

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241008001

http://www.yykxjz.cn/

杨苗苗, 夏苏东, 刘志鸿, 孙秀俊, 周丽青, 马培振, 李转转, 吴彪. 盐度对近江牡蛎生理及相关基因表达的影响. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 183–191

YANG M M, XIA S D, LIU Z H, SUN X J, ZHOU L Q, MA P Z, LI Z Z, WU B. Physiological and gene expression responses of *Crassostrea ariakensis* to salinity stress. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 183–191

盐度对近江牡蛎生理及相关基因表达的影响*

杨苗苗^{1,2,3} 夏苏东¹ 刘志鸿^{2,3} 孙秀俊^{2,3} 周丽青^{2,3}
马培振^{2,3} 李转转^{2,3} 吴彪^{2,3①}

(1. 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津农学院 天津 300384;

2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237)

摘要 近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)是我国南北沿海河口区的重要贝类,具有重要的经济价值和生态服务功能。河口区盐度变化较大且频繁,近江牡蛎对盐度具有较强的适应能力,但其机体响应方面的研究相对匮乏。本研究设置不同盐度梯度对近江牡蛎进行处理,检测并分析处理后耗氧率、排氨率、氧氮比、摄食率和滤水率的变化,以及对热休克蛋白 70 (*Hsp70*)、缺氧上调因子 1 (*Hyou1*) 和 *DNAJ* 热休克蛋白家族成员 C2 (*DNAJC2*)的影响。结果显示,在盐度 5~45 内,近江牡蛎耗氧率和排氨率先升高后下降,盐度 35 时达到峰值;盐度 5~25 时,摄食率逐渐上升,盐度 25~45 时下降,盐度 25 时达到峰值,盐度 45 时降到最低;滤水率在盐度 5~45 内呈先升高后降低的趋势,盐度 15 时达到最高,盐度 45 时最低。荧光实时定量 PCR 结果显示,3 个基因在近江牡蛎鳃、外套膜、闭壳肌和唇瓣中均有表达,且在闭壳肌中表达量显著高于其他组织。盐度变化显著影响近江牡蛎 *CarHsp70*、*CarHyou1* 和 *CarDNAJC2* 基因在鳃组织中的表达。盐度增加 10, *CarHsp70*、*CarHyou1* 和 *CarDNAJC2* 表达量分别上调至对照组的 4.36 倍、3.58 倍和 2.08 倍;盐度降低 10,则分别上调至 3.62 倍、2.97 倍和 2.05 倍。盐度增加 20,3 个基因表达量分别是对照组的 7.13 倍、4.68 倍和 2.72 倍;盐度降低 20,则分别是对照组的 5.92 倍、6.04 倍和 2.54 倍。本研究揭示了近江牡蛎在不同盐度条件下的生理和分子响应,包括耗氧率、排氨率、摄食率、滤水率及 *Hsp* 家族基因在应对盐度胁迫中的表达变化,为进一步了解牡蛎适应盐度环境变化的研究提供了参考资料。

关键词 近江牡蛎; 盐度; 生理变化; 基因表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0183-09

牡蛎是海洋生态系统中的关键物种,对生态功能修复和生物多样性维持至关重要。然而,全球气候变化和日益增长的人类活动正在加剧海洋环境波动,对

牡蛎及其他海洋生物的生长和生理功能产生了显著影响,生活于此的生物也进化出了相应的机体调节机制。例如,在高盐度条件下,生物体通过消耗更多能

* 国家重点研发计划(2023YFD2401002)、中国博士后科学基金(2024M753625)、山东省重点研发计划(2022CXPT002)、海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室基本科研业务费自主研究项目(BRESG-JB202408)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022024002)共同资助。杨苗苗, Email: 2842774079@qq.com

① 通信作者: 吴彪, 研究员, Email: wubiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-10-08, 收修改稿日期: 2024-11-19

量来调节离子和渗透压,从而维持体内环境稳定,通常表现出较低的活动水平和耗氧率(Awal *et al.*, 2012);在高温条件下,牡蛎提高摄食率,以获取更多的营养应对高温带来的挑战(Ko *et al.*, 2014);低氧环境会显著提高牡蛎耗氧率,以满足代谢活动的氧气需求(Gray *et al.*, 2002)。

盐度作为影响海洋生物渗透压平衡的关键环境因子,对牡蛎的影响尤为重要。面对盐度波动,贝类会暂时关闭其水管和双壳,以避免极端盐度的不利影响(Wang *et al.*, 2011)。研究显示,高盐环境下欧洲平牡蛎(*Ostrea edulis*)存活率降低,且摄食率也随之下降(Rodstrom *et al.*, 2000)。厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)在不同盐度胁迫下,其呼吸率随盐度的增加先升后降(饶科等, 2014)。盐度变化对贝类的生理影响不仅体现在代谢的变化,还会引发一系列应激响应,包括基因表达变化等层面的分子调控。潮间带牡蛎对盐度胁迫的高耐受性与热休克蛋白(HSPs)的合成密切相关,盐度胁迫可以促进 HSPs 的合成(Zhang *et al.*, 2015)。HSPs 作为 ATP 依赖型分子伴侣,存在于所有生物体中,在多种应激条件下被诱导表达(Mosser *et al.*, 2004),帮助有机体应对压力,保护细胞和组织。其中, *Hsp70* 是动物应激反应中最为保守且研究最广泛的热休克蛋白,其表达受到热应激、渗透胁迫、营养缺失、氧化应激、毒素暴露及感染等因素的影响(Jahangirizadeh *et al.*, 2018; Ellison *et al.*, 2017)。此外,缺氧上调因子 1 (*Hyou1*)和 DNAJ 热休克蛋白家族成员 C2 (*DNAJC2*) 在牡蛎对盐度变化的适应过程中发挥重要作用。*Hyou1* 不仅是细胞应激标志物,还是内质网伴侣蛋白,在机体受到盐度压力刺激时,启动内质网应激响应,表达量持续升高,从而维持机体正常功能(赵静等, 2024)。*DNAJC2* 作为一种分子伴侣,能够与 *Hsp70* 协同作用,参与蛋白质的正确折叠、异常蛋白的重新折叠或清除等过程(Shen *et al.*, 2005),这一协同作用对于细胞应对盐度变化所带来的压力至关重要。

近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)多栖息在盐度为 10~25 的河口区,在我国北至中朝边境的蜊子江、南至海南岛的沿海广泛分布。近江牡蛎具有较强的盐度适应性, Wu 等(2022)研究发现,相对于长牡蛎(*C. gigas*)、香港牡蛎(*C. hongkongensis*)和美洲牡蛎(*C. virginica*)等, *SLC13* 基因家族在近江牡蛎中发生显著扩张,推测近江牡蛎在盐度适应调节方面具有更强的能力;葛广玉等(2023)在近江牡蛎全基因组中鉴定出 *SLC13* 基因家族的 11 个成员,明确了 *CarSLC13* 家族的基因特征、系统进化及对急性高盐胁迫的响应

规律。为进一步探讨近江牡蛎在盐度变化胁迫后,耗氧率、排氨率、摄食率和滤水率等生理响应和重要基因的变化规律,本研究分析不同盐度处理后相关指标的变化,以期为深入理解牡蛎应对盐度胁迫的生理代谢响应提供数据和参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验近江牡蛎采自山东省莱州市的养殖群体,平均壳长为(43.7±5.3) mm。养殖水体盐度为 25,水温为 21℃。实验前,将壳表无损伤、健康个体表面的附着物清除后,在水温为 21℃、盐度为 25 的砂滤海水中暂养 7 d。期间,持续微充气,每天换水一次,每隔 4 h 投喂硅藻和小球藻一次。

1.2 盐度梯度及处理

设置 5 个实验盐度梯度(5、15、25、35 和 45),其中, 25 为对照组盐度。实验盐度用充分曝气后的海水、淡水以及海水晶按比例调配而成。将实验近江牡蛎随机分成 3 组,每组 3 只个体,转移到相应的盐度中进行实验,温度等其他条件与暂养时相同。

盐度胁迫 4 h 后,取牡蛎的鳃、闭壳肌、外套膜、唇瓣 4 种组织,用液氮速冻后转移至-80℃保存备用。

1.3 耗氧率和排氨率的测定

耗氧率和排氨率采用静水法在容量为 10 L 的呼吸瓶中进行。实验开始前,牡蛎禁食 24 h 以确保不同个体相同的生理状态。将 3 只大小基本相同的牡蛎放入呼吸瓶中,静置 30 min 后开始计时 2 h。以不加牡蛎的呼吸瓶作为对照组,每个盐度组设置 3 个平行。分别使用 IN-situ Aqua TROLL 400 便携式多参数水质检测仪和次溴酸钠氧化法测定溶解氧和氨氮含量,根据实验开始和结束时溶解氧、氨氮浓度的变化计算耗氧率(OCR)和排氨率(AER)。实验结束后,将牡蛎取出并用滤纸吸干贝体表面水分,分别测量牡蛎壳长(mm)、壳高(mm)和湿重(g)后,取软体部并在 65℃条件下烘干 48 h,称量软体部干重。

耗氧率的计算: $OCR = [(DO_0 - DO_t) \times V] / (W \times N \times t)$ 。式中, OCR 为单位体重的耗氧率[mg/(g·h)], DO_0 和 DO_t 分别为开始和结束时海水中的溶解氧含量(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为实验牡蛎平均软体部干重(g), N 为实验牡蛎的数量(只), t 为实验持续的时间(h)。

排氨率的计算: $AER = [(N_t - N_0) \times V] / (W \times N \times t)$ 。式

中, AER 为单位体重的排氨率 [$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$], N_t 和 N_0 分别为开始和结束时海水中的氨氮浓度 ($\mu\text{mol/L}$), V 为呼吸瓶容积 (L), W 为近江牡蛎平均软体部干重 (g), N 为实验牡蛎的数量 (只), t 为实验持续的时间 (h)。

呼吸过程中氧原子与排出氨氮原子的摩尔比 (O : N) 的计算公式: $\text{O} : \text{N} = [\text{OCR}/(16 \times 1\,000)]/\text{AER}$ 。

1.4 摄食率和滤水率的测定

摄食和滤水实验在直径为 10.5 cm、高度为 12.0 cm 的养殖桶中采用静水法进行。牡蛎在养殖桶中静置 30 min 后计时 4 h。以不加牡蛎的养殖桶作为对照组, 每个盐度组设置 3 个平行。实验前, 各组分别取 1 L 海水, 用玻璃纤维滤膜 (0.45 μm) 抽滤, 并计算悬浮颗粒物 (total particulate matter, TPM) 和颗粒有机物 (particulate organic matter, POM) 浓度。实验水体微充气, 确保饵料混合均匀和足够的氧气供应, 同时避免搅动桶底的粪便。实验结束后再次取 1 L 海水并计算 TPM 和 POM。饵料浓度的计算以海水中 TPM 和 POM 作为测定指标。

TPM 和 POM 的测定方法: 首先, 在 450 $^{\circ}\text{C}$ 的马弗炉内将玻璃纤维滤膜 (0.45 μm) 灼烧 6 h, 称重得到初始重量 (W_0)。然后, 用该滤膜分别过滤 1 L 水样后, 利用 0.5 mol/L 甲酸铵溶液充分漂洗滤膜以去除海水盐分, 65 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘干 48 h 后称重得到干燥后的重量 (W_1), 随后再次 450 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 6 h 后, 称重得到重量 (W_2)。单位水体中 TPM、POM 以及摄食率 (FR)、滤水率 (CR) 的计算公式: $\text{TPM} = W_1 - W_0$; $\text{POM} = W_2 - W_1$; $\text{FR} = V(C_0 - C_t)/Nt$; $\text{CR} = V \ln(C_0/C_t)/Nt$ 。式中, V 为实验水体积 (L); N 为实验牡蛎数量 (只); C_0 和 C_t 为实验开始和结束时的饵料浓度 (mg/L); t 为实验持续时间 (h)。

1.5 RNA 提取与反转录

RNA 的提取方法采用 FreeZol Reagent (Vazyme, 中国) 试剂盒, 提取的 RNA 采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测完整性、NanoDrop2000 (ThermoScientific, 美国) 检测纯度和浓度。将鉴定合格的 RNA 样品浓度稀释到 1 000 ng/ μL , 使用 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis kit with gDNA wiper (Vazyme, 中国) 反转录为 cDNA, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.6 重要基因的转录表达

从实验室前期近江牡蛎转录组 (葛广玉, 2023) 数据中获得热休克蛋白 70 (*CarHsp70*)、缺氧上调因子 1 (*CarHyou1*) 和 *DNAJ* 热休克蛋白家族成员 C2 (*CarDNAJC2*) 基因片段, 使用 Primer 3.0 ([http://](http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi)

www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi) 设计特异性引物进行序列验证, β -actin 基因为内参, 引物见表 1。利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行基因表达检测, 其反应体系 (10 μL): 引物 (上下游) 各 0.2 μL 、模板 cDNA 1 μL 、2 $\times$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 5 μL 、DEPC 水 3.6 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、循环 40 次。每组 6 个生物重复, 每个样品 3 次技术重复。

表 1 RT-qPCR 实验中使用的引物
Tab.1 Primers used in RT-qPCR experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
<i>CarHsp70-F</i>	TCAAGGTGCACTGGACTCTC
<i>CarHsp70-R</i>	GGGTTACGGGGGTCCATTTT
<i>CarHyou1-F</i>	AGCCAAGGTCACTCGTGATG
<i>CarHyou1-R</i>	TTTGGGCACTCTGGTTCCTC
<i>CarDNAJC2-F</i>	GTAAAGAAGCGTGATCGCCG
<i>CarDNAJC2-R</i>	CTTCTAGTGCCGTCATGGCT
β -actin-F	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT
β -actin-R	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT

1.7 数据分析

使用 SPSS 27.0 软件进行数据分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。使用 GraphPad prism 8.0 软件进行图表绘制, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较不同数据之间的差异性, $P < 0.05$ 为差异显著。基因相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 (安思琪等, 2024)。

2 结果与分析

2.1 盐度对近江牡蛎耗氧率、排氨率和氧氮比的影响

近江牡蛎在不同盐度条件下耗氧率、排氨率以及氧氮比的变化如图 1 所示。随着盐度的增加, 近江牡蛎耗氧率、排氨率呈相似的变化趋势, 表现出先上升后下降的趋势, 均在盐度 35 时达到峰值。氧氮比的变化与耗氧率、排氨率的变化规律基本相似, 变化程度相对小。与对照组盐度 25 相比, 盐度的下降均能降低耗氧率和排氨率, 而升高盐度则能提高这两个数值, 但盐度 35 时则又开始下降。盐度 25 时, 近江牡蛎的氧氮比与盐度 15 时相差不大。在实验盐度范围 5~45 内, 通过回归分析方程得到耗氧率、排氨率与盐度之间的关系分别为: $\text{OCR} = -0.000\,4x^2 + 0.030\,3x + 0.046\,3$ ($R^2 = 0.887\,8$), $\text{AER} = -0.003\,8x^2 + 0.264\,3x + 1.188\,5$ ($R^2 = 0.960\,9$)。氧氮比与盐度之间的关系方程

$$Y = -0.0013x^2 + 0.0825x + 4.935 \quad (R^2 = 0.3554)。$$

2.2 盐度对近江牡蛎摄食率和滤水率的影响

近江牡蛎在不同盐度下的摄食率和滤水率变化如图 2 所示。与耗氧率、排氨率随盐度变化趋势不同,近江牡蛎摄食率在对照组盐度 25 时最高,降低或者升高盐度均降低其摄食率,盐度 5、15、35 和 45 时的摄食率分别为对照组的 63%、91%、77%和 52%;

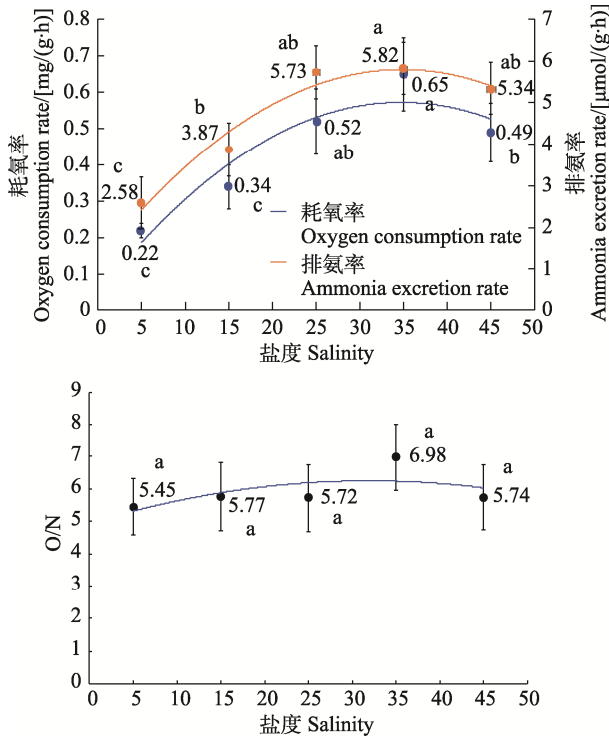


图 1 盐度胁迫后近江牡蛎耗氧率、排氨率和氧氮比
Fig.1 The oxygen consumption rate, ammonia excretion rate, and O/N ratio of the *C. ariakensis* after salinity stress

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

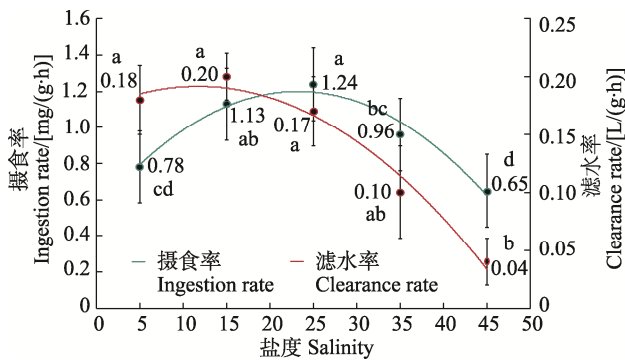


图 2 盐度胁迫后近江牡蛎摄食率和滤水率
Fig.2 Ingestion rate and clearance rate of the *C. ariakensis* after salinity stress

而降低盐度能够提高其滤水率,提高盐度则降低其滤水率,而且随盐度升高其降低程度也加剧,盐度 5、15、35 和 45 时的滤水率分别为对照组的 1.06%、1.17%、59%和 24%。通过回归分析得到摄食率与盐度之间的关系方程: $FR = -0.0012x^2 + 0.0568x + 0.5404$ ($R^2 = 0.9655$),滤水率与盐度之间的关系方程: $CR = -0.0001x^2 + 0.0033x + 0.1723$ ($R^2 = 0.9783$)。

2.3 基因组织分布及盐度胁迫后表达变化

本研究利用 RT-qPCR 技术分析了 *CarHsp70*、*CarHyoul* 和 *CarDANJC2* 等 3 个基因在近江牡蛎的组织分布及盐度胁迫后的表达变化(图 3)。以鳃组织为对照组,3 个基因在近江牡蛎不同组织的分布不同,基因 *CarHsp70*、*CarHyoul* 和 *CarDANJC2* 表达量最高的组织均为闭壳肌。对于 *CarHsp70*,闭壳肌的表达量最高,极显著高于其他组织($P < 0.01$),分别是外套膜的 4.35 倍、唇瓣的 9.22 倍和鳃的 7.67 倍。闭壳肌中 *CarHyoul* 基因表达量分别是外套膜、鳃的 1.37 倍和 1.88 倍($P < 0.01$);此外,闭壳肌中 *CarDANJC2* 基因表达量分别是外套膜、唇瓣和鳃的 4.17 倍、10.89 倍、10.14 倍($P < 0.01$)。

受到盐度胁迫后,鳃组织中 *CarHsp70*、*CarHyoul* 和 *CarDANJC2* 的表达变化见图 4。3 个基因的表达量具有相似的变化趋势,实验盐度的升高或降低均引起 3 个基因表达量的上升。与对照组相比,当盐度增加或降低 10 时, *CarHsp70* 基因表达量均显著上调,分别是对照组的 4.36 倍和 3.62 倍,增加或降低 20 则上调 7.13 倍和 5.92 倍;当盐度增加或降低 10 时, *CarHyoul* 基因的表达量均上调,分别是对照组的 3.58 倍和 2.97 倍,而在盐度增加或降低 20 时,则分别达到 4.68 倍和 6.04 倍。此外, *CarDANJC2* 基因在盐度变化时的表达量也显著增加,盐度上升或降

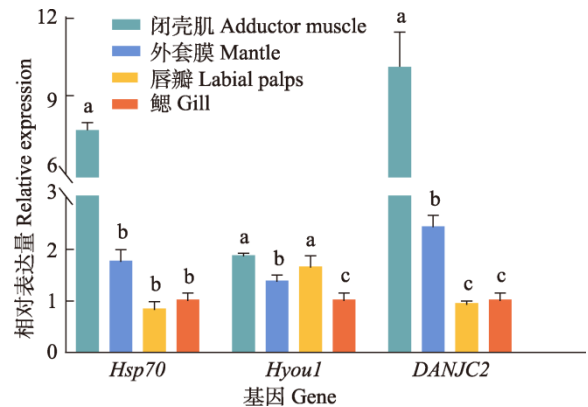


图 3 3 个基因在近江牡蛎不同组织的相对表达量

Fig.3 Relative expression levels of three genes in different tissues of *C. ariakensis*

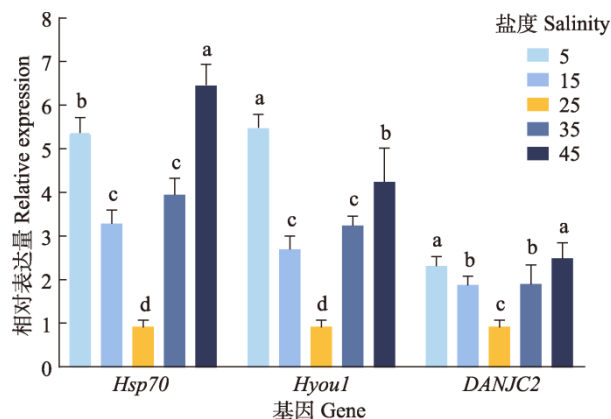


图4 盐度胁迫后3个基因在近江牡蛎鳃组织的响应

Fig.4 The response of three genes in gill tissue after salinity stress of *C. ariakensis*

低10和20时,分别是对照组的2.08倍、2.05倍、2.72倍和2.54倍。

3 讨论

3.1 盐度变化对近江牡蛎生理代谢的影响

盐度是近海岸海洋生态系统中的重要环境特征之一,受河流淡水输入和季节性降水等因素的影响,其波动显著影响海洋生物,尤其是贝类的生存和生理活动。贝类通过调节体内渗透压,如合成与释放游离氨基酸,关闭进出水管和闭壳(Ran *et al.*, 2017)以及调节新陈代谢来适应环境变化,从而维持水分平衡和生命活动。本研究结果显示,在盐度5~35范围内,近江牡蛎的耗氧率和排氨率随盐度的升高不断增大,盐度35时达到峰值,但在盐度45时有所下降。这与盐度对紫血蛤(*Sanguinolaria violacea*)、红娇凤凰螺(*Strombus luhuanus*)和长牡蛎的研究结果相近,3个物种最大耗氧率分别出现在盐度36、32和35,盐度36、32、30时排氨率达到最大值(唐保军等, 2012; 陈旭等, 2022; 王芳等, 2003)。而林丽华等(2012)对香港巨牡蛎的研究显示,盐度6~27范围内耗氧率、排氨率先增大后减小,盐度20时达到峰值。这可能因为不同贝类的最适生活盐度以及对盐度变化的适应能力不同。氧氮比是评估动物代谢过程中氧化供能物质类别的重要生理指标。贝类通过体内的碳水化合物、脂肪和蛋白质来获取能量,而氧氮比则反映动物在特定状态下的代谢比例关系(Person-Le *et al.*, 2004)。作为潮间带的物种,牡蛎常在干露状态,其生理活动受到长期的环境压力影响,这可能导致其呼吸和排泄速率较低,从而使氧氮比水平较低。在盐度为18、温度为23℃的条件下,僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)的氧氮比为5.31(焦海峰, 2017)。本研究中测得的氧氮比值为5.93,

与之相似。此外,本研究发现,近江牡蛎在盐度5~45范围内的摄食率先升高后降低,盐度25时达到峰值,45时降到最低。这可能是因为高盐会对贝类的附着力、鳃纤毛运动和心脏跳动等生理代谢产生负面影响,进而影响其摄食代谢(吕国华等, 2022)。与蜃蛭(*Sinonovacula constricta*)、四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)和文蛤(*Meretrix meretrix*)的研究结果相近,这3个物种分布在盐度20、30、20时摄食率达到峰值(吕昊泽等, 2016; 杨杰青等, 2016a)。邓传敏等(2016)研究发现,长牡蛎在盐度25时滤水率达到最大值,而在更高或更低的盐度下则逐渐减少。类似地,本研究发现,近江牡蛎滤水率在盐度5~15时上升,而在盐度15~45时呈下降趋势。这些研究表明,不同种类的贝类在面对盐度变化时,其代谢反应可能具有一定的共性。在一定盐度范围内,贝类的呼吸代谢活动会随着盐度的增加而逐渐上升,但超过某一范围后,其代谢活动则会受到抑制。

3.2 盐度变化对相关基因表达的影响

渗透压胁迫能够促使Hsp70家族蛋白的合成,高渗透压条件下,生物体内的离子环境发生变化,使得核糖体合成的线性蛋白质对离子浓度的变化变得更加敏感,这可能导致蛋白质发生变性或折叠错误(Yokoyama, 2006; Spees, 2002)。Hsp70家族通过其ATP酶活性辅助蛋白质折叠,此活性可以被J结构域蛋白(JDP)如DNAJ家族成员所刺激(Qiu *et al.*, 2006)。分子伴侣及辅助伴侣分子能够促进新合成多肽的组装,维持细胞内蛋白质系统的稳态,作为Hsp70的辅助伴侣,Hsp40(DNAJ)家族是目前已知的最大分子伴侣家族,能够通过J结构域与Hsp70结合,促进蛋白质正确折叠(何颖慧等, 2022)。Hyou1作为一种内质网分子伴侣,通过调节内质网的功能,在低氧、盐度和高温等环境胁迫下保护细胞并维持细胞活力(季文博等, 2019)。热休克蛋白在水生生物应激反应和非特异性免疫中发挥重要作用。鳃组织作为贝类进行气体交换和离子平衡的主要器官,对盐度变化非常敏感。本研究通过RT-qPCR技术分析了CarHsp70、CarHyou1和CarDANJC2基因在近江牡蛎不同组织中的分布及盐度胁迫后的表达变化。本研究结果显示,3个基因在牡蛎闭壳肌、鳃、外套膜、唇瓣中均有表达,闭壳肌中的表达量显著高于其他组织。有研究表明,Hsp70基因在马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)多个组织中均有表达,在肝胰腺中表达量最高(刘雅等, 2019)。Hyou1和DNAJ2基因在青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)不同组织中均有表达,肾脏中相对表达量较高(赵静等, 2024)。3个基因在贝类不同组织中发挥

着重要作用,它们的表达模式可能与组织的特定功能及不同物种对环境变化的敏感性有关。盐度胁迫后,3个基因在鳃组织中的表达量显著上升,并呈现相似的变化趋势。这可能是近江牡蛎应对盐度胁迫引起渗透压变化的一种适应性反应,从而帮助细胞保护自身免受盐度波动带来损伤。Rahman等(2022)研究指出,在高温环境下,美洲牡蛎鳃组织的 *Hsp70* 表达水平显著增加。盐度 16、22 和 24 胁迫后,文蛤鳃组织中 *Hsp70* 基因的表达量显著高于对照组(盐度 20)(杨杰青等,2016b)。*DANJC2* 基因在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)不同组织中均有表达,冷胁迫后在肝脏中的表达量显著增加(江婷佳等,2017)。综上所述,这3个基因在不同贝类组织中发挥重要的生理作用,在应对环境胁迫时可能具有协同效应,其表达模式反映了生物对环境变化的适应机制。本研究为理解贝类在面对环境压力时的生理反应机制提供了重要的科学依据。

参 考 文 献

- AN S Q, HE L, FAN J X, *et al.* Effects of salinity stress on osmotic pressure, free amino acid levels, and the carnosine synthetase gene of *Sinonovacula constricta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 97–111 [安思琪, 何琳, 范建勋, 等. 盐度胁迫对缢蛏渗透压、游离氨基酸及肌肽合成酶基因的影响. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 97–111]
- AWAL M A, KURI K C, SARKER S. Effect of salinity on the oxygen consumption of *Tilapia* fingerlings. *Daffodil International University Journal of Science and Technology*, 2012, 7(1): 12–14
- CHEN X, ZHAO W, CHEN M Q, *et al.* Effects of salinity stress on oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and immune-related enzyme activities of *Strombus luhuanus*. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(5): 160–165 [陈旭, 赵旺, 陈明强, 等. 盐度胁迫对红娇凤凰螺耗氧率、排氨率以及免疫相关酶活性的影响. *南方水产科学*, 2022, 18(5): 160–165]
- DENG C M, LI Q, KONG L F, *et al.* Comparison of feeding and respiration of the forth golden shell color line and normal culture groups of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 855–863 [邓传敏, 李琪, 孔令锋, 等. 长牡蛎壳金选育系 F₄ 与普通养殖群体摄食和呼吸的比较研究. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 855–863]
- ELLISON M A, FERRIER M D, CARNEY S L. Salinity stress results in differential *Hsp70* expression in the *Exaoptasia pallida* and *Symbiodinium symbiosis*. *Marine Environmental Research*, 2017, 132: 63–67
- GE G Y, CHI C F, WANG Z Y, *et al.* Genome-wide identification of the SLC13 gene family in *Crassostrea arakensis* and its expression characteristics in gill under acute salt stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(2): 127–137 [葛广玉, 迟长凤, 王振原, 等. 近江牡蛎 SLC13 基因家族的全基因组鉴定及急性高盐胁迫下的表达特征. *中国水产科学*, 2023, 30(2): 127–137]
- GE G Y. A comparison of the response to acute high salinity stress between the cultivated population of *Crassostrea ariakensis* selected for high salinity tolerance and the wild population. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2023 [葛广玉. 近江牡蛎耐高盐选育群体与野生群体对急性高盐胁迫响应的比较. *浙江海洋大学硕士研究生学位论文*, 2023]
- GRAY J S, WU R S, OR Y Y. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 238: 249–279
- HE Y H, WANG Z P. The roles of HSP40/DNAJ protein family in neurodegenerative diseases. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2022, 51(5): 640–646 [何颖慧, 王志萍. 分子伴侣 HSP40/DNAJ 蛋白家族及其在神经退行性疾病中的作用. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(5): 640–646]
- JAHANGIRIZADEH Z, GHAFOURI H, SAJEDI R H, *et al.* Molecular cloning, prokaryotic expression, purification, structural studies and functional implications of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) from *Rutilus frisii kutum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 798–807
- JI W B, WANG H, CHAI Z X, *et al.* Molecular cloning and tissue expression of gene *Hyou1*. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(3): 123–131 [季文博, 王会, 柴志欣, 等. 牦牛 *Hyou1* 基因克隆及组织表达分析. *生物技术通报*, 2019, 35(3): 123–131]
- JIANG T J. Molecular cloning and expression analysis of four different *DnaJ* genes from *Macrobrachium rosenbergii*. Master's Thesis of China University of Metrology, 2017 [江婷佳. 罗氏沼虾四种不同 *DnaJ* 基因克隆及表达分析. *中国计量大学硕士研究生学位论文*, 2017]
- JIAO H F, ZHENG D, YAN Q N, *et al.* Effects of water temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Saccostrea cucullata*. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(2): 692–699 [焦海峰, 郑丹, 严巧娜, 等. 温度、盐度及交互作用对僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)呼吸排泄的影响. *生态学报*, 2017, 37(2): 692–699]
- KO G W K, DINESHRAM R, CAMPANATI C, *et al.* Interactive effects of ocean acidification, elevated temperature, and reduced salinity on early-life stages of the Pacific oyster. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(17): 10079–10088
- LIN L H, LIAO W C, XIE J W, *et al.* Effect of salinity on the feeding and metabolic physiology of *Crassostrea hongkongensis*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(11): 10–14 [林丽华, 廖文崇, 谢健文, 等. 盐度对香港巨牡蛎摄食和代谢的影响. *广东农业科学*, 2012, 39(11): 10–14]
- LIU Y, WANG Q H, ZHENG Z, *et al.* Cloning of Pm-HSP70

- gene of *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(3): 990–998 [刘雅, 王庆恒, 郑哲, 等. 马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) Pm-HSP70 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(3): 990–998]
- LÜ G H, ZHANG T, YAO J T, *et al.* Effects of salinity on survival, respiration, feeding metabolism and energy budget of juvenile freshwater mussel *Solenia oleivira*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(5): 802–808 [吕国华, 张婷, 姚静婷, 等. 盐度对橄榄蛸蚌幼蚌存活、呼吸与摄食代谢及能量收支的影响. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(5): 802–808]
- LÜ H Z, LIU J, CHEN J H, *et al.* Effects of salinity on filtration, ingestion, and assimilation rates of three filter-feeding bivalves in the Yangtze River estuary. *Marine Sciences*, 2016, 40(8): 10–17 [吕昊泽, 刘健, 陈锦辉, 等. 盐度对长江口3种滤食性贝类滤水率、摄食率、同化率的影响. *海洋科学*, 2016, 40(8): 10–17]
- MOSSER D D, MORIMOTO R I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2907–2918
- 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*. *Aquaculture*, 2004, 237(1/2/3/4): 269–280
- QIU X B, SHAO Y M, MIAO S, *et al.* The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(22): 2560–2570
- RAN Z S, CHEN H, RAN Y, *et al.* Fatty acid and sterol changes in razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck 1818) reared at different salinities. *Aquaculture*, 2017, 473: 493–500
- RAO K, HUANG M J, ZHANG T P, *et al.* Effects of salinity and pH on respiration and calcification of three kinds of shellfish in Southern China. *Journal of Hydroecology*, 2014, 35(4): 74–80 [饶科, 黄明坚, 章逸平, 等. 盐度与pH对3种南方贝类呼吸率和钙化率的影响. *水生态学杂志*, 2014, 35(4): 74–80]
- RODSTROM E M, RJONSSON P. Survival and feeding activity of oyster spat (*Ostrea edulis* L) as a function of temperature and salinity with implications for culture policies on the Swedish west coast. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19(2): 799–808
- RAHMAN M F, BILLAH M, KLINE R J, *et al.* Effects of elevated temperature on 8-OHdG expression in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Induction of oxidative stress biomarkers, cellular apoptosis, DNA damage and γ H2AX signaling pathways. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2022, 4
- SHEN Y, HENDERSHOT L M. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(1): 40–50
- SPEES J L, CHANG S A, CHANG S E S. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *Biological Bulletin*, 2002, 203(3): 331–337
- TANG B J, YIN F, GUI C S. Effects of salinity on oxygen consumption and ammonia excretion rate of *Sanguinolaria violacea*. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2012(1): 89–94 [唐保军, 尹飞, 归从时. 海水盐度对紫血蛤耗氧率和排氨率的影响. *台湾海峡*, 2012(1): 89–94]
- WANG F, WANG Z P, DONG S L, *et al.* Effects of salinity on respiration and excretion of diploid and triploid oysters *Crassostrea gigas*. *Marine Sciences*, 2003, 27(6): 73–76 [王芳, 王昭萍, 董双林, 等. 盐度对二倍体和三倍体长牡蛎呼吸和排泄的影响. *海洋科学*, 2003, 27(6): 73–76]
- WANG Y J, HU M H, WONG W H, *et al.* The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63(5/6/7/8/9/10/11/12): 255–261
- WU B, CHEN X, YU M J, *et al.* Chromosome-level genome and population genomic analysis provide insights into the evolution and environmental adaptation of Jinjiang oyster *Crassostrea ariakensis*. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(4): 1529–1544
- YANG J Q, JIANG M, LI L, *et al.* Effects of salinity and pH on the filtration rate and ingestion rate of *Meretrix meretrix*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016a, 37(6): 87–93 [杨杰青, 蒋玫, 李磊, 等. 盐度、pH对文蛤(*Meretrix meretrix*)滤水率和摄食率的影响. *渔业科学进展*, 2016a, 37(6): 87–93]
- YANG J Q, SHEN X Q, JIANG M, *et al.* Effects of salinity and pH on expression of HSP70 gene in muscle, gill and mantle of clam *Meretrix meretrix*. *Fisheries Science*, 2016b, 35(4): 398–403 [杨杰青, 沈新强, 蒋玫, 等. 盐度、pH对文蛤肌肉、鳃、外套膜 HSP70 基因表达的影响. *水产科学*, 2016b, 35(4): 398–403]
- YOKOYAMA S, KOSHIO S, TAKAKURA N, *et al.* Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 2006, 255(1/2/3/4): 507–513
- ZHANG Y, SUN J, MU H W, *et al.* Proteomic basis of stress responses in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(1): 304–317
- ZHAO J, LI C Z, WANG R, *et al.* Response expression of Grp78 and its related genes in *Gymnocypris przewalskii* after salinity stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2024, 31(1): 70–81 [赵静, 李长忠, 王蓉, 等. 盐度胁迫后青海湖裸鲤 Grp78 及其相关基因的应答表达. *中国水产科学*, 2024, 31(1): 70–81]

Physiological and Gene Expression Responses of *Crassostrea ariakensis* to Salinity Stress

YANG Miaomiao^{1,2,3}, XIA Sudong¹, LIU Zhihong^{2,3}, SUN Xiujun^{2,3},
ZHOU Liqing^{2,3}, MA Peizhen^{2,3}, LI Zhuanzhuan^{2,3}, WU Biao^{2,3①}

(1. Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China)

Abstract Oysters are keystone species in marine ecosystems and essential for restoring ecological function and maintaining biodiversity maintenance. However, global climate change and increasing human activities have intensified environmental fluctuations in marine habitats, which greatly affect the growth and physiological functions of oysters and other marine organisms. Organisms in these environments have developed adaptive regulatory mechanisms. *Crassostrea ariakensis* is an economically important bivalve that inhabits estuarine areas along the coast of China and crucial for delivering essential ecological services. However, a lack of research exists on the physiological responses of *C. ariakensis* to frequent and substantial salinity variations in these estuaries.

In this study, we investigated the physiological responses and key gene alterations in *C. ariakensis* under salinity stress by analyzing changes in respiration, ammonia excretion, ingestion, and clearance rates under various salinity conditions. The findings provide valuable data and insights for a comprehensive understanding of the physiological and metabolic responses of oysters to salinity stress. This study had different salinity gradients (5, 15, 25, 35, and 45), whereas a salinity of 25 served as the control group. Seawater, freshwater, and seawater crystals were used to establish environments with different salinities, and oyster individuals were randomly assigned to different salinity groups, with three individuals per group. Following 4 h of salinity stress treatment, the gills, adductor muscle, mantle tissue, and labial palps of the oysters were individually removed and promptly frozen in liquid nitrogen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent analysis. The respiration, ammonia excretion, ingestion, and clearance rates of the oysters were measured using the static water method. Based on the β -actin gene as a reference, the expressions of the *CarHsp70*, *CarHyou1*, and *CarDANJC2* genes were detected using RT-qPCR. The reaction system (10 μL) comprised the following: 0.2 μL each of upstream and downstream primers, 1 μL of template cDNA, 5 μL of 2 $\times$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix, and 3.6 μL of diethyl pyrocarbonate water. The reaction conditions were as follows: pre-denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 s, and annealing at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, for 40 cycles. Each group included six biological replicates, with each biological replicate conducted in triplicate. The results demonstrated that within a salinity range of 5–45, the respiration and ammonia excretion rates of *C. ariakensis* initially increased and subsequently decreased, with peak values observed at a salinity of 35. Similarly, the ingestion and clearance rates of *C. ariakensis* exhibited an initial increase, followed by a decrease within the same salinity range, with the maximum clearance rate observed at a salinity of 15 and the minimum value observed at a salinity of 45. In addition, the research revealed substantial effects of salinity stress on gene expression, particularly for *CarHsp70*. The RT-qPCR results showed that the three genes (*CarHsp70*, *CarHyou1*, and *CarDANJC2*)

① Corresponding author: WU Biao, Email: wubiao@ysfri.ac.cn

were expressed in the gills, mantle tissue, adductor muscle, and lip tissue of *C. ariakensis*, with the highest expression level observed in the adductor muscle. Changes in salinity significantly affected the expression of the three genes in the HSP family of *C. ariakensis*. Following salinity stress, the expression levels of the three genes in gill tissues exhibited an upward trend. Upon a 10-unit rise in salinity, the expression levels of *CarHsp70*, *CarHyou1*, and *CarDANJC2* were upregulated by 4.36-, 3.58-, and 2.08-fold, respectively, compared to the control group. Conversely, a 10-unit drop in salinity resulted in adjustments to 3.62-, 2.97-, and 2.05-fold, respectively. Upon a 20-unit rise in salinity, the expression levels of the three genes were 7.13-, 4.68-, and 2.72- higher than those of the control group, respectively. Conversely, with a 20-unit drop in salinity, the expression levels were 5.92-, 6.04-, and 2.54- higher than those of the control group, respectively.

This study elucidates the physiological and molecular responses of *C. ariakensis* to different salinity conditions, including respiration, ammonia excretion, ingestion, and clearance rates, and the expression changes of HSP family genes in response to salinity stress. Within a defined salinity range, the respiratory metabolic activities of shellfish progressively increased with rising salinity; however, beyond a specific threshold, these activities were inhibited. The three genes (*CarHsp70*, *CarHyou1*, and *CarDANJC2*) are essential for physiological functions in different shellfish tissues and may exhibit synergistic effects in response to environmental stress. Their expression patterns provide insights into the mechanisms underlying the adaptation of organisms to environmental changes. This research enhances our scientific understanding of the adaptability of *C. ariakensis* to salinity variations and offers substantial guidance for the sustainable development of the oyster farming industry and genetic improvement. Additionally, it provides reference material for further investigations into the adaptability of oysters to salinity changes.

Key words *Crassostrea ariakensis*; Salinity; Physiological changes; Gene expression