATTTTGAATAAAGATTG
3226  ACAATATTTCAATCAATCTGTAACAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

```

图 1 黑鲷 *scd1a* 基因 cDNA 全长序列及预测氨基酸序列

*表示终止密码子; 起始密码子和终止密码子均加粗显示; 加尾信号(AATAAA)用下划线标出; 方框表示组氨酸富含区域。

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Asscd1a* gene in *Acanthopagrus schlegelii*. * indicates the stop codon. The translation initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are in bold. The polyadenylation signal sequence (AATAAA) is underlined. His-rich region is marked with filament box.

```

1  ACATGGGGGACTTCATCTCTGACGAGGACCGCGCTTGTCTCTGACGCTTTCGCTTACGCTTACCTGCAATCC
76  AGGTGCGCAGCGCGCGGAAAGCGACTGGAGGACACACGAGGACGCTGACCTGGAATACCTTCAGCGA
151  AAATGACCGAGACGGAAACCGGAATCATCACCGCGGCAAGCAGCAGAGGAGGTCATGGCAGCAGAAACAT
1  M T E T E T R N H A G K Q Q N G G A M A A E T
226  CGACGGTGGAGATGTTTTCGACGACCTACGACGAGAAAGAGTCCAAACCGCGGAGGACGCTGGTGTGGA
25  S T V E D V F D D T Y A E K E G P K P P R T L V W
301  GGAACATCATATTGATGACCTCTGACGCTCGCTTCGCTTTACGGGCTGGTTCCTTCATCCGATCGGCTC
50  R N I I L M T L L H V A S L Y G L V L L P S A S A
376  CAACTCTCGCTTGGACTGTAGTGTGCTACCTCTTCAGTGCCCTCGGTGTGACTGCTGGCGGCACAGATTGTGA
75  P T L A W T V V C Y L F S A L G V T A G A [H R L W]
451  GGCACAGATCCTATAAGGCTCAITTCCTCCGCGAGTCTTCCTTGCTCTTGCCAACTCCATGGCTTTTCAGAATG
100  [S H] R S Y K A S F P L R V F L A L A N S M A F Q N
526  ACATATATGAGTGGCAAGGACCGGTGTCCACCAAGTACTCGGAGACGAGCAGACCCCAACATGCCA
125  D I Y E W A R D [H R V H H] K Y S E T D A D P H N A
601  AGCGGGGGTCTCTTCGCGCCACATTGGTTGGCTGCTGGTTCGCAACATCCGACGCTATTGAGAGGGCAAAA
150  K R G F F F A H I G W L L V R K H P D V I E K G K
676  AACTGGAATGATGACCTGAAGCGGATTAAGTGGTGTATGTCCAGAGACGCACTCAAACTCTCGGTGTG
175  K L E L I D L K A D K V V M F Q R R H Y K L S V L
751  TCCTTGTCTCATCGTCCGACGTTGGTCCCTGGTACTCTCTGGGTGAATCTCTGGCTGTGGGATACTCTGTC
200  I L C F I V P T L V P W Y F W G E S L A V G Y F V
826  CCGGCTGCTCAGATACACTGTGATGCTCAATGCCACCTGGCTGGTCAACAGCGTGCACATATGGGCAACA
225  P G L L R Y T V M L N A T W L V N S A A H I W G N
901  GGCCTTATGACAAGACCTAATACCGGAGAGAACTCACTGGTTCCTTAAGTGCATAGGGGAAGGATCCACA
250  R P Y D K T I N P R E N S L V A L S A I G E G F [H]
976  ACTACCATCACACTTTCCTTCGACTATGCCACAGTGAAGTTGGCTGCAAGCTCAATCTCACCCCGCTTCA
275  N Y H H T F P F D Y A T S E F G C K L N L T T A F
1051  TAGACTTGATGTCTTATGGTCTGGCCAAGGACCGCAAGCGGGTGTGAAGGAGACAGTCTCGCTCGCTCC
300  I D L M C F M G L A K D R K T R V L K E T V V A R V
1126  AGAGAACGGGCGACGAGTACAAAATGGCTGAAGTCACTGCTCAAACTGTATACGCTGTGTGGAAC
325  Q R T G D G S Y K S G *
1201  AAGACAAAACGTAGCAACGGGTATAGCAGCATTTAGCGATTGGGGGGTGTTCACGACGCTTCTGATTAAATG
1276  TAAACCTCTCTGAGACTAATATGGCTTAAAGAAATTCAGACCTTTTCTATAAATTGTGTAGGCTCTCTTAA
1351  GTTGTGAAGTGTCTTCAACCACTATTAGCCACAGCCAGCAGCTCGGTACACGTGCAAGCAGACGCTTTTACCG
1426  TAATATAAACAGACAGGAGAGGATAAAAAAAGCTAATTGGGATTAAGTCTC
1501  TCTTGCAACAGTAGGACAACCAACAGTCTGTGTGAGCGGTGTCTAAAGCAGCAATT

```

图 2 黑鲷 *scd1b* 基因 cDNA 全长序列及预测氨基酸序列

*表示终止密码子; 起始密码子和终止密码子均加粗显示;
方框表示组氨酸富含区域。

Fig. 2 Full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Asscd1b* gene in *Acanthopagrus schlegelii*
* indicates the stop codon. The translation initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are in bold.
His-rich region is marked with filament box.

唇鱼(*Notolabrus celidotus*, XP_034537733.1)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*, XP_038593057.1)、金鲳(*Trachinotus ovatus*, ALI53628.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, AKA66436.1、MT325796.1、MT325797.1)、大海鲢(*Megalops cyprinoides*, XP_036402457.1)、海鲈(*Dicentrarchus labrax*, CBN-81527.1)、银鲳(*Pampus argenteus*, QGT37389.1)、翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*, QEU52182.1)、伯氏肩孔南极鱼(*Trematomus bernacchii*, ACI16378.1)、独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*, CAB56151.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_942110.2)的 SCD 序列进行多重序列比对和进化树分析。多重序列比对结果显示(图 3), 所有 SCD 的氨基酸序列高度保守, 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 编码蛋白与各种硬骨鱼类的 SCD 序列之间有较高的同源性, 相似度为 70%~98%, 其中 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 的同源性为 74.33%。所

有 SCD 的氨基酸都有 3 个高度保守的组氨酸元件(HRLWSH、HRV/AHH 和 HNYHH)。

基于 SCD 的氨基酸序列, 采用 NJ 法构建系统进化树, 结果如图 4 显示。在本研究中克隆获得的 *Asscd1a* 基因编码氨基酸序列与黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)的 SCD (XP_036978990.1)首先聚为一个小簇, 相似度 98%, 而获得的黑鲷 SCD1b 与黄鳍鲷的 SCD b 首先聚为一个小簇, 相似度 97%, 说明黑鲷与同属鲷科的黄鳍鲷具有较近的亲缘关系。而黑鲷的 SCD1a 和 SCD1b 分别聚于不同的簇中, 说明两者是不同的 SCD1 亚型。

2.3 正常生长水温下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 在肝脏、脑和鳃中的表达情况

在正常的水温下, 黑鲷的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因主要在肝脏显著表达, 在脑中表达量较低, 在鳃中几乎不表达。同时, 在不同组织中均以 *scd1a* 为主, 其表达量高于显著 *scd1b* ($P<0.01$, 图 5)。

2.4 低温胁迫下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在肝脏中的表达变化

生物体内的平衡是动态的, 在急性低温胁迫下, 对照组黑鲷的 *scd1a* 表达量波动变化, 在胁迫 24 h 后显著上升($P<0.05$)。敏感组和耐受组 *scd1a* 表达量均呈现先抑制后升高的趋势, 其中耐受组比敏感组对于温度变化的感知更灵敏。经过 14 h 的逐步降温至预设温度后, 耐受组在开始计时的胁迫 0 h 已经被抑制($P<0.05$), 并从胁迫 6 h 开始其表达量开始上调, 在 18 h 达到最大值并维持; 而敏感组的 *scd1a* 基因表达量在胁迫 6 h 才发生变化, 并被持续抑制至 12 h 后才出现上调趋势($P<0.05$, 图 6)。对照组中的 *scd1b* 基因表达量无明显变化, 而敏感组和耐受组的 *scd1b* 基因表达量均呈现持续上升的趋势, 分别在胁迫 6 h 和 0 h 开始发生变化($P<0.05$, 图 7)。其中, 肝脏中 *scd1b* 的上调幅度远大于 *scd1a*。

2.5 低温胁迫下 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在脑中的表达变化

在受到急性低温胁迫后, 黑鲷脑中的 *scd1a* (图 8)和 *scd1b* (图 9)表达均受到抑制。对照组中的 *scd1a* 和 *scd1b* 波动变化, 而敏感组中 *scd1a* 和 *scd1b* 的表达量持续受到抑制, 分别在胁迫 0 h 和

黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1a	MTEAFALEKKQHKSSNQND.VLP.EATREDTHTHYKERGKPGTIIVNWNVMTLHLHGAIAVSI	68
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1b	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD b	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD	MTEAFALEKKQHKSSNQND.VLP.EATREDTHTHYKERGKPGTIIVNWNVMTLHLHGAIAVSI	68
乌鲳 <i>Channa argus</i> _SCD	MSSETTTTHHASK...QQNGD.SMAEPPMTEDTDTYKERGKPGTIVNNTITMTLHWASLGVLI	67
独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i> _SCD	MTEAFALEKKQHKSSNQND.VLP.EATREDTHTHYKERGKPGRTIIVNWNVMTLHLHGAIAVSI	68
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> _SCD	MPDSVKAFLVLPQLE...AMDEBTPLEKSEPKAPKIVNWNVMTLHLHGAIAVSI	59
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
斑纹隐小鲈 <i>Kryptolebias marmoratus</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> _SCD1	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
新西兰背唇鱼 <i>Notolabrus celidonus</i> _SCD b	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
银鲈 <i>Pampus argenteus</i> _SCD1	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> _SCD1b	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i> _SCD1	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
金鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> _SCD	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
相同 Consensus	MTETETRNHAGK...QQNGAMAETSIVEDTDTYKERGKPGRTIIVNNTITMTLHWASLGVLI	68
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1a	IPSSPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
乌鲳 <i>Channa argus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	128
独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	127
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
斑纹隐小鲈 <i>Kryptolebias marmoratus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	130
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> _SCD1	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	131
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	123
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	128
新西兰背唇鱼 <i>Notolabrus celidonus</i> _SCD b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	131
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	125
银鲈 <i>Pampus argenteus</i> _SCD1	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	128
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> _SCD1b	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i> _SCD1	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	127
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	129
金鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> _SCD	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	128
相同 Consensus	IPSSAPILTLTWS...VLCFLISALG TAG HRLWSH SYKASIPRLPLFAGNSMAFNDIYEW	128
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1a	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
乌鲳 <i>Channa argus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	209
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	198
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	191
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	201
斑纹隐小鲈 <i>Kryptolebias marmoratus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	202
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> _SCD1	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	194
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	202
新西兰背唇鱼 <i>Notolabrus celidonus</i> _SCD b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	196
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
银鲈 <i>Pampus argenteus</i> _SCD1	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> _SCD1b	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	198
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i> _SCD1	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	200
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
金鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> _SCD	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
相同 Consensus	ARIHRHHIYSETDADPHNVRGFFFAHIGWLVRKHPVITEKGRLELTDLSQVVMFQRKRVLSVLI	199
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1a	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
乌鲳 <i>Channa argus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	279
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	261
斑纹隐小鲈 <i>Kryptolebias marmoratus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	271
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> _SCD1	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	272
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	264
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
新西兰背唇鱼 <i>Notolabrus celidonus</i> _SCD b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	272
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	266
银鲈 <i>Pampus argenteus</i> _SCD1	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> _SCD1b	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i> _SCD1	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	268
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	270
金鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> _SCD	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
相同 Consensus	ICFVTPVTPWYFVGESEIWAYFVGLLRVYTLNATWVNSAAHVGNRPYDGINPREKRVATSAIG	269
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1a	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	334
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> _SCD1b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	334
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	334
黄鳍鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	334
乌鲳 <i>Channa argus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	333
独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	343
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	331
海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	339
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	332
斑纹隐小鲈 <i>Kryptolebias marmoratus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	335
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> _SCD1	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	336
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	338
大口黑鲈 <i>Megalops cyprinoides</i> _SCD b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	333
新西兰背唇鱼 <i>Notolabrus celidonus</i> _SCD b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	336
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	330
银鲈 <i>Pampus argenteus</i> _SCD1	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	333
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> _SCD1b	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	334
翘嘴鲈 <i>Siniperca chuatsi</i> _SCD1	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	332
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	332
金鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> _SCD	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	333
相同 Consensus	EG HNYHHI FPDYATSEFGCKNITTAIDMCFGLAKDRGVSKVILARIQGDGSYRS	333

图 3 不同物种 SCD 氨基酸序列比对

方框表示组氨酸富含区域。

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of SCD in different species
His-rich region is marked with filament box.

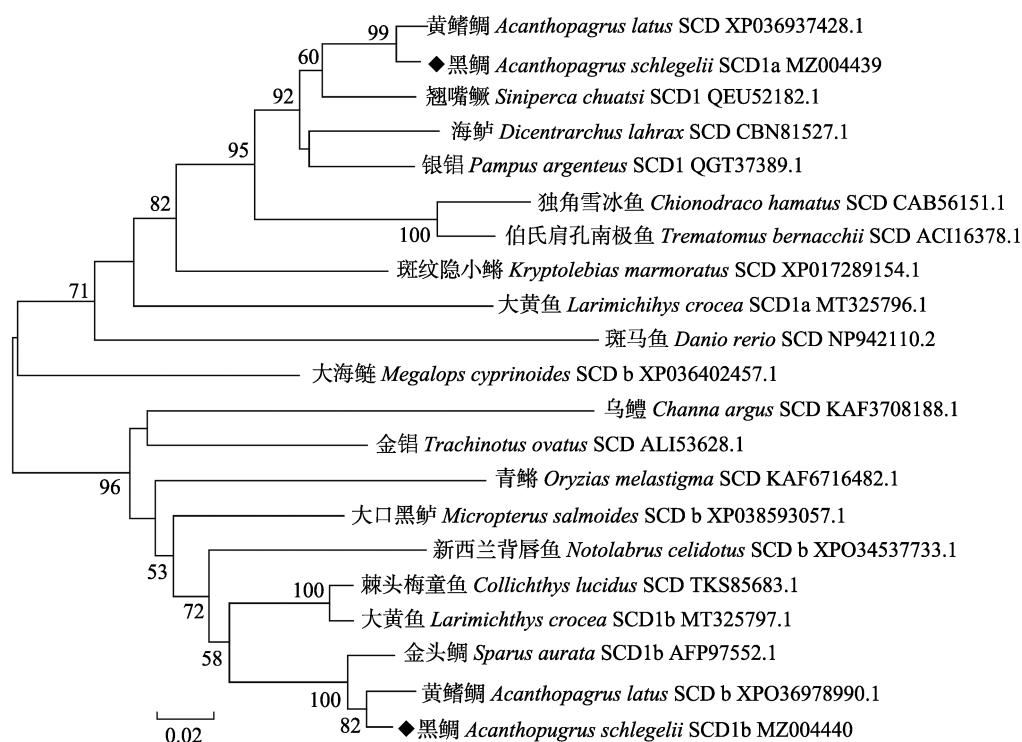
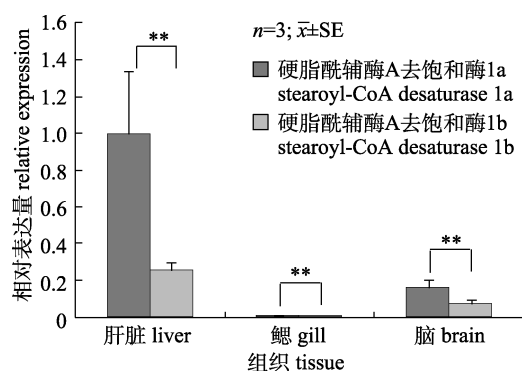
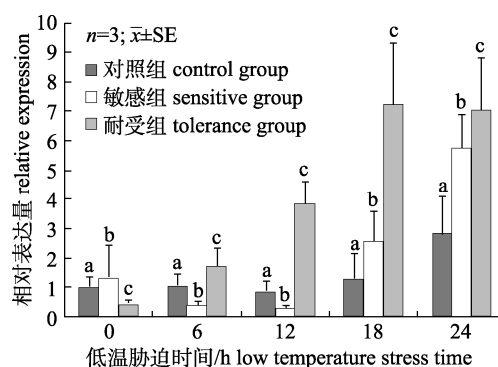


图 4 基于 SCD 氨基酸序列的系统进化树(NJ 法)

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of SCD (Neighbor-Joining method)

图 5 黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 在正常水温中的组织表达**表示 *scd1a* 和 *scd1b* 表达量差异极显著($P<0.01$).Fig. 5 Tissue expression of *scd1a* and *scd1b* genes in *Acanthopagrus schlegelii* under normal growth water temperature
** indicates extremely significant difference between *scd1a* and *scd1b* gene expression level ($P<0.01$).图 6 急性低温胁迫下黑鲷肝脏 *scd1a* 表达情况同一胁迫时间柱形图上不同小写字母表示不同组别间存在显著性差异($P<0.05$).Fig. 6 The expression of *scd1a* in the liver of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters at the same stress time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

胁迫 6 h 开始显著下调($P<0.05$); 而 *scd1* 的两种亚型均在耐受组波动变化, 并均在胁迫 18 h 开始受到抑制, 表达量随之显著下调($P<0.05$).

2.6 *Asscd1a* 和 *Asscd1b* 基因在鳃中的表达变化

在受到急性低温胁迫后, 对照组的 *scd1a* 的表达量在同一水平波动变化, 而敏感组和耐受组在受到一定时间的低温胁迫后开始发生变化, 分

别在胁迫 18 h 和 12 h 开始持续上调($P<0.05$, 图 10)。鳃中 *scd1b* 的表达情况与 *scd1a* 相似, 但以更快的速度发生相应的变化, 敏感组和耐受组分别在胁迫 12 h 和 0 h 已经开始出现上调趋势($P<0.05$, 图 11)。耐受组的 *scd1* 基因对低温的响应比敏感组的反应更迅速。

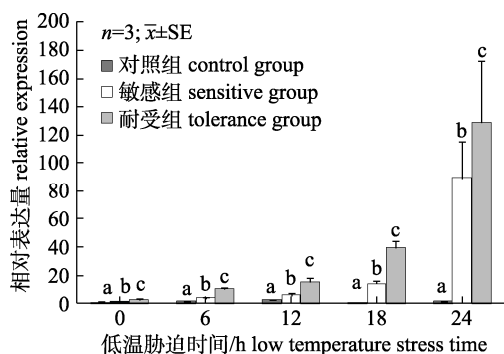


图7 急性胁迫下黑鲷肝脏 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间
存在显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 7 The expression of *scd1b* in the liver of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

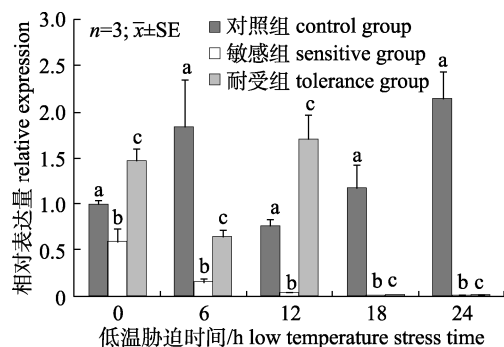


图8 低温胁迫下黑鲷脑中 *scd1a* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间
存在显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 8 The expression of *scd1a* in the brain of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

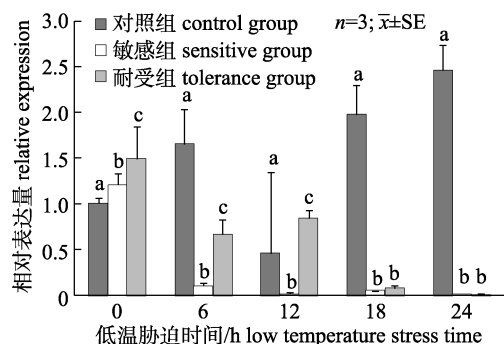


图9 低温胁迫下黑鲷脑中 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间
存在显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 9 The expression of *scd1b* in the brain of *Acanthopagrus schlegelii* under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

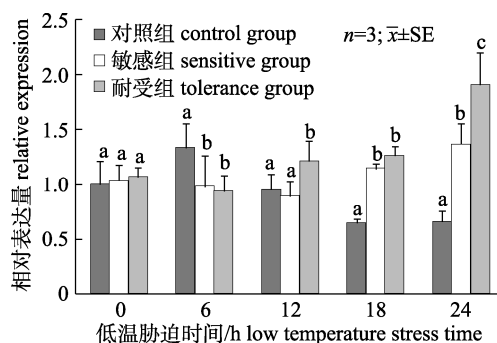


图10 急性低温胁迫下黑鲷鳃中的 *scd1a* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间
存在显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 10 The expression of *scd1a* in the gill of black porgy under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

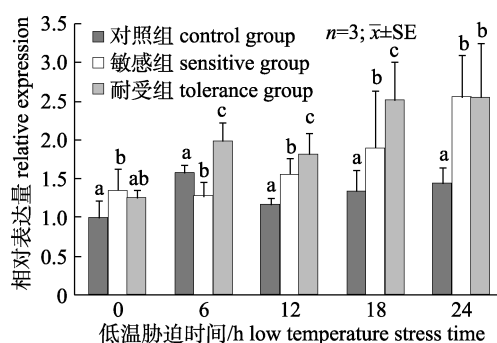


图11 急性低温胁迫下黑鲷鳃的 *scd1b* 表达情况
同一胁迫时间柱形图上不同字母表示不同组间
存在显著性差异 ($P<0.05$).

Fig. 11 The expression of *scd1b* in the gill of black porgy under acute low temperature stress
Different letters on the columns at the same time indicate significant difference among different groups ($P<0.05$).

3 讨论

鱼类作为变温动物, 其生活环境的温度对鱼类的各个方面都有着重大的影响, 低温环境刺激鱼体发生冷应激反应, 机体将通过调节体内的一系列反应协同互动, 从而使体内的反应达到新的平衡^[15]。Lyons等^[4]认为, 鱼体在处于低温环境时细胞膜的膜相首先因冷刺激而发生变化, 低温的刺激使得细胞膜的膜相由液晶相变为凝胶相, 导致细胞膜丧失一定的流动性。细胞膜的流动性与物质运输、能量转换和细胞识别等有着密切的关系, 细胞膜的流动性下降, 将丧失部分功能^[16]。为了维持生理稳态, 鱼类通过增加细胞膜脂肪酸

中的不饱和脂肪酸比例来提高细胞膜的流动性,这对于鱼类适应低温环境有着重要的意义。SCD1 是合成单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)的限速酶,在鱼类适应低温变化过程中起着关键作用^[17]。在 *scd1* 基因的研究中发现, *scd1* 基因的过表达能够增加细胞膜上饱和脂肪酸的比例,从而显著提高了细胞膜的流动性,SCD1 快速调节膜的流动性能够保护细胞抵御低温伤害,这是最重要的低温适应机制^[18]。

多重序列比对结果显示,黑鲷 SCD1a 和 SCD1b 基因与硬骨鱼类的 SCD 氨基酸序列均含有 3 个高度保守的组氨酸元件,8 个组氨酸残基形成的组氨酸盒结构是 SCD 酶的催化中心,这是 SCD 具有活性所必需的部分^[19]。克隆获得的两个 cDNA 序列与硬骨鱼类的 SCD 有着较高的同源性(70%~98%),说明这两个 cDNA 序列属于 *scd* 家族基因。系统进化树分析显示,SCD1a 和 SCD1b 分别与黄鳍鲷的 SCD 和 SCD b 聚为一簇,相似度分别为 98%和 97%,说明黑鲷与黄鳍鲷有着较近亲缘关系,具有共同的进化起源和相似的功能。

大量研究表明, *scd* 基因在不同物种或不同组织中存在多种亚型且具有物种和组织表达特异性,其中 *scd1* 主要在肝脏中表达,在脑组织低表达^[20]。本研究发现,在正常水温中,黑鲷 *scd1* 的两种亚型均主要在肝脏显著表达,在脑中有较低的表达,在鳃中几乎不表达,说明 *scd1* 基因主要在肝脏中发挥功能^[21]。在正常水温中黑鲷肝脏中的 *scd1a* 基因表达量远高于 *scd1b* 基因,提示常温下黑鲷肝脏中的 SCD1 主要以 SCD1a 形式存在,这与李明云等^[10]对大黄鱼 *scd1* 基因研究中得到的结果恰好相反。在正常水温环境下,大黄鱼主要以 SCD1b 形式存在,说明不同种类和不同组织之间 *scd1* 基因的调节方式存在差异。在低温胁迫组中,黑鲷肝脏中的 *scd1a* 基因先受到抑制后上调表达,而对照组的 *scd1a* 基因的表达量随着胁迫时间的延长也随之显著增加,说明黑鲷肝脏 *scd1a* 基因除了受冷应激调控外还可能还存在其他调节方式,这与徐浩^[22]对大黄鱼的饥饿胁迫实验得到的结果相似,说明饥饿可能诱导黑鲷肝脏 *scd1a* 的表达,同时有研究表明当同时受到冷应激和饥饿的双重

调控时,大黄鱼肝脏中的 *scd1* 基因转录呈现先受到抑制后过量表达的现象^[23],这可能也是黑鲷肝脏中 *scd1a* 受到抑制的原因,但需要后续进一步验证。黑鲷肝脏中的 *scd1b* 基因在胁迫组中呈现持续上调的趋势,且上调倍数远高于 *scd1a* (*scd1a*: 7 倍, *scd1b*: 129 倍),这提示黑鲷 *scd1a* 基因和 *scd1b* 基因在低温应答过程中以不同的调节方式协同调控自身的急性低温适应机制并发挥着至关重要的作用,使得黑鲷能在低温环境存活。在低温胁迫实验中黑鲷脑组织中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因表达量受到抑制,但与敏感组相比,耐受组的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在胁迫 0 h 的表达量均显著高于对照组,直到胁迫 12 h 后出现显著的抑制趋势,这暗示黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因在降温 and 低温胁迫过程中的表达趋势可能是先上调后抑制,有研究表明脑组织在低温适应过程中参与 SCD1 的代谢过程且主要受冷刺激调控,因此能够快速响应冷刺激^[23]。在鳃中的 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的表达量虽然翻倍增加,但由于基础表达量极低,所以 *scd1* 基因在鳃丝中低温调节机制中不一定能发挥显著的作用,这一结果在对大黄鱼 *scd1a* 和 *scd1b* 的研究中也有体现^[10]。从低温应答过程中的 *scd1a* 和 *scd1b* 在 3 种组织的表达量变化来看,对低温耐受的黑鲷具有对低温反应更灵敏的特点,上调表达速度更快,表达更不容易受到抑制特点,说明黑鲷 *scd1a* 和 *scd1b* 基因积极响应对低温胁迫的应答过程,并在低温调节机制中有着关键的作用。

4 结论

通过同源克隆和 RACE 技术首次从黑鲷中获得 *scd1a* 和 *scd1b* 基因的 cDNA 序列,通过多重序列比对和系统进化树结果分析发现二者为 *scd1* 基因的不同亚型,并与黄鳍鲷有着较近的亲缘关系。实时荧光定量结果显示,在低温胁迫下 *scd1a* 和 *scd1b* 基因表达主要在肝脏显著上调,但上调幅度和时间有所差异,这提示 *scd1a* 和 *scd1b* 基因参与黑鲷对低温耐受的调控过程并且以不同的调节方式发挥作用,但其适应低温胁迫的作用途径以及与其他耐低温基因的综合调控网络仍有待进一步研究。本研究结果可为探索黑鲷的低温响应

机制以及黑鲷的耐寒品种选育提供参考和数据支撑。

参考文献:

- [1] Nie M M, Tan X G, Lu Y L, et al. Network of microRNA-transcriptional factor-mRNA in cold response of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(2): 583-597.
- [2] Li M Y, Miao L, Chen Y Y, et al. Cloning of *MIPS* gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and the expression analysis under cold treatments[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(2): 292-301. [李明月, 苗亮, 陈莹莹, 等. 大黄鱼 *MIPS* 基因克隆及低温胁迫下的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(2): 292-301.]
- [3] Zhang D K, Gao J C, Wang Y Y, et al. Influences of low temperature stress on antioxidant status and expression of stress-related genes of American shad, *Alosa sapidissima*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2020(2): 144-151. [张德康, 高建操, 王裕玉, 等. 低温胁迫对美洲鲈抗氧化状态及应激相关基因表达的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2020(2): 144-151.]
- [4] Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury[J]. Plant Physiology, 1970, 45(4): 386-389.
- [5] Hsieh S L, Kuo C M. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 141(1): 95-101.
- [6] Zerai D B, Fitzsimmons K M, Collier R J. Transcriptional response of delta-9-desaturase gene to acute and chronic cold stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(5): 800-806.
- [7] Trueman R J, Tiku P E, Caddick M X, et al. Thermal thresholds of lipid restructuring and Δ^9 -desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(3): 641-650.
- [8] Liu H. Molecular clone, identification of stearyl-CoA desaturase 1 (*SCD1*) gene in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and effect of *SCD1* on membrane fluidity under cold stress[D]. Ningbo: Zhejiang Ocean University, 2015. [刘浩. 大黄鱼硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1(*SCD1*)基因的克隆与鉴定及在低温条件下对膜流动性影响[D]. 宁波: 浙江海洋学院, 2015.]
- [9] Polley S D, Tiku P E, Trueman R T, et al. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver delta 9-acyl-CoA desaturase isoforms[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2003, 284(1): R41-R50.
- [10] Li M Y, Miao L, Chen Y Y, et al. Gene cloning of *SCD-1a* and *SCD-1b* in Donghai No. 1 large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and their responses to cold stress[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(10): 1820-1829. [李明月, 苗亮, 陈莹莹, 等. 东海 1 号大黄鱼 *SCD-1a* 和 *SCD-1b* 基因克隆及其对低温胁迫的应答[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(10): 1820-1829.]
- [11] Zhuang P, Wang Y H, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 326-328. [庄平, 王幼槐, 李圣法, 等. 长江口鱼类[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 326-328.]
- [12] Kang C B, Lee S H, Hwang J H, et al. Morphological development of larvae and juveniles of *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Development & Reproduction, 2014, 18(4): 311-319.
- [13] Wang S T, Li P, Chen S Y, et al. Lipid content and fatty acid profile of *Acanthopagrus schlegelii*, *Pagrosomus major* and their hybrids[J]. Food Science, 2016, 37(20): 81-85. [王思婷, 李鹏, 陈淑吟, 等. 黑鲷与真鲷及其杂交子一代脂肪含量测定与脂肪酸成分分析[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 81-85.]
- [14] Chen Z Q, Zhang Z Y, Zhu F, et al. The effects of acute low temperature stress on activities of antioxidant enzymes and heat shock protein content in *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2020, 55(6): 784-792. [陈自强, 张志勇, 祝斐, 等. 急性低温对黑鲷抗氧化酶活性和热休克蛋白含量的影响[J]. 动物学杂志, 2020, 55(6): 784-792.]
- [15] Ning J H, Qin Y B, Hu L C, et al. Effects of abrupt and gradual decreases in water temperature on blood physiological and biochemical parameters in dusky rabbit fish *Siganus fuscescens*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(3): 294-301. [宁军号, 秦宇博, 胡伦超, 等. 水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 294-301.]
- [16] Yan L X, Li H Y, Xia W L. Bioglass could increase cell membrane fluidity with ion products to develop its bioactivity[J]. Cell Proliferation, 2020, 53(11): e12906.
- [17] Harris F M, Best K B, Bell J D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2002, 1565(1): 123-128.
- [18] Xu Y Q, Zheng Y M, Ding Z K. Research progress on the effects, mechanisms, and control of cold stress in aquatic animals[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1149-1159. [许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1149-1159.]
- [19] Wang J, Yu L, Wang H, et al. Identification and characteri-

- zation of hamster stearyl-CoA desaturase isoforms[J]. Lipids, 2008, 43(3): 197-205.
- [20] Hu Y, Xiao L X, Liang B. Stearyl-CoA desaturase in *Caenorhabditis elegans*[J]. Acta Biophysica Sinica, 2015, 31(1): 13-23. [胡英, 肖丽霞, 梁斌. 秀丽线虫硬脂酰辅酶 A 去饱和酶的研究进展[J]. 生物物理学报, 2015, 31(1): 13-23.]
- [21] Ntambi J M. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol[J]. Journal of Lipid Research, 1999, 40(9): 1549-1558.
- [22] Xu H. Preliminary study about effects of starvation on cold tolerance capacity in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2015. [徐浩. 饥饿胁迫对大黄鱼耐低温能力的影响及其机制的初步探讨[D]. 厦门: 集美大学, 2015.]
- [23] Xu H, Zhang D L, Yu D H, et al. Molecular cloning and expression analysis of *scd1* gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea* under cold stress[J]. Gene, 2015, 568(1): 100-108.

Cloning of *Acanthopagrus schlegelii* *scd1a* and *scd1b* genes associated with response to acute low temperature

CHEN Ziqiang^{1,2}, ZHANG Zhiyong¹, ZHANG Zhiwei¹, WEI Mingliang^{1,2}, LIN Zhijie^{1,2}, ZHU Fei¹, JIA Chaofeng^{1,2}, CHEN Shuyin¹, MENG Qian¹

1. Jiangsu Key Laboratory of Genetic and Breeding for Marine Fishes, Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to explore the role of stearyl-CoA desaturase-1 (*scd1*) in the response of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) to low temperature, the full-length cDNAs of *scd1a* and *scd1b* genes in the liver of black porgy were analyzed, and their expression in different tissues under acute low temperature stress was quantified. A temperature of 19.8 °C was used for the control group and 6 °C was used for the stress low temperature groups (cooling, at a rate of 1 °C/h, to 6 °C, which was maintained for 24 h). In the stress group, the individuals that could swim normally comprised the tolerant group and the ones in an unbalanced state comprised the sensitive group. The results showed that the full length of *scd1a* cDNA was 3281 bp (GenBank: No. MZ004439), including a 111-bp long 5' non-coding region, 2162-bp long 3' non-coding region, and 1008-bp long complete open reading frame, which encodes a total of 335 amino acids; the full length of *scd1b* gene cDNA was 1560 bp (GenBank: No. MZ004440), including a 1008-bp long complete open reading frame, encoding a total of 335 amino acids, and a 152-bp long 5'UTR and 400-bp long 3'UTR. The multiple sequence alignment results showed that the SCD amino acid sequences of black porgy and other bony fishes have a high degree of similarity (70%–98%), and both contain 3 highly conserved histidine elements. Phylogenetic tree analysis showed that the black porgy *scd1a* and *scd1b* genes were clustered with the *A. latus scd* and *scd b* genes, respectively, and there was a close evolutionary relationship between the two species. Using real-time quantitative polymerase chain reaction, it was found that at a water temperature of 19.8 °C, *Asscd1a* and *Asscd1b* were mainly expressed in the liver, weakly expressed in the brain, and not expressed in the gills. The expression of *scd1a* in the liver was inhibited in the early stage and significantly up-regulated in the later stages ($P < 0.05$); *scd1b* expression showed a continuous up-regulation trend in the liver, while being up-regulated to higher levels than *scd1a*. This suggests that the regulation of expression of black porgy *scd1a* and *scd1b* genes is coordinated and plays a vital role in the acute low temperature response mechanism through different regulatory methods. The expression of *Asscd1a* and *Asscd1b* in the brain was inhibited, and in the gills, their expression was significantly up-regulated ($P < 0.05$). The two sub-types of *scd1* in the tolerance group showed more rapid changes in the three tissues compared to the sensitive group. The dramatic changes in the expression of *Asscd1a* and *Asscd1b* indicate that they play an important role in the low temperature response of black porgy. The findings of the current study provide reference and supportive data for understanding the low temperature response mechanism and the breeding of cold-tolerant black porgy strains.

Key words: *Acanthopagrus schlegelii*; *scd1*; low temperature stress; gene clone

Corresponding author: ZHANG Zhiwei. E-mail: zhzhwei2005@126.com

DOI: 10.12264/JFSC2021-0198

中华绒螯蟹交配系统的形态功能

宣富君¹, 鲍成满¹, 付龙龙², 张悦¹, 王刚¹, 王坤¹, 张建光³, 唐伯平¹, 管卫兵⁴, 成永旭⁵

1. 盐城师范学院湿地学院, 江苏 盐城 224051;
2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017;
3. 江苏大仁水产良种有限公司, 江苏 盐城 224300;
4. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306;
5. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为深入了解中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的交配过程, 利用急速冷冻、扫描电镜、组织学等技术, 对其交配系统的形态特征进行观察。结果表明, 中华绒螯蟹交配系统具有短尾派蟹类的典型特征, 即第一附肢(G1)比第二附肢(G2)长。G1 整体粗壮光滑, 由连接腹部的原肢和内肢组成。内肢长而挺直, 呈三角柱状, 两侧边缘融合而成一缝合沟, 内含输精管道, 纵贯两端; 基部背面近内侧开口比较大, 外侧上覆盖 1 个带羽状刚毛的肉质瓣膜, 交配时阴茎可伸入(或通过瓣膜)开口的外侧部分; 顶端含一类似火山口的通道, 四周布满刚毛。G2 整体细小, 呈帆状, 顶端内陷, 上附 4 根透明状修长刚毛。G1/G2 内肢管壁厚度不一, 协作部分近输精通道一侧均存在较薄管壁, 具有一定收张能力, 交配时可封闭输精通道; G1 内肢内部大部分中空, G2 可深入部分以上存在含液滴的疏松结缔组织, 且管壁内侧出现连接宫腔的通道, 可以推断此处精液和 G1 宫腔积液可能存在某种形式的交流, 而后半段出现肌肉组织。雌性阴门覆盖一光滑厚实的阴盖, 可随所在胸节连接的关节左右摆动, 由此控制阴门开合。阴道呈半月型, 管壁较厚的一侧契入另一侧, 且契入一侧附有厚实的肌肉束。由此可以推断, 中华绒螯蟹交配时 G1 并没有直接插入雌蟹的生殖道内, 而是与阴门及周边胸板直接契合, 通过与 G1 共同进化出“对接状”的交配系统, 以保障精荚精液成功通过阴道输入纳精囊内储存。本研究阐述了中华绒螯蟹交配系统潜在的内在协作机制, 可以为今后开展中华绒螯蟹遗传育种及人工授精等相关研究提供理论和技术支持。

关键词: 中华绒螯蟹; 交配系统; 生殖肢; 形态功能

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0211-09

自然选择和性选择理论一般认为每个物种独特的交配器官造就了物种间的生殖隔离^[1-2]。以短尾派(*Brachyura*)蟹类为例, 物种间交配系统尽管整体上形态和功能类似, 但均存在显著差异, 比如雄性的腹肢及雌性的生殖道^[3]。

雄蟹交配系统通常由一对阴茎及第一、第二

对腹肢组成。阴茎较短, 一般是雄蟹生殖系统射精管部分外延而成, 而腹肢则特化为生殖肢(gonopod), 行交配功能^[4]。短尾派第一腹肢(first pleopod, G1)通常呈管状, 而第二腹肢(second pleopod, G2)呈棒状。交配时, 第二腹肢和阴茎通常插入第一腹肢的宫腔内^[5]。然而, 不同物种交配

收稿日期: 2021-04-30; **修订日期:** 2021-05-19.

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设专项(JATS[2021]404); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”专项(JBGS[2021]031); 宁夏自治区科技厅重点项目(2020ZDYF0860); 江苏省科技厅省政策引导类计划-苏北科技专项(SZ-YC202041); 江苏省产学研项目(BY2020587)。

作者简介: 宣富君(1981-), 男, 副研究员, 从事甲壳动物生殖生物学研究. E-mail: swimming_crab@126.com

通信作者: 成永旭, 教授, 从事甲壳动物生态养殖研究. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

过程中精英精液的输送过程不尽相同,这主要与其第二腹肢的形态差异有关。精液输送一般有两种模式:当雄蟹 G2 比 G1 短时, G2 可作为活塞将精英精液通过 G1 输送到雌蟹纳精囊内,此时仅 G1 与雌蟹阴户接触^[6];当 G2 长于 G1 时,则由 G2 的尖部直接插入雌蟹的生殖道内^[7]。

雌性生殖道由阴户和阴道组成。阴户一般位于螃蟹第六胸节,某些物种还上覆一厚实富含几丁质的盖子(chitinous opercula)。阴道起源于外胚层,内表面覆有一角质层,每个蜕壳周期均可脱落^[8]。短尾派的阴道分为简单型(simple type)和凹陷型(concave type)。简单型含一个开放的腔,外被一肌肉层;凹陷型腔体较为狭小,横断面呈半月状,腔一侧角质层常陷入另一侧,且内陷一侧一般附有厚实肌肉束以控制整个阴道的收缩^[8]。阴道与纳精囊相通,后者主要用来存储交配过程雌蟹获得的精英精液及作为排卵过程最终精卵交汇的场所^[9]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹、大闸蟹,属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、方蟹科(Grapsidae)、绒螯蟹属,是我国重要的经济蟹类。目前国内外关于中华绒螯蟹生物学方面的研究已有较多报道^[10-11],但至今未对其交配系统进行系统研究。本研究拟利用急速冷冻(flash-frozen)、扫描电镜、组织学等技术,通过对中华绒螯蟹雌雄个体交配过程交配系统(主要是雄性的生殖腹肢和雌性的生殖道)的形态功能研究,阐明其内在协作机制。该工作不仅可以增加人们对中华绒螯蟹繁殖交配过程的认识、丰富蟹类授精生物学知识,而且可为今后开展河蟹遗传育种及人工授精等相关工作提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用蟹由江苏大仁水产良种有限公司射阳县金源育苗场于 2019 年 12 月至 2020 年 4 月提供(雄性体重约 300 g,雌性体重约 200 g)。期间,交配实验及后续工作在江苏省滩涂生物资源与环境保护重点实验室完成。

1.2 实验方法

1.2.1 急速冷冻实验 交配实验于直径 1.2 m,高 0.7 m 的 5 个柱状圆桶内进行,桶底铺有约 10 cm 厚的细沙,水深 0.5 m,水体盐度 25,水温 15~18 ℃。待实验开始后,每个桶内放入一对雌雄亲本,期间每隔 30 min 观察一次,一旦发现其抱对交配(图 1A),迅速放入事先装有液氮(-196 ℃)的泡沫盒内。急速冷冻实验操作规程参考 Mattei 等^[12]。速冻后,待其融化,慢慢掰开雌雄个体,观察交配时雌雄个体交配器官的确切位置,以明确精英精液进入雌性体内的输送途径。

1.2.2 光镜观察 取雌雄螃蟹各 3 只,解剖取其完整的交配器官[雄:第一腹肢(G1)/第二腹肢(G2);雌:生殖道(包括纳精囊)],保存于 95%的乙醇内固定。24 h 后在体视镜(Leica, M205A)下观察交配器官的外部形态,并拍照分析。

1.2.3 扫描电镜观察 为进一步获取交配器官(主要是雄蟹 G1/G2)关键部位的组织结构信息,另取 3 只雄蟹的交配器官进行扫描电镜(Coxem, EM-30AX)观察。步骤简述如下:(1)剔除 G1/G2 多余组织后在 95%乙醇溶液中固定 48 h;(2)将样本置于烘箱 42 ℃恒温干燥 48 h;(3)待组织完全干燥,使用电镜专用导电胶将组织固定于圆形台座上并对样品进行喷金处理;(4)在连接电镜的可视屏幕中寻找所需要观察的部位,调节焦距倍率后进行观察拍照分析。

1.2.4 组织学观察 为进一步了解交配器官内部组织结构及 G1/G2 的协作情况,取 4 对雄蟹腹肢和雌蟹生殖道,放入含 10%中性甲醛的酸性脱钙液(百奥莱博, KFS015)中固定脱钙,处理时间为 48 h。待组织完全脱钙后,分别经系列乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡及组织包埋后,进行常规石蜡切片(厚度 7 μm, Leica, RM2235);随后进行 Mallory PTAH 染色(如吉生物科技, SJH0278)并在显微镜(Leica, DM2000)下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 雌雄抱对交配

急速冷冻后,瞬间固定了雌雄个体的交配姿态(图 1A):雄性上位,雌性打开腹腔允许雄性介

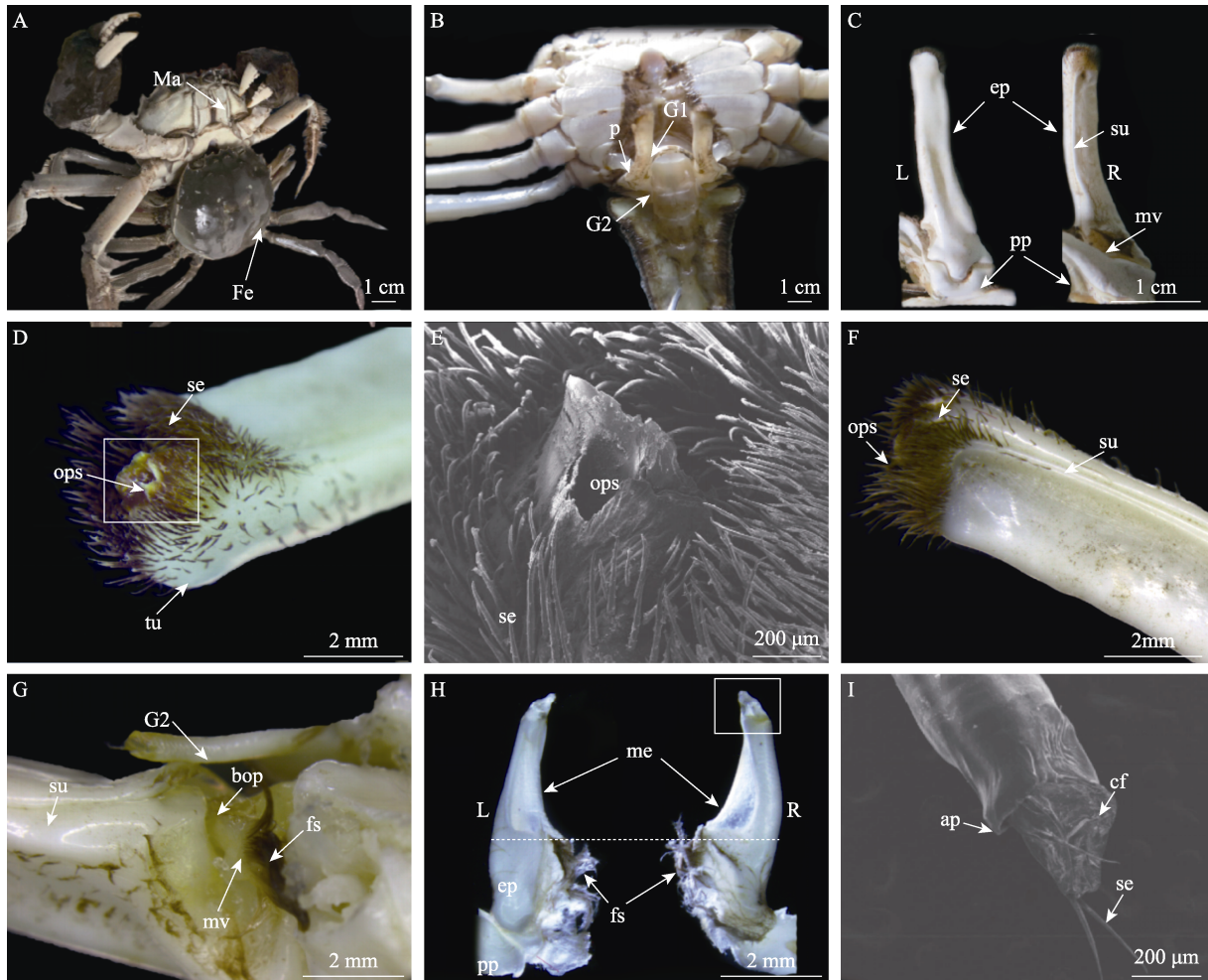


图 1 中华绒螯蟹雄性交配系统

A. 雌雄个体的交配姿势; B. 雄性交配系统的组成; C. 第一附肢(G1)外部结构(L: 腹面; R: 背面); D. G1 的顶端结构, 白框示输精管道; E. 扫描电镜下 G1 顶端输精管道的开口; F. G1 上部结构(侧面观), 示 G1 光滑的管壁和缝合沟; G. G1 基部开口处, 示第二附肢(G2)和阴茎的入口及肉状瓣膜; H. G2 外部结构(L: 腹面; R: 背面), 水平虚线指 G2 插入 G1 部分, 白框指 G2 端部; I. 扫描电镜下 G2 顶端结构, 示围带, 褶皱表皮及 4 根刚毛。ap: 围带; bop: G1 的基部开口; cf: 褶皱表皮; ep: 内肢; Fe: 雌蟹; fs: 羽状刚毛; G1: 第一腹肢; G2: 第二腹肢; Ma: 雄蟹; me: 薄膜; mv: 肉状瓣膜; ops: 精液通道开口; p: 阴茎; pp: 原肢; se: 刚毛; su: 缝合沟; tu: 瘤状突起。

Fig. 1 Overview on the male copulatory system of *Eriocheir sinensis*

A. The mating position of the male and female individuals; B. Overview on the male copulatory system; C. Morphological structure of G1 (L: ventral view; R: dorsal view); D. Top structure of G1. The white box indicates seminal canal; E. The opening of seminal canal, enlarged by SEM; F. The upper part of G1 (lateral view), showing smooth tube wall and suture groove; G. The basal opening in G1, showing the opening for G2 and penis, and meat-like valve; H. Morphological structure of G2 (L: ventral view; R: dorsal view). The dashed line indicates the position where G2 inserts G1. The white box indicates top structure of G2; I. The top structure of G2 enlarged by SEM, showing apical girdle, cuticle foldings and four setae. ap: apical girdle; bop: basal opening in G1; cf: cuticle foldings; ep: epipodite; Fe: female; fs: feathery setae; G1: first gonopod; G2: second gonopod; Ma: male; me: membrane; mv: meat-like valve; ops: opening of seminal canal; p: penis; pp: protopodite; se: setae; su: suture; tu: tubercle.

入。雄性交配器官整体隐藏在其腹部下面, 腹肢只保留 G1/G2, 后续 4 对完全退化; G1/G2 作为交接器, 组成了雄性交配系统的主要器官(图 1B)。雌性生殖道由阴门和阴道组成(图 3A-C)。进一步

观察发现: 交配时雄蟹 G1 并没有直接插入雌蟹的生殖道内, 而是与阴门及周边胸板直接契合, 形成一套“对接状”的交配系统, 以保障精英精液通过阴道输入纳精囊内储存。

2.2 雄性交配系统

2.2.1 G1 和 G2 外部形态 第一腹肢(G1)整体粗壮光滑, 由连接腹部的原肢和内肢组成(图 1C)。原肢较短, 由基节和底节融合而成, 作为基座与内肢绞合衔接。内肢长而挺直, 呈三角柱状, 略微向背腹轴线内侧倾斜。三角柱一面近乎与腹腔中线纵截面平行; 柱状背面近内侧部分留有与内肢两侧边缘高度融合而成的一道缝合沟, 纵贯内肢两端; 腹面两侧稍有内陷且内陷程度由基部向顶端弱化(图 1C, 1F)。内肢基部背面近内侧开口比较大, 仍可分为内外两部分: 靠外部分上覆盖一带羽状刚毛的肉质瓣膜, 交配时, 雄蟹突出在腹甲第 8 胸节上的膜质阴茎(或通过瓣膜)可以伸入这一开口的外侧部分; 靠内部分由 G2 插入(图 1G)。内肢顶端从上往下整体呈半球形, 腹面内侧与平行面汇合处形成一个明显的瘤状隆起(图 1D), 端口自此整体略向腹面一侧倾斜降低; 中间含一输送精荚精液的通道, 向外突出, 类似火山口, 环壁及内侧布满浓密的刚毛。内肢刚毛主要集中在端部, 少许沿缝合沟两侧分布; 刚毛修长, 顶端尖锐, 基部圆柱状切入, 呈咖啡色, 自隆起处向四周长度逐渐增加(图 1D, 1E)。

第二腹肢(G2)细小, 长度不及 G1 的 1/5, 亦由连接腹部的原肢和内肢组成。内肢整体光滑, 呈扁平指状, 由基部向顶端收窄(图 1H)。根据插入 G1 的折痕, 可以推断交配时 G2 内肢 1/2 多可以有效插入 G1, 据此 G2 可分为上下两个部分: 下部较宽, 背腹面内侧处分布多簇羽状刚毛; 上部整体呈帆状, 由腹面圆柱状内肢距端部不远处背面内陷向内侧拉伸形成透明状薄片。G2 顶端部分内陷, 呈水槽状, 表皮充满褶皱; 整体由腹面内侧向外侧倾斜, 围带一侧较高, 上附 4 根透明状修长刚毛(图 1I)。

2.2.2 G1 和 G2 内部协作 结合组织学观察发现, G1 内肢近缝合沟一侧处有一条贯穿两端的输精通道(图 2); 三角柱状内肢其骨骼分布厚度并不一致, 除近缝合沟一侧外, 另外两侧骨骼相对较厚(图 2)。G2 完全插入 G1 的长度仅占 G1 内肢的 1/10 左右, 但 G2 插入深处其端部可完全封闭 G1 输精管道的内腔(图 2D), 而在其插入基部, G1 输精管

道内腔空间相对较大, 除 G2 外, 仍留有精液经肉状瓣膜输入或阴茎插入的空间(图 2E, 图 2F)。

连续切片进一步发现, G1 内肢大部分中空, 前半部分仅分布有疏松的结缔组织并含有明显的分泌液滴(图 2A-C), 而后半部出现肌肉组织(图 2D-E, D')。此外, 在 G2 可插入部分以上, G1 管壁近输精管道部分出现可连接内外的通道(图 2B'), 可以推断此处输送精液和 G1 管腔内部积液可能存在某种形式的交流; 在 G2 插入与 G1 结合处, G1/G2 在输精管道处均存在可以伸缩的薄表皮(图 2E'), 这可能有利于 G1 在其管腔内部肌肉的收缩下自由调控雄性需要输送精液的量。G2 插入部分整体封闭, 内部含疏松结缔组织(图 2E')。

2.2.3 雌蟹交配系统 阴门开口于第六胸节近中线 1/5 处(图 3A), 腹甲沿阴道口环形突起后内陷, 中间配一个显著高于胸板的骨质化突出, 又称阴盖(operculum, 图 3B)。阴盖光滑厚实, 从腹面观呈三角形, 略向内侧倾斜弯曲, 成熟个体的阴盖与所在胸节连接的关节可以左右摆动, 可控制阴门开合(图 3C)。

阴道呈半月型, 表皮厚度不一, 厚实的一侧契入另一侧, 且契入一侧附有厚实的肌肉束(图 3D~F)。通常情况下阴道内部管腔呈压缩状, 并不完全开放; 交配后, 内部仍含有部分精液。

3 讨论

中华绒螯蟹的交配系统由雄性的 G1/G2 和雌性的生殖道组成。交配时, 雄蟹上位, 雌蟹打开腹腔, G1/G2 便整体隐藏在其腹部; 雄蟹的 G1 并没有直接插入雌蟹生殖道内, 而是与阴门及周边胸板直接契合, 形成一套“对接状”的交配系统, 以保障精荚精液通过阴道输入纳精囊内储存。期间, 雄蟹阴茎可能通过 G1/G2 组成的类似活塞式系统源源不断把精荚精液输送给雌蟹, 进而完成整个授精过程。目前, 这种独特“对接状”交配系统仅在蜘蛛蟹^[9]中报道过。

短尾派蟹类雄性交配系统有两大进化趋势: (1) G1 内肢两侧边缘融合度越来越高; (2) G2 越来越短小^[13]。中华绒螯蟹雄性交配系统具备典型的短尾派蟹类的特征, 属于 G1 长型, G2 长度不及

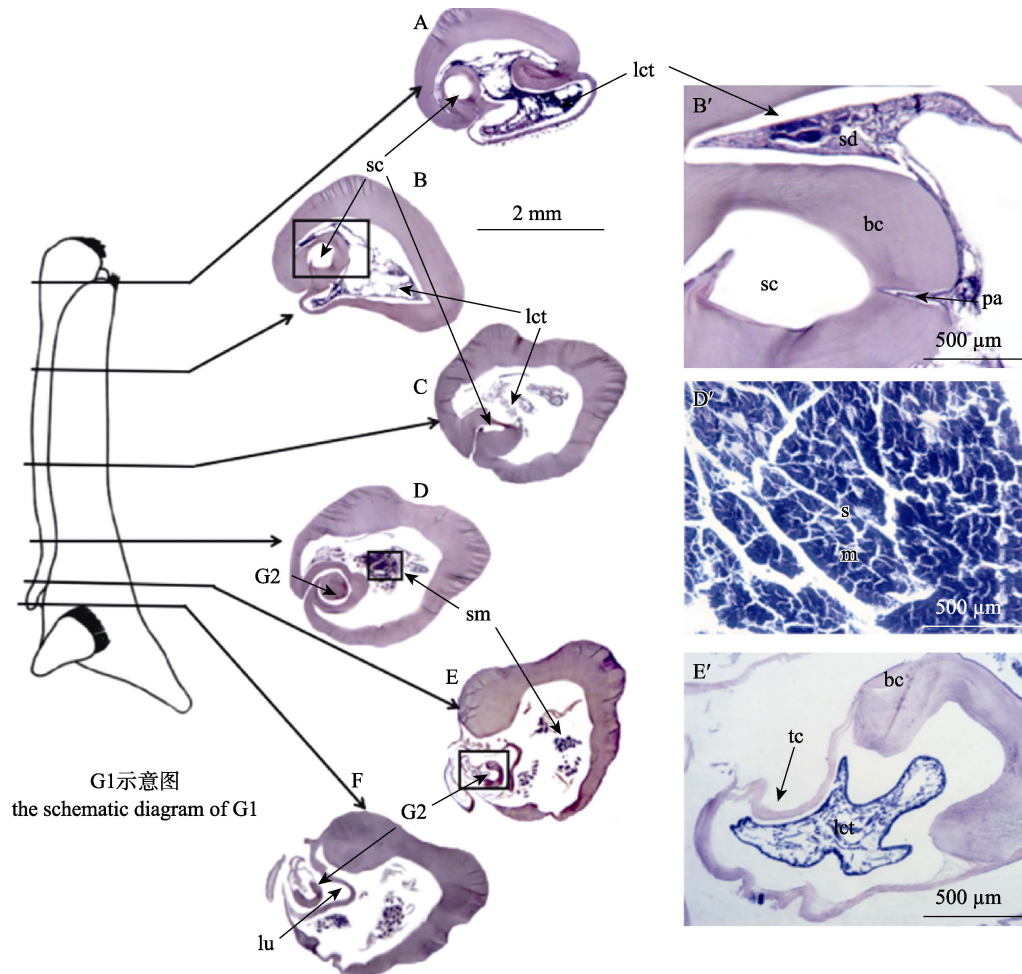


图2 中华绒螯蟹雄性交配系统 G1/G2 的组织学观察

A-F 示雄性腹肢不同部位的组织学结构; A. G1 的顶端部分, 示输精管道、G1 内分布的疏松结缔组织及大量分泌液滴; B. G1 中上部分, 示输精管道; 黑框部分示 G1 内壁通道及带有分泌液滴的疏松结缔组织(B'); C. G1 中间部分, 结构组成跟 B 一致; D. G1 中下部分, G2 出现; 黑框部分示 G1 内部出现大量肌肉组织(D'); E. 接近 G1 基部开口处, 示输精管道内 G2 及剩余空间; 黑框示 G2 结构(E'), 管壁厚薄不一, 内含疏松结缔组织; F. G1 基部开口处, 示输精管道内 G2 及剩余空间; bc: 厚表皮; lct: 疏松结缔组织; lu: 内腔; pa: 通道; sc: 输精管道; sd: 分泌液滴; sm: 条纹肌; tc: 薄表皮。

Fig. 2 Histological observation on male mating system G1/G2 of *Eriocheir sinensis*

A-F show histological cross sections at different regions of the gonopods. A. The top part of G1, showing seminal canal, loose connective tissue and lots of secretory droplets in G1; B. Upper part of G1, showing seminal canal. The black frame indicates one passage connecting the seminal canal on the inner side of the tube wall and loose connective tissue with secretory droplets in G1 (B'); C. Middle part of G1, its structure composition is similar to B; D. Lower part of G1, showing G2 appears in seminal canal of G1. The black frame indicates lots of striated muscle in G1 (D'); E. Close to G1 base opening, showing G2 and the spare space except for G2 in seminal canal. The black frame indicates the structure of G2 (E'), showing the thickness of the tube wall and loose connective tissue. F. Base opening of G1, showing G2 and the spare space except for G2 in seminal canal. bc: bold cuticle; lct: loose connective tissue; lu: lumen; pa: passage; sc: seminal canal; sd: secretion droplet; sm: striated muscle; tc: thin cuticle.

G1 的 1/5。G1 内肢两侧边缘完全融合, 形成封闭式输精管道, 这与目前报道的雪蟹(*Chionoecetes opilio*)^[5]、欧洲豆蟹(*Pinnotheres pisum*, *Pinnotheres pectunculi* 和 *Nepinnotheres pinnotheres*)^[14] 及蜘蛛蟹(*Libinia spinosa*)^[9] 的交配系统较为一致, 但也有其独特的形态功能特征。

中华绒螯蟹 G1 整体粗壮, 呈三角柱状, 内肢顶端成环状内陷, 中间突出, 含一类似火山口的输精管道出口, 四周布满浓密刚毛。与其他已报道的短尾派蟹类相比, 中华绒螯蟹 G1 相对光滑, 除基部还分布有少许微绒毛外, 并没有出现其他类型的刚毛, 而端部集中出现的刚毛, 整体修长,

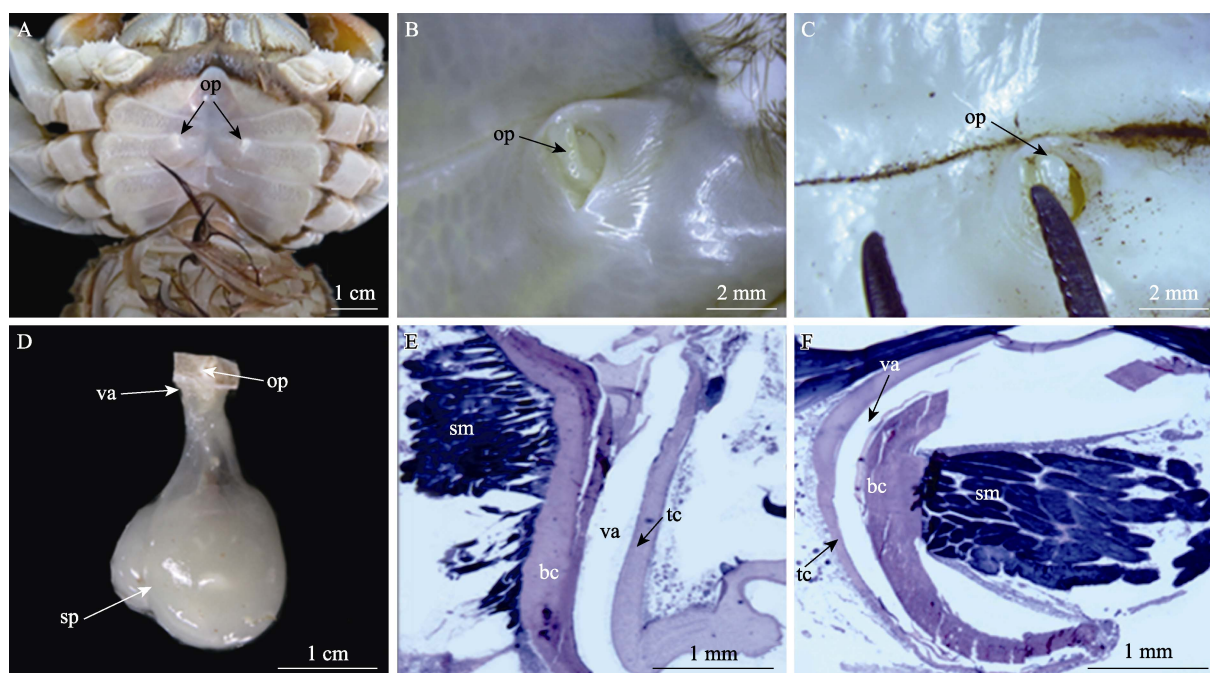


图 3 中华绒螯蟹的雌性生殖道

A. 雌性生殖道的位置; B. 阴门处的阴盖; C. 阴道开口(*), 示阴盖和所在胸节的一道裂缝; D. 完整的雌性生殖道, 示阴盖、阴道和纳精囊; E. 雌性生殖道纵切, 示阴道结构; F. 雌性生殖道横切, 示半月形阴道。

bc: 厚表皮; op: 阴盖; sm: 条纹肌; sp: 纳精囊; tc: 薄表皮; va: 阴道。

Fig. 3 Overview on the genital tract of female *Eriocheir sinensis*

A. Position of female genital tract; B. The operculum of vulva; C. Vaginal opening, black asterisk indicates one suture between operculum and thoracic sternite; D. Complete female genital tract, showing operculum, vagina and spermatheca; E. Longitudinal section of female genital tract, showing vaginal structure; F. Transverse section of female genital tract, showing crescent-shaped vagina.

bc: bold cuticle; op: operculum; sm: striated muscle; sp: spermatheca; tc: thin cuticle; va: vagina.

顶端尖锐, 基部圆柱状切入, 类似于蜘蛛蟹 (*Libinia spinosa*^[9]与 *Inachus phalangium*^[15]) G1 顶端出现的 I 型简单圆锥或金字塔形刚毛, 这类刚毛被认为有助于精英精液在输送过程中精英的机械裂解^[16], 但这种机制在中华绒螯蟹交配过程似乎是不大可能的, 后者其精英裂解已被证实主要由雄性生殖系统副性腺分泌的精液消化完成^[17]。这些刚毛仅分布于 G1 输精管道的开口四周, 由此认为, 中华绒螯蟹有可能在交配过程中利用这些密集分布的刚毛阻止周围水域杂质的渗入或直接指导 G1 与雌性阴门精准对接, 毕竟根据 G1 尺寸推断其在交配过程不可能插入雌蟹阴道内部 (本研究急速冷冻实验亦证实)。G1 基部除了存在阴茎和 G2 的入口外, 还外带 1 片带羽状刚毛的肉状瓣膜。交配时, 雄蟹阴茎可能未必直接插入 G1 (阴茎实际距离 G1 基部开口尚有一段距离) 进行精英精液的输送, 而是通过肉状瓣膜与其上附的

羽状刚毛形成的内在管道间接输入 G1 内部; 当然阴茎也有可能通过伸缩直接插入 G1, 而此时肉状瓣膜等结构可能起到保护阴茎免受外界物理损伤的作用。此外, G1 管腔内的疏松结缔组织中存在一定量的分泌液滴, 而并未出现诸如雪蟹^[18]、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)^[19]、及三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[20]等经济蟹类中报道的玫瑰腺体, 后者已被证实与该物种交配后纳精囊中精子塞的形成有关, 但中华绒螯蟹的这些分泌物在整个交配过程中的功能作用, 目前尚不清楚, 而且其通过 G1 管壁通道与交配过程输送的精液可能存在的交流机制亦没有相关报道, 需进一步研究。

G2 内肢呈扁平指状, 上部呈帆状, 顶端部分内陷, 水槽状, 内表皮充满褶皱, 这种结构与已经报道的雪蟹^[5]和蜘蛛蟹^[9]类似。Hartnoll^[13]和 Beninger 等^[5]建议这种结构可能有利于精英精液

在 G1 输精管道内运输, 其可以通过自身的收涨能力封闭管道进而形成一定的水压, 这种假说可能与组织学观察到的 G1/G1 管壁厚薄不一、均存在可以自由伸缩的一侧的结构相一致, 而 G2 顶端上附的 4 根刚毛可能有感受管腔内在水压的功能, 进而整体协调 G1/G2 将阴茎输送过来的精荚精液成功注入雌蟹生殖道。

短尾派蟹类雌性生殖道的阴门存在 3 种封闭形式: (1) 由肌肉收缩控制的一层薄膜; (2) 一层软膜; (3) 一个脱钙的阴盖^[8,21-22]。中华绒螯蟹阴门存在一个厚实的阴盖。一般该类型的蟹类, 交配前应该存在一个脱钙的过程, 比如招潮蟹(*Uca pugnax*)的雌蟹进入雄蟹已挖好的洞后开始脱钙^[23], 但脱钙通常发生在抱对前后, 此时卵巢已经成熟^[24]。这可能与中华绒螯蟹阴盖的脱钙机制较为一致, 前期观察发现, 每当 11 月中下旬, 雌蟹卵巢发育普遍接近成熟(卵巢Ⅳ期), 阴盖与其腹甲连接处的关节此时便可以自由移动, 而这对于刚完成生殖蜕壳(8—9 月, 卵巢Ⅱ~Ⅲ期)^[25]、卵巢尚未完全发育的个体是不可能的, 因其阴盖不能移动(作者亲自观察)。此外, 中华绒螯蟹的阴道属于凹陷型, 呈半月状, 一侧厚的几丁质表皮切入另一侧(连接阴盖), 切入一侧附有厚实的肌肉束, 这与目前已报道的该类型短尾派蟹类一致^[8], 可以控制阴道收缩。

参考文献:

- [1] Eberhard W G. Sexual Selection and Animal Genitalia[M]. Cambridge: Harvard University Press, 1985.
- [2] Masly J P. 170 years of “lock-and-key”: Genital morphology and reproductive isolation[J]. International Journal of Evolutionary Biology, 2012, 2012: Article ID 247352.
- [3] Ewers-Saucedo C, Hayer S, Brandis D. Functional morphology of the copulatory system of box crabs with long second gonopods (Calappidae, Eubrachyura, Decapoda, Crustacea)[J]. Journal of Morphology, 2015, 276(1): 77-89.
- [4] Smalley A E. A terminology for the gonopods of the American river crabs[J]. Systematic Biology, 1964, 13(1-4): 28-31.
- [5] Beninger P G, Elnor R W, Poussart Y. Gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius)[J]. Journal of Crustacean Biology, 1991, 11(2): 217-228.
- [6] Hartnoll R G. Mating in the Brachyura[J]. Crustaceana, 1969, 16(2): 161-181.
- [7] Brandis D, Storch V, Türkay M. Morphology and function of the copulatory system in freshwater crabs of the genus *Potamon*[J]. Journal of Morphology, 1999, 239(2): 157-166.
- [8] Hartnoll R G. Morphology of the genital ducts in female crabs[J]. Journal of the Linnean Society of London, Zoology, 1968, 47(312): 279-300.
- [9] McLay C L, López Greco L S. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last?[J]. Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology, 2011, 250(4): 378-406.
- [10] Wang W, Wang C H, Ma X Z. Ecological Culture for *Eriocheir sinensis*[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 20-58. [王武, 王成辉, 马旭洲. 河蟹生态养殖[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2013: 20-58.]
- [11] Chen L Q, Du N S. Biology of *Eriocheir sinensis*[M]. Beijing: Science Press, 2017. [陈立侨, 堵南山. 中华绒螯蟹生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2017.]
- [12] Mattei A L, Riccio M L, Avila F W, et al. Integrated 3D view of postmating responses by the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract, obtained by micro-computed tomography scanning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(27): 8475-8480.
- [13] Hartnoll R G. Copulatory structure and function in the Dromiacea, and their bearing on the evolution of Brachyura[J]. Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Napoli, 1975, 39(supplement): 657-676.
- [14] Becker C, Türkay M, Brandis D. The male copulatory system of European pea crabs (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae)[J]. Journal of Morphology, 2012, 273(11): 1306-1318.
- [15] Sal Moyano M P, Gavio M A, Cuartas E I. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2011, 91(8): 1617-1625.
- [16] Rorandelli R, Paoli F, Cannicci S, et al. Characteristics and fate of the spermatozoa of *Inachus phalangium* (Decapoda, Majidae): Description of novel sperm structures and evidence for an additional mechanism of sperm competition in Brachyura[J]. Journal of Morphology, 2008, 269(3): 259-271.
- [17] Wang J, Fang D A, Wang Y, et al. Cathepsin A protein from the accessory sex gland of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) plays a key role in spermatophore digestion[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(9): 953-960.

- [18] Urbani N, Sainte-Marie B, Sévigny J M, et al. Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae)[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1998, 55(5): 1104-1113.
- [19] Wolcott D L, Hopkins C W B, Wolcott T G. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: Effects of male mating history, male size, and season[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 319(1-2): 43-55.
- [20] Xuan F J, Guan W B, Dai X J, et al. Structure and content of spermathecae of *Portunus trituberculatus* from East China Sea[J]. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(2): 1-11. [宣富君, 管卫兵, 戴小杰, 等. 东海三疣梭子蟹纳精囊形态结构与内含物的变化[J]. 动物学杂志, 2009, 44(2): 1-11.]
- [21] Hartnoll R G. Reproductive investment in Brachyura[J]. Hydrobiologia, 2006, 557(1): 31-40.
- [22] Thompson G A, McLay C L. Mating behaviour of *Heterozius rotundifrons* (Crustacea: Brachyura: Belliidae): Is it a hard or soft shell mater?[J]. Marine & Freshwater Research, 2005, 56(8): 1107-1116.
- [23] Greenspan B N. Semi-monthly reproductive cycles in male and female fiddler crabs, *Uca pugnax*[J]. Animal Behaviour, 1982, 30(4): 1084-1092.
- [24] Henmi Y, Murai M. Decalcification of vulvar operculum and mating in the ocypodid crab *Ilyoplax pusilla*[J]. Journal of Zoology, 1999, 247(1): 133-137.
- [25] Ge Y C, Wu X G. Ovarian development of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* after genital molting[J]. Fisheries Science, 2020, 39(5): 766-770. [葛永春, 吴旭干. 中华绒螯蟹生殖蜕壳后卵巢发育规律的研究[J]. 水产科学, 2020, 39(5): 766-770.]

Functional morphology of the copulatory system of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XUAN Fujun¹, BAO Chengman¹, FU Longlong², ZHANG Yue¹, WANG Gang¹, WANG Kun¹, ZHANG Jianguang³, TANG Boping¹, GUAN Weibing⁴, CHENG Yongxu⁵

1. Wetland College, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China;
2. Jiangsu Freshwater Fisheries Research Institute, Jiangsu, Naijing 210017, China;
3. Jiangsu Da-ren Aquatic Products Co., Ltd., Yancheng 224300, China;
4. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
5. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To enhance our understanding of the mating process of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, the morphological functions of the copulatory system were observed and studied using flash-frozen samples, scanning electron microscopy, and histology. The copulatory system had the typical characteristics of Brachyura and belonged to the G1 long type. The male G1 was generally thick and smooth, in the form of a triangular column, with a suture groove formed by the overlap of the lateral margins of the endopodite, which contained a seminal canal and ran through the two ends. The base had one relatively large opening oriented towards the inner side of the dorsal surface, and the outer side was covered with a meat-like valve with feathery setae. During mating, the penis can extend into the outer part of the opening (or through a valve), and the inner part is inserted by G2. The distal end contained the other seminal opening, similar to a volcano mouth with bristle-like setae all around. G2 was small and sail-like, with the tip invaginated and four long transparent setae attached. The walls of both G1/G2 endopodites were different in thickness, and the seminal lumen of G1 corresponding to the G2 insertion part was thin. Therefore, the wall had a certain swelling capacity, and the lumen could be completely closed with the G1/G2 interaction during mating. Most of the G1 endopodite was hollow, and there were loose connective tissues with droplets above the insertable part of G2; correspondingly, many passages connected the lumen on the inner side of the tube wall. It could be inferred that there could be some form of communication between semen and G1 itself. Muscle tissue appeared in the latter half. The vulva was covered with a smooth and thick operculum, and the joint between the operculum and the thoracic segment of the mature individual could be easily shifted left and right to control the opening and closing of the vulva. The vagina was crescent-shaped in cross-section. One side of the chitinous wall was invaginated into the other, and thick muscles were attached to the invaginated wall. Finally, it can be concluded that G1 does not directly insert into the female reproductive tract but directly matches with the operculum and the surrounding thoracic segment. Through the co-evolution of G1 and G2, a “docking” mating system has developed to ensure that the sperm and other male materials are successfully transported into the spermathecae through the vagina for storage. This study described the potential internal cooperation mechanism of the copulatory system of *E. sinensis*, enriching the biological knowledge regarding crab insemination and providing theoretical and technical support for its genetic breeding and artificial insemination in the future.

Key words: *Eriocheir sinensis*; copulatory system; gonopod; functional morphology

Corresponding author: CHENG Yongxu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0168

棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与棕点石斑鱼低氧耐受能力初步研究

段鹏飞^{1,3}, 田永胜^{1,2}, 李振通^{1,3}, 李子奇^{1,3}, 陈帅^{1,3}, 黎琳琳^{1,4}, 王心怡^{1,3},
王林娜^{1,2}, 刘阳^{1,2}, 李文升⁵, 王晓梅⁵, 李波⁵

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
4. 中国农业科学院, 北京 100081;
5. 莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261400

摘要: 为了研究棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*, ♀)与蓝身大斑石斑鱼(*E. tukula*, ♂)杂交后代(简称金虎石斑鱼)和棕点石斑鱼的低氧耐受能力, 采用封闭式呼吸室测定棕点石斑鱼和金虎石斑鱼幼鱼的耗氧率与窒息点, 在正常溶氧[(5.71±0.31) mg/L]和溶解氧下降至 4.0 mg/L、3.0 mg/L、2.0 mg/L、1.0 mg/L、0.4 mg/L 处 1 h 后以及恢复正常溶氧水平 3 h 后, 采取棕点石斑鱼和金虎石斑鱼幼鱼的肝脏组织, 测定其部分抗氧化酶活性与能量利用的相关指标。研究结果显示, 在水温(31.18±0.38) °C 时金虎石斑鱼幼鱼的耗氧率为 0.16 mg/(g·h), 显著高于其母本棕点石斑鱼幼鱼($P<0.05$); 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼幼鱼的窒息点分别为 0.22 mg/L、0.24 mg/L, 二者差异不显著($P>0.05$); 溶解氧浓度下降和复氧的全过程中, 棕点石斑鱼幼鱼肝脏中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性和乳酸(lactic acid, LD)含量以及金虎石斑鱼幼鱼肝脏中 SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、GSH-Px、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、LDH 酶活性变化显著($P<0.05$), 但棕点石斑鱼肝脏中 T-AOC 和 CAT 活性和金虎石斑鱼肝脏 LD 含量变化不显著($P>0.05$); 复氧 3 h 后, 棕点石斑鱼肝脏中的 SOD 活性升高 16.7%, GSH-Px 活性升高 42.5%, LD 含量升高 2.8%, 均显著高于常氧对照组水平($P<0.05$), 而金虎石斑鱼除 GSH-Px 活性没有恢复至对照水平外($P<0.05$), 其余指标均与对照组无显著差异($P>0.05$); 在溶解氧变动的过程中, 金虎石斑鱼肝脏 SOD、GSH-Px、CAT 以及 T-AOC 活性激活程度分别达到 29.1%、17.9%、42.4%、76.0%, 均高于棕点石斑鱼肝脏中相应抗氧化酶活性激活程度的最大值。研究表明, 金虎石斑鱼相对于棕点石斑鱼耗氧率略高, 且其低氧耐受能力较好, 可以进行大规模高密度养殖; 在受到缺氧胁迫后, 金虎石斑鱼较棕点石斑鱼能够更高效地激活抗氧化防御系统, 且金虎石斑鱼在受到低氧胁迫后比棕点石斑鱼有更好的恢复能力。

关键词: 棕点石斑鱼; 蓝身大斑石斑鱼; 杂交; 耗氧率; 窒息点; 低氧耐受能力

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0220-14

石斑鱼是鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、石斑鱼科(Epinephelidae)鱼类的统称, 其广泛分布于太平洋、大西洋和印度洋的热带与亚热带海域, 是一种肉质鲜美、营养丰富、脂肪含量

收稿日期: 2021-04-27; **修订日期:** 2021-07-14.

基金项目: 山东省泰山产业领军人才工程项目(LJNY202109); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-47); 山东省农业良种工程项目(2019LZGC020); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020XT06, 2020TD19, 2020TD25); 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(20603022019002).

作者简介: 段鹏飞(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产种质资源与苗种工程. E-mail: duanpf_gs@163.com

通信作者: 田永胜, 研究员, 博士, 研究方向为鱼类种质冷冻保存及遗传育种. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

少,同时具有重要商业价值的鱼类^[1]。据2020年中国渔业统计年鉴相关数据显示,2019年海水石斑鱼养殖产量达到183127 t,相比2018年增长14.76%,现已发展成为我国南北方养殖的一种优质名贵鱼类^[2]。棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)俗称老虎斑,体呈淡黄褐色,其生长速度慢,生长周期较长,但是由于在其繁殖季节容易获得大量优质卵,并且抗病能力强,可以作为母本与其他石斑鱼雄鱼杂交以获得优良养殖品种,如珍珠龙胆石斑鱼(*E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)已大量养殖^[3];蓝身大斑石斑鱼(*E. tukula*)俗名金钱斑,体表淡灰褐色,全身遍布较大的陈褐色斑点,是石斑鱼中的大型种类之一,具有肉味鲜美、生长速度快的特点,使其成为一种重要的海水经济鱼类^[4]。

棕点石斑鱼与蓝身大斑石斑鱼是我国南方沿海地区的重要养殖鱼类,但两者在繁殖习性、生长水温、地理分布等方面均存在一定程度的生殖隔离,给大规模人工杂交培育增加了技术难度。田永胜等^[5]在国内外首次利用超低温冷冻保存的方法建立了蓝身大斑石斑鱼的精子冷冻库,并利用其冷冻精子与棕点石斑鱼卵进行杂交育种实验,获得了具有高受精率、高孵化率、低畸形率并且生长快等优势杂交子代(以下简称“金虎石斑鱼”),克服了两种亲本在人工繁育时间的隔离。目前对金虎石斑鱼的研究主要集中在与亲本的形态差异分析^[6]、后代生长发育分析^[5]、子代的染色体核型分析^[7]以及遗传多样性研究^[8]等方面,对于金虎石斑鱼抗逆性的相关研究还未见报道。

氧气在水生动物的生长发育过程中发挥着十分重要的作用^[9],然而在水产养殖过程中,水中溶解氧水平往往容易受到温度、富营养化、水体污染、表层水与深层水的交换、突变天气以及高密度养殖等自然和人为环境变化的影响^[10-11]。水体溶解氧浓度突然降低往往会引起鱼类摄食量减少、生长速度缓慢、生殖力下降、免疫能力降低等不良现象的发生,严重时甚至引起死亡^[12-13]。鱼类的低氧耐受能力不仅是抗逆性评估的重要参考,也是评价是否为水产养殖良种的重要指标。目前对于低氧胁迫对鱼类的研究主要集中在呼吸

代谢、组织损伤、能量代谢、氧化应激^[14-17]等方面,而对于石斑鱼类,尤其是新获得的杂交品种金虎石斑鱼及其母本棕点石斑鱼的低氧相关研究还未见报道。

本研究以相同养殖条件下的杂交金虎石斑鱼与其母本棕点石斑鱼为研究对象,比较研究了两种鱼的耗氧率与窒息点以及低氧胁迫下抗氧化酶、乳酸脱氢酶活性以及乳酸含量的变化,评价棕点石斑鱼和金虎石斑鱼幼鱼的耐低氧能力,以期为金虎石斑鱼苗种运输、成鱼养殖等过程中的溶氧水平和放养密度的确定提供理论参考,同时为石斑鱼杂交育种提供生理学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用棕点石斑鱼与金虎石斑鱼均由山东省烟台市莱州明波水产公司同批次繁育提供。在实验开始前挑选体质健康、无病无伤、规格一致的棕点石斑鱼与金虎石斑鱼,初始体重分别为(33.06±4.66) g、(34.26±3.85) g,全长分别为(11.63±0.97) cm、(13.06±0.78) cm,对其进行为期14 d的暂养驯化使其适应实验室环境。驯化期间溶解氧为(5.62±0.31) mg/L,温度(29.97±0.84) °C,每天早晚各投食1次,早晨排污换水1次并检查实验鱼的生长状况,日换水量不超过养殖水体总体积的2/3。

1.2 实验设计

1.2.1 耗氧率的测定实验 参考熊向英等^[14]及陈婉情等^[18]的研究,选取容积为5 L的实验盒作为呼吸室,在(31.18±0.38) °C的水温下分别测定棕点石斑鱼与金虎石斑鱼的耗氧率。在暂养实验水池中选取规格一致(表1)的棕点石斑鱼和金虎石斑鱼各4尾分别缓慢放入自制呼吸室中,每个呼吸室中放同种鱼两尾,待鱼适应1 h后处于较好状态时开始实验。往呼吸室中缓慢补注满水后采用保鲜膜密封,四周用透明胶带加固并盖好盒盖扣紧,以确保呼吸室的密封性良好,并将其置于暂养实验水池中水浴,使温度与暂养条件相同。以相同操作设置一个空白对照组,用于矫正实验前后溶解氧质量浓度。实验共持续2 h,在实验开

始前和结束时均用碘量瓶采样,快速固定并保存用于测定溶解氧质量浓度。实验结束后,用滤纸吸干实验幼鱼体表水分并称重,记录数据。此实验共重复进行 6 次。

1.2.2 窒息点的测定实验 在暂养实验水池中随机选取体重和全长相差不大(表 1)的棕点石斑鱼和金虎石斑鱼各 18 尾,分别缓慢置于 6 个容积为 5 L 呼吸室中,每个呼吸室中同种鱼 6 尾,待鱼适应 1 h 处于较好状态后开始实验,封闭操作同 1.2.1。在实验开始前利用碘量瓶采样,快速固定并测定溶解氧质量浓度,以 50% 的鱼死亡时的溶解氧质量浓度作为鱼的窒息点^[18]。

表 1 实验所用棕点石斑鱼与金虎石斑鱼记录

Tab. 1 Records of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus* used in the experiment

种名 species	体重/g body weight	全长/cm total length	数量/尾 number	用途 usage
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	38.31±5.43	12.86±0.53	12	1.2.1
	49.13±6.26	14.07±0.87	9	1.2.2
	32.13±5.94	12.17±0.90	70	1.2.3
金虎石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. tukula</i> (♂)	40.07±3.47	14.00±0.49	12	1.2.1
	49.19±4.59	15.13±0.58	9	1.2.2
	34.03±4.41	13.17±0.72	70	1.2.3

1.2.3 低氧胁迫实验 在驯养结束以后,挑选体质健康的金虎石斑鱼与棕点石斑鱼(表 1)进行实验,将金虎石斑鱼与棕点石斑鱼各 70 尾分别饲养于 4 个相同规模的实验水池($d=60$ cm, $h=45$ cm, 实际容水 120 L)中,两种鱼各设两个平行,每个平行放同种鱼 35 尾。实验开始前在每个平行各取 3 尾鱼作为对照组采样,并标记为 C 组。0 h 采样结束后立刻向各水池通入氮气使溶解氧在 10 min 内降至预定值(图 1),并通过调节水流大小使溶解氧维持在预定值 1 h 后每个平行各取 3 尾鱼采样,记为 H1 组。随后向各水池继续通氮气降低溶氧,并依次在预定溶氧处停留 1 h 后采样,每个平行每个时间点各取 3 尾鱼,依次记为 H2、H3、H4、H5 组。低氧胁迫阶段结束后,恢复正常流水和充气,使溶氧快速恢复至 5.5 mg/L 以上,在恢复 3 h 后再次取样,记为 R 组。整个实验期间每隔 10 min

用养殖用溶氧仪(OxyGuard Handy Polaris)测定并记录溶解氧质量浓度。

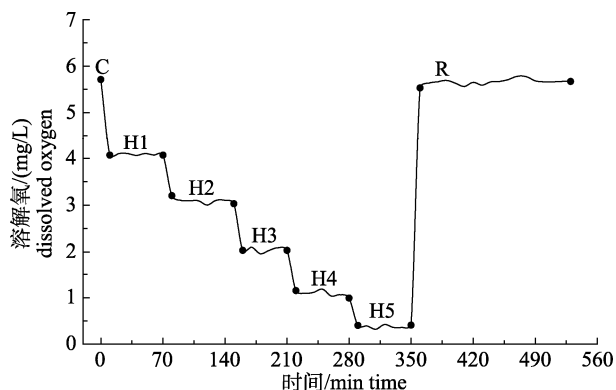


图 1 实验水质溶解氧变动记录

C: 常氧对照组[(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平(>5.5 mg/L) 3 h。

Fig. 1 Records about changes in dissolved oxygen in the experimental groups

C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level (>5.5 mg/L) for 3 h.

1.3 测定指标与方法

1.3.1 溶解氧浓度计算 耗氧率和窒息点中溶解氧质量浓度使用碘量法测定,计算公式如下:

$$A = \frac{C \times V \times 8}{V_0} \times 1000$$

式中, A 为样品中的溶解氧质量浓度,单位: mg/L; C 为滴定时使用硫代硫酸钠的浓度,单位: mol/L; V 为滴定样品时使用硫代硫酸钠的体积,单位: mL; V_0 为滴定时实际水样的体积,单位: mL。

1.3.2 耗氧率计算 依据下列公式计算每尾鱼单位时间、单位体重的相对耗氧率:

$$Q_0 = \frac{V \times (A_1 - A_2 + \Delta A)}{W \times T}$$

式中, Q_0 为相对耗氧率,单位: mg/(g·h); V 为呼吸室的实际容积,单位: mg/L; A_1 为实验前呼吸室中海水的溶解氧质量浓度,单位: mg/L; A_2 为实验后

呼吸室中海水的溶解氧质量浓度, 单位: mg/L; ΔA 为溶解氧质量浓度的矫正系数; W 为幼鱼的体重, 单位: g; T 为实验持续的时间, 单位: h。

1.3.3 肝脏酶活性的测定 在 1.2.3 中, 依据设定好的时间点将鱼置于含有鱼用麻醉剂 MS-222 的溶液中麻醉, 随后迅速解剖, 分离出肝脏并装于 2 mL 冻存管中后迅速置于液氮中速冻, 分装保存于液氮之中。肝脏总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性以及乳酸(lactic acid, LD)含量的测定均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒, 依各试剂盒说明书严格按步骤操作测定。

1.4 数据分析

实验数据均用平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)来表示,

利用 Excel 2010 软件对数据进行常规整理后, 利用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行独立样本 T 检验(independent-sample t -test), 或经方差同质性检验后进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 LSD 法进行各处理平均数之间的差异显著性比较, 置信水平选择 $P < 0.05$, 作图采用 Origin 2018 软件。

2 结果与分析

2.1 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼幼鱼的耗氧率与窒息点

研究表明(表 2), 在水温为(31.18±0.38) °C 时金虎石斑鱼幼鱼的耗氧率为 0.16 mg/(g·h), 显著高于其母本棕点石斑鱼幼鱼耗氧率 0.14 mg/(g·h) ($P < 0.05$)。棕点石斑鱼与金虎石斑鱼幼鱼的窒息点分别为 0.22 mg/L、0.24 mg/L, 二者差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 同水温下棕点石斑鱼与金虎石斑鱼幼鱼窒息点和耗氧率比较

Tab. 2 Comparison of suffocation points and oxygen consumption rates of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus* in the same water temperature

种名 species	水温/℃ temperature	窒息点/(mg/L) suffocation point	耗氧率/[mg/(g·h)] oxygen consumption rate
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	31.18±0.38	0.22±0.02	0.14±0.01
金虎石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. tukula</i> (♂)	31.18±0.38	0.24±0.04	0.16±0.00*

注: *表示两种石斑鱼之间差异显著($P < 0.05$).
Notes: * indicates significant difference between two groupers ($P < 0.05$).

2.2 溶氧下降和复氧下肝脏酶活性和乳酸含量的变化

对两种鱼肝脏中抗氧化酶、LDH 活性以及 LD 含量 6 种指标分别进行测定, 得出在溶氧开始变动后棕点石斑鱼与金虎石斑鱼 SOD 活性分别为 447~600 U/mg prot、464~613 U/mg prot, CAT 活性分别为 24~33 U/mg、18~33 U/mg, GSH-Px 活性分别为 210~414、174~344 U, T-AOC 活性分别为 0.7~1.2 U/mg prot、0.5~1.0 U/mg prot, LD 含量分别为 0.4~0.6 mmol/g prot、0.2~0.4 mmol/g prot, LDH 活性分别为 763~1496 U/g prot、789~1199 U/g prot。经单因素方差分析(one-way ANOVA), 除棕点石斑鱼 T-AOC 和 CAT 活性以及金虎石斑鱼 LD 含量变化受溶氧变动的影响不显著外, 其余指标受

溶氧变动的影响均显著($P < 0.05$)(表 3)。
2.2.1 肝脏总抗氧化能力和抗氧化酶活性的变化 从图 2 和图 3 可以看出, 在溶氧下降过程中, 棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 SOD 和 CAT 活性均呈先上升后下降的趋势。棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性分别在 H3、H2 组时达到最大值, 相比对照组显著提高 28.2% ($P < 0.05$)、29.1% ($P < 0.05$), 随后均略有下降。恢复常氧 3 h 后, 棕点石斑鱼肝脏中 SOD 活性提高 16.7%, 并与对照组差异显著($P < 0.05$), 金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性则降低 1.7%, 与对照无显著差异($P > 0.05$), 但恢复至常氧水平。在 H2 组时, 金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性较对照组显著升高 29.1% ($P < 0.05$), 且显著高于棕点石斑鱼肝脏中 SOD 活性($P < 0.05$); 棕点

表 3 溶氧变动对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏抗氧化酶、LDH 活性以及 LD 含量影响的方差分析结果

Tab. 3 Variance analysis result for liver antioxidant enzyme, LDH activity and LD content of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus* affected by dissolved oxygen changes

种名 species	指标 index	P
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	超氧化物歧化酶 SOD	0.0039
	过氧化氢酶 CAT	0.1873
	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	<0.0001
	总抗氧化能力 T-AOC	0.1122
	乳酸 LD	0.0007
	乳酸脱氢酶 LDH	0.0156
金虎石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> ♀ × <i>E. tukula</i> ♂	超氧化物歧化酶 SOD	0.0004
	过氧化氢酶 CAT	0.0096
	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	<0.0001
	总抗氧化能力 T-AOC	0.0014
	乳酸 LD	0.3363
	乳酸脱氢酶 LDH	0.0476

石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 CAT 活性分别在 H4、H2 组时提高 35.7% ($P<0.05$)、42.4% ($P<0.05$), 达到最大值。恢复 3 h 后, 棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 CAT 活性较 H5 组分别升高了 5.0%、20.5%, 且二者与对照组均无显著差异 ($P>0.05$)。在 H3、H4 组时, 与对照组相比, 金虎石斑鱼肝脏中 CAT 活性下降了 6.9%、20.7%, 均显著低于棕点石斑鱼肝脏中 CAT 活性 ($P<0.05$)。

如图 4 所示, 棕点石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性随溶解氧浓度下降整体呈现出降低的趋势, 在 H4 组时下降到最低值, H3、H4、H5 组较对照组分别显著下降 26.9% ($P<0.05$)、46.9% ($P<0.05$)、46.9% ($P<0.05$); 金虎石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性随溶解氧浓度下降呈现出先升高再降低后又升高的变化趋势, 相比于对照组 H3 组显著降低了 39.5% ($P<0.05$), 下降到了最低值, 且显著低于棕点石斑鱼 ($P<0.05$), 随后有所上升; 恢复常氧 3 h 后, 棕点石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性较低氧 H5 组时显著升高了 42.5% ($P<0.05$), 金虎石斑鱼则显著下降了 44.3% ($P<0.05$), 且二者之间差异显著 ($P<0.05$), 与常氧对照组相比棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏 GSH-Px 活性分别显著降低 24.3% ($P<0.05$)、40.4% ($P<0.05$)。

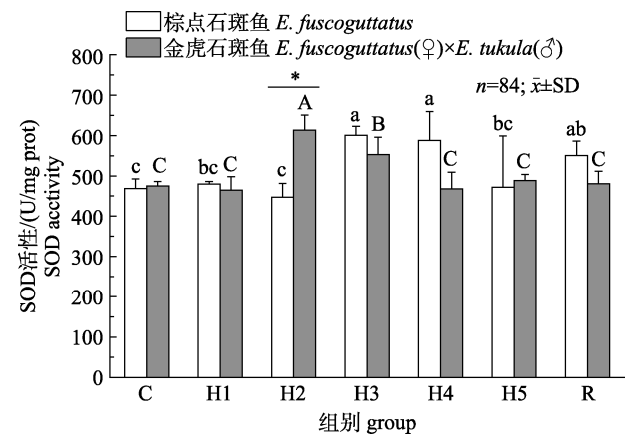


图 2 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著 ($P<0.05$); *表示同一组两种鱼差异显著 ($P<0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h。

Fig. 2 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on SOD activity in the livers of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus*

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P<0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P<0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

如图 5 所示, 棕点石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性受低氧胁迫和复氧的影响不显著, 整体趋势呈上升下降交替波动, 但在 H2、H3 组时均显著高于金虎石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性 ($P<0.05$); 金虎石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性 H4 组时迅速升高 76.0% ($P<0.05$), 达到峰值后随溶解氧的降低呈下降趋势, 其余组较对照组略有变化, 但差异均不显著 ($P>0.05$)。恢复常氧 3 h 后, 棕点石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性升高 22.0%, 而金虎石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性降低 12.3%, 显著低于棕点石斑鱼 ($P<0.05$), 但二者均与常氧对照组无显著差异 ($P>0.05$)。

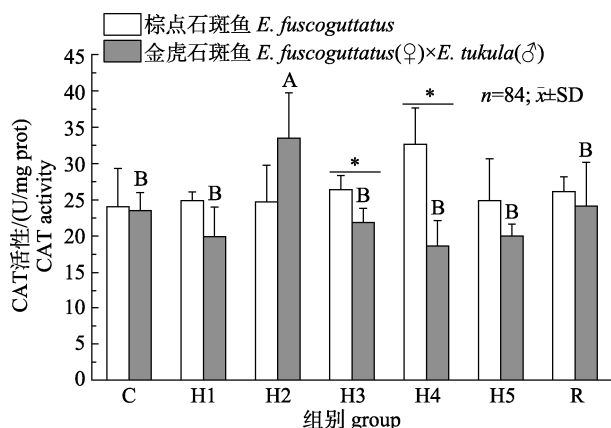


图3 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中CAT活性的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著($P<0.05$); *表示同一组两种鱼差异显著($P<0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h.

Fig. 3 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on CAT activity in the livers of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus*

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P<0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P<0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

2.2.2 肝脏乳酸含量和乳酸脱氢酶活性的变化

从图6可以得出, 棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中LD含量随溶解氧浓度的降低均呈现先升高后降低的变化趋势, 且在H2、H3组时二者的差异显著($P<0.05$)。棕点石斑鱼肝脏中LD含量在H1、H2、H3、H4组时较对照组分别显著升高10.0%、53.3%、34.5%、65.9% ($P<0.05$), 并在H4组时达到最大值, 随后便显著下降了26.1% ($P<0.05$), 但与对照组并无显著差异($P>0.05$)。在恢复常氧3h后, 棕点石斑鱼肝脏中LD含量上升2.8%, 显著高于对照组26.0% ($P<0.05$); 金虎石斑鱼肝脏中LD含量则下降了35.9%, 与常氧对照组无显著差异($P>0.05$), 且显著低于棕点石斑鱼肝脏中LD含

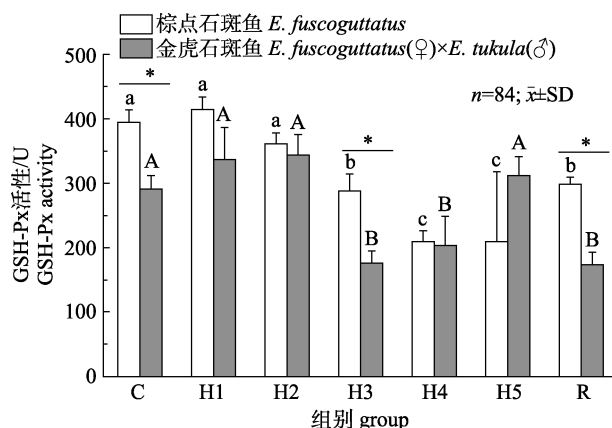


图4 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中GSH-Px活性的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著($P<0.05$); *表示同一组两种鱼差异显著($P<0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h.

Fig. 4 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on GSH-Px activity in the livers of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus*

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P<0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P<0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

量($P<0.05$)。

图7显示出棕点石斑鱼肝脏中LDH活性随着溶解氧浓度的下降而呈先升高再下降的趋势, 在H3组时LDH活性较对照组升高72.2%, 与其他组别差异显著($P<0.05$), 且显著高于金虎石斑鱼($P<0.05$); 金虎石斑鱼肝脏中LDH活性在H1、H3、H4组时, 相比于对照组分别显著降低了34.2% ($P<0.05$)、33.8% ($P<0.05$)、34.1% ($P<0.05$), 但在H5组时LDH活性较对照组上升35.7%, 与常氧对照组无显著差异($P>0.05$)。在复氧3h后, 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼肝脏中LDH活性分别升高了40.7%、8.7%, 且均与常氧对照组无显著差异($P>0.05$)。

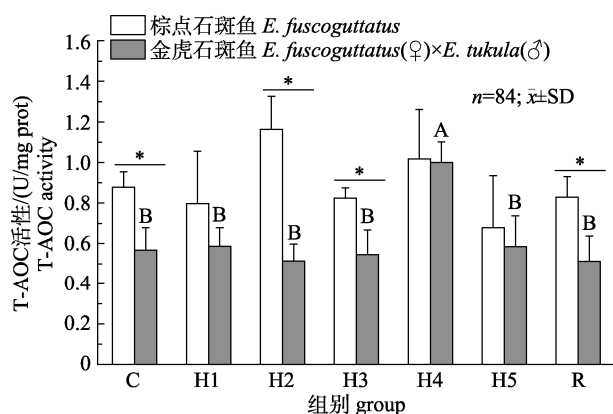


图 5 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$); * 表示同一组两种鱼差异显著 ($P < 0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h.

Fig. 5 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on T-AOC activity in the liver of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus*

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P < 0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P < 0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

3 讨论

3.1 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼幼鱼耗氧率和窒息点的比较

标准耗氧率往往是指鱼体在禁食、保持安静状态时的耗氧率, 因为此时的耗氧只是为了维持鱼类生命的能量消耗, 没有进行贮藏和生长, 所以经常用于表示鱼体的标准代谢^[19-20]。本实验在将鱼体禁食 24 h 后置于简易呼吸室中测定标准耗氧率, 得到在水温为 (31.18±0.38) °C 时金虎石斑鱼耗氧率显著高于棕点石斑鱼, 推测可能是金虎石斑鱼生长速度快、反应迅速等杂种优势所致, 因为耗氧率高可能代表摄食活动强烈、能量代谢强度高以及新陈代谢快等特点^[5,21]。

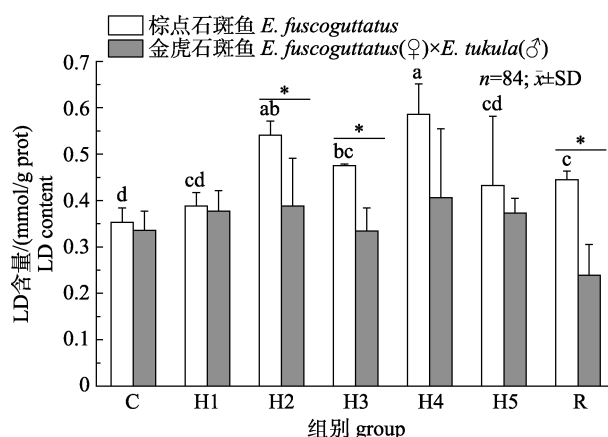


图 6 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 LD 含量的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$); * 表示同一组两种鱼差异显著 ($P < 0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h.

Fig. 6 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on LD content in the livers of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids and *Epinephelus fuscoguttatus*. Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P < 0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P < 0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

鱼类的窒息点代表了其忍耐低氧的极限指标, 窒息点越低, 代表对低氧的耐受能力越强^[22]。本研究测得在水温 (31.18±0.38) °C 时, 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼的窒息点分别为 0.22 mg/L、0.24 mg/L, 不仅低于赤点石斑鱼 (*E. akaara*)^[18]、珍珠龙胆石斑鱼 (*E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)^[18]、青石斑鱼 (*E. awoara*)^[23] 等常见养殖石斑鱼种类 (表 4), 而且也低于驼背鲈 (*Cromileptes altivelis*, 1.00~1.21 mg/L)^[18]、豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*, 0.75~0.97 mg/L)^[18]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*, 0.834~1.113 mg/L)^[20]、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*, 1.42~2.27 mg/L)^[24]、条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*, 1.60~2.95 mg/L)^[25]、真鲷 (*Pagrus major*,

1.55~1.65 mg/L)^[23,26]等海水养殖鱼类, 同时也比草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*, 0.39 mg/L)^[22,26]、鳙(*Aristichthys nobilis*, 0.46 mg/L)^[22]、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*, 0.51 mg/L)^[22]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*, 0.27 mg/L)^[22]、黄颡鱼

(*Pelteobagrus fulvidraco*, 0.36 mg/L)^[22]等淡水养殖鱼类低, 表明棕点石斑鱼与金虎石斑鱼的耐低氧能力较好, 可以进行大规模高密度养殖。限于条件, 本实验未探讨窒息点和耗氧率与水温之间的关系。

表 4 几种石斑鱼耗氧率和窒息点的比较
Tab. 4 Comparison of oxygen consumption rate and suffocation point of some groupers

种名 species	体重/g weight	水温/℃ temperature	耗氧率/[mg(g·h)] oxygen consumption rate	窒息点/(mg/L) suffocation point	参考文献 reference
赤点石斑鱼 <i>Epinephelus akaara</i>	69.3±6.8	25	0.14±0.01	0.54±0.02	[18]
		30	0.20±0.01	0.66±0.04	[18]
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	74.2±5.4	25	0.14±0.01	0.28±0.02	[18]
		30	0.20±0.01	0.39±0.02	[18]
	69.7±6.4	25	0.15±0.00	0.24±0.01	[18]
		30	0.16±0.02	0.25±0.02	[18]
珍珠龙胆石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)	98.8	25	0.216±0.013	—	[27]
		30	0.218±0.007	—	[27]
		27	0.2076	—	[28]
云龙石斑鱼 <i>E. moara</i> (♀)× <i>E. lanceolatus</i> (♂)	6.15±0.04	30	0.2094	—	[28]
		33	0.246	—	[28]
		22~23	0.1038	0.8160	[23]
青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	23.67±2.17	27	0.158±0.007	—	[29]
		30	0.173±0.007	—	[29]
		33	0.193±0.006	—	[29]
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	25.625	27.1	0.235	—	[30]
		30.5	0.347	—	[30]
		33.4	0.434	—	[30]

3.2 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼抗氧化能力的比较

鱼类缺氧不仅会影响其行为、生长和生理状况^[31-32], 通常还会导致活性氧(ROS)的积累^[33], 从而打破鱼体细胞内 ROS 产生和清除的动态平衡, 使鱼体处于氧化应激状态^[34-35]。为了尽量避免多余 ROS 引起过氧化反应从而对机体造成过氧化损伤, 鱼类的抗氧化防御系统发挥的清除活性中间产物的抗氧化作用则至关重要, 此系统由抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px 等)和小分子抗氧化剂(维生素、谷胱甘肽、类胡萝卜素等)组成^[33-39]。一般认为, SOD、CAT、GSH-Px 和 T-AOC 活性是检测鱼类抗氧化能力的重要指标^[40-43]。肝脏是鱼类最大的腺体, 是参与物质代谢最重要的器官之一^[37,44], 也是进行氧化反应较多的组织^[12,45-48], 所以本研究选择采用肝脏来评价棕点石斑鱼与金虎石斑鱼

的抗氧化能力。

SOD 最早在 ROS 的清除过程中发挥作用, 是降解活性氧自由基的第一道防线, 可将超氧阴离子自由基转化为 H₂O₂, 然后由 CAT 将 H₂O₂ 催化为水和氧气, 从而达到减少机体损伤、保护细胞免受伤害的目的^[33-34,37,39,48-50]。本研究中, 随着溶解氧浓度的下降, 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼肝脏中 SOD 和 CAT 活性均不同程度提高后又有所下降, 推测溶解氧的下降使棕点石斑鱼与金虎石斑鱼肝脏产生过量的 ROS 而处于氧化应激状态。在卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[15]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[51]、翘嘴鲮(*Siniperca chuatsi*)^[52]的研究中均有 SOD 和 CAT 活性类似趋势的报道。在溶氧下降到 3 mg/L 时, 金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性与对照组相比突然显著升高, 并且其激活程度

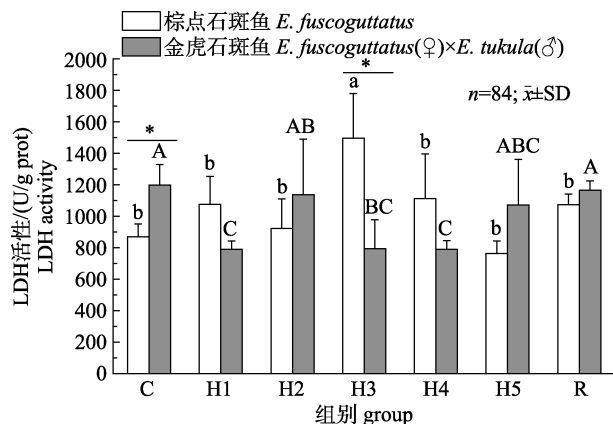


图 7 溶氧下降和复氧对棕点石斑鱼和金虎石斑鱼肝脏中 LDH 活性的影响

同一种鱼上标不同字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$); * 表示同一组两种鱼差异显著 ($P < 0.05$). C: 常氧对照组 [(5.71±0.31) mg/L]; H1: 溶解氧降至 4.0 mg/L 并维持 1 h; H2: 溶解氧降至 3.0 mg/L 并维持 1 h; H3: 溶解氧降至 2.0 mg/L 并维持 1 h; H4: 溶解氧降至 1.0 mg/L 并维持 1 h; H5: 溶解氧降至 0.4 mg/L 并维持 1 h; R: 恢复常氧水平 3 h.

Fig. 7 Effects of decreased dissolved oxygen and reoxygenation on LDH activity in the livers of *Epinephelus fuscoguttatus* and *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂) hybrids. Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P < 0.05$). * means significant difference between the two fishes in the same group ($P < 0.05$). C: normal oxygen control group [(5.71±0.31) mg/L]; H1: Dissolved oxygen decreased to 4.0 mg/L and maintained for 1 h; H2: Dissolved oxygen decreased to 3.0 mg/L and maintained for 1 h; H3: Dissolved oxygen decreased to 2.0 mg/L and maintained for 1 h; H4: Dissolved oxygen decreased to 1.0 mg/L and maintained for 1 h; H5: Dissolved oxygen decreased to 0.4 mg/L and maintained for 1 h; R: Dissolved oxygen recovered to normal level for 3 h.

显著高于棕点石斑鱼, 表明金虎石斑鱼对于外界环境的改变而做出的反应较为迅速。金虎石斑鱼与棕点石斑鱼肝脏中 SOD 活性分别达到最大值后又显著下降, 推测可能是因为在下降到更小溶解氧时产生了更多的活性氧自由基, SOD 在清除活性氧自由基时导致了其活性的下降。

肝脏中 CAT 活性分别在棕点石斑鱼与金虎石斑鱼肝脏中 SOD 活性达到最大值之后才开始下降, 这可能是因为肝脏中高活性的 SOD 清除活性氧自由基时生成了大量的 H_2O_2 , 鱼体迅速提高 CAT 活性来清除 H_2O_2 , 从而避免 H_2O_2 与 O_2 反应生成毒性更大的其他 ROS, 这与在虹鳟和硬头鳟幼鱼^[44]以及条石鲷幼鱼^[47]受盐度胁迫时的变化模型相似。在恢复溶氧 3 h 后, 金虎石斑鱼肝脏中

SOD 活性已与对照组无显著差异, 而棕点石斑鱼肝脏中 SOD 活性显著高于对照组水平, 表明棕点石斑鱼在复氧 3 h 后仍然可能处于应激状态, 说明金虎石斑鱼在受到低氧胁迫后较棕点石斑鱼有较好的恢复能力。

GSH-Px 作为另一重要抗氧化酶具有清除细胞内多余 H_2O_2 的作用, 通常以谷胱甘肽作为底物发挥此功能, 同时也对清除脂质过氧化产物以及有毒物质有促进作用, 从而间接地保护细胞膜结构和功能的完整性^[49,53]。在本实验中, 金虎石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性在受到低氧胁迫后呈先小幅升高再下降又升高的趋势, 与 CAT 活性变化趋势相反, 可能与 GSH-Px 和 CAT 之间协同清除 H_2O_2 的作用有关^[54]。该特征在银鲳(*Pampus argenteus*)^[37]、河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophilus*)^[39]等鱼的研究中也有体现, 表明 GSH-Px 与 CAT 之间存在浓度互补作用。但在溶解氧下降到 0.4 mg/L 时, 金虎石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性显著升高, 推测低氧水平可能致使金虎石斑鱼产生了较多的脂质过氧化物; 而棕点石斑鱼肝脏中 GSH-Px 活性整体呈下降趋势, 在溶氧 1 mg/L 与 0.4 mg/L 显著下降到最低, 可能由于低氧环境产生了大量的过氧化物, 暂时超过了鱼体的承受范围, 其毒性抑制了 GSH-Px 酶活性所致。

T-AOC 是机体内抗氧化酶体系和抗氧化物体系抗氧化能力的总和, 是可以用于衡量机体抗氧化系统功能状况的一种综合性指标, 其活性是反映机体抗氧化能力的重要参数。姜景腾等^[55]在研究低氧胁迫对真鲷(*Pagrosomus major*, ♀)与黑鲷(*Sparus macrocephalus*, ♂)杂交子一代体内酶活力的影响中发现, 低氧(1.83 mg/L)胁迫后肝脏中 T-AOC 活性在短时间内迅速上升 54.1%, 但随着胁迫时间的延长杂交鲷肝脏中 T-AOC 活性逐渐下降, 并低于对照组水平, 这与本研究结果相似。本实验中, 棕点石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性激活程度为 15.9%~32.4%, 且受溶解氧变动的影响差异不显著; 而金虎石斑鱼肝脏中 T-AOC 活性激活程度为 2.8%~76.0%, 明显高于棕点石斑鱼, 表明金虎石斑鱼较棕点石斑鱼能够高效地对低氧胁迫和复氧做出响应来有效地清除多余的 ROS, 从而对应激带来的氧化压力。

3.3 棕点石斑鱼与金虎石斑鱼无氧代谢能力的比较

一般认为鱼类在受到低氧胁迫时, 体内有氧代谢水平可能会受到不同程度的抑制, 从而出现机体所需能量供给不足的现象, 于是为了尽可能地延长在低氧环境中的存活时间, 通常会采取提高无氧代谢比率的方式来满足对能量需求^[16,34,56]。而 LD 作为无氧代谢的一种产物, 可以将其作为评价鱼类无氧代谢能力的重要指标^[34,57]; LDH 是重要的无氧代谢标志酶, 不仅可以催化丙酮酸生成无氧代谢的最终产物 LD, 也可以催化 LD 使其脱去全部吸附的氢原子, 从而实现丙酮酸与 LD 之间的还原和氧化反应, 因此其活性在一定程度上也可以反映无氧代谢的水平^[16,58-59]。

本研究中, 在溶解氧开始下降后棕点石斑鱼与金虎石斑鱼肝脏中 LD 浓度均有所上升, 但是金虎石斑鱼肝脏中 LD 浓度的变化并不显著。肝脏中 LD 的积累说明在低氧条件下棕点石斑鱼与金虎石斑鱼有氧呼吸可能受阻, 导致了 ATP 供应不足, 从而转变为厌氧代谢模式为机体供能, 这与熊向英等^[14]研究的鲮(*Mugil cephalus*)幼鱼低氧(1.66 mg/L)胁迫下的 LD 积累结果类似。李洪娟等^[17]在研究急性低氧胁迫(2.64 mg/L)对军曹鱼(*Rachycentron canadus*)能量利用的影响时发现, 在低氧 3 h 后肝脏中 LDH 活性急剧上升, 本研究中棕点石斑鱼 LDH 活性变化与此相似。本研究中, 棕点石斑鱼在溶氧下降到 2 mg/L 时其肝脏中 LDH 活性显著提升 72.2%, LDH 活性升高意味着将更多的丙酮酸转化为 LD, 从而导致了 LD 积累, 以供机体提高厌氧代谢比率来应对低氧环境, 这也与对卵形鲳鲹^[60]的研究结果相似。但是在溶解氧开始下降后, 金虎石斑鱼肝脏中 LDH 活性均有所抑制, 推测与金虎石斑鱼肝脏中 LD 浓度的变化不显著有关, 具体机制需更进一步研究。

参考文献:

- [1] Ding S X, Liu Q H, Wu H H, et al. A review of research advances on the biology and artificial breeding of groupers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 737-752. [丁少雄, 刘巧红, 吴昊昊, 等. 石斑鱼生物学及人工繁育研究进展[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 737-752.]
- [2] Wu B, Xie J. Effects of the dissolved oxygen level and the vibration on oxidative stress of grouper during water transport[J]. Food & Machinery, 2019, 35(8): 137-142, 182. [吴波, 谢晶. 溶解氧水平和振动对有水活运过程中石斑鱼氧化应激的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 137-142, 182.]
- [3] Chen C, Kong X D, Li Y L, et al. Embryonic and morphological development in the larva, juvenile, and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 135-144. [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[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 135-144.]
- [4] Li Z T, Tian Y S, Cheng M L, et al. Comparison of development and growth of hybrid *Chromileptes altivelis* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂)[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(1): 17-26. [李振通, 田永胜, 成美玲, 等. 驼背鲆(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交子代发育及生长比较[J]. 南方水产科学, 2020, 16(1): 17-26.]
- [5] Tian Y S, Tang J, Ma W H, et al. Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tukula* (♂) using cryopreserved sperm[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 36-47. [田永胜, 唐江, 马文辉, 等. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 36-47.]
- [6] Wu Y P, Tian Y S, Li Z T, et al. Analysis on morphological difference between hybrid *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂ and its parents[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(6): 17-22. [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与亲本的形态差异[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(6): 17-22.]
- [7] Wu Y P, Tian Y S, Li Z T, et al. Karyotype analysis of hybrids of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus tukula* (♂)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(1): 119-123. [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交子代核型分析[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(1): 119-123.]
- [8] Wu Y P, Tian Y S, Wang L N, et al. Genetic diversity analysis of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) and *E. tukula* (♂) hybrids[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 25-32. [吴玉萍, 田永胜, 王林娜, 等. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)及其杂交子代遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 25-32.]
- [9] Terova G, Rimoldi S, Corà S, et al. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1α mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquaculture, 2008, 279(1-4): 150-159.
- [10] Zhao L L, Sun J L, Liang J, et al. Enhancing lipid metabo-

- lism and inducing antioxidant and immune responses to adapt to acute hypoxic stress in *Schizothorax prenanti*[J]. Aquaculture, 2020, 519: 734933.
- [11] Zeng L, Wang Y H, Ai C X, et al. Effects of β -glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(5): 1395-1405.
- [12] Wang M, Wu F L, Xie S G, et al. Acute hypoxia and reoxygenation: Effect on oxidative stress and hypoxia signal transduction in the juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735903.
- [13] Ding J, Liu C, Luo S Y, et al. Transcriptome and physiology analysis identify key metabolic changes in the liver of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to acute hypoxia[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 189: 109957.
- [14] Xiong X Y, Huang G Q, Peng Y H, et al. Effect of hypoxia on growth performance, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(1): 73-82. [熊向英, 黄国强, 彭银辉, 等. 低氧胁迫对鲈鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 73-82.]
- [15] Chen S X, Wang P F, Ou Y J, et al. The effect of acute and chronic hypoxia stress on liver tissue structure and oxidation in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(6): 1049-1058. [陈世喜, 王鹏飞, 区又君, 等. 急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹幼鱼肝组织损伤和抗氧化的影响[J]. 动物学杂志, 2016, 51(6): 1049-1058.]
- [16] Guo Z X, Zeng Z Q, Huang J S, et al. Effects of acute hypoxia on oxidative stress, energy utilization and carbohydrate metabolism in liver of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(3): 134-140. [郭志雄, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 急性低氧胁迫对大规格军曹鱼幼鱼肝脏氧化应激、能量利用及糖代谢的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(3): 134-140.]
- [17] Li H J, Chen G, Guo Z X, et al. Oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(4): 12-19. [李洪娟, 陈刚, 郭志雄, 等. 军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼对环境低氧胁迫氧化应激与能量利用指标的响应[J]. 海洋学报, 2020, 42(4): 12-19.]
- [18] Chen W Q, Wu H X, Wu L, et al. Oxygen consumption rate and suffocation point of the juveniles for five species of mariculture fish[J]. Journal of Marine Sciences, 2015, 33(2): 76-81. [陈婉情, 吴洪喜, 吴亮, 等. 5 种海水养殖鱼类幼鱼的耗氧率及窒息点[J]. 海洋学研究, 2015, 33(2): 76-81.]
- [19] Person-Le Ruyet J, Mahé K, Le Bayon N, et al. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 269-280.
- [20] Wang Z S, Huang J T, Peng B. Oxygen consumption and asphyxiation in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Fisheries Science, 2004, 23(4): 3-7. [王资生, 黄金田, 彭斌. 半滑舌鳎耗氧率和窒息点的初步研究[J]. 水产科学, 2004, 23(4): 3-7.]
- [21] Sun X Y, Huang X L, Huang Z, et al. Diet feeding, oxygen consumption rhythm and gastrointestinal evacuation time of *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(5): 77-83. [孙莘溢, 黄小林, 黄忠, 等. 卵形鲳鲹摄食、耗氧节律和胃肠排空时间的研究[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 77-83.]
- [22] Yu L N, Yang D, Liu H Y, et al. Correlation between hemoglobin and asphyxiation point in twelve species of freshwater fish[J]. Chinese Journal of Zoology, 2017, 52(3): 478-484. [余来宁, 杨东, 刘红艳, 等. 十二种淡水鱼类血红蛋白与窒息点的相关分析[J]. 动物学杂志, 2017, 52(3): 478-484.]
- [23] Dai Q N, Zhao L L. Study on oxygen consumption rate of *Epinephelus awoara*[J]. Fisheries Science, 1994, 13(3): 6-9. [戴庆年, 赵莉莉. 青石斑鱼耗氧率研究[J]. 水产科学, 1994, 13(3): 6-9.] <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=CHAN403.001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>
- [24] Zhang X S, Wang Y. Studies on oxygen consumption rate and suffocation point of *Pseudosciaena crocea* fry[J]. Journal of Economic Animal, 2007, 11(3): 148-152, 158. [张学舒, 王英. 大黄鱼鱼苗耗氧率和窒息点的研究[J]. 经济动物学报, 2007, 11(3): 148-152, 158.]
- [25] Sun Z Z, Xu Y J, Han B, et al. Study on the oxygen consumption rate and asphyxiation point of rock bream *Oplegnathus fasciatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 27-33. [孙中之, 徐永江, 韩兵, 等. 条石鲷的耗氧率与窒息点研究[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 27-33.] <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HYS C200905007&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>
- [26] Dong C Y, Zhang J R. A preliminary measurement on suffocation point and oxygen consumption rate of *Pagrosomus major*[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(1): 75-79. [董存有, 张金荣. 真鲷窒息点与耗氧率的初步测定[J]. 水产学报, 1992, 16(1): 75-79.]
- [27] Liang H F, Huang D K, Wu Y H, et al. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(2): 30-34. [梁华芳, 黄东科, 吴耀华, 等. 温度和盐度对龙虎斑耗氧率和排氨率的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 30-34.] <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail>

- aspx?filename=HYSC201402005&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ
- [28] Xing D C, Song X F, Peng L, et al. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of juvenile *Epinephelus groupers*[J]. Fishery Modernization, 2017, 44(3): 7-14. [邢道超, 宋协法, 彭磊, 等. 温度与盐度对云龙石斑鱼幼鱼耗氧率和排氨率的影响[J]. 渔业现代化, 2017, 44(3): 7-14.]
- [29] Huang J S, Chen G, Zhang J D, et al. Effects of temperature, pH and body wet weigh on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* juveniles cultured in low-salt water[J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(6): 1038-1048. [黄建盛, 陈刚, 张健东, 等. 温度、pH及体重对低盐水体下斜带石斑鱼幼鱼耗氧率与排氨率的影响[J]. 动物学杂志, 2016, 51(6): 1038-1048.]
- [30] Chen G H, Zhang H Z, Chen X F. Study on the baby fish oxygen consumption of *Epinephelus fario*[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 1999, 17(3): 259-264. [陈国华, 章华忠, 陈雪芬. 鲑点石斑鱼幼鱼耗氧率的研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1999, 17(3): 259-264.]
- [31] Sun J L, He K, Liu Q, et al. Inhibition of fatty acid oxidation induced by up-regulation of miR-124 and miR-205 during exposure of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to acute hypoxia[J]. Aquaculture, 2020, 529: 735679.
- [32] Li M X, Wang X D, Qi C L, et al. Metabolic response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute and chronic hypoxia stress[J]. Aquaculture, 2018, 495: 187-195.
- [33] Wang W J, Li X L, Zhu J Y, et al. Antioxidant response to salinity stress in freshwater and marine *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Aquatic Botany, 2019, 154: 35-41.
- [34] Chang Z C, Wen H S, Zhang M Z, et al. Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms[J]. Periodical of Ocean University of China, 2018, 48(7): 20-28. [常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(7): 20-28.] <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=QDHY201807003&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>
- [35] Magouz F I, Mahmoud S A, El-Morsy R A A, et al. Dietary menthol essential oil enhanced the growth performance, digestive enzyme activity, immune-related genes, and resistance against acute ammonia exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735944.
- [36] Zhao Y J, Di G L, Jiang X Y, et al. Responses of antioxidant defenses to hypoxia in freshwater fish[J]. Fisheries Science, 2016, 35(5): 591-596. [赵燕静, 狄桂兰, 蒋昕晟, 等. 淡水鱼类对低氧的抗氧化防护响应[J]. 水产科学, 2016, 35(5): 591-596.]
- [37] Yin F, Sun P, Peng S M, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the APTase activities in its gill and kidney[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1059-1066. [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1059-1066.]
- [38] Dong X Q, Zhang D M, Chen Y K, et al. Effects of antimicrobial peptides (AMPs) on blood biochemical parameters, antioxidase activity, and immune function in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(1): 429-434.
- [39] Jia X Q, Zhang H Y, Wang L, et al. Effect of hypoxia stress on the antioxidant enzyme and ATP enzyme activity in tissues of *Odontobutis potamophila*[J]. Marine Fisheries, 2017, 39(3): 306-313. [贾秀琪, 张宏叶, 王丽, 等. 低氧胁迫对河川沙塘鳢抗氧化酶及 ATP 酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 2017, 39(3): 306-313.]
- [40] Bian P J, Qiu C G, Xu S L, et al. Effects of salinity on growth, activity of non-specific immune and antioxidant enzymes in obscure puffer *Takifugu obscurus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 108-114. [边平江, 邱成功, 徐善良, 等. 盐度对暗纹东方鲀生长、非特异性免疫和抗氧化酶活力的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 108-114.]
- [41] Kong Y D, Li M, Chu G S, et al. The positive effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria on *Channa argus*: Digestive enzyme activity, antioxidant capacity, intestinal microbiota and morphology[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735852.
- [42] Pan G P, Liu B W, Zhou W Y. The effects of cold stress on the antioxidant defense and immune parameters of juvenile *Epinephelus moara*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(1): 78-85. [潘桂平, 刘本伟, 周文玉. 低温胁迫对云纹石斑鱼幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(1): 78-85.]
- [43] Wei J, Tian L, Wang Y K, et al. Effects of salinity, photoperiod, and light spectrum on larval survival, growth, and related enzyme activities in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735794.
- [44] Yang J W, Zhou Y G, Huang M, et al. Comparative studies on digestive and antioxidant enzyme activities between juvenile rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and steelhead trout (*O. mykiss*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(3): 119-128. [杨静雯, 周演根, 黄铭, 等. 盐度对虹鳟

- 和硬头鳊幼鱼消化酶和抗氧化酶活性的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(3): 119-128.]
- [45] Li W F, Zhang X P, Song W H, et al. Effects of *Bacillus* preparation added to culture water on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1027-1033. [李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 养殖水体中添加芽孢杆菌对草鱼免疫和抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1027-1033.]
- [46] Zhang C J, Zhang Y L, Gao Q X, et al. Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea al-biflora*[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 59-64. [张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 59-64.]
- [47] Sun P, Yin F, Peng S M, et al. Effects of salinity on the activity of antioxidant enzymes in livers of juvenile *Oplegnathus fasciatus*[J]. Marine Fisheries, 2010, 32(2): 154-159. [孙鹏, 尹飞, 彭士明, 等. 盐度对条石鲷幼鱼肝脏抗氧化酶活力的影响[J]. 海洋渔业, 2010, 32(2): 154-159.]
- [48] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V, et al. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37(6): 1319-1330.
- [49] Nam S E, Haque M N, Shin Y K, et al. Constant and intermittent hypoxia modulates immunity, oxidative status, and blood components of red seabream and increases its susceptibility to the acute toxicity of red tide dinoflagellate[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 105: 286-296.
- [50] Yang M, Sun S M, Fu H T, et al. Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 493-503. [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 493-503.]
- [51] Sun J X, Han G K, Liu Y, et al. The growth characteristics and hypoxia tolerant ability of yellow catfish and hybrid catfish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(6): 1271-1279. [孙俊霄, 韩广坤, 刘娅, 等. 杂交黄颡鱼与普通黄颡鱼幼鱼生长性能及耐低氧能力的比较[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1271-1279.]
- [52] Xu C, Ding W D, Cao Z M, et al. Effects of acute hypoxia stress on antioxidant enzymes, respiratory related enzymes and expression of related genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(3): 686-694. [徐畅, 丁炜东, 曹哲明, 等. 急性低氧胁迫对翘嘴鲌抗氧化酶、呼吸相关酶活性及相关基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2020, 51(3): 686-694.]
- [53] Han S Y, Wang M Q, Liu M, et al. Comparative sensitivity of the hepatopancreas and midgut in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to oxidative stress under cyclic serious/medium hypoxia[J]. Aquaculture, 2018, 490: 44-52.
- [54] Xiong H L, Jiang Z Y, Zhang R X, et al. Effects of enrofloxacin hydrochloride on activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in liver of juvenile hybrid sturgeon[J]. Fisheries Science, 2017, 36(5): 601-605. [熊铧龙, 蒋左玉, 张儒学, 等. 盐酸恩诺沙星对杂交鲟幼鱼肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(5): 601-605.]
- [55] Jiang J T, Wu X F, Jiang H L. Hypoxia-induced Metabolic and Antioxidant Enzymatic Activities in the *P. major* ♀ × *S. macrocephalus* ♂ F₁[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2010, 23(4): 10-14. [姜景腾, 吴雄飞, 蒋宏雷. 低氧胁迫对真鲷(♀)与黑鲷(♂)杂交子一代体内酶活力的影响[J]. 宁波大学学报(理工版), 2010, 23(4): 10-14.]
- [56] Cooper R U, Clough L M, Farwell M A, et al. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 279(1-2): 1-20.
- [57] He W, Cao Z D, Fu S J. Effects of temperature and hypoxia on lactate and carbohydrate level in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2013, 30(5): 27-31. [何伟, 曹振东, 付世建. 温度和低氧对白鲢乳酸与糖水平的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2013, 30(5): 27-31.]
- [58] Wang W Z, Zeng Z Q, Huang J S, et al. Effects of hypoxia stress on antioxidation, immunity and energy metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(5): 12-18. [王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼抗氧化、免疫能力及能量代谢的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(5): 12-18.]
- [59] Wang Q F, Shen W L, Liu C, et al. Effects of multi-environmental factors on physiological and biochemical responses of large yellow croaker, *Larimichthys crocea*[J]. Chemosphere, 2017, 184: 907-915.
- [60] Ou Y J, Chen S X, Wang P F, et al. Study on oxidative stress response and physiological metabolism related indices of *Trachinotus ovatus* under hypoxia stress[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(3): 120-124. [区又君, 陈世喜, 王鹏飞, 等. 低氧环境下卵形鲳鲹的氧化应激响应与生理代谢相关指标的研究[J]. 南方水产科学, 2017, 13(3): 120-124.]

Hypoxia tolerance of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. tukula* (♂) hybrids and *E. fuscoguttatus*

DUAN Pengfei^{1,3}, TIAN Yongsheng^{1,2}, LI Zhentong^{1,3}, LI Ziqi^{1,3}, CHEN Shuai^{1,3}, LI Linlin^{1,4}, WANG Xinyi^{1,3}, WANG Linna^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, LI Wensheng⁵, WANG Xiaomei⁵, LI Bo⁵

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, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;
3. College of Fishers and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
5. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Laizhou 261400, China

Abstract: Hypoxia is a common stress phenomenon in aquaculture. Hypoxia tolerance of fish is an important indicator of fish resistance. To study the hypoxia tolerance of juveniles of tiger groupers (*Epinephelus fuscoguttatus*) and the hybrids, named jinhu groupers (*E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂), a closed breathing chamber was used to measure the oxygen consumption rate and suffocation point. In addition, the gradual hypoxia method was used to measure indicators of antioxidant enzyme activity and energy utilization in the liver by sampling the liver tissues of the individuals after 1 h at various dissolved oxygen levels [normal (5.71±0.31) mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, and 0.4 mg/L] and after 3 h at a normoxic level. The experimental results showed that when the water temperature was at (31.18±0.38) °C, the oxygen consumption rate of jinhu grouper juveniles was 0.16 mg/(g·h), which was significantly higher than that of the female tiger grouper juveniles ($P<0.05$). The suffocation points of tiger grouper and jinhu grouper juveniles were 0.22 mg/L and 0.24 mg/L, respectively, and the difference between the two species was not significant. During the process of decreasing dissolved oxygen concentration and returning to normal dissolved oxygen, there was a significant difference ($P<0.05$) between superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activities and lactic acid (LD) content in the liver of tiger grouper juveniles, as well as SOD, catalase (CAT), GSH-Px, total antioxidant capacity (T-AOC), LDH enzyme activities in the liver of jinhu grouper juveniles. However, the activity change of T-AOC and CAT in the liver of tiger grouper juveniles and the content of LD in the liver of jinhu grouper juveniles were not significant. After 3 h of reoxygenation, the activity of SOD in the liver of tiger groupers increased by 16.7% and that of GSH-Px increased by 42.5%, while the content of LD increased by 2.8%. There were significant differences in these indicators between the reoxygenation group and the normoxic group ($P<0.05$). However, there were no significant differences in the indicators of jinhu grouper juveniles compared with the normoxic group, except for the activity of GSH-Px ($P<0.05$). During the change in dissolved oxygen level, the activation levels of SOD, GSH-Px, CAT, and T-AOC in the liver of jinhu groupers reached 29.1%, 17.9%, 42.4%, and 76.0%, respectively, which were higher than the maximum activation levels of corresponding antioxidant enzymes in tiger grouper livers. The experimental results showed that jinhu groupers had a slightly higher oxygen consumption rate than tiger groupers and that their hypoxia tolerance was higher. Thus, jinhu groupers can be cultured on a large scale and in high density. After being subjected to hypoxia stress, compared with tiger groupers, jinhu groupers could efficiently activate the antioxidant defense system to protect the body from oxidative damage and had a faster recovery ability after hypoxia.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus*; *Epinephelus tukula*; hybrid; oxygen consumption rate; suffocation point; hypoxia tolerance

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

DOI: 10.12264/JFSC2021-0163

刀鲚染色体核型及不同组织中的 LDH 同工酶

蒋俊^{1,2}, 宋超^{1,2,3}, 周丽青⁴, 胡丽娟^{1,2}, 谢志伟^{1,2}, 刘若晖^{1,2}, 庄平^{1,2,3}, 张涛^{1,2,3}

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海与长江口渔业资源环境科学观测实验站, 上海 200090;
2. 上海长江口渔业资源增殖与生态修复工程技术研究中心, 上海 200090;
3. 中国水产科学研究院长江口渔业生态重点实验室, 上海 200090;
4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 为筛选出刀鲚种质生化遗传标记, 并从细胞遗传与生化遗传层面丰富刀鲚(*Coilia nasus*)的种质资源研究内容, 本研究以刀鲚鳃丝细胞为材料, 进行短期离体培养制备染色体标本, 并采用 PAGE 电泳法对刀鲚的心脏、肝脏、肾脏、眼、肌肉、鳃 6 种组织进行乳酸脱氢酶(LDH)检测, 比较不同组织及不同群体间 LDH 同工酶的差异。结果表明, 刀鲚雌雄染色体数量不存在差异, 染色体数目均为 $2n=48$, 全部属于端部着丝粒染色体(t), 核型为 $2n=48t$, 臂数(NF)=48, 其性染色体类型为 ZW/ZZ 型, 与以往研究中刀鲚与短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)染色体核型为 ZO/ZZ 型不同; 刀鲚雌性染色体中期分裂相中存在一团“点状物质”, 对其进行众数分析后发现, 该“点状物质”分布概率在 90.8%以上(120 个中期分裂相), 确认其为鲚属鱼类雌性异形性染色体。6 种组织中共检测到 6 条 LDH 同工酶酶带, 其中肝脏组织有 6 条酶带, 活性最低, 其余组织均有 5 条酶带, 活性各不相同; 不同群体间刀鲚 LDH 活性存在差异, 并存在个体差异性; LDH 在刀鲚体内分布较广泛, 具有明显的组织特异性, 其中眼 LDH 酶带表达丰富并且活性稳定, 可作为鉴定刀鲚种质的特征生化遗传标记。

关键词: 刀鲚; 染色体; 核型; 异形性染色体; 乳酸脱氢酶(LDH); 组织特异性

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0234-11

刀鲚(*Coilia nasus*)又名长颌鲚, 俗称刀鱼、毛鲚、野毛鲚等, 在我国东海和黄渤海, 以及长江、钱塘江、淮河及其他通海河流均有分布^[1]。刀鲚是长江口主要经济鱼类, 因其产量高、具有易捕捞性质, 是长江口重要的经济捕捞对象, 具有较高的经济价值。刀鲚与凤鲚(*Coilia mystus*)、前颌间银鱼(*Hemisalanx prognathus*)、白虾(*Exopalaemon* spp.)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)一并曾有长江口“五大渔汛”之称, 但近年来, 由于过度捕捞、水域污染和栖息生境的改变等因素, 刀鲚已基本不能形成渔汛, 其资源岌岌可危^[1]。因此, 刀鲚种质资源研究对于刀鲚遗传育种和分类研究

方面具有重要参考意义, 同时也是对其种质资源进行保护和利用的必要前提。

近年来, 有关刀鲚的研究主要集中在其生物学^[2-3]、繁养殖^[4-5]、应激性^[6-7]、洄游机理^[8]等方面。通过核型分析所得的结论在鱼类遗传育种方面是重要的参考资料^[9-10]。现有研究表明, 鲚属鱼类中刀鲚^[11]、短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)^[12]和凤鲚^[13]的雌雄染色体数量存在差异, 雌性染色体数目为 $2n=47$, 核型公式为 $2n=47t$, 雄性染色体数目为 $2n=48$, 核型公式为 $2n(\sigma)=48t$; 雌性染色体臂数 NF=47, 雄性 NF=48; 都存在性染色体, 其性染色体类型为 ZO/ZZ 型。已有研究在短颌鲚与

收稿日期: 2021-04-30; **修订日期:** 2021-06-02.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900802); 上海市科技兴农项目(2019-02-08-00-07-F01129; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD13).

作者简介: 蒋俊(1995-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水产动物种质资源. E-mail: jiangunn@163.com

通信作者: 张涛, 研究员, 主要从事鱼类生态学与繁育生物学研究. E-mail: zhangtaoyfi@163.com

凤鲚染色体中发现了一个明显的“点状物质”^[12-13],但这个“点状分裂相”是杂质还是染色体,尚未对其进行进一步的分析和确认,故本研究针对这一发现进行深入的研究与分析,以探究鲚属鱼类的染色体核型分类。

同工酶作为一种生化遗传参数,在鱼类物种鉴定、亲缘关系研究和群体遗传结构分析等方面已得到广泛应用^[14]。刀鲚生化遗传特性已有研究报道^[15-17]。周宗汉等^[15]研究表明,刀鲚在肝脏、生殖腺、肌肉中乳酸脱氢酶(LDH)酶谱都由 I 型(3 条区带)和亚型(4 条区带)两种谱型组成;刘文斌^[16]对长江刀鲚和太湖刀鲚两个不同生态型的 LDH 进行比较,发现两个地区刀鲚肌肉、脑、心脏和肝脏 4 个组织表现的酶带数量与迁移率都相同,仅表现出酶带活性的差异;徐钢春等^[17]进一步探讨刀鲚不同组织的 LDH 表型差异,发现眼是刀鲚 LDH 表达较为典型的组织,肌肉和血清不存在 LDH-AB₃ 酶带,其余组织均表现为 5 条酶带,各组织均未发现由 LDH-C 基因控制表达的酶带。对比分析发现,刘文斌^[16]与徐钢春等^[17]的研究存在不同点,其中刘文斌^[16]研究发现肌肉组织为 5 条酶带,而徐钢春等^[17]发现肌肉仅表现为 4 条酶带,针对以上结论差异性,本研究期望通过对刀鲚肌肉、肝脏等 LDH 进行再次分析,得到刀鲚群体的 LDH 表达稳定遗传性与差异性,在此基础上筛选出较为稳定的 LDH 生化遗传标记,以丰富刀鲚群体的种质资源研究。

本研究从细胞水平、生化水平两个层面对刀鲚的种质特征进行分析评估,以期获得刀鲚的核型特征和 LDH 酶谱特征,从而了解其种质特征,制定出相关种质检验标准,为种质鉴别提供理论依据,同时丰富刀鲚的种质资源研究数据,为合理地保护刀鲚种质资源以及其系统进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

染色体研究供试刀鲚于 2020 年 6 月采自崇明内河,为 1~2 龄性成熟个体,用于染色体核型分析的 15 尾(10♀, 5♂)刀鲚,体重分别为(68.69±

1.62) g (♂)和(64.54±0.41) g (♀),体长分别为(24.05±1.92) cm (♀)和(22.26±1.78) cm (♂)。样品采集后放入泡沫箱中暂养 20 min,待鱼体稳定后进行实验,暂养水温控制在 24 ℃。

LDH 研究供试刀鲚于 2020 年 9 月和 11 月分别采自江苏省扬中市、上海市崇明内河、江苏省连云港市灌河和浙江省嵊泗县 4 地,扬中市刀鲚为养殖刀鲚(长江野生刀鲚群体人工繁育后 F1),其余三地为野生刀鲚,共 36 尾,体重(23.52±13.76) g,体长(18.9±3.95) cm。现场解剖试验鱼,迅速获取心脏、肝脏、肾脏、眼、肌肉、鳃等组织,用 PBS 充分洗涤,沥干水分后,装入冻存管,液氮速冻,分组移入干冰中,后转入-80 ℃冰箱冻存待用。

1.2 实验方法

1.2.1 染色体标本的制作 采用蒋俊等^[13]鱼类鳃丝细胞短期离体培养方法制备刀鲚染色体标本。实验采样现场取刀鲚鳃丝,放入 0.04%秋水仙素溶液(50%过滤当地海水+50%去离子水)中;35 min 后将样品置入 0.05 mol/L KCl 低渗溶液中,上下颠倒数次后静置 50 min;收集样品,置入预冷的 Carney's 固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$)中,冰浴固定,每 15 min 更换固定液,共换液 3 次。将固定后的样品放入已预冷的解离液($V_{\text{冰醋酸}}:V_{\text{蒸馏水}}=1:1$)中,将鳃丝剪碎,用预冷的一次性吸管吹散鳃丝上的细胞,用手指轻弹管壁或将离心管上下颠倒数次,形成样品的细胞悬浮液,最后放入 4 ℃冰箱预冷。热滴片制片,采用 10%吉姆萨染液染色 30 min,蒸馏水冲洗 5~10 s,自然干燥后镜检。

1.2.2 核型计数及分析 OLYMPUS BX51 显微镜下对刀鲚染色体中期分裂相进行拍照,每尾鱼平均选取 12 个,共获得 180 个分布良好且清晰的分裂相,用 Image-Pro Plus 6.0 软件对染色体进行计数。雌雄各选 15 个具有代表性(分布效果良好、数目清晰完整、长度适中、着丝点清楚)的中期分裂相进行染色体配对和长度测量,根据 Levan 等^[18]的标准对染色体进行配对、分类、组型排列,计算染色体相对长度(实测单条长度×2/全部染色体长度总和×100%)。采用 *t* 检验方法,利用 SPSS 24 软件对雌雄凤鲚间及相邻的染色体相对长度进行

差异显著性检验($P<0.05$)认为差异显著。

1.2.3 组织酶液的制备 实验前,准确称取适量组织,按 1:10 (g:mL)的比例加入 4℃ 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0),在冰浴条件下研磨充分,放入离心管,冷冻离心机 4℃ 12000 r/min 条件下离心 30 min,取上清酶液与等量蔗糖溶液混合后,加入适量 1%的溴酚蓝溶液作指示剂,4℃短时间保存。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳 采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(PAGE)方法对各组织进行电泳,参考张庆朝等^[19]和葛彦龙等^[20]的方法,分离胶浓度为 6% (pH 8.8),浓缩胶浓度为 4.0% (pH 6.8),电极缓冲液为 Tris-Gly (pH 7.0),冰浴条件下(4℃左右),180 V 恒压电泳 40 min。

1.2.5 LDH 同工酶染色方法及命名 LDH 同工酶染色方法参照朱蓝菲^[21]、刘磊等^[22]的方法略作修改,具体方法为:乳酸钠(1 mg/mL):氧化型辅酶 I 溶液(NAD^+ , 5 mg/mL):NaCl (0.1 mol/L):甲硫吩嗪(PMS, 1 mg/mL):氯化硝基四氮唑蓝(NBT, 1 mg/mL):磷酸盐缓冲液(PBS, 0.5 mol/L, pH 7.5)=2.5:4.0:2.5:1.0:10.0:5.0,按比例进行配制,现配现用;电泳结束后,取出凝胶板,完全浸入染色液中,恒温(37℃)染色 15 min,待显带清晰后,蒸馏水冲洗,相机拍照保存。LDH 的命名及缩写参考 Shaklee 等^[23]的方法。

1.2.6 LDH 研究统计分析 根据 LDH 酶带的分布与相对迁移率,从电泳阴极到阳极依次由 LDH-C₄、LDH-A₄、LDH-A₃B、LDH-A₂B₂、LDH-AB₃、LDH-B₄命名,并对酶带数量进行分析,观察各组织酶带数量是否存在差异;采用 Image J 对电泳图谱进行灰度识别,绘制电泳图谱模式图,分析刀鲚 LDH 酶带的活性表达。

2 结果与分析

2.1 刀鲚二倍体染色体数目

在显微镜下,对 15 尾刀鲚(♂5, ♀10)的 180 个中期分裂相(2n, ♂60, ♀120)进行计数、统计(表 1)。结果表明,刀鲚染色体数目为 48 条,雄性占所测 60 个雄性中期分裂相的百分比为 86.0%,雌性占所测 120 个雌性中期分裂相的百分比为 75.8%,综上可以判定刀鲚的染色体数目为 2n=48。

表 1 刀鲚分裂中期染色体数目统计结果
Tab. 1 The metaphase chromosome number of *Coilia nasus*

项目 item	染色体数(2n) number of chromosomes (2n)					
	性别 sex	<6	46	47	48	49 合计 total
中期分裂相数目 number of metaphases	雄性 male	3	2	2	52	1 60
	雌性 female	23	3	2	91	1 120
所占百分比/% percentage	雄性 male	5	3.3	3.3	86	1.7 100
	雌性 female	15.3	2.7	5.3	75.8	0.7 100

2.2 刀鲚的染色体核型

通过对刀鲚雌鱼和雄鱼各 15 个良好的中期分裂相进行显微拍照统计分析,得出刀鲚雌鱼和雄鱼染色体的相对长度和臂比(表 2)。按照 Leven 等^[18]的标准分析,刀鲚的染色体组型均为 t 型(染色体全部属于端部着丝粒染色体),核型公式为:2n=48t, NF=48。雄性刀鲚染色体相对长度最短为 2.98±0.24,最长为 5.67±0.34;雌性刀鲚染色体相对长度最短为 2.32±0.30,最长为 5.67±0.22。 t 检验结果显示,雌雄刀鲚第 12~16 和 24 对染色体的相对长度差异显著($P<0.05$),其中第 13、24 对染色体相对长度雌雄差异极显著($P<0.01$)。

根据表 1 数据,按照染色体相对长度由大到小排列,得到刀鲚的染色体中期分裂相核型图(图 1,图 2),结果发现,刀鲚的雌雄染色体均可配对成为 24 对同源染色体,其染色体数为 48 条,但在雌鱼中发现第 24 对染色体中有一点”状的染色体(图 1 箭头所示)与其他染色体形态存在明显差异。为验证该“点状物质”是否存在于刀鲚雌性个体中,本研究对 15 尾刀鲚雌鱼共 120 个染色体中期分裂相进行了众数统计分析(表 3),结果发现在刀鲚雌鱼的 120 个中期分裂相中,具有该“点状物质”的分裂相所占百分比为 90.80%,证明该“点状物质”为刀鲚雌鱼的染色体,可称其为刀鲚的异形性染色体。综上认为,在刀鲚中存在异形性染色体,其性染色体类型为 ZW/ZZ 型。

2.3 刀鲚不同组织 LDH 同工酶分析结果

PAGE 电泳图谱及其模式图分析结果显示,刀鲚 LDH 酶带共有 6 条(图 3),由 LAD-A、LDH-B

表 2 刀鲚染色体相对长度和臂比值
Tab. 2 The relative length and arm ratio of *Coilia nasus* chromosomes

n=15; $\bar{x}\pm SE$

序号 no.	雄性 male			雌性 female			雌雄差异性 difference between male and female
	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	类型 type	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	类型 type	
1	5.67±0.34	∞	t	5.67±0.22	∞	t	--
2	5.14±0.26	∞	t	5.17±0.20	∞	t	-
3	4.94±0.17	∞	t	4.97±0.17	∞	t	-
4	4.81±0.15	∞	t	4.80±0.09	∞	t	-
5	4.69±0.13	∞	t	4.69±0.10	∞	t	-
6	4.59±0.10	∞	t	4.61±0.10	∞	t	-
7	4.50±0.07	∞	t	4.52±0.10	∞	t	-
8	4.42±0.07	∞	t	4.45±0.10	∞	t	-
9	4.34±0.07	∞	t	4.38±0.10	∞	t	-
10	4.28±0.07	∞	t	4.32±0.11	∞	t	-
11	4.23±0.07	∞	t	4.27±0.09	∞	t	-
12	4.16±0.07	∞	t	4.23±0.09	∞	t	*
13	4.10±0.07	∞	t	4.17±0.08	∞	t	**
14	4.04±0.08	∞	t	4.11±0.09	∞	t	*
15	3.98±0.07	∞	t	4.05±0.07	∞	t	*
16	3.92±0.09	∞	t	3.97±0.05	∞	t	*
17	3.85±0.10	∞	t	3.90±0.07	∞	t	-
18	3.79±0.11	∞	t	3.83±0.07	∞	t	-
19	3.71±0.12	∞	t	3.73±0.10	∞	t	-
20	3.65±0.13	∞	t	3.64±0.15	∞	t	-
21	3.55±0.15	∞	t	3.55±0.23	∞	t	-
22	3.41±0.10	∞	t	3.44±0.30	∞	t	-
23	3.26±0.16	∞	t	3.27±0.31	∞	t	-
24	2.98±0.24	∞	t	2.32±0.30	∞	t	**

注: ∞表示臂比大于 7.0, -表示差异不显著($P>0.05$), *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).
Note: ∞ indicates that the arm ratio is greater than 7.0; - indicates that the difference is not significant ($P>0.05$); * indicates that the difference is significant ($P<0.05$); ** indicates that the difference is extremely significant ($P<0.01$).

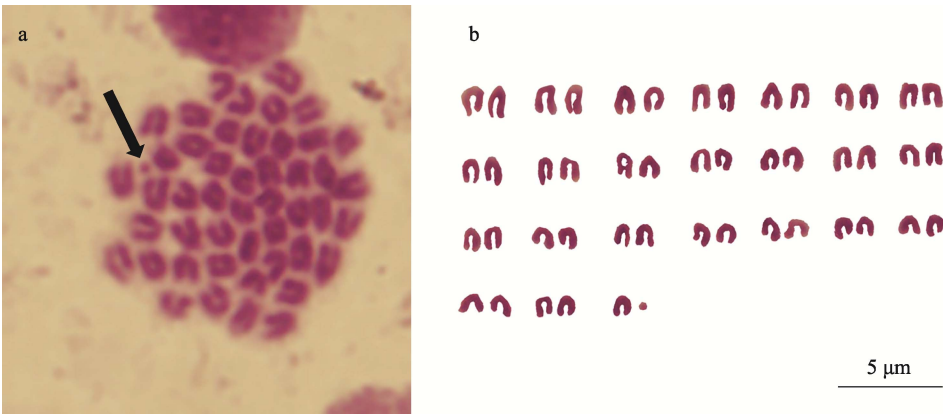


图 1 雌性刀鲚染色体中期分裂相(a)与核型图(b)
箭头表示异形性染色体.
Fig. 1 The metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of the female *Coilia nasus*
Arrow shows heteromorphic sex chromosome.

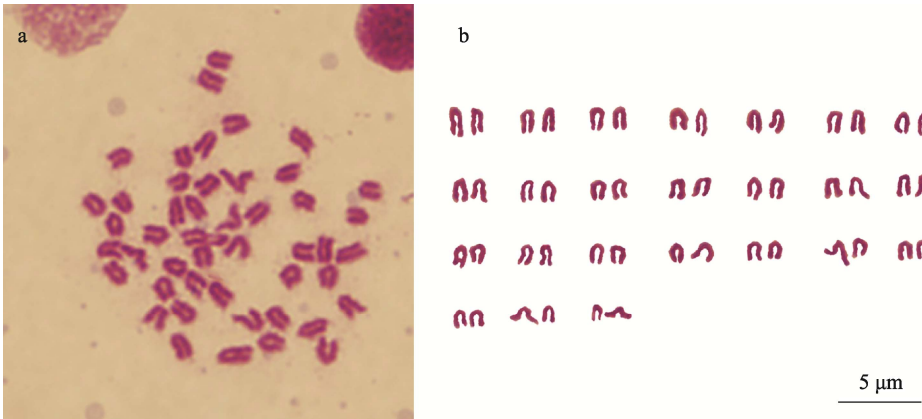


图 2 雄性刀鲚染色体中期分裂相(a)与核型图(b)
Fig. 2 The metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of the male *Coilia nasus*

表 3 刀鲚存在异形性染色体中期分裂相数目
Tab. 3 Number of metaphases with heteromorphic sex chromosomes in *Coilia nasus*

项目 item	中期分裂相 metaphase		
	无 no	有 have	合计 total
存在异形性染色体数目 number of heteromorphic sex chromosomes	11	109	120
所占百分比/% percentage	9.2	90.8	100

位点自由组合而成的 LDH-A₄、LDH-A₃B、LDH-A₂B₂、LDH-AB₃、LDH-B₄ 5 种典型 LDH 酶带,在 6 种组织中均有表达,各组织的活性强度不同(图 3);由 LDH-C 位点组合而成的第 6 条酶带 LDH-C₄ 仅在刀鲚肝脏酶谱中有表达。根据刀鲚各组织 LDH 电泳酶谱染色深浅和模式图分析发现(图 3),刀鲚不同组织的 LDH 活性具有组织特异性,在心脏中,LDH-A₄、LDH-A₃B、LDH-A₂B₂、LDH-AB₃、LDH-B₄ 5 条酶带由正极到负极,活性逐渐减弱,LDH-B₄ 活性表达占优势;

肝脏相对其他组织酶带活性最小,活性强度分布不均,其 LDH-A₃B 表达占优势;肾脏中 LDH-B₄ 活性表达占优势,其余 4 条酶带活性强度分布均匀;眼、肌肉、鳃中,LDH-B₄ 活性表达均占优势,眼中 LDH-A₂B₂ 活性表达较弱,肌肉和鳃中 LDH-AB₃ 活性表达相对较弱。

2.4 不同群体刀鲚 LDH 比较分析结果

2.4.1 眼 LDH 比较分析 对 4 个不同群体刀鲚眼 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 4),结果显示,扬中群体、崇明群体、灌河群体中不同个体眼的酶谱条带都呈现出 5 条带,扬中群体中 3 号个体,嵊泗群体中 11 号个体的酶带表达的相对位置与其他个体所在位置存在差异性;在 4 个群体中,除 3 号、11 号个体以外,其余个体的 LDH-B₄ 活性表达占优势,而 3 号、11 号个体的 LDH-A₄ 表达占优势,表现出刀鲚个体酶带活性差异性;4 个群体中,眼的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为扬中群体、崇明内河群体、灌河群体和嵊泗群体。

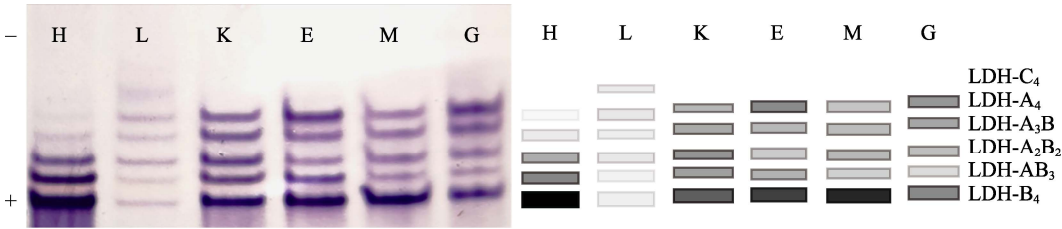


图 3 刀鲚 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图
H: 心脏; L: 肝脏; K: 肾脏; E: 眼; M: 肌肉; G: 鳃。
Fig. 3 PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of *Coilia nasus* LDH isozyme
H: heart; L: liver; K: kidney; E: eye; M: muscle; G: gill.

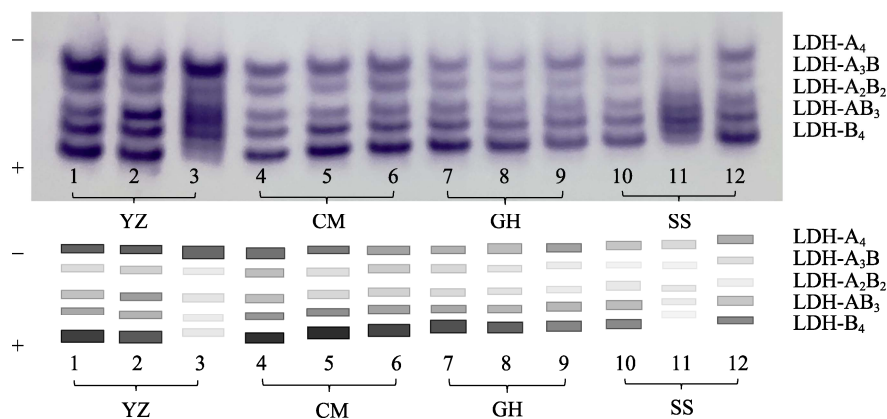


图4 4个不同群体刀鲚眼 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵊泗.

Fig. 4 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of eye in *Coilia nasus* from four populations
YZ: Yangzhong population; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS: Shengsi population.

2.4.2 肌肉 LDH 比较分析 对 4 个不同群体刀鲚肌肉 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 5), 结果显示, 扬中群体、崇明群体、灌河群体中不同个体肌肉组织的酶带均呈现为 5 条带, 而在嵊泗群体中, 10 号个体仅表达出 3 条酶带, 无 LDH-A₃B、LDH-A₂B₂ 和 LDH-B₄ 条带, 不同刀鲚个体间酶带数量呈现差异性。在扬中群体中, LDH-A₄ 活性表达占优势; 崇明内河群体和灌河群体中, LDH-B₄ 表达占优势; 嵊泗群体中, 9 号、10 号个体中 LDH-A₄ 活性表达占优势, 而 11 号、12 号个体 LDH-B₄ 表达占优势; 表现出明显的个体酶带活性表达差异性; 4 个群体中, 肌肉组织的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为扬中群体、嵊泗群体、崇明内河群体和灌河群体。

2.4.3 肝脏 LDH 比较分析 对 4 个群体肝脏组织 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 6), 结果显示, 4 个群体刀鲚均呈现出 6 条酶带, 但在嵊泗群体中, 10 号个体仅表达出 3 条酶带, 无 LDH-A₃B、LDH-A₂B₂ 和 LDH-B₄ 条带, 不同刀鲚个体间酶带数量呈现差异性。在扬中群体、崇明内河群体和灌河群体中, LDH-C₄ 活性表达占优势; 嵊泗群体中, 9 号个体和 12 号个体 LDH-A₄ 活性表达占优势, 11 号个体 LDH-C₄ 活性表达占优势, 个体酶带活性表现出明显差异性; 4 个群体中, 肝脏组织的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为嵊泗群体、灌河群体、扬中群体、崇明内河群体。

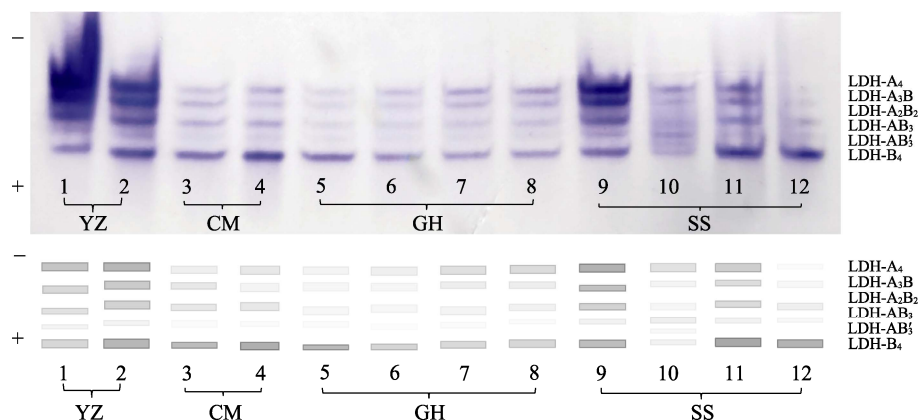


图5 4个不同群体刀鲚肌肉 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵊泗.

Fig. 5 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of muscle in *Coilia nasus* from four populations
YZ: Yangzhong population; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS: Shengsi population.

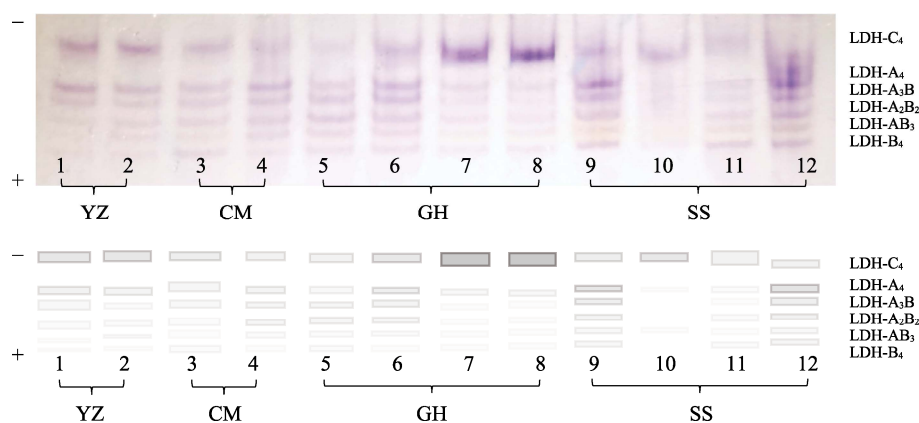


图 6 4 个不同群体刀鲚肝脏 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵊泗.

Fig. 6 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of liver in *Coilia nasus* from four populations
YZ: Yangzhong population; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS: Shengsi population.

3 讨论

3.1 刀鲚染色体核型

本研究发现刀鲚雌鱼中存在异形性染色体, 这与许世杰等^[11]和洪云汉等^[12]所报道的结果有明显差异。在短颌鲚染色体核型报道^[12]中指出, 短颌鲚雌鱼的染色体数目为 $2n=47$, 雌雄染色体数目不同, 其原因是雌性染色体缺失导致; 经染色体配对发现雌鱼有一较小的染色体不能进行配对, 但在雄鱼中是可进行配对的, 故洪云汉等^[12]提出短颌鲚的性染色体类型为 ZO/ZZ 型; 但本研究通过对刀鲚染色体核型分析发现, 在绝大多数 (90.8%) 刀鲚雌鱼的核型计数、配对过程中有一与其他染色体明显不同的“点状物质”(图 1), 笔者对凤鲚染色体核型结果再次进行分析时, 也同样发现凤鲚雌鱼中存这样一个“点”^[13], 并且在短颌鲚雌鱼中期分裂相中, 也同样存在这一个“点”, 综上在几种不同鲚属鱼类雌性染色体中期分裂相中都发现该“点”的存在, 而在刀鲚核型分析的报道结果中却未发现该“点”的存在^[11], 推测可能在染色体标本制作时该点被误认为是杂质, 也可能是在核型分析时由于其他染色体对其遮挡, 未能发现该“点状物质”的存在。

为确认该“点”是否存在于刀鲚雌性个体中, 本研究对 15 尾刀鲚共 120 个染色体中期分裂相进行了众数统计分析(表 3), 发现存在该“点”的中期

分裂相占所测 120 个中期分裂相的百分比为 90.80%, 并且在凤鲚核型分析结果中, 凤鲚雌鱼中存在该“点”的中期分裂相占所测 120 个中期分裂相的百分比为 84.20%^[11]。综上, 初步判定该“点”不是染色体标本制作时产生的杂质, 而是鲚属鱼类雌鱼的异形性染色体。刀鲚的染色体数目均为 $2n=48$, 雌雄刀鲚之间不存在染色体数目上的差异(表 1), 但刀鲚雌鱼中存在与其他染色体不同的异形性染色体, 其在雌鱼染色体核型配对的方式与雄鱼不同, 故刀鲚的性染色体类型为 ZW/ZZ 型, 以雌性异配型的 W 染色体决定其后代性别, 该类型的性染色体在鱼类的研究中已有相关报道^[24]。

通过 t 检验发现, 刀鲚异形性染色体的相对长度与同型性染色体具有极显著差异, 使雌鱼中 W 型性染色体与其他染色体明显区分, 并可通过肉眼观察出来。半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)^[24]雌雄染色体对比结果中也发现 ZW/ZZ 型的性染色体类型, 但不同的是半滑舌鲷性染色体的相对长度较刀鲚更大, 这一现象可能与鲚属鱼类与半滑舌鲷所处生境不同有关。

3.2 刀鲚同工酶表达的组织特异性

本研究中, 刀鲚的 6 种主要组织均能检测到 LDH 表达, 表明在刀鲚体内 LDH 分布广泛。LDH 在刀鲚各组织中具有组织特异性, 在肝脏中检测到 6 条酶带表达, 而其他组织中均检测到 5 条酶

带,各不同组织之间的酶带活性分布存在不同;肝脏酶带活性明显比其他几种组织酶带活性低(图1)。

硬骨鱼类中 LDH 同工酶一般为四聚体酶,由 LAD-A、LDH-B 和 LDH-C 3 个基因位点控制,其中 LDH-C 具有组织差异性,表达编码所需的蛋白质电荷与 LAD-A、LDH-B 不同^[25-26]。LDH-C 基因位点首先在鱼类的眼中发现,有“眼带”之称^[27]。在已有报道中,发现 LDH-C 在鱼类的眼、肝脏中都有所表达,肝脏中出现的 LDH-C 基因编码的酶带称其为“肝带”^[28]，“肝带”电泳时一般偏向阴极端^[29]。本研究发现刀鲚肝脏组织都存在偏向阴极的“肝带”，这一现象与细鳞斜颌鲴(*Xenocypris microlepis*)^[30]、蒙古红鲌(*Erythroculter mongolicus*)^[31]的结果相似。肝脏在动物机体中是重要的代谢功能器官,具有重要生理作用,如解毒、糖原储存、蛋白合成的促进作用、分泌胆汁促消化等^[32],刀鲚肝脏组织发现“肝带”的表达,这可能与其肝脏所需要执行的重要生理功能相适应。

3.3 LDH 在刀鲚不同群体的表达

刀鲚 LDH 研究虽已有相关报道,但本研究较以往研究,存在如下差异:(1)已报道的刀鲚 LDH 研究中,均未发现刀鲚肝脏中有 LDH-C₄ 酶带的表达;(2)本研究中发现刀鲚的肌肉组织中存在 5 条酶带,LDH-AB₃ 酶带有所表达,与刘文斌^[16]对刀鲚肌肉 LDH 的研究结果相同。笔者推测以上两点差异的原因如下:(1)鱼体本身不同组织中酶带的编码基因并非同步表达,从而造成有些酶带表达不明显,使其酶带数量的表达存在差异性;(2)即使控制酶带的编码基因同步表达,但活性表现程度不同,或由于不同组织的生理功能不同,酶带受不同影响因子的调控,而造成各组织间 LDH 同工酶的含量或活性的不同,最后形成酶带强弱的差异性^[33];(3)检测差异:样品的获取、制备和保存方式不同,实验方法、实验条件存在不同,如凝胶板分离胶的浓度不同,缓冲液 pH 不同,电泳时电压的不同,电泳时间差异等,都可造成 LDH 酶谱表达的差异性。

本研究对刀鲚不同群体间不同组织 LDH 的

表达做了对比分析,发现刀鲚样品的来源不同可导致其酶带表达具有差异性。本研究对扬中养殖刀鲚、灌河、崇明内河和嵊泗野生刀鲚的眼、肝脏、肌肉组织的 LDH 进行了对比分析,结果发现,不同群体中,多数刀鲚个体的眼、肌肉组织均存在 5 条酶带,肝脏组织多为 6 条酶带,即说明在刀鲚眼、肌肉组织普遍存在 5 条酶带,而肝脏中存在“肝带”——LDH-C₄ 酶带。此外,刀鲚的 LDH 酶带表达具有明显个体差异性,本研究发现嵊泗群体 10 号或 11 号个体在不同组织中存在酶带的异常表达,在眼中(图4)11号个体酶带分布异常,在肌肉组织中(图5),10号个体表现出 6 条酶带,在肝脏中(图6),10号个体仅表现出 3 条酶带,推测可能与其生存的地理环境的多变性相关,这与张芹等^[34]实验结果相似,由于水质环境等因素造成不同水域团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)同种组织 LDH 酶带数目存在差异,但具体原因有待进一步探究。

3.4 刀鲚生化遗传标记的选择

在生化遗传标记的选择中,刀鲚的肝脏组织中虽然具有其他组织未检测到的 LDH-C₄,但其活性低,表达不稳定,故不能作为刀鲚种质鉴定的生化遗传标记,在其余 5 个组织中发现,LDH 在刀鲚眼中表达相对稳定且强烈,并易获取,建议采用眼 LDH 作为刀鲚的生化遗传标记。

4 结论

刀鲚的染色体数目为 $2n=48$; 其雌雄染色体核型公式均为 $2n=48t, NF=48$, 雌性存在异形性染色体,性染色体类型为 ZW/ZZ 型。首次发现了刀鲚的雌性异形性染色体,并对笔者以往的风鲚染色体核型结果予以纠正。

对刀鲚 6 种组织进行 LDH 检测,刀鲚 LDH 特征:酶带共有 6 条,LDH-C₄ 酶带仅在肝脏中表达,除 LDH-C₄ 外的其他 5 种 LDH 酶带在各组织中均有表达;刀鲚体内 LDH 的分布较为广泛,具有明显组织特异性;刀鲚眼 LDH 酶带的表达丰富,并且活性稳定,可作为刀鲚生化遗传标记鉴定刀鲚生化种质特征。

参考文献:

- [1] Zhuang P, Zhang T, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary (second edition)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2018: 125-126. [庄平, 张涛, 李圣法, 等. 长江口鱼类(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 125-126.]
- [2] Zhang S S, Luo J, Chen B J, et al. A study on morphological differences of *Coilia nasus* from different populations[J]. Freshwater Fisheries, 2020, 50(3): 26-33. [张赛赛, 罗珺, 陈博锦, 等. 不同群体刀鲚形态差异研究[J]. 淡水渔业, 2020, 50(3): 26-33.]
- [3] Hu Y B. A preliminary study on the age structure and growth characteristics of *Coilia mystus* and *Coilia nasus* in the Yangtze River Estuary[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [胡永斌. 长江口凤鲚和刀鲚年龄结构与生长特征的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [4] Shi Y H, Zhang G Y, Zhang H M, et al. Complete artificial propagation and embryonic development of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 36-43. [施永海, 张根玉, 张海明, 等. 刀鲚的全人工繁殖及胚胎发育[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 36-43.]
- [5] Liu Y S, Shi Y H, Deng P P, et al. Growth of one-year *Coilia nasus* and pond water quality under high density cultivation[J]. Southwest China Journal of Agriculture Science, 2020, 33(7): 1593-1600. [刘永士, 施永海, 邓平平, 等. 高密度培育条件下刀鲚一龄鱼种生长与池塘水环境[J]. 西南农业学报, 2020, 33(7): 1593-1600.]
- [6] Du F K, Xu G C, Nie Z J, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 558.
- [7] Gao J W, Du F K, Gu R B, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizin on transport response in *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(6): 817-825. [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 817-825.]
- [8] Zhu G L, Wang L J, Tang W Q, et al. De novo transcriptomes of olfactory epithelium reveal the genes and pathways for spawning migration in Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*)[J]. Plos One, 2014, 9(8): e103832.
- [9] Arai R. Fish Karyotypes(ed)[M]. Tokyo: Springer, 2011: 10-35.
- [10] Zhong S P, Chen C, Wang J, et al. Chromosome karyotype of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. 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[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 150-155.]
- [11] Xu S J, Li Y Y, Fu G B, et al. Chromosome karyotype analysis of *Coilia nasus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(7): 155-157. [许世杰, 李园园, 付官宝, 等. 刀鲚染色体核型分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(7): 155-157.]
- [12] Hong Y H, Zhou T. Karyotype of *C. brachygnathus* and its ZZ-ZO sex chromosome[J]. Hereditas, 1984, 6(4): 12-14. [洪云汉, 周瞰. 短颌鲚的核型及其 ZZ-ZO 性染色体[J]. 遗传, 1984, 6(4): 12-14.]
- [13] Jiang J, Zhuang P, Song C, et al. The karyotype of *Coilia mystus*[J]. Marine Fisheries, 2020, 42(1): 45-52. [蒋俊, 庄平, 宋超, 等. 凤鲚染色体核型研究[J]. 海洋渔业, 2020, 42(1): 45-52.]
- [14] Ardestani G, Rogelio D R, Reyes R, et al. Genetic diversity of two Philippine native freshwater goby species (Perciformes: Gobiidae): implications for conservation[J]. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 2014, 24(5): 592-600.
- [15] Zhou Z H, Lin J B, Wang F S, et al. Study on lactate dehydrogenase isoenzyme and sarcoplasmic protein electrophoresis of *Coilia*[J]. Journal of Nanjing University: Natural Science, 1986, 22(3): 440-445. [周宗汉, 林金榜, 王峰松, 等. 鲚属 *Coilia* 鱼类乳酸脱氢酶同工酶及肌浆蛋白电泳的研究[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1986, 22(3): 440-445.]
- [16] Liu W B. Biochemical and morphological comparison and interspecific of four species of the genus *Coilia* in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(5): 558-565. [刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 558-565.]
- [17] Xu G C, Dong J J, Nie Z J, et al. Studies on lactate dehydrogenase isozymes and DNA content in different tissues of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4): 481-488. [徐钢春, 董晶晶, 聂志娟, 等. 刀鲚不同组织的乳酸脱氢酶同工酶及 DNA 含量研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 481-488.]
- [18] Levan A, Fredga K A S. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201-220.
- [19] Zhang Q C, Wang H, Qin Z J, et al. Study on polyacrylamide gel electrophoresis of lactate dehydrogenase isozyme in fish[J]. Biotechnology, 1994, 4(5): 38-40. [张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 鱼类乳酸脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究[J]. 生物技术, 1994, 4(5): 38-40.]
- [20] Ge Y L, Yin H B, Shi L Y, et al. Improved fish isozyme electrophoresis[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(2): 51-52. [葛彦龙, 尹洪滨, 石连玉, 等. 鱼类同工酶电泳方法的改进[J]. 水产学杂志, 2010, 23(2): 51-52.]
- [21] Zhu L F. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of

- isozymes and proteins in fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 183-185. [朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J]. *水生生物学报*, 1992, 16(2): 183-185.]
- [22] Liu L, Zhang C J, Peng S M, et al. Differential expression of 4 kinds of isozyme in different tissues of *Pampus argenteus*[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(1): 68-75. [刘磊, 张晨捷, 彭士明, 等. 银鲳不同组织中 4 种同工酶的表达差异[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(1): 68-75.]
- [23] Shaklee J B, Kepes K L, Whitt G S. Specialized lactate dehydrogenase isozyme: the molecular and genetic basic for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes[J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1973, 185(2): 217-240.
- [24] Zhou L Q, Yang A G, Liu X Z, et al. The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*. 2005, 29(3): 417-419. [周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 417-419.]
- [25] Wang J X, Zhou C W. Lactate dehydrogenase isoenzymes in fish[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1989(1): 51-57. [王金星, 周才武. 鱼类的乳酸脱氢酶同工酶[J]. *海洋湖沼通报*, 1989(1): 51-57.]
- [26] Hu S Y, Peng Y, Zhao H T, et al. Study on isoenzymes of *Schizothorax kozlovi*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(18): 4540-4543. [胡思玉, 彭垠, 赵海涛, 等. 四川裂腹鱼同工酶研究[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(18): 4540-4543.]
- [27] Zhang Q C, Wang H, Qin Z J, et al. Study on isozymes of red scale fish in Taishan Mountain[J]. *Zoological Research*, 1994, 15(2): 62-67. [张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 泰山赤鳞鱼同工酶的研究[J]. *动物学研究*, 1994, 15(2): 62-67.]
- [28] Jiang X H, Zan R G, Gu S. Analysis on the developmental genetics of lactate dehydrogenase isozymes in Dianchi high-back grucian carp(*Carassius auratus*)[J]. *Southwest China Journal of Agriculture Science*, 1996, 9(4): 53-57. [蒋晓华, 胥瑞光, 谷甦. 云南滇池高背鲫鱼乳酸脱氢酶(LDH)同工酶发育遗传学分析[J]. *西南农业学报*, 1996, 9(4): 53-57.]
- [29] Ferris S D, Whitt G S. Loss of duplicate gene expression after polyploidisation[J]. *Nature*, 1977, 265(5591): 258-260.
- [30] Zhang T, Gan J H, Zhou J G, et al. Electrophoretic analysis for two kinds of isozymes expressed in 5 tissues of *Xenocypris microlepis*[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2019, 9(1): 10-17. [张涛, 甘金华, 周剑光, 等. 细鳞斜颌鲴 5 种组织 2 种同工酶的电泳分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(1): 10-17.]
- [31] Qin G X, Qi Z X, Tang G P, et al. Morphological characteristics and electrophoretic analysis of two kinds of isozymes in *Erythroculter mongolicus*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(1): 194-200. [秦改晓, 齐子鑫, 唐国盘, 等. 蒙古红鲌形态特征及其两种同工酶的电泳分析[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(1): 194-200.]
- [32] Zhang H J. Study on liver morphogenesis of *Glyptosternum maculatum* and biological adaptation[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2011. [张惠娟. 黑斑原鲃肝脏的发生及相关生物学适应性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.]
- [33] Yi J H, Zeng Z Y, Hao G Q. Electrophoretic study on lactate dehydrogenase and esterase isozyme of tilapia and silver carp[J]. *Freshwater Fisheries*, 1982(6): 22-25. [易健华, 曾治义, 郝广勤. 罗非鱼与鲢乳酸脱氢酶及酯酶同工酶的电泳研究[J]. *淡水渔业*, 1982(6): 22-25.]
- [34] Zhang Q, Kong L J, Qu C Y, et al. Tissue specificity analysis of two isozymes in *Megalobrama amblycephala* from Yi River[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2020, 10(5): 37-43. [张芹, 孔令军, 屈长义, 等. 伊河团头鲂 2 种同工酶组织特异性分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2020, 10(5): 37-43.]

Chromosome karyotype and LDH isoenzyme in different tissues of *Coilia nasus*

JIANG Jun^{1,2}, SONG Chao^{1,2,3}, ZHOU Liqing⁴, HU Lijuan^{1,2}, XIE Zhiwei^{1,2}, LIU Ruohui^{1,2}, ZHUANG Ping^{1,2,3}, ZHANG Tao^{1,2,3}

1. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment of the East China Sea and Yangtze Estuary, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Resources Enhancement and Ecological Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China;
3. Key Laboratory of Fisheries Ecology of the Yangtze Estuary, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: This study aimed to further understanding *Coilia nasus* germplasm resources, regarding aspects of cellular inheritance and biochemical inheritance, chromosome number, and karyotype structure of *C. nasus*, and to lay a theoretical foundation for screening the biochemical genetic markers of *C. nasus* germplasm. Short-term *in vitro* culture of gill filament cells was used to prepare chromosome specimens. Polyacrylamide gel electrophoresis was used to detect the expression of lactate dehydrogenase (LDH) in the heart, liver, kidney, eye, muscle, gill of *C. nasus*. The results showed that there was no difference in the number of chromosomes between males and females. The number of chromosomes was $2n=48$, all of which belonged to terminal centromeric chromosomes (t), and the karyotype was $2n=48t$. The number of arms (NF) was 48, and the sex chromosome type was ZW/ZZ. Unlike previous studies in which the karyotypes of *C. nasus* and *C. brachygnathus* were ZO/ZZ type, we found a “point” in the metaphase mitotic phase of the female chromosomes of *C. nasus*. Using mode analysis, we found that the probability of distribution of this “point” was more than 90.8% (120 metaphase mitotic phases), which was confirmed to be the female heteromorphic sex chromosome of *Coilia* species. A total of six LDH isoenzyme bands were detected in six tissues of *C. nasus* (heart, liver; kidney; eye, muscle; gill.), among which six bands were found in the liver tissue, with the lowest activity, and five bands were found in other tissues, with different activities. The expression of the LDH isoenzyme of *C. nasus* was tissue-specific. There were differences in LDH activity of *C. nasus* among different populations, in addition to individual differences. LDH is widely distributed in *C. nasus* and has obvious tissue specificity. The LDH enzyme band corresponding to expression in the eyes was highly expressed and presented stable activity, owing to which it can be used as a biochemical genetic marker for the identification of germplasm characteristics of *C. nasus*.

Key words: *Coilia nasus*; chromosome; karyotype; heteromorphic sex chromosome; lactate dehydrogenase (LDH); tissue specificity

Corresponding author: ZHANG Tao. E-mail: zhangtaoyfi@163.com

DOI: 10.12264/JFSC2021-0231

简单回归尺度转换实现半滑舌鲷性逆转基因的高效定位

黄岩^{1,3}, 宋禹昕^{2,3}, 蒋丽³, 杨润清³

1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 中国水产科学研究院生物技术研究中心, 北京 100141

摘要: 在间断性状全基因组关联分析中, 当基因组数据存在复杂群体分层时, 广义线性模型需要同时考虑上百个协变量, 其求解速度会大大下降而且还会产生异常解。本研究目的是把简单回归结果中显著位点的效应值和遗传力的尺度转化为可解释的广义线性回归结果。首先对亲缘关系矩阵进行谱分解, 特征向量作为主成分(PC), 矫正间断性状中的群体分层; 再求解每一个主成分的回归系数, 并将众多协变量与其各自的回归系数相乘, 得到的乘积合并为一个新的协变量; 然后将它作为简单回归的协变量, 逐个对标记进行关联检验; 最后对筛选获得的候选数量性状核苷酸(QTN)进行广义线性模型回归分析, 将效应和方差转化为广义线性回归模型尺度。采用本研究提出的方法与直接考虑主成分的广义线性回归模型, 分别对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的性逆转性状进行全基因组关联分析, 结果表明, 本研究方法的 QTN 检测效率更高, 共检测出 6 个 QTN, 其中 5 个 QTN 位于 Z 染色体上, 1 个 QTN 位于 W 染色体上, 并且在基因组控制方面, 本研究方法的基因组控制值与直接考虑 PC 的广义线性回归模型的基因组控制值相同, 均为 1.01, 处于较优水平。结论认为, 基于主成分分析的简单回归尺度转换方法能够在保证准确率的情况下提升 QTN 的检测效率, 实现间断性状快速稳健的全基因组关联分析, 同时检测出的 QTN 能为半滑舌鲷性逆转性状的研究提供理论指导。

关键词: 全基因组关联分析; 半滑舌鲷; 性逆转; 主成分; 尺度转换; 简单回归模型; 广义线性回归模型

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0245-07

全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)是在全基因组范围内, 以数以万计的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为分子标记, 探究基因变异与性状之间关联的研究。GWAS 已成为当今基因定位的主流方法, 广泛应用于人类疾病、动植物疾病、动植物性状改良、动植物遗传育种等方面。由于 GWAS 的样本来源于不同的种群, 每个种群独特的遗传历史、交配习惯、繁殖扩张以及随机变异都会使个体之间等位基因频率产生差异^[1-2], 存

在群体分层, 会导致关联分析过程中检验统计量膨胀, 从而降低对数量性状核苷酸(quantitative trait nucleotide, QTN)的检测效力。主成分分析法(principal component analysis, PCA)是当下应对该问题的主要策略^[3-4]。

间断性状, 即类似于性别、是否患病等表型, 可用二进制或者是不连续数字表示的性状。在进行基因定位时, 间断性状和连续性状一样, 也需考虑除检验标记外的群体分层、家系结构和隐藏亲缘等混杂因素^[5-6]。然而与呈现正态分布的连续

收稿日期: 2021-05-14; 修订日期: 2021-05-25.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900201); 中央公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2019ZY09).

作者简介: 黄岩(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为数量遗传学. E-mail: ayan0827@163.com

通信作者: 蒋丽, 副研究员, 研究方向为数量遗传学, E-mail: jiangl@cafs.ac.cn; 杨润清, 研究员, 研究方向为数量遗传学, E-mail: runqingyang@cafs.ac.cn

性状用剩余误差作为校正后的表型不同, 间断性状的表型形式较为特殊, 无法像连续性状一样估计表型的剩余误差, 这就需要引入广义线性模型 (generalized linear model, GLM) 中的 logit 回归, 对间断性状进行 GWAS。即使校正了一些固定效应协变量, logit 回归仍会受到群体分层的影响导致检验统计量膨胀。与线性模型 (linear model, LM) 相比较, 广义线性模型求解要消耗更多时间和计算机内存。当协变量比较多时, GLM 还会产生由近似引起的严重偏差问题^[7-8]。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 在动物分类上属于鲽形目 (pleuronectiformes)、舌鳎科 (cynoglossidae)、舌鳎属, 属于近海大型底栖暖温性动物, 分布于中国、朝鲜、日本, 在中国主要分布在黄海、渤海近海区域^[9], 是目前中国重要的海水养殖鱼类品种之一^[10]。不同性别的半滑舌鳎成体体重差异较大, 雌性舌鳎生长速度较快, 体重较大, 相比之下, 雄性舌鳎的体重较轻, 生长缓慢。在人工养殖过程中, 生理性别是雌性的舌鳎仅占 20%~35%^[11]; 此外, 半滑舌鳎是性逆转生物, 即在发育过程中, 生理性别可能发生改变, 即由遗传雌性逆转为生理雄性, 该现象在昆虫^[12]、爬行动物^[13]、两栖动物^[13]和鱼类^[14]中时有发生。已有研究认为半滑舌鳎在 Z 染色体上可能存在导致性逆转的基因^[15]。出于经济利益的考虑, 在半滑舌鳎养殖过程中控制性逆转的产生, 提高雌鱼的比例尤为重要。

半滑舌鳎性逆转性状在数量遗传学中被认为是间断性状, 对该类性状 QTN 的筛选通常采用广义线性回归分析, 对于存在群体分层的群体, 则可采用考虑主成分 (principal component, PC) 的广义线性回归模型进行基因定位。为了更好地校正存在于半滑舌鳎性逆转性状中的复杂群体分层, 以及提高 QTN 检测效力, 本研究将提出一种间断性状 GWAS 方法, 该方法可以将简单回归模型结果中显著位点的效应值和遗传力的尺度, 转化为可解释的广义线性回归模型结果, 降低了广义线性回归模型的求解难度和异常解出现的概率。本研究通过使用上述策略对半滑舌鳎性逆转性状进行 GWAS, 并与直接考虑 PC 的广义线性回归模

型 GWAS 结果作比较, 检验本研究提出的方法对群体分层的校正效果以及 QTN 检测效力, 同时对检测出的影响半滑舌鳎性逆转性状的多态性核苷酸位点进行分析阐述, 为以后半滑舌鳎性逆转性状的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验群体基因型与表型的获取

本研究所用半滑舌鳎实验群体育成于河北黄骅。2013 年 3 月, 随机选取 6 尾亲本雌鱼和 11 尾表型雄鱼作为亲本, 混合养殖, 亲本间随机交配繁殖, 产生后代。半滑舌鳎性逆转通常发生在孵化后的前 90 d, 为避免低温性逆转现象发生, 对子代幼鱼进行持续 90 d、恒温 22 ℃ 的养殖。90 d 之后, 随机选取 268 尾半滑舌鳎进行 DNA 提取、亲代分析、遗传和表型性别检测, 去除缺失数据, 115 尾雌性遗传基因被用于 GWAS。采集这 115 只雌性半滑舌鳎的鱼鳍和性腺, 并用鱼鳍提取 DNA, 提取鱼鳍组织 DNA 的具体操作步骤在 Jiang 等^[16]的文章中有详细的描述。采用 Chen 等^[17]提出的方法确定遗传性别, 利用遗传雌性的生殖腺组织切片进行表型性别鉴定, 得到表型数据。基因型数据由上海欧易生物技术有限公司测序分析得到, 使用 Illumina HiSeq2500 平台对 115 尾遗传型雌性的半滑舌鳎的鱼鳍 DNA 进行单端测序, 采用 2b-RAD 方法对测序结果进行基因分型, 质量控制后, 最终获得共 17618 个 SNP 标记。

1.2 方法

1.2.1 广义线性回归关联检验 考虑群体分层时, 通常以亲缘关系矩阵的主成分去校正由群体分层导致的分层效应, 根据广义线性模型理论, 连接函数建立起了间断性状表型向量 y (0 或 1) 的期望和被检验标记效应的关系:

$$\ln\left(\frac{\mu}{1-\mu}\right) = Xb + z\beta_1 \quad (1)$$

式中, μ 是 y 的期望, Xb 是固定效应项, β_1 为当前检验标记的加性遗传效应, z 为所对应的指示变量向量。

通常, 为了简化计算, 事先估计出 $X\hat{b}$ 并将它作为已知的回归项, 此时只需要用 $y^* - X\hat{b}$ 代替 y

求解标记的效应:

$$\hat{\beta}_1 = (z^T w z)^{-1} z^T w (y^* - X\hat{b}) \quad (2)$$

式中, $w = \mu(1-\mu)$ 是权重, $y^* = z\beta_1 + \frac{y-\mu}{w}$ 是由表型值和回归系数组成的新的因变量。

采用卡方统计量, 推断 SNP 与间断性状关联:

$$\chi^2 = \frac{\hat{\beta}_1^2}{(z^T w z)^{-1}} \quad (3)$$

这个统计量服从自由度为 1 的卡方分布。

1.2.2 简单回归关联检验 考虑群体分层时, 通常以亲缘关系矩阵的特征向量作为基因组简单线性回归模型的协变量去校正由群体分层导致的分层效应, 简单回归模型变为:

$$y = Xb + z\beta_c + e \quad (4)$$

式中, β_c 是简单回归模型求出的效应值, β_c 可以直接用最小二乘法求解, $e \sim N(0, \sigma_e^2)$ 是回归的误差项。采用卡方统计量, 推断 SNP 与间断性状关联:

$$\chi^2 = \frac{\hat{\beta}_c^2}{(z^T z)^{-1} \hat{\sigma}_e^2} \quad (5)$$

这个统计量服从自由度为 1 的卡方分布。

1.2.3 关联检验尺度转换 当广义线性模型的回归系数多, 群体小或标记等位基因频率较低时, 广义线性模型很难收敛, 理论和实践证明, GLM 与 LM 具有相同的统计效力^[18], 所以本研究先采用(4)中的简单回归模型对每个标记进行检验, 并以 Bonferroni 矫正阈值为标准, 筛选候选 QTN。假设检测到了 q 个候选 QTN, 将这 q 个标记指示变量 z 逐个代入考虑群体分层的广义线性模型中重新求解 β_1 , 将新求解出的 β_1 代替简单回归模型求解出的 β_c , 这样标记的效应值就从简单回归尺度转化到了广义线性回归尺度。此时, 总检测到

$$\text{QTN 的遗传力} = \frac{\sum_{i=1}^q \text{Var}(z_i \beta_{li})}{\sum_{i=1}^q \text{Var}(z_i \beta_{li}) + 1}, \text{ 其中第 } i \text{ 个}$$

$$\text{QTN 的遗传力} = \frac{\text{Var}(x_i \beta_{li})}{\sum_{i=1}^q \text{Var}(x_i \beta_{li}) + 1}。$$

2 结果与分析

在 GWAS 中, Q-Q 图是算法统计性质的直接体现; 曼哈顿图常用于显著 QTN 的定位和筛选, 分布于水平线即 5% Bonferroni 校正阈值线(2.838×10^{-6})之上的点即为显著 QTN; 基因组控制 (genomic control, GC) 值可以直接显示是否存在群体分层, GC 值接近 1 说明基因组控制效果较好。

2.1 基因组广义线性回归模型的 GWAS 结果

图 1 所示是半滑舌鲷性逆转性状考虑复杂群体分层的广义线性回归模型的 GWAS 结果。观察 Q-Q 图可以得知, 1 个 PC 和 3 个 PC 的 Q-Q 图前半段均未贴合理论线, 5 个 PC 的 Q-Q 图的前半段能够很好地贴合理论线, 后半部分上扬; 而且 1 个 PC 时的 GC 值为 2.37, 3 个 PC 时的 GC 值为 1.64, 5 个 PC 时的 GC 值为 1.01, GC 值和 Q-Q 图结果都显示, 1 个 PC 和 3 个 PC 时的群体结构未得到很好的校正, 存在假阳性。考虑 5 个 PC 的广义线性回归模型的 GC 值接近 1, 基因组控制效果较好, 观察曼哈顿图可见, 这时在 Z 染色体有 2 个 QTN 超过阈值线。

2.2 基因组简单回归模型尺度转换后的 GWAS 结果

半滑舌鲷性逆转性状使用基因组简单线性回归模型尺度转换后的 GWAS 结果如图 2 所示, 此方法把简单回归结果中显著位点的效应值和遗传力的尺度转化为可解释的广义线性回归结果。可以看出, 1、5、30 个 PC 的 Q-Q 图前面部分都能较好地贴合理论线, 尾部上扬, 说明 3 种情况都能对群体结构较好校正。计算 GC 值能直接了解基因组控制效果, 1 个 PC 的 GC 值为 1.1, 5 个 PC 的 GC 值为 1.1, 30 个 PC 的 GC 值为 1.01, 可以看出考虑 30 个 PC 的简单回归尺度转换方法对于群体分层的校正效果最好。由曼哈顿图可看出, 检测到 6 个 QTN, 5 个在 Z 染色体上, 1 个在 W 染色体上; 同时还检测到 13 号染色体的 1 个接近阈值的位点, 以及 Z 染色体上 3 个接近阈值的位点。

半滑舌鲷性逆转性状考虑 30 个 PC, 使用简单回归模型进行尺度转换, 然后进行 GWAS, 检出的 QTN 位点的详细信息如表 1 所示。表中 QTN

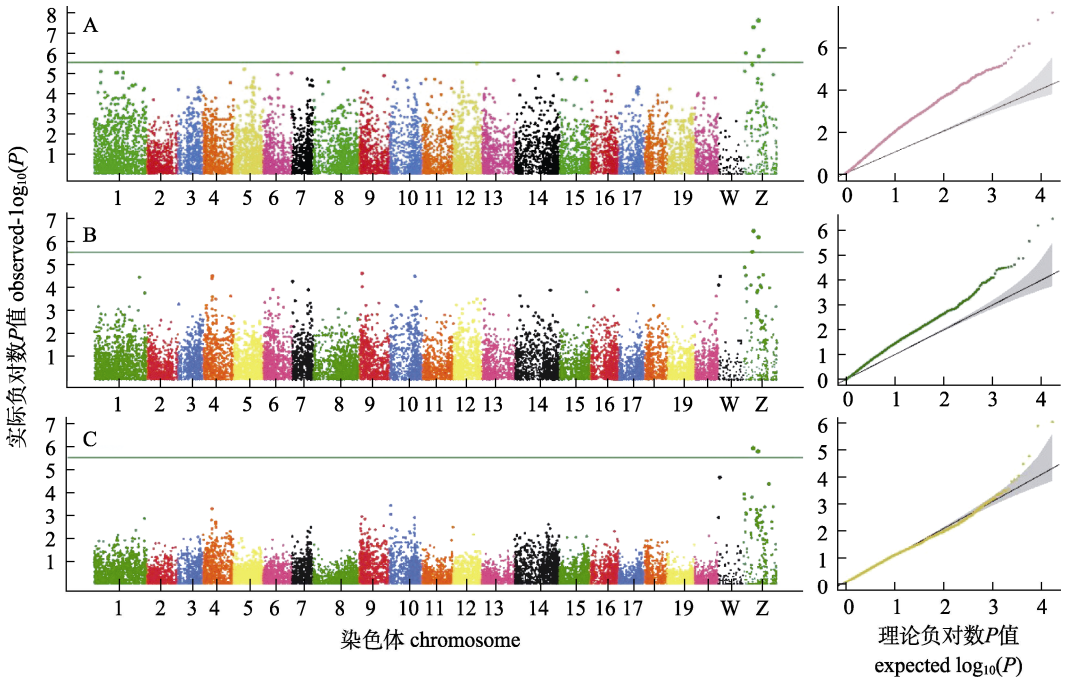


图 1 半滑舌鲷性逆转性状广义线性回归模型 GWAS 曼哈顿和 Q-Q 图

A. 1 个 PC, B. 3 个 PC, C. 5 个 PC

Fig. 1 Manhattan and QQ plots of generalized linear regression model GWAS on sex reversal traits in Half-smooth Tongue sole

A. 1 PC, B. 3 PCs, C. 5 PCs

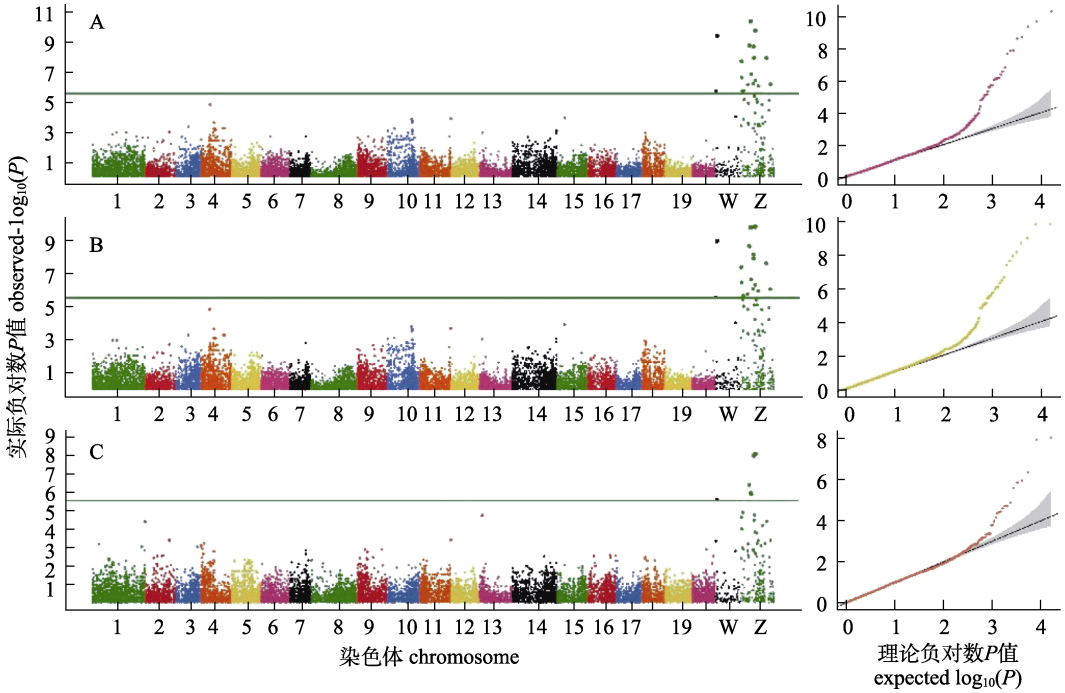


图 2 半滑舌鲷性逆转性状简单回归模型尺度转换 GWAS 曼哈顿和 Q-Q 图

A. 1 个 PC, B. 5 个 PC, C. 30 个 PC.

Fig. 2 Manhattan and QQ plots for scale transformation of simple regression model GWAS on sex reversal traits in Half-smooth Tongue sole

A. 1 PC, B. 5 PCs, C. 30 PCs.

遗传力说明各个位点能解释性逆转性状遗传变异的百分比, 6 个 P 值超出阈值的 SNP 位点即为检

测到的与半滑舌鲷性逆转性状相关的 QTN, 其余 4 个接近阈值的位点, 可作为候选 QTN。

表 1 检测到的与半滑舌鲷性逆转性状相关联的 QTN 信息

Tab. 1 QTN information associated with sex reversal trait detected in *Cynoglossus semilaevis*

染色体	位置	SNP 编号	基因名称	Lm 效应	Lm 标准误	Glm 效应	Glm 标准误	QTN 遗传力/%	P
chromosome	location	SNP ID	gene name	Lm effect	Lm standard error	Glm effect	Glm standard error	QTN heritability	
Z	9793913	M65579	Si:deky-193c22.1	-0.3032	0.0466	-1.2138	0.1864	0.189	8.24E-09*
Z	8643646	M65437	DAPK1	-0.4751	0.0735	-1.9015	0.2942	0.198	1.01E-08*
Z	5833328	M65164	ADGRD2	-0.2998	0.0538	-1.1999	0.2155	0.240	4.06E-07*
Z	6676874	M65244	FBXL17	-0.2540	0.0477	-1.0168	0.1910	0.236	1.08E-06*
Z	7256721	M65301	DMXL1	0.4827	0.0915	1.9322	0.3663	0.275	1.31E-06*
W	1218194	M63786	LOC103396896	0.5462	0.1067	2.1863	0.4270	0.275	2.40E-06*
Z	1633247	M64758	LOC103397473	-0.4116	0.0879	-1.6475	0.3516	0.270	1.26E-05
Z	9232660	M65511	无	0.3734	0.0811	1.4946	0.3245	0.275	1.70E-05
13	2140529	M40452	CD27	-0.9204	0.2006	-3.6840	0.8029	0.227	1.82E-05
Z	781540	M64676	MALT1	-0.2973	0.0657	-1.1902	0.2631	0.252	2.31E-05

注: *表示该 SNP 位点与性逆转性状显著相关($P<2.838\times10^{-6}$).
Note: * represent that the SNP location is significantly correlate with sex reversal trait ($P<2.838\times10^{-6}$).

3 讨论

本研究结果表明,简单回归尺度转换方法和广义线性回归模型都可以很好地校正关联分析中的群体分层,无论是评价指标中的 Q-Q 图还是基因组控制值,都显示只要考虑作为协变量的主成分数目恰当,就可以很好地控制全基因组关联分析中的假阳性。比较两种方法检出 QTN 的个数可知,基于简单回归尺度转换的简单回归模型比直接考虑 PC 的广义线性回归模型的 QTN 的检出效力更高,且使用简单回归尺度转换方法检测到的 QTN 高于已发表的方法,不但检测到了 Z 染色体上的 QTN,还检测到了 W 染色体的一个 QTN。

Z 染色体上位置为 9793913 的 SNP 位于 *si:deky-193c22.1* 基因上,未有研究者对该基因的功能进行探究。Z 染色体上位置为 8643646 的 SNP 在 *DAPK1* (death-associated protein kinase 1) 基因上, *DAPK1* 与细胞的死亡有关, Raval 等^[19]研究发现, *DAPK1* 的表达缺失或降低是人类慢性 B 淋巴细胞白血病发病的原因; Siqueira 等^[20]在不同性别牛胚胎对群落刺激因子 2 反应的研究中证实, *DAPK1* 的表达有受性别影响的趋势。Z 染色体上位置为 5833328 的 SNP 在 *ADGRD2* (adhesion G protein-coupled receptor D2) 的基因上。Z 染色体上位置为 6676874 的 SNP 在 *FBXL17* (F-box and leucine-rich repeat protein 17) 的基因上, Jiang 等^[16]

有关半滑舌鲷性逆转性状的研究发现, *FBXL17* 基因上位置为 6676874 的 SNP 与半滑舌鲷性逆转性状有关, 本研究所应用的方法也检测到了这一位点。Z 染色体上位置为 7256721 的 SNP, 在 *DMXL1* (Dmx like 1) 基因上, 人类 *DMXL1* 基因编码一个 11 kb 的 RNA, 开放阅读框 3027 个氨基酸, 主要具有调节功能^[21]。W 染色体上位置为 1218194 的 SNP, 是唯一检测到的 W 染色体上的 QTN, 在 *LOC103396896* 基因上, 还没有研究者对该基因功能进行深入的研究, 但是这个基因位于 W 染色体上, 有可能参与到性逆转性状的调控中。

除了检出的 5 个在 Z 染色体上的 QTN 和 1 个在 W 染色体上的 QTN 之外, 还检测到 Z 染色体上的另外 3 个 QTN, 但未超过阈值, 13 号染色体上也检测出了一个接近阈值的 QTN, 这几个位点如下: Z 染色体上位置为 1633247 的 SNP, 在 *LOC103397473* 基因上; Z 染色体上位置为 9232660 的 SNP, 未在基因编码区内; Z 染色体上位置为 781540 的 SNP, 在 *malt1* (MALT paracaspase 1) 基因上, MALT1 是在抗原受体介导的淋巴细胞活化中起关键作用的信号蛋白^[22]; 13 号染色体上检出的位点位置是 2140529, 在 *CD27* 基因上, CD27 是 T 细胞的共刺激分子, 可支持 naïve T 细胞的抗原特异性扩增, 若删除或改变编码 CD27 的基因, 免疫应答会发生延迟, 特异性 T 细胞数量减少^[23]。这些位点虽未超过阈值, 但可作为候

选 QTN, 为后续有关半滑舌鲷性逆转性状以及其他性状的全基因组关联分析研究奠定基础。

运用基于尺度转换的简单回归模型所检测出的与半滑舌鲷性逆转性状相关的位点, 除了 Z 染色体上位置为 6676874 的 SNP 与半滑舌鲷性逆转性状有关之外^[16], 其余位点到目前为止没有报告或有明显的证据表明与性别决定的各种途径直接相关, 但它们仍值得被关注, 因为这些位点基本都在 Z 染色体或者 W 染色体上。众所周知, Z 染色体和 W 染色体是半滑舌鲷的性染色体, 雌性为 ZW, 雄性为 ZZ, 这两条染色体上的基因以及他们的连锁基因对于性别决定都可能具有潜在的影响, 任一位置的突变都有可能对决定性别的基因产生影响。另外 4 个接近阈值的位点可作为候选 QTN, 为研究者们研究半滑舌鲷性逆转性状提供了候选研究位点。

参考文献:

- [1] Zhao J L, Li S L, Gao J, et al. Bare-bones regression scan for genome-wide mixed model association study[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2018, 49(7): 58-66. [赵敬丽, 李淑玲, 高进, 等. 全基因组混合模型关联分析的极速回归扫描法研究[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(7): 58-66.]
- [2] Slatkin M. Inbreeding coefficients and coalescence times[J]. Genetical Research, 1991, 58(2): 167-175.
- [3] Zhu X F, Zhang S L, Zhao H Y, et al. Association mapping, using a mixture model for complex traits[J]. Genetic Epidemiology, 2002, 23(2): 181-196.
- [4] Price A L, Patterson N J, Plenge R M, et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies[J]. Nature Genetics, 2006, 38(8): 904-909.
- [5] Bulmer M G. The effect of selection on genetic variability[J]. The American Naturalist, 1971, 105(943): 201-211.
- [6] Falconer D S, Mackay T, Longman P. Introduction to quantitative genetics[J]. American Journal of Human Genetics, 1990, 46(6): 1231.
- [7] Schall R. Estimation in generalized linear models with random effects[J]. Biometrika, 1991, 78(4): 719-727.
- [8] Gilmour A R, Anderson R D, Rae A L. The analysis of binomial data by a generalized linear mixed model[J]. Biometrika, 1985, 72(3): 593-599.
- [9] Song C, Jiang L, Wang J W, et al. Studies on genetic features of sex reversal in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(3): 207-212. [宋超, 蒋丽, 王景伟, 等. 半滑舌鲷性逆转的遗传特性研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(3): 207-212.]
- [10] Wan R J, Jiang Y W, Zhuang Z M. Morphological and developmental characters at the early stages of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50(1): 91-102. [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征[J]. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102.]
- [11] Liang Z, Chen S L, Zhang J, et al. Gonadal development process observation of half-smooth tongue sole in rearing population[J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(12): 2074-2078. [梁卓, 陈松林, 张静, 等. 半滑舌鲷养殖群体性腺发育观察[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 2074-2078.]
- [12] Narita S, Kageyama D, Nomura M, et al. Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: Feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(13): 4332-4341.
- [13] Quinn A E, Georges A, Sarre S D, et al. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile[J]. Science, 2007, 316(5823): 411.
- [14] Nagahama Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31(2-3): 105-109.
- [15] Shao C W, Li Q Y, Chen S L, et al. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish[J]. Genome Research, 2014, 24(4): 604-615.
- [16] Jiang L, Li H D. Single locus maintains large variation of sex reversal in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. G3 Genes|Genomes|Genetics, 2017, 7(2): 583-589.
- [17] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 243-251.
- [18] Yang J, Zaitlen N A, Goddard M E, et al. Advantages and pitfalls in the application of mixed-model association methods[J]. Nature Genetics, 2014, 46(2): 100-106.
- [19] Raval A, Tanner S M, Byrd J C, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (*DAPK1*) in chronic lymphocytic leukemia[J]. Cell, 2007, 129(5): 879-890.
- [20] Siqueira L G B, Hansen P J. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2[J]. Reproduction, 2016, 152(6): 645-654.
- [21] Kraemer C, Enklaar T, Zabel B, et al. Mapping and structure of DMXL1, a human homologue of the DmX gene from *Drosophila melanogaster* coding for a WD repeat protein[J].

- Genomics, 2000, 64(1): 97-101.
- [22] Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation[J]. Nature Reviews Immunology, 2004, 4(5): 348-359.
- [23] Hendriks J, Gravestein L A, Tesselaar K, et al. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity[J]. Nature Immunology, 2000, 1(5): 433-440.

Efficiently mapping the sex reversal genes of half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* using simple regression scale transformation

HUANG Yan^{1,3}, SONG Yuxin^{2,3}, JIANG Li³, YANG Runqing³

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
3. Research Centre for Aquatic Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: In genome-wide association analysis of discontinuous traits, when complex population stratification exists in genomic data, the generalized linear model needs to consider hundreds of covariables at the same time, which slows the calculation speed and presents abnormal solutions. This study aimed to transform the effect value and heritability scale of significant loci in simple linear regression results into interpretable generalized linear regression results. First, the eigenvectors solved by spectral decomposition of the kinship matrix were considered as the principal components (PCs) to correct the population stratification in the discontinuous traits dataset. Then, a new covariate was formed through the sum of the multiplications of each covariate, and its regression coefficient of the principal component was computed using a linear regression model. The new covariate was used as the covariable of simple regression to carry out correlation tests for markers one by one. Finally, the generalized linear model was used for regression analysis of candidate quantitative trait nucleotides (QTNs), and the effects and variance were transformed into the generalized linear regression model scale. The genome-wide association analysis of sex reversal traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) was conducted using the new method and the generalized linear regression model with direct consideration of principal components: The results show that the QTN detection efficiency of this method is higher, a total of 6 QTNs were detected, including 5 QTNs on Z chromosome and 1 QTN on W chromosome. In addition, in terms of genome control, the genome control value of the method in this study is the same as that of the generalized linear regression model which directly considers PC, which is at an optimal level of 1.01. Therefore, the simple regression scaling transformation method based on principal component analysis improved the detection power for QTN detection, while retaining the accuracy of results, with fast and robust genome-wide association analysis of discontinuous traits. In addition, the QTNs detected by the new method proposed in this study can provide theoretical guidance for the study of sex reversal traits in half-smooth tongue soles.

Key words: genome-wide association analysis; *Cynoglossus semilaevis*; sex reversal; principal component; scaling transformation; simple regression model; generalized linear regression model

Corresponding author: JIANG Li, E-mail: jiangl@cafs.ac.cn; YANG Runqing, E-mail: runqingyang@cafs.ac.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0294

营养代谢过程中黄条鰺幼鱼消化道菌群的演变趋势

姜燕¹, 于超勇², 徐永江¹, 柳学周¹, 王滨¹, 崔爱君¹, 薛致勇³

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
2. 山东省海洋科学研究院(青岛国家海洋科学研究中心), 山东 青岛 266104;
3. 海阳市黄海水产有限公司, 山东 烟台 265100

摘要: 为认识消化道菌群结构在宿主营养代谢过程中的变化规律, 并探讨饵料菌群对其的影响, 采用 16S rDNA 高通量测序技术, 对黄条鰺(*Seriola lalandi*)幼鱼一个完整摄食周期内的消化道菌群结构特征进行研究, 并解析其与饵料菌群的相关性。结果显示, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)和 *Faecalibacterium* 等是黄条鰺胃、幽门盲囊和肠道的共有优势定植菌群。结合营养代谢过程中优势菌属变化规律, 将乳杆菌属、肠弧菌属(*Enterovibrio*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Escherichia-Shigella*、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、鞘氨醇单胞菌属、拟杆菌属、甲基单胞菌属(*Methylobacter*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、气单胞菌属、弧菌属、普氏菌属(*Prevotella*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)和 *Faecalibacterium* 作为本研究黄条鰺幼鱼消化道的核心菌群; 其中的乳杆菌属、芽孢杆菌属、双歧杆菌属、芽孢乳杆菌属是水产养殖中常见的潜在益生菌; 而假单胞菌属、气单胞菌属、弧菌属和发光杆菌属中的部分菌株被视为潜在病原菌; 研究结果揭示了潜在益生菌与致病菌始终以动态平衡的状态定植于健康幼鱼的消化道内, 并参与宿主生理活动, 从微生态角度保障宿主健康。通过优势菌群结构演变趋势分析发现, 饵料菌群对营养代谢过程消化道菌群相对丰度的影响较大, 进一步揭示了饵料微生物安全的重要性。

关键词: 黄条鰺; 消化道; 核心菌群; 演变趋势; 高通量测序

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0252-12

在所有生命体中共存在 130 种水解酶、22 种多糖裂解酶、16 种碳水化合物酯酶, 而微生物基因组能够编码其中的大部分^[1-2]。消化道中定植着数以万亿计的微生物, 其组成、活性与宿主的遗传信息、营养水平及生存环境等息息相关^[3-5]。研究显示, 肠道菌群有助于鱼体能量的吸收^[6], 并且肉食性鱼类肠道中产蛋白酶的菌群丰度较高, 而草食性鱼类肠道中产淀粉酶和纤维素酶的菌群占据优势地位^[7]。可见, 消化道菌群在宿主营养消

化吸收过程中发挥了至关重要的作用。

黄条鰺(*Seriola lalandi*)是一种全球性分布的大洋性经济鱼类, 因其具有生长速度快、个体大、营养丰富、口感佳等特点, 成为我国发展深远海养殖的优良鱼种^[8]。伴随着我国相关单位的不断深入研究, 其繁育与养殖技术逐渐趋于成熟。目前, 关于黄条鰺种质遗传特性^[9-10]、生理生态环境^[11]、生殖与生长内分泌调控机制^[12-14]等方面的研究已取得一定成果。然而, 关于黄条鰺消化道菌群组

收稿日期: 2021-06-29; **修订日期:** 2021-08-16.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901204, 2019YFD0900901); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项经费项目(20603022021011, TD47, 2021GH05); 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0303-1).

作者简介: 姜燕(1985-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为海水鱼类肠道健康研究. E-mail: jiangyan@ysfri.ac.cn

通信作者: 柳学周, 研究员, 研究方向为海水鱼类增殖技术. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

成信息与分布特征方面的研究较少, 尤其是关于其营养消化吸收过程中消化道菌群演变趋势研究更是鲜有报道。本研究针对人工养殖环境条件下黄条鰺幼鱼消化道菌群结构特征开展研究, 并以此为基础, 追踪完整摄食周期内消化道各组织菌群结构的变化规律, 明确黄条鰺幼鱼消化道中的核心菌群, 为黄条鰺本土益生菌群的筛选提供基础数据, 并为从微生态调控角度促进营养消化吸收提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究在海阳市黄海水产有限公司的工厂化循环水车间开展, 实验用黄条鰺均来自于当年同一批受精卵孵化而来的幼鱼, 随机挑选 200 尾体表无任何病症的健康黄条鰺幼鱼进行实验, 其体重为(246.31±42.30) g, 体长为(22.62±1.17) cm。

1.2 实验设计

将挑选的实验鱼随机分布于 2 个 3 m×3 m×2 m 的工厂化循环水养殖池中, 水深 1.5 m, 每个养殖池 100 尾幼鱼。2 个养殖池位于黄条鰺幼鱼养殖车间, 实验幼鱼养殖水环境条件、饵料类型等与工厂化养殖的幼鱼的养殖管理完全相同。幼鱼入池后先进行一段时间的驯化, 驯化期间饵料为冰冻玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)(实验幼鱼驯化与正式实验期间, 冰鲜饵料均经简单冲洗后再投喂), 每天 7: 00 和 17: 00 分别进行饱食投喂, 每次摄食结束 30 min 后换水 1/2, 养殖池内始终保持流水状态。每次投喂时观察实验鱼摄食情况, 准确称量、计算并记录每次的摄食量, 当幼鱼连续 3 d 的摄食量相对稳定后开始正式实验。正式实验开始前先对幼鱼进行 48 h 的饥饿处理, 开始后按照驯化期间的投喂频率与时间进行饱食投喂, 摄食结束后捞出养殖池内残余的饵料, 实验期间的养殖管理与驯化期间的相同。驯化与实验期间, 水温 19~21 ℃, 溶解氧不低于 5 mg/L, 盐度 29~31, 氨氮浓度低于 0.1 mg/L。

1.3 实验样品采集与预处理

由于黄条鰺游速快且极易受惊, 在现有条件下, 为避免受惊对营养消化吸收造成不良影响,

本实验对 2 个养殖池采取轮流采集及小范围围捕的策略, 以最大程度降低捞鱼操作对实验鱼的惊扰。

以正式实验开始时的幼鱼第一个完整摄食周期为目标, 即正式实验开始的第一次投喂前(0 h), 摄食结束后的 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 分别从 2 个养殖池中轮流取样, 每次随机捞取 3 尾, 经 MS-222 (Fluka, USA)麻醉后, 于无菌环境下解剖并迅速取出消化道, 剔除消化道表面的血管和脂肪组织后用 75%乙醇迅速擦拭表面, 再用预冷的无菌生理盐水冲洗后于无菌条件下分离胃、幽门盲囊和肠道组织。将幽门盲囊和肠道分别采用无菌冻存管保存于液氮中备用, 将胃组织于无菌环境下纵向剖开, 如果胃组织内存在块/粒状内容物, 则用无菌镊子轻轻夹出丢弃, 将剩余半流体状态的内容物与胃组织一同采用无菌冻存管于液氮中保存备用。同时, 在投喂前随机选取 3 尾完整的冰鲜鱼饵料采用无菌冻存管于液氮中保存备用。具体的样品采集信息见表 1。

表 1 采集样品编号信息表							
Tab. 1 The ID information of collected samples							
样品 sample	采集时间/h collecting time						
	0	1	2	4	6	8	10
胃 stomach	AS	BS	CS	DS	ES	FS	GS
幽门盲囊 pyloric caecum	AP	BP	CP	DP	EP	FP	GP
肠道 gut	AG	BG	CG	DG	EG	FG	GG
饵料 feed	F						

1.4 微生物总 DNA 提取与高通量测序

将液氮中保存的样本取出, 分别于低温条件下充分研磨、混匀后, 分别取一小部分采用 Soil DNA Kit (OMEGA, USA)试剂盒提取微生物总 DNA, 通过 barcode 的特异性引物(341F: 5'-CC-TACGGGNGGCWGCAG-3', 806R: 3'-GGACTAC-HVGGGTATCTAAT-5')扩增 16S rDNA V3~V4 高变区序列, 然后 PCR 扩增产物切胶回收, 用 QuantiFluor™ 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合, 连接测序接头, 构建测序文库, 采用 Hiseq2500 的 PE250 模式上机测序。

1.5 数据处理

对测序所得的原始数据进行质控、拼接、过

滤和去嵌合体等一系列处理,得到有效序列。按照相似性高于 97% 的序列聚类为 1 个 OTU (operational taxonomic units) 的原则,采用 Uparse (usearch v9.2.64) 软件对所有的有效序列进行归类操作,并选取每一个 OTU 的代表性序列,通过 RDP Classifier (version 2.2) 与 Silva (version v128) 数据库进行物种注释,其中的置信度阈值为 0.8~1; 采用 Tax4fun (0.3.1) 进行 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 功能预测。

通过 SPSS 25.0 对结果数据进行单因素方差分析(ANOVA),利用 Duncan's 检验对同一消化道组织不同取样时间点间的差异性进行多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。所有数值均采用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 测序结果

通过对测序数据的一系列处理,共得到 2450752 条有效序列,平均每个样品测序深度为 37133 条,结合基于 OTU 水平的稀释曲线可以看出,该实验的测序深度已经基本覆盖到样品中的所有物种(图 1)。基于 OTU 水平的秩丰度(rank abundance)曲线如图 2 所示,从图中可以看出,实验样品的菌群丰富度均较高,并且物种的分布也相对比较均匀。

2.2 消化道菌群结构特征

在胃内,魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、弧菌属(*Vibrio*)和普氏菌属(*Prevotella*)等为摄食前的优势菌属(图 3a)。摄食后 1 h 时,魏斯氏菌属、乳杆菌属、乳球菌属、弧菌属等的相对丰度迅速下降,而不动杆菌属、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属、*Escherichia-Shigella* 和拟杆菌属(*Bacteroides*)等的相对丰度迅速上升。随着营养的消化吸收,魏斯氏菌属、乳球菌属、假单胞菌属整体呈现逐渐下降的趋势;乳杆菌属、弧菌属的相对丰度在 2 h 时出现上升趋势,之后相对比较稳定,但是 10 h 时乳杆菌属的相对丰度低于摄食前,而弧菌属的则高于摄食前。不动杆菌

属、鞘氨醇单胞菌属、*Escherichia-Shigella* 和拟杆菌属的相对丰度在 2 h 时出现下降趋势,随后又出现一定范围的波动,但 10 h 时的相对丰度仍然高于摄食前的。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)整体呈现上升-下降-上升的趋势,在 4 h 和 10 h 时相对丰度较高。

幽门盲囊内乳杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、弧菌属、鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、发光

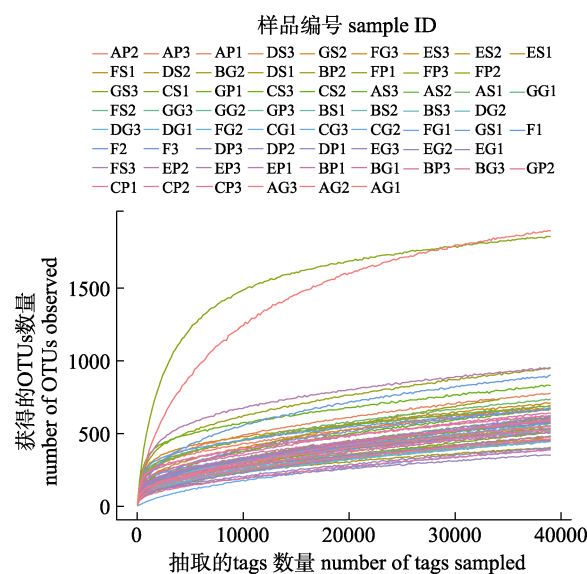


图 1 黄条鲷幼鱼消化道和饵料样品的稀释曲线

AS、BS、CS、DS、ES、FS 和 GS 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的胃组织,其中,AS1、AS2 和 AS3 分别表示 0 h 时胃组织的 3 个平行样本;AP、BP、CP、DP、EP、FP 和 GP 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的幽门盲囊样品,其中,AP1、AP2 和 AP3 分别表示 0 h 时幽门盲囊的 3 个平行样本;AG、BG、CG、DG、EG、FG 和 GG 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的肠道组织,其中,AG1、AG2 和 AG3 分别表示 0 h 时肠道组织的 3 个平行样本;F 表示饵料,其中, F1、F2 和 F3 分别表示 3 个平行样本。

Fig. 1 Rarefaction curves of juvenile *Seriola lalandi* gastrointestinal tract and feed

AS, BS, CS, DS, ES, FS and GS represent the stomach samples at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AS1, AS2 and AS3 represent three parallel samples for AS. The same for other stomach samples. AP, BP, CP, DP, EP, FP and GP represent the pyloric caecum sample at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AP1, AP2 and AP3 represent three parallel samples for AP. The same for other pyloric caecum samples. AG, BG, CG, DG, EG, FG and GG represent the gut sample at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AG1, AG2 and AG3 represent three parallel samples for AG. The same for other gut samples. F represents the feed samples, while F1, F2 and F3 represent three parallel samples.

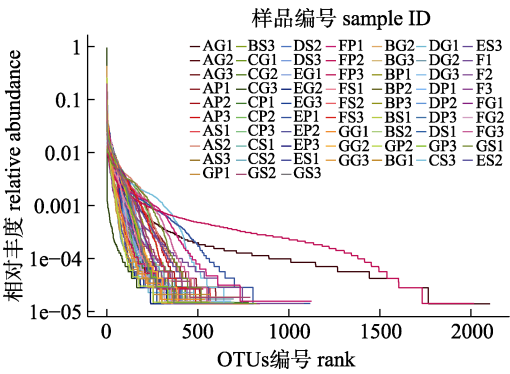


图 2 黄条鰺幼鱼消化道和饵料样品的 Rank-abundance 曲线

AS、BS、CS、DS、ES、FS 和 GS 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的胃组织, 其中, AS1、AS2 和 AS3 分别表示 0 h 时胃组织的 3 个平行样本; AP、BP、CP、DP、EP、FP 和 GP 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的幽门盲囊样品, 其中, AP1、AP2 和 AP3 分别表示 0 h 时幽门盲囊的 3 个平行样本; AG、BG、CG、DG、EG、FG 和 GG 分别表示不同取样时间 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的肠道组织, 其中, AG1、AG2 和 AG3 分别表示 0 h 时肠道组织的 3 个平行样本; F 表示饵料, 其中, F1、F2 和 F3 分别表示 3 个平行样本。

Fig. 2 The Rank-abundance distribution curves of juvenile *Seriola lalandi* gastrointestinal tract and feed AS, BS, CS, DS, ES, FS and GS represent the stomach samples at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AS1, AS2 and AS3 represent three parallel samples for AS. The same for other stomach samples. AP, BP, CP, DP, EP, FP and GP represent the pyloric caecum sample at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AP1, AP2 and AP3 represent three parallel samples for AP. The same for other pyloric caecum samples. AG, BG, CG, DG, EG, FG and GG represent the gut sample at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, respectively, while AG1, AG2 and AG3 represent three parallel samples for AG. The same for other gut samples. F represents the feed samples, while F1, F2 and F3 represent three parallel samples.

杆菌属(*Photobacterium*)和拟杆菌属等为摄食前的优势菌属(图 3b)。摄食后 1 h 时, 乳杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、弧菌属、鲸杆菌属和发光杆菌属相对丰度均出现下降趋势, 而拟杆菌属、普氏菌属、*Faecalibacterium* 和双歧杆菌属等, 则出现上升趋势。伴随营养的消化吸收, 乳杆菌属、弧菌属、普氏菌属整体呈现下降-上升-下降的趋势, 乳杆菌属 8 h 时相对丰度(4.17%)仍然低于摄食前(5.01%), 普氏菌属在 6 h 时相对丰度(2.38%)高于摄食前(1.49%); 不动杆菌属、假单胞菌属、发光杆菌属呈现先下降后上升趋势, 分别在 4 h、2 h 和 6 h 时相对丰度最低, 均在 10 h 时

最高(分别为 33.89%、6.56%和 4.81%); 鲸杆菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属和拟杆菌属整体呈现先上升后下降趋势, 分别在 4 h、2 h、6 h 和 2 h 时相对丰度最高(分别为 1.66%、6.56%、2.27%和 6.56%)。

肠道内的鞘氨醇单胞菌属、不动杆菌属、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、乳球菌属、乳杆菌属、魏斯氏菌属和 *Escherichia-Shigella* 等为摄食前的优势菌属(图 3c)。摄食后 1 h 时, 除弧菌属、拟杆菌属和发光杆菌属相对丰度上升外, 其余优势菌属相对丰度均下降。随着营养的消化吸收, 鞘氨醇单胞菌属、乳杆菌属呈现下降-上升-下降趋势, 鞘氨醇单胞菌属 6 h 时相对丰度(3.26%)低于摄食前(8.91%), 乳杆菌属 4 h 时相对丰度(3.36%)高于摄食前(2.53%); 不动杆菌属、假单胞菌属整体呈现上升趋势, 均在 10 h 时相对丰度最高(分别为 29.98%、10.05%); 克雷伯氏菌属相对丰度在摄食后均低于 0.05%; 乳球菌属、魏斯氏菌属、*Escherichia-Shigella*、普氏菌属、拟杆菌属和发光杆菌属整体呈现先上升后下降趋势, 分别在 2 h、4 h、8 h、2 h 和 2 h 时相对丰度最高(分别为 2.91%、8.09%、4.19%、1.92%和 32.78%)。

2.3 饵料菌群结构特征

饵料中相对丰度高于 1%的优势菌属组成信息如表 2 所示。从图中可以看出, 饵料中发光杆菌属相对丰度最高, 为 38.74%, 希瓦氏菌属(*Shewanella*)(19.45%)次之, 弧菌属相对丰度为 9.47%, 不动杆菌属相对丰度为 3.45%。

表 2 黄条鰺幼鱼饵料中优势菌属的组成
Tab. 2 The composition of dominant microbiota in feed for juvenile *Seriola lalandi* at the genus level %

属 genus	相对丰度 relative abundance
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	38.74
希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	19.45
弧菌属 <i>Vibrio</i>	9.47
<i>Aliivibrio</i>	6.37
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	3.45
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	1.37
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	1.25
其他 others	19.90
发光杆菌属 <i>Photobacterium</i>	38.74
希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	19.45

2.4 菌群结构相似性分析

在主成分分析中,可以看出主成分一和主成分二的贡献率分别为 60.3%~70.2%、17.3%~33.1% (图 4)。在黄条鰺幼鱼消化道各组织中,与饵料中

的菌群相比,营养消化吸收的不同时间点间的菌群组成与分布更为相近。在胃内,摄食前的菌群结构与摄食后 1 h 的相似性最小,与 4~6 h 时的相似性也不高,而与 8~10 h 时的相似性较高(图 4a)。

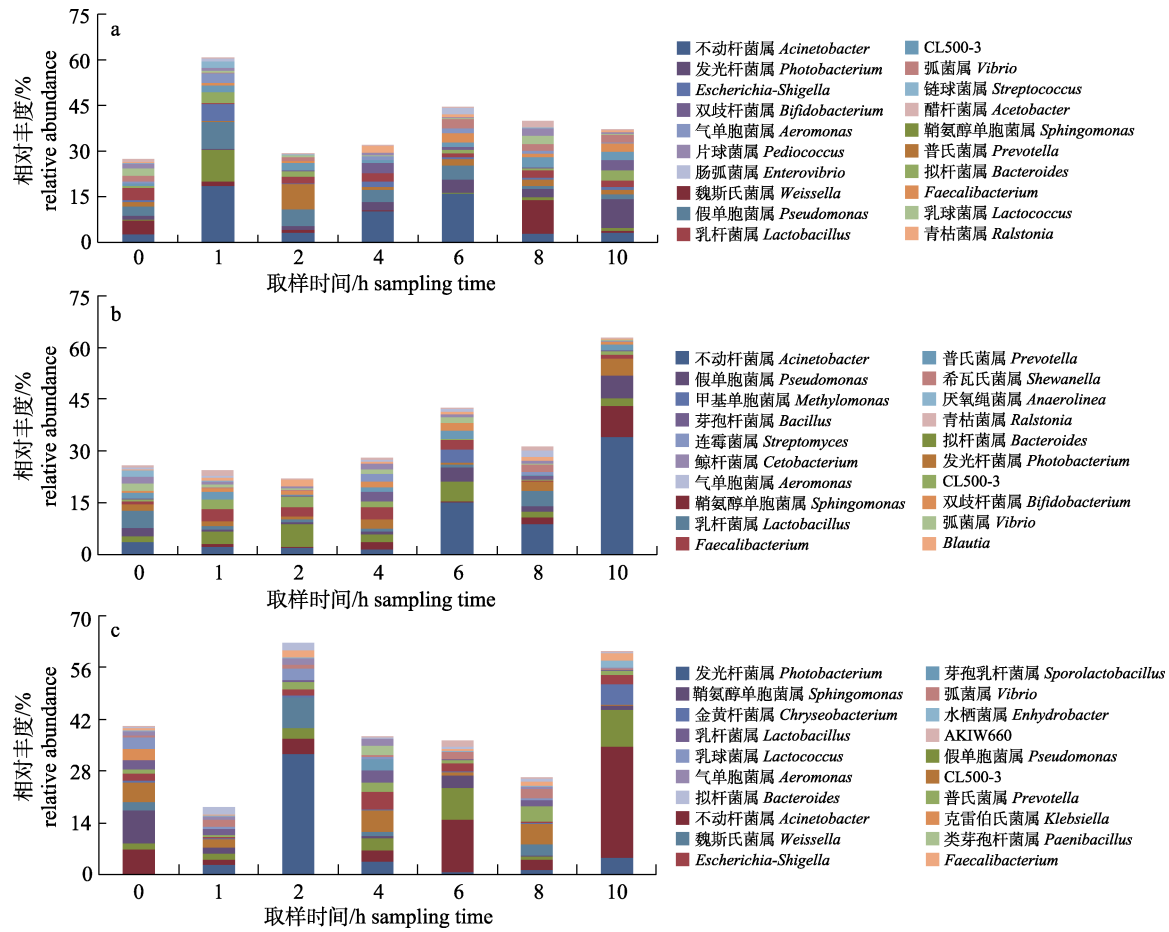


图 3 黄条鰺幼鱼消化道优势菌属结构变化情况
a. 胃组织; b. 幽门盲囊组织; c. 肠道组织。

Fig. 3 Structure changes of dominant microbiota in juvenile *Seriola lalandi* gastrointestinal tract at the genus level
a. Stomach; b. Pyloric caecum; c. Gut.

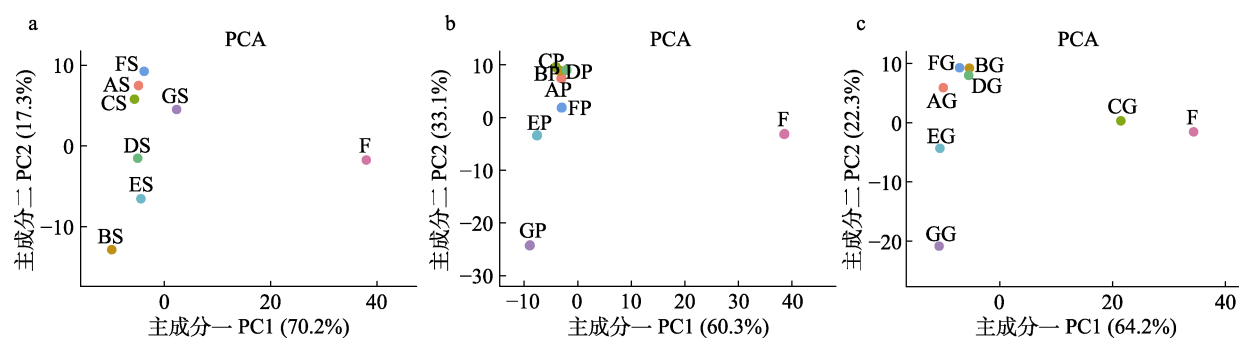


图 4 基于属水平的样品菌群主成分分析
a. 胃组织; b. 幽门盲囊组织; c. 肠道组织。

Fig. 4 The principal components analysis (PCA) of microbiota in samples at the genus level
a. Stomach; b. Pyloric caecum; c. Gut.

幽门盲囊内, 摄食前的菌群结构与摄食后 10 h 的相似性最小, 与摄食后 6~8 h 时的相似性次之, 而与 1~4 h 时的相似性最高(图 4b)。肠道内, 除摄食后 2 h 的外, 其余时间点的菌群结构相似性情况均与幽门盲囊内的相近(图 4c)。

2.5 消化道菌群功能特征分析

通过 KEGG Pathway 分析可以发现, 一级水平下菌群基因参与的信号通路大部分为新陈代谢通路; 在三级水平下, 对消化道各组织菌群参与的环境信息处理、新陈代谢、遗传信息处理通路的基因相对丰度进行分析(图 5 和表 3)。消化道各组织中菌群基因参与的主要信号通路相同, 但在基因丰度方面存在一定差异, 按菌群基因丰度排列主要包括环境信息处理中的 ABC 转运载体(7.43%~8.87%)和双组分系统(6.89%~8.08%)、新陈代谢中的嘌呤代谢(3.24%~3.54%)、遗传信息处理中的氨酰生物合成(2.69%~3.18%)、新陈代谢中的嘧啶代谢(2.14%~2.40%)等。

摄食后, 胃内菌群基因参与 ABC 转运载体、双组分系统、氨酰生物合成、嘧啶代谢、氧化磷酸化、淀粉和蔗糖代谢等信号通路的相对丰度在摄食后出现短暂的小幅下降后逐渐上升并保持相对稳定, 参与嘌呤代谢的相对丰度基本保持平稳状态, 参与氮代谢和细菌分泌系统的相对丰度呈现缓慢升高的趋势, 参与精氨酸和脯氨酸代谢的相对丰度出现先升高后下降趋势并逐渐趋于稳定。摄食后, 幽门盲囊内菌群基因参与 ABC 转运载体、双组分系统、嘌呤代谢、氮代谢、精氨酸和脯氨酸代谢的相对丰度呈现缓慢升高的趋势, 参与氨酰生物合成、嘧啶代谢的相对丰度基本保持平稳状态, 参与淀粉和蔗糖代谢的相对丰度呈现下降-升高-下降的趋势, 氨基糖和核苷糖代谢、氧化磷酸化的相对丰度呈现缓慢下降趋势。摄食后, 肠道内菌群基因参与双组分系统的相对丰度呈现缓慢升高的趋势, 参与嘌呤代谢、氨酰生物合成的相对丰度呈现相对平稳状态, 参与 ABC 转运载体、嘧啶代谢的相对丰度呈现一定的下降趋势, 参与淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷糖代谢的相对丰度呈现先上升后下降的趋势。

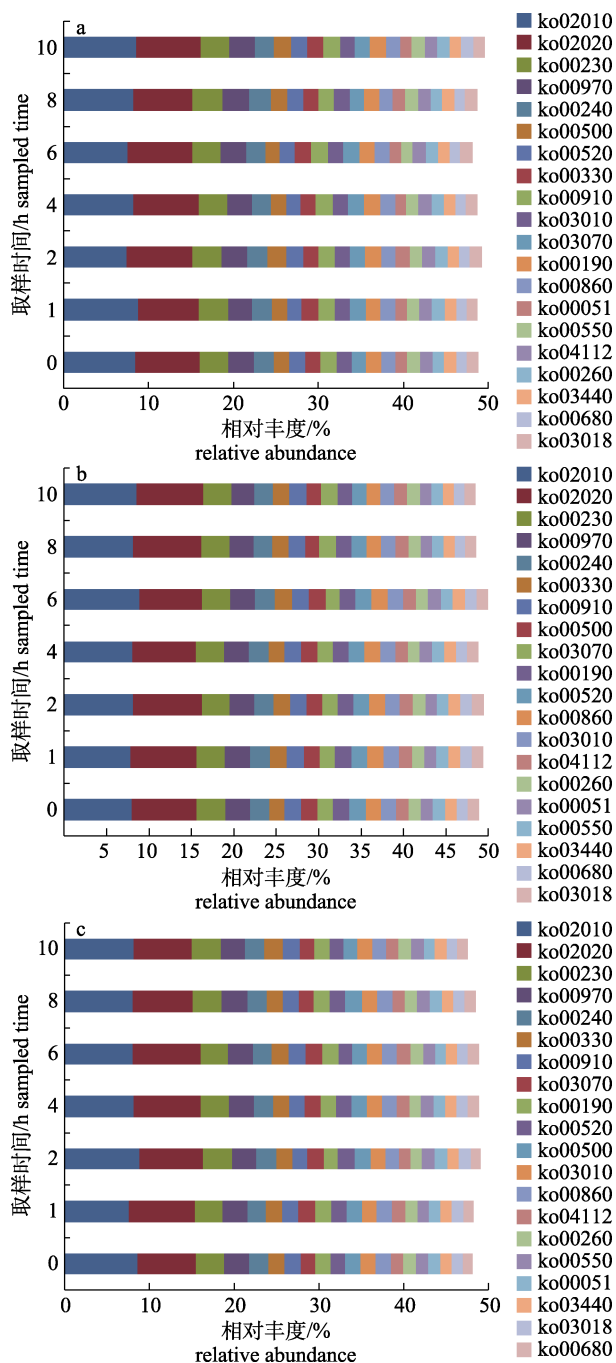


图 5 黄条鰺幼鱼消化道菌群每个 Pathway 相对丰度变化情况

a. 胃组织; b. 幽门盲囊组织; c. 肠道组织。

Fig. 5 Relative abundance changes of each pathway of microbiota in juvenile *Seriola lalandi* gastrointestinal tract
a. Stomach; b. Pyloric caecum; c. Gut.

3 讨论

3.1 黄条鰺幼鱼消化道核心菌群

在正式实验开始前对实验鱼进行饥饿处理, 使黄条鰺幼鱼处于空腹状态以确保其营养代谢水

表 3 KEGG 途径注释信息

Tab. 3 The annotation information of KEGG pathway

n=3; $\bar{x} \pm SE$

途径 pathway	注释信息 annotation information
ko00051	新陈代谢; 碳水化合物代谢; 果糖和甘露糖代谢 metabolism; carbohydrate metabolism; fructose and mannose metabolism
ko00190	新陈代谢; 能量代谢; 氧化磷酸化 metabolism; energy metabolism; oxidative phosphorylation
ko00230	新陈代谢; 核苷酸代谢; 嘌呤代谢 metabolism; nucleotide metabolism; purine metabolism
ko00240	新陈代谢; 核苷酸代谢酶类; 嘧啶代谢 metabolism; nucleotide metabolism; pyrimidine metabolism
ko00260	新陈代谢; 氨基酸代谢; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 metabolism; amino acid metabolism; glycine, serine and threonine metabolism
ko00330	新陈代谢; 氨基酸代谢; 精氨酸和脯氨酸代谢 metabolism; amino acid metabolism; arginine and proline metabolism
ko00500	新陈代谢; 碳水化合物代谢; 淀粉和蔗糖代谢 metabolism; carbohydrate metabolism; starch and sucrose metabolism
ko00520	新陈代谢; 碳水化合物代谢; 氨基糖和核苷糖代谢 metabolism; carbohydrate metabolism; amino sugar and nucleotide sugar metabolism
ko00550	新陈代谢; 多糖生物合成与代谢; 肽聚糖生物合成 metabolism; glycan biosynthesis and metabolism; peptidoglycan biosynthesis
ko00680	新陈代谢; 能量代谢; 甲烷代谢 metabolism; energy metabolism; methane metabolism
ko00860	新陈代谢; 辅酶因子和维生素代谢; 卟啉和叶绿素代谢 metabolism; metabolism of cofactors and vitamins; porphyrin and chlorophyll metabolism
ko00910	新陈代谢; 能量代谢; 氮代谢 metabolism; energy metabolism; nitrogen metabolism
ko00970	遗传信息处理; 翻译; 氨酰生物合成 genetic information processing; translation; aminoacyl-trna biosynthesis
ko02010	环境信息处理; 膜转运; abc 转运载体 environmental information processing; membrane transport; abc transporters
ko02020	环境信息处理; 信号转导; 双组分系统 environmental information processing; signal transduction; two-component system
ko03010	遗传信息处理; 翻译; 核糖体 genetic information processing; translation; ribosome
ko03018	遗传信息处理; 折叠、分类和降解; rna 降解 genetic information processing; folding, sorting and degradation; rna degradation
ko03070	环境信息处理; 膜转运; 细菌分泌系统 environmental information processing; membrane transport; bacterial secretion system
ko03440	遗传信息处理; 复制和修复; 同源重组 genetic information processing; replication and repair; homologous recombination
ko04112	细胞转化; 细胞生长和死亡; 细胞循环-柄杆菌属 cellular processes; cell growth and death; cell cycle-caulobacter

平一致, 因此, 在黄条鰺幼鱼摄食前其消化道中的菌群为定植菌属。结合消化道各组织菌群结构特点, 乳杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、拟杆菌属、气单胞菌属、弧菌属、普氏菌属、发光杆菌属和 *Faecalibacterium* 是消化道定植菌属。其中, 不动杆菌属、发光杆菌属、弧菌属、假单胞菌属、普氏菌属和乳杆菌属的相对丰度均高于 1%。朱伟星等^[15]研究发现, 养殖斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)消化道各段消化酶活性在摄食 3 h 内显著上升, 3~30 h 内保持相对平稳, 之后呈现显著下降趋势; 在养殖牙鲆(*Parali-*

chthys olivaceus)消化道蛋白酶活性研究中发现, 摄食后 5~8 h 时肠道蛋白酶活性比较高^[16]。可见养殖鱼摄食后均会出现一个消化酶活性较高的阶段, 揭示此阶段内对营养的消化吸收比较旺盛, 但是由于鱼的品种、养殖环境、实验条件的不同而存在一定差异。笔者发现, 黄条鰺摄食后 4~6 h 各消化酶活性较高(相关研究待发表)。此阶段消化道各组织中部分菌群的相对丰度达最高值, 包括胃内的肠弧菌属、弧菌属、双歧杆菌属, 幽门盲囊内的 *Faecalibacterium*、甲基单胞菌属、连霉菌属、拟杆菌属、普氏菌属、双歧杆菌属、芽孢

杆菌属, 肠道内的 *Escherichia-Shigella*、类芽孢杆菌属、气单胞菌属、乳杆菌属和芽孢乳杆菌属。因此, 根据消化道的共有定植菌属和消化生理特性, 将乳杆菌属、肠弧菌属、双歧杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、*Escherichia-Shigella*、类芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、拟杆菌属、甲基单胞菌属、链霉菌属、气单胞菌属、弧菌属、普氏菌属、芽孢乳杆菌属、发光杆菌属和 *Faecalibacterium* 作为本实验黄条鰺幼鱼消化道核心菌群。

黄条鰺幼鱼消化道核心菌群中的乳杆菌属、芽孢杆菌属、双歧杆菌属、芽孢乳杆菌属是常见的潜在益生菌, 其中的乳杆菌属、双歧杆菌属、芽孢杆菌属能够促进鲟(*Acipenser baerii*)幼鱼的生长^[17-19]。并且, 女性在孕期中经常食用鱼类, 能够对出生婴儿粪便微生物群产生有益影响, 使其以双歧杆菌为主而非大肠杆菌^[20]。Yaghoobfar 等^[21]研究发现, *Faecalibacterium* 在微生物法治疗肠炎中具有重要作用; 拟杆菌属中的部分菌株能够合成并分泌具有抗炎特性的多聚糖 A^[22]; 链霉菌属微生物是抗生素类的重要源泉之一^[23-24]; 类芽孢杆菌属因能够合成并分泌葡萄糖化酶、几丁质酶等而成为植物健康生长的重要益生菌^[25-27]; 人肠道中普氏菌属的丰度增加可能有助于膳食纤维诱导的葡萄糖代谢改善^[28]; 甲基单胞菌属是甲烷氧化菌的一种, 能够以甲烷为主要碳源合成并分泌琥珀酸盐, 而琥珀酸盐是农业、食品和制药行业中最重要化学原料之一^[29]。并且, 目前在海水鱼类养殖过程中也尚未有上述几类菌致病的报道, 因此, 本实验条件下, 将上述几类微生物视为非致病菌。不动杆菌属中的多数菌株是水产养殖中的潜在病原菌^[30-31], 但是, 从废水中分离的 *Acinetobacter towneri* 和 PDD-57b-25 鞘氨醇单胞菌对氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和总磷具有很好的生物净化能力, 能够使蟹的工厂化循环水养殖系统中无机氮和总磷水平保持在临界值以下, 并且还能促进养殖蟹的产量和质量^[32]。有研究发现 *Escherichia-Shigella* 可能不利于心脏瓣膜置换患者对相关抗凝治疗的反应^[33], 但未见 *Escherichia-Shigella* 对养殖鱼类致病的研究报道。在水产养

殖中, 假单胞菌属、气单胞菌属、弧菌属和发光杆菌属中的部分菌株经常被视为潜在病原菌^[34-36], 这些有害菌属能够正常定植于健康养殖鱼类消化道内壁上^[35,37], 并且与潜在益生菌间维持动态平衡关系, 是保障肠道健康的关键因素之一。

3.2 黄条鰺幼鱼消化道菌群演变规律

本研究中, 通过 Rank-abundance 曲线可以看出, 饵料中菌群丰富度相对比较高, 携带微生物的饵料进入黄条鰺幼鱼胃内后逐渐被消化至半流体状态才能逐渐进入幽门盲囊、肠道, 在消化道各组织内进行自身生长繁殖的同时参与宿主的各种生理活动, 并与消化道内定植菌群间形成竞争或协同的作用, 从而导致摄食 1 h 时消化道内菌群相对丰度发生较大改变, 随后伴随着营养的消化吸收, 消化道各组织内相对应的核心菌群相对丰度整体呈现先上升后下降趋势, 在 4~6 h 时达到一个较高值。在消化道排空速度研究中发现, 摄食冰鲜鱼后 1 h 时矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)前肠内就能监测到食糜, 3 h 时中肠能检测到食糜^[38]。另外, 在营养代谢过程中, 食糜中的大分子营养物质在消化道各组织内不断被降解为小分子易被吸收的营养成分, 使消化道各组织内的营养水平不断发生变化^[38], 而营养组分的变化能明显改变消化道菌群结构^[39], 这可能也是摄食后胃、幽门盲囊、肠道内菌群结构发生变化的主要原因。同时, 冰鲜鱼饵料携带的发光杆菌属和弧菌属等相对丰度较高, 推测消化道各组织中发光杆菌属、弧菌属等相对丰度的不断变化与饵料携带菌群有直接关系, 而消化道各组织内的菌群处于动态平衡状态之中, 这两个菌属相对丰度的变动必然引起其他相关菌属的改变。通过研究发现, 鱼的种类、摄食习性、生理阶段、养殖环境条件等因素都能够不同程度影响消化道排空的时间^[15,40-41]。本实验中, 黄条鰺幼鱼的投喂频率与时间间隔参照养殖场的管理进行, 至 10 h 时幼鱼胃内仍含有少量食糜(均为半流体状态), 推测这可能是实验结束时消化道各组织内菌群结构与摄食前存在较大差异的主要原因。由此可见, 在黄条鰺幼鱼营养代谢过程中, 摄食饵料中的菌群对消化道优势菌群结构的影响比较明显, 这与

Jiang 等^[42]研究结果一致。并且,本实验中所用冰鲜鱼饵料未经任何处理,其携带的潜在病原菌相对丰度较高,如若长期投喂势必打破消化道菌群的平衡状态,导致疾病暴发,这也从侧面警示从业人员要特别重视冰鲜饵料投喂前的处理,以保障养殖动物饵料的微生物安全。

3.3 消化道菌群功能变化趋势

消化道是一个复杂的生态系统,其内部定植菌群携带的基因数量远超宿主基因组的上百倍,并且可通过内部结构调整使自身功能基因在某一信号通路中富集,从而在营养、免疫等多方面参与并影响宿主的生理活动^[3,6-7]。本研究中,通过菌群基因主要富集的信号通路可以看出,消化道菌群功能主要包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、核苷酸代谢、膜转运和信号转导等。黄条魮幼鱼摄食后,消化道各组织中菌群结构发生变化,其协同宿主进行的各种生理活动也随之改变,分子层面的表现主要为信号通路富集的基因相对丰度出现波动。从而导致双组分系统、ABC 转运载体、嘌呤代谢和嘧啶代谢、遗传信息处理下的氨酰生物合成信号通路富集的基因相对丰度出现一定波动。其中,细菌和古细菌基因组中大概有 1%~3% 的基因是编码 ABC 转运载体蛋白的,可以说 ABC 转运载体蛋白家族是目前已知的最大蛋白家族,其底物种类比较广泛^[43];双组分系统是菌群对环境刺激作出反应的多重信号转导过程,是某些菌群应对高浓度氨氮环境的主要方式^[44-45],而消化道营养代谢过程中形成的氨基酸经脱氨基作用产生大量的氨,氨不稳定常常以 NH_4^+ 的形式存在,这可能是双组分系统和 ABC 转运载体等始终占据优势地位的一个主要原因。由此推测,营养代谢过程中消化道内的氨氮浓度相对较高,后续可针对营养代谢过程中黄条魮幼鱼消化道中的核心菌群进行分离培养,以获取与 N、P 降解相关的菌群并开展工厂化循环水调控研究,为构建高效的生物膜系统提供理论参考。

4 结论

通过对定植菌群和营养代谢过程中优势菌群演变趋势分析,获得黄条魮幼鱼消化道核心菌群,

主要包括乳杆菌属、双歧杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、拟杆菌属、链霉菌属、弧菌属、芽孢乳杆菌属、发光杆菌属和 *Faecalibacterium* 等;营养代谢过程中,消化道内的潜在益生菌群与致病菌群间仍然保持动态平衡状态;结合摄食饵料菌群结构特征,揭示饵料菌群对营养代谢过程中消化道菌群影响明显,进而提示从业者应注重微生物质量安全问题。

参考文献:

- [1] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl_1): D233-D238.
- [2] Flint H J, Scott K P, Duncan S H, et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 289-306.
- [3] Dwivedi M, Ansarullah, Radichev I, et al. Alteration of immune-mechanisms by human microbiota and development and prevention of human diseases[J]. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017: 6985256.
- [4] Li X M, Yu Y H, Feng W S, et al. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae[J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(1): 29-37.
- [5] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [6] Zhang M L, Li M, Sheng Y, et al. *Citrobacter* species increase energy harvest by modulating intestinal microbiota in fish: Nondominant species play important functions[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00303-20.
- [7] Banerjee G, Ray A K. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism[J]. *Symbiosis*, 2017, 72(1): 1-11.
- [8] Liu X Z, Xu Y J, Li R, et al. Analysis and evaluation of nutritional composition of the muscle of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 128-135. [柳学周, 徐永江, 李荣, 等. 黄条魮(*Seriola aureovittata*)肌肉营养组成分析与评价[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 128-135.]
- [9] Cui A J, Xu Y J, Wang B, et al. Genome-wide association analysis of growth traits in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 71-78. [崔爱君, 徐永江, 王滨, 等. 黄条魮生长性状全基因组关联分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 71-78.]
- [10] Cui A J, Wang B, Jiang Y, et al. Development of SNP mark-

- ers for yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) by 2b-RAD simplified genome sequencing[J]. Conservation Genetics Resources, 2020, 12(3): 403-407.
- [11] Liu X Z, Shi B, Liu Y S, et al. Effects of sharp changes in salinity on osmotic regulation function in juvenile yellowtail kingfish *Seriola aureovittata*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(6): 767-775. [柳学周, 史宝, 刘永山, 等. 盐度突变对黄条鰺幼鱼渗透调节功能的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(6): 767-775.]
- [12] Xu Y J, Zhang Z R, Liu X Z, et al. Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(1): 172-182. [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鰺早期生长发育特征[J]. 中国水产科学, 2019, 26(1): 172-182.]
- [13] Sun R R, Shi B, Liu X Z, et al. Molecular cloning and tissue and temporal expression of PTEN gene in early development of goldstriped amberjack *Seriola aureovittata*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(1): 47-55. [孙冉冉, 史宝, 柳学周, 等. 黄条鰺 PTEN 基因克隆、组织分布及早期发育阶段的表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 47-55.]
- [14] Wang B, Zhang Y X, Liu Q, et al. Molecular identification and developmental expression patterns of growth hormone and its receptors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(9): 7305-7312.
- [15] Zhu W X, Hua X M, Zhong G F, et al. Patterns of gastric evacuation and digesta characteristics in the gastrointestinal tract of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) when fed plant protein based diet[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(4): 529-538. [朱伟星, 华雪铭, 钟国防, 等. 斑点叉尾鲷对全植物蛋白饲料的胃排空及消化道内容物特性研究[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 529-538.]
- [16] Bian H H, Huang J, Wang X H, et al. Protease activity and chyme protein tracing by GFP in the digestive tract of flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(6): 36-41. [边慧慧, 黄健, 王秀华, 等. 牙鲆幼鱼消化道内蛋白酶活性及食糜蛋白的 GFP 示踪[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 36-41.]
- [17] Sanders M E, Morelli L, Tompkins T A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2003, 2(3): 101-110.
- [18] Sayed Hassani M H, Jourdehi A Y, Zelti A H, et al. Effects of commercial superzist probiotic on growth performance and hematological and immune indices in fingerlings *Acipenser baerii*[J]. Aquaculture International, 2020, 28(1): 377-387.
- [19] Chen Y N, Meenu M, Xu B J. A narrative review on micro-encapsulation of obligate anaerobe probiotics *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, and *Faecalibacterium prausnitzii*[J/OL]. Food Reviews International, (2021-01-18). <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1871008>.
- [20] Simone M, Harshman S G, Castro I, et al. Maternal fish consumption in pregnancy is associated with a *Bifidobacterium*-dominant microbiome profile in infants[J]. Current Developments in Nutrition, 2020, 4(1): nzz133.
- [21] Yaghoufar R, Behrouzi A, Fateh A, et al. Effects of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* on serotonin transporter expression in intestinal epithelial cells[J]. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 2021, 20(1): 1-5.
- [22] Hidalgo-Cantabrana C, Moro-García M A, Blanco-Míguez A, et al. *In silico* screening of the human gut metaproteome identifies Th17-promoting peptides encrypted in proteins of commensal bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1726.
- [23] Fu J Z, Ji L X, Xie C F. Biologically active natural products from *Streptomyces microorganisms*[J]. Drug Evaluation Research, 2010, 33(2): 153-158. [傅俊曾, 冀兰鑫, 谢春锋. 链霉菌属微生物来源的生物活性天然产物[J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 153-158.]
- [24] Chai B Z, Yan C, Xiang R X, et al. Antibacterial secondary metabolites produced by marine *Streptomyces* sp. MMHS020[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 1854-1861. [柴保中, 闫岑, 项仁鑫, 等. 一株海洋链霉菌 MMHS020 的抗菌活性代谢产物[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1854-1861.]
- [25] Kim Y C, Hur J Y, Park S K. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by chitin-based cultures of *Paenibacillus elgii* HOA73[J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155(1): 253-263.
- [26] Lincoln L, More V S, More S S. Purification and biochemical characterization of extracellular glucoamylase from *Paenibacillus amylolyticus* strain[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(4): 375-384.
- [27] Yu W Q, Xiao J J, Liu W Z, et al. Advances in mechanisms of *Paenibacillus* to promote growth & diseases-defending in plant[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(6): 102-112. [于文清, 肖俊杰, 刘文志, 等. 类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)对植物促生御病机理研究进展[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(6): 102-112.]
- [28] Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(6): 971-982.
- [29] Nguyen D T N, Lee O K, Hadiyati S, et al. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1

- for production of succinate from methane[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 170-179.
- [30] Kozińska A, Paździor E, Pękala A, et al. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii*-the emerging fish pathogens[J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58(2): 193-199.
- [31] Li J, Cao J L, Wang X, et al. *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(16): 6459-6471.
- [32] Shao Y, Zhong H, Mao X, et al. Biochar-immobilized *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. isolates to enhance nutrient removal: Potential application in crab aquaculture[J]. *Aquaculture Environment Interactions*, 2020, 12: 251-262.
- [33] Wang L, Liu L S, Liu X X, et al. The gut microbes, *Enterococcus* and *Escherichia-Shigella*, affect the responses of heart valve replacement patients to the anticoagulant warfarin[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 159: 104979.
- [34] Wu H B, Pan J P. Progress in studies of vibriosis in aquaculture[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 89-93. [吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 89-93.]
- [35] Jiang Y, Wang Y G, Zhang Z, et al. Responses of microbial community structure in turbot (*Scophthalmus maximus*) larval intestine to the regulation of probiotic introduced through live feed[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216590.
- [36] Shao P, Wu Z, Yong P Z, et al. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* from half-smooth tongue sole and evaluation of its pathogenicity[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(6): 42-49. [邵蓬, 武尊, 雍朋政, 等. 半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(6): 42-49.]
- [37] Wu Z C, Zhang S S, Yang Z, et al. The influence of feeding CAVP on intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 546-558. [吴振聪, 张莎莎, 杨转, 等. 投喂鲍内脏多糖对罗非鱼肠道菌群结构的影响[J]. *中国水产科学*, 2019, 2019, 26(3): 546-558.]
- [38] Li X D, Luo Z, He D, et al. The evacuation rate of chymes in digestive tract of javelin goby *Synechogobius hasta* and changes in nutrient composition[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(2): 59-62. [李晓东, 罗智, 何东, 等. 食糜在矛尾复鰕虎鱼消化道排空速度及其营养含量的变化[J]. *水产科学*, 2009, 28(2): 59-62.]
- [39] Li Y X, Yang P, Zhang Y J, et al. Effects of dietary glycine on the growth performance, digestion, intestinal morphology and bacterial community of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 125-133.
- [40] Feng X B, Yang D G, Li X, et al. Gastric evacuation rate and daily food consumption of artificially-reared juvenile rock carp *Procypris rabaudi* (Tchang)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(4): 654-661. [冯宪斌, 杨德国, 李茜, 等. 人工养殖条件下岩原鲤幼鱼排空率与摄食量[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(4): 654-661.]
- [41] Zhang P F, Chang Q, Chen S Q, et al. Diet feeding rhythm and analysis of gastric evacuation associated mathematical models in juvenile *Thamnaconus septentrionalis*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 104-111. [张鹏飞, 常青, 陈四清, 等. 绿鳍马面鲀幼鱼昼夜摄食节律及胃排空模型研究[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 104-111.]
- [42] Jiang Y, Liu X Z, Xu Y J, et al. Microbiota characteristics in *Sebastes schlegelii* intestine in early life stages[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2020, 38(1): 275-287.
- [43] Liu Y Q, Zhao Y F. Structure and mechanism of ABC transporter[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(3): 223-229. [刘艳青, 赵永芳. ABC转运蛋白结构与转运机制的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(3): 223-229.]
- [44] Galperin M Y, Makarova K S, Wolf Y I, et al. Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00681-17.
- [45] Zheng Y, Wu K N, Wang L, et al. Transcriptome and sRNA analyses of the response of *Bacillus subtilis* to ammonia nitrogen[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 147-154. [郑姚, 吴开年, 王利, 等. 枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 147-154.]

Analysis of the evolution trend of gastrointestinal tract microflora of juvenile yellowtail kingfish, *Seriola lalandi* during nutrient metabolism

JIANG Yan¹, YU Chaoyong², XU Yongjiang¹, LIU Xuezhou¹, WANG Bin¹, CUI Aijun¹, XUE Zhiyong³

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;
2. Marine Science Research Institute of Shandong Province (National Oceanographic Center, Qingdao), Qingdao 266104, China;
3. Haiyang Yellow Sea Aquaculture Co., Ltd., Yantai 265100, China

Abstract: The yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) is a globally distributed marine economic fish. The consumer demand for this fish is growing because of its delicious taste and high nutritional value. With increasing catch numbers, its natural resources are gradually declining. Many countries, including China, have begun to artificially culture this species. We found that the development of the juvenile yellowtail kingfish gastrointestinal tract (stomach, pyloric caecum, and gut) was evident and strong, with a fast growth rate. Evaluating the characteristics of microbiota structure may contribute to analyzing the effect of the microbiota, introduced by feed, on the change rule of gastrointestinal tract microbiota during nutrient metabolism. In this study, 16S rDNA high-throughput sequencing was used to assess the characteristics of gastrointestinal tract microbiota structure of yellowtail kingfish juveniles during the whole feeding cycle and analyze the correlation with the microbiota in feed. Results showed that *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Vibrio*, and *Faecalibacterium* were the shared and dominant genera colonizing the stomach, pyloric caecum, and gut. In combination with the changes in dominant genera during nutrient metabolism, *Lactobacillus*, *Enterovibrio*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia-Shigella*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Bacteroides*, *Methylobacterium*, *Streptomyces*, *Aeromonas*, *Vibrio* and *Faecalibacterium* were selected as the core microbiota in the gastrointestinal tract of yellowtail kingfish juveniles. These core microbiota contained both potential probiotics and pathogens; the relationship between the potential probiotics and pathogens in the gastrointestinal tract was maintained in a dynamic balance during nutrient metabolism of the host, which will protect the health of the host from a microecological perspective. Through analysis of the evolution trend of dominant microbiota structure, it was found that the microbiota introduced by feed had a great influence on the relative abundances of gastrointestinal tract microbiota during nutrient metabolism, which revealed the importance of the safety of the microbiota in feed. Our findings provide theoretical support for the screening of local probiotics of yellowtail kingfish juveniles and a reference for healthy culture management of the species.

Key words: *Seriola lalandi*; gastrointestinal tract; core microbiota; evolution trend; high-throughput sequencing

Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0222

温度对中间球海胆幼胆生存、生长和行为的影响

郑定发, 王慧妍, 丁靖芸, 孙江南, 赵冲, 常亚青

大连海洋大学, 农业农村部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 底播增殖是一种提高中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)产量的有效方法。底播增殖受到多种内在和外在因素的影响, 其中温度发挥着十分重要的作用, 因此确定中间球海胆适宜增殖温度范围至关重要。本实验将大(23.29±0.27) mm、小(18.78±0.19) mm 两种规格的中间球海胆放置在 3 个温度环境下(10 °C、15 °C、20 °C)养殖 6 周, 观察并测定其生存、生长和行为。实验结果表明, 3 个温度条件均不会造成海胆死亡。20 °C 组的两种规格海胆摄食量显著高于 15 °C 和 10 °C 组($P<0.01$)。10 °C、15 °C 组小规格海胆的觅食时间显著大于 20 °C 组($P<0.01$), 觅食距离显著小于 20 °C 组($P<0.05$)。在趋光实验中, 20 °C 组小规格海胆的运动时间显著大于 15 °C 组($P<0.01$); 运动路程显著小于 15 °C、10 °C 组($P<0.05$)。在避光实验中, 两规格海胆 20 °C 组的运动时间均显著大于 15 °C、10 °C 组($P<0.05$), 运动路程均显著小于 15 °C、10 °C 组($P<0.01$); 15 °C、10 °C 组两种规格海胆口器咬合频率显著大于 20 °C 组($P<0.01$)。15 °C、10 °C 组两种规格海胆的壳径、壳高、体重、性腺重、肠重、口器长、口器重、壳重、壳压力均大于 20 °C 组; 15 °C、10 °C 组两种规格海胆的口器长/壳径、壳高/壳径均大于 20 °C 组。综上所述, 在 10 °C 和 15 °C 的水温下, 中间球海胆均表现出显著更好的行为和生长, 10~15 °C 是中间球海胆幼胆底播增殖的适宜增殖温度范围, 在该环境下放流中间球海胆幼胆预期能够提升底播增殖生产效率。

关键词: 中间球海胆; 温度; 底播增殖; 生长; 行为

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0264-10

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)目前主要分布在日本海、朝鲜半岛和中国东北部等地区的潮间带和潮下岩礁区^[1], 具有生长速度快、个体大、性腺色泽佳等优点^[2], 是经济海胆种类中的佳品, 有很高的经济价值^[3]。然而, 过度捕捞^[4]以及落后的资源增殖和管理技术^[2]导致我国中间球海胆养殖产量无法满足日益增长的市场需求^[2]。目前, 资源增殖是扩大中间球海胆养殖规模、提高产量的关键, 对满足市场需求、保护近乎枯竭的海胆资源具有重要意义^[5]。

底播增殖是中间球海胆资源增殖的重要方式之一。它通过在养殖海域放流幼胆(15~25 mm)增

加种群数量, 进而增大海区海胆资源量, 扩大经济效益^[6]。温度是影响海胆生长发育和适应性最主要的环境因素和制约因子^[7-10], 对海胆生理^[11]、生长^[12]、被捕食^[13]和行为^[14]可产生显著影响。这些研究结果支持海胆对温度敏感^[15]这一结论。因此, 寻找使底播增殖的中间球海胆具有最佳的行为和生长表现的合适的温度范围, 对优化底播增殖技术非常重要。

常亚青等^[2]发现中间球海胆在 10~22 °C 的水温中均能正常生存。本研究通过研究大、小两种规格的中间球海胆在 3 种温度环境(10 °C、15 °C 和 20 °C)下养殖 6 周后, 其生存、生长和行为等

收稿日期: 2021-05-18; 修订日期: 2021-09-16.

基金项目: 辽宁省重大科技攻关项目(2017203003); 辽宁省高等学校创新人才支持计划项目。

作者简介: 郑定发(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产增养殖, E-mail: 562632865@qq.com; 共同第一作者: 王慧妍(2000-), 女, 本科生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 1244351501@qq.com

通信作者: 赵冲, 博士, 副研究员, 从事海胆行为学和底播增殖研究, E-mail: chongzhao@dlou.edu.cn; 常亚青, 博士, 教授, 从事海胆遗传育种和增养殖研究, E-mail: changlab@hotmail.com

方面的表现, 来判断中间球海胆适宜的增殖温度范围, 为中间球海胆底播增殖和海胆资源可持续利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 海胆

实验所使用的中间球海胆幼胆购买于大连某养殖场, 运至大连海洋大学农业农村部北方海水增殖重点实验室的室内水槽(1 t)中暂养。暂养水温为室温(12 ℃), 保持水槽内供氧充足(大于7 mg/L), 每3天投喂一次裙带菜(*Undaria pinnatifida*), 更换水槽中二分之一的海水。

1.2 实验设计

大(23.29±0.27) mm、小(18.78±0.19) mm 两种规格的实验海胆分别在 10 ℃、15 ℃、20 ℃ 的控温水槽(长×宽×高: 775 mm×470 mm×375 mm; 大连汇新钛设备有限公司, 中国)中进行养殖。每组设置3个重复组。实验前在各个水槽中放置适量挑选过的礁石, 以模拟中间球海胆的底栖生活环境^[16]。利用控温水槽使水温以每天0.5 ℃的变温速度由室温(12 ℃)转变为实验温度(10 ℃、15 ℃、20 ℃)。

两种规格海胆在3个温度环境下养殖6周, 定期投喂饲料, 每2~3 d收集粪便, 更换海水, 并保持充分供氧和适宜光照。养殖期间使循环水溶

氧值保持在8.11~11.07 mg/L。养殖6周后, 每个水槽内随机选取10只海胆进行行为实验、体性状测量和组织重量测量。

1.3 死亡率

养殖期间定期观察各个水槽中是否有海胆死亡, 及时记录数据。实验结束后计算海胆的死亡率。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{死亡的海胆数目}}{\text{初始海胆总数}} \times 100\%$$

1.4 摄食量

养殖期间定期投喂与每组海胆相同重量的裙带菜。每次投喂前取出上一次残留饲料, 去除多余的水分后称重, 再进行下一次的投喂。摄食量的计算公式为:

$$\text{摄食量(g)} = \frac{\text{投喂饲料重量(g)} - \text{残留饲料重量(g)}}{\text{海胆数目}}$$

1.5 口器咬合实验

口器咬合体现了海胆的摄食能力^[17]。口器咬合实验是指测定5 min内海胆在充满海带碎的琼脂凝胶上的口器咬合频率, 即牙齿从张开到闭合的次数^[18]。海带琼脂凝胶是由2 g海带粉、3 g琼脂粉置于100 mL海水中加热, 混合均匀后倒入塑料隔间(长×宽×高: 4.5 cm×4.5 cm×4 cm, 图1A)^[18]制成。每个水槽随机选取10只海胆放入隔间, 控

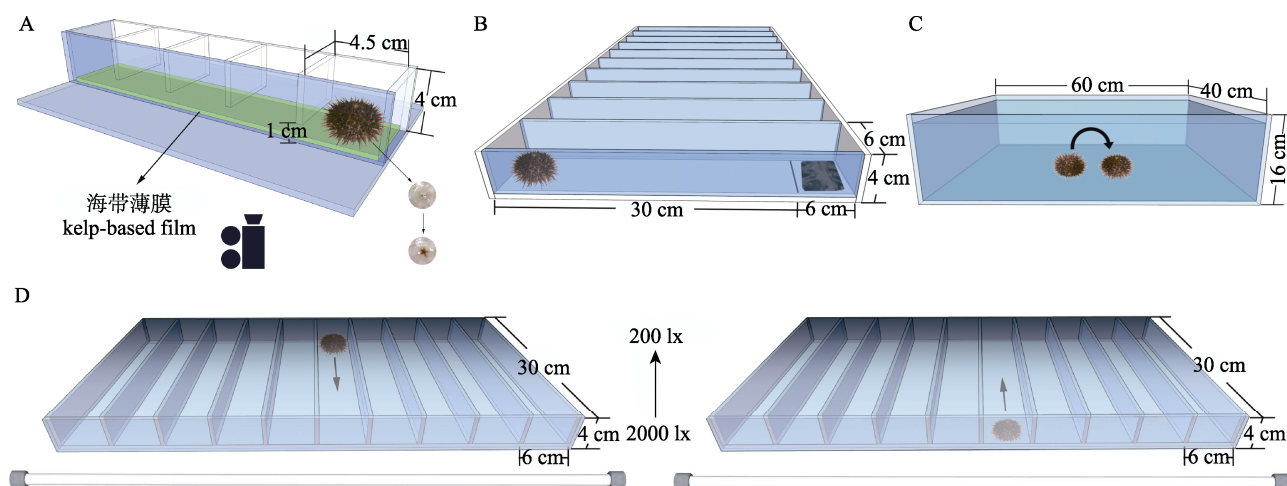


图1 中间球海胆口器咬合(A), 觅食行为(B), 翻正行为(C), 趋光行为和避光行为(D)实验模式图

Fig. 1 Diagrams showing Aristotle's lantern reflex (A), foraging behavior (B), righting behavior (C) and phototaxis (D) of *Strongylocentrotus intermedius*

制海水温度与实验温度一致,利用数码相机(Legria HF20; Canon, 东京, 日本)记录 5 min 内海胆口器咬合频率。按上述实验方法用不同海胆重复 3 次实验。每次结束实验后,更换 1 次海水。以每组 10 只海胆的平均值作为每组海胆的口器咬合频率($n=3$)。

1.6 觅食行为

为了观察海胆的觅食行为,本研究设计了一个含有 10 条独立轨道的塑料装置(轨道长 $\times$ 宽 $\times$ 高: 30 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm, 图 1B)。轨道的终点放上海带(*Laminaria japonica*) (长 $\times$ 宽: 6 cm $\times$ 6 cm)。每组随机选取 10 只海胆,分别放置于 10 条轨道起始处,水浴控制海水温度与实验温度一致。利用数码相机(Legria HF20; Canon, 东京, 日本)测定海胆的觅食时间(海胆第一次到达海带处的时间)。若 15 min 内未到达终点,则觅食时间记为 900 s。利用软件 ImageJ (version 1.51 n)计算 15 min 内海胆的觅食路程。按上述实验方法用不同海胆重复 3 次实验。每次结束实验后,更换一次海水。以每组 10 只海胆平均值作为每组海胆的觅食时间和觅食路程($n=3$)。

1.7 翻正行为

翻正时间是指海胆从口面朝上的状态恢复到正常状态所需要的时间^[19]。从每个水槽中随机选取 10 只海胆,将海胆以口器面朝上的状态放进一个大水槽(长 $\times$ 宽 $\times$ 高: 60 cm $\times$ 40 cm $\times$ 16 cm, 图 1C)中,海水温度与实验温度一致,观察 5 min 内海胆的翻正情况。海胆翻正行为所花时间若超出 5 min,则翻正时间记为 300 s。按上述实验方法用不同海胆重复 3 次实验。每次结束实验后,更换 1 次海水。以每组 10 只实验海胆翻正时间的平均值作为每组的海胆翻正时间($n=3$)。

1.8 趋光行为和避光行为

为探究中间球海胆的趋光行为和避光行为,本研究设计了一个含有 10 条独立轨道的塑料装置(轨道长 $\times$ 宽 $\times$ 高: 30 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm, 图 1D),以可调节光强的日光灯为唯一光源。在趋光实验中将日光灯放置在终点位置,调节日光灯使起始位置光强为 200 lx, 终点位置光强为 2000 lx; 避光实验中日光灯放置于起始位置。各组随机选取 10 只海胆放置在起始位置,用数码相机(Legria

HF20; Canon, 东京, 日本)分别记录海胆在趋光、避光实验中第一次到达终点的时间,若 15 min 内未到达终点,则运动时间记录为 900 s; 使用软件 ImageJ (version 1.51 n)计算海胆的运动路程。按上述实验方法用不同海胆重复 3 次实验。每次结束实验后,更换一次海水。以每组 10 只实验海胆的运动时间和路程的平均值作为每组海胆在趋光和避光实验下的运动时间和路程($n=3$)。

1.9 体性状和组织重量

体性状的测量包括海胆的体重、壳径、壳高、壳重、壳厚、口器长和口器重。组织重量性状包括海胆的性腺重和肠道重(大规格海胆)。在 6 周实验后,从各组中随机选取 10 只海胆进行体性状测量和组织重量测量。重量测量使用电子天平(JJ1000, G&G Co.), 尺寸测量采用游标卡尺(IP67 16EW, Mahr Co., 德国),并利用压力仪(济南试金公司, 中国)测量大规格中间球海胆的壳压力。按上述方法重复 3 次实验。以每组 10 只实验海胆数据的平均值作为每组海胆的性状数据和组织重量($n=3$)。

1.10 数据分析

数据分析前采用 Levene's test 和 Kolmogorov-Smirnov test 检验对所有数据进行正态分布和方差齐性检验。摄食量采用单因素重复度量方差分析方法进行统计; 实验中所有海胆的行为实验数据和体尺数据采用单因素方差分析方法进行分析。当方差分析有显著差异时,采用 LSD 方法进行两两比较。当 $P<0.05$ 时,认为具有显著的统计学差异。本实验所有数据分析均采用 SPSS 20.0 统计软件进行,数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 温度对海胆存活的影响

在探究不同温度对中间球海胆影响的养殖实验中,各实验组大、小两个规格的海胆均并未发现死亡个体。

2.2 温度对海胆行为的影响

2.2.1 觅食行为 由图 2 可知,20 $^{\circ}\text{C}$ 组小规格海胆的觅食时间极显著大于 15 $^{\circ}\text{C}$ 组($P<0.001$)和 10 $^{\circ}\text{C}$

组($P<0.01$), 且觅食路程极显著小于 15 °C 组($P<0.001$), 显著小于 10 °C 组($P<0.05$)。大规格海胆在 3 个温度下(10 °C、15 °C、20 °C)的觅食时间和觅食路程均无显著差异($P>0.05$)。

2.2.2 趋光行为和避光行为 趋光实验中, 20 °C 组小规格海胆运动时间极显著大于 15 °C 组($P<0.01$); 运动路程极显著小于 15 °C 组($P<0.01$), 显著小于 10 °C 组($P<0.05$)。大规格海胆在趋光实验中行为

在各组间无显著差异($P>0.05$)(图 3A, 3C)。

在避光实验中, 20 °C 组小规格海胆的运动时间极显著大于 15 °C 组($P<0.001$), 显著大于 10 °C 组($P<0.05$), 运动路程极显著小于 15 °C 组($P<0.001$)。20 °C 组大规格海胆运动时间极显著大于 15 °C 组($P<0.001$)和 10 °C 组($P<0.01$), 且运动路程极显著小于 15 °C 组($P<0.001$)和 10 °C 组($P<0.01$)(图 3B, 3D)。

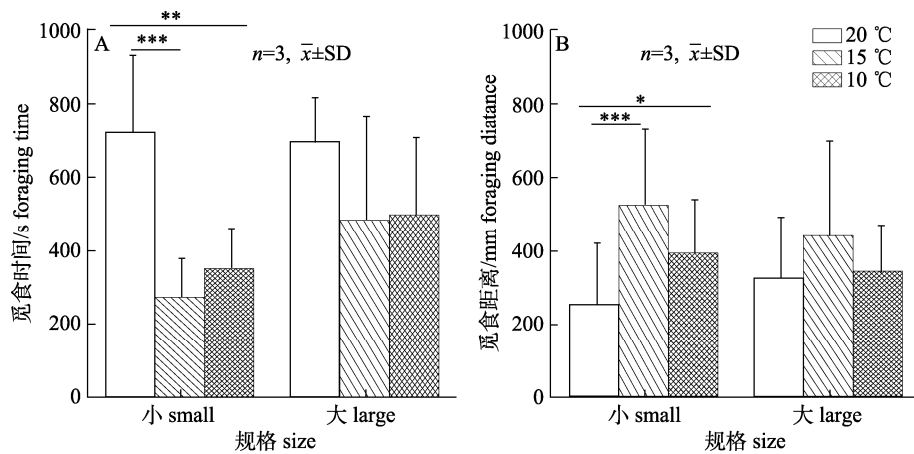


图 2 中间球海胆在不同水温条件下觅食时间(A)和觅食路程(B)

*表示差异显著($P<0.05$), **和***分别表示差异极显著($P<0.01$, $P<0.001$).

Fig. 2 Foraging time (A) and foraging distance (B) of *Strongylocentrotus intermedius* under different water temperatures
* refers to significant difference ($P<0.05$), ** and ***refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

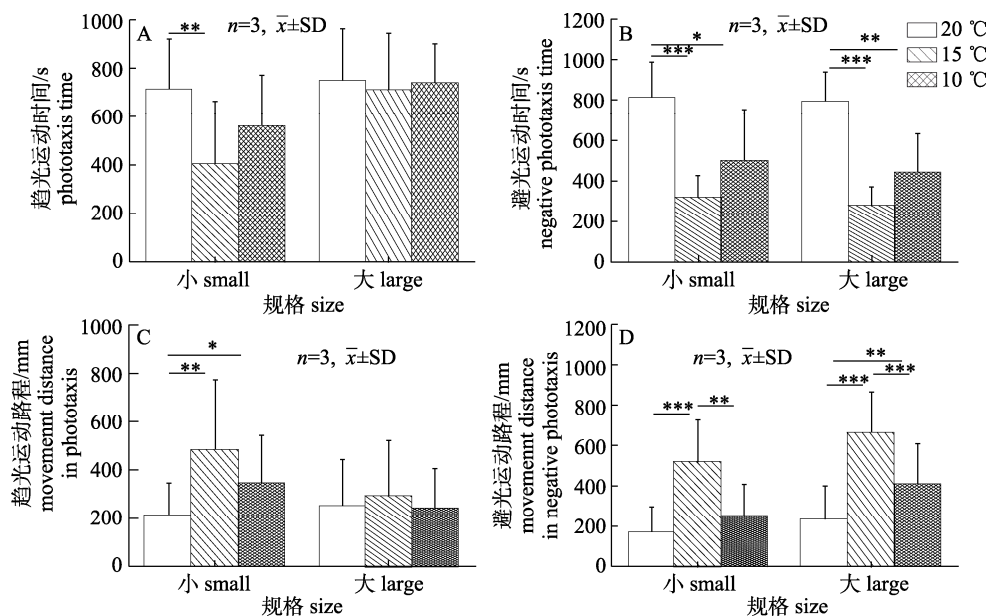


图 3 不同温度下中间球海胆趋光运动时间(A), 避光运动时间(B), 趋光运动路程(C)和避光运动路程(D)

*表示差异显著($P<0.05$), **和***表示差异极显著($P<0.01$, $P<0.001$).

Fig. 3 Phototaxis time (A), negative phototaxis time (B), movement distance in positive phototaxis (C) and movement distance in negative phototaxis (D) of *Strongylocentrotus intermedius* under different water temperatures

* refers to significant difference ($P<0.05$), ** and ***refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

2.2.3 口器咬合频率 20 ℃组小规格海胆的口器咬合频率极显著低于 15 ℃组($P<0.001$)和 10 ℃组($P<0.01$)。20 ℃组大规格海胆的口器咬合频率极显著低于 15 ℃组($P<0.01$)和 10 ℃组($P<0.001$)(图 4)。

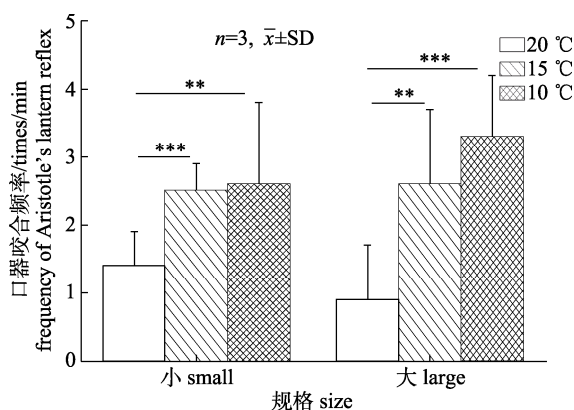


图 4 不同温度下中间球海胆的口器咬合频率

和*表示为差异极显著($P<0.01$, $P<0.001$)。

Fig. 4 Aristotle's lantern reflex of *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

** and *** refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

2.2.4 翻正行为 大、小规格海胆翻正时间在各温度组(10 ℃、15 ℃、20 ℃)间无显著差异($P>0.05$)(图 5)。

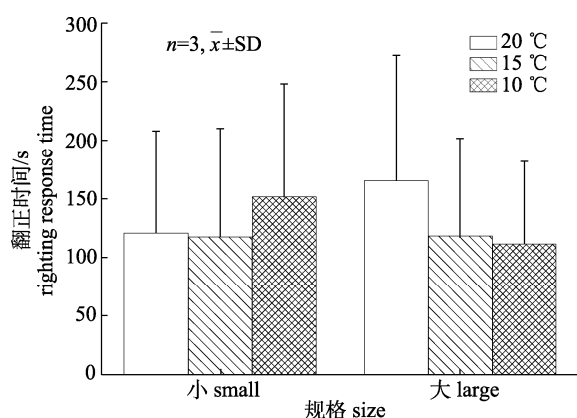


图 5 不同温度下中间球海胆的翻正时间

Fig. 5 Righting response time of *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

2.2.5 摄食量 在 3 种温度环境下(10 ℃、15 ℃、20 ℃), 两种规格海胆的摄食量变化趋势相同, 20 ℃组海胆的摄食量极显著大于 15 ℃组($P<0.001$), 15 ℃组海胆摄食量极显著大于 10 ℃组($P<0.001$)(图 6)。

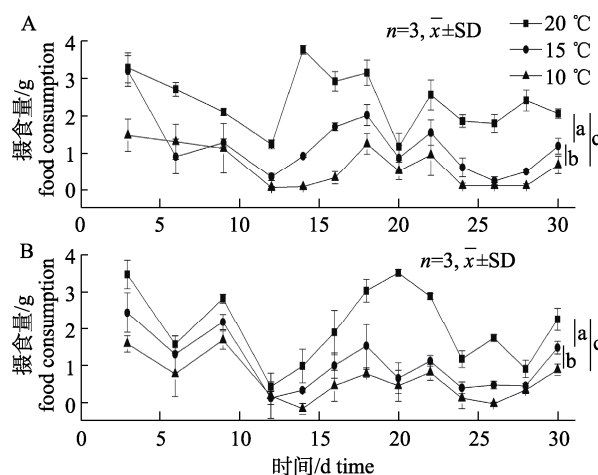


图 6 不同温度下小规格(A)和大规格(B)中间球海胆的摄食量
摄食量用重复度量分析方法进行测量. 图中不同字母表示
整个实验过程摄食量不同温度间差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Food consumption of small (A) and large size (B) *Strongylocentrotus intermedius* under different water temperatures

Food consumption was measured using a repeat metric analysis method. Different letters indicate significant differences in food consumption among different temperature treatment groups over the course of the experiment ($P<0.05$).

2.3 温度对海胆生长的影响

2.3.1 壳径、壳高、壳高/壳径和体重 20 ℃组大、小规格海胆的壳径、体重均极显著小于 15 ℃组($P<0.001$)和 10 ℃组($P<0.001$)(图 7A、D)。20 ℃组大、小规格海胆的壳高均极显著小于 15 ℃组($P<0.001$)(图 7B)。

20 ℃组小规格海胆的壳高/壳径极显著大于 15 ℃组($P<0.001$)和 10 ℃组($P<0.01$), 且 15 ℃组显著大于 10 ℃组($P<0.05$)。20 ℃组大规格海胆的壳高/壳径显著大于 15 ℃组($P<0.05$), 极显著大于 10 ℃组($P<0.01$)(图 7C)。

2.3.2 组织重量 如图 8 所示, 20 ℃组大规格海胆的性腺重和肠重均极显著小于 15 ℃组和 10 ℃组($P<0.001$)。

2.3.3 口器长、口器重和口器长/壳径 20 ℃组小规格海胆的口器长极显著小于 15 ℃组($P<0.001$), 20 ℃大规格组海胆的口器长极显著小于 15 ℃组($P<0.01$)(图 9A)。20 ℃组小规格海胆的口器重极显著小于 15 ℃组($P<0.001$)和 10 ℃组($P<0.01$); 20 ℃组大规格海胆的口器重极显著小于 15 ℃组和 10 ℃组($P<0.01$)(图 9B)。

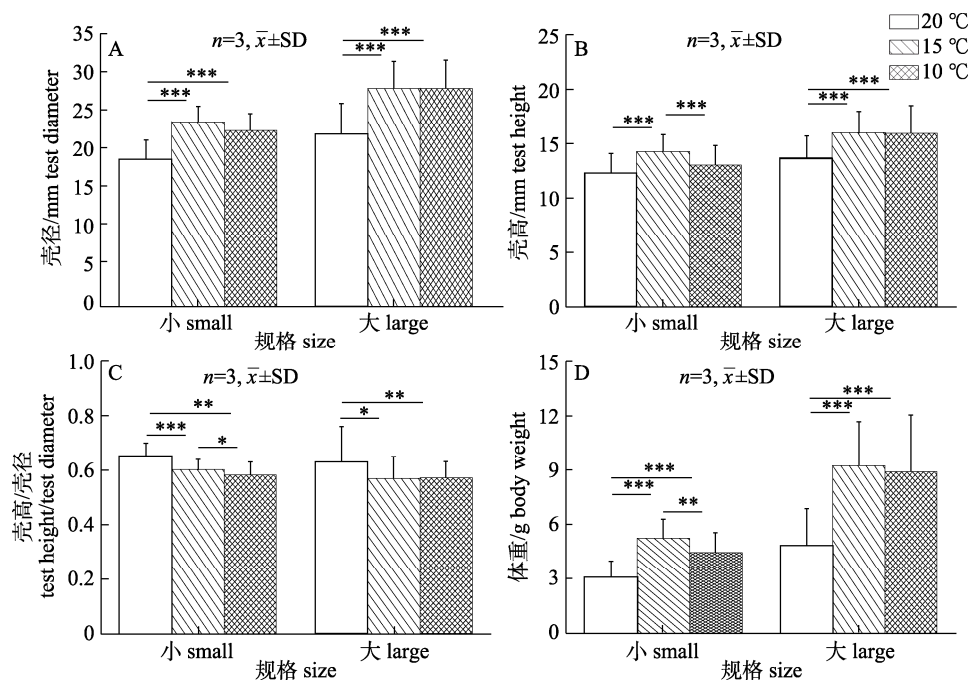


图 7 中间球海胆在不同温度条件下的壳径(A)、壳高(B)、壳高/壳径(C)以及体重(D)

*表示差异显著($P < 0.05$), **和***表示差异极显著($P < 0.01$, $P < 0.001$).

Fig. 7 Test diameter (A), test height (B), test height/test diameter (C) and body weight (D) of *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

* refers to significant difference ($P < 0.05$), ** and *** refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

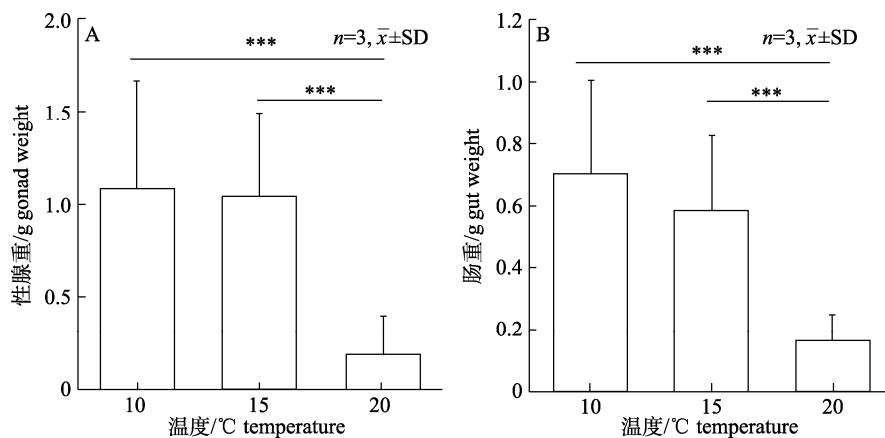


图 8 大规格中间球海胆在不同温度条件下的性腺重(A)和肠重(B)

***表示差异极显著($P < 0.001$).

Fig. 8 Gonad (A) and gut (B) weights of large size *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

*** refers extremely significant difference ($P < 0.001$).

20 °C组小规格海胆的口器长/壳径极显著大于 10 °C组($P < 0.01$); 20 °C组大规格海胆的口器长/壳径极显著大于 15 °C组和 10 °C组($P < 0.001$)(图 9C)。

2.3.4 壳重、壳厚、壳压力 20 °C组大、小规格海胆的壳重均极显著小于 15 °C组和 10 °C组

($P < 0.001$)(图 10A)。20 °C组大规格海胆的壳压力显著小于 15 °C组($P < 0.05$)(图 10C)。

20 °C组小规格海胆的壳厚极显著大于 10 °C组($P < 0.001$), 20 °C组大规格海胆的壳厚极显著小于 10 °C组($P < 0.001$)。15 °C组与 20 °C组的两种规格海胆壳厚无显著性差异($P > 0.05$)(图 10B)。

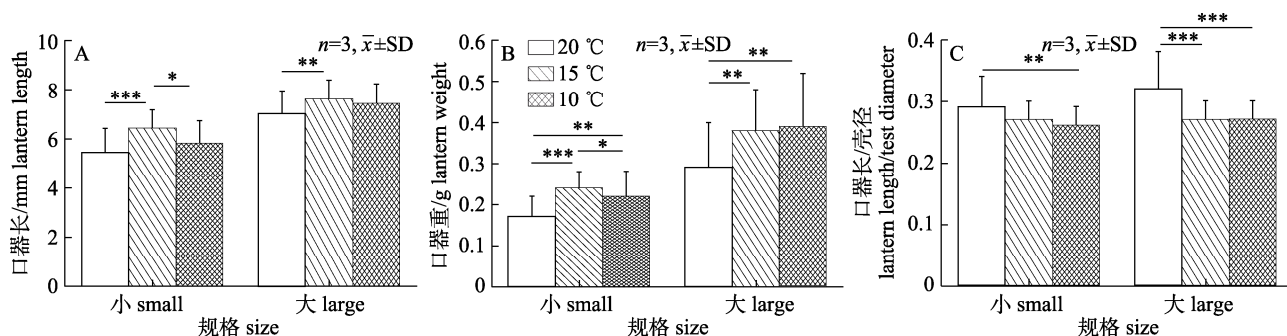


图 9 不同温度下中间球海胆的口器长(A)、口器重(B)和口器长/壳径(C)

*表示差异显著($P<0.05$), **和***表示差异极显著($P<0.01$, $P<0.001$).

Fig. 9 Lantern length (A), lantern weight (B) and lantern length/test diameter (C) of *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

* refers to significant difference ($P<0.05$), ** and *** refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

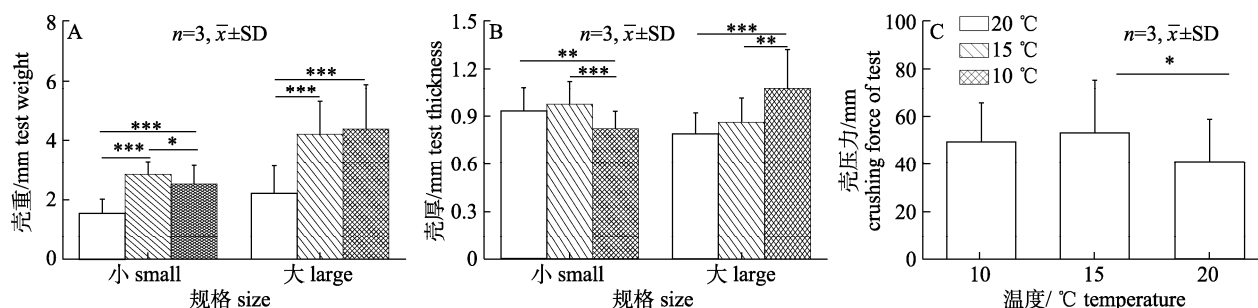


图 10 中间球海胆在不同温度条件下的壳重(A)、壳厚(B)和大规格海胆壳压力(C)

*表示差异显著($P<0.05$), **和***表示差异极显著($P<0.01$, $P<0.001$).

Fig. 10 Test weight (A), test thickness (B) and crushing force of large size test (C) of *Strongylocentrotus intermedius* at different water temperatures

* refers to significant difference ($P<0.05$), ** and *** refer to extremely significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

3 讨论

3.1 温度对中间球海胆存活的影响

本实验通过研究中间球海胆在 10 °C、15 °C、20 °C 下不同存活、行为和生长表现来确定其最佳增殖温度。在正式实验前控制养殖温度从暂养水温缓慢转变为实验温度,以防止温度骤变影响海胆在不同温度下的生长状况和行为表型。降低死亡率是海胆进行底播增殖的首要目标^[6], 本研究发现 10 °C、15 °C、20 °C 的水温均能够保证不同规格的中间球海胆正常存活。尤凯等^[20]发现海胆的适宜水温为 8~22 °C, 高绪生等^[7]也证明幼海胆在 0~30 °C 范围内可大量存活, 与本研究结论一致。因此从生存角度来看, 10~20 °C 是中间球海胆增殖可接受的温度范围, 不会造成海胆大量死亡。

3.2 温度对中间球海胆行为的影响

有效觅食是中间球海胆底播增殖的关键, 直接决定了它们在野外的生物量^[21]。在觅食行为实验中, 20 °C 组小规格海胆的觅食时间显著大于 15 °C 组($P<0.001$)和 10 °C 组($P<0.01$), 且觅食路程显著少于 15 °C 组($P<0.001$)和 10 °C 组($P<0.05$)。这与 Zhao 等^[15]发现长期高温增加中间球海胆的觅食时间的研究结果一致。中间球海胆第一次到达海带处的时间(觅食时间)以及运动的总路程(觅食路程)表征着海胆在觅食过程中的主动性^[22]。觅食时间的增加意味着海胆可能暴露在捕食者面前和受到物理干扰的时间更长^[15]; 觅食距离的缩短则不利于海胆寻找能够满足自身营养需求的足够食物。以上结果表明, 中间球海胆在 10~15 °C 下觅食行为更强。探测光对于海洋无脊椎动物寻找食物、庇护所和躲避捕食者发挥重要作用^[23]。无

论是趋光还是避光实验,海胆行为均与觅食行为结果趋势相一致。因此,10~15℃是中间球海胆觅食行为的最佳温度范围。

在口器咬合实验中,20℃组两种规格海胆的口器咬合频率显著低于其他温度组(10℃组、15℃组),这意味着高温削弱了海胆操纵下颌获取食物的能力^[17]。海胆的觅食和口器咬合均是由离散的神经肌肉介导的行为^[17]。温度升高可能影响了海胆神经肌肉功能^[24],导致海胆行为受抑制,降低了觅食和摄食效率^[17]。因此,10~15℃是中间球海胆最佳的摄食温度范围,利于海胆生存。然而,有趣的是,中间球海胆的摄食量在10℃、15℃、20℃的水温中呈逐渐上升趋势。这与常亚青等^[2]发现在10~19℃范围内,19℃组的中间球海胆无论摄食海带、裙带菜或石莼(*Ulva lactuca*),其摄食率均最高的现象一致。这表明20℃时,中间球海胆虽表现出相对较弱的觅食和摄食行为,但摄食量却显著高于其他温度组。

3.3 温度对中间球海胆生长的影响

本研究发现20℃环境下海胆的口器长/壳径最高。这一现象可能是由于海胆为了满足高温下的自身代谢需求^[25-26],口器与壳之间产生了异速增长^[15]。口器的增大有利于增加海胆的摄食能力^[27]。20℃下海胆口器与壳之间显著的异速增长是海胆觅食和摄食行为显著降低条件下依然具有高摄食量的可能原因。

20℃下两种规格海胆的壳径、壳重、壳高、体重、口器长、口器重、性腺重和肠重均小于15℃组和10℃组。这与Zhao等^[15]发现长期生活在高温下的中间球海胆其壳径、体重和壳重显著下降的结论一致。综上,10~15℃水温是中间球海胆底播增殖的最佳温度范围。相较于20℃,10~15℃水温下海胆具有显著更强的觅食和摄食行为和更好的生长发育,有利于底播增殖。

海胆壳的硬度对于防御非生物干扰和捕食很重要,决定着海胆的适应性^[17]。本研究发现20℃组海胆的壳压力显著小于15℃组海胆。这表明15℃环境下中间球海胆抗干扰能力更强。此外,海胆壳的塑性表明它们在成长过程中骨骼的灵活性^[28],壳高/壳径的种内差异与栖息地环境相关^[29-30]。在

本研究中发现,生活在20℃环境下的中间球海胆的壳高/壳径均显著高于其他两组,体现了海胆形状对环境压力的适应性^[31]。这与Zhao等^[15]关于长期高温显著增加了中间球海胆的壳高/壳径的实验结论相一致。这还表明与其他两个温度相比,20℃对中间球海胆幼胆造成的环境压力更大,使得20℃组海胆通过发生显著形状变化来适应环境。另外,其缩小的体型将会减少高温对能量的需求,有助于海胆生存^[15]。虽然两种规格海胆在10℃、15℃、20℃3个温度下都能够正常生存,但由于它们对温度的敏感性^[15]以及对水温的耐受能力不同^[7],采取多种方式减轻和抵御环境温度的升高所带来的负面影响^[22],导致海胆在3个温度下的适应性有所差异。

4 结论

本研究结果表明,10~15℃为中间球海胆最适宜的底播增殖温度范围。在此水温下,中间球海胆具有显著更快的生长速度和更活跃的行为,有利于自身的生长发育。本实验揭示了不同温度下中间球海胆生存、生长和行为的变化规律,为中间球海胆底播增殖和资源管理提供了有价值的参考信息。

参考文献:

- [1] Agatsuma Y. *Strongylocentrotus intermedius*[M]//Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: Elsevier, 2013: 437-447.
- [2] Chang Y Q, Wang Z C, Wang G J. Effect of temperature and algae on feeding and growth in sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(1): 69-76. [常亚青, 王子臣, 王国江. 温度和藻类饵料对虾夷马粪海胆摄食及生长的影响[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 69-76]
- [3] Wang Z C, Chang Y Q. Research prospects for marine culture of economic sea urchin[J]. Marine Sciences, 1997, 21(6): 20-22. [王子臣, 常亚青. 经济类海胆增养殖研究进展及前景[J]. 海洋科学, 1997, 21(6): 20-22.]
- [4] Andrew N L, Agatsuma Y, Ballesteros E, et al. Status and management of world sea urchin fisheries[M]//Oceanography and Marine Biology, An Annual Review. Los Angeles: CRC Press, 2002, 40: 343-425.
- [5] Sun J N, Chi X M, Yang M F, et al. Light intensity regulates phototaxis, foraging and righting behaviors of the sea urchin

- Strongylocentrotus intermedius*[J]. PeerJ, 2019, 7: e8001.
- [6] Sakai Y, Tajima K I, Agatsuma Y. Stock enhancement of the short-spined sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* in Hokkaido, Japan[M]//Stock Enhancement and Sea Ranching. Oxford: Blackwell Publishing, 2004: 465-476.
- [7] Gao X S, Sun M Y, Hu Q M, et al. Influence of temperature on various development stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* A[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1993, 24(6): 634-640. [高绪生, 孙勉英, 胡庆明, 等. 温度对光棘球海胆不同发育阶段的影响[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(6): 634-640.]
- [8] Lawrence J M, Cao X B, Chang Y Q, et al. Temperature effect on feed consumption, absorption, and assimilation efficiencies and production of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Shellfish Research, 2009, 28(2): 389-395.
- [9] Lemoine N P, Burkepille D E. Temperature-induced mismatches between consumption and metabolism reduce consumer fitness[J]. Ecology, 2012, 93(11): 2483-2489.
- [10] Zhao C, Feng W P, Wei J, et al. Effects of temperature and feeding regime on food consumption, growth, gonad production and quality of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2016, 96(1): 185-195.
- [11] Uthicke S, Liddy M, Nguyen H D, et al. Interactive effects of near-future temperature increase and ocean acidification on physiology and gonad development in adult Pacific sea urchin, *Echinometra* sp. A[J]. Coral Reefs, 2014, 33(3): 831-845.
- [12] Wolfe K, Dworjanyn S A, Byrne M. Effects of ocean warming and acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*)[J]. Global Change Biology, 2013, 19(9): 2698-2707.
- [13] Bodmer M D V, Wheeler P M, Hendrix A M, et al. Interacting effects of temperature, habitat and phenotype on predator avoidance behaviour in *Diadema antillarum*: Implications for restorative conservation[J]. Marine Ecology Progress Series, 2017, 566: 105-115.
- [14] Zhao C, Ji N J, Zhang B L, et al. Effects of covering behavior and exposure to a predatory crab *Charybdis japonica* on survival and HSP70 expression of juvenile sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97840.
- [15] Zhao C, Zhang L S, Qi S B, et al. Multilevel effects of long-term elevated temperature on fitness related traits of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Bulletin of Marine Science, 2018, 94(4): 1483-1497.
- [16] Agatsuma Y. Ecology of *Strongylocentrotus nudus*[M]//Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: Elsevier, 2001, 32: 347-361.
- [17] Brothers C J, McClintock J B. The effects of climate-induced elevated seawater temperature on the covering behavior, righting response, and Aristotle's lantern reflex of the sea urchin *Lytechinus variegatus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2015, 467: 33-38.
- [18] Ding J Y, Zheng D F, Sun J N, et al. Effects of water temperature on survival, behaviors and growth of the sea urchin *Mesocentrotus nudus*: New insights into the stock enhancement[J]. Aquaculture, 2020, 519: 734873.
- [19] Shi D T, Ding J Y, Zhang L L, et al. Effects of UV-B radiation on fitness related behaviors of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(5): 1681-1687.
- [20] You K, Zeng X Q, Liu H, et al. Selectivity and tolerance of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) to environmental change[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(3): 409-412. [尤凯, 曾晓起, 刘晖, 等. 马粪海胆对环境变化的耐受性与选择性研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 409-412.]
- [21] Agatsuma Y, Takagi S, Inomata E, et al. Process of deterioration of a kelp (*Ecklonia bicyclis* Kjellman) bed as a result of grazing by the sea urchin *Mesocentrotus nudus* (Agassiz) in Shizugawa Bay in northeastern Honshu, Japan[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(1): 599-605.
- [22] Zhang L S. Effects of long-term high temperature stress on behaviours, growth and offspring traits of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017. [张立胜. 长时间升温胁迫对中间球海胆行为、生长及子代性状的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.]
- [23] Kirwan J D, Bok M J, Smolka J, et al. The sea urchin *Diadema africanum* uses low resolution vision to find shelter and deter enemies[J]. Journal of Experimental Biology, 2018, 221(14): jeb176271.
- [24] De Ridder C, Lawrence J M. Food and feeding mechanisms: Echinoidea[M]//Echinoderm Nutrition. Los Angeles: CRC Press, 1982: 57-92.
- [25] Spirlet C, Grosjean P, Jangoux M. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata)[J]. Aquaculture, 2000, 185(1-2): 85-99.
- [26] Ulbricht R J. Effect of temperature acclimation on the metabolic rate of sea urchins[J]. Marine Biology, 1973, 19(4): 273-277.
- [27] Ebert T A, Hernández J C, Clemente S. Annual reversible plasticity of feeding structures: Cyclical changes of jaw allometry in a sea urchin[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014, 281(1779): 20132284.
- [28] Johnson A S, Ellers O, Lemire J, et al. Sutural loosening and skeletal flexibility during growth: Determination of drop-like shapes in sea urchins[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2002, 269(1488): 215-220.
- [29] McPherson B F. Contributions to the biology of the sea urchin

- hin *Tripneustes ventricosus*[J]. Bulletin of Marine Science, 1965, 15(1): 228-244.
- [30] Lewis J B, Storey G S. Differences in morphology and life history traits of the echinoid *Echinometra lucunter* from different habitats[J]. Marine Ecology Progress Series, 1984, 15: 207-211.
- [31] Zhao C, Zhang L L, Shi D T, et al. Carryover effects of short-term UV-B radiation on fitness related traits of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 164: 659-664.

Effects of water temperature on survival, behavior, and growth of small sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)

ZHENG Dingfa, WANG Huiyan, DING Jingyun, SUN Jiangnan, ZHAO Chong, CHANG Yaqing

Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Stock enhancement is an effective method to achieve high production of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. This process is affected by various internal and external factors, among which temperature plays an important role. Temperature significantly affects the feeding and metabolism of *S. intermedius*, thereby regulating survival and growth. Temperature change, as an important stress factor, affects the behaviors of *S. intermedius*. These behaviors can effectively protect *S. intermedius* from the effects of environmental factors. The righting response, frequency of Aristotle's lantern reflex, foraging behavior, positive phototaxis behavior, and negative phototaxis behavior reflect the behavioral functions of *S. intermedius* for foraging and self-protection against predators. Additionally, they are the most important adaptation-related characteristics for increasing the population size of *S. intermedius*. Therefore, it is essential to determine the optimal temperature range for stock enhancement of *S. intermedius*.

In this study, *S. intermedius* were placed in temperature-controlled tanks. Stones were collected locally and placed in the tanks to simulate the benthic environment of *S. intermedius*. We placed large [(23.29±0.27) mm] and small [(18.78±0.19) mm] *S. intermedius* in three temperature environments (10 °C, 15 °C, and 20 °C) for 6 weeks to observe the changes in their survival, growth and behaviors, to reveal the effects of different temperatures on *S. intermedius*. Growth referred to the change in body traits (test diameter, test weight, test height, crushing force of test, test thickness, body weight, lantern length, and lantern weight) and tissue weight (gonad weight and gut weight) of *S. intermedius* after 6 weeks. Behaviors included righting response, frequency of Aristotle's lantern reflex, foraging behavior, positive phototaxis, and negative phototaxis.

There was no mortality during the experiment. This indicates that 10–20 °C is an acceptable temperature range for the survival of *S. intermedius*. The food consumption of sea urchins in the 20 °C group was significantly higher than that in the other two temperature groups for both body sizes ($P<0.001$). Test diameter, test weight, test height, crushing force of test, body weight, lantern length, lantern weight, gonad weight, and gut weight of different sizes were significantly lower in sea urchins exposed to 20 °C than to 10 °C and 15 °C. Therefore, 10 °C and 15 °C were within the most suitable temperature range for optimal growth and development of sea urchins. Moreover, the frequency of Aristotle's lantern reflex, phototaxis, negative phototaxis, and foraging behaviors of *S. intermedius* exposed to 15 °C was significantly greater than that at 20 °C. This suggests that *S. intermedius* exhibits better behavior in this environment. In summary, the present study investigated the changes in survival, growth, and behaviors of *S. intermedius* at different water temperatures and found that 10–15 °C is appropriate for behavior and growth of *S. intermedius*. Releasing juvenile *S. intermedius* at 10–15 °C will maximize the benefit of stock enhancement. The present study provides valuable information for stock enhancement and resource management of *S. intermedius*.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; temperature; stock enhancement; growth; behavior

Corresponding author: ZHAO Chong, E-mail: chongzhao@dlou.edu.cn; CHANG Yaqing, E-mail: changlab@hotmail.com

DOI: 10.12264/JFSC2021-0351

饲料中发酵啤酒酵母添加水平对大口黑鲈生长、饲料利用效率和水质的影响

崔正贺¹, 余聪², 李云梦², 王岩²

1. 焦作师范高等专科学校, 河南 焦作 454001;

2. 浙江大学海洋学院, 浙江 舟山 316021

摘要: 通过养殖实验评价了饲料中发酵啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)添加水平对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长、饲料利用效率和水质的影响。以鱼粉含量为 40%的饲料为背景(RF), 利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中 60%的鱼粉(CH0); 在饲料 CH0 的基础上, 分别按 1% (CH1)和 2% (CH2)的剂量添加发酵啤酒酵母。将初始体重为(21.7±0.2) g 的实验鱼在容积为 4000 L 的室外聚乙烯水槽内养殖 8 周, 密度为 30 尾/水槽。实验期间, 水温为(22.5±5.2) °C, 溶解氧>6.0 mg/L, pH 为 6.8±0.1。实验结果表明, 在饲料中添加 1%或 2%的发酵啤酒酵母对鱼成活率、体增重、摄食率、饲料利用效率(饲料系数、碳和氮储积效率)、单位鱼产量鱼粉消耗、鱼体形态(肥满度、肝重指数)和组成(水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分、碳和磷含量)、碳、氮和磷废物排放量以及养殖水槽内水质(氨氮、总磷和高锰酸盐指数)无显著影响($P>0.05$)。磷储积效率随发酵啤酒酵母添加水平增加明显下降($P<0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间在体增重、摄食率、饲料系数、碳和氮储积效率、鱼体水分、粗蛋白和粗脂肪含量、碳废物排放量方面无显著差异($P>0.05$), 但前者的单位鱼产量鱼粉消耗、肝重指数和鱼体灰分含量明显高于后者($P<0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼磷储积效率明显高于摄食饲料 CH1 和 CH2 的鱼($P<0.05$), 而氮和磷废物排放量显著低于后者($P<0.05$)。与采用湖沼学方法估算的养殖水体氮、磷积累量相比, 采用营养学方法估算的氮积累量较低($P<0.05$), 而磷积累量较高($P<0.01$)。本研究结果揭示, 通过添加棉籽浓缩蛋白将饲料中鱼粉含量降低到 16%不会对大口黑鲈摄食、生长、饲料利用效率、鱼体组成和养殖废物排放量产生显著的负面影响; 在饲料中添加 1%或 2%的发酵啤酒酵母不会明显增加摄食低鱼粉饲料的鱼的生长速度和饲料利用效率, 或明显降低其养殖废物排放量。

关键词: 大口黑鲈; 发酵啤酒酵母; 饲料; 生长; 氮排放; 磷排放; 水质

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0274-10

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)属鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Centrarchidae), 黑鲈属, 俗名加州鲈, 为淡水肉食性鱼类, 原产于北美洲, 20 世纪 80 年代后被引入中国大陆养殖。大口黑鲈生长速度快, 肉质鲜美, 适温范围广, 是淡水池塘集约化养殖的优良品种。国外学者报道大口黑鲈饲料蛋白质需求为 40%~44%^[1-2], 但投喂据

此参数配方的饲料时鱼生长缓慢, 故国内池塘养殖中曾一度以冰鲜鱼为饵料。陈乃松等^[3]发现大口黑鲈适宜饲料蛋白质含量为 46%~49%, Huang 等^[4]进一步指出其适宜饲料蛋白质水平为 48%~52%, 表明高蛋白的配合饲料可满足大口黑鲈快速生长的需求。配合饲料技术的突破推动了大口黑鲈养殖产业的发展, 2017 年国内大口黑鲈养殖

收稿日期: 2021-07-26; 修订日期: 2021-09-15.

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2018C02033).

作者简介: 崔正贺(1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类生态和养殖. E-mail: cuizhenghe@163.com

通信作者: 王岩, 教授, 研究方向为水域生态学、鱼类营养和可持续水产养殖模式. E-mail: ywang@zju.edu.cn

产量从 2016 年的 347300 t 跃增至 456900 t。

减少鱼类饲料中的鱼粉用量是近 40 年来水产养殖研究的重要问题^[5-6]。与杂食性鱼类饲料相比,肉食性鱼类饲料中蛋白质和鱼粉含量较高^[7],例如大口黑鲈商业饲料中鱼粉含量高达 45%^[8]。研究表明,通过添加鸡肉粉和豆粕混合物、大豆浓缩蛋白(SPC)或辐照羽毛粉可将饲料鱼粉含量降低至 16%,而对大口黑鲈生长和饲料利用效率无明显负面影响^[9-11]。啤酒酵母中富含核苷酸^[12],而核苷酸可改善鱼类的生长^[13]。国外学者报道在饲料中按 1%添加发酵啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)能够明显改善虹鳟的生长和免疫性能^[14-15],但 Wu 等^[11]发现添加 0.5%的发酵啤酒酵母未显著增加利用大豆浓缩蛋白替代大口黑鲈饲料鱼粉的水平。考虑到发酵啤酒酵母的作用效果可能与其在饲料中的添加量有关,有必要探讨增加发酵啤酒酵母的添加水平是否有助于改善摄食低鱼粉饲料的大口黑鲈的生长。此外,尽管研究表明利用 SPC 适度替代饲料鱼粉不会导致氮、磷废物排放量增加^[11],但该结论尚未从水质的角度得以验证。本研究通过养殖实验评价了饲料中发酵啤酒酵母添加水平对大口黑鲈产量、饲料利用效率和养殖水质的影响,目的是确定在大口黑鲈低鱼粉饲料配方中添加发酵啤酒酵母的必要性,同时评价利用棉籽浓缩蛋白(CPC)替代饲料鱼粉对大口黑鲈养殖水质的影响。

1 材料与方法

1.1 实验设计、实验鱼和饲料

采用单因素实验设计。背景饲料(RF)鱼粉含量为 40%,利用棉籽浓缩蛋白(CPC)替代饲料 RF 中鱼粉的 60% (CH0),在此基础上,分别按 1% (CH1)和 2% (CH2)的剂量添加发酵啤酒酵母。实验饲料蛋白质和脂肪含量分别为 50%和 11%^[4]。

所用大口黑鲈幼鱼购自德清市乾元镇某淡水鱼育苗场(湖州,浙江),用活水车运至浙江大学紫金港校区动物科学实验中心后,先在容积为 2000 L 的室外聚乙烯水槽中暂养 4 周,暂养期间投喂根据浙江大学水域生态系统与水产养殖实验室配方加工的浮性膨化饲料(粗蛋白含量为 50%,

粗脂肪含量为 9%)。所用棉籽浓缩蛋白(CPC)由湖南欣瑞生物科技有限公司(常德,湖南)提供,其他饲料原料,包括蒸汽干燥鱼粉(新西兰)、宠物级鸡肉粉(美国)、去皮豆粕、大豆浓缩蛋白(SPC)、面粉和鱼油等购自浙江省科盛饲料股份有限公司(绍兴,浙江)。DL-Met 购自潜江永安制药有限公司(潜江,湖北)。蛋白混合物根据专利(ZL 200710001775.0)配制,成分包括鸡肉粉、豆粕、晶体氨基酸等。主要饲料原料的营养组成见表 1。

表 1 饲料原料的营养组成
Tab. 1 Proximate composition of the feed ingredients %

原料 ingredient	干物质 dry matter	粗蛋白 crude protein	粗脂肪 crude lipid	灰分 ash
鱼粉 fish meal	91.6	69.5	9.0	13.4
棉籽浓缩蛋 cottonseed-protein meal	91.8	63.0	0.7	7.3
蛋白混合物 soybean meal	90.7	49.7	1.3	6.4
面粉 wheat flour	88.0	17.6	2.2	1.0

注:粗蛋白、粗脂肪和灰分表示原料在自然贮存条件下的含量,数据为两次测量结果的平均值。
Note: Crude protein, crude lipid and ash reflect the situation of the feed ingredients stored in air, and the data are means of two measurements.

将饲料原料粉碎,过 80 目筛,然后根据配方依次称重各原料(最后加入鱼油)并手工混匀,将饲料原料混合物移入饲料搅拌机,加入约 20% (V/W)的水后混合 10 min。用中国水产科学研究院渔业机械研究所生产的 SLP-450 型单螺杆饲料膨化机进行饲料颗粒(直径为 3 mm,长度为 5 mm)的制粒。待饲料在室温下自然风干后将其分装在塑料袋内,使用前贮存在冰箱(-20 ℃)中。实验饲料配方和营养组成见表 2。

1.2 养殖实验

实验前挑选 500 尾个体大小接近的鱼,将其在室外聚乙烯水槽(直径为 140 cm,高为 140 cm,容积为 2000 L)中驯养两周。驯养期间每天早、晚分别按饱食量投喂饲料 RF。实验开始时先停喂 24 h,然后将驯养的鱼集中在一个水槽中。每次随机捕捞 30 尾鱼,群体称重后随机放入实验所用的室外聚乙烯水槽(直径为 160 cm,高为 200 cm,容积为 4000 L)中。每种饲料设 3 个重复,共用 12

个水槽。实验鱼初始体重为(21.7±0.2) g ($\bar{x}$ ±SD, $n=12$)。放养结束后从剩余的驯养鱼中随机取 3 组鱼(5 尾/组), 分别测量其体重、体长和肝重。将所取的鱼保存在冰箱(-20 °C)中作为分析实验开始时鱼体组成的样品。

表 2 实验饲料配方和营养组成
Tab. 2 Formulation and proximate composition of the test diets

原料 ingredient	饲料 diet				%
	RF	CH0	CH1	CH2	
鱼粉 fish meal	40.0	16.0	16.0	16.0	
棉籽浓缩蛋白 cottonseed-protein meal	0.0	26.5	26.5	26.5	
蛋白混合物 protein premix	30.0	30.0	30.0	30.0	
面粉 wheat flour	12.9	12.9	12.9	12.9	
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.5	1.5	1.5	1.5	
氯化胆碱 choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	
维生素和矿物质预混物 ^a vitamin and mineral premix ^a	1.5	1.5	1.5	1.5	
发酵啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			1.0	2.0	
沸石粉 bentonite	6.5	2.0	1.0	0.0	
鱼油 fish oil	7.4	9.4	9.4	9.4	
干物质 dry matter	92.8	92.4	91.6	93.2	
粗蛋白 ^b crude protein ^b	50.3	50.1	50.4	50.3	
粗脂肪 ^b crude lipid ^b	11.0	11.2	11.1	11.1	
灰分 ^b ash ^b	15.2	9.6	8.7	8.0	
磷 ^b phosphorus ^b	1.6	1.6	1.6	1.6	

注: ^a 维生素和矿物质预混物(每 kg 饲料): 维生素 A, 8000 IU; 维生素 D₃, 2000 IU; 维生素 E, 100 mg; 维生素 K₃, 7.5 mg; 维生素 B₁, 15 mg; 维生素 B₂, 15 mg; 维生素 B₆, 12.5 mg; 维生素 B₁₂, 0.05 mg; 生物素, 0.25 mg; 泛酸钙, 40 mg; 叶酸, 5 mg; 烟酰胺, 50 mg; 维生素 C, 140 mg; 肌醇, 120 mg; FeSO₄, 40 mg; CuSO₄·5H₂O, 25 mg; MnSO₄·4H₂O, 10 mg; ZnSO₄, 100 mg; MgSO₄·7H₂O, 200 mg; CoCO₃, 0.35 mg; KI, 0.05 mg; Na₂SeO₃, 0.3 mg; C₁₄H₁₉NO, 5 mg. ^b 粗蛋白、粗脂肪、灰分和磷含量表示自然贮存条件下的含量, 数据为两次测量结果的平均值。

Note: ^a Rovimix provides per kg of feed: vitamin A, 8000 IU; vitamin D₃, 2000 IU; vitamin E, 100 mg; vitamin K₃, 7.5 mg; vitamin B₁, 15 mg; vitamin B₂, 15 mg; vitamin B₆, 12.5 mg; vitamin B₁₂, 0.05 mg; D-biotin, 0.25 mg; D-calcium pantothenate, 40 mg; folic acid, 5 mg; niacinamide, 50 mg; vitamin C, 140 mg; inositol, 120 mg; FeSO₄, 40 mg; CuSO₄·5H₂O, 25 mg; MnSO₄·4H₂O, 10 mg; ZnSO₄, 100 mg; MgSO₄·7H₂O, 200 mg; CoCO₃, 0.35 mg; KI, 0.05 mg; Na₂SeO₃, 0.3 mg; C₁₄H₁₉NO, 5 mg. ^b Crude protein, crude lipid, ash and phosphorus are expressed as the situation stored in air, and the data are means of two measurements.

养殖实验从 2017 年 8 月 26 日开始至 10 月

20 日结束, 历时 8 周。实验期间, 每天 8:00 和 16:00 分别按饱食量向实验水槽内投喂饲料^[16]。发现水槽内有死鱼则立即捞出并称重。水槽内 24 h 连续充气, 并根据水质状况分别在 9 月 4 日、9 月 13 日、9 月 26 日和 10 月 8 日适度换水(每次换水量为 2000 L)。记录降雨天数(共 13 d)。每天 7:30 和 15:30 测量水温[(22.5±5.2) °C]; 每天上午分别用 YSI-58 溶氧仪(YSI Incorporated, 美国)和雷磁 PHB-4 pH 计(上海精密科学仪器有限公司, 中国)测定水槽内溶氧(>6.0 mg/L)和 pH(6.8±0.1)。定期用 5 L 采水器在每个实验水槽内水面下 0.5 m 处采样, 分析总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮(TAN)和高锰酸盐指数(COD_{Mn})。实验结束时, 先停喂 24 h, 然后分别将每个水槽内的鱼全部捕出并群体称重。从每个水槽内随机取 5 尾鱼, 分别测量其体重、体长和肝重后保存在冰箱(-20 °C)中, 作为分析实验结束时鱼体组成的样品。

1.3 化学分析

将所取的实验鱼样品在室温下化冻、称重, 在高压灭菌锅(120 °C)内蒸煮 20 min 后转入烘箱内(105 °C)烘干。饲料原料、实验饲料和实验鱼分析前先粉碎并过 40 目筛, 按 AOAC (1995)^[17]方法分析水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量。其中, 粗蛋白含量用 Foss-8400 全自动凯氏定氮仪(FOSS, 瑞典)测定; 粗脂肪含量用 SZF-06A 脂肪抽提仪(上海新嘉电子有限公司, 中国)测定。用钒钼酸铵法测定磷含量; 用 EA3000 CHNS 元素分析仪(Euro Vector, 意大利)测定碳含量。

所取水样的 TN、TP 和 TAN 含量用 Skalar San⁺⁺营养盐流动注射分析仪(Skalar Analytical BV, 荷兰)测定。用酸性高锰酸钾法测定 COD_{Mn}。

1.4 数据计算与统计

摄食率(feed intake, FI)、体增重(weight gain, WG)、饲料系数(feed conversion ratio, FCR)、碳储积效率(carbon retention efficiency, CRE)、氮储积效率(nitrogen retention efficiency, NRE)、磷储积效率(phosphorus retention efficiency, PRE)、肥满度(condition factor, CF)、肝重指数(hepatosomatic index, HSI)、碳废物排放量(carbon waste, CW)、

氮废物排放量(nitrogen waste, NW)和磷废物排放量(phosphorus waste, PW)、单位鱼产量鱼粉消耗(ratio of fish meal consumption to fish production, RCP)分别按下列公式计算:

$$FI (\%/d) = 100 \times I / [(W_0 + W_t) / 2 \times t]$$

$$WG (g) = W_t / N_t - W_0 / N_0$$

$$FCR = I / (W_t - W_0 + W_d)$$

$$CRE (\%) = 100 \times (W_t \times C_{Ct} - W_0 \times C_{C0} + W_d \times C_{Cd}) / (I \times C_{Cf})$$

$$NRE (\%) = 100 \times (W_t \times C_{Nt} - W_0 \times C_{N0} + W_d \times C_{Nd}) / (I \times C_{Nf})$$

$$PRE (\%) = 100 \times (W_t \times C_{Pt} - W_0 \times C_{P0} + W_d \times C_{Pd}) / (I \times C_{Pf})$$

$$CF (g/cm^3) = 100 \times W_s / L_s^3$$

$$HSI (\%) = 100 \times W_l / W_s$$

$$CW [g C / (kg \text{ fish gain})] = 1000 \times (I \times C_{Cf}) \times (1 - CRE) / (W_t - W_0 + W_d)$$

$$NW [g N / (kg \text{ fish gain})] = 1000 \times (I \times C_{Nf}) \times (1 - NRE) / (W_t - W_0 + W_d)$$

$$PW [g P / (kg \text{ fish gain})] = 1000 \times (I \times C_{Pf}) \times (1 - PRE) / (W_t - W_0 + W_d)$$

$$RCP (g/g) = WG \times FCR \times FL / (W_t / N_t \times DMF_t - W_0 / N_0 \times DMF_0)$$

式中, $I(g)$ 为实验期间每个水槽内投喂的饲料量; $W_0(g)$ 和 $W_t(g)$ 分别为实验开始和结束时鱼的体重; N_0 和 N_t 为实验开始和结束时每个水槽内鱼的尾数; $t(d)$ 为实验时间; $W_d(g)$ 为每个水槽内死鱼的质量; $C_{C0}(\%)$ 和 $C_{Ct}(\%)$ 分别为实验开始和结束时鱼体的碳含量; $C_{Cd}(\%)$ 为死鱼的碳含量; $C_{N0}(\%)$ 和 $C_{Nt}(\%)$ 分别为实验开始和结束时鱼体的氮含量; $C_{Nd}(\%)$ 为死鱼的氮含量; $C_{P0}(\%)$ 和 $C_{Pt}(\%)$ 分别为实验开始和结束时鱼体的磷含量; $C_{Pd}(\%)$ 为死鱼的磷含量; $C_{Cf}(\%)$ 、 $C_{Nf}(\%)$ 和 $C_{Pf}(\%)$ 分别为饲料的碳、氮和磷含量; $W_s(g)$ 、 $L_s(cm)$ 和 $W_l(g)$ 分别为实验结束时所取样鱼样品的体重、体长和肝重。 $FL(\%)$ 为实验饲料鱼粉含量, $DMF_0(\%)$ 和 $DMF_t(\%)$ 为实验开始和结束时鱼体的干物质含量。

实验水槽内积累的氮(NA)、磷(PA)可根据营养学方法和湖沼学方法计算^[18]。按营养学方法计算时, 其公式如下:

$$NA (g) = NW \times (W_t - W_0)$$

$$PA (g) = PW \times (W_t - W_0)$$

按湖沼学方法计算时, 其公式如下:

$$NA (g) = [(TN_t - TN_0) \times V + \sum v \times TN_e \text{ 或 } TP_e] / 1000$$

$$PA (g) = [(TP_t - TP_0) \times V + \sum v \times TN_e \text{ 或 } TP_e] / 1000$$

式中, $NW[g N / (kg \text{ fish gain})]$ 和 $PW[g P / (kg \text{ fish$

gain])分别为鱼类养殖的氮和磷废物排放量; $W_0(g)$ 和 $W_t(g)$ 分别为实验开始和结束时鱼的体重; $TN_t(mg/L)$ 和 $TP_t(mg/L)$ 分别为实验结束时水体总氮和总磷浓度; $TN_0(mg/L)$ 和 $TP_0(mg/L)$ 分别为实验开始时水体总氮和总磷浓度; $V(L)$ 为养殖水体积; $v(L)$ 为每次换水体积; $TN_e(mg/L)$ 和 $TP_e(mg/L)$ 分别为排水中的总氮和总磷浓度。

采用单因素方差分析(ANOVA)检验饲料中发酵啤酒酵母添加水平对终体重、成活率、FI、WG、FCR、CRE、NRE、PRE、RCP、CF、HSI、鱼体组成(水分、蛋白质、脂肪、碳、灰分和磷)、CW、NW、PW、TN、TP、TAN 和 COD_{Mn} 的影响。若处理效应显著, 则进一步进行 Duncan's 检验比较 CH0、CH1 和 CH2 之间差异。采用 Dunnett test 比较饲料 RF 与饲料 CH0、CH1 和 CH2 之间上述指标的差异。方差分析前先对用百分数表示的数据(如 FI、NRE、PRE、HSI 和鱼体组成等)进行反正弦转换。采用成对数据 t 检验方法比较采用营养学方法和湖沼学方法所计算出的氮、磷积累量之间的差异。所用统计分析利用 SPSS 20.0 软件完成, 取 $P < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 实验鱼存活、摄食、生长、饲料利用效率和饲料鱼粉依赖性

由表 3 可见, 发酵啤酒酵母添加水平对实验鱼成活率、终体重、WG、FI、FCR、CRE、NRE 和 RCP 无显著影响($P > 0.05$)。随发酵啤酒酵母添加水平升高, PRE 明显下降($P < 0.05$), 摄食饲料 CH0 的鱼 PRE 明显高于摄食饲料 CH2 的鱼($P < 0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼终体重、WG、FI、FCR、CRE、NRE 以及成活率与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间无显著差异($P > 0.05$), 但其 PRE 明显高于摄食饲料 CH1 和 CH2 的鱼($P < 0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼 RCP 明显高于摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼($P < 0.05$)。

2.2 实验鱼肥满度、肝重指数和鱼体组成

从表 4 可见, 发酵啤酒酵母添加水平对实验鱼 CF、HSI 和鱼体组成(水分、粗蛋白、粗脂肪、

灰分、碳、磷)无显著影响($P>0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和碳含量与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间无显著差异($P>0.05$), 但 HSI 和鱼体灰分含量明显高于后者($P<0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼 CF 显著高于摄食饲料 CH0 的鱼, 磷含量明显高于摄食饲料 CH2 的鱼($P<0.05$)。

2.3 养殖废物排放量和水质变化

从表 5 可见, 不同发酵啤酒酵母添加水平对 CW、NW 和 PW 无显著影响($P>0.05$)。摄食饲料 RF 的鱼 CW 与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼

之间无显著差异($P>0.05$), 但其 NW 和 PW 分别显著低于摄食饲料 CH1 和 CH2 的鱼($P<0.05$)。

从表 6 可见, 按营养学方法计算的养殖水体氮积累量低于按湖沼学方法计算的值($P<0.05$), 但按营养学方法计算的水体磷积累量明显高于按湖沼学方法计算的值($P<0.01$)。

从图 1 可见, 实验期间水槽内水温始终处于波动状态, 总体上随实验时间延长呈下降趋势。最高水温为 32.5 ℃, 最低水温为 15.2 ℃, 水温低于 20 ℃的时间有 14 d。

表 3 大口黑鲈存活、摄食、生长、饲料利用效率和饲料鱼粉依赖性
Tab. 3 Survival, feed intake, growth, feed utilization efficiency and ratio of fish meal consumption to fish production in *Micropterus salmoides* cultivation

n=3; $\bar{x} \pm SD$; WW

饲料 diet	终体重/g final body weight	体增重/g WG	摄食率/(%/d) FI	饲料系数 FCR	碳储积率/% CRE	氮储积率/% NRE	磷储积率/% PRE	单位鱼产量鱼粉消耗 /(g/g) RCP	成活率/% survival
RF	76.1±2.4	54.2±2.6	1.77±0.03	0.90±0.03	36.86±2.47	38.38±1.49	43.10±2.62	1.27±0.07	99±2
CH0	77.4±7.2 ^a	55.7±7.4 ^a	1.86±0.08 ^a	0.95±0.02 ^a	34.49±1.27 ^a	36.26±0.57 ^a	40.44±3.51 ^b	0.55±0.02 ^{a*}	96±4 ^a
CH1	69.3±6.1 ^a	47.9±6.2 ^a	1.87±0.04 ^a	1.02±0.09 ^a	31.11±3.08 ^a	34.34±2.88 ^a	34.87±3.70 ^{ab*}	0.56±0.06 ^{a*}	98±2 ^a
CH2	73.3±3.1 ^a	51.6±2.9 ^a	1.85±0.08 ^a	0.99±0.08 ^a	31.49±2.17 ^a	34.45±3.32 ^a	31.62±2.41 ^{a*}	0.56±0.05 ^{a*}	96±2 ^a

注: RF 为鱼粉含量为 40% 的背景饲料; 在 CH0、CH1 和 CH2 中利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中鱼粉的 60%, 其中 CH1 和 CH2 中分别按 1% 和 2% 的剂量添加发酵啤酒酵母。上标字母和星号分别表示 Duncan's 检验(CH0、CH1 和 CH2 之间)和 Dunnett 检验(RF 与 CH0、CH1 和 CH2 之间)结果。同列数据中上标字母不同者表示处理间差异显著($P<0.05$), 同列数据中上标星号者表示其与 RF 差异显著($P<0.05$)。
Note: RF was the reference diet containing 40% fish meal; in diets CH0, CH1 and CH2, 60% of the fish meal in diet RF was replaced with cottonseed protein concentrate, and fermented brewer's yeast was added at 1% and 2% in diets CH1 and CH2. The superscripts (letter or asterisk) represent the results of Duncan's test (between CH0, CH1 and CH2) or Dunnett test (between RF and CH0, CH1 or CH2), respectively. The data in the same column with different letter are significantly different in Duncan's test ($P<0.05$), while the data in the same column with asterisk are significant from RF ($P<0.05$).

表 4 大口黑鲈肥满度、肝重指数和鱼体组成
Tab. 4 Condition factor, hepatosomatic index and body composition of *Micropterus salmoides*

n=3; $\bar{x} \pm SD$; WW

饲料 diet	肥满度/(g/cm ³) CF	肝重指数/% HSI	水分/% moisture	粗蛋白/% crude protein	粗脂肪/% crude lipid	灰分/% ash	碳/% carbon	磷/% phosphorus
initial	1.91±0.17	2.41±0.58	73.6±0.3	16.2±0.1	5.4±0.3	4.3±0.0	12.6±0.6	1.04±0.01
RF	2.17±0.19	2.64±0.45	72.0±0.6	17.1±0.1	6.6±0.6	3.6±0.1	13.6±0.3	0.75±0.01
CH0	2.01±0.07 ^{a*}	2.00±0.32 ^{a*}	72.6±0.2 ^a	16.9±0.2 ^a	6.6±0.4 ^a	3.4±0.1 ^{a*}	13.5±0.2 ^a	0.72±0.04 ^a
CH1	2.11±0.11 ^a	2.04±0.24 ^{a*}	71.9±0.5 ^a	17.1±0.1 ^a	6.9±0.7 ^a	3.4±0.0 ^{a*}	13.5±0.1 ^a	0.72±0.02 ^a
CH2	2.06±0.11 ^a	2.08±0.44 ^{a*}	72.5±0.2 ^a	16.8±0.3 ^a	7.0±0.1 ^a	3.3±0.1 ^{a*}	13.3±0.1 ^a	0.68±0.01 ^{a*}

注: RF 为鱼粉含量为 40% 的背景饲料; 在 CH0、CH1 和 CH2 中利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中鱼粉的 60%, 其中 CH1 和 CH2 中分别按 1% 和 2% 的剂量添加发酵啤酒酵母。上标字母和星号分别表示 Duncan's 检验(CH0、CH1 和 CH2 之间)和 Dunnett 检验(RF 与 CH0、CH1 和 CH2 之间)结果。同列数据中上标字母不同者表示处理间差异显著($P<0.05$), 同列数据中上标星号者表示其与 RF 差异显著($P<0.05$)。
Note: RF was the reference diet containing 40% fish meal; in diets CH0, CH1 and CH2, 60% of the fish meal in diet RF was replaced with cottonseed protein concentrate, and fermented brewer's yeast was added at 1% and 2% in diets CH1 and CH2. The superscripts (letter or asterisk) represent the results of Duncan's test (between CH0, CH1 and CH2) or Dunnett test (between RF and CH0, CH1 or CH2), respectively. The data in the same column with different letter are significantly different in Duncan's test ($P<0.05$), while the data in the same column with asterisk are significant from RF ($P<0.05$).

表 5 大口黑鲈碳、氮、磷废物排放量
Tab. 5 Wastes of carbon, nitrogen and phosphorus of *Micropterus salmoides*

项目 item	RF	CH0	CH1	CH2
碳废物排放量/[g C/(kg fish gain)] CW	240.5±17.0	262.7±9.6 ^a	312.1±41.1 ^a	299.6±33.6 ^a
氮废物排放量/[g N/(kg fish gain)] NW	44.8±2.5	48.4±1.3 ^a	53.9±7.0 ^{a*}	52.3±6.9 ^a
磷废物排放量/[g P/(kg fish gain)] PW	8.4±0.7	8.8±0.6 ^a	10.7±1.5 ^a	11.1±1.3 ^{a*}

注: RF 为鱼粉含量为 40% 的背景饲料; 在 CH0、CH1 和 CH2 中利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中鱼粉的 60%, 其中 CH1 和 CH2 中分别按 1% 和 2% 的剂量添加发酵啤酒酵母。上标字母和星号分别表示 Duncan's 检验(CH0、CH1 和 CH2 之间)和 Dunnett 检验(RF 与 CH0、CH1 和 CH2 之间)结果。同行数据中上标字母不同者表示处理间差异显著($P<0.05$), 同行数据中上标星号者表示其与 RF 差异显著($P<0.05$)。

Note: RF was the reference diet containing 40% fish meal; in diets CH0, CH1 and CH2, 60% of the fish meal in diet RF was replaced with cottonseed protein concentrate, and fermented brewer's yeast was added at 1% and 2% in diets CH1 and CH2. The superscripts (letter or asterisk) represent the results of Duncan's test (between CH0, CH1 and CH2) or Dunnett test (between RF and CH0, CH1 or CH2), respectively. The data in the same row with different letter are significantly different in Duncan's test ($P<0.05$), while the data in the same row with asterisk are significant from RF ($P<0.05$).

表 6 实验期间水槽内的氮和磷积累量
Tab. 6 Accumulation of nitrogen and phosphorus in the experimental tanks

饲料 diet	营养学方法 nutritional method		湖沼学方法 limnological method	
	氮积累量/g nitrogen accumulation	磷积累量/g phosphorus accumulation	氮积累量/g nitrogen accumulation	磷积累量/g phosphorus accumulation
RF	71.7±2.7	13.4±0.6	84.5±5.7	2.5±0.3
CH0	76.9±7.5	13.9±1.5	84.5±14.1	1.7±0.5
CH1	74.2±2.2	14.7±0.1	99.6±6.7	1.8±0.1
CH2	75.4±4.0	16.0±0.6	93.1±31.2	1.3±0.1

注: RF 为鱼粉含量为 40% 的背景饲料; 在 CH0、CH1 和 CH2 中利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中鱼粉的 60%, 其中 CH1 和 CH2 中分别按 1% 和 2% 的剂量添加发酵啤酒酵母。

Note: RF was the reference diet containing 40% fish meal; in diets CH0, CH1 and CH2, 60% of the fish meal in diet RF was replaced with cottonseed protein concentrate, and fermented brewer's yeast was added at 1% and 2% in diets CH1 and CH2.

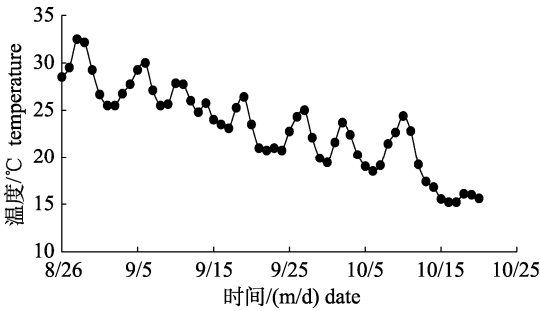


图 1 实验期间水温变化

Fig. 1 Variation in water temperature during the experiment

从图 2 可见, 8 月 26 日至 9 月 26 日实验水槽内 TAN 和 TN 浓度呈上升趋势, 随后至 10 月 20 日呈下降趋势; 8 月 26 日至 9 月 13 日 TP 和 COD_{Mn} 浓度呈上升趋势, 随后至 10 月 20 日呈下降趋势。总体上看, TN 和 TAN 浓度峰值出现的时间较 TP 和 COD_{Mn} 峰值出现的时间滞后 10 d 左右。9 月下旬进入雨季, TN、TP、TAN 和 COD_{Mn} 呈下降趋势, 10 月其浓度一直维持在较低的水平。发酵啤

酒酵母添加水平对 TAN、TP 和 COD_{Mn} 浓度无显著影响($P>0.05$)。投喂饲料 RF 的水槽内 TAN 和 COD_{Mn} 浓度与投喂饲料 CH0、CH1 和 CH2 的水槽无显著差异($P>0.05$), 仅在 9 月 4 日其 TN 浓度显著低于投喂饲料 CH0 和 CH2 的水槽($P<0.05$)。实验结束时, 投喂饲料 RF 的水槽内 TP 浓度明显高于投喂饲料 CH0 和 CH2 的水槽($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 发酵啤酒酵母添加水平对大口黑鲈存活、生长和饲料利用效率的影响

大口黑鲈商业饲料中鱼粉含量往往高达 45%^[8], 降低饲料鱼粉含量是大口黑鲈养殖产业可持续发展亟需解决的重要问题。在大口黑鲈饲料鱼粉替代方面已开展了一些工作, 例如, Li 等^[19]报道通过添加鸡血浆蛋白粉可将饲料鱼粉含量降低至 32%; He 等^[20]报道通过添加豆粕和发酵豆粕可将饲料

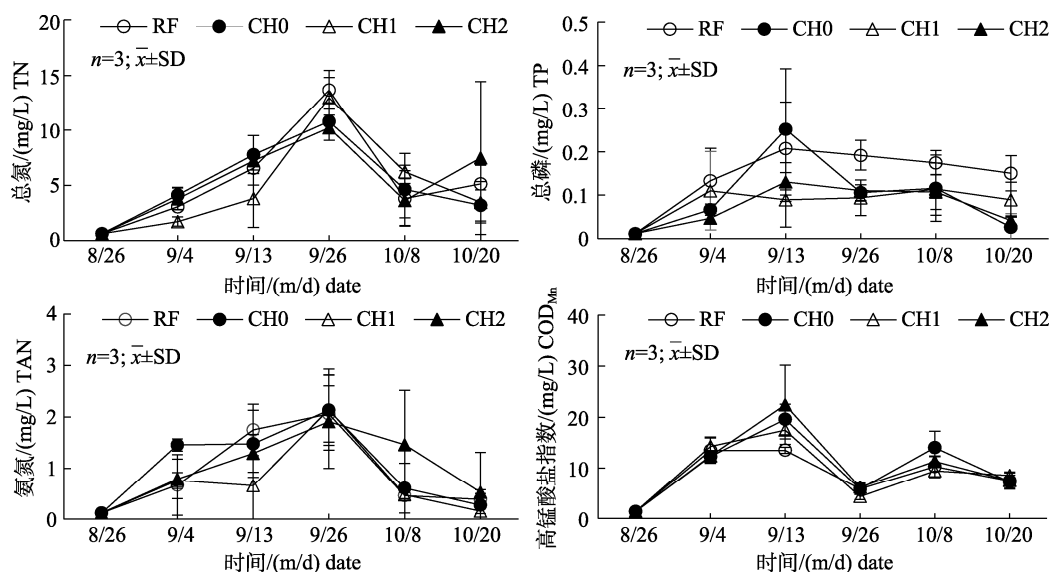


图 2 实验期间总氮、总磷、氨氮和高锰酸盐指数变化

RF 为鱼粉含量为 40% 的背景饲料; 在 CH0、CH1 和 CH2 中利用棉籽浓缩蛋白替代饲料 RF 中鱼粉的 60%, 其中 CH1 和 CH2 中分别按 1% 和 2% 的剂量添加发酵啤酒酵母。

Fig. 2 Variation in total nitrogen, total phosphorus, ammonia and chemical oxygen demand during the experiment RF was the reference diet containing 40% fish meal; in diets CH0, CH1 and CH2, 60% of the fish meal in diet RF was replaced with cottonseed protein concentrate, and fermented brewer's yeast was added at 1% and 2% in diets CH1 and CH2.

鱼粉含量降低至 24%; Ren 等^[9-10]和 Wu 等^[11]报道通过添加鸡肉粉与豆粕的混合物、辐照羽毛粉或 SPC 可将饲料中的鱼粉含量降低至 16%。本研究中, 摄食饲料 RF 的鱼 WG、FI、FCR、NRE、CRE 以及成活率与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间无显著差异, 表明通过添加 CPC 可将大口黑鲈饲料中的鱼粉含量降低至 16%, 这与 Ren 等^[9-10]和 Wu 等^[11]的结论一致。Heidarieh 等^[15]报道在饲料中添加 1% 发酵啤酒酵母可明显改善虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的生长和免疫性能, 但 Wu 等^[11]发现在配方中添加 0.5% 发酵啤酒酵母不会显著增加利用 SPC 替代大口黑鲈饲料鱼粉的水平。本研究中, 摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼 WG、FI、FCR、NRE、CRE 以及成活率之间无显著差异, 表明添加 1% 或 2% 发酵啤酒酵母不会明显改善大口黑鲈摄食低鱼粉饲料时的摄食、生长和饲料利用效率, 这与 Wu 等^[11]的结论一致。啤酒酵母中富含核苷酸^[12], de Cruz 等^[13]报道在饲料中添加核苷酸可改善杂交条纹鲈摄食用棉粕替代鱼粉的饲料时的生长。本研究结果是否意味着饲料中核苷酸不是限制大口黑鲈利用植物蛋白原料的因素尚需进一步的实验验证。

3.2 发酵啤酒酵母添加水平对大口黑鲈肥满度、肝重指数和鱼体组成的影响

研究表明, 利用鸡肉粉、肉骨粉、豆粕 SPC 等动物或植物性蛋白原料适度替代饲料中的鱼粉对实验鱼 CF 以及鱼体组成往往不会产生显著影响, 但可导致肝重指数显著降低^[9-11,21-23]。本研究发现摄食饲料 RF 的鱼 CF 和鱼体组成与摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间无显著差异, 表明利用 CPC 替代大口黑鲈饲料中的鱼粉不会明显改变鱼体 CF 和鱼体组成; 摄食饲料 CH0、CH1 和 CH2 的鱼之间 CF、HSI 和鱼体组成无显著差异, 表明添加 1% 或 2% 的发酵啤酒酵母不会显著改变鱼体形态和组成。这一结果与 3.1 中所述“添加 1% 或 2% 发酵啤酒酵母水平不会显著改善大口黑鲈摄食、生长和饲料利用效率”的观点一致。

3.3 发酵啤酒酵母添加水平对降低大口黑鲈饲料鱼粉依赖性和养殖污染的影响

饲料蛋白源匮乏和养殖污染是限制水产养殖产业可持续发展的重要因素^[7]。在不降低鱼类生长性能的前提下, 最大程度地降低水产饲料对鱼粉的依赖性为解决饲料蛋白源匮乏的重要途径^[11]。

本研究中,随着将鱼粉含量从40%减少至16%,RCP从1.27降至0.55~0.56,表明通过利用CPC替代鱼粉可将大口黑鲈养殖生产中所消耗的鱼粉量降低一半以上;在低鱼粉饲料中添加1%或2%发酵啤酒酵母未能进一步降低RCP,表明添加发酵啤酒酵母不能减轻大口黑鲈饲料对鱼粉的依赖性。此外,在鱼类养殖中,投喂饲料所输入的氮被鱼类利用贮存的比例通常不超过50%^[24],大部分的氮以养殖废物的形式释放入养殖水体,成为水质恶化的诱因。有关水产养殖废物排放对环境的影响已开展了大量的研究^[25],但定量评价水产饲料鱼粉替代对养殖碳、氮、磷废物排放量的影响的研究尚不多见^[9-10,21-23]。本研究中发现摄食饲料RF的鱼碳废物排放量与摄食饲料CH0、CH1和CH2的鱼无显著差异,但氮和磷废物排放量分别显著低于摄食饲料CH1和CH2的鱼;摄食饲料CH0、CH1和CH2的鱼之间碳、氮、磷废物排放量无显著差异。这些结果表明利用CPC替代饲料鱼粉和在饲料中添加发酵啤酒酵母不会导致大口黑鲈养殖中的碳、氮、磷废物排放量发生明显改变。

评价水产养殖废物排放量的方法包括生物学(营养学)方法和化学(湖沼学)方法。Cho等^[18]认为用营养学方法能够较准确地定量因投喂饲料所产生的水产养殖废物排放量。迄今,有关营养学方法和湖沼学方法评价饲料鱼粉替代对养殖水质的影响方面的比较研究尚未见报道。本研究中分别采用营养学方法和湖沼学方法评价了大口黑鲈养殖水体中氮、磷积累量,发现按湖沼学方法计算的氮积累量略高于营养学方法计算值,而按湖沼学方法计算的磷积累量低于后者的计算值。初步分析两种方法在评价氮、磷废物积累方面的差异一方面可能与营养学方法未考虑实验水槽内蓝藻固氮以及大气降尘导致氮积累量增加,另一方面可能与湖沼学方法低估了雨季实验水槽排水时导致磷流失(水槽底部的磷浓度远远高于水体的平均磷浓度)。根据本研究结果,笔者认为营养学和湖沼学方法在评价养殖水体中氮积累的结果较为一致,而采用湖沼学方法评价磷积累时应考虑因磷在养殖水体底部沉积而可能产生的偏差。

李云梦等^[26]报道大口黑鲈养殖池塘中TN浓度为2.35~4.34 mg/L,TP浓度为0.09~0.33 mg/L,TAN浓度为0.00~1.83 mg/L。Li等^[27]报道大口黑鲈养殖水槽内TN浓度为(13.40±2.0) mg/L,TP浓度为(1.90±0.1) mg/L,TAN浓度为(2.70±0.9) mg/L,COD_{Mn}为(18.4±1.0) mg/L。本研究实验期间水槽内TN浓度为0.028~15.41 mg/L [(5.18±4.12) mg/L],TP为0.00~0.37 mg/L [(0.10±0.09) mg/L],TAN为0.037~2.26 mg/L [(0.91±0.82) mg/L],COD_{Mn}为0.06~19.43 mg/L [(9.55±5.96) mg/L]。相比之下,本研究中水槽内的TN、TP和TAN浓度低于以往研究中养殖水槽内的TN、TP和TAN浓度^[27],而TN和TAN浓度明显高于养殖池塘中的TN和TAN浓度^[26]。考虑到本研究中实验水槽内大口黑鲈的放养密度(7.5 尾/m³)是池塘养殖放养密度(3.75 尾/m³,相当于5000 尾/亩)的2倍,实验水槽内较高的TN和TAN浓度应与较高的鱼类放养密度有关。因此,在养殖生产中采用合理的放养密度是有效地控制或降低TN、TP和TAN浓度的重要措施。

4 结论

通过添加CPC可将大口黑鲈饲料中鱼粉含量降低到16%而不会对其摄食、生长、饲料利用效率、鱼体组成和养殖废物排放产生显著的负面影响。在低鱼粉饲料中添加1%或2%发酵啤酒酵母不能明显增加大口黑鲈生长速度和饲料利用效率,也不能明显降低养殖废物排放量。

参考文献:

- [1] Anderson R J, Kienholz E W, Flickinger S A. Protein requirements of smallmouth bass and largemouth bass[J]. The Journal of Nutrition, 1981, 111(6): 1085-1097.
- [2] Portz L, Cyrino J E P, Martino R C. Growth and body composition of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* in response to dietary protein and energy levels[J]. Aquaculture Nutrition, 2001, 7(4): 247-254.
- [3] Chen N S, Xiao W W, Liang Q L, et al. Effects of dietary lipid to protein ratios on growth performance, body composition and non-specific immunity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1270-1280. [陈乃松, 肖温温, 梁勤朗, 等. 饲料中脂肪与蛋白质比对大口黑鲈生长、体组成和非特异性免疫

- 的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1270-1280.]
- [4] Huang D, Wu Y B, Lin Y Y, et al. Dietary protein and lipid requirements for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2017, 48(5): 782-790.
 - [5] Naylor R L, Hardy R W, Bureau D P, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(36): 15103-15110.
 - [6] The state of world fisheries and aquaculture 2020: Sustainability in action[R/OL]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. <http://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html>.
 - [7] National Research Council, Board on Agriculture, Subcommittee on Fish Nutrition. Nutrient Requirements of Fish[M]. Washington DC: National Academy Press, 2011.
 - [8] Han D, Shan X J, Zhang W B, et al. A revisit to fishmeal usage and associated consequences in Chinese aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(2): 493-507.
 - [9] Ren X, Wang Y, Chen J M, et al. Replacement of fishmeal with a blend of poultry byproduct meal and soybean meal in diets for largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2018, 49(1): 155-164.
 - [10] Ren X, Huang D, Wu Y B, et al. Gamma ray irradiation improves feather meal as a fish meal alternate in largemouth bass *Micropterus salmoides* diet[J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 269: 114647.
 - [11] Wu Y B, Wang Y, Ren X, et al. Replacement of fish meal with gamma-ray irradiated soybean meal in the diets of largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Aquaculture Nutrition, 2021, 27(4): 977-985.
 - [12] Ferreira I M P L V O, Pinho O, Vieira E, et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: Characteristics and potential applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(2): 77-84.
 - [13] de Cruz C R, Yamamoto F Y, Castillo S, et al. Establishing the optimal adenosine 5'-monophosphate level for hybrid striped bass *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*: Effects on growth performance, nutrient digestibility, and immune modulation during acute and chronic stress[J]. Aquaculture, 2020, 520: 734668.
 - [14] Sheikhzadeh N, Heidarieh M, Karimi Pashaki A, et al. Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 1083-1087.
 - [15] Heidarieh M, Mirvaghefi A R, Akbari M, et al. Evaluations of Hilyses™, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, enzymatic activities and gastrointestinal structure[J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(3): 343-348.
 - [16] Huang D, Ren X, Wu Y B, et al. Effect of different feeding-feed deprivation time on feed intake, growth and waste output of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2017, 43(3): 359-364. [黄迪, 任幸, 吴玉波, 等. 不同投喂-停喂时间对大口黑鲈摄食、生长和废物排放的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2017, 43(3): 359-364.]
 - [17] AOAC. Official Methods of Analysis[M]. 16th Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
 - [18] Cho C Y, Hynes J D, Wood K R, et al. Quantification of fish culture wastes by biological (nutritional) and chemical (limnological) methods: The development of high nutrient dense (HND) diets[C]//Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, 2013: 37-50.
 - [19] Li S L, Ding G T, Wang A, et al. Replacement of fishmeal by chicken plasma powder in diets for largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Effects on growth performance, feed utilization and health status[J]. Aquaculture Nutrition, 2019, 25(6): 1431-1439.
 - [20] He M, Yu Y F, Li X Q, et al. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, nutrition utilization and intestinal histology[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(10): 4302-4314.
 - [21] Zhang Y Q, Wu Y B, Jiang D L, et al. Gamma-irradiated soybean meal replaced more fish meal in the diets of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. Animal Feed Science and Technology, 2014, 197: 155-163.
 - [22] Wang Y, Wang F, Ji W X, et al. Optimizing dietary protein sources for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with an emphasis on using poultry by-product meal to substitute fish meal[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(4): 874-883.
 - [23] Wang Y, Ma X Z, Wang F, et al. Supplementations of poultry by-product meal and selenium yeast increase fish meal replacement by soybean meal in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) diet[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(4): 1904-1914.
 - [24] Chai X J, Ji W X, Han H, et al. Growth, feed utilization, body composition and swimming performance of giant croaker, *Nibea japonica* Temminck and Schlegel, fed at different dietary protein and lipid levels[J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(6): 928-935.
 - [25] Penczak T, Galicka W, Molinski M, et al. The enrichment of a mesotrophic lake by carbon, phosphorus and nitrogen from the cage aquaculture of rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. Journal of Applied Ecology, 1982, 19(2): 371-393.
 - [26] Li Y M, Zheng X F, Wang Y. Analysis on the growth performance and culture environment of largemouth bass *Micropterus salmoides* and snakehead *Ophiocephalus argus* in ponds in Zhejiang Province[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2018, 45(1): 11-17. [李云梦, 郑侠飞, 王岩. 浙江省池塘养殖大口黑鲈和乌鳢的生长性能和养殖环境分析[J]. 水产科技情报, 2018, 45(1): 11-17.]
 - [27] Li Y M, Qin J G, Zheng X F, et al. Production performance of largemouth bass *Micropterus salmoides* and water quality variation in monoculture, polyculture and integrated culture[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(2): 423-430.

Effect of fermented brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on growth, feed utilization, and water quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) farming

CUI Zhenghe¹, YU Cong², LI Yunmeng², WANG Yan²

1. Jiaozuo Normal College, Jiaozuo 454001, China;

2. Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China

Abstract: An 8-week experiment was conducted to evaluate the effect of fermented brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on growth, feed utilization, and water quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) farming. A diet containing 40% fish meal served as the reference (RF). In three other diets, 60% of the fish meal in the RF diet was replaced with cottonseed protein concentrate and supplemented with 0% (CH0), 1% (CH1), and 2% (CH2) fermented brewer's yeast. The experiment was conducted in outdoor tanks, each containing 4000 L of aerated tap water. The initial body weight of the fish was (21.7 ± 0.2) g (mean $\pm$ SD, $n=12$), and stocking density was 30 fish per tank. During the experiment, water temperature was (22.5 ± 5.2) °C, dissolved oxygen was always more than 6.0 mg/L, and pH was (6.8 ± 0.1) . The fermented brewer's yeast supplementation did not significantly affect the survival, weight gain, feed intake, feed conversion ratio, retention efficiencies of carbon and nitrogen, condition factor, hepatosomatic index, and body composition (moisture, crude protein, crude lipid, ash, carbon, and phosphorus content) of the fish as well as the levels of carbon, nitrogen, and phosphorus wastes; concentration of ammonia and total phosphorus; and chemical oxygen demand in the tanks ($P>0.05$). Phosphorus retention efficiency declined with increasing fermented brewer's yeast supplementation ($P<0.05$). No significant differences were found in weight gain; feed intake; feed conversion ratio; retention efficiencies of carbon and nitrogen; contents of moisture, crude protein, and crude lipid in the whole body of the fish ($P>0.05$). Moreover, carbon waste levels between fish fed the RF diet and those fed the CH0, CH1, and CH2 diets were not significantly different ($P>0.05$). However, the ratio of fish meal consumption to fish production, hepatosomatic index, and body ash content in fish fed the RF diet was higher than that in fish fed the CH0, CH1, and CH2 diets ($P<0.05$). Phosphorus retention efficiency was higher ($P<0.05$), while the levels of carbon and nitrogen wastes were lower ($P<0.05$) in fish fed the RF diet than in those fed the CH1 and CH2 diets ($P<0.05$). Nutritional nitrogen accumulation was lower ($P<0.05$), while phosphorus accumulation was higher ($P<0.01$) than those calculated using the limnological method. This study reveals that dietary fish meal for largemouth bass can be reduced to 16% using cottonseed protein concentrate as a substitute. Adding 1% and 2% fermented brewer's yeast to the diet did not significantly improve growth and feed utilization efficiency or reduce waste outputs in largemouth bass farming.

Key words: *Micropterus salmoides*; fermented brewer's yeast; feed; growth; nitrogen waste; phosphorus waste; water quality

Corresponding author: WANG Yan. E-mail: ywang@zju.edu.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0362

降解亚硝酸盐的大山芽孢杆菌 JY-1 的分离、鉴定及其作用

周敏, 宁文, 陈红菊, 季相山, 赵燕

山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要: 为得到稳定高效降解亚硝酸盐的益生菌, 通过菌株富集分离培养、菌株鉴定、发酵培养基优化等实验对菌株进行了分离、鉴定, 对菌株降亚硝酸盐效果进行了分析, 并克隆了亚硝酸盐还原酶基因。结果显示, 从养殖池塘、污水处理厂等 5 处混合水体中分离、筛选出一株具有亚硝酸盐降解能力的菌株, 命名为 JY-1。菌株生理生化 and 16S rDNA 序列分析显示, JY-1 是大山芽孢杆菌(*Bacillus gaemokensis*); 发酵培养基优化显示, JY-1 的最适氮源和碳源分别是蛋白胨和葡萄糖。JY-1 降亚硝酸盐效果分析显示, 3 h JY-1 可将水体中 0.6 mg/L 的亚硝酸盐降到 0.0 mg/L。安全性评价检测显示, 菌株 JY-1 菌落周围无溶血环出现, 且高浓度 JY-1 (10^9 CFU/mL) 灌服尼罗罗非鱼对其无明显影响。克隆获得了 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因, 结合 JY-1 对水体中氨氮、亚硝酸盐、总氮等的影响实验, 初步推测 JY-1 是通过酶降解途径把亚硝酸氮还原后将其移出水体的。本研究为制备高效降解亚硝酸盐的微生态制剂产品提供了重要原料。

关键词: 大山芽孢杆菌; 亚硝酸盐; 养殖水体; 分离; 鉴定

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)02–0284–11

近年来随着水产养殖业的集约化发展, 水产养殖密度逐渐增大, 造成单位水体中苗种投放量和饲料投喂量的增大, 使残饵、粪便、代谢产物也相应增加, 过量的残饵粪便等沉积在养殖水体的底部, 无法完全分解掉, 部分经过微生物的无氧分解产生大量亚硝酸盐、硫化氢等有害物质, 这些有害物质的积累造成池塘污染、水质恶化, 甚至水产动物死亡^[1–4]。高浓度的亚硝酸盐可以通过呼吸作用进入血液, 使水产动物体内的血红蛋白失去载氧能力, 对水生动物造成缺氧和器官损伤等健康威胁, 从而降低养殖水产品的产量和品质^[5–7]。

水体中动态稳定的氮循环是水体健康及养殖动物健康生长的保障^[8], 是养殖水体中有机质分解和能量循环的重要部分^[9], 要保证良好的养殖水质, 就必须把握和遵循水体中氮物质的转化规

律。水体中氮素的形态可分为有机氮和无机氮两大类, 经过不同的微生物分解为不同形式的氮, 这几种形式的氮在水体中处于相互转化的动态平衡中。残饵粪便是养殖环境中最主要的氮来源, 其中的有机氮首先在氨化菌的氨化作用下转化为氨氮, 氨氮再由亚硝化细菌的亚硝化作用很快转化为亚硝态氮, 后在水体溶解氧充足的情况下经过硝化细菌的硝化作用转化为硝态氮, 但硝化细菌的繁殖速度很慢, 因此限制了亚硝酸盐的转化, 溶氧不充足时硝酸盐又会变成亚硝酸盐^[10–11]。因此在氮循环中, 如果大量的氮短时间进入水体而难以被天然微生物完全利用, 可直接导致氮循环失衡, 增加水体环境污染的风险^[12]。

降低水体中的亚硝酸盐浓度的根本方法是解决养殖水环境中的氮失衡, 具体做法一方面是加速氮循环, 尤其是加速亚硝酸盐的降解^[13–14], 另

收稿日期: 2021-08-06; **修订日期:** 2021-09-06.

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-13); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019YY008); 山东省重点研发计划项目(2021CXGC010806).

作者简介: 周敏(1996–), 女, 硕士研究生, 专业方向为水生生物学. E-mail: 2978795597@qq.com

通信作者: 赵燕, 副教授, 研究方向为水产健康养殖. E-mail: yzhao@sdau.edu.cn

一方面是让亚硝酸盐彻底降解,即亚硝态氮经过反硝化作用直接还原为气态的氨气、NO、N₂O 和 N₂,将氮元素从养殖水体中去除^[15]。近年来,研究者们筛选到的亚硝酸盐降解菌的种类较多,多属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[16]、副球菌属(*Paracoccus*)^[17]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[18-20]等。熊焰等^[16]从养殖水体中筛选到巨大芽孢杆菌 SZ-3,对污染水体里的亚硝酸盐有较强的降解效果;真菌 *Aspergillus parasiticus* JFS 可强烈降解亚硝酸盐且将亚硝酸盐降解为无毒的硝酸盐和铵根离子^[21];从对虾养殖池塘的底泥中筛选到的光合细菌也能有效降解亚硝酸盐^[20]。但各种类别的菌株都有一定的局限性,例如光合细菌、硝化细菌等增殖缓慢,且易受到溶氧、有机物浓度等水体环境因素的影响^[22-23];还有一些反硝化细菌易造成硝酸盐的累积,也易受水体中溶氧的影响,这些菌株在实际养殖生产中效果不一^[17]。并且,多数报道的

菌株在实验室条件下降解能力很强,但由于实际养殖环境自身的复杂多变性、有益菌群难以形成、活菌数量和活性不佳等原因,实际生产中的效果往往不是很理想^[24-25]。目前迫切需要开发出更多能高效降解亚硝酸盐,且对不良环境高度耐受、适应性强的稳定安全的菌株。本研究从多个养殖水体中富集分离并筛选出一株对亚硝酸盐具有稳定高效降解能力、在自然水体中繁殖速度快、对水生动物安全的土著亚硝酸盐降解菌,探究该菌的水质调控能力并对其发酵条件进行优化,为今后深入研究和开发高效实用的亚硝酸盐微生态制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究共计采集 50 个样品,来自泰安本地养殖场、污水处理厂等多处水域(表 1)。

表 1 采集样品相关信息
Tab. 1 The information of collecting sample

采样时间 sampling date	采样地点 sampling location	样品数量 sample number
2018-05-04	山东农业大学科技试验站 science and technology experimental station of Shandong Agricultural University	6
2018-05-22	泰安第二污水处理厂 the second sewage-treatment plant of Tai'an	18
2018-06-08	泰安南湖公园 Tai'an Nanhu Park	8
2018-06-19	泰安鑫源养殖场 Tai'an Xinyuan Farm	8
2018-07-25	泰安温泉养殖场 Tai'an Hot Spring Farm	10

富集培养基: C₆H₁₂O₆ 10 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 1 g, NaNO₂ 2.5 mg, 微量元素溶液 2 mL,加水定容至 1 L,调节 pH 至 7.2~7.4,高压灭菌(121 ℃灭菌 20 min)。

微量元素溶液: EDTA 50.0 g, ZnSO₄ 2.2 g, CaCl₂ 5.5 g, MnCl₂·4H₂O 5.06 g, FeSO₄·7H₂O 5.0 g, CuSO₄·5H₂O 1.57 g, (NH₄)₆-Mo₇SO₄·4H₂O 1.1 g, CoCl₂·6H₂O 1.61 g,加水定容至 1 L,调节 pH 至 7.0~7.5。

发酵培养基: 葡萄糖 2 g, 蛋白胨 2 g, MgSO₄ 0.02 g, NaCl 0.2 g, K₂HPO₄ 0.04 g,加水定容至 200 mL。

1.2 菌株的富集、筛选

采集以上水域底层水样及水下 5 cm 内的泥

样,混匀后按照 1%的比例接种到生理盐水中,37 ℃振荡器中振荡活化 45 min,静置后取上清液,制得悬浮液。在 100 mL NaNO₂ 富集培养基中加入 10 mL 悬浮液,180 r/min、37 ℃培养 24 h 后重新接种到新鲜富集培养基中,反复培养 6 代。将培养 6 代后的菌液进行梯度稀释后涂平板,37 ℃培养 24 h,选取生长良好、形态单一的单菌落进行液体培养,依次纯化传代培养 4 代。将传代纯化培养的菌株在发酵培养基中培养 24 h 后,以 1%的比例接种到 NaNO₂ 初始浓度为 0.8 mg/L 的 20 L 水体中进行菌株降解 NaNO₂ 能力测定实验,实验期间微充氧培养,每隔 2 h 测定水体中亚硝酸盐的浓度。

1.3 菌株 JY-1 的鉴定

形态和生理生化鉴定: 将筛选到的菌株进行革兰氏染色、芽孢染色后, 观察其形态, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[26]对其进行生理生化鉴定。

分子生物学鉴定: 以纯化培养后的菌液为模板, 以 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTGAG-3' 和 5'-TACGGYTACCTTGTACGAGTT-3' 分别为上、下游引物, PCR 扩增 16S rDNA 部分序列。扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.4 菌株 JY-1 的安全性检测

菌株溶血实验: 将筛选到的菌株接种于血琼脂平板上, 37 °C 倒置培养 24 h, 观察溶血现象。

菌株灌服罗非鱼实验: 将体重(50±5) g 的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 360 尾, 平均分成 6 组, 每组设 3 个重复。第 1 组作为对照组, 每尾灌服生理盐水 0.5 mL; 第 2~6 组分别灌服 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL 的 JY-1 菌液 0.5 mL, 3 d 后, 记录罗非鱼的摄食、行动状态, 统计 14 d 累计死亡率。

1.5 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化

将基础发酵液中的碳源葡萄糖替换为等量的玉米粉、蔗糖或可溶性淀粉, 接种 2% 的 JY-1 于发酵培养基中, 180 r/min, 37 °C 培养 48 h 后, 统计各组的芽孢数, 与葡萄糖添加组进行比较。类似地, 将基础发酵液中的氮源蛋白胨替换为酵母粉、硫酸铵或尿素, 接种 2% 的 JY-1 于发酵培养基中, 180 r/min, 37 °C 培养 48 h 后, 统计各组的芽孢数, 并与蛋白胨添加组进行比较。

1.6 菌株 JY-1 对养殖水体的水质调控效果研究

在 20 L 的水体中, 每缸放养罗非鱼 5 尾, 每天投喂 3 次。调整养殖水体中 NO_2^- 初始质量浓度为 0.6 mg/L, 接种菌株 JY-1 至终浓度为 10^7 CFU/mL, 微充氧, 接种后 12 h 内, 每隔 3 h 测定亚硝酸盐、氨氮、硝酸盐和总氮含量, 实验重复 3 次。亚硝酸盐测定采用重氮-偶氮法, 氨氮测定采用奈氏试剂法, 硝酸盐与总氮用罗威邦 ET99732 多参数水质快速测定仪测定。

1.7 菌株 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因的扩增与分析

根据 NCBI 中相关菌株亚硝酸盐还原酶基因(NIR)的编码区序列, 分别设计上下游引物: 5'-CCAGCTAGCATGAGTTATGAAAAAGTATG-3' 和

5'-TGGCTCGAGAGACGCTATTACTTC-3', 以菌株 JY-1 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物送北京六合华大基因科技有限公司测序。根据菌株 JY-1 及相关菌株的 NIR 序列, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树, 以初步推测菌株 JY-1 对亚硝酸盐的降解途径。

1.8 数据分析

所有的数据都以平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。利用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析和 Tukey 检验, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从采集的 50 个样品(表 1)中, 采用定向富集分离的方法反复培养 6 代后, 再纯化培养 4 代, 共筛选到 6 株亚硝酸盐降解效果较好的菌株, 命名为 JY-1~JY-6。筛选菌株室内降解实验表明, 菌株 JY-1 在接种后 2 h 内可完全降解亚硝酸盐, 降解速度最快(图 1)。

2.2 菌株鉴定

对 JY-1 菌株进行形态学观察和革兰氏染色、芽孢染色鉴定, 发现菌株单菌落呈白色, 边缘整齐且光滑, 中间凸起, 菌体生长物可向四周呈云雾状扩散; 菌株呈杆状、无鞭毛, 少数聚合在一起呈短链状排列, 芽孢椭圆形, 中生, 不产生伴孢晶体, 革兰氏染色阳性。依据《伯杰细菌鉴定手册》^[26]和《常见细菌系统鉴定手册》^[27], 初步鉴定该菌为芽胞杆菌属。生理生化试验显示, 菌株 JY-1 能利用硝酸盐肉汤、淀粉、葡萄糖、甘露醇等, 溶菌酶活性等检验呈阳性(表 2)。

菌株 JY-1 的 16S rDNA 扩增产物长度为 1616 bp, 与 NCBI 数据库中的序列比对后发现, 与芽胞杆菌属的大山芽胞杆菌相似度达 98%; 利用 MEGA5.0 软件, 将 JY-1 与相关菌株构建菌株系统发育树, 发现 JY-1 与大山芽胞杆菌 M25 和 JN205 聚合在一起(图 2), 这进一步确认菌株 JY-1 为大山芽胞杆菌(*Bacillus gaemokensis*)。

2.3 菌株的安全性检测

在血琼脂平板上 37 °C 倒置培养 24 h, 菌株 JY-1 菌落周围无溶血环出现, 结果为阴性。菌株

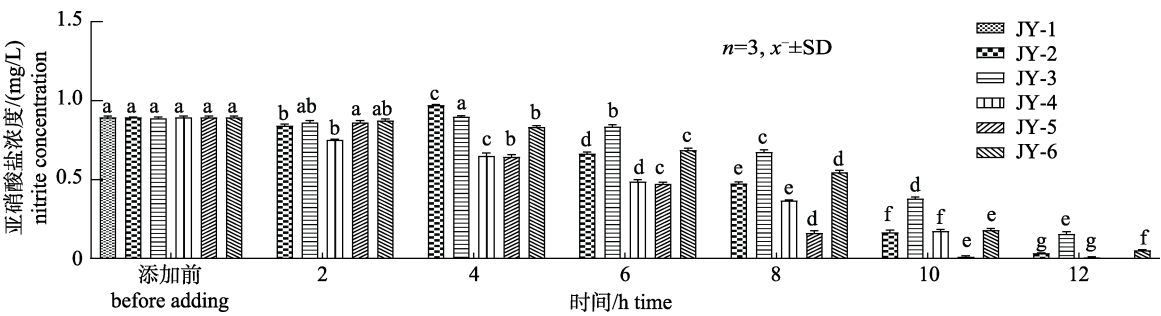


图 1 不同菌株降解亚硝酸盐效果对比
同一时间标有不同字母的组间差异显著($P<0.05$).
Fig. 1 Comparison of nitrite degradation effect of different strains
Groups with different letters at the same time are significantly different ($P<0.05$).

表 2 菌株 JY-1 生理生化试验结果
Tab. 2 Physiological and biochemical test results of strain JY-1

项目 item	结果 result	项目 item	结果 result
硝酸盐肉汤 nitrate broth	+	甘露醇 manna sugar	+
淀粉水解 amylohydrolysis	+	溶菌酶 lysozyme	+
西蒙氏柠檬酸盐 Simmons citrate medium	+	动力培养基 dynamic medium	+
V-P 实验 V-P test	+	明胶 gelatin	+
葡萄糖 glucose	+	3%过氧化氢酶 3% catalase	+

注: “+” 代表“阳性”.
Note: “+” means “positive”.

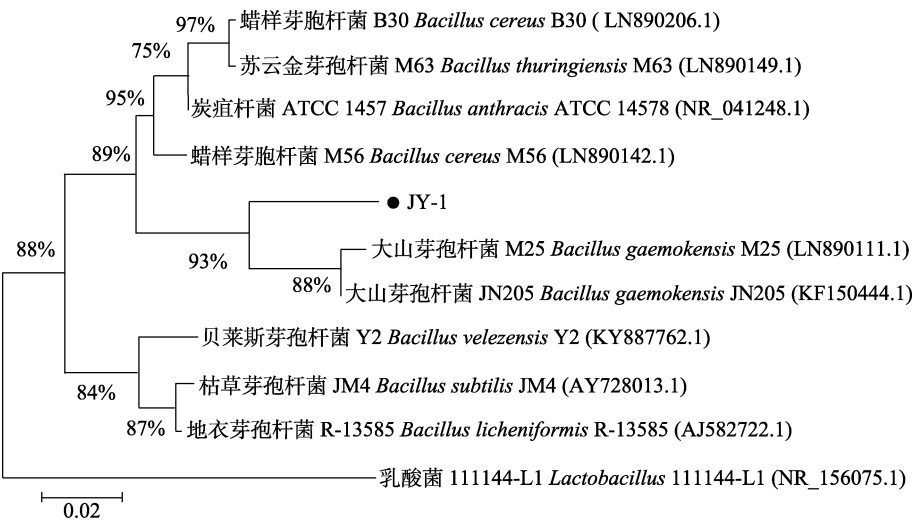


图 2 菌株 JY-1 的系统进化发育树
进化树的 Bootstrap 值在分支位点处标出(%), 用于评估分支的可信度. 距离标尺显示 0.02% 的序列差异.
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain JY-1
Bootstrap values for 1000 trees are shown at branch points (%) evaluating the credibility of the branch.
The bar represents a sequence divergence of 0.02%.

灌服实验显示, 灌服各浓度的菌株 JY-1 后, 14 d 的观察期内实验组与对照组的尼罗罗非鱼皆行动敏捷、正常摄食, 无死亡现象。

2.4 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化
发酵培养基的碳源类别比较实验显示, 葡萄糖作为碳源时, 芽孢浓度最高, 为 2.7×10^8 CFU/mL,

显著高于其他处理组。发酵培养基的氮源类别比较实验显示, 蛋白胨作为氮源时, 芽孢浓度最高, 为 2.26×10^8 CFU/mL, 显著高于其他处理组(图 3)。

2.5 菌株 JY-1 在养殖水体中的水质调控效果研究

添加菌株 JY-1 的实验组在 3 h 内亚硝酸盐质量浓度就从 0.6 mg/L 降到 0 mg/L, 而对照组亚硝酸盐的含量在 12 h 内变化不显著。实验组与对照

组的氨氮含量均随时间的推移逐渐下降, 但在各个时期实验组的氨氮浓度都低于对照组。对照组和实验组硝酸盐浓度变化趋势基本一致, 在各个时期都没有显著变化, 且两组间差异不显著 ($P < 0.05$)。对照组的总氮浓度总体呈上升趋势, 且上升幅度较大; 实验组的总氮浓度随着时间的推移略有上升, 但上升幅度比对照组显著小(图 4)。

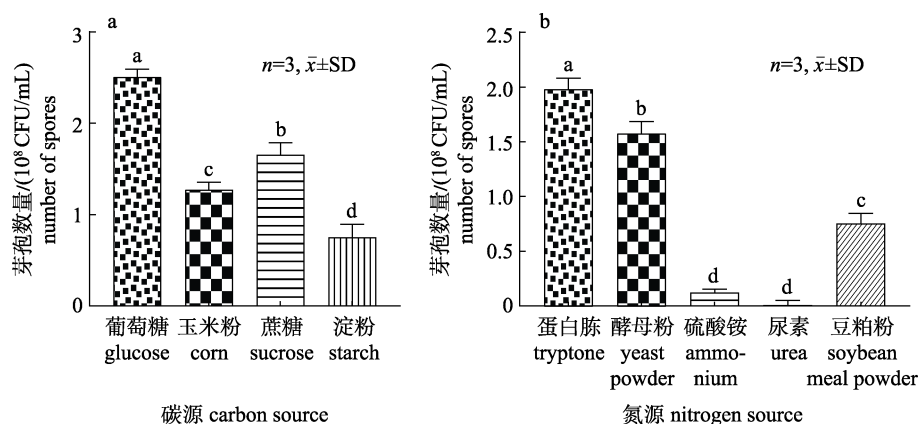


图 3 菌株 JY-1 发酵培养基中氮源和碳源的优化

a.. 不同碳源对菌株 JY-1 芽孢数量的影响; b. 不同氮源对菌株 JY-1 芽孢数量的影响. 不同组别中不同字母表明差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 3 Optimization of carbon source and nitrogen source in fermentation medium of strain JY-1

a. Effect of different carbon sources on spores numbers of JY-1; b. Effect of different nitrogen sources on spores numbers of JY-1.

Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

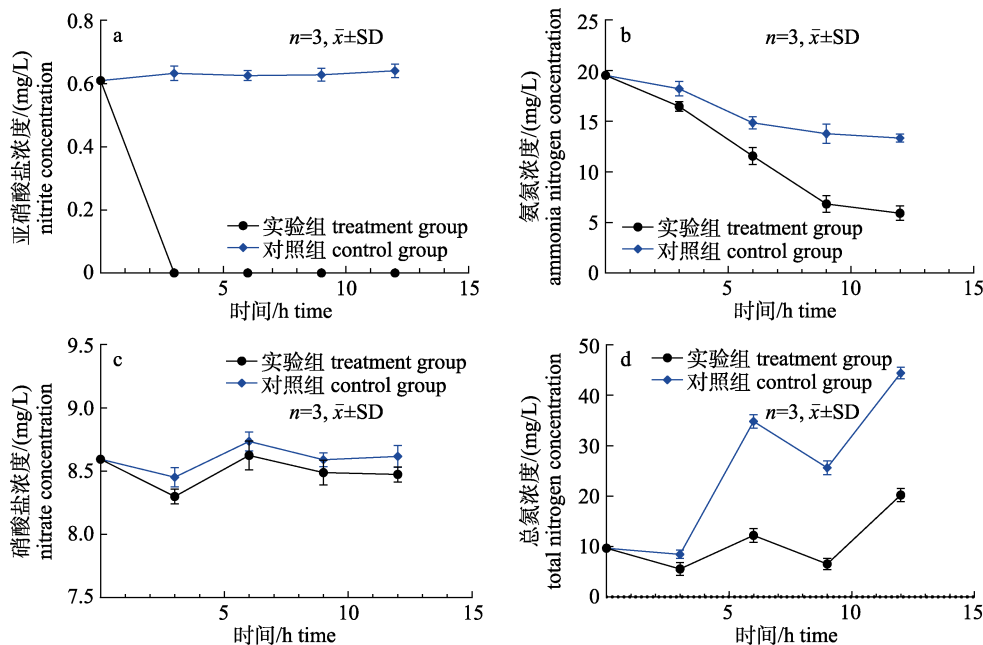


图 4 添加菌株 JY-1 的实验组和对照组的养殖水体在不同时间的水质变化

a. 亚硝酸盐浓度变化; b. 氨氮浓度变化; c. 硝酸盐浓度变化; d. 总氮浓度变化.

Fig. 4 Water quality change of aquaculture water in test group added with strain JY-1 and control group

a. Nitrite concentration; b. Ammonia nitrogen concentration; c. Nitrate concentration;

d. Total nitrogen concentration in each period.

2.6 菌株 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因的克隆与分析

利用作者设计的 NIR 引物, 以 JY-1 的 DNA 为模板扩增出 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因序列共

1576 bp, 上传至 NCBI, 登录号为 MT127563。利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树, 结果显示 JY-1 首先与萝卜(*Raphanus sativus*)的 NIR 聚合在一块, 接着再与其他物种的 NIR 聚合(图 5)。

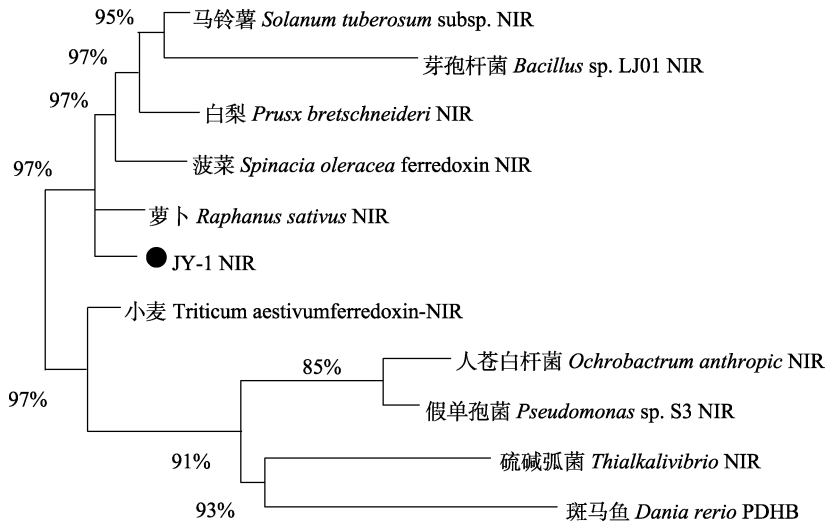


图 5 菌株 JY-1 中 NIR 的系统发育进化树
进化树的 Bootstrap 值在分支位点处标出(%), 用于评估分支的可信度。

Fig. 5 Phylogenetic tree of NIR in strain JY-1
Bootstrap values for 1000 trees are shown at branch points (%) evaluating the credibility of the branch.

3 讨论

3.1 菌株 JY-1 对亚硝酸盐的降解效果

已报道的亚硝酸盐降解菌可分为硝化细菌和反硝化细菌两大类。研究较多的硝化细菌多属于黄杆菌属、对杆菌属、硝化杆菌属等^[10,28-30]。这些硝化细菌在有氧条件下都能高效地将亚硝酸盐转化为硝酸盐, 但这一降解过程很容易受到水体中溶氧的影响, 目前对硝酸盐降解菌的研究并不多, 因为硝化作用并不能将氮完全从养殖水体中去除^[29]。并且, 这些硝化细菌繁殖速度慢, 在实际养殖中需要将硝化细菌的硝化作用与植物的同化作用联系起来达到去除水体亚硝酸盐的效果^[31]。近年来, 研究者更多地将关注点放在脱氮彻底、适应性强的反硝化细菌上。截至目前已报道的反硝化细菌多属于芽孢杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、红螺菌属等^[19,32-40]。研究发现不动杆菌 Sxf14、红螺菌 SP3 等能够降解低浓度亚硝酸盐, 如从水库沉积物中筛选到的不动杆菌 Sxf14, 当接种量为 2%时, 48 h 内可将初始浓度

为(3.91±0.03) mg/L 的亚硝酸盐降解掉(40.52±1.49)%^[32], 这类亚硝酸盐降解菌可用于处理低中度污染的养殖池塘中的亚硝酸盐。而阴沟肠杆菌 DB-6、卓贝尔氏菌 F13-1、施氏假单胞菌 LYS-86、施氏假单胞菌 DB-33 和地衣芽孢杆菌 FP6 等可高效降解高浓度亚硝酸盐。如从舟山市水产研究所循环水生物滤池毛刷滤料上的少量污泥里筛选的阴沟肠杆菌 DB-6, 当接种量为 2%时, 5 d 内可将硝态氮由 3570 mg/L 降至 22 mg/L, 去除率达 99.4%^[35]; 聂欢欢等^[36]从南美白对虾养殖塘底层水样中筛选到了地衣芽孢杆菌 FP6, 当接种量为 1%时, 48 h 内可将约 26 mg/L 的硝态氮完全去除掉, 这类亚硝酸盐降解菌更适用于高度污染的养殖废水、工业废水等各种污水处理中。

由于养殖用水的亚硝酸盐含量应控制在 0.2 mg/L 以下, 筛选能将低浓度的亚硝酸盐降低到 0 的微生态菌株在水产养殖中意义较大, 而在已有的研究中, 尚未见针对 1 mg/L 以下的低浓度亚硝酸盐降解的报道。本研究从养殖池塘、污水处理厂等 5 处混合水体中筛选到一株降解亚硝酸

盐的大山芽孢杆菌 JY-1, 能够降低水体中亚硝酸盐、总氮和氨氮的含量, 在初始浓度为 1×10^7 CFU/mL 时, 能够在 3 h 内将 0.6 mg/L 的亚硝酸盐降为 0, 降解率达 100%, 并且不会造成水体中硝酸盐的积累。因此菌株 JY-1 更适合用于低浓度亚硝酸盐养殖水体中的亚硝酸盐的快速降解。此外, 芽孢杆菌繁殖快、代谢快, 产生的芽孢耐酸、耐碱、耐高温, 一旦遇到适宜的环境就产生大量的胞外酶类, 能降解养殖水体里的残饵和动物排泄物, 并为水体中光合细菌和其他微生物提供小分子物质, 产生良好的微生态环境^[41]。因此菌株 JY-1 在水产养殖中的应用前景十分广阔。

3.2 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化

对微生物培养条件进行优化是微生物应用的前提。碳源是菌液培养基的基本组分之一, 不仅为菌株的生长提供碳骨架, 供给生命活动所需要的能量, 而且在反硝化过程中, 作为微生物的电子供体, 其化学结构制约着反硝化过程的顺利进行^[42]。本研究显示, 不同碳源对菌株 JY-1 的生长影响显著, 主要表现为单糖优于双糖, 双糖优于多糖, 最佳碳源为葡萄糖。从理论上讲微生物更容易同化利用的碳源为葡萄糖, 淀粉等也最终分解为葡萄糖才能被利用。研究发现不同种属的菌株对碳源的选择差异很大, 如光合细菌的最佳碳源往往是小分子有机物乙酸钠, 而芽孢杆菌属则更易利用单糖或多糖^[43-45]。同一种属的不同种菌株对碳源的选择也不同, 如尹艳楠等^[46]和 Luo 等^[47]研究表明, 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 的最佳碳源为可溶性淀粉, 巨大芽孢杆菌 SP1 的最佳碳源为葡萄糖。而张慧等^[48]研究显示, 枯草芽孢杆菌 CS27 的最佳碳源为糖蜜。总体上, 不同菌株的最优碳源种类有差异, 这可能与菌株本身特性有关。此外, 研究人员发现, 糖类经过不同方式的灭菌后, 糖的结构发生变化, 葡萄糖、果糖、半乳糖等还原糖含量差异较大^[49], 这也可能是不同菌株对碳源选择存在显著差异的原因之一。

氮源是微生物生长所必需的营养物质, 是微生物生长所必需的核酸、蛋白质的重要原料, 且无机氮源如硝酸盐和亚硝酸盐可作为电子受体^[42]。本研究筛选的菌株 JY-1 利用有机氮源远优于无机

氮源, 速效氮源(酵母粉, 蛋白胨)优于迟效氮源(豆粕粉), 当以蛋白胨作为氮源时, 菌株 JY-1 的芽孢产量达到最大值。这与尹艳楠等^[46]和龚燕川等^[50]的研究结果相似。许丽娟等^[51]的研究也发现以无机氮尿素作为唯一氮源时, 枯草芽孢杆菌 N419 活菌数和芽孢数均低于有机氮, 三种有机氮(牛肉膏、酵母膏、工业蛋白胨)作为氮源时, 活菌数和芽孢数没有显著性差异。JY-1 为氨基酸异养型菌株, 有机氮源的多肽和氨基酸可能是其易于在有机氮源培养基上生长的原因。

3.3 菌株 JY-1 降解亚硝酸氮的途径

作者在菌株 JY-1 中扩增出了亚硝酸盐还原酶基因, 且在菌株 JY-1 对养殖水体的水质调控实验中发现, 3 h 内亚硝酸氮含量就被迅速降解为 0, 同时水体中氨氮、硝酸盐、总氮等数值在此期间都有不同程度的下降, 未造成二次污染。已有研究发现一些反硝化细菌利用同化作用将亚硝酸盐转化为自身生长必须的氨基酸、蛋白质, 将养殖水体中的无机氮转变为生物体的有机氮, 但当该反硝化细菌死后有机氮又转变为水体中的总氮, 氮元素并未从养殖水体中去除^[52-53]。一些研究表明降解亚硝态氮的微生物含有亚硝酸还原酶(NIR), NIR 可将亚硝态氮还原为一氧化氮, 这是通过亚硝酸盐的酶降解途径完成的^[54-55]; 张庆芳等^[56]研究发现反硝化细菌如乳酸菌在发酵过程中 pH 逐渐降低, NIR 的活性被抑制, 在 pH 小于 4.0 时直接将亚硝酸氮还原成氮气, 表现为亚硝酸盐的酸降解。本研究中养殖水体的总氮水平下降, 且芽孢杆菌不产生有机酸, 因此推测菌株 JY-1 可能通过酶降解途径把亚硝酸氮还原为气体从而从水体中去除。

4 结论

本研究从多个养殖水体中筛选到一株亚硝酸盐降解菌 JY-1, 经鉴定为大山芽孢杆菌, 菌株 JY-1 可将实际养殖水体中的亚硝酸盐在 3 h 内完全降解, 降解率达 100%, 同时也降低了总氮和氨氮的含量, 并且不会造成水体中硝酸盐的积累。通过溶血实验和灌服实验证明该菌株对水生动物

无害。发酵条件优化显示 JY-1 的最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为蛋白胨。

参考文献:

- [1] Evans A E V, Mateo-Sagasta J, Qadir M, et al. Ippolito agricultural water pollution: Key knowledge gaps and research needs[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2019, 36: 20-27.
- [2] Ding Y W, Ai H. Applications of microorganisms in aquaculture[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2000, 20(1): 68-73. [丁彦文, 艾红. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(1): 68-73.]
- [3] Wang J P, Chen J G, Si L G, et al. Discussions on self-pollution and its prevention and cure in aquaculture[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2008, 27(2): 192-196, 200. [王建平, 陈吉刚, 斯烈钢, 等. 水产养殖自身污染及其防治的探讨[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27(2): 192-196, 200.]
- [4] Zakem E J, Haj A A, Church M J, et al. Ecological control of nitrite in the upper ocean[J]. *Nature Communications*, 2018, 9 (1): 1206.
- [5] Ren W M. The United States studies the mechanism and treatment methods of nitrite poisoning fish[J]. *Foreign Journal of Fisheries*, 1989(4): 45. [任维美. 美国研究亚硝酸盐使鱼中毒的机理和处理方法[J]. 国外水产, 1989(4): 45.]
- [6] Ferreira da Costa O T, dos Santos Ferreira D J, Presti Mendonça F L. Fernandes susceptibility of the amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite[J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 627-636.
- [7] Huang X H, Li C L, Zheng L, et al. The toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ on *Litopenaeus vannamei* and effects of $\text{NO}_2\text{-N}$ on factors relating to the anti-disease ability[J]. *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[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 466-471.]
- [8] Nie M, Li Z L. Bioprocess of nitrite accumulation in water—a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(8): 1493-1503. [聂铭, 李振轮. 水体中亚硝酸盐积累的生物过程及影响因素研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1493-1503.]
- [9] Fan J N, Zhao J W, Zhu D W. The research progresses on biological oxidation and removal of nitrogen in lakes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(15): 4924-4931. [范俊楠, 赵建伟, 朱端卫. 湖泊氮素氧化及脱氮过程研究进展[J]. 生态学报, 2012, 32(15): 4924-4931.]
- [10] Ma Y, Qian L M, Wang Y S, et al. Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007(05): 872-879. [马英, 钱鲁闽, 王永胜, 等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007(05): 872-879.]
- [11] Fang Xiuzhen, Guo Xianzhen, Yu Tongbing, et al. Bacteria involved in n-cycle in fish pond and sediment activity[J]. *Journal of Fisheries of China*. 1993, 17(2): 137-145. [方秀珍, 郭贤桢, 郁桐炳, 等. 鱼池淤泥中参与氮循环的细菌和淤泥活性. 水产学报, 1993, 17(2): 137-145.]
- [12] Mo Z L. Selection of organic-pollutants-degrading bacteria in shrimp ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 334-338 [莫照兰. 虾池有机污染物降解细菌的筛选[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 334-338.]
- [13] Li J Z, Cheng N N, Chen Q J. Progress in the study of bioremediation for polluted water bodies[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2005, 6(1): 25-30. [李继洲, 程南宁, 陈清锦. 污染水体的生物修复技术研究进展[J]. 环境工程学报, 2005, 6(1): 25-30.]
- [14] Yang X J, Cai G J, Zheng W Y, et al. Application of immobilized microorganism in bioremediation of polluted water involved in mariculture and harmful algal blooms[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 712-720. [杨旭俊, 蔡冠竟, 郑伟, 等. 固定化微生物技术在受污养殖水体和水华水域生物修复中的应用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 712-720.]
- [15] Xie J, Fang X Z, Yu T B. Studies on the correlation among various bacteria and physicochemical factors in the nitrogen cycle in fishpond[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(2): 180-187. [谢骏, 方秀珍, 郁桐炳. 池塘氮循环中各种细菌与理化因子的相关性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 180-187.]
- [16] Xiong Y, Liu L Y, Luo R, et al. Screening, identification, degradation condition and effects of a nitrite-degrading strain[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1264-1271. [熊焰, 刘力源, 罗睿, 等. 1株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1264-1271.]
- [17] Liu Y, Gan L, Huang Z Q, et al. Study on denitrification characteristics of *Paracoccus* YF₁[J]. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(10): 61-65. [刘燕, 甘莉, 黄哲强, 等. 脱氮副球菌 YF₁的反硝化特性研究[J]. 水处理技术, 2010, 36(10): 61-65.]
- [18] Chen W, Ding X L, He Y L, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of nitrite degradation bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(S2): 37-41. [陈薇, 丁祥力, 贺月林, 等. 亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(S2):

- 37-41.]
- [19] Li Y S, Wei M, Zhang A X, et al. Isolation, identification and characterization of a nitrite-oxidizing bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 196-202. [李焱生, 魏民, 张艾晓, 等. 一株异养型亚硝酸盐氧化细菌的分离及其降解特性的研究[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 196-202.]
- [20] Liu H L, Zhang H L, Li X Z. Degradation of nitrite by photosynthetic bacterium-I (PSB-I) isolated from shrimp culture ponds[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(6): 32-33. [刘慧玲, 张红莲, 李细钊. 光合细菌 I 的分离及其对水体中亚硝酸盐降解的研究[J]. *水产科学*, 2005, 24(6): 32-33.]
- [21] Liu B H, Guo X H, Yang L, et al. Screening and identification of the nitrite-degrading *Aspergillus parasiticus* JFS[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1556-1563. [刘冰花, 郭晓恒, 杨林, 等. 一株亚硝酸盐降解真菌 *Aspergillus parasiticus* JFS 的筛选及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1556-1563.]
- [22] Wu W, Yu X L, Li Y M. Studies on the degradation characteristics of nitrite in the fishery water by *Candida* sp[J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(1): 8-11. [吴伟, 余晓丽, 李咏梅. 假丝酵母对养殖水体中亚硝酸盐的降解特性[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(1): 8-11.]
- [23] Wu W, Hu G D, Qu J H, et al. Removal of nitrite from aquacultural water with *Lactobacillus brevis*[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*[J]. 2007, 23(4): 37-40. [吴伟, 胡庚东, 瞿建宏, 等. 应用短乳杆菌去除养殖水体中亚硝酸盐[J]. *生态与农村环境学报*, 2007, 23(4): 37-40.]
- [24] He W, Wang W, Wang J, et al. Isolation, identification and its mixed application of a strain of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(2): 88-93. [何伟, 王薇, 王洁, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其混合应用特性研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2009, 25(2): 88-93.]
- [25] Wang H C. Isolation, identification and safety evaluation of a nitrite removal bacterium AQ-3[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [王会聪. 亚硝酸盐降解菌 AQ-3 的分离鉴定及安全性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [26] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 677-830. [R E 布坎南, N E 吉本斯. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 677-830.]
- [27] Dong X Z, Cai M Y. *Systemic Identification Manual of Familiar Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 409-412. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 409-412.]
- [28] Su J F, Lu X, Ma C M, et al. Isolation, culture and identification of a heterotrophic nitrifying bacteria[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2020, 6(4): 79-82. [苏金凤, 吕祥, 马传敏, 等. 一株异养硝化细菌的分离培养及鉴定[J]. *生物化工*, 2020, 6(4): 79-82.]
- [29] Pang D, Peng Z R, He W H, et al. Screening, identification and immobilized optimization of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(6): 2430-2437. [庞朵, 彭自然, 何文辉, 等. 异养高效硝化细菌的筛选鉴定与固定化最优化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(6): 2430-2437.]
- [30] Chen M J, Jiang J Y, Zhou Y X, et al. Separation, identification and phylogenetic analysis of autotrophic nitro bacteria[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(3): 340-345. [陈梅娟, 蒋进元, 周岳溪, 等. 自养硝化细菌的分离、鉴定及系统发育分析[J]. *环境科学研究*, 2010, 23(3): 340-345.]
- [31] Zhao L Y. Mechanism of the phytoremediation of decabromodiphenyl ether in sediment by aquatic macrophyte *Scirpus validus* Vahl[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012: 154. [赵良元. 水生植物水葱对沉积物中十溴联苯醚的修复机制研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012: 154.]
- [32] Huang T L, He X X, Zhang H H, et al. Nitrogen removal characteristics of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. Sxf14[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(2): 201-207. [黄廷林, 何秀秀, 张海涵, 等. 水库贫营养异养硝化-好氧反硝化菌 Sxf14 的脱氮特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(2): 201-207.]
- [33] Li W F, Du L B, Liu S Y, et al. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 202-209. [李文甫, 杜柳冰, 刘思莹, 等. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 202-209.]
- [34] Zhang F F, Xie F X, Zhao Y J, et al. Identification and denitrification efficiency of a denitrifying bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2013, 7(11): 4415-4420. [张峰峰, 谢凤行, 赵玉洁, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及脱氮能力[J]. *环境工程学报*, 2013, 7(11): 4415-4420.]
- [35] Peng Z L, Liu M H, Guo H B, et al. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifier[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(4): 632-639. [彭志兰, 柳敏海, 郭海波, 等. 一株高效好氧反硝化细菌的分离与鉴定[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(4): 632-639.]
- [36] Nie H H, Zhao Q F, Li C H, et al. Identification and charac-

- teristics of a strain of bacteria with highly-effective nitrite nitrogen removing[J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2146-2155. [聂欢欢, 赵群芬, 李长红, 等. 一株高效去除亚硝酸氮细菌的分离鉴定及其脱氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2146-2155.]
- [37] Wang Y Y, Zhang Q Z. Isolation and identification of a photosynthetic bacterium strain and removal of ammonia nitrogen and nitrite by the bacterium species in water[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2512-2528. [王艺雅, 张其中. 一株光合细菌的分离鉴定及该菌对氨氮和亚硝态氮的去除作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2512-2528.]
- [38] Li Q C, Zhu L M, Shen X H, et al. Isolation and characterization of a photosynthetic bacterium[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2017, 58(8): 1444-1446. [林启存, 朱丽敏, 沈小红, 等. 一株光合细菌的分离与鉴定[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(8): 1444-1446.]
- [39] Liu Y T, Liu W S, Yang T J, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a nitrite-degrading strain[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 1171-1180. [刘玉廷, 刘文舒, 杨天俊, 等. 一株亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 1171-1180.]
- [40] Yang H F, Tang J Y, Hu A H, et al. Identification and denitrification characteristics of a denitrifier[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(1): 366-371. [杨浩锋, 唐佳巧, 胡安辉, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(1): 366-371.]
- [41] Zhang X Y, Guo L D, Liu X Y. Research advances in the neutral protease of *Bacillus subtilis*[J]. China Brewing, 2018, 37(4): 12-15. 张晓燕, 国立东, 刘晓艳. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 12-15
- [42] Wang S Y, Sun H W, Yang Q, et al. Biochemical reaction mechanism and kinetics of denitrification[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(5): 732-736. [王淑莹, 孙洪伟, 杨庆, 等. 传统生物脱氮反硝化过程的生化机理及动力学[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(5): 732-736.]
- [43] Tian Q W. Isolation and identification of photosynthetic bacteria and optimization of fermentation conditions and their application in aquaculture[D]. Huaiyin: Huaiyin Institute of Technology, 2020. [田启文. 光合细菌的分离鉴定与发酵条件优化及在水产养殖中的应用[D]. 淮阴: 淮阴工学院, 2020.]
- [44] Zhang X X. Studied on the purified effect on *Litopenaeus vannamei* reared water for the photosynthetic bacteria isolated from Hainan[D]. Haikou: Hainan University, 2018. [张秀霞. 海南土著光合细菌筛选及其对凡纳滨对虾养殖废水净化效果研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.]
- [45] Zheng J. Study on the fermentation production of coenzyme Q₁₀ by photosynthetic bacteria-*Rhodospseudomonas sphaeroides*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [郑君. 光合细菌(球形红假单胞菌)发酵产辅酶 Q₁₀ 的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [46] Yin Y N, Wu J W, Tan J J, et al. Optimization of medium and culture conditions for *Bacillus cereus* NJSZ-13[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2020, 40(6): 9-17. [尹艳楠, 吴佳雯, 谈家金, 等. 松树内生蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵培养基及条件优化[J]. 浙江林业科技, 2020, 40(6): 9-17.]
- [47] Luo L, Zhao Z, Huang X, et al. Isolation, identification, and optimization of culture conditions of a biofloculant-producing bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and its application in aquaculture wastewater treatment[J]. BioMed Research International, 2016, 2758168.
- [48] Zhang H, Lin C Q, Wu D H, et al. Optimization of liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis* CS27[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(5): 995-1001. [张慧, 林陈强, 吴大华, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CS27 液体发酵条件优化[J]. 热带作物学报, 2019, 40(5): 995-1001.]
- [49] Yi H, Wang L L, Feng H Y, et al. The color producing problem of glucose-containing medium during sterilization and its prevention measurements[J]. Liquor Making, 2003(02): 42-43. [仪宏, 王丽丽, 冯惠勇, 等. 含葡萄糖培养基高温灭菌变色及其防范措施的研究[J]. 酿酒, 2003(02): 42-43.]
- [50] Gong Y C, Chen Y, Tang J, et al. Culture characteristics of *Morchella importuna* mycelium with different fruiting performance[J]. Edible Fungi of China, 2016, 35(4): 7-11. [龚燕川, 陈影, 唐杰, 等. 梯棱羊肚菌 M83 和 M101 菌株培养特性差异[J]. 中国食用菌, 2016, 35(4): 7-11.]
- [51] Xu L J, Chen W, Wu Y B, et al. Optimization of culture media for a *Bacillus subtilis* of degrading nitrite[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2016(9): 10-11, 16. [许丽娟, 陈薇, 吴迎奔, 等. 亚硝酸盐降解菌 N419 的培养基优化[J]. 湖南农业科学, 2016(9): 10-11, 16.]
- [52] He T X, Li Z L, Xu Y. Denitrification characteristics of a hypothermia nitrite-denitrifier *Pseudomonas putida* Y-12[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(10): 3071-3077. [何腾霞, 李振轮, 徐义. 耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌 *Pseudomonas putida* Y-12 脱氮特性[J]. 环境科学学报, 2015, 35(10): 3071-3077.]

- [53] He T X, Li Z L, Yang S. Research progress in aerobic denitrifier and its removing mechanism of nitrite[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15(1): 174-180. [何腾霞, 李振轮, 杨珊. 好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展[J]. 过程工程学报, 2015, 15(1): 174-180.]
- [54] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, et al. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(3): 635-642.
- [55] Poth M, Focht D D. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: An examination of nitrifier denitrification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(5): 1134-1141.
- [56] Zhang Q F, Chi N Y, Zheng Y, et al. The study on mechanism of nitrite degradation by lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(8): 27-31. [张庆芳, 迟乃玉, 郑燕, 等. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 27-31.]

Isolation, identification and function of a nitrite-degrading strain JY-1

ZHOU Min, NING Wen, CHEN Hongju, JI Xiangshan, ZHAO Yan

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: In the present study, to isolate and screen a probiotic that degrades nitrite stably and efficiently, we carried out experiments on enrichment, isolation, culture, and identification of a suitable strain. Then, biological characteristics of the identified strain were determined through optimization of fermentation medium, analysis of nitrite degrading effect, and gene cloning of nitrite reductase. The strain was isolated and screened from five mixed water bodies, including aquaculture projects and wastewater treatment plants, and named JY-1. Additionally, the strain JY-1 was identified using 16S rDNA gene sequence analysis and physiological and biochemical characteristics. The results revealed strain JY-1 to be *Bacillus gaemokensis*. Optimization of fermentation conditions for sporulation of JY-1 strain indicated that the best carbon source for JY-1 was glucose and the best nitrogen source was tryptone. Analysis of the nitrite-degrading effect of JY-1 showed that JY-1 could degrade 0.6 mg/L nitrite in aquaculture water to 0.0 mg/L in 3 h. Moreover, the safety evaluation test suggested that no hemolysis was found, and the high concentration of JY-1 (10^9 CFU/mL) had no significant effect on the survival of Nile tilapia. Based on the results of experiments of gene cloning of nitrite reductase and the effect of JY-1 on ammonia, nitrite, and total nitrogen in water bodies, it is preliminarily speculated that enzymatic degradation, operated by JY-1, was the pathway through which nitrite was degraded and removed from water. In summary, this study provides an important basis for the preparation of microecological preparations with high efficiency in degrading nitrite.

Key words: *Bacillus gaemokensis*; nitrite; aquaculture water; isolation; identification

Corresponding author: ZHAO Yan. E-mail: yzhao@sdaa.edu.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0195

长江口盐沼湿地 3 种亚生境中国花鲈的碳、氮稳定同位素特征及基础食源差异

彭彪彪^{1, 2, 3, 4}, 王思凯^{1, 3, 4}, 赵峰^{1, 2, 3, 4}, 杨刚^{1, 2, 3, 4}, 庄平^{1, 2, 3, 4}

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海与长江口渔业资源环境科学观测实验站, 上海 200090;
2. 上海海洋大学, 上海 201306;
3. 上海长江口渔业资源增殖与生态修复工程技术研究中心, 上海 200090;
4. 中国水产科学研究院长江口渔业生态重点实验室, 上海 200090

摘要: 为探讨长江口九段沙盐沼湿地 3 种亚生境中基础食源对中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)的贡献, 明确长江口中国花鲈碳($\delta^{13}\text{C}$)、氮($\delta^{15}\text{N}$)稳定同位素特征及其基础食源差异, 于 2019 年 5—10 月, 在光滩、植被区和潮沟 3 种亚生境进行插网调查采样并采集各类潜在基础食源, 运用稳定同位素技术并结合多源线性混合模型分析中国花鲈基础食源差异。单因素方差分析结果显示 3 种亚生境中国花鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ 无显著差异($P>0.05$); 植被区与光滩亚生境和潮沟亚生境中的 $\delta^{15}\text{N}$ 值均存在显著性差异($P<0.05$); 随体长增大 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值呈增加趋势; 不同月份中国花鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 聚类分析结果表明, 7 月与其他月份(5、6、8、9、10 月)的同位素值差异较大, 其中 $\delta^{13}\text{C}$ 值随月份递增逐渐增加, $\delta^{15}\text{N}$ 值 7 月骤减。利用多源线性混合模型(IsoSource)估算主要基础食源对中国花鲈的碳源贡献, 结果显示 3 种亚生境各基础食源组成和贡献率相似, 悬浮颗粒物(Suspended particulate organic matter, POM)和 C_4 植物互花米草(*Spartina alterniflora*)碎屑是中国花鲈的主要碳源, 其次为藻类, C_3 植物海三棱藨草(*Scirpus mariqueter*)和芦苇(*Phragmites australis*)碎屑的碳源贡献最小。随体长增大 POM 的贡献率逐渐减小, 互花米草的贡献率逐渐增大, 随着生长中国花鲈基础食源由 POM 为主($>70\%$)转变为以 POM (50%~66%)和互花米草(32%~47%)为主。7 月各碳源对中国花鲈的贡献率较其他月份差异较大, 主要是由 POM 的贡献率骤增和藻类的贡献率减少引起的, 其根本原因可能是由于受长江径流量影响。研究表明, 3 种亚生境中国花鲈的基础食源组成和贡献率无明显差异, 但在不同亚生境所摄食饵料生物可能存在差异; 在生长过程中 3 种亚生境中国花鲈的基础食源均由 POM 为主转变为以 POM 和互花米草为主, 原因可能是中国花鲈在生长过程中食性发生转变。

关键词: 长江口; 盐沼湿地; 中国花鲈; 稳定同位素; 基础食源

中图分类号: S931, Q18.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0295-09

盐沼湿地具有较高的初级生产力, 生境类型和基础食源类型多样, 食物网结构和碳流途径比较复杂^[1-2], 为众多水生生物的生长、繁殖提供了必要的生存空间和适宜的生态条件, 支撑着流域和近海渔业的可持续发展^[3]。随着全球经济快速发展, 地球上几乎所有的生态系统都受到人类活

动的干扰。有研究表明, 全球约 65%的水域生态系统正遭受物种入侵、过度捕捞、水质污染和气候变化等因素的威胁^[4]。这些干扰因素一方面直接影响了鱼类的洄游、索饵、繁育习性, 继而影响鱼类资源群体补充; 另一方面导致水域生态基础碳源组成发生改变, 间接影响了鱼类的食源甚

收稿日期: 2021-04-29; 修订日期: 2021-06-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900905); 中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费项目(2021M04); 农业农村部财政专项(CJDC-2017-23); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目(2020TD13).

作者简介: 彭彪彪(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生态学. E-mail: a18437923323@126.com

通信作者: 庄平, 研究员, 研究方向为水生生物学. E-mail: pzhuang@ccsf.ac.cn

至食性,从而导致了鱼类资源衰退。

长江口盐沼湿地在维持河口生态系统健康、促进渔业可持续发展与保护河口水生动物资源等方面具有十分重要的作用。稳定同位素常用于食物网结构研究,如蔡德陵等^[5-6]利用碳稳定同位素对崂山湾水体和潮间带食物网结构进行了研究;也可用于辨别有机质的最初来源和营养结构研究^[7-8],而关于一些重要鱼种在不同亚生境和不同生活史阶段的基础食源的研究还未见报道。

中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)为长江口的重要经济鱼类,是长江口主要的传统捕捞对象之一。中国花鲈属凶猛的肉食性鱼类,成体以吞食活体动物为生,其生活习性为终年栖息于近海,尤喜栖息于河口咸淡水水域,早春游向近岸和河口区索饵,秋季产卵后游向较远的深海越冬。冬季栖于水深 10~14 m 处,春季栖于 8~9 m 处,夏末秋初于河口附近活动^[9]。长江河口区是中国花鲈的育肥场,亲鱼成熟前要在长江口大量捕食,为成熟后到邻近海域进行产卵繁殖储存能量。所以长江口的生态环境直接影响中国花鲈的捕食效率,而中国花鲈的捕食作用,也影响着长江口整个生态系统食物链^[10]。明确中国花鲈的基础食源特征,有助于了解盐沼湿地生态系统中的能量流动和物质循环过程,更有助于对渔业资源的管理和可持续利用进行有效的评估。碳($\delta^{13}\text{C}$)、氮($\delta^{15}\text{N}$)稳定同位素分析方法已广泛应用于水域生态学研究,成为食物网构建与食源追踪十分有效的手段^[11-13]。

本研究基于稳定同位素技术结合 IsoSource 模型分析,探讨长江口九段沙盐沼湿地 3 种亚生境中基础食源对中国花鲈的贡献,明确长江口中国花鲈碳、氮稳定同位素特征和基础食源变化特征,以期为中国花鲈资源保护和可持续利用提供科学依据,为长江口盐沼湿地生态修复提供基础资料。

1 研究方法

1.1 研究区域概况

研究地点位于上海九段沙湿地国家级自然保护区(31°03'N~31°38'N, 121°50'E~122°05'E)(图 1),

该区域受到亚热带季风气候的影响,四季分明,冬季寒冷干燥,夏季暖热多雨,年均降水量 1145 mm,年平均气温 15.7 °C。1 月最低,平均 4.2 °C;7 月最高,平均 27.3 °C。九段沙附近潮汐属于非正规半日浅海潮,平均潮差 2.67 m,最大潮差 4.62 m。冬季为枯水季节(11—1 月),被高盐度咸水控制,夏季为丰水季节(7—9 月),被低盐度江水控制^[14]。

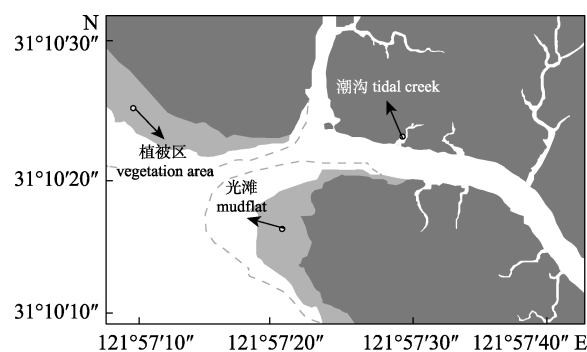


图 1 本研究采样位置

Fig. 1 Sampling locations of this study

1.2 样品采集

于 2019 年 5—10 月,利用插网在光滩、植被区[主要为海三棱藨草(*Scirpus mariqueter*)]和潮沟中各设一站点进行调查,每次调查插网连续收集 3 d 渔获物,对中国花鲈进行生物学测量,包括全长、体长(精确到 1 mm)、体重(精确到 0.01 g)等。选取每个月 3 种亚生境捕获的部分中国花鲈,共 141 尾,取其第一背鳍与侧线鳞之间肌肉进行稳定同位素分析。每月采集潜在的碳源,包括互花米草(*Spartina alterniflora*)、海三棱藨草(*Scirpus mariqueter*)、芦苇(*Phragmites australis*)、藻类、悬浮颗粒有机物(suspended particulate organic matter, POM)。在各样点附近的潮沟中各采集 2 L 潮水,用灼烧过(450 °C, 12 h)的 GF/F 玻璃纤维滤膜(Whatman)和真空泵过滤系统过滤获得 POM 样品。所有样品采集后迅速放入保温瓶中冷藏,带回实验基地-20 °C 冷冻保存。

所有用于进行稳定同位素分析的样品在冷冻干燥机中冻干至恒重,然后用研钵研磨粉碎,用 1 mol/L HCl 酸化去除碳酸盐成分(仅在测定碳稳定同位素比值进行此操作)。酸化后样品再次烘干并研磨成细粉末状,经 60 目筛网过滤后装入离心

管中干燥器保存。本实验中所有样品的稳定同位素比值由上海化工研究院有限公司测定, 仪器型号为 DEL TAplus XP (分析精度: $^{13}\text{C} < 0.1\text{‰}$, $^{15}\text{N} < 0.2\text{‰}$)。稳定 C、N 同位素的自然丰度表示为: $\delta(X) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$, 式中 X 表示 ^{13}C 或者 ^{15}N 的丰度, R 表示 $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$ 。其中碳的标准物质是箭石 Pee Dee Belemnite (PDB), 氮的标准物质是空气中的氮气。

1.3 数据分析

在 SPSS 23.0 中对所测各类潜在碳源样品、中国花鲈样品的稳定同位素比值进行成对样本 t 检验、方差分析, 以探讨其变化特征。

利用多源线性混合模型估算各种碳源对中国花鲈的相对贡献率^[15-16], 录入的数据根据消费者的营养级校正基础食物源的碳、氮稳定同位素值, 具体方法参照曾艳艺等^[17]和 Wang 等^[18]。所有需要标准化的数据采用离差标准化。

2 结果与分析

2.1 中国花鲈碳、氮稳定同位素特征

单因素方差分析显示同一月份中九段沙盐沼湿地 3 种亚生境中国花鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值无显著性差异($P > 0.05$)。3 种亚生境中国花鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围在 $-26.21\text{‰} \sim -14.42\text{‰}$, 平均值为 -19.39‰ ; $\delta^{15}\text{N}$ 值变化范围在 $6.44\text{‰} \sim 14.42\text{‰}$, 平均值为 10.94‰ 。植被区与光滩亚生境中国花鲈的 $\delta^{15}\text{N}$ 值存在显著性差异($P < 0.05$), 植被区与潮沟亚生境中的中国花鲈的 $\delta^{15}\text{N}$ 值也存在显著性差异($P < 0.05$)。

中国花鲈的碳、氮稳定同位素值在月份间存在差异, 其中 $\delta^{13}\text{C}$ 随月份逐渐增加, $\delta^{15}\text{N}$ 在 5 月和 6 月逐渐增加, 在 7 月骤减后继续增加(图 2)。月平均 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 聚类分析表明, 7 月与其他月份(5、6、8、9、10 月)相似性较小($< 40\%$), 九段沙盐沼湿地中国花鲈依据月份 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 可分为 7 月与其他月份两大类(图 3)。

2.2 体长与同位素的关系

为分析中国花鲈体长与碳、氮稳定同位素的关系, 将中国花鲈体长及其碳、氮稳定同位素数值进行分组并由小到大编号(图 4)。结果表明 $\delta^{13}\text{C}$ 随体长增大而增大, $\delta^{15}\text{N}$ 总体上逐渐增加。

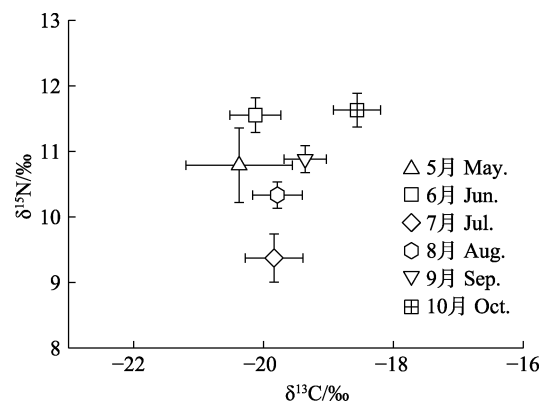


图 2 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈不同月份的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 双同位素坐标图

Fig. 2 Dual isotope plot of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of *Lateolabrax maculatus* in different months in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

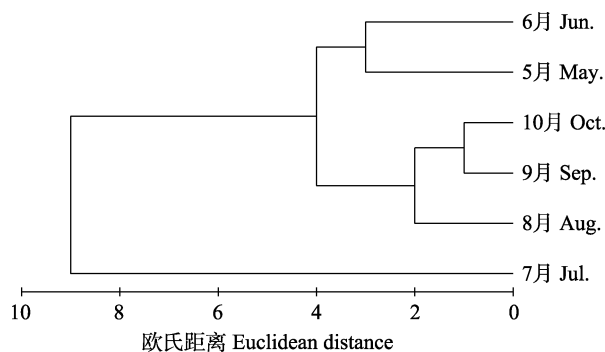


图 3 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈不同月份碳、氮稳定同位素水平聚类图

Fig. 3 Cluster diagram of stable carbon and nitrogen isotope levels of *Lateolabrax maculatus* in different months in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

平均 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的聚类分析结果表明, 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈根据体长可以划分为两组, 即组 I 和组 II (图 5): 组 I 的体长范围为 $28 \sim 128 \text{ mm}$, 组 II 的体长范围为 $129 \sim 367 \text{ mm}$, 组 I 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值显著小于组 II ($P < 0.05$), 且组 I 的体长明显小于组 II, 说明中国花鲈碳、氮稳定同位素随生长发生明显变化, 小规格个体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值小于大规格个体。

2.3 中国花鲈潜在碳源及贡献率估算

本研究所采集中国花鲈的潜在碳源为 POM、藻类、海三棱藨草、互花米草、芦苇。这 5 种碳源彼此的碳、氮同位素存在显著性差异($P < 0.05$)。POM 的碳、氮稳定同位素值在 7 月显著高于 5 月 ($P < 0.05$), 其他月份无显著性差异($P > 0.05$)。

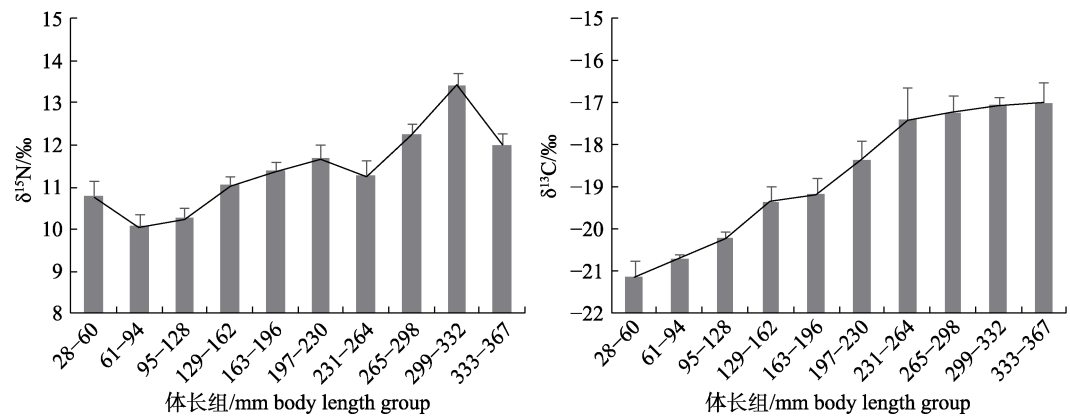


图 4 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈各体长组稳定同位素组成

Fig. 4 Stable isotopic composition of different body length groups of *Lateolabrax maculatus* in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

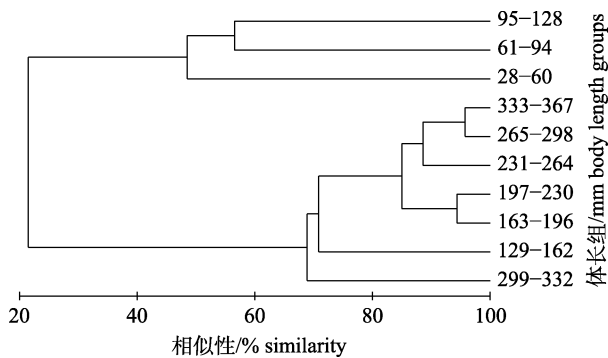


图 5 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈不同体长组碳、氮稳定同位素水平聚类图

Fig. 5 Cluster diagram of carbon and nitrogen stable isotope levels in different body length groups of *Lateolabrax maculatus* in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

利用多源线性混合模型估算主要碳源对中国花鲈的碳源贡献,结果显示,3种亚生境中各食源组成和贡献率相似,POM和互花米草是3种亚生境主要碳源,其次是藻类,海三棱藨草和芦苇对中国花鲈碳源贡献较小(表1,图6)。

5种碳源对中国花鲈的贡献率在不同的月份存在差异(表2),POM在调查期间对中国花鲈的碳源贡献率最大且随月份变化较大;互花米草对中国花鲈的碳源贡献率排第二位,贡献率随月份逐渐增大;海三棱藨草和芦苇对中国花鲈的碳源贡献率较小且月份间的变化较小;藻类对中国花鲈的碳源贡献率不稳定,月份间的变化较大。

5种碳源对不同体长组中国花鲈的贡献率存在差异(表3),总体表现为随着体长增大,POM的贡献减小,互花米草的贡献增大,中国花鲈基础

表 1 长江口九段沙盐沼湿地中国花鲈潜在碳源的碳、氮同位素水平

Tab. 1 Carbon and nitrogen isotopes level of potential carbon source of *Lateolabrax maculatus* in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

潜在碳源 potential carbon source	范围/‰ range		平均值/‰ mean	
	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N
悬浮颗粒有机物 POM	-25.09-23.22	3.56-4.34	-24.27	3.97
海三棱藨草 <i>Scirpus mariqueter</i>	-29.13-27.33	6.57-7.97	-28.13	7.57
芦苇 <i>Phragmites australis</i>	-29.91-26.21	5.19-7.23	-27.90	6.28
互花米草 <i>Spartina alterniflora</i>	-14.76-11.7	6.91-8.13	-12.76	7.51
藻类 algae	-26.57-22.05	5.26-7.18	-24.12	5.12

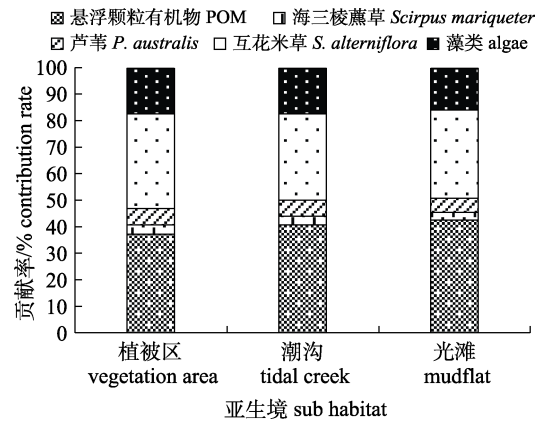


图 6 5种碳源对长江口九段沙盐沼湿地不同亚生境中国花鲈的贡献率

Fig. 6 Contribution rates of five carbon sources to *Lateolabrax maculatus* in different sub habitats in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

食源由 POM 为主(>70%)转变为以 POM (50%~66%)和互花米草(32%~47%)为主。

表 2 长江口九段沙盐沼湿地 5 种碳源在不同月份对中国花鲈的贡献率

Tab. 2 Contribution rates of five carbon sources to *Lateolabrax maculatus* in different months in Jiuduansha salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

月份 month	50%置信水平(1%–99%置信水平范围)的碳源贡献率 contribution rate of carbon source at 50% confidence level (1%–99% confidence level)					%
	悬浮颗粒有机物 POM	海三棱藨草 <i>Scirpus mariqueter</i>	芦苇 <i>Phragmites australis</i>	互花米草 <i>Spartina alterniflora</i>	藻类 algae	
5 月 May.	31 (7–48)	5 (0–17)	8 (0–25)	29 (28–35)	24 (0–59)	
6 月 Jun.	34 (1–49)	4 (0–15)	6 (0–22)	32 (28–35)	21 (0–59)	
7 月 Jul.	56 (5–58)	3 (1–5)	2 (0–5)	35 (34–35)	3 (1–13)	
8 月 Aug.	41 (34–53)	3 (0–8)	3 (0–8)	34 (33–36)	19 (0–3)	
9 月 Sep.	47 (28–50)	4 (0–7)	3 (0–11)	38 (35–39)	7 (0–37)	
10 月 Oct.	47 (28–50)	4 (0–7)	3 (0–11)	38 (35–39)	7 (0–37)	

表 3 长江口九段沙盐沼湿地 5 种碳源对不同体长组中国花鲈的贡献率

Tab. 3 Contribution rates of 5 carbon sources to different body length groups of *Lateolabrax maculatus*

体长组 body length group	悬浮颗粒有机物 POM	海三棱藨草 <i>Scirpus mariqueter</i>	芦苇 <i>Phragmites australis</i>	互花米草 <i>Spartina alterniflora</i>	藻类 algae	%
1	73.5	0	1.5	20.5	4.5	
2	75.0	0	0.0	25.0	0.0	
3	72.0	0	0.0	28.0	0.0	
4	66.0	0	0.0	33.0	1.0	
5	60.0	0	0.0	40.0	0.0	
6	60.0	0	0.0	38.0	2.0	
7	51.8	1	0.3	44.7	1.4	
8	53.0	0	0.0	45.0	1.0	
9	64.6	1	0.3	32.0	1.5	
10	49.9	2	0.3	47.4	2.0	

3 讨论

3.1 中国花鲈的碳、氮同位素特征

本研究结果显示中国花鲈的碳、氮稳定同位素值跨度较大,且略大于孙培英^[19]所报道的范围,经仔细比较发现这些差异可能与所采集样本的体长有关,孙培英所采集的中国花鲈的体长范围为 68~265 mm,而本研究所采集样本体长范围为 28~367 mm,体长跨度几乎涵盖整个幼鱼阶段的体长范围,而此阶段是中国花鲈食性转变时期,所以其对应的同位素值变化幅度也较大。鱼类较大跨度的碳、氮稳定同位素值与其复杂多样的饵料来源有关^[20],且孙帼英等^[21]在分析长江口中国花鲈

胃含物时发现中国花鲈摄食饵料既有浮游动物又有鱼虾蟹类等,因此推测本研究中国花鲈较大跨度的碳、氮稳定同位素值与中国花鲈在长江口盐沼湿地的摄食多样性有关。

本研究结果还显示长江口中国花鲈的碳、氮稳定同位素值随个体生长呈增大趋势,小规格个体的碳、氮稳定同位素值显著小于大规格个体。说明中国花鲈在生长发育过程中,随着个体增大,取食范围扩大,食性发生转变。这与孙帼英等^[21]对长江口中国花鲈胃含物分析结果相似:中国花鲈幼鱼摄食饵料以枝角类、桡足类、涟虫等浮游动物为主,稍大个体摄食饵料以鱼虾蟹等为主。此外李斌^[22]和陈展彦^[23]在研究蒙古鲇(*Culter mongolicus*)时发现相似的规律:小规格个体蒙古鲇的碳、氮稳定同位素值显著小于大规格个体,并用稳定同位素证实蒙古鲇的食性在生长过程中发生了由杂食性偏肉食性到向肉食性的转变。有研究者认为鱼类碳、氮同位素随体长的变化是由鱼类体内蛋白质和脂肪酸的含量变化引起的^[24–25]。也有研究者认为这种变化与鱼类食性变化有关,如 Pilati 等^[24]发现美洲真鲮(*Dorosoma cepedianum*)的碳、氮同位素值随生长而增大,并认为这与其由食浮游动物转变为食沉积物有关。综上所述中国花鲈的碳、氮稳定同位素值随个体生长而增大,且与中国花鲈的食性变化有关。

碳同位素可以用来反映鱼类不同空间分布的差异。Gning 等^[26]研究发现黑鳍缩口银鲈(*Eucinostomus molanopterus*)在低盐区和高盐区 $\delta^{13}\text{C}$ 存在显著差异。Hiroshige 等^[27]发现近岸日本

鳊(*Engraulis japonicus*)的 $\delta^{13}\text{C}$ 显著高于离岸区。本研究中中国花鲈的 $\delta^{13}\text{C}$ 在长江口盐沼湿地 3 种亚生境中无显著性差异。分析原因可能是中国花鲈游泳能力较强, 有较大的捕食范围, 同一条鱼可能在 3 种亚生境均有摄食, 而非限定在某一生境, 3 种亚生境对于中国花鲈来说可能是较小的空间尺度, 因此中国花鲈的碳稳定同位素在 3 种亚生境未表现出明显的差异。为进一步探讨中国花鲈的碳稳定同位素特征, 可在更大空间尺度上开展相关研究, 丰富研究结果。

氮同位素与摄食相关, 会随营养级升高有明显富集^[28-29], 鱼类摄食不同的饵料生物就会导致氮同位素的差异。有研究表明 3 种亚生境饵料生物存在差异, 周晓等^[30]发现长江口九段沙湿地海三棱藨草植被区的大型底栖动物物种数高于光滩; 袁兴中等^[31]发现崇明东滩海三棱藨草植被区的大型底栖动物物种数高于光滩中大型底栖动物物种数。不同亚生境的消费者所摄食的饵料种类不同, 叶锦玉^[32]研究发现斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)在海三棱藨草植被区偏向于摄食多毛类等底栖动物, 在潮沟和光滩亚生境偏向于摄食虾和鱼类。因此本研究认为中国花鲈的氮稳定同位素在 3 种亚生境的差异是由于其所摄食饵料生物的不同。

3.2 中国花鲈的基础食源特征

由于长江口盐沼湿地生态系统基础能量来源复杂, 根据长江口盐沼湿地水利条件和植被特征, 将中国花鲈的潜在食物源分为 POM、藻类、互花米草、海三棱藨草和芦苇。本研究表明在生长过程中 3 种亚生境中国花鲈的基础食源均由 POM 为主转变为以 POM 和互花米草为主。出现这种变化的原因可能是中国花鲈生长过程中摄食饵料生物发生了变化: 中国花鲈幼鱼时期摄食饵料以枝角类、桡足类、涟虫等浮游动物为主, 而浮游动物主要的食物来源为水中的 POM^[33-35], 因此小规格中国花鲈的基础碳源主要来源于 POM。稍大个体的中国花鲈摄食饵料以鱼、虾、蟹等为主, 这些饵料生物多食碎屑腐殖质。互花米草是长江口入侵植物, 在九段沙湿地更是大面积分布成为绝对优势种^[36], 每年会生产大量的碎屑。有研究表

明入侵植物互花米草可以通过鱼类、昆虫、蟹类、螺类等进入食物网^[37-40], 进而传递到中国花鲈等高级消费者。根据最佳摄食理论, 随着个体增大, 鱼类捕食的饵料生物也越大^[41], 洪巧巧等^[10]在研究中国花鲈的食性时发现中国花鲈的体长与其饵料生物的体长成正相关, 饵料生物越大, 营养级越高, 富集来自互花米草的碳就越多^[6], 因此随体长增大互花米草对中国花鲈的食源贡献增大, POM 的食源贡献减小。

本研究中 POM 对中国花鲈的食源贡献随季节逐渐增大, 在 7 月显著增大, 这种变化可能与 POM 组成和径流量有关。有研究表明 POM 在生态系统中的贡献率与季节有着明显的联系^[20,42], 此外宁加佳等^[43]在研究水库颗粒有机物的碳、氮同位素特征时发现 POM 的碳、氮同位素在 5 月和 7 月较高可能与较高的外源有机物比例有关, 且径流量与 POM 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈及其显著的相关关系。7 月正值长江口丰水期, 因此 7 月 POM 对中国花鲈的食源贡献显著增大可能与此月份的径流量有关。这也揭示了外部环境的变化会影响中国花鲈的基础能量来源。

4 小结

本研究以长江口盐沼湿地优势种中国花鲈为研究对象, 利用碳、氮稳定同位素技术探究其碳、氮稳定同位素特征及食源差异, 得到如下结论:

(1) 中国花鲈在 3 种亚生境的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无显著性差异, 藨草亚生境与光滩亚生境和潮沟亚生境中的中国花鲈的 $\delta^{15}\text{N}$ 值存在显著性差异($P < 0.05$)。中国花鲈在 3 种亚生境中的基础食源无差异, 但所摄食饵料生物存在差异。

(2) POM 和互花米草是中国花鲈主要碳源, 其贡献率在 3 种亚生境间相似。7 月各碳源对中国花鲈的贡献率较其他月份差异较大, 变化主要是由于 POM 的贡献率骤增和藻类的贡献率减少引起的, 其原因可能是受长江径流量影响。

(3) 随着中国花鲈生长发育, 其基础食源由 POM 为主(>70%)转变为以 POM (50%~66%)和互花米草(32%~47%)为主, 说明中国花鲈在幼鱼阶段食性发生转变。

参考文献:

- [1] Pétilion J, Ysnel F, Canard A, et al. Impact of an invasive plant (*Elymus athericus*) on the conservation value of tidal salt marshes in western France and implications for management: Responses of spider populations[J]. *Biological Conservation*, 2005, 126(1): 103-117.
- [2] Eslami-Andargoli L, Dale P E R, Sipe N, et al. Local and landscape effects on spatial patterns of mangrove forest during wetter and drier periods: Moreton Bay, Southeast Queensland, Australia[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2010, 89(1): 53-61.
- [3] McLusky D S, Elliott M. The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management[M]. New York: Oxford University Press, 2004: 16-49.
- [4] Vörösmarty C J, McIntyre P B, Gessner M O, et al. Global threats to human water security and river biodiversity[J]. *Nature*, 2010, 467(7315): 555-561.
- [5] Cai D L, Meng F, Han Y B, et al. Studies on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios as a tracer for food web in a marine ecosystem—the trophic relations in pelagic food webs in Laoshan bay[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(6): 671-678. [蔡德陵, 孟凡, 韩贻兵, 等. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值作为海洋生态系统食物网示踪剂的研究——崂山湾水体生物食物网的营养关系[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6): 671-678.]
- [6] Cai D L, Hong X G, Mao X H, et al. Preliminary studies on trophic structure of tidal zone in the Laoshan Bay by using carbon stable isotopes[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, 23(4): 41-47. [蔡德陵, 洪旭光, 毛兴华, 等. 崂山湾潮间带食物网结构的碳稳定同位素初步研究[J]. *海洋学报*, 2001, 23(4): 41-47.]
- [7] Vizzini S, Mazzola A. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon[J]. *Marine Biology*, 2003, 142(5): 1009-1018.
- [8] Yu J, Liu M, Hou L J, et al. Food sources of macrofauna in East Chongming salt marsh as traced by stable isotopes[J]. *Journal of Natural Resources*, 2008, 23(2): 319-326. [余婕, 刘敏, 侯立军, 等. 崇明东滩大型底栖动物食源的稳定同位素示踪[J]. *自然资源学报*, 2008, 23(2): 319-326.]
- [9] Zhuang P, Zhang T, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2018: 365-368. [庄平, 张涛, 李圣法, 等. 长江口鱼类[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2018: 365-368.]
- [10] Hong Q Q, Zhuang P, Yang G, et al. Feeding habits of *Lateolabrax maculatus* in Yangtze River estuary[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(13): 4181-4190. [洪巧巧, 庄平, 杨刚, 等. 长江口中国花鲈食性分析[J]. *生态学报*, 2012, 32(13): 4181-4190.]
- [11] Zanden M, Casselman J M, Rasmussen J B. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes[J]. *Nature*, 1999, 401(6752): 464-467.
- [12] Gu B C, Schelske C L, Hoyer M V. Stable isotopes of carbon and nitrogen as indicators of diet and trophic structure of the fish community in a shallow hypereutrophic lake[J]. *Journal of Fish Biology*, 1996, 49(6): 1233-1243.
- [13] Schwamborn R, Giarrizzo T. Stable isotope discrimination by consumers in a tropical mangrove food web: How important are variations in C/N ratio?[J]. *Estuaries and Coasts*, 2015, 38(3): 813-825.
- [14] Chen J K. Overview of Shanghai Jiuduansha Wetland Nature Reserve[M]. Beijing: Science Press, 2003: 13-186. [陈家宽. 上海九段沙湿地自然保护区科学考察集[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 13-186.]
- [15] Gregg P J. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources[J]. *Oecologia*, 2003, 136(2): 261-269.
- [16] Zeug S C, Winemiller K O. Evidence supporting the importance of terrestrial carbon in a large-river food web[J]. *Ecology*, 2008, 89(6): 1733-1743.
- [17] Zeng Y Y, Lai Z N, Yang W L, et al. Trophic spectrum of fishery species from the Pearl River Estuary by stable isotope analysis[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(1): 194-202. [曾艳艺, 赖子尼, 杨婉玲, 等. 珠江河口渔业生物稳定同位素营养级分析[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(1): 194-202.]
- [18] Wang J Z, Gu B H, Huang J H, et al. Terrestrial contributions to the aquatic food web in the middle Yangtze River[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102473.
- [19] Sun P Y. Carbon, nitrogen and phosphorus ecological stoichiometry of *Lateolabrax maculatus* and *Acanthogobius ommaturus* in the estuary of Yangtze River, China[D]. Shanghai: East China Normal University, 2014: 1-58. [孙培英. 长江口中国花鲈和斑尾刺虾虎鱼的生态化学计量研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2014: 1-58.]
- [20] Chen Z Y, Wu H T, Wang Y B, et al. Research progress on food sources and food web structure of wetlands based on stable isotopes[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(7): 2389-2398. [陈展彦, 武海涛, 王云彪, 等. 基于稳定同位素的湿地食物源判定和食物网构建研究进展[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(7): 2389-2398.]
- [21] Sun G Y, Zhu Y Y, Chen J G, et al. Growth and feeding habits of Japanese sea-bass, *Lateolabrax japonicus*, in the estuary of Yangtze River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(3): 183-189. [孙帼英, 朱云云, 陈建国, 等. 长江口花鲈的生长和食性[J]. *水产学报*, 1994, 18(3): 183-189.]
- [22] Li B. Ecological studies on the fish food web structures and trophic relationships with stable isotope technology in a tributary in the Three Gorges reservoir areas (TGR)[D]. Chongqing: Southwest University, 2012: 12-39. [李斌. 三峡库区小江鱼类食物网结构、营养级关系的C、N稳定性同

- 位素研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012: 12-39.]
- [23] Chen Z Y. Study on aquatic food web structure of typical wetland in Sanjiang Plain[D]. Changchun: University of Chinese Academy of Sciences (Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences), 2018: 21-59. [陈展彦. 三江平原典型沼泽湿地水生食物网结构研究[D]. 长春: 中国科学院大学(中国科学院东北地理与农业生态研究所), 2018: 21-59.]
- [24] Pilati A, Vanni M J. Ontogeny, diet shifts, and nutrient stoichiometry in fish[J]. *Oikos*, 2007, 116(10): 1663-1674.
- [25] Harvey C J, Hanson P C, Essington T E, et al. Using bioenergetics models to predict stable isotope ratios in fishes[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2002, 59(1): 115-124.
- [26] Gning N, Le Loc'h F, Thiaw O T, et al. Estuarine resources use by juvenile Flagfin mojarra (*Eucinostomus melanopterus*) in an inverse tropical estuary (Sine Saloum, Senegal)[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2010, 86(4): 683-691.
- [27] Hiroshige T, Akinori T, Ichiro A, et al. Geographical variations in the trophic ecology of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*, inferred from carbon and nitrogen stable isotope ratios[J]. *Marine Biology*, 2008, 154(3): 557-568.
- [28] Ke Z X, Huang L M, Xu J, et al. The stable nitrogen isotope of size-fractionated plankton and its relationship with biomass during winter in Daya Bay[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(22): 7102-7108. [柯志新, 黄良民, 徐军, 等. 大亚湾冬季不同粒径浮游生物的氮稳定同位素特征及其与生物量的关系[J]. *生态学报*, 2012, 32(22): 7102-7108.]
- [29] Wang T T, Lv Z B, Li F, et al. Determination of the trophic levels of four fish species in Engraulidae and Clupeidae in Laizhou Bay based on stable carbon and nitrogen isotopes[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(5): 1076-1085. [王田田, 吕振波, 李凡, 等. 基于稳定碳氮同位素的莱州湾 4 种鳀鲷科鱼类营养级研究[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(5): 1076-1085.]
- [30] Zhou X, Wang T H, Ge Zhen M, et al. Impact of *Spartina alterniflora* invasion on the macrobenthos community of Jiuduansha's intertidal mudflat in the Yangtze River estuary[J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14, 165-171. [周晓, 王天厚, 葛振鸣, 等. 长江口九段沙湿地不同生境中大型底栖动物群落结构特征分析[J]. *生物多样性*, 2006, 14, 165-171.]
- [31] Yuan X Z, Lu J J. Preliminary study on macrobenthic community of the creek in the tidal flat of the Changjiang Estuary[J]. *Zoological Research*, 2001, 22(3): 211-215. [袁兴中, 陆健健. 长江口潮沟大型底栖动物群落的初步研究[J]. *动物学研究*, 2001, 22(3): 211-215.]
- [32] Ye J Y. The temporal spatial distribution and inhabit strategy of *acanthogobius ommaturus* in the intertidal wetland subhabitats of the Yangtze River[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 15-31. [叶锦玉. 长江口潮间带湿地亚生境中斑尾刺虾虎鱼时空分布特征和栖息策略[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 15-31.]
- [33] Sierszen M, Morrice J, Moffett M, et al. Benthic versus planktonic foundations of three Lake Superior coastal wetland food webs[J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2004, 30(1): 31-43.
- [34] Prins T, Smaal A, Dame R. A review of the feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes[J]. *Aquatic Ecology*, 1997, 31(4): 349-359.
- [35] Xu Q. Evaluation of food sources of bivalve in seaweed and filter-feeding bivalve polyculture ecosystem[D]. Qingdao: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography), 2007: 37-77. [许强. 贝藻混养系统中贝类食物来源的定量分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2007: 37-77.]
- [36] Liu Y, Li X Z, Yan Z Z, et al. Biomass and carbon storage of *Phragmites australis* and *Spartina alterniflora* in Jiuduansha wetland of Yangtze Estuary, East China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8): 2129-2134. [刘钰, 李秀珍, 闫中正, 等. 长江口九段沙盐沼湿地芦苇和互花米草生物量及碳储量[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2129-2134.]
- [37] Gratton C, Denno R F. Arthropod food web restoration following removal of an invasive wetland plant[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(2): 622-631.
- [38] Quan W, Fu C, Jin B, et al. Tidal marshes as energy sources for commercially important nektonic organisms: Stable isotope analysis[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 352: 89-99.
- [39] Qin H, Chu T, Xu W, et al. Effects of invasive cordgrass on crab distributions and diets in a Chinese salt marsh[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 415: 177-187.
- [40] Maclean N. Feeding Ecology of Fish[J]. *Copeia*, 1995(s1-2): 754.
- [41] Wu Y T, Wang C H, Zhang X D, et al. Effects of saltmarsh invasion by *Spartina alterniflora* on arthropod community structure and diets[J]. *Biological Invasions*, 2009, 11(3): 635-649.
- [42] Connolly R M, Hindell J S, Gorman D. Seagrass and epiphytic algae support nutrition of a fisheries species, *Sillago schomburgkii*, in adjacent intertidal habitats[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 286: 69-79.
- [43] Ning J J, Liu H, Gu B H, et al. Carbon and nitrogen stable isotope characteristics of particulate organic matter and zooplankton in Liuxihe Reservoir[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(5): 1502-1509. [宁加佳, 刘辉, 古滨河, 等. 流溪河水库颗粒有机物及浮游动物碳、氮稳定同位素特征[J]. *生态学报*, 2012, 32(5): 1502-1509.]

Carbon and nitrogen isotopic characteristics and food source differences of *Lateolabrax maculatus* in three sub habitats of salt marsh wetland in the Yangtze River Estuary

PENG Biaobiao^{1,2,3,4}, WANG Sikai^{1,3,4}, ZHAO Feng^{1,2,3,4}, YANG Gang^{1,2,3,4}, ZHUANG Ping^{1,2,3,4}

1. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment of the East China Sea and Yangtze Estuary, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Resources Enhancement and Ecological Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China;
4. Key Laboratory of Fisheries Ecology of the Yangtze Estuary, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: In order to investigate the contribution of basic food sources to *Lateolabrax maculatus* in three sub habitats of Jiuduansha salt marsh wetland in the Shanghai and to determine the stable isotope characteristics of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and the variation characteristics of basic food sources of this species, a survey was conducted in the mudflat, *Scirpus mariqueter* vegetation area and tidal creek from May to October in 2019. The results of one-way analysis of variance showed that there were no significant difference in $\delta^{13}\text{C}$ among the three sub habitats. There were significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ between vegetation area and mudflat sub habitats, and there were significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ between vegetation area and the tidal creek sub habitat ($P < 0.05$). Increasing with body length $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ value showed an increasing trend, and $\delta^{13}\text{C}$ value of *L. maculatus* in Jiuduansha salt marsh gradually increased each month, while $\delta^{15}\text{N}$ value decreased sharply in July. The cluster analysis of monthly average $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ showed that July had little similarity with the other months (May, June, August, September, and October). The results showed that the composition and contribution rate of basic food sources in the three sub habitats are similar, and suspended particulate organic matter (POM) and *Spartina alterniflora* were the main carbon sources, followed by microalgae, *Scirpus mariqueter* and *Phragmites australis* contributed the least to the carbon source of *maculatus*. The contribution rate of POM decreased, while that of *S. alterniflora* increased with the increase in body length. With the growth of *L. maculatus*, the main food source for it changed from POM (>70%) to POM (50%–66%) and *S. alterniflora* (32%–47%). The results showed that the feeding habits of *L. maculatus* changed in the juvenile stage. The contribution rates of carbon sources to *L. maculatus* in July were different from those in other months. The change was mainly caused by the sudden increase in the POM contribution rate and the decrease in the algae contribution rate. The internal reason may be affected by the Yangtze River runoff. Conclusion: there were no significant differences in the composition and contribution rate of basic food sources of *L. maculatus* among the three sub habitats, but there may be differences in the feeding in different sub habitats; During the growth process, the basic food source of *L. maculatus* in the three sub habitats changed from POM to POM and *S. alterniflora*, which may be due to the change of feeding habits of *L. maculatus* during the growth process.

Key words: Yangtze River Estuary; salt marshes wetland; *Lateolabrax maculatus*; stable isotopes; basic food source

Corresponding author: ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@ecsf.ac.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0211

澜沧江西藏段鱼类群落结构及多样性

朱挺兵, 胡飞飞, 龚进玲, 王旭歌, 陈康, 杜红春, 杨德国, 吴兴兵

中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223

摘要: 为了解澜沧江西藏段鱼类群落现状, 于 2017—2019 年对澜沧江西藏段干流及主要支流的鱼类资源进行了实地调查, 并分析和评价了鱼类群落的结构特征及多样性。结果显示, 澜沧江西藏段现有鱼类 2 目 5 科(亚科) 13 种, 其中土著鱼类 9 种, 外来鱼类 4 种; 摄食生态类型包括杂食性(占比 92.3%)和肉食性(占比 7.7%)2 种; 栖息类型包括 3 种, 其中底栖缓流性鱼类物种数比例最高, 占 61.5%; 群落优势种为光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabius*)、澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)、裸腹叶须鱼(*Ptychobarbus kaznakovi*)和前腹裸裂尻鱼(*Schizopygopsis anteroventris*); 鱼类群落的 Shannon-Wiener 指数、Pielou 均匀度指数和 Margalef 丰富度指数的变化范围分别为 0.570~1.249、0.585~0.901 和 0.504~1.423。总体而言, 澜沧江西藏段鱼类群落结构较为简单, 但处于稳定状态, 所有有历史记录의土著鱼类均采集到样本, 所有外来鱼类均是首次记录。为保护澜沧江西藏段土著鱼类资源, 建议加强土著鱼类栖息地保护和人工驯养繁育, 并重视对外来鱼类的防控。

关键词: 澜沧江; 西藏; 鱼类资源; 群落结构; 多样性

中图分类号: S932

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0304-10

澜沧江是一条发源于青藏高原的大型国际河流, 自北向南流经青海、西藏、云南三省区。澜沧江地势北高南低, 源头和下游较宽阔, 上游、中游则狭窄, 地形起伏剧烈、复杂多变, 汇聚了高山草甸、峡谷激流、热带雨林等多种自然景观, 同时也孕育了丰富的鱼类生物资源。根据《中国动物志 硬骨鱼纲》^[1-3]、《中国鲤科鱼类志》^[4]、《云南鱼类志》^[5-6]、《中国条鳅志》^[7]、《青藏高原鱼类》^[8]、《西藏鱼类及其资源》^[9]、《横断山区鱼类》^[10]、《云南湖泊鱼类资源》^[11]和《澜沧江水生生物物种资源调查》^[12]等文献资料记载, 澜沧江流域共分布有鱼类 10 目 28 科 99 属(亚属) 174 种。尽管澜沧江流域鱼类的多样性非常高, 但是空间差异明显, 总体表现为中下游的云南段多样性极高, 而青海、西藏段的多样性相对较低。

对于澜沧江西藏段的鱼类资源, 过去开展过零星的调查和研究, 缺乏系统的鱼类资源数据。20 世纪以前, 仅有《青藏高原鱼类》^[8]、《西藏鱼类及其资源》^[9]、《横断山区鱼类》^[10]等学术资料报道过少量澜沧江西藏段的鱼类分布。进入 21 世纪以来, 仅见李斌等^[13]报道了 2008 年在澜沧江西藏段新采集记录鮡科鱼类 1 种, 以及刘绍平等^[12]报道了 2010 年夏季和 2011 年夏季澜沧江西藏段部分江段的鱼类种类组成情况, 距今已有十几年。与云南段相比, 澜沧江西藏段的生态系统结构更为简单, 生物种群也更为脆弱。开展澜沧江西藏段鱼类群落结构及多样性研究, 不仅是及时掌握资源现状的需要, 同时也可為澜沧江西藏段鱼类资源的保护与利用提供科学依据。

收稿日期: 2021-05-08; 修订日期: 2021-06-16.

基金项目: 农业财政专项(西藏重点水域渔业资源与环境调查); 财政部和农业农村部现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-46); 中国水产科学研究院院级创新团队项目(2020TD57).

作者简介: 朱挺兵(1987-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事鱼类生态学研究. E-mail: zhutb2008@163.com

通信作者: 杨德国, 研究员, 主要从事鱼类保护生物学研究. E-mail: yangdg@yfi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 研究区域

研究区域为澜沧江西藏段干流和主要支流。

共设置8个调查样点, 其中干流4个样点(曲孜卡、如美、卡若、扎曲), 支流4个样点(金河、麦曲、昂曲、热曲)(图1)。

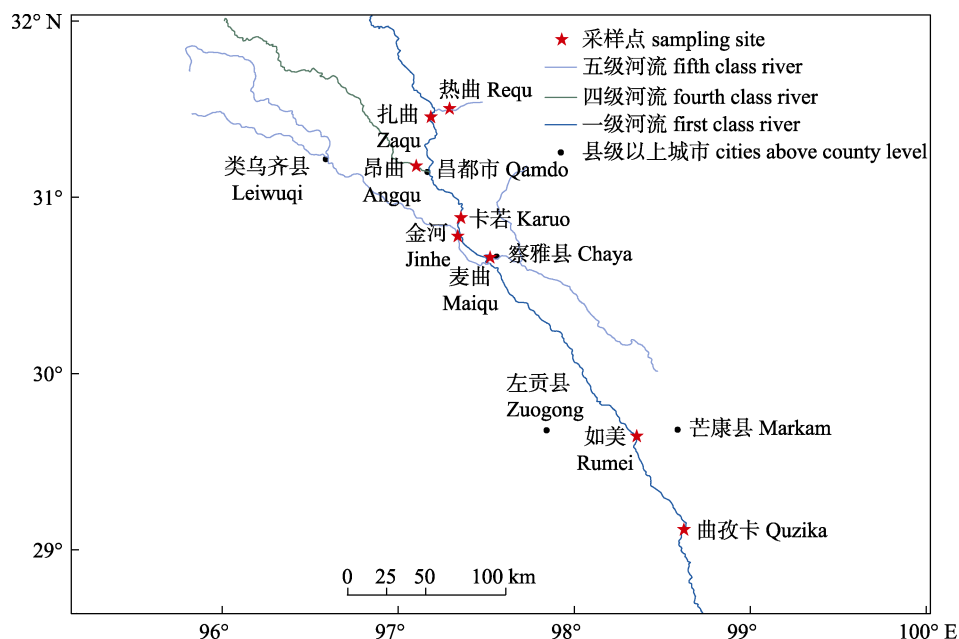


图1 澜沧江西藏段鱼类采集样点示意图

Fig. 1 Sampling stations of fish in the Tiber reach of the Lancang River

1.2 调查时间

共开展了7次野外调查, 时间分别为2017年4月、2017年9月、2018年4月、2018年7月、2018年10月、2019年4月和2019年9月。

1.3 调查方法

采取现场捕捞调查的方式, 在澜沧江西藏段干支流各样点采集鱼类。捕捞网具为三层丝网, 网长10 m, 高1.5 m, 内网网目2.5 cm, 外网网目7 cm。每次调查在每个样点布设6~8张网, 放置时间约12 h。对于采集到的鱼类样本, 参考《西藏鱼类及其资源》^[9]进行现场种类鉴定、拍照, 然后测量全长(精确到0.1 cm)、体长(精确到0.1 cm)和体重(精确到0.01 g)。对于现场无法鉴定的种类, 先进行编号、测量, 然后用福尔马林溶液固定, 带回实验室做进一步鉴定。

1.4 数据处理

现场调查时, 支流昂曲和麦曲因不可控因素采集到的鱼类样本数量过少, 不具备代表性, 因此在最终的数据分析中予以剔除。

1.4.1 资源量估算 以单位捕捞努力渔获量(CPUE)作为相对渔业资源量的评价参数。具体以每张网每小时渔获物的重量表示, 计算公式如下:

$$CPUE = \frac{\text{总渔获量}(C)}{\text{渔网数量}(n) \times \text{捕捞小时数}(h)}$$

1.4.2 优势种分析 采用相对重要性指数(IRI)对采集到的鱼类群落优势种进行分析, 计算公式如下:

$$IRI = (N + W)F$$

式中, N 为某种类的个体数占总渔获个体数的百分比; W 为某种类重量占总渔获重量的百分比; F 为有某种类出现的样点数占总调查样点数的比例。设定 $IRI \geq 1000$ 的物种为优势种; $100 \leq IRI < 1000$ 的物种为重要种; $10 \leq IRI < 100$ 的物种为常见种; $IRI < 10$ 的物种为偶见种。

1.4.3 鱼类多样性 鱼类多样性采用香农-威纳(Shannon-Wiener)指数(H')、Pielou 均匀度指数(J)和 Margalef 丰富度指数(D)来评价。

2 结果与分析

2.1 种类组成

共调查到鱼类 13 种, 分属于 2 目 5 科(亚科) 9 属(表 1), 其中土著鱼类 9 种, 占鱼类种类总数的 69.2%。有历史记录的 9 种鱼类均采集到样本。区域特有鱼类 5 种, 分别为澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)、前腹裸裂尻鱼(*Schizopygopsis anteroventris*)、细尾鲃(*Pareuchiloglanis gracilicaudata*)、无斑褶鲃(*Pseudecheneis immaculatus*)、德钦纹胸鲃(*Glyptothorax deqinensis*)。新记录鱼类 4 种, 均为外来鱼类, 包括鲫(*Carassius auratus*)、鲃(*Silurus asotus*)、异齿裂腹鱼(*Schizothorax oconnori*)和拉萨裂腹鱼(*Schizothorax waltoni*)。列入《国家重点保护野生动物名录》的有拉萨裂腹鱼。

列入《中国物种红色名录》的鱼类有 4 种, 其中濒危物种有澜沧裂腹鱼和细尾鲃, 易危物种有光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiat*)和裸腹叶须鱼(*Ptychobarbus kaznakovi*)。被《中国生物多样性红色名录》评为濒危等级的鱼类有 3 种, 分别是澜沧裂腹鱼、德钦纹胸鲃、细尾鲃; 评为易危等级的鱼类也有 3 种, 分别是拉萨裂腹鱼、裸腹叶须鱼、无斑褶鲃。

2.2 鱼类分布特征

从分布范围上看, 澜沧裂腹鱼和光唇裂腹鱼分布最为广泛, 在所有调查样点均出现; 高原鳅类主要出现在支流; 德钦纹胸鲃、无斑褶鲃主要分布在海拔较低的如美和曲孜卡; 外来鱼类全部采集自卡若(表 2)。从各样点来看, 卡若有 10

表 1 澜沧江西藏段鱼类种类组成名录
Tab. 1 Species composition of fishes in the Tibet reach of the Lancang River

目 order	科(/亚科) family (/subfamily)	属 genus	种名 species
鲤形目 Cypriniformes	裂腹鱼亚科 Schizothoracae	裂腹鱼属 <i>Schizothorax</i>	1. 澜沧裂腹鱼▲ <i>Schizothorax lantsangensis</i>
			2. 光唇裂腹鱼▲ <i>Schizothorax lissolabiat</i>
	鲃科 Sisoridae		3. 异齿裂腹鱼★ <i>Schizothorax oconnori</i>
			4. 拉萨裂腹鱼★ <i>Schizothorax waltoni</i>
		叶须鱼属 <i>Ptychobarbus</i>	5. 裸腹叶须鱼▲ <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>
		裸裂尻鱼属 <i>Schizopygopsis</i>	6. 前腹裸裂尻鱼▲ <i>Schizopygopsis anteroventris</i>
		鲃属 <i>Pareuchiloglanis</i>	7. 细尾鲃▲ <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>
		褶鲃属 <i>Pseudecheneis</i>	8. 无斑褶鲃▲ <i>Pseudecheneis immaculatus</i>
		纹胸鲃属 <i>Glyptothorax</i>	9. 德钦纹胸鲃▲ <i>Glyptothorax deqinensis</i>
		条鳅亚科 Nemacheilinae	10. 细尾高原鳅▲ <i>Triplophysa stenura</i>
		高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	11. 短尾高原鳅▲ <i>Triplophysa brevicauda</i>
鲃形目 Siluriformes	鲤亚科 Cyprininae	鲫属 <i>Carassius</i>	12. 鲫★ <i>Carassius auratus</i>
	鲃科 Siluridae	鲃属 <i>Silurus</i>	13. 鲃★ <i>Silurus asotus</i>

注: ★为外来鱼类, ▲为历史记录鱼类。
Note: ★ indicates exotic fishes, ▲ indicates historical fishes.

表 2 澜沧江西藏段鱼类的空间分布
Tab. 2 Spatial distribution of fishes in the Tibet reach of the Lancang River

种名 species	曲孜卡 Quzika	如美 Rumei	卡若 Karuo	扎曲 Zaqu	热曲 Requ	金河 Jinhe
澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	+	+	+	+	+	+
光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	+	+	+	+	+	+
异齿裂腹鱼 <i>Schizothorax oconnori</i>			+			
拉萨裂腹鱼 <i>Schizothorax waltoni</i>			+			
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>			+	+	+	+
前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>			+	+	+	+
细尾鲃 <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>		+	+	+		
无斑褶鲃 <i>Pseudecheneis immaculatus</i>	+	+				
德钦纹胸鲃 <i>Glyptothorax deqinensis</i>	+					
细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>			+		+	+
短尾高原鳅 <i>Triplophysa brevicauda</i>					+	+
鲫 <i>Carassius auratus</i>			+			
鲃 <i>Silurus asotus</i>			+			

种鱼类分布, 热曲、金河均有 6 种鱼类分布, 扎曲有 5 种鱼类分布, 曲孜卡、如美均有 4 种鱼类分布。

2.3 鱼类生态类型

从摄食类型划分, 除鲇为肉食性以外, 其他鱼类几乎都是杂食性。

从栖息环境看, 可将调查到的鱼类分为 3 类:

(1) 底栖缓流型鱼类: 体型多侧扁或细长, 包括裂腹鱼属、叶须鱼属、裸裂尻鱼属和高原鳅属的鱼类。

(2) 底栖急流型鱼类: 体型多侧扁或头胸部扁平且有吸着器, 包括鮡属、褶鮡属和纹胸鮡属的鱼类。

(3) 底栖静水型鱼类: 一般栖息于静水水域, 持续游泳能力较弱。包括鲫、鲇等。

2.4 资源现状

2.4.1 渔获物组成 2017—2019 年共采集到鱼类 670 尾, 78.8 kg, 其中优势种类有光唇裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼和前腹裸裂尻鱼(表 3)。

表 3 澜沧江西藏段渔获物组成情况(2017—2019 年)
Tab. 3 Fish catches in the Tibet reach of the Lancang River (2017–2019)

种类 species	尾数 number	重量/g weight	百分比/% percentage	相对重要性指数 IRI	群落地位 community status
光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	210	31090.05	39.46	7080	I
澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	153	20429.11	25.93	4876	I
裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	126	17909.33	22.73	2374	I
前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	91	7028.2	8.92	1286	I
鲫 <i>Carassius auratus</i>	2	551.94	0.70	14	III
异齿裂腹鱼 <i>Schizothorax oconnori</i>	1	418.4	0.53	10	III
拉萨裂腹鱼 <i>Schizothorax waltoni</i>	1	417.8	0.53	10	III
细尾鮡 <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>	10	394.59	0.50	85	III
细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>	52	214.13	0.27	344	II
德钦纹胸鮡 <i>Glyptothorax deqinensis</i>	7	132.59	0.17	17	III
鲇 <i>Silurus asotus</i>	1	92.25	0.12	4	IV
无斑褶鮡 <i>Pseudecheneis immaculatus</i>	8	86.29	0.11	37	III
短尾高原鳅 <i>Triplophysa brevicauda</i>	8	24.16	0.03	35	III
合计 total	670	78789	100		

注: I 表示优势种; II 表示重要种; III 表示常见种; IV 表示偶见种。
Note: I indicates dominant species; II indicates important species; III indicates common species; IV indicates occasional species.

从空间上看, 干流的卡若、如美, 以及支流热曲的渔获量较高, 而干流曲孜卡、扎曲和支流金河的渔获量较低(表 4)。曲孜卡、如美、卡若和扎曲的主要渔获种类为澜沧裂腹鱼和光唇裂腹鱼, 金河的主要渔获种类是细尾高原鳅、裸腹叶须鱼和前腹裸裂尻鱼, 热曲的主要渔获种类为裸腹叶须鱼(表 4)。

2.4.2 单位努力捕捞量 澜沧江西藏段的平均单位努力捕捞量(CPUE)为 28.4 g/网时。从时间上看, 2017 年 4 月至 2019 年 9 月, CPUE 呈先下降后上升的趋势, 其中 2019 年 4 月的 CPUE 最高, 为 47.1 g/网时; 2018 年 7 月的 CPUE 最低, 为 13.7 g/网时(图 2)。从空间上看, 金河的 CPUE 最高, 为 68.9 g/

网时; 扎曲的 CPUE 最低, 为 12.0 g/网时(图 3)。

2.4.3 优势鱼类个体大小分布 根据相对重要性指数确定的澜沧江西藏段优势鱼类有 4 种, 包括光唇裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼和前腹裸裂尻鱼, 对它们的个体大小分布进行了分析。

光唇裂腹鱼的体长范围 10.7~36.7 cm, 其中优势体长分布区间为 16~22 cm, 占比 44.76%; 澜沧裂腹鱼的体长范围 9.4~38.0 cm, 其中优势体长分布区间为 12~24 cm, 占比 72.55%; 裸腹叶须鱼的体长范围 9.8~46.7 cm, 其中优势体长分布区间为 10~20 cm, 占比 65.87%。前腹裸裂尻鱼的体长范围 3.3~30.3 cm, 其中优势体长分布区间为 14~20 cm, 占比 51.65% (图 4)。

表 4 澜沧江西藏段不同样点的渔获物情况
Tab. 4 Fish catches of different sampling sites in the Tibet reach of the Lancang River

采样点 site	种类 species	数量 number	重量/g weight	占比/% percentage
曲孜卡 Quzika	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	16	2045.35	50.54
	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	17	1821.99	45.02
	德钦纹胸鲃 <i>Glyptothorax deqinensis</i>	7	132.59	3.28
	无斑褶鲃 <i>Pseudecheneis immaculatus</i>	5	47.13	1.16
	合计 total	45	4047.06	
如美 Rumei	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	125	13730.87	77.15
	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	39	3972.05	22.32
	细尾鲃 <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>	1	54.81	0.31
	无斑褶鲃 <i>Pseudecheneis immaculatus</i>	3	39.16	0.22
	合计 total	168	17796.89	
金河 Jinhe	裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	27	859.36	34.73
	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	7	565.43	22.85
	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	4	502.39	20.30
	前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	26	398.85	16.12
	细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>	46	145.14	5.87
	短尾高原鳅 <i>Triplophysa brevicauda</i>	1	3.27	0.13
	合计 total	111	2474.44	
卡若 Karuo	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	81	12737.86	44.64
	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	52	11333.37	39.71
	前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	7	1726.76	6.05
	裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	4	1057.29	3.70
	鲫 <i>Carassius auratus</i>	2	551.94	1.93
	异齿裂腹鱼 <i>Schizothorax oconnori</i>	1	418.4	1.47
	拉萨裂腹鱼 <i>Schizothorax waltoni</i>	1	417.8	1.46
	细尾鲃 <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>	4	139.05	0.49
	鲇 <i>Silurus asotus</i>	1	92.25	0.32
	细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>	5	62.87	0.22
	合计 total	158	28537.59	
扎曲 Zaqu	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	8	2081.68	62.90
	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	6	626.3	18.92
	裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	2	209.96	6.34
	细尾鲃 <i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>	5	200.73	6.07
	前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	1	190.86	5.77
	合计 total	22	3309.53	
热曲 Requ	裸腹叶须鱼 <i>Ptychobarbus kaznakovi</i>	93	15782.72	69.76
	前腹裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis anteroventris</i>	57	4711.73	20.83
	光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiat</i>	4	1619.75	7.16
	澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i>	4	482.63	2.13
	短尾高原鳅 <i>Triplophysa brevicauda</i>	7	20.89	0.09
	细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>	1	6.12	0.03
	合计 total	166	22623.84	

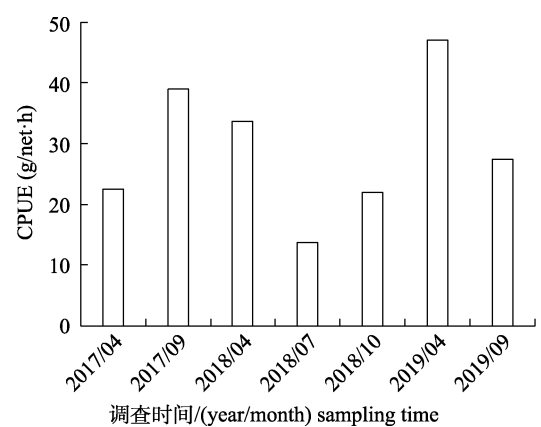


图 2 澜沧江西藏段鱼类单位努力捕捞量 (CPUE)的时间分布

Fig. 2 Temporal distribution of CPUE of fishes in the Tibet reach of the Lancang River

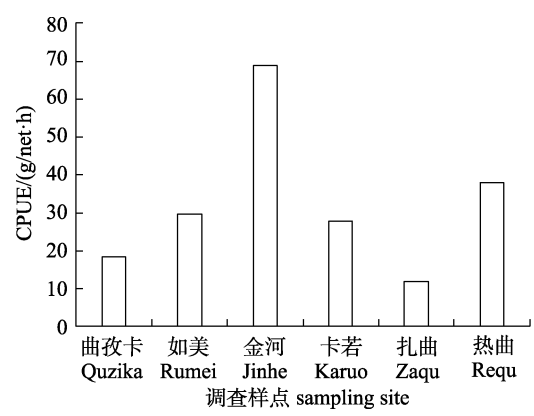


图 3 澜沧江西藏段鱼类单位努力捕捞量 (CPUE)的空间分布

Fig. 3 Spatial distribution of CPUE of fishes in the Tibet reach of the Lancang River

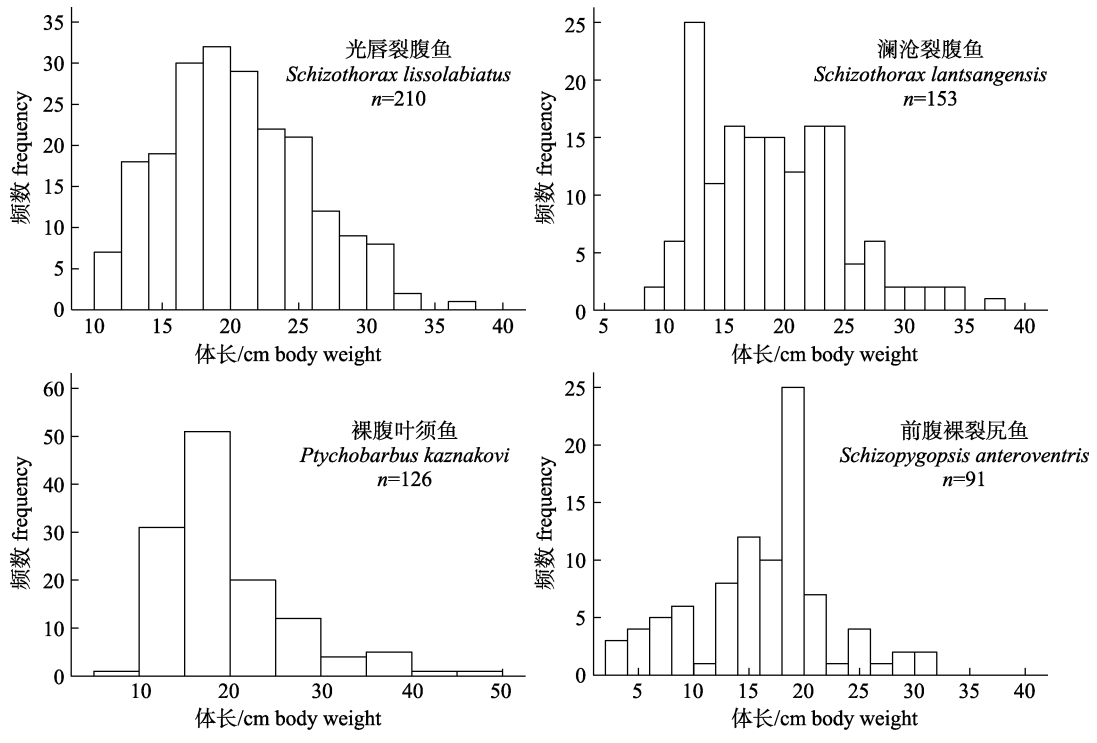


图 4 澜沧江西藏段主要优势鱼类的体长频数分布

Fig. 4 Frequency of body length of the dominant fish species in the Tibet reach of the Lancang River

光唇裂腹鱼的体重范围 15.80~684.4 g, 其中优势体重分布区间为 0~150 g, 占比 65.71%; 澜沧裂腹鱼的体重范围 12.07~907.84 g, 其中优势体重分布区间为 0~200 g, 占比 81.05%; 裸腹叶须鱼的体重范围 13.64~1433 g, 其中优势体重分布区间为 0~100 g, 占比 66.67%。前腹裸裂尻鱼的体重范围 0.50~359.89 g, 其中优势体重分布区间为 0~100 g, 占比 81.32% (图 5)。

2.5 多样性分析

从总体上看, 澜沧江西藏段鱼类的多样性偏低, Shannon-Wiener 指数(H')变化范围为 0.570~1.249, 其中卡若、扎曲和金河的多样性相对较高; Pielou 均匀度指数(J)变化范围为 0.585~0.901, 其中扎曲、金河的均匀度指数相对较高; Margalef 丰富度指数(D)的变化范围为 0.504~1.423, 其中卡若、扎曲和金河的丰富度相对较高(表 5)。

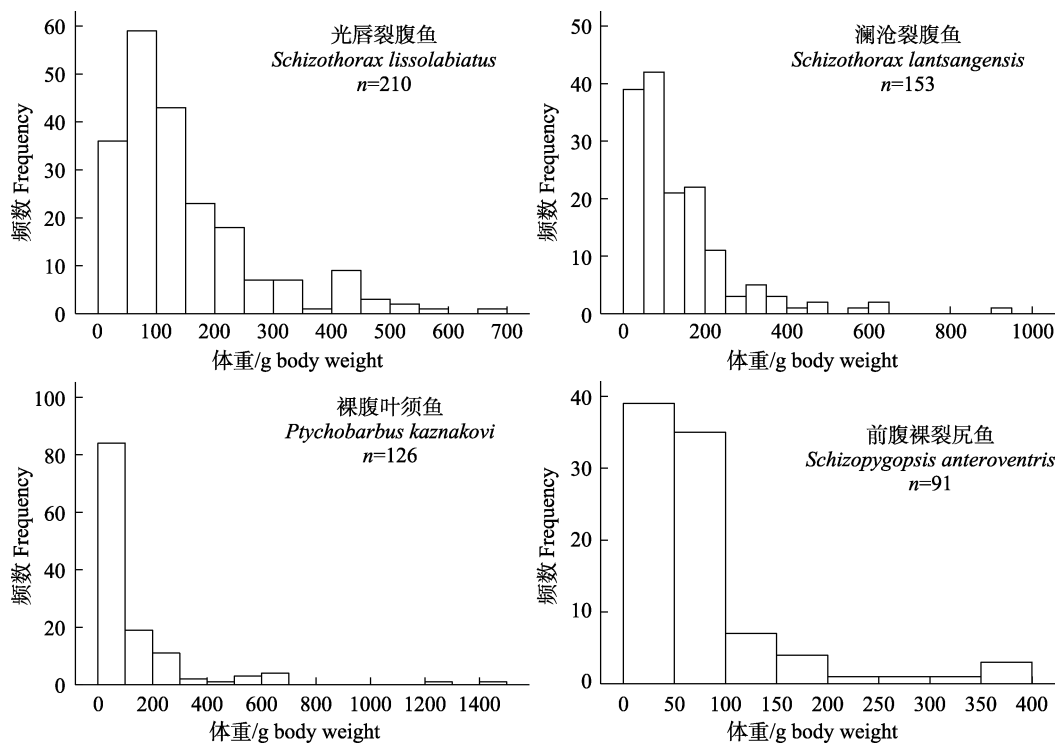


图 5 澜沧江西藏段主要优势鱼类的体重频数分布
Fig. 5 Frequency of body weight of the dominant fish species in the Tibet reach of the Lancang River

表 5 澜沧江西藏段鱼类群落的多样性指数
Tab. 5 Biodiversity indices of fish community in the Tibet reach of the Lancang River

样点 site	多样性指数 biodiversity index		
	H'	J	D
曲孜卡 Quzika	0.665±0.350	0.772±0.211	0.647±0.144
如美 Rumei	0.570±0.290	0.585±0.204	0.504±0.154
卡若 Karuo	1.158±0.263	0.782±0.134	1.173±0.371
扎曲 Zaqu	1.249±0.004	0.901±0.029	1.423±0.169
金河 Jinhe	1.157±0.260	0.814±0.045	1.060±0.370
热曲 Requ	0.760±0.349	0.763±0.255	0.612±0.328

注: H' 表示 Shannon-Wiener 指数; J 表示 Pielou 均匀度指数; D 表示 Margalef 丰富度指数。
Note: H' indicates Shannon-Wiener index; J indicates Pielou evenness index; D indicates Margalef richness index.

3 讨论

3.1 澜沧江西藏段鱼类群落结构及多样性特征

本研究表明, 澜沧江西藏段的鱼类群落结构总体符合青藏高原鱼类区系的典型结构特征, 即主要由裂腹鱼类、鲃类和高原鳅类三大类群组成。有关澜沧江西藏段鱼类的报道较少, 且大部分仅介绍了物种的分布情况。李斌等^[13]首次报道了无

斑褶鲃在澜沧江曲孜卡段有分布。刘绍平等^[12]在澜沧江如美段、扎曲、麦曲和金河共采集到鱼类 9 种, 均为土著鱼类, 包括光唇裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼、前腹裸裂尻鱼、细尾鲃、德钦纹胸鲃、无斑褶鲃、细尾高原鳅和短尾高原鳅。本研究采集到了前述 9 种有历史报道的土著鱼类。另外, 本研究还报道了 4 种外来鱼类在澜沧江西藏段的首次记录。目前未见有澜沧江鱼类资源量的历史报道。就本研究结果而言, 澜沧江西藏段的土著鱼类在渔获物中占据绝对优势, 而外来鱼类多为偶然采集。这一结果表明澜沧江西藏段的土著鱼类资源总体上是比较稳定的, 外来鱼类入侵还处于早期阶段。从生态类型来看, 澜沧江西藏段的鱼类大多为杂食性, 且都是底栖型鱼类。这可能是适应高原水域饵料生物资源匮乏, 以及急流性环境的结果。从鱼类的空间分布上看, 澜沧江西藏段下游如美、曲孜卡分布的鱼类种类数明显低于上游干支流。这可能是因为如美、曲孜卡为峡谷急流, 过快的流速使得鱼类栖息的难度相对更大。从优势鱼类的个体大小分布来看, 光唇裂腹鱼、澜沧江裂腹鱼、裸腹叶须鱼和前腹

裸裂尻鱼的个体均偏小,说明种群出现了一定程度的衰退,但原因还有待于进一步调查和探讨。

澜沧江西藏段鱼类群落结构具有简单但基本稳定的特点。澜沧江西藏段鱼类的 Shannon-Wiener 指数(H')变化范围为 0.570~1.249, 低于 Magurran^[14]提出的多样性指数的一般范围(1.5~3.5)。物种丰富度指数和均匀度指数反映了水域中鱼类种类数与物种分布的情况,指数越低表明群落结构复杂度和稳定性越低^[15]。据此判断,澜沧江西藏段鱼类群落结构的复杂度较低,但稳定性处于正常水平。但这种稳定状态是十分脆弱的。因为这些高原鱼类大都具有生长缓慢、性成熟晚等特性,种群一旦受到外界过度干扰,将很难恢复^[9]。

3.2 澜沧江西藏段鱼类面临的主要威胁

(1) 工程建设等活动导致栖息地被破坏。由于澜沧江河谷是当地人口的主要生活和生产区,因此沿江公路、桥梁、采砂等工程建设活动较为密集。同时,澜沧江干支流都规划有梯级电站,部分已经建成发电。例如,澜沧江干流扎曲果多段建有果多水电站,支流金河建有金河水电站、瓦托水电站等水利工程。各类工程建设将导致澜沧江河道水文形势、地形等发生变化,河道采砂会改变河床形态、底质结构和水体流态等物理环境。这些环境变化也将直接改变鱼类及其饵料生物的生活环境,严重的可能会造成鱼类栖息场所功能的减弱甚至丧失。同时,水电大坝会对具有短距离洄游习性的光唇裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼、前腹裸裂尻鱼等鱼类的正常洄游活动造成影响。

(2) 外来鱼类入侵挤占土著鱼类生存空间。由于对水产品需求的激增,加上活鱼运输技术的发展,越来越多的外来鱼类得以进入到西藏。但藏区群众有放生习俗,容易误将市场采购的外来鱼类放生到野外水体中,从而造成外来鱼类的入侵^[16]。高原土著鱼类种群普遍脆弱,在面对外来鱼类入侵时往往处于劣势。本研究共发现了鲫、鲇、异齿裂腹鱼和拉萨裂腹鱼 4 种外来鱼类,均是首次记录。由于鲫和鲇分别只采集到 2 尾和 1 尾样本,尚无法确定它们是否可以在调查区域内繁殖。但这两种鱼类都是入侵性极强的鱼类,应引起重

视。鲫的耐受力强,繁殖要求低,有可能在当地建立种群。鲇是肉食性鱼类,而澜沧江西藏段没有肉食性鱼类的自然分布,鲇的出现很有可能会占据食物链顶端,直接对土著鱼类产生巨大的威胁。异齿裂腹鱼和拉萨裂腹鱼仅自然分布于雅鲁藏布中游^[9],非专业人士易将它们当成是澜沧江西藏段土著裂腹鱼类而放生。由于分类地位和生态习性接近,异齿裂腹鱼和拉萨裂腹鱼可能与澜沧江西藏段的土著裂腹鱼类产生生态位竞争,同时也更有可能发生种间杂交,对澜沧江西藏段裂腹鱼类的遗传多样性造成干扰。

(3) 环境污染倾泻和排放威胁鱼类健康。现场调查发现,部分江段存在垃圾直接倾泻入江,以及污水直排入江的现象。沿江两岸消落区内的植被上普遍挂有塑料袋、布料等各类垃圾,河漫滩则经常可见塑料瓶、玻璃瓶等废弃物。部分生活垃圾如塑料袋可能会被鱼类误食,而污水的排放则可能会造成鱼类体内有毒有害物质含量超标,进而危害鱼类正常的生长发育和健康。

3.3 澜沧江西藏段鱼类资源保护建议

针对澜沧江西藏段鱼类资源现状及主要威胁因素,建议采取以下保护措施:

(1) 加强鱼类重要栖息地保护。澜沧江西藏段鱼类的栖息地整体分布较为分散,但不同江段鱼类栖息地的栖息种类和数量有差异。根据本研究调查到的数据,澜沧江西藏段干流栖息的鱼类主要是裂腹鱼类和鲃类,支流栖息的鱼类主要是裂腹鱼类和高原鳅类。基于鱼类资源状况、典型性、保护可行性等因素考虑,建议重点保护干流卡若至麦曲汇口段、卡贡至如美段,以及支流热曲妥坝至干流汇口段的鱼类栖息地。其中,干流卡若至麦曲汇口段是本研究中鱼类资源量和种类最为丰富的江段,卡贡至如美段是人类活动最少的江段,适宜作为裂腹鱼类和鲃类的重要栖息地进行强化保护。支流热曲妥坝至干流汇口段是裸腹叶须鱼的主要栖息地,很有必要重点保护。条件成熟时,甚至可以考虑在这些江段建立鱼类保护区。

(2) 开展土著鱼类人工驯养繁育与增殖放流。当前澜沧江西藏段主要优势鱼类的种群都显示出衰退迹象,有必要开展人工驯养繁育与增殖放流,

以恢复自然种群。目前光唇裂腹鱼^[17-18]、澜沧裂腹鱼^[19-20]等鱼类的人工繁育技术已经取得初步突破,而其他大部分土著鱼类的人工繁育技术还是空白。建议将光唇裂腹鱼、澜沧裂腹鱼、裸腹叶须鱼和前腹裸裂尻鱼列为近期重点保护对象,扩大人工驯养繁育规模,尽早开展增殖放流活动。

(3) 规范放流放生活动,降低外来鱼类入侵风险。建议设立放生活动报批制度,对放生的鱼类种类、数量、重量、来源、放生日期、放生地点等信息进行登记管理,由村-乡-县区-市逐级上报备案,严格禁止放生外来鱼类;加强科学放生宣传活动,建议通过与宗教活动相结合,宣传科学放生理念。

(4) 构建长期性的水生生态监测体系。开展长期性水生生态环境监测,是掌握渔业资源与环境现状及变化趋势的主要方式。监测结果可以为管理部门科学制定澜沧江西藏段鱼类资源保护措施及评价相关措施效果提供依据,从而使保护工作更为有效。建议在澜沧江干流和主要支流设立监测站位,依季节进行水环境、鱼类饵料生物资源、鱼类种类组成、鱼类资源和鱼类栖息地分布与规模等方面的监测。

参考文献:

- [1] Chen Y Y. Fauna Sinica, Osteichthyes: Siluriformes Cypriniformes II [M]. Beijing: Science Press, 1998. [陈宜瑜. 中国动物志□硬骨鱼纲□鲤形目(中卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.]
- [2] Yue P Q. Fauna Sinica, Osteichthyes: Siluriformes Cypriniformes III [M]. Beijing: Science Press, 2000. [乐佩琦. 中国动物志□硬骨鱼纲□鲤形目(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2000.]
- [3] Chu X L, Zheng B S, Dai D Y, et al. Fauna Sinica, Osteichthyes: Siluriformes [M]. Beijing: Science Press, 1999. [褚新洛, 郑葆珊, 戴定远, 等. 中国动物志□硬骨鱼纲□鲇形目 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.]
- [4] Wu X W. Cyprinidae Fishes of China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1982. [伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.]
- [5] Chu X L, Chen Y R. The Fishes of Yunnan, China: Part I [M]. Beijing: Science Press, 1989. [褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1989.]
- [6] Chu X L, Chen Y R. The Fishes of Yunnan, China: Part II [M]. Beijing: Science Press, 1990. [褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1990.]
- [7] Zhu S Q. The Loaches of the Subfamily Nemacheilinae in China [M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 1989. [朱松泉. 中国条鳅志[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989.]
- [8] Wu Y F, Wu C Z. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1991. [武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991.]
- [9] Bureau of Aquatic Products, Xizang Autonomous Region. Fishes and Fish Resources in Xizang, China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995. [西藏自治区水产局. 西藏鱼类及其资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.]
- [10] Chen Y Y. The Fishes of the Hengduan Mountains Region [M]. Beijing: Science Press, 1998. [陈宜瑜. 横断山区鱼类[M]. 北京: 科学出版社, 1998.]
- [11] Gao L C, Zhuang D D, Guo Q Z, et al. Fishery Resources of Lakes in Yunnan Plateau [M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 1990. [高礼存, 庄大栋, 郭起治, 等. 云南湖泊鱼类资源[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1990.]
- [12] Liu S P, Liu M D, Zhang Y G, et al. Investigation and Protection of Aquatic Biological Species Resources in the Lancang River [M]. Beijing: Science Press, 2016. [刘绍平, 刘明典, 张耀光, 等. 澜沧江水生生物物种资源调查与保护 [M]. 北京: 科学出版社, 2016.]
- [13] Li B, Yue X J, Wang Z J. A new record of Sisoridae in Tibet: *Pseudecheneis immaculatus* Chu [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2010, 27(2): 18-19, 99. [李斌, 岳兴建, 王志坚. 西藏鲃科鱼类一新纪录种——无斑褶鲃[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2010, 27(2): 18-19, 99.][知网]
- [14] Magurran A E. Why diversity? [M]//Ecological Diversity and Its Measurement. Dordrecht: Springer, 1988: 1-5.
- [15] Wang Y P, Kuang Z, Lin D Q, et al. Community structure and species diversity of fish around the Xinzhou shoal in the Anqing section of the Yangtze River, China [J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(7): 2417-2426. [王银平, 匡箴, 蔺丹清, 等. 长江安庆新洲水域鱼类群落结构及多样性[J]. 生态学报, 2020, 40(7): 2417-2426.]
- [16] Li B H, Zhu T B, Li L. Alien Fishes in Tibet, China [M]. Lhasa: The Tibet People's Publishing House, 2017. [李宝海, 朱挺兵, 李雷. 西藏的外来鱼类[M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2017.]
- [17] Liu Y T, Wu J D, Li G H, et al. A study on artificial domestication of *Schizothorax lissolabius* [J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(5): 123-126. [刘跃天, 吴敬东, 李光华, 等. 光唇裂腹鱼人工驯养研究[J]. 水生生态学杂志,

- 2012, 33(5): 123-126.]
- [18] Shen A H, Li G H, Zhao S H, et al. Study on embryonic and early larval development of *Schizothorax lissolabiatatus*[J]. Journal of Hydroecology, 2013, 34(6): 76-80. [申安华, 李光华, 赵树海, 等. 光唇裂腹鱼胚胎发育与仔鱼早期发育的研究[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(6): 76-80.]
- [19] Shen A H, Li G H, Wang H L, et al. A study on artificial domestication of *Schizothorax lantsangensis*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015(2): 272, 278. [申安华, 李光华, 王海龙, 等. 澜沧裂腹鱼人工驯养研究[J]. 现代农业科技, 2015(2): 272, 278.]
- [20] Ma Q, Xu C X. Successful artificial breeding of once endangered *Schizothorax lantsangensis*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, 44(6): 341. [马骞, 徐承旭. 一度濒危的澜沧裂腹鱼人工繁殖成功[J]. 水产科技情报, 2017, 44(6): 341.]

Community structure and species diversity of fishes in the Tibet reach of the Lancang River, China

ZHU Tingbing, HU Feifei, GONG Jinling, WANG Xuge, CHEN Kang, DU Hongchun, YANG Deguo, WU Xingbing

Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Since decades, there have been no reports on the fish resource of the Tibet reach of the Lancang River, China. To gain a contemporary understanding of the corresponding fish communities, field surveys on fish resources were conducted in the main stream and major tributaries of the Tibet reach of the Lancang River in April and September 2017, April, July, and October 2018, and April and September 2019. Fish samples were caught using drifting gillnets (mesh size: 2.5 cm and 7.0 cm). A total of 13 fish species from 2 orders and 5 families (subfamilies) were collected with 9 indigenous fish species and 4 exotic fish species. Omnivorous and carnivorous fishes accounted for 92.3% and 7.7% of total fish, respectively. Benthic and slow-flowing fishes accounted for 61.5% of the fish species. *Schizothorax lissolabiatatus*, *S. lantsangensis*, *Ptychobarbus kaznakovi*, and *Schizogopsis anteroventris* were the dominant species. The Shannon-Wiener index, Pielou evenness index, and Margalef richness index of the fish community were 0.570–1.249, 0.585–0.901, and 0.504–1.423, respectively. In general, the fish community structure of the Tibet reach of the Lancang River was simple and stable. All historically recorded indigenous fishes were sampled, while all exotic fishes were recorded for the first time. To protect the indigenous fish resources in the Tibet reach of the Lancang River, it is suggested to strengthen the habitat protection, artificial domestication, and breeding of indigenous fishes, as well as to focus on the control of exotic fish populations and prevent invasion.

Key words: Lancang River; Tibet; fish resource; community structure; diversity

Corresponding author: YANG Deguo. E-mail: yangdg@yfi.ac.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0184

长江安庆段草鱼仔稚鱼资源时空动态特征与水文因子的相关性

彭云鑫¹, 方弟安^{1,2}, 徐东坡^{1,2}, 丁隆强², 黎加胜³, 任鹏², 何晓辉¹, 罗宇婷³

1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部长江下游渔业资源环境科学观测实验站, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 为探究长江下游安庆段草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)仔稚鱼资源时空特征与水文因子之间的响应关系, 本研究于 2018—2020 年每年的 4—8 月在长江安庆段对草鱼仔稚鱼进行连续监测, 结合形态学与分子生物学方法共计鉴定出 272 尾草鱼仔稚鱼, 连续 3 年捕获量占四大家鱼捕获量的比例分别为 12.30%、17.86%与 4.37%; 通过仔稚鱼资源量估算, 2018—2020 年通过安庆段的仔稚鱼径流量分别为 3.95×10^8 、 5.79×10^8 、 3.29×10^8 尾。时空特征分析结果显示, 2018—2020 年安庆段草鱼仔稚鱼集中出现在 5—7 月, 高峰期发生在 5 月和 7 月中上旬, 其中 2020 年因洪水暴发不利于繁殖, 仔稚鱼丰度最低, 其主汛期也存在推迟的现象; Kruskal-Wallis 检验表明左、右岸草鱼仔稚鱼丰度显著高于江心($P < 0.05$, $n=70$), 2018—2020 年整体平均丰度呈现出左岸($8.99 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$)>右岸($5.34 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$)>江心($3.53 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$)的空间分布规律。通过 Pearson 相关性分析表明, 草鱼仔稚鱼丰度与水温、水位日上涨率、径流量日上涨率呈显著正相关($P < 0.05$), 与透明度呈极显著负相关的关系($P < 0.01$); GAM 模型分析结果显示, 水文因子相对重要性由高到低依次为水温、透明度、水位日上涨率、径流量日上涨率。本研究中 GAM 模型总偏差解释率达到 90.8%, 较为准确地揭示了草鱼仔稚鱼丰度与水文因子之间的响应关系, 为揭示长江草鱼早期资源的发生机制积累了基础数据。

关键词: 长江安庆段; 草鱼仔稚鱼; 时空动态; 水文因子

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0314-11

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)并称四大家鱼^[1], 长江干流为其重要的产卵场和洄游通道。从 20 世纪 70 年代初起, 由于大量捕捞与长江生境改变, 长江草鱼资源正逐渐衰减^[2]; 80 年代的长江草鱼早期资源量仅占 60 年代的 25%^[3]。葛洲坝等重大水利工程对长江干流中草鱼产卵场的影响明显, 坝上水域的长期蓄水导致草鱼产卵场减少, 坝下水域的水文情势受到严重影响^[4-5]。众所周知, 长江中上游是草鱼重要的繁殖与育幼场所, 熊飞等^[6]对长江上游的调查结果显示, 草鱼种群生长性能

呈现下降趋势。刘绍平等^[7]在 2003—2006 年在长江中游宜昌至城陵矶监测到的四大家鱼资源总量仅为 1997—2002 年平均值的 42.8%。有学者研究表明, 长江中游至安庆段随距离的增加四大家鱼仔稚鱼丰度有所增长^[8]。任鹏^[9]于 2012—2013 年的研究也表明长江下游与鄱阳湖等大型湖泊及众多支流相连构成复杂的江湖复合系统, 使下游水环境条件趋于原生生态环境, 因此长江草鱼资源量有向安庆段增加的趋势。

长江安庆段分布有许多重要鱼类保护区, 并与七里湖这一通江湖泊相连, 具有类似湖口江段与鄱阳湖的生境特征, 适合鱼类的索饵和育幼。仔

收稿日期: 2021-04-23; 修订日期: 2021-06-12.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900903); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD61).

作者简介: 彭云鑫(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类早期资源. E-mail: 2370057783@qq.com

通信作者: 方弟安, 研究员, 主要从事渔业资源方向研究, E-mail: fangdian@ffrc.cn; 徐东坡, 研究员, 主要从事渔业资源方向研究, E-mail: xudp@ffrc.cn

稚鱼的时空动态能够反映鱼类群落特征,开展相关研究也是揭示鱼类群聚特征的重要手段之一^[10]。丁隆强等^[11]在2016—2018年对安庆段四大家鱼仔稚鱼资源调查时发现,四大家鱼仔稚鱼丰度明显高于长江中游黄石江段,但是草鱼仔稚鱼资源呈现逐年下降的趋势。为探究长江下游安庆段草鱼仔稚鱼资源时空特征与水文因子之间的响应关系,进一步揭示长江草鱼早期资源衰退和发生机制,本研究以长江下游安庆段的草鱼仔稚鱼(初孵仔鱼至鳞片形成期^[10])为研究对象,估算2018—2020年安庆段草鱼仔稚鱼资源量现状,着重分析草鱼仔稚鱼丰度的时间动态与空间分布格局,并应用GAM模型解析仔稚鱼丰度与关键水文因子之间的相关性,为揭示长江草鱼早期资源的发生机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样时间与地点

本研究于2018—2019年的4月下旬至8月上旬、2020年的5月上旬至8月上旬对长江下游安庆段(117°0'18"E, 30°29'28"N)进行持续327 d的早期资源调查;该江段的断面设置(图1)参考曹文宣等^[10]的采样方法并结合现场勘查进行选择,设置的断面包括左岸、右岸与江心3个采样点(左右两岸采样点距岸边5~10 m),每日样品的采集时间为早上5:00~7:00 am,对上层水体(≤ 1 m)进行样品采集。

1.2 调查方法与样品的保存及鉴定

1.2.1 样品采集 本研究在采样过程中所使用的网具为直径0.8 m,网深2.5 m,网目40目,孔径0.25 mm的锥形浮游生物网(拖网),在拖网口处设置流量计(Digital Flow Meter 23090; KC Denmark A/S, Silkeborg, Denmark)记录流量转数,以此计算单位时间内通过拖网的水流量,并利用旋桨式流速仪测定水流速度,萨氏透明度盘测量透明度,同时采用水质分析仪(Thermo Orion Star A329; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA)测定采样水域的温度、浊度、pH等,水位和江水径流量的数据于安徽省水利信息网上的大通水文站与安庆水文站获取;样品采集过程中,将网具

固定于渔船边的水体表面进行拖曳,渔船行驶方向与水流方向相反,为避免拖曳过程中网口浮出水面,且减少渔船行驶的波浪对采集产生的影响,使船速控制在2.5节左右,每次下网拽拖持续5 min。

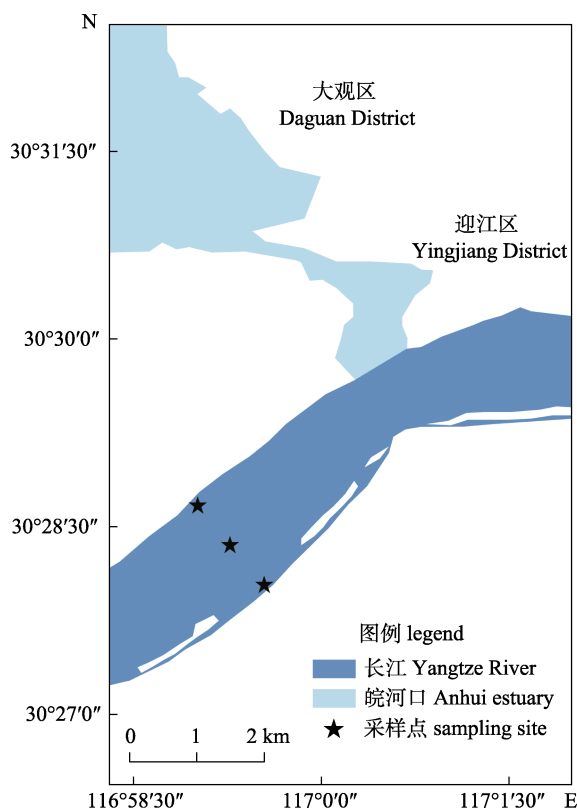


图1 长江安庆段采样图

Fig. 1 Sampling site distribution in Anqing section of the Yangtze River

1.2.2 样品鉴定与保存 现场采集的仔稚鱼样品放入装有冰块的广口瓶保存,并置于0~4℃恒温箱隔热,在2 h内用镊子将仔稚鱼挑出,随后对仔稚鱼进行鉴定计数,再使用75%乙醇保存。对于仔稚鱼的种类鉴定,通常对照曹文宣等^[10]的《长江鱼类早期资源》,使用形态学方法在Olympus SZX 16解剖镜下进行分类鉴定。不能通过形态特征准确判断种类或因鱼体残缺无法辨识的仔稚鱼,则采用分子手段进行鉴定,方法是提取仔稚鱼样本的基因组DNA,基于CO I (cytochrome C oxidase subunit I, 线粒体细胞色素C氧化酶亚基I)基因条形码,用PCR扩增目的基因并测序,再将获得的测序结果与长江鱼类条形码数据库进行对比从而确定仔稚鱼的种类^[12]。

1.3 数据处理与分析

1.3.1 草鱼仔稚鱼丰度计算 草鱼仔稚鱼在拥有主动游泳能力之前随江水漂流, 因此仔稚鱼丰度计算方法按照易伯鲁等^[13]的计算方法, 依据所采集草鱼仔稚鱼的数量、单个采样点采集所用的时间、采集期间流量计的差值和锥形 I 型浮游生物网网口面积按下列公式处理:

$$Q_i = (0.3 \times S \times a_i) / t_i$$

$$D_i = \frac{N_i}{Q_i \times t_i}$$

式中, Q_i 为第 i 个采集点采集网具网口的过水流量 (m^3/s), S 为主动网具网口面积 (m^2), a_i 为第 i 个采集点采集流量计的流量差, t_i 为第 i 个采集点采集所用的时间, D_i 为第 i 个采集点草鱼仔稚鱼的丰度 (ind/m^3), N_i 为第 i 个采集点采集到的草鱼仔稚鱼尾数 (ind)。

1.3.2 采样断面仔稚鱼平均丰度与定点仔稚鱼丰度相比系数 各采样点草鱼仔稚鱼的平均丰度与第 i 个采样点草鱼仔稚鱼丰度相除, 可计算出草鱼仔稚鱼平均丰度相比系数, 公式如下:

$$C = \sum \bar{D} / D_i$$

式中, C 为仔稚鱼平均丰度相比系数, $\bar{D}$ 为各采样点仔稚鱼的平均丰度 (ind/m^3), D_i 为第 i 个采集点草鱼仔稚鱼的丰度 (ind/m^3)。

1.3.3 草鱼仔稚鱼径流量 采样期间草鱼仔稚鱼径流量:

$$M_i = D_i \times Q_i \times C_i$$

式中, M_i 为第 i 次采集时间内通过该江段断面的草鱼仔稚鱼尾数 (ind), Q_i 为第 i 次采集时的断面流量 (m^3/s), D_i 为第 i 个采集点草鱼仔稚鱼的丰度 (ind/m^3)。

非采集期间草鱼仔稚鱼径流量:

$$M_{i,i+1} = (M_i/t_i + M_{i+1}/t_{i+1})t_{i,i+1}/2$$

用相邻两次采集的径流量及其间隔时间进行插补计算。式中, $M_{i,i+1}$ 为第 $i, i+1$ 采集时间间隔内的草鱼仔稚鱼径流量 (ind), $t_{i,i+1}$ 为第 $i, i+1$ 次采集时间间隔 (s)。

采集江段的草鱼仔稚鱼总径流量:

$$M = \sum M_i + \sum M_{i,i+1}$$

水位日上涨率与径流量日上涨率为当天采样

江段的水位、径流量减去前一天水位、径流量的差值。

1.3.4 广义可加模型(generalized additive models, GAM) 该模型是一种非参数化或半参数化的回归分析方法^[14], 当应变量和预测变量间关系不明确时, GAM 模型可以在较高程度上进行检测。本研究应用 GAM 模型揭示水文因子与草鱼仔稚鱼丰度之间的关系, 表达式:

$$g(p) = \alpha + \sum_{j=1}^n f_j(x_j) + \varepsilon$$

式中, $g(p)$ 为关联函数; p 为草鱼仔稚鱼密度 ($\text{ind}/100 \text{ m}^3$), α 为适合函数中的截距; x_j 为解释变量, 包括水温、透明度、水位日上涨率和径流量日上涨率; $f_j(x_j)$ 为解释变量关系的非参数函数; ε 为误差项, 与解释变量 x_j 无关, $E(\varepsilon)=0$, $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ 。模型采用样条平滑法, 对数据图进行平滑处理。

在数据录入过程中使用 Excel 2016 软件对数据进行处理, 用 Origin 2018 软件制作分析图; 数据分析使用 SPSS19.0 分析软件, 差异显著性使用 Kruskal-Wallis 分析, 水文因子与丰度变化的关联程度采用 Pearson 相关性分析; GAM 模型的构建与验证在 R 3.5.3 软件的 mgcv 包内实现。

2 结果与分析

2.1 草鱼仔稚鱼组成占比和径流量

本研究于 2018—2020 年 4—8 月在长江下游安庆段开展早期资源调查共 327 d, 采集到仔稚鱼 392186 尾, 其中四大家鱼 1912 尾, 草鱼有 272 尾。3 年内草鱼仔稚鱼的捕获量依次为 99 尾、165 尾与 8 尾, 分别占当年四大家鱼仔稚鱼总捕获量的 12.30%、17.86%与 4.37%; 根据在安庆段 3 个采样点所采集的草鱼仔稚鱼数量及江段流量计算, 2018—2020 年通过安庆段的草鱼仔稚鱼径流量分别为 3.95×10^8 尾、 5.79×10^8 尾与 3.29×10^8 尾。

2.2 草鱼仔稚鱼丰度的时空分布特征

根据早期资源走航调查数据分析, 安庆段 2018—2020 年草鱼仔稚鱼丰度的变化范围为 1.12~141.54 $\text{ind}/1000 \text{ m}^3$, 日平均丰度为 19.21 $\text{ind}/1000 \text{ m}^3$ 。2018 年安庆段草鱼仔稚鱼日平均丰度

为 17.36 ind/1000 m³, 在繁殖期内的草鱼仔稚鱼丰度波动较明显, 高峰期集中发生于 5 月中上旬, 最高峰出现在 5 月 5 日, 丰度急剧下降后逐渐上升, 至 5 月 14 日开始呈现波动性下降的趋势, 6 月与 7 月的草鱼仔稚鱼最高丰度依次出现在 6 月 7 日与 7 月 18 日, 对应峰值为 16.50 ind/1000 m³ 与 36.56 ind/1000 m³。2019 年安庆段草鱼仔稚鱼日平均丰度为 21.48 ind/1000 m³, 高峰期集中发生于 5 月中上旬, 在 5 月 1 日与 5 月 15 日出现两个最高峰, 对应仔稚鱼丰度为 14.15 ind/1000 m³

与 8.61 ind/1000 m³, 之后 7 月与 8 月出现两个小高峰, 丰度分别为 3.66 ind/1000 m³ 与 3.60 ind/1000 m³; 2020 年仅于 7 月至 8 月上旬采集到草鱼仔稚鱼, 期间最高峰值出现在 7 月 1 日, 对应丰度为 22.41 ind/1000 m³ (图 2); 2018—2020 年草鱼仔稚鱼丰度月变化分析显示, 5 月平均丰度显著高于其他月份(图 3), 为草鱼繁殖期内的苗汛高发期; 草鱼仔稚鱼丰度年变化分析表明, 2019 年平均丰度高于 2018 年, 显著高于 2020 年, 呈波动性变化(图 4)。

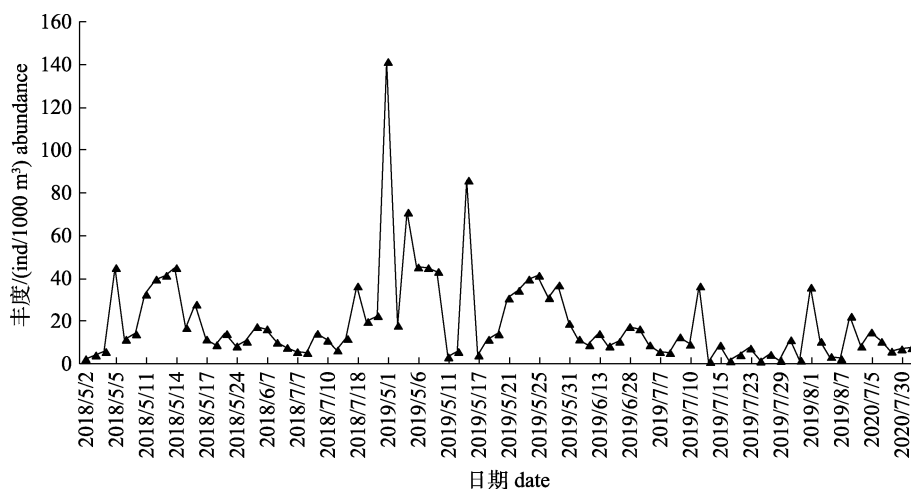


图2 安庆段 2018—2020 年草鱼仔稚鱼丰度日变化

Fig. 2 Daily abundance of *Ctenopharyngodon idellus* larvae in Anqing section during 2018 to 2020

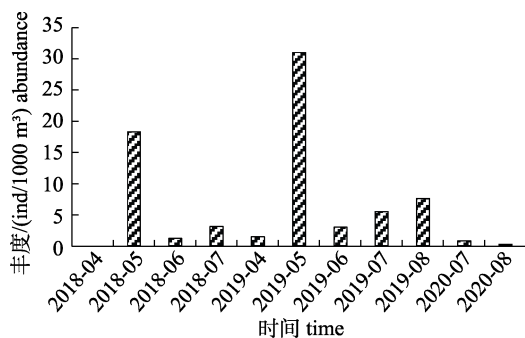


图3 安庆段 2018—2020 年 4—8 月草鱼仔稚鱼丰度月变化
Fig. 3 Month abundance of *Ctenopharyngodon idellus* larvae in Anqing section from April to August during 2018 to 2020

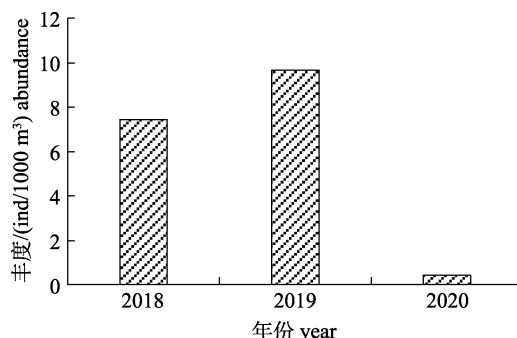


图4 安庆段 2018—2020 年草鱼仔稚鱼丰度年变化
Fig. 4 Annual abundance of *Ctenopharyngodon idellus* larvae in Anqing section from 2018 to 2020

对 2018—2020 年长江下游安庆段的右岸、江心与左岸草鱼仔稚鱼丰度数据进行差异显著性分析, 以此验证草鱼仔稚鱼在安庆段的断面空间分布差异。Kruskal-Wallis 检验表明, 采样断面 3 个采样点在 3 年中均不存在显著性差异 (2018 年: $P>0.05$, $n=33$; 2019 年: $P>0.05$, $n=59$; 2020 年: $P>0.05$, $n=7$), 但左、右岸的平均漂流丰

度均大于江心 ($P<0.05$, $n=70$); 2018、2019 年安庆段草鱼仔稚鱼平均漂流丰度断面横向分布皆呈现左岸 (12.52、14.09 ind/1000 m³) > 右岸 (4.99、10.84 ind/1000 m³) > 江心 (0.87、9.57 ind/1000 m³) 的分布规律, 2020 年呈现左岸 (0.37 ind/1000 m³) > 江心 (0.19 ind/1000 m³) > 右岸 (0.14 ind/1000 m³) 的分布规律(图 5)。

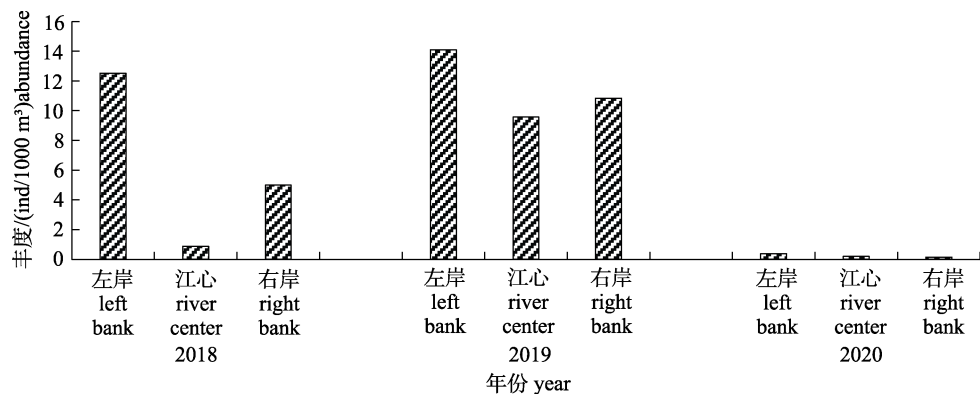


图 5 安庆段 2018—2020 年草鱼仔稚鱼平均漂流丰度断面分布

Fig. 5 The distribution of average drifts density of *Ctenopharyngodon idellus* larvae in Anqing section from 2018 to 2020

2.3 水文因子变化特征

2018—2020 年调查期间, 安庆段环境因子变化范围如表 1 所示, 所记录环境指标中的水温从 4—8 月逐步上升, 在 5—6 月波动较大, 至 7—8 月达到水温最大值(32.9 ℃, 29.8 ℃, 31.9 ℃); 透明度与浊度在调查期间呈波动性变化, 在 2018 年 7 月与 2019 年的 5 月波动较大, 2020 年的透明度于 5 月存在最小值(27 cm), 可能与安庆段径流量骤然增大相关, 导致江水浑浊; 2018—2020 年长江安庆段的水位与径流量变化趋势相似, 其中 2020 年的峰值(17.96 m, 76500 m³/s)显著高于 2018 年与 2019 年同期峰值(2018 年: 13.86 m, 49900 m³/s; 2019 年: 16.56 m, 67900 m³/s), 峰值均在 7 月出现; 在调查期间, 左岸采样点的平均水温为 25.17 ℃, 略高于右岸采样点(24.98 ℃)与左岸采样点(24.93 ℃), 而透明度则呈现右岸采样点(43.83 cm)>江心采样点(42.38 cm)>左岸采样点(39.00 cm)的空间分布特征。

表 1 长江安庆段环境因子变化

Tab. 1 Changes of environmental factors in Anqing section of the Yangtze River

环境因子 environmental factor	最小值 lowest	最大值 highest	平均值 average value
水温/℃ temperature	17.90	32.90	24.30±3.04
浊度 NTU	16.90	132.80	40.15±17.17
酸碱度 pH	7.36	8.51	7.85±0.24
溶氧量/(mg/L) DO	3.73	8.75	6.77±1.12
水流速度/(m/s) V	0.60	2.80	0.89±0.2
透明度/cm SD	5.00	70.00	41.07±11.36

2.4 草鱼仔稚鱼丰度与水文因子的相关性

使用 Pearson 相关性分析草鱼仔稚鱼丰度与水文因子之间的相关性的结果显示, 草鱼仔稚鱼丰度日变化与水温($P<0.05$, 图 6a)、水位日上涨率($P<0.05$, 图 6b)与径流量日上涨率($P<0.05$, 图 6c)呈显著正相关, 与透明度呈极显著负相关($P<0.01$, 图 6d)。如图 6 所示, 水温在上升过程中, 仔稚鱼在 5 月密集出现, 2018—2020 年每年最高丰度所对应的水温依次为 23.8 ℃、26.6 ℃、25.4 ℃, 当水温上升至 27.9 ℃时, 草鱼仔稚鱼丰度明显下降, 达到水温最大值 29.8 ℃时, 仔稚鱼丰度趋于零; 当草鱼仔稚鱼丰度达到最大时, 透明度、水位与径流量分别为 51.5 cm、10.78 m 和 31100 m³/s;

在 Pearson 相关性分析的基础上构建 GAM 模型进一步验证, 构建过程中分别加入关键水文因子(水温、透明度、水位日上涨率与径流量日上涨率), 根据 AIC 准则选择最优模型, 结果见表 2, 总偏差解释率为 90.8%, 预测模型的校正决定系数($R\text{-sp}$)为 0.889>0.5, 较准确地说明了水温、透明度、水位日上涨率与径流量日上涨率对草鱼仔稚鱼丰度的影响。

采用正态 Q-Q 图、Shapiro-wilk 检验来验证 GAM 模型与其残差的正态性。正态 Q-Q 图显示 GAM 模型符合正态分布(图 7), Shapiro-wilk 检验表面 GAM 模型的残差符合正态分布($P>0.05$)。

从 GAM 模型中的偏差解释率来看, 加入模型的水文因子相对重要性表现为: 水温>透明度>水位日上涨率>径流量日上涨率。从水文因子与草

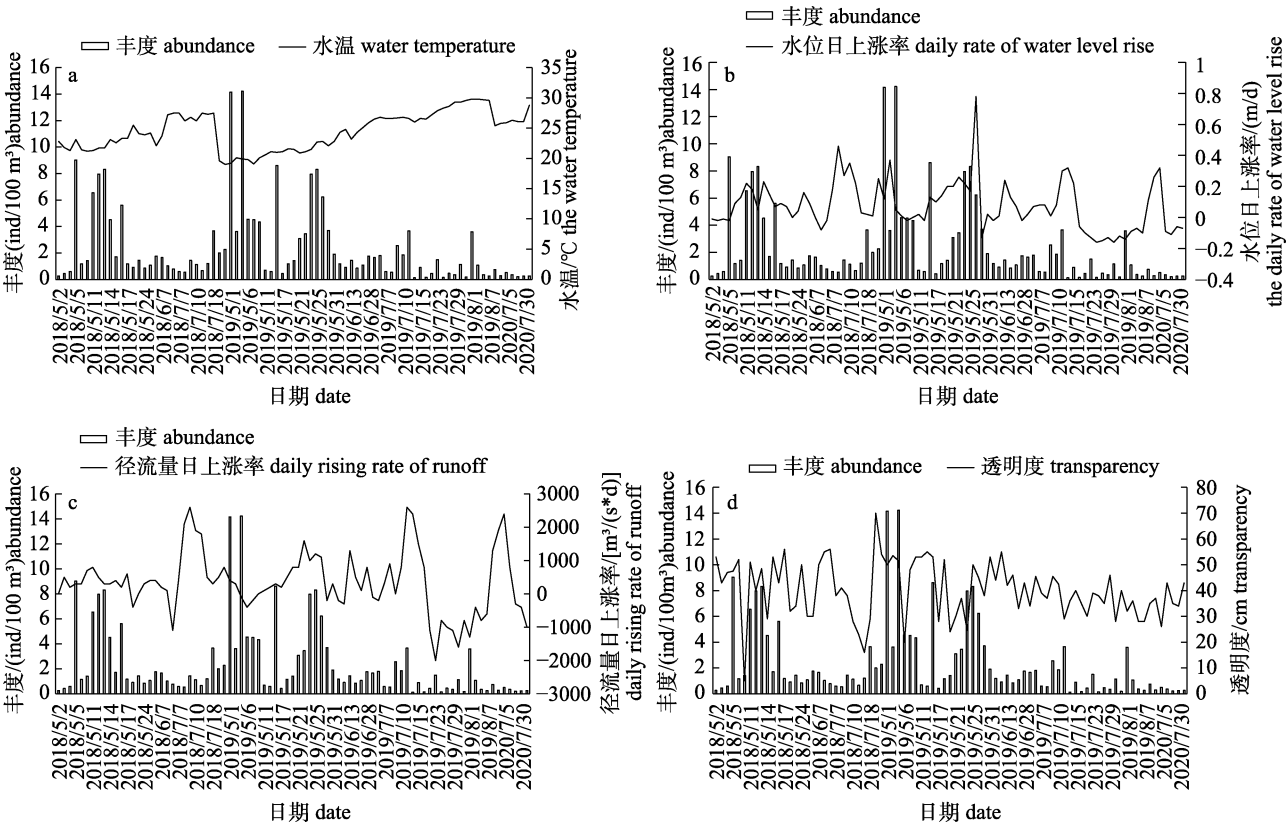


图 6 2018—2020 年安庆段草鱼仔稚鱼丰度与水文因子的关系

图中 a、b、c 和 d 分别为草鱼仔稚鱼丰度与水温、水位日上涨率、径流量日上涨率和透明度之间的关系。

Fig. 6 The relationship between the density of *Ctenopharyngodon idellus* larvae and hydrological factors in Anqing section from 2018 to 2020

a, b, c and d are the relationship between the abundance of larval *Ctenopharyngodon idellus* and water temperature and daily rise of water level, daily rise of river runoff and transparency.

表 2 安庆段草鱼仔稚鱼 GAM 模型方差分析

Tab. 2 Variance analysis of GAM model for *Ctenopharyngodon idellus* larvae in Anqing section of the Yangtze River

因变量 dependent variable	环境因子 environmental factors	偏差解释率/% deviation interpretation rate	R-sq	AIC	P
草鱼仔稚鱼 Larval <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	水温+透明度+水位日上涨率+径流量日上涨率 water temperature+transparency+daily rise of water level+ daily rise of runoff	90.8			
	水温 water temperature	59.6	0.559	597.67	1.60×10 ^{-2*}
	透明度 transparency	25.8	0.834	487.56	3.00×10 ^{-3*}
	水位日上涨率 daily rise of water level	4.7	0.885	328.68	1.06×10 ^{-4*}
	径流量日上涨率 daily rise of runoff	0.7	0.889	258.16	6.84×10 ^{-8*}

注: *表示在 0.05 水平上呈显著性相关($P<0.05$).
Note: * indicates a significant correlation at the 0.05 level ($P<0.05$).

鱼仔稚鱼丰度的 GAM 分析(图 8)显示,草鱼仔稚鱼丰度随水温、水位日上涨率与径流量日上涨率的涨幅而呈现显著正相关关系($P<0.05$),与透明度呈现显著负相关性($P<0.05$)。水位日上涨率范围主要集中在 0.01~0.24 m/d,而水温、透明度与径流量日上涨率都没有较集中的分布。

3 讨论

3.1 安庆段草鱼仔稚鱼资源的时空动态

近年来,对长江流域四大家鱼的调查结果表明其早期资源量处于不断衰退的趋势^[6,11],其中草鱼衰退趋势尤为明显,如长江上游江津段卵苗

种类组成中,草鱼所占的比例不断下降^[15]。在三峡水库蓄水前后,长江中游以草鱼为主的四大家鱼仔稚鱼组成发生明显变化,鲢的仔稚鱼资源量

快速增长,而草鱼仔稚鱼资源量显著降低^[16],2017—2018年通过宜都江段的四大家鱼仔稚鱼径流量从 4.12×10^8 尾降至 0.11×10^8 尾^[17]。本研究结果中2019年草鱼仔稚鱼占四大家鱼仔稚鱼总量的比例(17.86%)较2018年(12.30%)有所增长,通过长江安庆段的草鱼仔稚鱼径流量也从 3.95×10^8 尾增长至 5.79×10^8 尾;一方面是因为草鱼作为典型的产漂流性卵鱼类,其产卵活动多数发生在江水上涨期间,规模大小受江水涨水过程的影响^[18],2019年的水位与径流量普遍高于2018年同期水位与径流量,涨水持续时间较长,水文环境更适宜草鱼亲鱼繁殖;另一方面,2019年长江禁捕工作开始初步实施,安庆段(实行全面退捕)未发生大规模捕捞,有益于草鱼亲鱼繁殖,使得草鱼仔稚鱼资源量明显高于2018年。本研究中2020年通过安庆段的草鱼仔稚鱼径流量有所下降,其主要原因是2020年6月长江流域接连发生强降雨,加上长江的大坝开闸泄洪导致洪水暴发,下游水

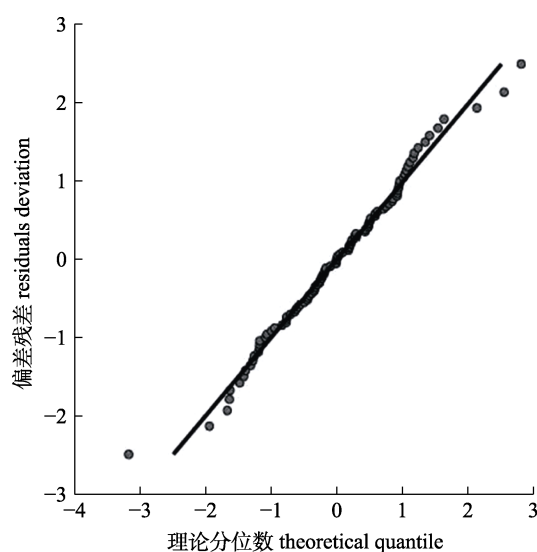


图7 草鱼仔稚鱼丰度的GAM模型Q-Q图

Fig. 7 GAM model Q-Q diagram for larval fish abundance of *Ctenopharyngodon idellus*

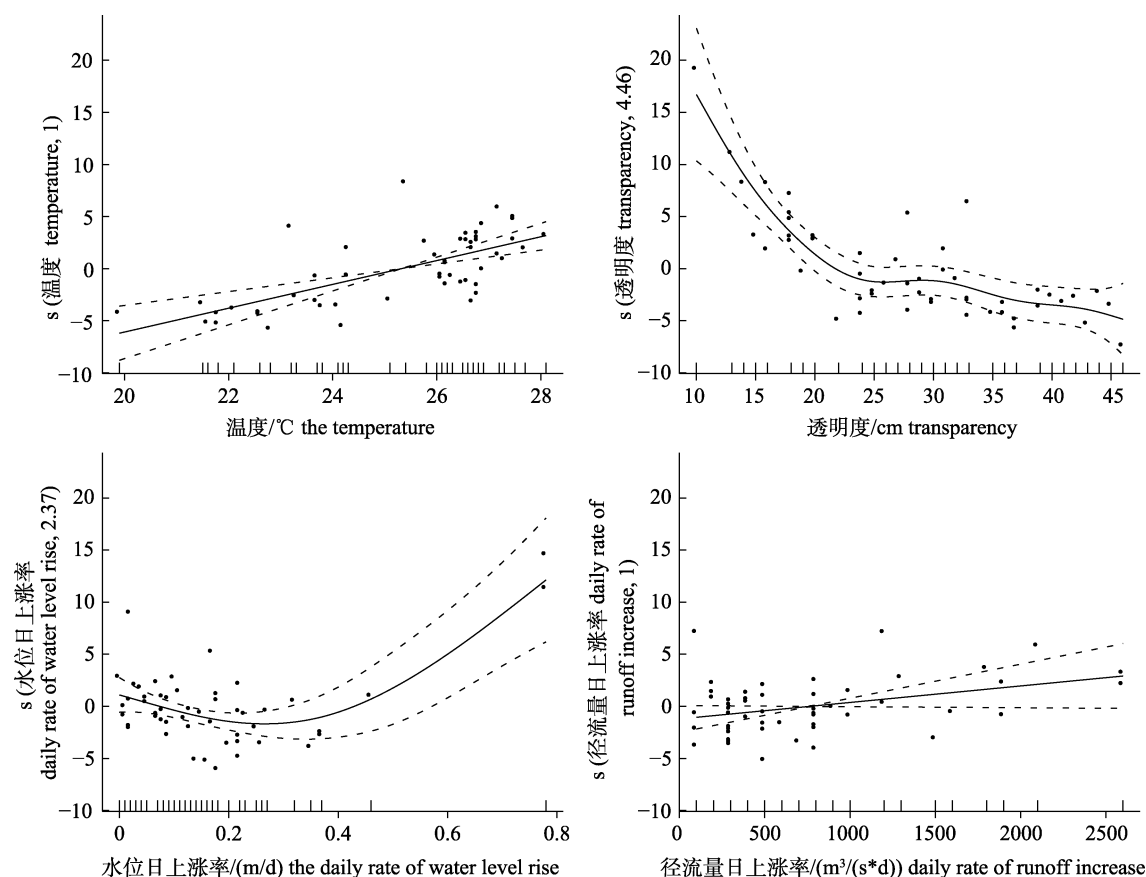


图8 草鱼仔稚鱼丰度与水文因子之间关系的GAM分析

Fig. 8 GAM analysis on the relationship between larval fish abundance of *Ctenopharyngodon idellus* and hydrological factors

位与径流量大幅上涨,如安庆段7月水位与径流量高达18.42 m与81500 m³/s,过快的江水流速反而不利于草鱼亲鱼繁殖^[19]。

长江下游与沿江支流相连形成江湖连通系统,且距离大坝越远的水域其水文情势趋向于自然状态,因此大坝对下游鱼类资源的影响较小^[9]。2016年通过长江下游安庆段的四大家鱼仔稚鱼径流量为 21.7×10^8 尾^[11],显著高于同期的长江中游黄石江段^[20],本研究中2018年草鱼仔稚鱼径流量高于同期长江中游宜昌江段的四大家鱼仔稚鱼径流量^[21],呈现长江中游资源量向下游安庆段增多的趋势,主要原因可能是由于长江安庆段至湖口江段生境良好,且存在四大家鱼的产卵场^[22],由此产生的叠加效应导致安庆江段的草鱼仔稚鱼径流量较高。

3.2 草鱼仔稚鱼时空分布差异的影响因素

仔稚鱼发生的时空动态能直接反映亲鱼繁殖的时空特征^[23]。本研究结果显示,由于长江干流的水位与径流量从4月开始逐渐增长,安庆段草鱼仔稚鱼集中出现于5—7月,高峰期发生在5月和7月中上旬,与历史文献中该江段的四大家鱼仔稚鱼出现的高峰期相似^[11],草鱼仔稚鱼出现的高峰期峰值呈现逐年上升的趋势,但2018—2020年主要汛期存在推迟的现象,主要原因是2020年因洪水暴发,水位与径流量涨幅过大,江水流速过快不适宜草鱼亲鱼洄游产卵^[24],致使5月与6月未发现草鱼仔稚鱼,待7月径流量有所下降后才出现草鱼苗汛。

徐薇等^[25]的研究表明了鱼类早期资源在空间上具有水平差异,其丰度与流速呈负相关性。本研究对草鱼仔稚鱼丰度在断面空间分布差异上进行分析时发现,3个采样点在2018—2020年均不存在显著性差异,主要原因是江水流速较快,沿岸不能形成缓流区,仔稚鱼较少聚集;另一方面草鱼仔稚鱼密集出现的5月透明度较低,江水浑浊,这在一定程度上降低了仔稚鱼主动游泳能力,不能有效躲避捕捞和控制游泳方向,使得草鱼仔稚鱼在左右沿岸分布没有显著差异,但整体上左右两岸的草鱼仔稚鱼密度显著高于江心,与田佳丽等^[26]对安庆新洲江段的调查结果一致。此外草鱼仔稚鱼群聚规模还受生境差异的影响,左岸的

草鱼仔稚鱼平均漂流丰度都略高于右岸,这是由于左岸连接皖河口,水生植物覆盖率较高,有利于草鱼摄食,使得仔稚鱼大量群聚。

3.3 水文环境因子与草鱼仔稚鱼资源的相关性

鱼类早期资源的群聚动态可以反映出栖息地生境的特征与水质状况^[27],水温通常被认为是影响鱼类繁殖的重要因素,而作为四大家鱼之一的草鱼,其产卵盛期的水温范围一般为18~24℃^[28]。本研究结果显示,水温是影响长江野生草鱼繁殖的主要水文因子,安庆段草鱼仔稚鱼丰度日变化整体随水温的升高呈上升趋势,苗汛高峰时期的水温范围为21.3~27.5℃,高于长江中游监利江段的四大家鱼仔稚鱼高峰期的水温范围(20~24℃)^[29],说明长江下游安庆段草鱼仔稚鱼适宜温度略高于中游,而江水温度上升到29.8℃后,草鱼仔稚鱼丰度趋于零,研究结果表明,温度过高不利于草鱼亲鱼产卵。

在鱼类繁殖期,长江草鱼产卵行为的发生离不开水位与水径流量等自然条件的驱动^[3],有研究表明,产漂流性卵鱼类在繁殖时理想的水位日上涨率在0.30~0.55 m/d,径流量日上涨率一般高于2100 m³/(s·d)^[30]。2018—2020年安庆段的草鱼仔稚鱼丰度与水位日上涨率和径流量日上涨率呈显著正相关的关系,当水温达到繁殖要求,水位日上涨率达到0.22 m/d或江水径流量上涨率达到800 m³/(s·d)时,草鱼仔稚鱼丰度开始呈显著上升趋势^[31],也有研究表明,径流量达到30000 m³/s时,仔稚鱼与鱼卵的丰度明显降低^[20-21],而本研究中径流量高于30000 m³/s时,草鱼仔稚鱼仍有较高丰度,这是由于长江下游河道较宽,加上有鄱阳湖等通江湖泊的存在,水文环境也能满足草鱼亲鱼繁殖的要求。本研究GAM模型分析的结果证实了水位与径流量的涨幅是影响草鱼繁殖的重要因素。

3.4 调查方法等对草鱼早期资源调查的影响

草鱼早期资源调查是评估草鱼丰度的重要研究手段,其动态可以在一定程度上反映长江草鱼资源状况,但此调查方法在本研究中略有不足之处,如2020年长江下游因洪水泛滥而导致长江水域面积大范围扩增且水流形态复杂,草鱼仔稚鱼

随机扩散,这对于采集草鱼仔稚鱼与探索仔稚鱼资源分布规律增加了难度;同时采样工作大多是在白天进行,草鱼一般是在夜间繁殖,不同距离的产卵场随江水流速的不同而到达采样点的时间也不同,基于固定采集而估算的草鱼仔稚鱼资源量就可能与长江中的实际资源量有细微偏差。因此,针对这些不足,建议增加采样断面中的采样位点,同时对采样点进行持续性的全天监测,使得草鱼仔稚鱼资源量分布与系统估算的结果更为精确。本研究后续将重点关注草鱼仔稚鱼群聚水域的生境特征,结合水文数据揭示草鱼仔稚鱼的种群发生机制。

4 小结与展望

本研究于 2018—2020 年在长江下游安庆段以草鱼仔稚鱼为研究对象,针对长江下游干流草鱼仔稚鱼时空动态开展相关研究,研究结果揭示了草鱼仔稚鱼在安庆段的资源量现状、时空动态特征,及其丰度与水温、透明度、水位日上涨率和径流量日上涨率等水文因子的相关性,之后还需要对长江安庆段及下游其他江段持续进行草鱼早期资源监测,揭示长江下游野生草鱼资源的发生和补充机制,同时为长江草鱼苗汛预测与种群保护提供参考依据。

参考文献:

- [1] Newbold L R, Kemp P S. Influence of corrugated boundary hydrodynamics on the swimming performance and behaviour of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 82: 112-120.
- [2] Chen D Q, Duan X B, Liu S P, et al. On the dynamics of fishery resources of the Yangtze River and its management[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(6): 685-690. [陈大庆, 段辛斌, 刘绍平, 等. 长江渔业资源变动和管理对策[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(6): 685-690.]
- [3] Yi B L, Yu Z T, Liang Z S. Gezhouba Hydro-Junction and the Four Famous Domestic Fishes of Yangtze River[M]. Wuhan: Hubei Science & Technology Press, 1988. [易伯鲁, 余志堂, 梁秩桑, 等. 葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1988.]
- [4] Yi Y J, Wang Z Y. Impact from dam construction on migration fishes in Yangtze River Basin[J]. *Water Resources and Hydropower Engineering*, 2009, 40(1): 29-33. [易雨君, 王兆印. 大坝对长江流域洄游鱼类的影响[J]. *水利水电技术*, 2009, 40(1): 29-33.]
- [5] Xie P, Chen Y Y. Evil quartet of inland waters in China: Impact of human activities on the loss of biodiversity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(Suppl): 41083.
- [6] Xiong F, Liu H Y, Duan X B, et al. Population structure and growth of *Ctenopharyngodon idellus* in the Upper Yangtze River[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2014, 37(4): 16-22. [熊飞, 刘红艳, 段辛斌, 等. 长江上游草鱼种群结构与生长特征[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2014, 37(4): 16-22.]
- [7] Liu S P, Chen D Q, Duan X B, et al. Monitoring of the four famous Chinese carps resources in the middle and upper reaches of the Yangtze River[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2004, 13(2): 183-186. [刘绍平, 陈大庆, 段辛斌, 等. 长江中上游四大家鱼资源监测与渔业管理[J]. *长江流域资源与环境*, 2004, 13(2): 183-186.]
- [8] Zhang G. Temporal and spatial patterns of early-life-history resource of the four major carps in the middle Yangtze River[D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences), 2012. [张国. 长江中游四大家鱼早期资源的时空格局研究[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院水生生物研究所), 2012.]
- [9] Ren P. Distribution and annual dynamics of early life history resources of fish in the lower reach of the Yangtze River, China[D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences), 2015. [任鹏. 长江下游鱼类早期资源的分布与周年动态研究[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院水生生物研究所), 2015.]
- [10] Cao W X, Chang J B, Qiao Y. Fish Resources of Early Life History Stages in Yangtze River[M]. Beijing: China Water Power Press, 2007. [曹文宣, 常剑波, 乔晔. 长江鱼类早期资源[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2007.]
- [11] Ding L Q, He X H, Li X F, et al. The larvae and juvenile fish resources of the four major Chinese carps at Anqing section in the lower reaches of the Yangtze River from 2016 to 2018[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2020, 32(4): 1116-1125. [丁隆强, 何晓辉, 李新丰, 等. 2016—2018 年长江下游安庆江段四大家鱼仔稚鱼资源调查分析[J]. *湖泊科学*, 2020, 32(4): 1116-1125.]
- [12] Gao L. Diversity and temporal and spatial patterns of larval fish assemblages in the south branch of Yangtze Estuary[D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences), 2014. [高雷. 长江口南支鱼类早期资源多样性与时空格局研究[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院水生生物研究所), 2014.]

- [13] Yi B L, Yu Z T, Liang Z S, et al. The distribution, natural conditions and breeding production of the spawning grounds of four famous freshwater fishes on the main stream on the Yangtze River[M]//Gezhouba Water Control Project and the Four Famous Freshwater Fishes of the Yangtze River. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1988: 47-68. [易伯鲁, 余志堂, 梁秩桑, 等. 长江干流草、青、鲢、鳙四大家鱼产卵场的分布、规模和自然条件[M]//葛洲坝水利枢纽与长江四大家鱼. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1988: 47-68.]
- [14] Hastie T, Tibshirani R. Generalized additive models[J]. Statistical Science, 1986, 1(3): 297-310.
- [15] Tang X L, Chen D Q, Wang K, et al. Spatial and temporal distribution of larval resources of fishes in the upper reaches of Yangtze River[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(5): 27-31. [唐锡良, 陈大庆, 王珂, 等. 长江上游江津江段鱼类早期资源时空分布特征研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(5): 27-31.]
- [16] Duan X B, Chen D Q, Li Z H, et al. Current status of spawning grounds of fishes with pelagic eggs in the middle reaches of the Yangtze River after impoundment of the Three Gorges Reservoir[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(4): 523-532. [段辛斌, 陈大庆, 李志华, 等. 三峡水库蓄水后长江中游产漂流性卵鱼类产卵场现状[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 523-532.]
- [17] Chen C, Li M Z, Gao X, et al. The status of the early-stage fish resources and hydrologic influencing conditions in the Yichang section in the middle reaches of the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(5): 1055-1063. [陈诚, 黎明政, 高欣, 等. 长江中游宜昌江段鱼类早期资源现状及水文影响条件[J]. 水生生物学报, 2020, 44(5): 1055-1063.]
- [18] Li M Z. Study on the life history strategies of fishes in the Yangtze River and its adaption to environment during early life history stage[D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences), 2012. [黎明政. 长江鱼类生活史对策及其早期生活史阶段对环境的适应[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院水生生物研究所), 2012.]
- [19] Wang S Y, Liao W G, Chen D Q, et al. Analysis of eco-hydrological characteristics of the four Chinese farmed carps' spawning grounds in the middle reach of the Yangtze River[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2008, 17(6): 892-897. [王尚玉, 廖文根, 陈大庆, 等. 长江中游四大家鱼产卵场的生态水文特性分析[J]. 长江流域资源与环境, 2008, 17(6): 892-897.]
- [20] Gao L, Hu X K, Yang H, et al. Resources of the four major Chinese carps of early life history stages at Huangshi section in the middle reaches of the Yangtze River[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(6): 1498-1506. [高雷, 胡兴坤, 杨浩, 等. 长江中游黄石江段四大家鱼早期资源现状[J]. 水产学报, 2019, 43(6): 1498-1506.]
- [21] Chen C, Li M Z, Gao X, et al. The status of the early-stage fish resources and hydrologic influencing conditions in the Yichang section in the middle reaches of the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(5): 1055-1063. [陈诚, 黎明政, 高欣, 等. 长江中游宜昌江段鱼类早期资源现状及水文影响条件[J]. 水生生物学报, 2020, 44(5): 1055-1063.]
- [22] He X H, Tan L F, Peng Y X, et al. Four major Chinese carps eggs resources and spawning grounds distribution at Hukou section of the Yangtze River[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(4): 420-430. [何晓辉, 谈龙飞, 彭云鑫, 等. 长江湖口段四大家鱼卵资源及其产卵场分布[J]. 中国水产科学, 2021, 28(4): 420-430.]
- [23] Doyle M J, Morse W W, Kendall A W. A comparison of larval fish assemblages in the temperate zone of the northeast Pacific and northwest Atlantic Oceans[J]. Bulletin of Marine Science, 1993, 53(2): 588-644.
- [24] Yang Q, Hu P, Yang Z F, et al. Suitable flow rate and adaptive threshold for grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) migration[J]. Journal of Hydroecology, 2019, 40(4): 93-100. [杨庆, 胡鹏, 杨泽凡, 等. 草鱼洄游的适宜流速条件与适应阈值[J]. 水生态学杂志, 2019, 40(4): 93-100.]
- [25] Xu W, Liu H G, Tang H Y, et al. Effects of ecological operation of Three Gorges reservoir on fish eggs and larvae in Shashi section of the Yangtze River[J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(2): 1-8. [徐薇, 刘宏高, 唐会元, 等. 三峡水库生态调度对沙市江段鱼卵和仔鱼的影响[J]. 水生态学杂志, 2014, 35(2): 1-8.]
- [26] Tian J L, Dai P, Ren P, et al. Assemblage of larvae and juvenile fish in Anqing Xinzhou section of the Yangtze River[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(8): 916-926. [田佳丽, 代培, 任鹏, 等. 长江安庆新洲江段仔稚鱼的群聚特征[J]. 中国水产科学, 2020, 27(8): 916-926.]
- [27] Franco A, Franzoi P, Torricelli P. Structure and functioning of Mediterranean lagoon fish assemblages: A key for the identification of water body types[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2008, 79(3): 549-558.
- [28] Wu G X, Liu L H, Wang Z L, et al. Study on natural reproduction of grass carp in the Jinshajiang Reach of the upper reaches of the Yangtze River[J]. Freshwater Fisheries, 1988, 18(1): 3-6. [吴国犀, 刘乐和, 王志玲, 等. 长江上游金沙江江段草鱼自然繁殖的研究[J]. 淡水渔业, 1988, 18(1): 3-6.]
- [29] Wang K, Zhou X, Chen D Q, et al. Response relationship analysis on hydrological processes and spawning behavior of four major Chinese carps[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(1): 66-70. [王珂, 周雪, 陈大庆, 等. 四大家鱼自然繁殖对水文过程的响应关系研究[J]. 淡水渔业, 2019, 49(1): 66-70.]

- [30] Li M Z, Gao X, Yang S R, et al. Effects of environmental factors on natural reproduction of the four major Chinese carps in the Yangtze River, China[J]. Zoological Science, 2013, 30(4): 296-303.
- [31] Yi Y J, Le S H. Habitat suitability function of four major Chinese carps spawning sites in the Yangtze River[J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2011, 19(S1): 117-122. [易雨君, 乐世华. 长江四大家鱼产卵场的栖息地适宜度模型方程[J]. 应用基础与工程科学学报, 2011, 19(S1): 117-122.]

Correlation between the temporal and spatial characteristics of larval *Ctenopharyngodon idellus* resource and hydrological factors in the Anqing section of the Yangtze River

PENG Yunxin¹, FANG Di'an^{1,2}, XU Dongpo^{1,2}, DING Longqiang², LI Jiasheng³, REN Peng², HE Xiaohui¹, LUO Yuting³

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in the Lower Reaches of the Changjiang River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: To explore the relationship between the temporal and spatial characteristics of larval *Ctenopharyngodon idellus* and hydrological factors in the Anqing section of the lower Yangtze River, the larval *C. idellus* were systematically monitored from April 2018 to August 2020. A total of 272 larval *C. idellus* were identified using morphological and molecular biological methods, of which the three-year catch accounted for 12.30%, 34.52%, and 4.37% of the four major fish catches in China in 2018, 2019, and 2020, respectively. According to the estimation of larval fish resources, their runoffs were 3.95×10^8 , 5.79×10^8 , and 3.29×10^8 , for 2018, 2019, and 2020, respectively. The results of spatial and temporal characteristics analysis showed that the larvae and juveniles of *C. idellus* were present mainly from May to July, with peaks in May and the early part of mid-July. In 2020, the abundance of larvae and juveniles of *C. idellus* was the lowest because the flood was not suitable for breeding and because the main flood season was delayed. Kruskal-Wallis test showed that the abundance of larval *C. idellus* on the left and right banks was significantly higher than that in the middle of the river ($P < 0.05$, $n = 70$). From 2018 to 2020, the spatial distribution of the overall average abundance was distributed as follows: left bank ($8.99 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$) > right bank ($5.34 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$) > middle of the river ($3.53 \text{ ind}/1000 \text{ m}^3$). Pearson correlation analysis showed that the abundance of larval *C. idellus* was significantly positively correlated with water temperature, the daily rising rate of water level, and runoff and negatively correlated with transparency. GAM model analysis showed that the relative importance of hydrological factors was as follows: water temperature > transparency > daily rising rate of water level > daily rising rate of runoff. In this study, the total deviation interpretation rate of the GAM model reached 90.8%, which accurately revealed the response relationship between the abundance of larval *C. idellus* and hydrological factors. This study accumulated basic data for understanding the occurrence mechanism of early *C. idellus* resources in the Yangtze River.

Key words: Anqing section of the Yangtze River; larval *Ctenopharyngodon idellus*; spatial and temporal dynamics; hydrological factors

Corresponding author: FANG Dian, E-mail: fangdian@ffrc.cn; XU Dongpo, E-mail: xudp@ffrc.cn

DOI: 10.12264/JFSC2021-0367

异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗对罗非鱼的免疫效果

祝璟琳^{1,2}, 邹芝英¹, 李大宇¹, 肖炜¹, 喻杰¹, 陈炳霖¹, 马文静², 杨弘¹, 沈锦玉³

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
3. 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001

摘要: 为了研究异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗免疫罗非鱼后的免疫效果, 本研究采用 10% 甲醛溶液灭活法制备了无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 胞外产物灭活疫苗, 通过腹腔注射途径免疫健康奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂), 在免疫后 28 d 用同/异源无乳链球菌攻毒, 测定了免疫后和攻毒后罗非鱼的免疫应答反应和血清抗体效价, 并比较了罗非鱼在腹腔注射 1×10^8 CFU/尾无乳链球菌后的相对免疫保护率和交叉免疫保护率。结果显示, 免疫鱼谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)在免疫后 28 d 显著高于对照组, 但在攻毒后显著低于对照组; 与对照鱼相比, 免疫鱼的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平在免疫和攻毒后均有不同程度的提高, 丙二醛(MDA)显著降低($P < 0.05$)。实时定量 PCR 结果显示, 炎性细胞因子基因 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *TGF- β* , 体液免疫相关基因 *HSP70*, *MHC II* 和 *IgM* 在免疫和攻毒后也呈现显著升高趋势, 并显著高于对照组($P < 0.05$)。血清抗体效价于免疫后第 28 天达到 1 : 6400, 显著高于对照组($P < 0.05$)。攻毒实验结果显示, 免疫组在同源和异源无乳链球菌攻毒后相对的免疫保护率在 31.6%~47.4%。结果表明, 研制的灭活疫苗免疫罗非鱼后, 能够显著诱导罗非鱼体内的免疫应答, 产生中等疫苗效力, 对同/异源无乳链球菌都具有免疫保护能力。本研究结果为深入研究罗非鱼链球菌病的免疫预防技术和研制二价疫苗奠定了基础。

关键词: 无乳链球菌; 胞外产物; 灭活疫苗; 免疫保护; 奥尼罗非鱼

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0325-16

罗非鱼(*Oreochromis* spp.)是原产于非洲的暖水性鱼类, 具有生长快、产量高、肉质好、无肌间刺等优点。据《中国渔业统计年鉴》最新统计结果, 2020 年我国罗非鱼总产量 165.54 万 t, 产量稳居世界第一位^[1]。随着罗非鱼养殖规模的迅速扩大和高密度养殖, 由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)引起的链球菌病给我国罗非鱼产业造成了巨大的经济损失^[2-3]。在罗非鱼养殖场, 常规

的抗生素防治是目前控制无乳链球菌感染的主流方法, 但耐药性菌株出现、药残和环境污染对抗生素治疗提出了严峻的挑战^[4-5]。免疫接种是一种环境友好、安全有效的疾病预防方法, 目前已研发的罗非鱼的无乳链球菌疫苗包括细胞外产物(ECP)灭活疫苗^[6-7]、亚单位疫苗^[8-10]、DNA 疫苗^[11-13], 以及减毒活疫苗^[14-17]。虽然各类疫苗各有优缺点, 但相比较之下, 灭活疫苗因为安全性高和制备便

收稿日期: 2021-08-09; 修订日期: 2021-09-06.

基金项目: 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室开放课题项目(ZJK202012); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2021JBFM04); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费-罗非鱼和鲤鱼遗传育种创新团队项目(2020TD37).

作者简介: 祝璟琳(1983-), 博士, 副研究员, 研究方向为淡水鱼抗病育种研究. E-mail: zhujinglin@ffrc.cn

通信作者: 杨弘, 研究员, 研究方向为淡水鱼遗传育种. E-mail: yanghong@ffrc.cn; 沈锦玉, 研究员, 研究方向为水产病害防治与免疫. E-mail: sjinyu@126.com

捷,只要解决好免疫剂量大和异源菌株间交叉保护力差的问题,可能比其余 3 类疫苗更适合于生产实践。

我国罗非鱼无乳链球菌的血清型主要是 I a 型,且多为 β 溶血,同时也发现少量的 I b 和 I c 型无乳链球菌^[18]。Chen 等^[2]发现无乳链球菌全菌灭活疫苗的免疫保护率不仅与菌株血清型有关,也与其 PFGE 基因型有关,很难获得一个单一的疫苗候选毒株,可以保护来自同一血清型的所有基因型毒株。本课题组对 2009 年以来在海南、广东、广西和福建分离的 42 株罗非鱼源无乳链球菌进行多重 PCR 血清型分析和脉冲场凝胶电泳(PFGE)基因型分型,发现它们都属于血清型 I a 型,以 HN0901 菌株为代表的 I 型和以 GX1101 菌株为代表的 IV 型是我国罗非鱼无乳链球菌的主要基因型。胞外产物是病原菌分泌的代谢产物,其中的某些蛋白质具有良好的免疫原性,能够引发宿主的免疫应答,是一种有效的保护性抗原。无乳链球菌胞外产物单价疫苗已被开发用于链球菌病控制,腹腔注射是最有效的递送途径^[6-7]。本研究研制了一种针对同一血清型、不同基因型的异源无乳链球菌胞外产物的单价灭活疫苗,评价了它们对无乳链球菌感染的免疫应答和免疫保护效果,并测定了它们对罗非鱼感染异源无乳链球菌的交叉保护能力。

1 材料与方法

1.1 菌株与实验用鱼

无乳链球菌保存于本实验室 -80°C 冰箱,菌株 HN0901 血清型为 I a 型,基因型为 I 型,在中国典型微生物保藏中心编号为 CCTCC NO: M 2020546;菌株 GX1101 血清型为 I a 型,基因型为 IV 型,在中国典型微生物保藏中心编号为 CCTCC NO: M 2020547。健康奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂)来自农业农村部罗非鱼遗传育种中心南泉基地,体重为 (180 ± 20) g。实验前暂养于循环养殖系统 1 周,水温 $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$,日投喂两次,检测无细菌感染后开展正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 无乳链球菌胞外产物灭活疫苗制备 从超

低温冰箱取出无乳链球菌 HN0901 和 GX1101,分别以 10^8 CFU/mL 的菌液浓度攻毒 10 尾健康罗非鱼进行复壮,2~3 d 后随机抽检濒死罗非鱼并做细菌分离和 API 20 strep 快速鉴定,确认为无乳链球菌后接种于脑心浸液(BHI)培养基, 28°C 摇床 200 r/min 扩大培养 72 h,然后加 10%甲醛溶液使终浓度为 3%,继续放在摇床中灭活 24 h。将灭活菌液经 4°C 、7000 g 离心 30 min,收集离心后上清液和沉淀菌体, 4°C 保存。上清液使用 3 kD 的 Amicon® Ultra-15 离心过滤器浓缩 20 倍,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤器灭菌,浓缩的上清液即为胞外产物;细菌沉淀用无菌生理盐水进行重悬稀释后离心,重复重悬 3 次,浓缩液 10:1 (V/V)重悬菌体沉淀。疫苗的最终浓度为 4×10^9 CFU/mL,或在 540 nm 光密度下吸光值为 1.9,置于 4°C 冰箱保存备用。

1.2.2 疫苗无菌性及安全性检测 取 100 μL 灭活菌液分别涂布于血平板, 28°C 培养 48 h,观察有无细菌生长。将两种无乳链球菌灭活疫苗分别腹腔注射健康罗非鱼各 20 尾,免疫剂量为 0.2 mL/尾;另取健康罗非鱼 20 尾注射等剂量的无菌 PBS,连续观察 14 d,观察鱼体状况并进行记录,检测其安全性。

1.2.3 疫苗的免疫和采样 将无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 灭活疫苗经腹腔注射分别免疫 120 尾健康罗非鱼,免疫剂量为 0.2 mL/尾。另取健康罗非鱼 120 尾腹腔注射等剂量的脑心浸液培养基(BHI)作为对照组。免疫后 28 d 每组各取 80 尾分别进行攻毒实验 1:免疫组分别腹腔注射浓度为 2.2×10^7 CFU/mL 的无乳链球菌 HN0901 或 GX1101,剂量为 0.2 mL/尾,每组 40 尾;对照组注射等量的菌液。免疫后 0 d、28 d 以及攻毒后 14 d、21 d,每组罗非鱼随机取 6 尾,尾静脉采血,室温静置 2~4 h 后,4000 r/min 离心 15 min 分离血清。同时取肝脏放入含 1 mL Trizol 试剂的无 RNA 酶的冻存管中,液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱。

1.2.4 罗非鱼血清酶活力指标测定 将采集的罗非鱼血清进行酶活力测定,谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)活性的测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,所用测试方法

参考试剂盒上的说明书操作。

1.2.5 qRT-PCR 检测免疫相关基因 将肝脏样品从-80 ℃超低温冰箱中取出,用高通量组织研磨机(Sceintz-48 型,宁波新芝公司)匀浆研磨,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒(PrimeScript™, TaKaRa 公司)说明书将 RNA 反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 检测基因 *TNF-α*、*IL-1β*、*TGF-β*、*HSP70*、MHC II 和 IgM 相对表达量变化,引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in the study

基因 gene	正向引物(5'-3') forward primer sequence	反向引物(5'-3') reverse primer sequence
<i>TNF-α</i>	ATATGGAAAGTGTGCG CCGT	TTGTGTCATCCTTTCT GGCC
<i>IL-1β</i>	GGCATCAAAGGCACA AACCT	TCGCTTTCAGCGCTTA TCCT
<i>TGF-β</i>	TGGGACTATGAGCAG GAGGG	AACAGCAGTTGTGTGA TTGGGT
<i>HSP70</i>	CATCGCCTACGGTCTG GACAA	TGCCGTCTTCAATGGT CAGGAT
MHC II	AGTGTGGGGAAGTTT GTTGGAT	ATGGTGACTGGAGAG AGGCG
IgM	ACGAGGAAGCAGACT CAAGTTAT	ACAATAGCTCTAGTTG TGTTAACC
<i>β-actin</i>	GTTGCCATCCAGGCTG TGCT	TCTCGGCTGTGGTGGT GAAG

在 7900HT Fast Real Time PCR 仪(ABI 公司,美国)上进行 qRT-PCR 检测。20 μL 反应体系为: 2×SYBR Green I real-time PCR Master Mix (Toyobo 公司, 日本) 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, 无 RNA 水 7.4 μL; PCR 扩增程序: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火 20 s, 72 ℃延伸 40 s, 40 个循环。目的基因和内参基因扩增效率基本一致的前提下,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析计算目的基因的相对表达量。

1.2.6 血清抗体效价测定 参考 Shoemaker 等^[19]的方法,用间接 ELISA 方法测定免疫和攻毒后罗非鱼血清抗体效价。罗非鱼 IgM 单克隆抗体购于英国 Aquatic Diagnostic Ltd, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2.7 免疫保护率测定 在免疫后第 28 天,在 2 个免疫组和 1 个对照组随机各取 40 尾,用无乳链

球菌菌株 HN0901、GX1101 进行攻毒实验 2: 每尾鱼注射 0.2 mL (菌浓度为 50 倍 LD₅₀, 即 5×10^8 CFU/mL), 水温 32 ℃, 观察鱼发病症状, 连续记录 14 d。免疫保护率(RPS)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。

1.3 统计分析

数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,用 SPSS 25 分析各实验组之间的差异性,若差异显著($P<0.05$),用 Duncan 检验法进行多重比较。所有数据用 GraphPadPrism8 软件作图。

2 结果与分析

2.1 疫苗质量检测结果

HN0901、GX1101 灭活疫苗分别涂布在血平板上, 28 ℃培养 48 h 后均未见细菌生长, 表明两种疫苗均被完全灭活。将浓缩后的灭活疫苗原液分别腹腔注射罗非鱼, 连续观察 14 d, 所有鱼无死亡, 摄食状况正常, 表明疫苗的安全性良好。

2.2 血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性变化

免疫前奥尼罗非鱼血清 ALT 和 AST 活力各组之间没有显著性差异, 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组血清 ALT 和 AST 活力显著高于对照组($P<0.05$)。用 HN0901 和 GX1101 菌株对各组进行攻毒后, 对照组 ALT 和 AST 活力显著升高, 且都高于免疫组($P<0.05$); HN0901 菌株攻毒后 HN0901 免疫组在攻毒 14 d 血清 ALT 和 AST 活力恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组则在攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平(图 1 和图 2)。用 GX1101 菌株对各组进行攻毒, HN0901 免疫组在攻毒 14 d 血清 ALT 和 AST 活力就恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组血清 AST 和 ALT 活力分别在攻毒后 14 d 和攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平(图 1 和图 2)。

2.3 血清中抗氧化酶活力的变化

免疫前各组罗非鱼血清 SOD 活力无显著性差异($P>0.05$), 免疫 28 d 两组免疫组的血清 SOD 活力显著高于对照组($P<0.05$), 而对照组血清 SOD 活力没有显著性差异($P>0.05$)。在同/异源无乳链球菌攻毒后, HN0901 免疫组的罗非鱼血清 SOD 活力无显著性差异($P>0.05$), GX1101 免疫组的血清 SOD 活力与免疫 28 d 相比显著降低($P<0.05$),

同时显著高于免疫前血清 SOD 活力($P<0.05$); 对照组在攻毒后 14 d 和 21 d 血清 SOD 活力显著下降($P<0.05$); 攻毒后两个免疫组的血清 SOD 活力

显著高于对照组($P<0.05$, 图 3)。

HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组血清 CAT 活力在免疫后 28 d 显著升高, 在同/异源无乳链球

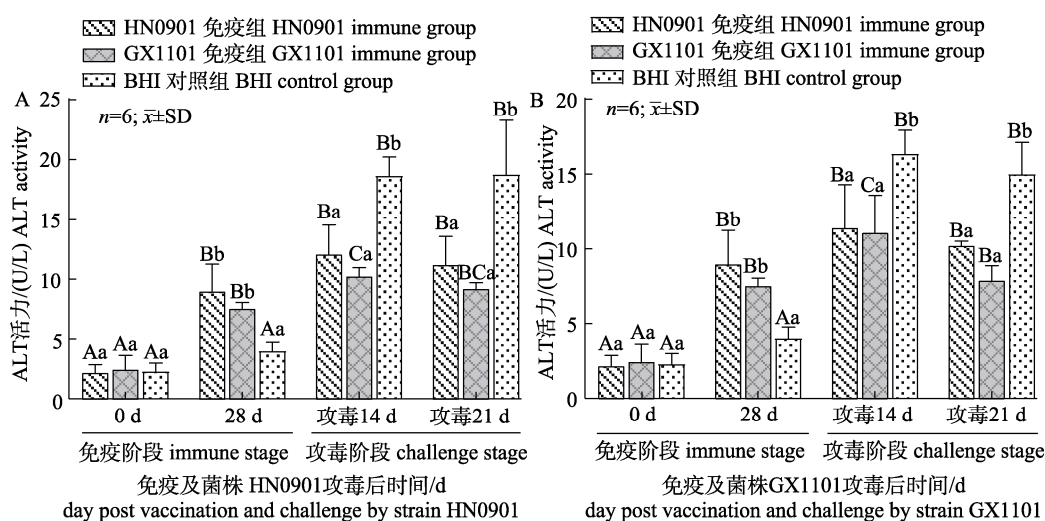


图 1 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901(A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后的谷丙转氨酶(ALT)变化

图中不同大写字母表示同一免疫组在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 Serum ALT activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O.aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

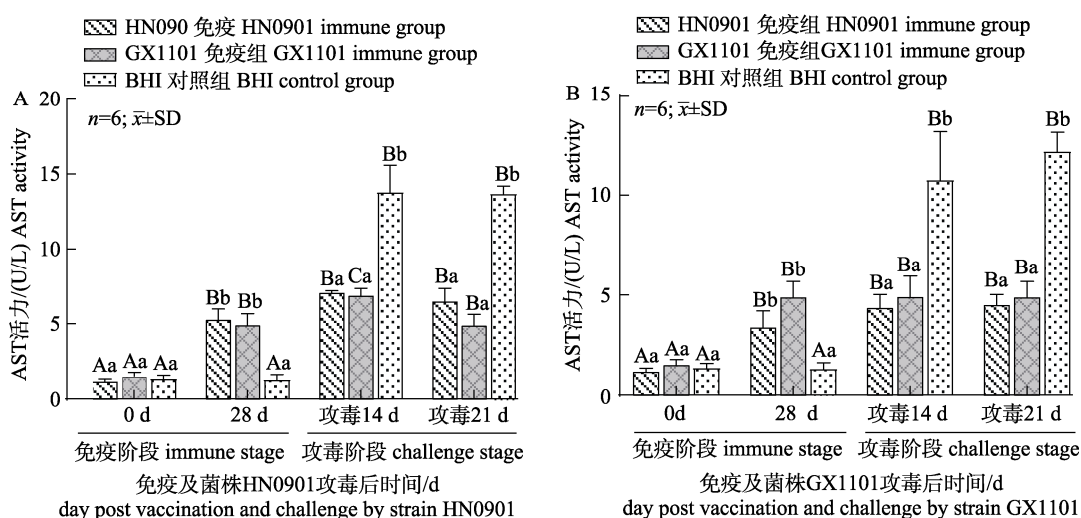


图 2 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清谷草转氨酶(AST)活力

图中不同大写字母表示同一免疫组在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 Serum AST activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O.aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

菌攻毒后 14 d 和 21 d 均显著高于对照组($P<0.05$), 但与免疫后 28 d 没有显著性差异($P>0.05$)。BHI 对照组血清 CAT 活力免疫后 28 d 与免疫前无显著性变化($P>0.05$), 在攻毒后 14 d 和 21 d 显著性降低($P<0.05$, 图 4)。

免疫前各组罗非鱼之间血清 MDA 含量不存

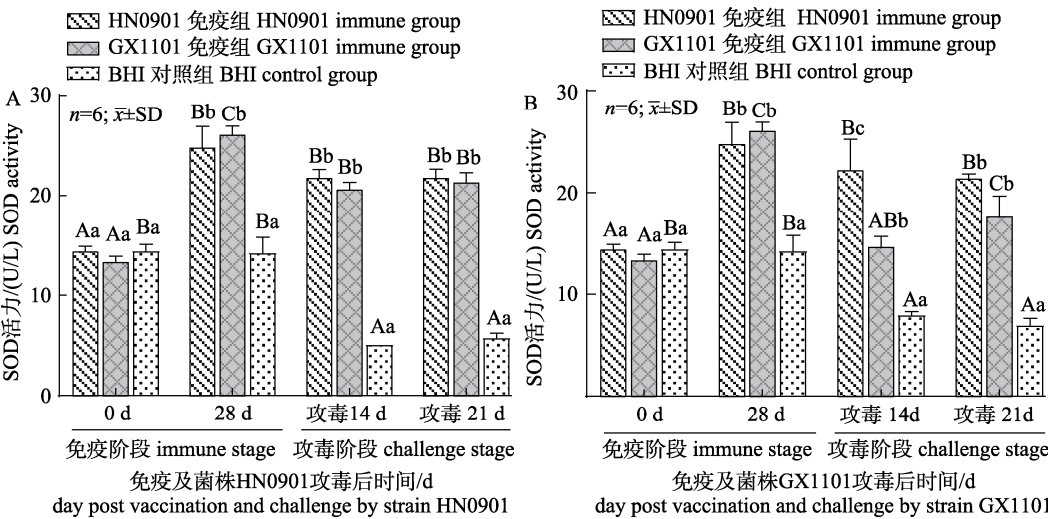


图 3 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清超氧化物歧化酶(SOD)活力
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Serum SOD activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

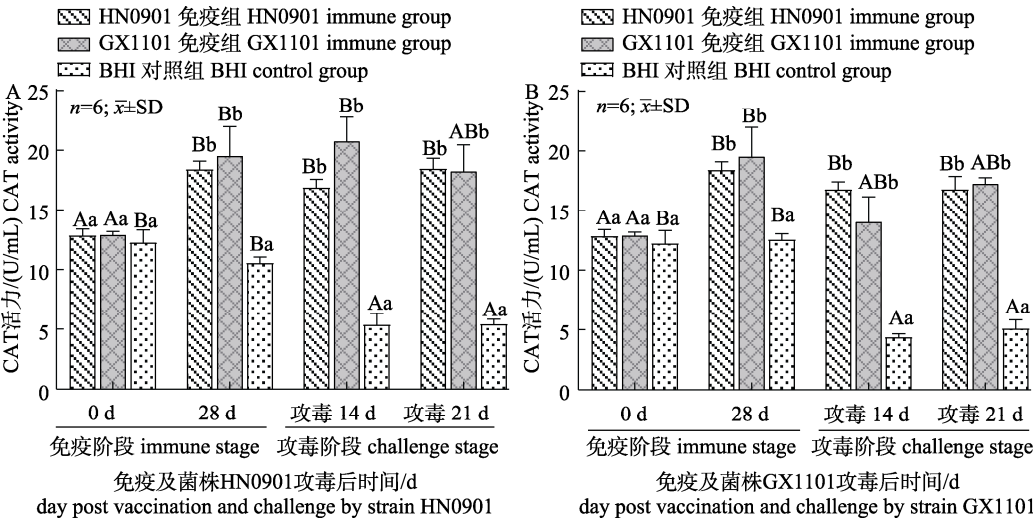


图 4 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清过氧化氢酶(CAT)活力
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Serum CAT activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

在显著性差异($P>0.05$), 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组罗非鱼血清 MDA 含量显著低于对照组($P<0.05$)。在同/异源无乳链球菌攻毒

后, 各组在攻毒后 14 d 的血清 MDA 含量显著升高($P<0.05$), 但对照组的值显著高于免疫组; 在攻毒后 21 d 恢复到免疫前水平(图 5)。

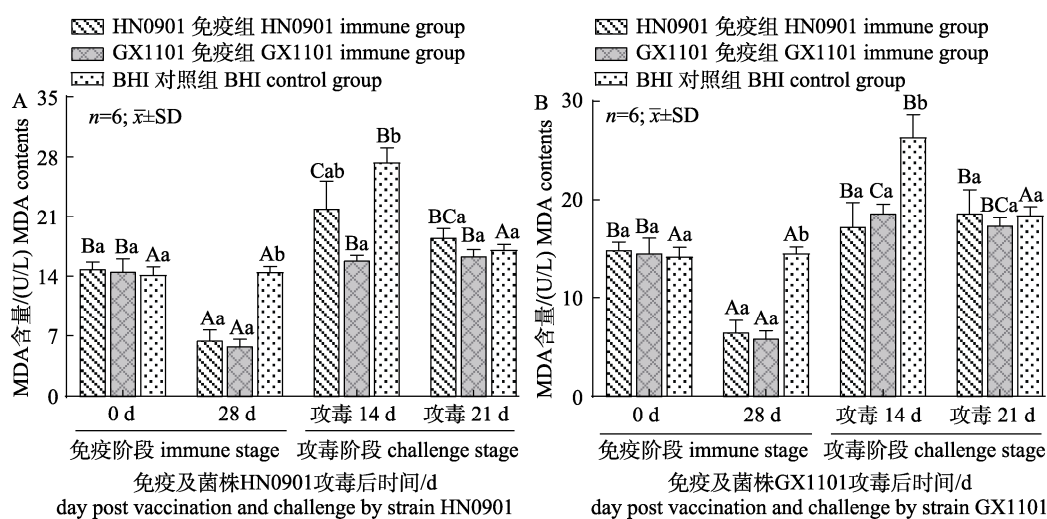


图 5 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后血清丙二醛(MDA)活力

图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Serum MDA activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

2.4 免疫相关基因的表达量变化

免疫前和免疫 28 d 各组罗非鱼肝脏 *TNF-α* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。各组攻毒 HN0901 菌株后 14 d 两个免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 其中 HN0901 免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著升高($P<0.05$); 各组攻毒 GX1101 菌株后 14 d 两个免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著升高($P<0.05$), 而且显著高于对照组($P<0.05$)。同/异源无乳链球菌攻毒后 21 d, 两个免疫组 *TNF-α* 下降至免疫后 28 d 时水平, 与对照组不存在显著性差异; 对照组在攻毒前后的 *TNF-α* 表达量无显著性差异($P>0.05$, 图 6)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 *IL-1β* 表达量无显著性差异($P>0.05$), 免疫 28 d 两个免疫组肝脏 *IL-1β* 表达量显著高于对照组($P<0.05$)。对各组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 各组肝脏 *IL-1β* 表达量都显著升高($P<0.05$), 两个免疫组肝脏 *IL-1β* 表达量在攻毒后 14 d 和 21 d 都显著高

于对照组($P<0.05$, 图 7)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 *TGF-β* 表达量无显著性差异($P>0.05$), 免疫 28 d HN0901 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量显著升高($P<0.05$)。对各组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), GX1101 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量比免疫后 28 d 显著性升高($P<0.05$)。攻毒后 21 d 两个免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量下降至与对照组同一水平(图 8)。

免疫前和免疫后 28 d 各组罗非鱼肝脏 *HSP70* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。对各组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 免疫组肝脏 *HSP70* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 且比免疫期间显著升高($P<0.05$), 对照组在攻毒前后的 *HSP70* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。其中 HN0901 菌株攻毒后 21 d HN0901 免疫组 *HSP70* 表达量下降, 但仍高于攻毒前 *HSP70* 表达量; GX1101 菌株攻毒后 21 d 两个免疫组的肝脏 *HSP70* 表达量降至免疫

28 d 时的水平(图 9)。

免疫前和免疫后 28 d 各组罗非鱼肝脏 MHC II 表达量无显著性差异($P>0.05$)。对各组进行

HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒 14 d 后两个免疫组肝脏 MHC II 表达量显著升高($P<0.05$), 并且显著高于对照组($P<0.05$)。对照组在 HN0901

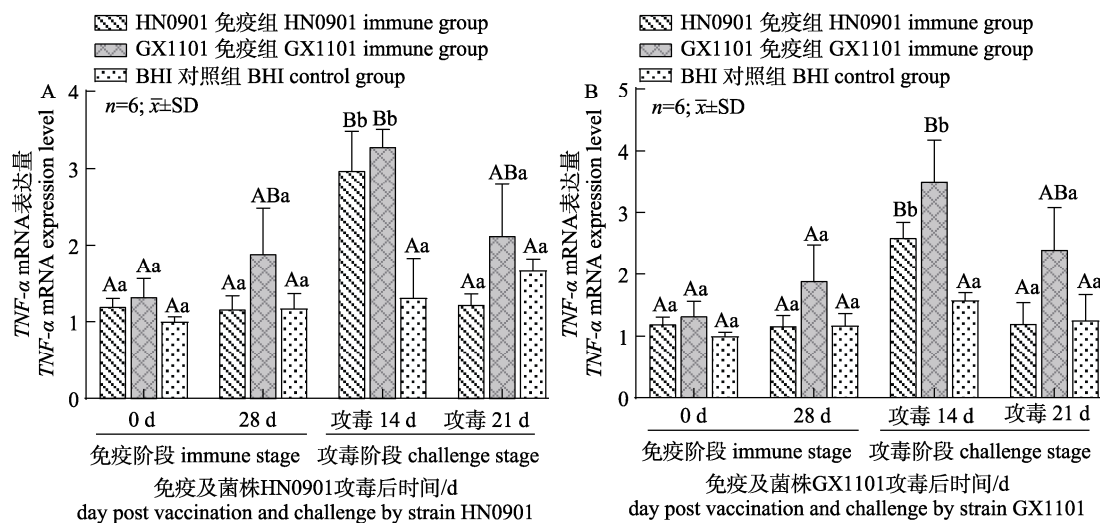


图 6 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后肝脏 *TNF-α* mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 The change of *TNF-α* mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

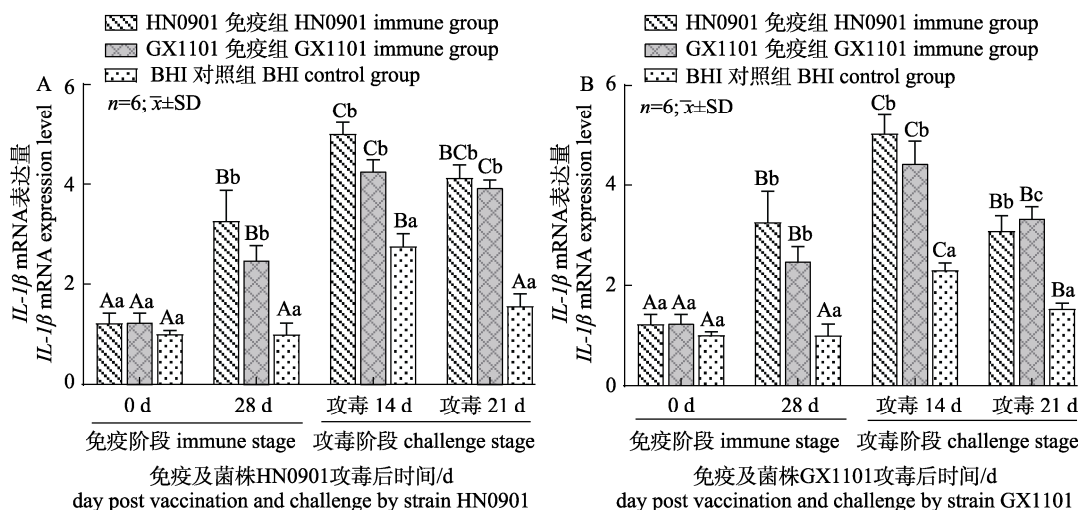


图 7 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后肝脏 *IL-1β* mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 7 The change of *IL-1β* mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

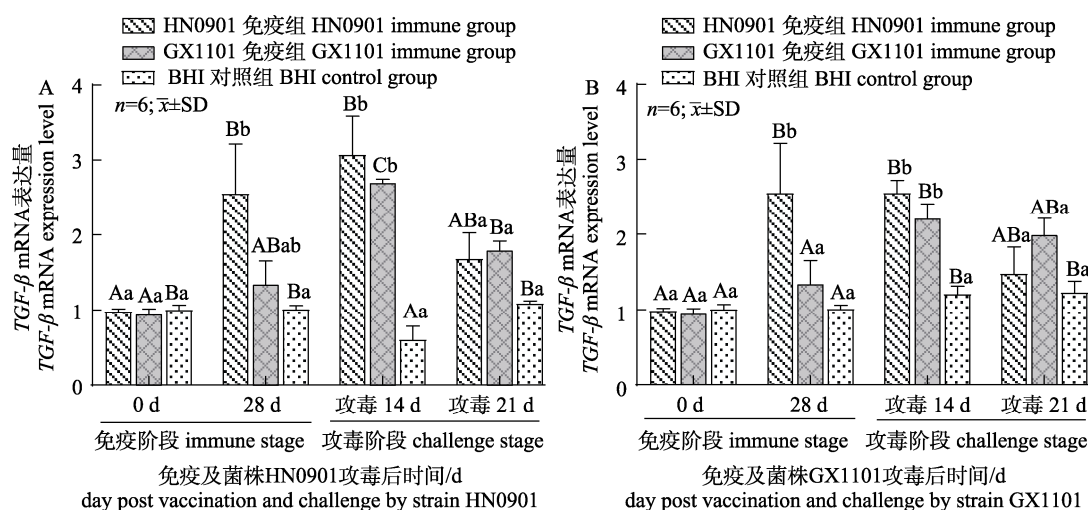


图 8 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 $TGF-\beta$ mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著 ($P < 0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 8 The change of $TGF-\beta$ mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P < 0.05$).

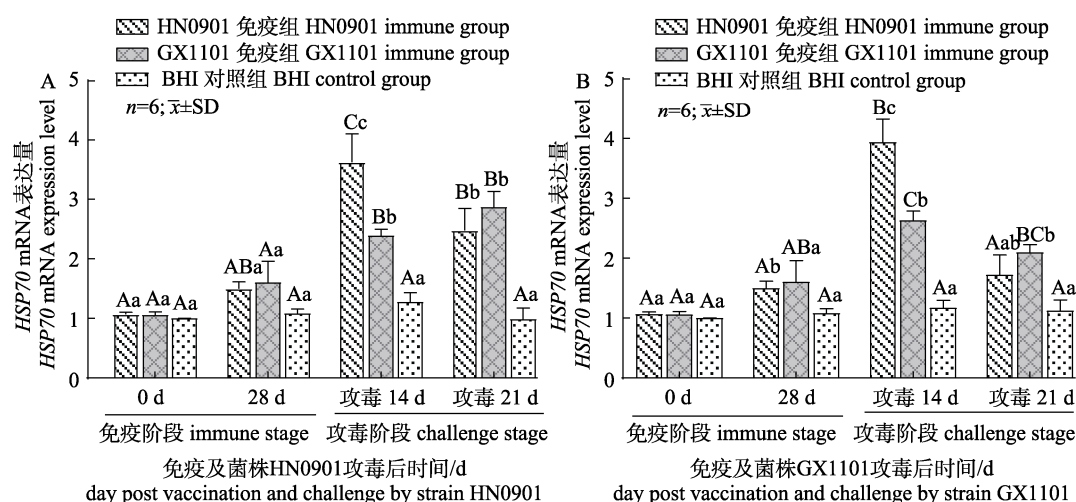


图 9 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 HSP70 mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著 ($P < 0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 9 The change of HSP70 mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P < 0.05$).

菌株攻毒前后的 MHC II 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), 在 GX1101 菌株攻毒后 14 d MHC II 表达量显著升高 ($P < 0.05$)。GX1101 菌株攻毒后 21 d, 各组 MHC II 表达量恢复至免疫水平 (图 10)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 IgM 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$), 免疫 28 d 两个免疫组肝脏 IgM 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对各组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 和 21 d

两个免疫组 IgM 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 对照组在攻毒后 14 d 的 IgM 表达量已恢复到攻毒前水平($P>0.05$, 图 11)。

2.5 抗体效价

ELISA 检测结果表明, 罗非鱼注射无乳链球菌胞外产物灭活疫苗后血清的抗体效价可达到

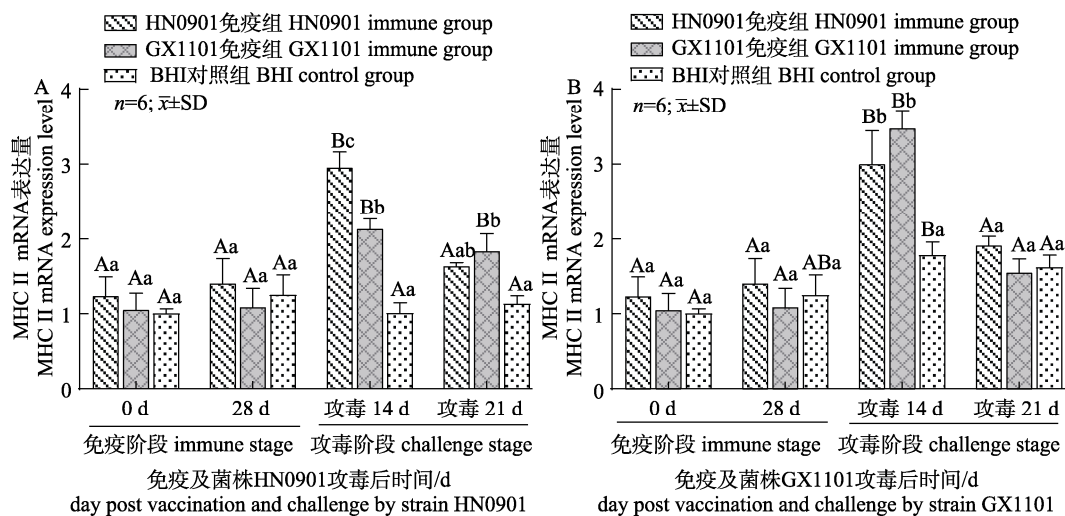


图 10 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后肝脏 MHC II mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 10 The change of MHC II mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

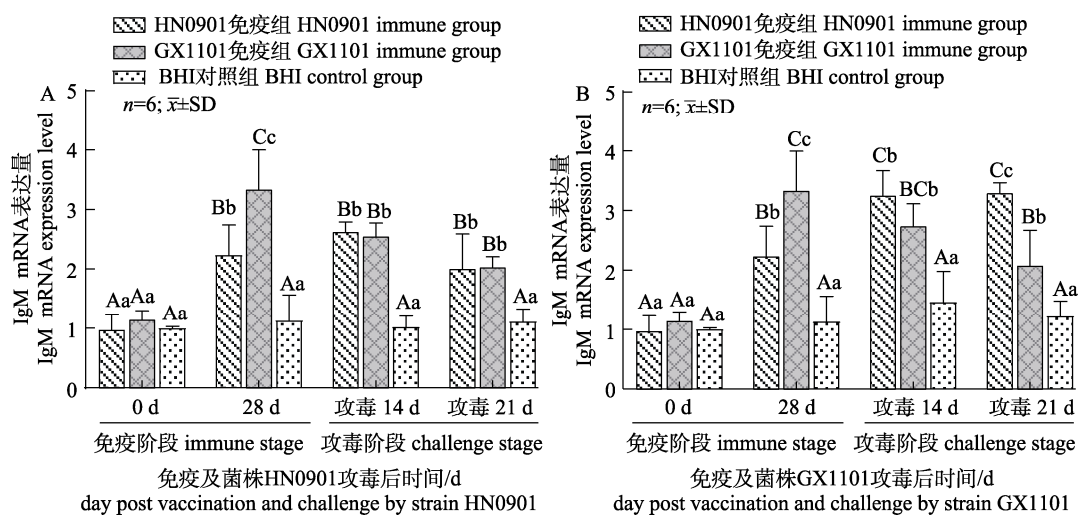


图 11 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后肝脏 IgM mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 11 The change of IgM mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

1 : 6400。从图 12 可见, 免疫前各组之间血清抗体效价无显著性差异($P>0.05$), 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的抗体效价均显著高于对照组($P<0.05$)。用菌株 HN0901 攻毒后, HN0901 免疫组的抗体效价显著高于免疫 28 d 时的抗体效价。用菌株 GX1101 攻毒后, 两个免疫组在攻毒后 14 d 和 21 d 的抗体效价都显著高于攻毒后的对照组。

2.6 疫苗的免疫保护实验

罗非鱼免疫 28 d 后各组分别腹腔注射无乳链球菌 HN0901 菌株和 GX1101 菌株, 12 h 开始出现

死亡, 对照组罗非鱼在攻毒后 4 d 死亡率就达到 95%; 免疫组死亡持续一周, 死亡率在 50%~65% 之间, 一周后鱼不再死亡。攻毒后, 病鱼表现出典型链球菌病症状, 病鱼转圈, 泳姿失衡, 眼球突出; 分离并鉴定了死亡罗非鱼脑中的病原菌, 通过 API 20 Strep 试剂条检测均为无乳链球菌。无乳链球菌 HN0901 菌株攻毒后, HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的相对保护率分别为 31.6% 和 36.8%。GX1101 菌株攻毒后, HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的相对保护率分别为 47.4% 和 42.2% (表 2)。

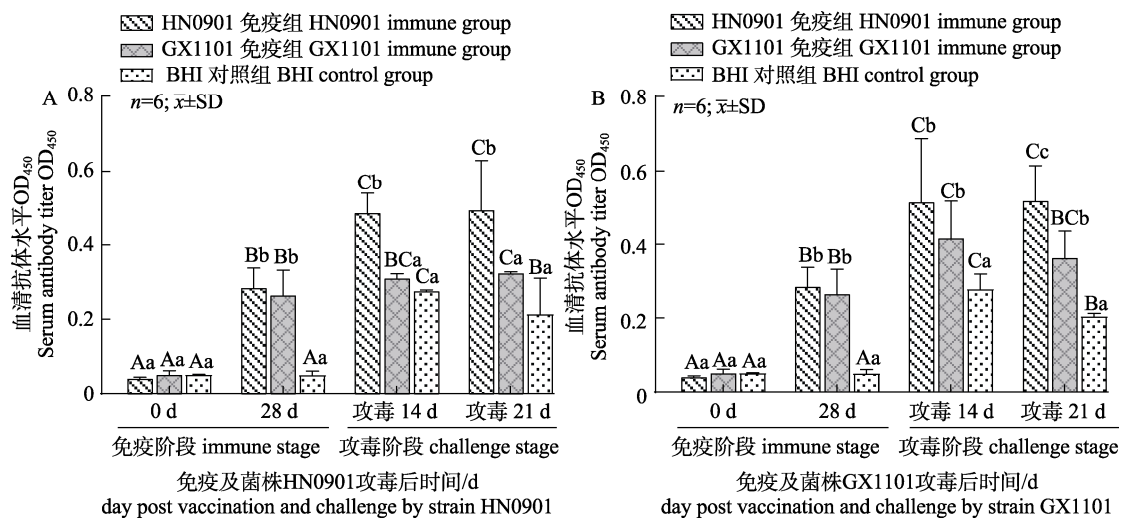


图 12 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后的血清效价
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著 ($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 12 Serum antibody levels in in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

表 2 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒后各组奥尼罗非鱼免疫保护率
Tab. 2 Relative protection rate of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) challenged by HN0901 and GX1101 strains

攻毒菌株 strain	组别 group	鱼总数/尾 fish number	死亡数/尾 death number	死亡率/% death rate	存活率/% survival rate	免疫保护率/% RPS	P
HN0901	BHI 对照组 BHI control group	20	19	95	5		
	HN0901 免疫组 HN0901 immune group	20	13	65	35	31.6	<0.05
	GX1101 免疫组 GX1101 immune group	20	12	60	40	36.8	<0.05
GX1101	BHI 对照组 BHI control group	20	19	95	5		
	HN0901 免疫组 HN0901 immune group	20	10	50	50	47.4	<0.05
	GX1101 免疫组 GX1101 immune group	20	11	55	45	42.2	<0.05

3 讨论

无乳链球菌作为引起罗非鱼链球菌病的主要病原之一,对全世界罗非鱼产业具有严重的危害性^[20-21]。疫苗接种仍然是控制致病病原体最合适的方法,用单一细菌分离株制备的疫苗免疫的鱼总是缺乏对其他菌株或血清型的交叉保护。经过近10年的流行病学调查,发现无乳链 I a 型是罗非鱼感染中最常见的血清型,占无乳链球菌分离株的90%以上^[18]。本实验选用两株无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 血清型都是 I a 型,基因型 I 型和 IV 型分别对应 Chen 等^[2]研究中的基因型 F 型和 D 型,是我国罗非鱼源无乳链球菌的优势基因型。作者分别制备 10% 甲醛溶液灭活的胞外产物疫苗,采用腹腔注射的方法对罗非鱼进行免疫,以诱导鱼体产生抗体,减少罗非鱼感染链球菌后死亡。

3.1 疫苗对罗非鱼血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶的影响

ALT 和 AST 是肝脏中最重要的转氨酶之一,肝损伤会改变它们的转运功能和膜通透性,导致 ALT 和 AST 从细胞渗漏到血清,血清中转氨酶的活性明显升高,可作为肝脏受损的指示指标^[22]。Chen 等^[23]研究表明罗非鱼感染创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)后肝脏受损程度与 AST、ALT 呈正相关。罗非鱼感染无乳链球菌后 ALT 和 AST 都显著升高^[24]。在本实验中,免疫 28 d 后免疫组血清 AST 和 ALT 活性显著高于对照组,说明免疫接种对罗非鱼肝脏造成了一定的损伤;但攻毒后对照组血清 AST 和 ALT 活性在攻毒后 21 d 都是成倍性显著上升,且显著高于免疫组,而 HN0901 免疫组在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 血清 ALT 和 AST 活力恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组在攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平,表明无乳链球菌胞外产物灭活疫苗虽然对罗非鱼肝脏有一定的应激,但能对无乳链球菌感染造成的肝损伤起到修复作用。

3.2 疫苗对罗非鱼血清中抗氧化指标和丙二醛含量的影响

在鱼类中, SOD 和 CAT 的抗氧化反应是抵御

氧化应激的第一道防御措施。超氧化物歧化酶催化细胞内的氧自由基生成过氧化氢,而过氧化氢酶将过氧化氢分解为水和氧^[25]。本实验中免疫后 28 d 两个免疫组罗非鱼血清中 CAT 和 SOD 活性显著高于对照组,说明灭活疫苗免疫后可以提高罗非鱼血清中 CAT 和 SOD 酶活性,这与 Wang 等^[26]的研究结果一致。免疫组无乳链球菌攻毒后血清 CAT 和 SOD 活性无显著性差异,而对照组血清 CAT 和 SOD 活性显著下降,这与之前研究不同,可能是因为采样的时间点不同,鱼体免疫状态不同。据报道,在感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)后 7 d 牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)中 SOD、CAT 和 GST 活性显著升高^[27]。对照组血清 CAT 和 SOD 活性的下调表明,清除超氧阴离子自由基、氧代谢和免疫反应的作用减弱,而免疫组提高了鱼体抗氧化能力提高^[28]。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物,具有细胞毒性,它的含量代表了膜的过氧化程度,间接反映了机体的抗氧化能力^[25]。祝璟琳等^[29]研究表明吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus* GIFT strain)感染无乳链球菌后体内 MDA 含量显著提高。在本实验中,免疫组的 MDA 含量显著低于对照组,对各组的罗非鱼分别攻毒不同无乳链球菌菌株,对照组的血清 MDA 含量显著高于免疫组,说明对照组罗非鱼机体受到损伤,而免疫组则减少了脂质过氧化 MDA 的产生。

3.3 疫苗对罗非鱼免疫相关基因表达量的影响

硬骨鱼的肝脏是感染期间免疫调节的重要部位。*TNF- α* 和 *IL-1 β* 是疫苗效力的促炎指标,它们通过促进吞噬、淋巴细胞活化和白细胞的迁移,在对细菌感染的即时和早期反应中发挥重要作用^[30]。*TGF- β* 是重要的抗炎细胞因子,可以抵消促炎细胞因子的产生,限制炎症反应、病原体感染和组织炎症^[31]。接种无乳链球菌后,应激组罗非鱼炎症相关基因(*TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-10*)的转录水平显著升高^[28]。但持续的炎症反应也可能造成组织损伤,降低对无乳链球菌的抵抗力,这对鱼类可能是致命的^[32]。Wang 等^[33]研究表明在免疫后 35 d 整个观察期内,福尔马林灭活疫苗接种后的免疫罗非鱼中头肾和脾脏的 *IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *TGF- β* 的

基因表达显著高于 PBS 假免疫的对照组。本实验中两个免疫组在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 肝脏 $TNF-\alpha$ 和 $TGF-\beta$ 表达量显著高于对照组, $IL-1\beta$ 表达量在免疫和攻毒后的表达量都显著高于对照组, 而对照组 $TNF-\alpha$ 在免疫和攻毒后表达没有显著性变化。推测疫苗刺激鱼体产生促炎因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 与抗炎因子 $TGF-\beta$, 彼此相互作用, 起到控制炎症和对抗病原体感染的作用; 之前报道罗非鱼 $TNF-\alpha$ 表达水平在攻毒后 7 d 也显著升高^[28], 但本实验结果表明 $TNF-\alpha$ 在攻毒后 14 d 已降低到免疫和攻毒前水平。

HSP70 是一种高度保守的应激蛋白, 有助于促进变性蛋白的重新折叠, 并靶向降解受损蛋白^[34]。细菌刺激后大量诱导的 HSP70 可能参与了鱼类的免疫反应^[35]。硬骨鱼 HSP70 可能通过诱导产生促炎细胞因子参与免疫调节^[36]。本实验中, 在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 免疫组肝脏 HSP70 表达量显著高于对照组, 且比免疫期间显著升高, 说明灭活疫苗对机体产生了免疫刺激, 使机体在受到病原菌刺激时能够迅速做出反应。而对照组 HSP70 在免疫和攻毒后表达没有显著性变化, 可能是因为本实验采样间隔时间较长, 应激蛋白 HSP70 的表达水平已经恢复正常。高度多态的 MHC 分子在抗原处理和提呈途径中起着核心作用, MHC I 将内源性抗原递呈给 $CD8^+T$ 细胞, MHC II 结合细胞外抗原并呈递给 $CD4^+T$ 细胞^[37]。对于罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染来说, MHC II 比 MHC I 更重要^[38]。在本实验中, 免疫组和对照组在免疫后 28 d 和免疫前没有显著性变化, 在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 免疫组肝脏 MHC II 表达量显著高于对照组, 21 d 后恢复至攻毒前水平。表明灭活疫苗在免疫后能够使机体在受到外源病原体侵害时, 通过提升抗原呈递能力增强罗非鱼的获得性免疫。IgM 被称为鱼类的主要抗体, 也是硬骨鱼体液免疫系统的主要组成部分, 可能有助于确定和中和外来抗原, 如细菌和病毒^[39]。Mo 等^[16]研究表明免疫鱼体中 IgM 的表达水平与抗体水平相关。宋晓青等^[40]研究表明牙鲆经注射和浸泡免疫鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 灭活疫苗后, IgM 在脾和头

肾中的表达量在 14 d 内逐渐上升。类似的, 本实验中两个免疫组肝脏 IgM 表达量免疫后 28 d 显著上调, 且在免疫后和攻毒后都显著高于对照组, 而对照组 IgM 在免疫后 28 d 无显著性变化, 说明免疫组在攻毒前就产生了抗体, 对照组在感染前没有产生抗体。对照攻毒结果, 说明免疫球蛋白 IgM 在罗非鱼抵御无乳链球菌中起着至关重要的作用。

3.4 疫苗对罗非鱼抗体效价的影响

硬骨鱼具有一个相对完善的免疫系统, 当鱼体受到病原菌刺激时, 免疫器官被激活, 产生相应的应答反应调节机体免疫。Munang'Andu 等^[41]提出抗体可能是鱼类疫苗保护性免疫的最可靠的相关因素。Pasnik 等^[42]研究表明抗无乳链球菌的特异性抗体在鱼类对无乳链球菌的免疫中起主要作用。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等免疫分析方法被广泛用于评价疫苗诱导的抗体反应, 本实验研制的两种无乳链球菌胞外产物灭活疫苗在免疫后和攻毒期的抗体效价显著提高, 且显著高于对照组。其结果与海豚链球菌胞外产物灭活疫苗接种的结果一致, 罗非鱼抗体滴度显著升高^[19,43], 以及通过被动免疫实验证明了抗体的特异性保护作用^[44]。浓缩的胞外产物上清液在巨噬细胞中诱导趋化反应, 并且这种促炎反应可能有助于有效的免疫反应^[45]。

3.5 疫苗对罗非鱼的免疫保护效果

国外对罗非鱼无乳链球菌疫苗的研究较早, 并取得了一定的成效。用无乳链球菌胞外产物疫苗攻毒罗非鱼, 在 30~32 °C 下每尾鱼腹腔注射 $1.5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ CFU 的无乳链球菌后, 产生 62%~96.4% 的相对免疫保护率^[6,46-47]。本实验的两个单一灭活疫苗在罗非鱼腹腔注射接种后, 在同源和异源无乳链球菌攻毒后对相应病原体的感染均有保护作用, 相对免疫保护率在 31.6%~47.4% 不等, 与 Ramos-Espinoza 等^[48]的结果类似。其研究发现无乳链球菌替代灭活疫苗和常规甲醛疫苗之间具有同等的中等疫苗效力, 相对保护率在 33.3%~60%^[48]。关于无乳链球菌注射攻毒实验的研究表明, 鱼体死亡率取决于几个因素, 包括注射的菌量、鱼的重量、禁食和水质条件^[28]。本研究无乳

链球菌攻毒菌量为 1×10^8 CFU/尾鱼, 远高于之前的研究^[6,46-47], 造成了免疫组较高的死亡率, 因此推断攻毒细菌浓度过高影响了两个灭活疫苗的效力^[48]。一些研究表明, 与单价疫苗相比, 多价疫苗中不同细菌的某些组合可以增强保护作用, 如创伤弧菌和海豚链球菌合在一起可以诱导协同免疫效应^[49]。因此下一步可以在本研究基础上开展双价疫苗的研究, 预期可以取得更高的免疫保护率。

本研究针对我国血清型 I a 型, 但分属不同优势基因型的两株无乳链球菌, 研制了异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗, 使其免疫罗非鱼后, 能够显著诱导罗非鱼体内的免疫应答, 产生中等疫苗效力, 并对同源和异源无乳链球菌都具有免疫保护能力。本研究结果为深入研究罗非鱼链球菌病的免疫预防技术和研制二价疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2020 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 25. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 25.]
- [2] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3-4): 526-530.
- [3] Zhu J L, Yang H, Zou Z Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Streptococcus* from tilapias *Oreochromis niloticus* cultured in Hainan[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(4): 590-596. [祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596.]
- [4] Baquero F, Martínez J L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(3): 260-265.
- [5] Squadrone S. Water environments: Metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2020, 192(4): 238.
- [6] Evans J J, Klesius P H, Shoemaker C A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration[J]. Vaccine, 2004, 22(27-28): 3769-3773.
- [7] Pasnik D J, Evans J J, Panangala V S, et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(4): 205-212.
- [8] He Y, Wang K Y, Xiao D, et al. A recombinant truncated surface immunogenic protein (tSip) plus adjuvant FIA confers active protection against Group B *Streptococcus* infection in tilapia[J]. Vaccine, 2014, 32(51): 7025-7032.
- [9] Cai Y Z, Liu Z G, Lu M X, et al. Preparation of live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing Sip protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and immunogenicity analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(3): 661-670. [蔡玉臻, 刘志刚, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼无乳链球菌 Sip 蛋白乳酸菌活载体口服疫苗的研制及其免疫效果[J]. 水产学报, 2019, 43(3): 661-670.]
- [10] Li Q Y, Ke X L, Lu M X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of C5a peptidase (ScpB) of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. Journal of Fisheries Sciences of China, 2014, 21(1): 169-179. [李庆勇, 可小丽, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶(ScpB)的原核表达及其免疫原性[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 169-179.]
- [11] Huang L Y, Wang K Y, Xiao D, et al. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 34-41.
- [12] Zhu L, Yang Q, Huang L Y, et al. Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 77: 77-87.
- [13] Wang B, Li G H, Lu Y S, et al. Chimeric DNA vaccine development and protective immunity analysis of Sip-GAPDH of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(11): 1926-1936. [王蓓, 李桂欢, 鲁义善, 等. 无乳链球菌 Sip-GAPDH 嵌合核酸疫苗的制备及免疫效果评价[J]. 水产学报, 2014, 38(11): 1926-1936.]
- [14] Li L P, Wang R, Liang W W, et al. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 955-963.
- [15] Liu L, Lu D Q, Xu J, et al. Development of attenuated erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture[J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(5): 693-701.

- [16] Mo X B, Wang J, Guo S, et al. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2020, 518: 734774.
- [17] Zhang D F, Gao Y X, Li Q Y, et al. An effective live attenuated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 853-859.
- [18] Zhang D F, Liu L H, Ren Y, et al. Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 1044-1054. [张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1044-1054.]
- [19] Shoemaker C A, LaFrentz B R, Klesius P H, et al. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(7): 537-544.
- [20] Legario F S, Choresca C H, Turnbull J F, et al. Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Philippines[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(11): 1431-1442.
- [21] Syuhada R, Zamri-Saad M, Ina-Salwany M Y, et al. Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734543.
- [22] Mao X B, Tian Y, Wen H S, et al. Effects of *Vibrio harveyi* infection on serum biochemical parameters and expression profiles of interleukin-17 (IL-17) / interleukin-17 receptor (IL-17R) genes in spotted sea bass[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 110: 103731.
- [23] Chen C Y, Wooster G A, Bowser P R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate[J]. Aquaculture, 2004, 239(1-4): 421-443.
- [24] Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, et al. Study on resistant difference among four bleeding species of tilapia *Oreochromis* spp. following *Streptococcus agalactiae* challenge[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 6(41): 1222-1241. [祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 四个罗非鱼选育品种抗链球菌病能力差异研究[J]. 水生生物学报, 2017, 6(41): 1232-1241.]
- [25] Lee J W, Choi H, Hwang U K, et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 68: 101-108.
- [26] Wang Q S, Fu T Z, Li X C, et al. Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccines[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 382-389.
- [27] Kim J H, Sohn S, Kim S K, et al. Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 194-203.
- [28] He R Z, Li Z C, Li S Y, et al. Development of an immersion challenge model for *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735877.
- [29] Zhu J L, Ji H T, Xiao W, et al. Protective effects from *Houttuynia cordata* against *Streptococcus agalactiae*-induced liver injury of GIFT *Oreochromis niloticus* strain[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(7): 1187-1197. [祝璟琳, 季桓涛, 肖伟, 等. 鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复作用[J]. 水产学报, 2020, 44(7): 1187-1197.]
- [30] Wang Q C, Ji W, Xu Z. Current use and development of fish vaccines in China[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 96: 223-234.
- [31] Wang J X, Liang D Z, Yang Q H, et al. The effect of partial replacement of fish meal by soy protein concentrate on growth performance, immune responses, gut morphology and intestinal inflammation for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 619-631.
- [32] Ishibe K, Yamanishi T, Wang Y J, et al. Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 386-389.
- [33] Wang Q S, Wang X P, Wang X M, et al. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 49-56.
- [34] Roberts R J, Agius C, Saliba C, et al. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(10): 789-801.
- [35] Han Y L, Hou C C, Du C, et al. Molecular cloning and expression analysis of five heat shock protein 70 (HSP70) family members in *Lateolabrax maculatus* with *Vibrio harveyi* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 60: 299-310.
- [36] Zhang A Y, Guo Y F, Zhang S N, et al. Cytokine effects and

- cellular signaling pathways of grass carp HSP70 in head kidney leukocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 550-556.
- [37] Ackerman A L, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(7): 678-684.
- [38] Zhang L G, Wang C, Liu H, et al. The important role of phagocytosis and interleukins for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to defense infection of *Aeromonas hydrophila* based on transcriptome analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 54-63.
- [39] Yılmaz S, Ergün S. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 140-157.
- [40] Song X Q, Xing J, Zhan W B. Variations of seven immune related genes expression in flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected and immersed with inactivated *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 747-758. [宋晓青, 邢婧, 战文斌. 牙鲆经注射和浸泡免疫鳃弧菌灭活疫苗后7种免疫相关基因表达的变化[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 747-758.]
- [41] Munang'Andu H M, Evensen Ø. Correlates of protective immunity for fish vaccines[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 85: 132-140.
- [42] Pasnik D J, Evans J J, Klesius P H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 365-371.
- [43] Klesius P H, Shoemaker C A, Evans J J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2000, 188(3-4): 237-246.
- [44] Shelby R A, Klesius P H, Shoemaker C A, et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(1): 1-6.
- [45] Klesius P H, Evans J J, Shoemaker C A. The macrophage chemotactic activity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* extracellular products (ECP)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 443-450.
- [46] Pretto-Giordano L G, Müller E E, Klesius P, et al. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 41(10): 1539-1544.
- [47] Pasnik D J, Evans J J, Klesius P H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(2): 129-134.
- [48] Ramos-Espinoza F C, Cueva-Quiroz V A, Yunis-Aguinaga J, et al. A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735484.
- [49] Shoemaker C A, LaFrentz B R, Klesius P H. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 354-355: 45-49.

Immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous *Streptococcus agalactiae* extracellular product in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂)

ZHU Jinglin^{1,2}, ZOU Zhiying¹, LI Dayu¹, XIAO Wei¹, YU Jie¹, CHEN Binglin¹, MA Wenjing², YANG Hong¹, SHEN Jinyu³

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
3. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China

Abstract: To study the immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous *Streptococcus agalactiae* extracellular product in tilapia (*Oreochromis niloticus*), two strains of *S. agalactiae* (HN0901 and GX1101) were cultured, and highly efficacious vaccines were developed using extracellular products and formalin-killed whole cells of HN0901 and GX1101. The vaccine was administered by intraperitoneal (i.p.) injection in a volume of 0.2 mL, and sham-vaccinated (control) fish were i.p. injected with the same volume of sterile BHI. At 28 d post-vaccination (DPV), the fish were challenged, i.p. injection, with approximately 1.0×10^8 CFU of homologous or heterologous *S. agalactiae* to determine the efficacy of protective immunity. The immune response and serum antibody titer of the immunized and post-injected tilapia were measured, and the relative immune protection rate and cross-immune protection rate were compared. The results showed that the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels of immunized fish were significantly higher than those of control fish at 28 DPV but significantly lower than those of control fish post injection. Compared with the control fish, the levels of superoxide dismutase and catalase in immunized fish increased in varying degrees after immunization and challenge, while malondialdehyde levels decreased significantly ($P < 0.05$). The results of real-time quantitative polymerase chain reaction also indicated that *TNF- α* , *IL-1 β* , *TGF- β* , *HSP 70*, MHC II, and IgM expression levels showed different degrees of significant increase and were higher than those in the control group after immunization and challenge ($P < 0.05$). Serum antibody titer reached 1 : 6400 at 28 DPV, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The relative percentage of survival ranged from 31.6% to 47.4% after the homologous or heterologous *S. agalactiae* challenge. Furthermore, the developed inactivated vaccines significantly induced an immune response in tilapia and produced moderate vaccine efficacy. Administration of the single isolate HN0901 or GX1101 vaccine via i.p. injection was marginally protective in preventing streptococcal disease caused by homologous or heterologous isolates of *S. agalactiae*. Our findings laid a foundation for further studies on immune prevention technology against streptococcosis in tilapia and the development of bivalent vaccines.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; extracellular product; inactivated vaccine; immune protection; hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂)

Corresponding author: YANG Hong, E-mail: yanghong@ffrc.cn; SHEN Jinyu, E-mail: sjinyu@126.com