

## 中国沿海三疣梭子蟹脂肪酸指纹标记的多元分析

董志国<sup>1,2,3</sup>, 沈双焯<sup>4</sup>, 李晓英<sup>2</sup>, 阎斌伦<sup>2</sup>, 孙效文<sup>3\*</sup>

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

4. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为探明分布于中国四大海区的天然三疣梭子蟹群体脂肪酸组成状况及群体差异, 并建立群体判定的指纹标记以应用于种质鉴定和资源保护, 实验应用脂肪酸指纹标记结合多元分析方法在表型水平上研究中国四大海区中湛江、大连、连云港、东营、舟山和漳州海区 6 个天然群体秋冬季三疣梭子蟹的脂肪酸差异, 并建立了群体判定的脂肪酸指纹标记。结果表明, 四大海区 6 群体三疣梭子蟹脂肪酸存在显著差异 ( $P < 0.01$ ), 均含有 27 种脂肪酸。其中, 反式油酸、棕榈酸、DHA、EPA 和芥酸这 5 种脂肪酸的总含量在 6 群体中均高达 82% 以上。油酸、二十碳一烯酸、芥酸、ARA 和 EPA 这 5 种脂肪酸作为脂肪酸指纹标记可以有效的对中国四大海区的 6 群体秋冬季雌性三疣梭子蟹进行种质鉴定, 其综合判别准确率达 88.46%。应用所含的 27 种脂肪酸进行聚类分析显示, 四大海区 6 群体三疣梭子蟹系统聚类结果与地理距离不具有显著相关性, 这种脂肪酸组成的群体差异可能与栖息地食物组成差异有关。本研究结果对于中国四大海区三疣梭子蟹的种质鉴定和原产地资源保护具有一定应用价值。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 地理群体; 脂肪酸; 气相色谱法; 多元分析; 指纹标记

**中图分类号:** Q 346; S 917.4

**文献标志码:** A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*), 属十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae), 广泛分布于中国、日本和朝鲜<sup>[1]</sup>, 是沿海重要的渔业资源。2010 年中国梭子蟹海洋捕捞产量达 35 万吨<sup>[2]</sup>, 但近年来资源已呈现显著的衰退趋势<sup>[3]</sup>。分布于中国四大海区的天然三疣梭子蟹群体表型差异研究相对较少, 仅见陈萍等<sup>[4]</sup>对海州湾、舟山沿海、辽东湾、莱州湾 4 个地理群体三疣梭子蟹免疫生理研究并发现 4 群体中海州湾群体的超氧化物歧化酶 (SOD) 显著高于莱州湾群体, 而对谷胱苷肽过氧化物酶 (GSH-px) 研究也具有同样的规律。高保全等<sup>[5]</sup>在对来自舟山种群、莱州湾种群和海州湾种群自繁一代的 120 日龄三疣梭子蟹生长发育和存活率的研究表明, 海州湾连云港群体在全甲长和体质量等 6 个生长相关性状方面均极

显著低于莱州湾和舟山野生种群 ( $P < 0.01$ )。对三疣梭子蟹群体形态多样性研究表明, 不同地理种群存在显著的差异, 但所有的差异均未达到亚种水平<sup>[6-7]</sup>。分子生物学的发展为揭示遗传变异提供了捷径, 应用分子标记对我国沿海三疣梭子蟹的群体遗传分析开展了一些研究, 冯冰冰等<sup>[8]</sup>研究我国沿海三疣梭子蟹 9 个野生群体线粒体 CR 和 COI 片段序列中发现, 群体间存在着一定的遗传差异。相关作者先后对山东半岛群体<sup>[9]</sup>、黄渤海及东海群体利用 16S rRNA gene、COI、D-loop 和微卫星等标记开展了一系列研究<sup>[10-12]</sup>, 但不同作者对中国沿海三疣梭子蟹地理群体的遗传分化与变异尚存在一定分歧, 需要进一步探讨中国沿海三疣梭子蟹种质资源状况。

脂肪酸是机体的主要能量来源之一, 对水生

收稿日期: 2012-04-10 修回日期: 2012-12-09

资助项目: 国家“十二五”科技支撑计划重大项目 (2011BAD138B03); 国家自然科学基金项目 (31072213); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题 (2006HS002)

通信作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

动物的生长、发育、繁殖以及其他的生理机能有着重要的意义。利用脂肪酸标志的示踪作用可以较准确地揭示特定类群在单一或不同生境中的食物来源差异以及某一特定复杂生境中不同类群生物的食物来源情况<sup>[13]</sup>。不同群体脂肪酸组成的特异性,可以用来作为指纹图谱进行种质鉴定,目前已在高等植物种质鉴定中取得广泛应用<sup>[14-15]</sup>,而水产动物的研究目前大多是从营养角度研究脂肪酸的差异<sup>[16-18]</sup>以及脂肪酸来源对水产动物的性腺发育与繁殖能力的影响<sup>[19-22]</sup>,以脂肪酸作为指纹标记对中国不同海区三疣梭子蟹的脂肪酸组成状况及群体差异分析,从而进行种质鉴定和群体系统分析,目前还未见相关的报道。本实验对秋冬季我国四大海区 6 个不同地理种群雌性三疣梭子蟹肌肉脂肪酸差异进行分析,并建立用于群体判定的指纹标记,为三疣梭子蟹种质鉴定、资源保护利用及系统地理学提供一定的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 本 采 集

试验所用三疣梭子蟹是经刺网渔船在大连海区(DL)、东营海区(DY)、连云港海区(LYG)、舟山海区(ZS)、漳州海区(ZZ)和湛江海区(ZJ)这 6 个作业海区采集的秋冬季雌性天然三疣梭子

蟹(表 1)。活体样本运到实验室后速冻于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰柜中,随机抽取部分样本真空冷冻干燥以进行脂肪酸测定。样本采集地理信息见图 1。

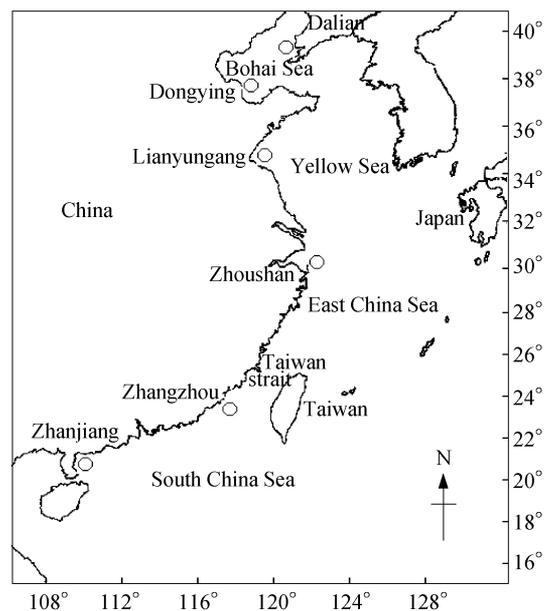


图 1 三疣梭子蟹的样本采集分布图

“O”代表采样地。

Fig. 1 Sample locations of *P. trituberculatus* along China coast

Locations of the 6 studied geographical populations along coast of China sea and the sample site are indicated by the circle.

表 1 三疣梭子蟹样本生物学数据

Tab. 1 Samples information of *P. trituberculatus*

群体 population	ZS	DL	LYG	DY	ZJ	ZZ
采样时间 sampling date	2005-09	2005-09	2005-10	2005-12	2005-12	2006-01
样本数目/个 sample number	30	22	31	33	36	19
背甲宽的均值/cm mean width of carapace	11.94	13.40	15.75	14.37	16.85	16.20
标准差 standard deviation	1.45	0.55	1.59	1.04	1.75	1.66

### 1.2 药 品 与 仪 器

氯仿-无水甲醇混合液、无水硫酸钠、氢氧化钾-甲醇(色谱级)、苯-石油醚混合液,均购自国药集团。

日本岛津公司 GC-2014 气相色谱仪、北京中惠普分析技术研究所 NHA300 氢氮空一体机、Eppendorf Research 公司 5301 型真空浓缩仪等。

### 1.3 试 验 方 法

蟹肉冷冻真空干燥并磨成粉末,取 0.5 g 蟹肉粉末于 25 mL 平底试管中,加入 2 mL 氯仿甲醇混合液(2:1),漩涡震荡 1 min,再加入 7 mL 氯仿甲醇混合液(2:1),静止抽提 4~8 h,真空抽

滤,所得滤液在真空浓缩仪中浓缩。在浓缩的脂肪中加入 1 mL 苯-石油醚混合液(1:1),静置 5 min,混匀,加入 1 mL KOH-甲醇溶液,处理 10~15 min,加入蒸馏水混匀,静置分层 20 min,取上层清液于 1.5 mL 已加无水硫酸钠 EP 管中,用岛津 GC-2014 气相色谱仪进行分析。

### 1.4 数 据 处 理

以各脂肪酸相对保留时间,作为定性依据,对谱图中的脂肪酸进行鉴定;据峰面积计算其含量,输入 MS-Excel。使用 STASTISTICA 99' edition 软件进行聚类分析、主成分分析和判别分析,方法同文献[6],脂肪酸群体间差异进行单因子方差

分析(以每种脂肪酸为变量为变量)和多因子方差分析(以全部 17 种脂肪酸),应用邓肯氏法进行多重比较。对地理距离和欧氏距离进行相关分析,以判断欧氏距离与地理距离的相关性,并进行卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 三疣梭子蟹的脂肪酸群体组成差异

检测到含有三疣梭子蟹 27 种脂肪酸,含量排在前五位的依次是反式油酸、棕榈酸、DHA、EPA 和芥酸,这 5 种脂肪酸的总含量在 6 群体中均高

达 82% 以上,其中 EPA 含量以 DY 群体最高,达 23.25%,但与 ZJ 群体无显著差异( $P > 0.05$ ),ZZ 群体最低但也高达 14.75%,DL 与 ZS 群体居中,二者差异不显著,但与其它群体差异显著( $P < 0.05$ )(表 2)。DHA 的含量也以 DY 群体最高,达 21.96%,与 DL、ZZ 相互间无显著差异,但显著高于 ZJ 群体( $P < 0.05$ )。以 27 种脂肪酸的相对含量为基础,进行多变量方差分析结果见表 3,结果显示群体之间均存在极显著差异( $P < 0.0001$ )。

表 2 6 群体三疣梭子蟹脂肪酸组成及差异  
Tab.2 Fatty acid composition and variation of six populations of swimming crab mean  $\pm$  SD

脂肪酸 fatty acid	DL <i>n</i> = 19	DY <i>n</i> = 19	LYG <i>n</i> = 15	ZJ <i>n</i> = 17	ZZ <i>n</i> = 19	ZS <i>n</i> = 16
肉豆蔻酸 C14:0	1.74 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	1.26 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	1.17 $\pm$ 0.60 <sup>bc</sup>	0.72 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup>	1.72 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.40 <sup>bc</sup>
肉豆蔻油酸 C14:1	0.07 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
十五碳酸 C15:0	0.40 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	0.65 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>	0.66 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
十五碳一烯酸 C15:1	0.13 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
棕榈酸 C16:0	21.21 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	16.87 $\pm$ 1.19 <sup>d</sup>	14.78 $\pm$ 1.24 <sup>e</sup>	16.23 $\pm$ 1.38 <sup>de</sup>	19.12 $\pm$ 4.10 <sup>c</sup>	19.25 $\pm$ 2.21 <sup>bc</sup>
棕榈油酸 C16:1	2.24 $\pm$ 2.25 <sup>ab</sup>	1.51 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 2.63 <sup>ab</sup>	3.71 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 1.43 <sup>b</sup>
十七碳酸 C17:0	1.27 $\pm$ 0.29 <sup>d</sup>	1.50 $\pm$ 0.13 <sup>cd</sup>	1.97 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	1.70 $\pm$ 0.21 <sup>bc</sup>	1.93 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	2.20 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
十七碳一烯酸 C17:1	0.64 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	0.49 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	2.16 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>
硬脂酸 C18:0	0.34 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	4.81 $\pm$ 3.63 <sup>a</sup>	3.58 $\pm$ 4.28 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	3.05 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup>
反式油酸 C18:1n9t	23.96 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	18.46 $\pm$ 3.32 <sup>b</sup>	15.92 $\pm$ 1.56 <sup>c</sup>	18.71 $\pm$ 3.69 <sup>b</sup>	21.72 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	12.81 $\pm$ 3.97 <sup>d</sup>
<b>油酸 C18:1n9c</b>	0.31 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2.96 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>
反式亚油酸 C18:2n6t	0.39 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	0.18 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
亚油酸 C18:2n6c	1.15 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	2.63 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	0.76 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>
花生酸 C20:0	0.23 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
$\gamma$ -亚麻酸 C18:3n6	0.25 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.13 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
<b>二十碳一烯酸 C20:1</b>	0.94 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
二十碳二烯酸 C20:2	0.91 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>
二十二碳酸 C22:0	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.70 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
二十碳三烯 C20:3n6	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.17 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.20 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
<b>芥酸 C22:1n9</b>	3.80 $\pm$ 0.56 <sup>f</sup>	5.81 $\pm$ 0.37 <sup>e</sup>	12.79 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>	10.66 $\pm$ 2.03 <sup>c</sup>	9.05 $\pm$ 1.67 <sup>d</sup>	14.46 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>
二十碳三烯 C20:3n3	0.17 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.23 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	0.08 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
<b>花生四烯酸 ARA C20:4n6</b>	0.18 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.49 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
二十二碳二烯酸 C22:2	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
<b>二十碳五烯酸 EPA C20:5n3</b>	17.72 $\pm$ 1.67 <sup>c</sup>	23.25 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	19.99 $\pm$ 2.82 <sup>b</sup>	21.96 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>	14.75 $\pm$ 1.59 <sup>d</sup>	17.26 $\pm$ 1.78 <sup>c</sup>
二十四碳酸 C24:0	0.19 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	0.06 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.29 <sup>bc</sup>	0.45 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	0.60 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup>
二十四碳一烯酸 C24:1	0.78 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	0.87 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	1.14 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>
二十二碳六烯酸 DHA C22:6n3	20.51 $\pm$ 1.71 <sup>ab</sup>	21.96 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	18.85 $\pm$ 3.92 <sup>bc</sup>	17.59 $\pm$ 2.94 <sup>c</sup>	21.69 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup>	18.55 $\pm$ 1.87 <sup>bc</sup>

注:同一行比较,相同字母为差异不显著,有不同字母为差异显著( $P < 0.05$ );粗体为用于群体判定的脂肪酸标记。

Notes:  $P < 0.05$  was regarded as statistically significant differences. The values in the same line without the same letter on the superscript were significantly different ( $P < 0.05$ ). The figures in bond type represented fatty acid markers for population discriminant.

表 3 基于 27 种脂肪酸的多变量方差分析  
Tab.3 An ANOVA based on 27 fatty acids of six population swimming crab

群体 population	DL	DY	LYG	ZJ	ZZ
DY	3.86 **				
LYG	14.10 **	8.97 **			
ZJ	10.63 **	9.56 **	8.24 **		
ZZ	7.20 **	9.10 **	9.47 **	8.25 **	
ZS	16.15 **	14.51 **	7.14 **	7.53 **	6.33 **

注:表中数据为群体间的  $F$  值  $df=27,72$ ; \*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.0001$ )。

Notes:  $F$ -values between populations shown in the table;  $df=27,72$ ; A double asterisks represented a significant difference ( $P < 0.0001$ ).

## 2.2 基于 27 种脂肪酸的群体系统聚类分析

6 个地理群体三疣梭子蟹 27 种脂肪酸的欧氏距离聚类结果见图 2。DL 和 ZS, DL 和 LYG, DY 与 ZS 的欧氏距离均较大,在 2.0 左右,脂肪酸趋异程度最大。而 LYG 与 ZJ 欧氏距离最小,为 0.72,脂肪酸组成和含量最为接近,其余各组居中。聚类结果显示 6 个群体可以分为二组,一组为大连、漳州群体,而另一组为连云港、湛江、东营和舟山群体。欧氏距离与地理距离的相关性结果见图 3,可见二者不具有显著的相关性,相关系数较低,  $R^2 = 0.0364$ ,卡方检验结果显示差异不显著 ( $P > 0.05$ ),说明三疣梭子蟹的脂肪酸组成与地理距离位置无关。

## 2.3 主成份分析

6 个地理种群三疣梭子蟹的第 1、2 主成分的散布图见图 4。由图 4 可以看出,不同群体间存在差异,群体主成分散布形成了各自独立的区域,说明这 6 群体在脂肪酸的组成和含量上存在较大

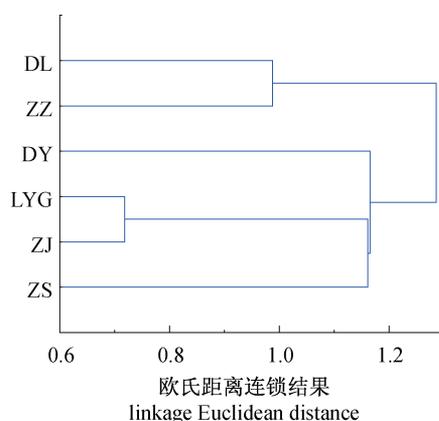


图 2 6 个地理种群三疣梭子蟹聚类分析图  
Fig.2 Diagram of cluster analysis of six populations of *P. trituberculatus*

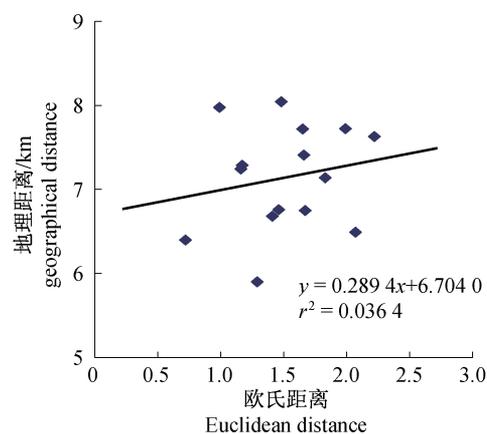


图 3 欧氏距离与地理距离的相关曲线  
Fig.3 The correlation curve for Euclidean distance and geographical distance

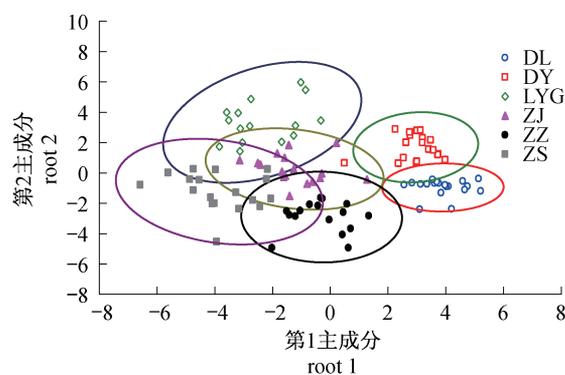


图 4 6 个地理群体三疣梭子蟹的第 1、2 主成分的散布图

Fig.4 Scatter diagram for the first and the second principal components of the six populations of *P. trituberculatus*

的差异,重叠区较小。特别是大连和东营群体相对于其他群体在脂肪酸的组成和含量上差异最大,与聚类分析的结果相一致。

## 2.4 判别分析

用一般判别分析对 6 群体 27 种脂肪酸的判别分析结果表明,判别准确率  $P_1$  为 94.12% ~ 100.00%,判别准确率  $P_2$  为 88.89% ~ 100.00%,6 个地理种群的综合判别率为 96.25%。为了找到适合种群鉴定的脂肪酸标记,对 27 种脂肪酸进行了逐步判别分析。结果表明在进行完 22 步逐步判别分析之后,油酸、二十碳一烯酸、芥酸、ARA 和 EPA 这 5 种脂肪酸对判别分析的贡献较大。对这 5 种脂肪酸建立了 5 个地理群体的判别方程,公式中  $X_1 \sim X_5$  分别代表 C18:1n9c、C20:1、

C22: 1n9、C20: 4n6、C20: 5n3 各函数的自变量和常数。

判别方程如下:

$$Y_{DL} = -0.26308X_1 + 17.50915X_2 + 0.566904X_3 - 3.11972X_4 + 1.99393X_5 - 28.2072$$

$$Y_{DY} = -0.44737X_1 + 17.09849X_2 + 0.905095X_3 - 6.49666X_4 + 2.59919X_5 - 41.1479$$

$$Y_{LYG} = 0.304593X_1 + 19.20673X_2 + 2.70242X_3 - 6.7069X_4 + 2.070999X_5 - 48.3036$$

$$Y_{ZJ} = 2.402161X_1 + 8.02753X_2 + 2.091121X_3 +$$

$$12.05962X_4 + 2.169074X_5 - 43.7125$$

$$Y_{ZZ} = 0.32297X_1 + 10.38896X_2 + 1.856493X_3 - 1.42514X_4 + 1.541347X_5 - 24.3296$$

$$Y_{ZS} = 2.64626X_1 + 11.7139X_2 + 3.256454X_3 + 0.441147X_4 + 1.431713X_5 - 42.7935$$

由这5个比例性状对6群体三疣梭子蟹进行判别,对测量数据按上述公式进行预测分类,结果见表4,判别准确率  $P_1$  为 84.21%~100.00%,  $P_2$  为 77.27%~94.12%,综合判别率为 88.46%。因此,上述判别方程是可靠的。

表4 6个地理种群三疣梭子蟹逐步判别分析测试结果

Tab.4 The testing discriminant results of the six populations of *P. trituberculatus*

种群 population	样本数目/个 sample no.	判别准确率/% discriminant accuracy		预测分类 foreseen classification					
		$P_1$	$P_2$	DL	DY	LYG	ZJ	ZZ	ZS
DL	19	84.21	94.12	16	3	0	0	0	0
DY	19	89.47	77.27	1	17	0	1	0	0
LYG	15	86.67	92.86	0	2	13	0	0	0
ZJ	19	82.35	87.5	0	0	0	14	1	2
ZZ	17	100.00	94.12	0	0	0	0	16	0
ZS	16	88.89	88.89	0	0	1	1	0	16
合计	105	88.46		17	22	14	16	17	18

### 3 讨论

#### 3.1 不同群体三疣梭子蟹的脂肪酸群体差异

同种生物体内脂肪酸组成和含量的差异性主要取决于投喂不同种类的饵料以及不同的生活型和生境差异,而对于一些近缘物种其机体脂肪酸的差异,则更多的与物种差异有关。对同一栖息环境下采集的4种桡足类脂肪酸组成差异研究发现飞马哲水蚤(*Calanus finmarchicus*)的C16和C18多不饱和脂肪酸含量比另外3种桡足类的低,而C20特别是C22的含量较高<sup>[23]</sup>,这显示出物种间脂肪酸的差异性,与物种特异的遗传有关。给海胆(*Psammechinus miliaris*)人工投喂鱼类颗粒饵料和海带(*Laminaria saccharina*),结果表明颗粒饵料组的海胆性腺脂肪酸组成中DHA的含量很高,而饲喂海带组的海胆18:4( $n-3$ )和20:4( $n-6$ )含量较高,这说明同种生物脂肪酸组成和含量的差异性主要取决于投喂不同种类的饵料<sup>[24]</sup>。本研究中湛江、大连、连云港、东营、舟山和漳州海区的三疣梭子蟹肌肉共检出27种脂肪酸,但主要是反式油酸、棕榈酸、DHA、EPA和芥酸,各群体

中5种脂肪酸的总和均高达82%。徐善良等<sup>[25]</sup>对野生和养殖三疣梭子蟹群体肌肉脂肪酸营养研究认为三疣梭子蟹肌肉脂肪酸碳链长度在14~24碳之间,含有18种脂肪酸,含量普遍较高的是棕榈酸、反式油酸、DHA、EPA,未检测出芥酸,本研究结果则显示6群体中芥酸含量3.80%(DL)~14.46%(ZS)(表2),已具有较高的比例,而且本研究结果显示芥酸是种群鉴定的一个重要的脂肪酸指纹标记。这种脂肪酸种类和数量的差异可能与所用标样种类有一定关系。一般认为芥酸主要存在于植物中,十字花科芸薹属(*Brassica* spp.)和糖芥属(*Erysimum* spp.)植物的种子中,芥酸含量一般为30%~60%,金莲花科植物种子的芥酸含量可高达80%,少量动物也含有芥酸<sup>[26]</sup>。如在油菜中芥酸含量主要受脂肪酸延长酶基因FAE1的调控,这也说明该芥酸是一种可遗传性状,这在生产中已有高芥酸和低芥酸油菜新品种的选育并得以应用<sup>[27-28]</sup>。关于水产动物体内芥酸的合成与代谢研究还未见相关报道,仅见脂肪酸组成与含量的报道,在一些鱼类如大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)<sup>[29]</sup>的精液和凤鲆

(*Coilia mystus*)的卵巢中检测到芥酸的存在(凤鲚:0.50%,大西洋庸鲽:0.22%~1.18%),而湖鲚(*Coilia ectenes taihuensis*)和刀鲚(*Coilia ectenes*)卵巢则未检出<sup>[30]</sup>,这也说明芥酸有可能成为一个种质鉴定的标记物,当然本研究的6群体芥酸含量存在显著差异,具有成为一个脂肪酸指纹标记的潜力。

本研究对不同群体三疣梭子蟹肌肉脂肪酸差异分析,结果显示 EPA 含量以 DY 群体最高,达 23.25%,但与 ZJ 群体无显著差异( $P > 0.05$ ),ZZ 群体最低,与 DL 群体无显著差异,但也高达 14.75%,其余 13 组合间均存在显著差异( $P < 0.05$ )。对野生和养殖群体研究发现 EPA 含量并无明显差异(18.98%~19.16%)<sup>[25]</sup>,这一结果与本研究中的 6 群体在同一范围内,这可能与三疣梭子蟹所处的栖息地生境差异及饵料组成结构有关,当然是否与不同群体的遗传背景有关,还需要更深入的研究才能得出结论。对不同养殖区域海胆的研究发现,在网箱养鱼和筏式扇贝养殖中,网箱和筏绳上生长的海胆(*P. miliaris*)体内的 DHA 含量显著高于海带养殖区海胆体内的 DHA 含量,认为是由于它们摄食了富含 DHA 的鱼用饲料,而生长在扇贝养殖筏绳上的海胆体内较高含量的 DHA 很可能来源于摄食筏架上附着的贻贝(*Mytilus edulis*),生活在海带繁盛的潮间带的海胆体内含有高含量的 18:4( $n-3$ )和 20:4( $n-6$ ),说明海带是该区域海胆的重要食物来源;在扇贝养殖区和泥质潮间带生长的海胆体内 18:1( $n-9$ )/18:1( $n-7$ )比值较低,奇数碳、支链脂肪酸含量较高,表明其饵料组成中细菌来源有机质具有重要贡献<sup>[24]</sup>。本研究显示 DY 群体的 EPA 和 DHA 含量均显著高于 LYG 和 ZS 群体,这可能与三疣梭子蟹群体所处的饵料环境有关,当然是否受到遗传影响还有待深入比较研究。本研究以 27 种脂肪酸的相对含量为基础,进行多变量方差分析,结果显示群体之间均存在极显著差异( $P < 0.0001$ ),但聚类结果与地理距离无显著相关性,特别是大连群体和漳州群体的脂肪酸组成上要比这两群体分别与其它群体之间的差异小,欧氏距离与地理距离不具有显著的相关性(图 3),说明三疣梭子蟹的脂肪酸组成与地理距离的关系并不密切,这也提示三疣梭子蟹脂肪酸营养积累可能更多的与栖息地饵料有关。在人工养殖环境下以饵

料的形式强化脂肪酸营养可有助于三疣梭子蟹脂肪酸的积累,这已在一些蟹类的幼体培育和养殖实践中得到证明<sup>[31-33]</sup>。对三疣梭子蟹不同群体栖息地环境的饵料组成、营养结构和三疣梭子蟹体成分脂肪酸组成的研究将是今后深入开展调查研究的重要方向。

### 3.2 几种脂肪酸共同作为群体脂肪酸指纹标记的可能性

脂肪酸在食物链传递过程中相对保守,将不同物种体内具有特异性的脂肪酸种类作为标志物示踪研究海洋生物间的营养关系是很有发展前景的分析方法<sup>[13]</sup>。选择脂肪酸作为营养学标志物是根据脂肪酸的代谢特点决定的。在许多情况下,生物体在对食物的吸收过程中,食物中的脂肪酸会被相对保守地同化至消费者体内,从而反映最近一段时期内生物的摄食情况<sup>[34]</sup>;另一方面,不同物种、品种、品系、地方群体等脂肪酸组成的特异性使其作为指纹图谱进行种质鉴定已成为一种新的种质鉴定方法<sup>[35]</sup>,目前已在农作物<sup>[36]</sup>、中草药<sup>[14]</sup>、茶叶<sup>[15]</sup>等植物种质鉴定中取得广泛应用。而应用脂肪酸指纹标记对水产动物进行种质鉴定还未见相关的报道。本研究应用聚类分析、主成分分析和判别分析从不同方面揭示了中国沿海 6 种群三疣梭子蟹的脂肪酸差异,3 种方法均印证了中国海 6 种群三疣梭子蟹脂肪酸组成和含量存在显著差异这一事实。用逐步判别分析筛选出 C14:0、C14:1、C15:0、C20:4N6 和 C22:6N3 这 5 种脂肪酸对 6 群体的判别准确率较高,综合判定率可以达到 88.46%。因此,C14:0、C14:1、C15:0、C20:4N6 和 C22:6N3 这 5 种脂肪酸作为群体判定和种质鉴定的指纹标记将具有一定的应用前景,当然,对中国沿海广泛分布的地理群体其脂肪酸组成差异情况,以及大量的养殖群体间是否具有稳定的差异还需要开展大量的工作,并建立不同地区相应的判定方程,这对于中国沿海三疣梭子蟹的种质资源鉴定与保护、申请地理标志和原产地保护均具有十分重要的科学和应用价值。

### 参考文献:

- [1] 薛俊增,堵南山,赖伟,等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Mier 的研究[J]. 东海海洋,1997,15(4):60-64.
- [2] 农业部渔业局. 2011 中国渔业统计年鉴[M]. 北

- 京:中国农业出版社,2011:33-52.
- [3] 郑元甲,陈雪忠,程家骅,等.东海大陆架生物资源与环境[M].上海:上海科学技术出版社,2003:30-375.
- [4] 陈萍,李健,李吉涛,等.不同地理群体三疣梭子蟹非特异性免疫功能的比较[J].中国农学通报,2008,24(11):496-499.
- [5] 高保全,刘萍,李健.三疣梭子蟹3个地理种群杂交一代生长和存活率的比较[J].大连水产学院学报,2008,23(5):325-329.
- [6] 董志国,李晓英,阎斌伦,等.中国海五种群三疣梭子蟹的形态差异分析[J].海洋通报,2010,29(4):421-426.
- [7] 高保全,刘萍,李健,等.三疣梭子蟹4个野生群体形态差异分析[J].中国水产科学,2007,14(2):223-228.
- [8] 冯冰冰,李家乐,牛东红,等.我国沿海三疣梭子蟹9个野生群体线粒体CR和CO I片段比较分析[J].动物学杂志,2008,43(2):28-36.
- [9] Liu Y G, Guo Y H, Hao J, et al. Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) populations from Shandong peninsula as assessed by microsatellite markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 41(1):91-97.
- [10] Liu Y, Liu R L, Ye L C, et al. Genetic differentiation between populations of swimming crab *Portunus trituberculatus* along the coastal waters of the East China Sea [J]. Hydrobiologia, 2009, 618(1):125-137.
- [11] 吴惠仙,徐雪娜,薛俊增,等.中国沿海三疣梭子蟹的遗传结构和亲缘关系分析[J].海洋学研究,2009,27(3):48-53.
- [12] Xu Q H, Liu R L, Liu Y. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 371(2):121-129.
- [13] 许强,杨红生.脂肪酸标志物在海洋生态系统营养关系研究中的应用[J].海洋学报:中文版,2011,33(1):1-6.
- [14] 袁敏,张铭光,曾志.裂解色谱法测定中药指纹图谱[J].华南师范大学学报:自然科学版,2003(1):66-70.
- [15] 郝志龙,金心怡,江丽萍,等.化学指纹图谱在茶叶品质鉴定与控制上的应用[J].亚热带农业研究,2009,5(1):60-63.
- [16] 张东平,张少欢,余应新,等.太湖鱼中多不饱和脂肪酸及其与多氯联苯共摄入益害分析[J].科学通报,2012,57(5):324-331.
- [17] 洛桑.水体环境对拉萨河裸鲤脂肪酸的影响[J].西藏大学学报:自然科学版,2009,24(2):23-26.
- [18] Hunt A Ö, Özkan F, Engin K, et al. The effects of freshwater rearing on the whole body and muscle tissue fatty acid profile of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture International, 2011, 19(1):51-61.
- [19] Styriahave B, Faldborg M, Andersen P O. Influence of cadmium accumulation and dietary status on fatty acid composition in two color forms of shore crabs, *Carcinus maenas* [J]. Marine Biology, 2000, 137(3):423-433.
- [20] 成永旭,堵南山,赖伟.中华绒螯蟹卵巢和胚胎发育期脂类在卵黄物质中存在的形态及其变化[J].动物学杂志,1999,34(1):51-56.
- [21] 成永旭,堵南山,赖伟.中华绒螯蟹卵巢快速发育期内脂类积累以及对抱卵的影响[J].水产学报,2000,24(2):113-118.
- [22] 艾春香,陈立侨,温小波,等.维生素E、C和HUFA交互作用对中华绒螯蟹生殖性能的影响[J].水产学报,2002,26(6):533-541.
- [23] Lovern J A. Fat metabolism in fishes; The fats of some plankton crustacea [J]. Biochemical Journal, 1935, 29(4):847-849.
- [24] Cook E J, Bell M V, Black K D, et al. Fatty acid compositions of gonadal material and diets of the sea urchin, *Psammechinus miliaris*; trophic and nutritional implications [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2000, 255(2):261-274.
- [25] 徐善良,张薇,严小军,等.野生与养殖三疣梭子蟹营养品质分析及比较[J].动物营养学报,2009,21(5):659-702.
- [26] Food Standards Australia New Zealand. Erucic acid in food: A toxicological review and risk assessment [C]. Canberra, Wellington; Food Standards Australia New Zealand, 2003(21):17-23.
- [27] 陈柳,毛善婧,陆莉.导入LPAAT和KCS基因对油菜种子芥酸含量的影响[J].作物学报,2006,32(8):1174-1178.
- [28] Zhang H Z, Shi C H, Wu J G. Analysis of Genetic Effects for Heterosis of Erucic Acid and Glucosinolate Contents in Rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2011, 10(10):1525-1531.
- [29] 丁福红, Santosh P L, 李军, 等. 大西洋庸鲷 (*Hippoglossus hippoglossus* L.) 精液脂肪酸分析及

- 激素 GnRHa 诱导对其组成的影响[J]. 海洋与湖沼,2010,41(6):857-861.
- [30] 王桂学,刘凯,徐东坡,等. 凤鲚、湖鲚和刀鲚卵巢氨基酸、脂肪酸及矿物元素分析[J]. 广东海洋大学学报,2009,29(3):86-89.
- [31] 吴旭干,于智勇,成永旭,等. 4 组生物饵料对中华绒螯蟹  $Z_4$  到大眼幼体生长发育和脂肪酸组成的影响[J]. 中国水产科学,2007,14(6):911-918.
- [32] Dan S, Hamasaki K. Effects of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae) [J]. Aquaculture International, 2011, 19(2):323-338.
- [33] 陈立侨,江洪波,周忠良,等.  $\omega$ -3HUFA 对中华绒螯蟹幼体存活率及体脂肪酸组成的影响[J]. 水产学报,2000,24(5):448-452.
- [34] Kirsch P E, Iverson S J, Bowen W D, et al. Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1998, 55(6):1378-1386.
- [35] Budge S M, Iverson S J, Koopman H N. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation [J]. Marine Mammal Science, 2006, 22(4):759-801.
- [36] 李洪英,方洪壮,张晓丽,等. 水飞蓟油脂肪酸气相色谱指纹图谱的研究[J]. 中国食品工业, 2009(10):58-60.

## Fatty acid composition variation and fingerprint of the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China Sea based on multivariate analysis method

DONG Zhiguo<sup>1,2,3</sup>, SHEN Shuangye<sup>4</sup>, LI Xiaoying<sup>1,2</sup>, YAN Binlun<sup>1</sup>, SUN Xiaowen<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology, Jiangsu, Lianyungang 222005, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The swimming crab is widely distributed in the coastal waters of China, Japan and Korea. This species is one of the most common edible marine crab in the East Asia. To assess the fatty acid composition and variation of swimming crab populations and to develop a genetic resources identification technique based on fatty acids biomarkers, a multivariate analysis method was used to study fatty acid composition difference of swimming crab *P. trituberculatus* along China coast, the six geographical populations from China Sea (Dalian, Dongying, Lianyungang, Zhangzhou, Zhoushan and Zhanjiang) in autumn and winter. A set of fatty acids as fingerprint technique was developed for identifying different populations. The crabs from the six population all contained 27 kinds of fatty acids among which the total volume of five kinds of fatty acids C18:1n9t, C16:0, C22:1n9, DHA and EPA was over 82%, and multivariate ANOVA revealed that there were significant differences among the six populations ( $P < 0.01$ ). As fatty acid fingerprint markers, the five kinds of fatty acids C18:1n9c, C20:1, C22:1n9, ARA and EPA, were effective to identify the six-populations of crabs for the total discriminant accuracy amounted to 88.46%. The results of cluster analysis indicated that there were no significant correlations between geographical distance and Euclidean distance based on 27 kinds of fatty acids. The reason of population differences of fatty acids was probably related with feed composition in habitat of the swimming crabs.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; geographical population; fatty acid; gas chromatography; multivariate analysis; fingerprint technique

**Corresponding author:** SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com