

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16146

盐度和胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的联合效应分析

钱佳慧, 栗志民, 刘建勇, 艾加林

广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088

摘要: 采用中心复合设计和响应曲面法研究了盐度和胁迫时间对九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*) α -淀粉酶基因表达量影响的联合效应, 旨在为九孔鲍盐度驯化及海区推广提供指导。实验设定盐度范围为 22~40, 时间范围为 0~72 h, 建立了盐度、胁迫时间与 α -淀粉酶基因表达量之间关系的定量模型, 并通过分析明确了盐度和胁迫时间的最优组合。结果表明, 盐度对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量影响的一次效应不显著($P>0.05$), 而二次效应极显著($P<0.01$), 说明盐度与九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量之间为非线性关系。随盐度升高, 淀粉酶基因表达量呈先上升后下降的变化趋势, 当盐度为 31 时淀粉酶基因表达量最大, 此时九孔鲍消化能力最强。胁迫时间对淀粉酶基因表达量影响的一次效应显著($P<0.05$), 二次效应不显著($P>0.05$), 表明胁迫时间与九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量之间呈线性关系, 即随着胁迫时间的延长, 淀粉酶基因从开始低水平表达逐渐升高并恢复至正常表达水平。盐度和胁迫时间之间不存在交互作用。对实验结果建立模型可知, α -淀粉酶基因表达回归模型达极显著水平($P<0.05$), 且失拟项不显著($P>0.05$), 表明实验拟合出的方程有效。回归方程的决定系数为 80.05%, 校正系数 65.80%, 预测系数 50.18%, 表明方程拟合度较好, 模型选择较为恰当, 可以为不同盐度和胁迫时间诱导下的淀粉酶基因表达量变化提供参考依据。

关键词: 九孔鲍; α -蛋白酶; 盐度; 胁迫时间; 基因表达量; 联合效应

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0057-08

α -淀粉酶是众多蛋白酶中最重要的胞外蛋白酶, 它广泛存在于植物^[1]、动物^[2]、微生物^[3]等多种生物群体中。在水生动物中, α -淀粉酶主要在营养消化吸收、碳水化合物代谢等方面起到至关重要的作用^[4]。已有研究表明, 文蛤(*Meretrix meretrix*)不同个体间淀粉酶活力不同, 大个体文蛤中淀粉酶活力较强^[5]; 刺参(*Morinane palensis*)个体在生长发育过程中, 淀粉酶活力逐渐升高, 且远高于幼体期^[6]。此外, α -淀粉酶基因的多态性与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[7]、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[8]、草鱼(*Ctenopharynx godonidellus*)^[9]生长性状具有显著相关性。以上研究均表明 α -淀粉酶与水生动物生长性状显著相关。 α -淀粉酶影响水生动物的生长机制通常包含 2 个方面: 一是 α -淀粉酶活力变化可以改变水生动物对

食物的消化吸收能力, 从而影响机体生长状况^[10]; 另一方面则是 α -淀粉酶的合成量对水生动物营养吸收产生影响, 亦可以说 α -淀粉酶的基因表达变化在某种程度上可以反映机体生长情况^[8]。近年来有关水生动物 α -淀粉酶的研究日益增多, 但大多数研究都局限于生化水平, 极少从 α -淀粉酶基因表达方面进行研究, 本研究从分子层面阐述了环境因子对 α -淀粉酶基因表达量的影响, 从基因水平上解释环境因子影响水生动物生长的原因。

九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)原产于台湾, 20 世纪 90 年代初被引进广东, 现已成为广东沿海地区养殖鲍的主要种类^[11]。广东地区经常受台风影响, 降雨量明显多于其他省份, 每当降雨量增加, 海区盐度会骤降, 这种盐度大范围的变化往往会引起水生动物体腔内渗透压改变,

收稿日期: 2016-05-08; 修订日期: 2016-06-02.

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2015A020209196); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目(A201408A04); 深圳市未来产业项目(2015A020209196).

作者简介: 钱佳慧(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事经济无脊椎动物增养殖研究. E-mail: 52.duo@163.com

通信作者: 刘建勇(1970-), 男, 教授, 主要从事海产经济遗传育种研究. E-mail: liujy70@126.com

破坏细胞内的离子代谢, 最终导致机体蛋白合成出现紊乱^[12-13], 严重时会造成水产动物大量死亡。作为广东地区本地种的九孔鲍受盐度变化影响, 死亡现象尤为明显^[12, 14]。因此研究九孔鲍在不同盐度和胁迫时间下 α -淀粉酶基因表达量的变化, 对探究九孔鲍工厂化养殖模式以及在不同海区推广等具有重要的指导作用。响应曲面法作为实验优化方法中的首选方法, 它不仅能够有效减少实验次数, 同时能够较准确地预测和获得较优的实验条件^[15-16], 本研究采用响应曲面法, 将盐度和胁迫时间作为影响因子, 研究在 2 个因子胁迫下九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的变化, 从而了解九孔鲍在不同盐度范围下的适应情况, 同时为九孔鲍低盐或高盐下的驯化提供分子方面的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用九孔鲍取自广东汕尾市某水产公司。随机选取相同家系九孔鲍 800 头, 平均壳长(45.52±5.66) mm, 体重(11.29±4.23) g。在实验前将 800 头鲍暂养于经过沙滤、消毒后的海水中, 并投喂适量的海带。水温为 27℃, 盐度为 32。

1.2 实验设计

本实验采用中心复合设计以及响应曲面法, 对盐度和胁迫时间 2 个因子进行探究, 并得出盐度和胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的联合效应。实验共有 13 个组合, 每个组合均设有 3 组平行。每个组合下分别放入九孔鲍 20 头。实验中盐度范围为 22~40, 时间范围为 0~72 h。具体组合见表 1。

1.3 胁迫实验

实验在 10 L 的塑料桶内进行, 将健康、活力强的九孔鲍放入相应的盐度组, 然后按照表 1 组合进行胁迫。盐度调节采用曝气后的海水添加海水晶或淡水进行调节, 实验中保证盐度变化不超过±0.2。每天对九孔鲍进行 50%换水, 然后用遮光板进行遮光, 并投喂少量的海带。盐度胁迫到相应的取样时间后进行九孔鲍胃组织取样, 并放于 RNA hold 中保存, 用于 RNA 提取。

表 1 实验设计
Tab. 1 The design of the experiment

序号 no.	编码值 code value		实际值 actual value	
	<i>S</i>	<i>t/h</i>	<i>S</i>	<i>t/h</i>
1	0	0	31.00	36.00
2	0	0	31.00	36.00
3	-1	1	24.64	61.46
4	-1.414	0	22.00	36.00
5	-1	-1	24.64	10.54
6	0	0	31.00	36.00
7	0	0	31.00	36.00
8	1	1	37.36	61.46
9	0	0	31.00	36.00
10	0	-1.414	31.00	0.00
11	1	-1	37.36	10.54
12	1.414	0	40.00	36.00
13	0	1.414	31.00	72.00

注: *S* 表示盐度, *t* 表示胁迫时间。

Note: *S* means salinity; *t* means stress time.

1.4 九孔鲍总 RNA 提取及 cDNA 合成

九孔鲍总 RNA 提取方法参照 Trizol(北京全式金生物技术有限公司)试剂说明书。然后取 1 μ L RNA 溶液于微量核酸定量仪上检测 RNA 浓度以及纯度, 并记录 OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 同时记录 RNA 浓度值。若 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 则认为 RNA 质量较好, 可用于实时荧光定量 PCR。

采用 EasyScript One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒, 将提取的总 RNA 反转为 cDNA, 反应体系为 500 ng RNA, 1 μ L Oligo-dT (0.5 μ g/ μ L), 10 μ L 2 \times ES Reaction Mix, 1 μ L EasyScript Enzyme Mix, 1 μ L gDNA Remover, 加至 RNase-free H₂O 至 20 μ L。然后将混合溶液于 42℃ 孵育反转录 30 min, 85℃ 加热 5 s, 最后 4℃ 保存备用。

1.5 盐度及胁迫时间对 α -淀粉酶基因表达量影响检测

采用九孔鲍 β -actin 基因作为内参基因, 内参基因与目的基因荧光定量 PCR 特异引物序列如表 2 所示。荧光定量 PCR 采用北京全式金生物技术有限公司的 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒, 每个样品设置 3 个重复。反应体系参照试剂盒说明书, 反应条件为: 94℃ 30 s; 94℃ 5 s,

58℃ 34 s, 72℃ 10 s, 40 个循环。荧光信号采集设置为退火步骤进行采集。反应结束后导出淀粉酶基因表达量数据。

表 2 本研究所用引物序列

Tab. 2 The sequences of primers used in the study

名称 name	序列 sequence
β -actin(s)	CCATCCAGGCTGTTCTGTCTC
β -actin(a)	GCGGTGGTGGTGAATGAGTAA
RT-AMY(s)	ATGGTAGCGTTCAGGAATGCCGTAG
RT-AMY(a)	GGGAGCCCTGTTTGAATGTTTGAT

1.6 数据处理

以盐度和胁迫时间为自变量, 以九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量为因变量, 建立 α -淀粉酶基因表达量的二次回归方程为:

$$Y_{amy} = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 S + \beta_3 T \times S + \beta_4 T^2 + \beta_5 S^2 + \mu \quad (1)$$

式中, Y_{amy} 表示响应值(α -淀粉酶基因表达); β_0 表示截距; β_1 、 β_2 表示盐度和胁迫时间的一次效应; β_3 表示盐度和胁迫时间的互作效应; β_4 、 β_5 表示盐度和胁迫时间的二次效应; μ 表示随机误差, 并且假设为服从均值为 0 的正态分布。应用 Design Expert 软件对实验数据进行分析, 同时将所得方程进行优化, 得到九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的最优盐度和时间。此外通过决定系数、校正系数等众多参数对模型进行失拟性检验。并将显著性标准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 盐度、胁迫时间对九孔鲍胃 α -淀粉酶基因表达量影响的方差分析

对盐度、胁迫时间不同组合下的九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量进行检测(表 3), 结果表明, 盐度相同时, 随胁迫时间延长, α -淀粉酶基因表达量升高。当盐度为 31, 胁迫时间 36 h 下 α -淀粉酶基因表达量最高。对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量进行回归模型方差分析(表 4), 结果发现, 建立的九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的回归模型达极限显著($P<0.05$), 且失拟水平不显著($P>0.05$), 表明实验所拟合出的方程有效。回归方程的决定系数为 80.05%, 校正系数为 65.80%, 预测系数为 50.18%, 表明方程拟合度较好, 模型选择较为恰当。

表 3 不同盐度和胁迫时间组合下 α -淀粉酶基因表达量
Tab. 3 The expression level of alpha-amylase gene in different salinity and stress time

盐度 salinity	胁迫时间/h stress time	α -淀粉酶基因表达量 alpha-amylase expression level
31.00	36.00	2.62±0.29
31.00	36.00	2.62±0.02
24.64	61.46	1.82±0.22
22.00	36.00	1.11±0.01
24.64	10.54	1.09±0.12
31.00	36.00	2.61±0.04
31.00	36.00	1.62±0.10
37.36	61.46	2.02±0.10
31.00	36.00	2.61±0.09
31.00	0.00	1.36±0.18
37.36	10.54	1.75±0.23
40.00	36.00	1.27±0.11
31.00	72.00	2.71±0.08

表 4 盐度、胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量
回归模型方差分析

Tab. 4 Variance analysis of synergistic effect of salinity and stress time on alpha-amylase gene expression level

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P
模型 model	3.82	5	0.76	5.62	0.0214
残差 residual	0.95	7	0.14		
失拟项 lack of fit	0.16	3	0.05	0.27	0.8446
纯误差 pure error	0.79	4	0.20		

注: 决定系数 $R^2=80.05\%$, 校正系数 Adj. $R^2=65.80\%$, 预测系数 Pred. $R^2=50.18\%$ 。

Note: Determinate coefficient (R^2) is 80.05%; modified coefficient (Adj. R^2) is 65.80%; predictive coefficient (Pred. R^2) is 50.18%.

对基因表达量进行回归分析(表 5)可知, 盐度的一次效应不显著($P>0.05$), 二次效应显著($P<0.05$), 表明盐度对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响是非线性的, 即存在峰值。胁迫时间的一次效应显著($P<0.05$), 而二次效应不显著($P>0.05$), 表明胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响呈线性关系。此外盐度和胁迫时间不存在交互作用, 即两个因子为独立因子, 彼此间互不影响。对实验数据进行二次方程拟合, 并根据系数估计值得到 α -淀粉酶基因表达量(Y_{amy})与盐度(S)、胁迫时间(t)的二次回归方程:

$$Y_{amy} = 2.42 + 1.14S + 0.36t - 0.11S \times t - 0.6S^2 - 0.18t^2$$

表 5 盐度、胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量影响的回归分析

Tab. 5 The analysis of regression on amylase gene expression level under different salinity and stress time

因子 factor	系数估计值 coefficient estimate	P	标准误差 standard error	95%置信区间 95% CI	
				低值 low value	高值 high value
截距 intercept	2.42	—	0.16	2.03	2.81
S	0.14	0.3307	0.13	-0.17	0.44
t	0.36	0.0270*	0.13	0.06	0.67
$S \times t$	-0.11	0.5536	0.18	-0.55	0.32
S^2	-0.60	0.0036**	0.14	-0.93	-0.27
t^2	-0.18	0.2481	0.14	-0.51	0.15

注: S 为盐度, t 为胁迫时间. *表示差异显著($P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$).

Note: S is salinity; t is stress time. * means significant difference ($P < 0.05$); ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.2 盐度、胁迫时间对九孔鲍胃 α -淀粉酶基因表达量的响应曲面分析

图 1 为盐度、胁迫时间的等高线图。由图 1 可知盐度、胁迫时间的交互效应不显著, 表明盐度的改变不影响胁迫时间的变化区间。当盐度接近 31, 胁迫时间接近 36 h 时 α -淀粉酶基因表达量接近 2.5。图 2 为盐度、胁迫时间的响应曲面分析图。由图 2 可知, 盐度对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响呈抛物线形变化趋势, 即随着盐度的升高, α -淀粉酶基因表达量先升高后下降; 胁迫时

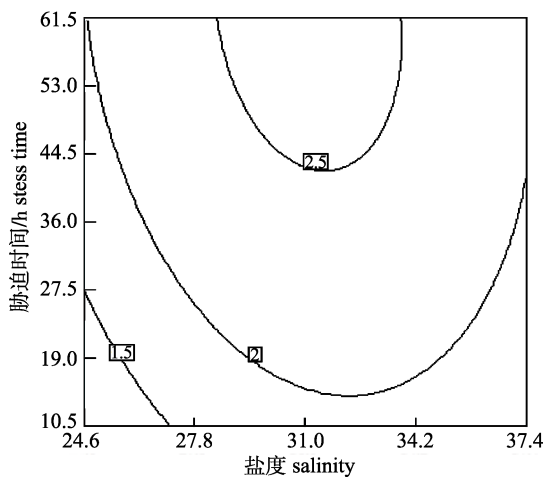


图 1 盐度、胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量影响的等高线

Fig. 1 Contour plot of the effect of salinity and stress time on alpha-amylase gene expression of *Haliotis diversicolor supertexta*

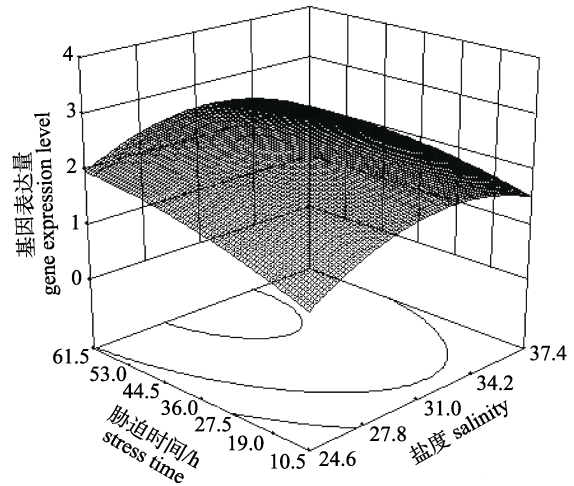


图 2 盐度、胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量影响的响应曲面

Fig. 2 Response surface of salinity and stress time on alpha-amylase gene expression of *Haliotis diversicolor supertexta*

间对 α -淀粉酶基因表达量的影响呈线性变化, 即随着胁迫时间延长, α -淀粉酶基因表达量逐渐升高, 当胁迫时间在 44.49~61.46 h 区间, α -淀粉酶基因表达量逐渐趋于平缓。在盐度 31, 胁迫时间 36 h 时 α -淀粉酶基因表达量存在最优值。

2.3 盐度、胁迫时间对九孔鲍胃 α -淀粉酶基因表达量影响的优化

以九孔鲍胃组织 α -淀粉酶基因表达量为响应值, 通过中心复合设计考察了盐度、胁迫时间这两个因子对 α -淀粉酶基因表达量的影响, 并对实验进行优化。结果发现, 当盐度为 31, 胁迫时间为 36 h 时, 九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量达最大值 (2.42), 且满意度达 93.5%, 即在此盐度、胁迫时间组合下, α -淀粉酶基因表达量达到最大值。将最佳组合进行实验验证, 发现与理论值基本相符。

3 讨论

3.1 盐度对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响

在诸多环境因子中, 盐度通常对九孔鲍生长、生存及繁殖具有显著影响^[17-19]。研究发现, 盐度一次效应对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量影响不显著($P > 0.05$), 但二次效应极显著($P < 0.01$), 表明盐度对 α -淀粉酶基因表达量的影响是非线性的, 即盐度过高或过低都会影响 α -淀粉酶基因的表达量。研究发现, 盐度对马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)

Hsp70 基因表达量的一次效应不显著, 而二次效应达到显著水平^[20]; 仿刺参(*Apostichopus Japonicus*) 在盐度从 30 突然降低至 20 时, *Hsp90* 基因表达量的变化趋势也是非线性的^[12]; 小球藻(*Chlorella*) 在不同盐度下, 硝酸还原酶基因表达量差异显著, 且表达量随盐度升高呈现先上升后下降的变化趋势^[21]。以上研究表明, 盐度对于基因表达量的影响是非线性的, 证实了本研究结果。目前对盐度影响 α -淀粉酶基因表达量的调控机制尚未见报道, 但本研究初步推断可能是盐度影响导致了九孔鲍摄食量的下降, 处于饥饿状态的九孔鲍不能通过食物的蠕动刺激肠胃神经节, 造成淀粉酶基因表达的 mRNA 含量下降^[22-23]。 α -淀粉酶基因表达量的高低反映九孔鲍消化能力的强弱, 说明当盐度为非最适盐度时, 九孔鲍消化能力减弱, 食物中能量的摄取量减少, 而摄取的少量能量全部用于机体渗透压调节, 生长所需能量的输入几乎为零, 严重影响九孔鲍生长^[24-26]。盐度不仅可以影响 α -淀粉酶的表达量, 同时可以通过改变酶活力影响机体生长。已有研究表明, 盐度可以影响鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)^[27]、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)^[14]、凡纳滨对虾^[28]等多种水生动物的淀粉酶活力, 并且淀粉酶活力高低与生长具有相关性。因此推测盐度对九孔鲍生长的影响不仅来源于对淀粉酶表达量的影响, 同时也可能来自于盐度对淀粉酶活力的影响。而盐度对九孔鲍淀粉酶活力的影响及其与生长的相关性有待于进一步研究。

3.2 胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响

本研究发现, 胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量存在显著的一次效应($P < 0.05$), 而二次效应未达显著水平($P > 0.05$)。说明胁迫时间对九孔鲍基因表达量影响呈线性关系, 通过对 α -淀粉酶基因表达量构建响应曲面模型可知, 随着胁迫时间延长, α -淀粉酶基因表达量逐渐升高。九孔鲍受到盐度胁迫时, 由于水环境渗透压突然改变, 导致九孔鲍停止摄食, 因此在胁迫初期检测到 α -淀粉酶基因表达水平较低。但随胁迫时间延长, 九孔鲍逐渐适应渗透压改变, 并根据外界渗透压慢慢调节自身体内的离子平衡, 因此九孔鲍开始逐

渐摄食, 同时检测到 α -淀粉酶基因表达水平逐渐升高。当胁迫时间超过 48 h 时, 发现 α -淀粉酶基因表达量趋于平缓, 不再有上升的趋势, 表明此时九孔鲍已适应外界环境, 基因表达趋于稳定。这种变化趋势不仅存在于九孔鲍 α -淀粉酶基因中, 在其他物种其他基因中也存在。如许友卿等^[29]对近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) 进行温度胁迫研究发现, 在 12 h 以前各个时间点 *i*-型溶菌酶基因表达量差异显著, 但 12~72 h 时各个时间点 *i*-型溶菌酶基因表达量差异不显著($P > 0.05$), 表明在 12 h 以后基因表达趋于稳定。对口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*) 进行盐度胁迫时发现, 不同胁迫时间下口虾蛄 *Mn-SOD* 基因表达量差异显著, 且随着胁迫时间延长表达量逐渐升高, 当胁迫时间继续延长表达量又呈下降趋势, 表明口虾蛄在盐度胁迫 72 h 内呈现不适应-适应-不适应的过程^[30]。本研究发现, 九孔鲍在盐度胁迫下随胁迫时间延长呈现不适应-适应的过程, 说明九孔鲍经过驯化可以适应较高或较低盐度, 且驯化时间不少于 48 h。因此可根据该特性驯化出适合高盐海区或低盐海区养殖的九孔鲍品种。

3.3 盐度和胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达影响的交互作用

在以往研究中只考察单因子对 α -淀粉酶基因表达量的影响^[31], 并未考虑因子间的交互作用。本实验采用中心复合设计, 对盐度和胁迫时间的交互作用进行显著性检验, 发现盐度、胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量无显著交互作用, 表明盐度和胁迫时间对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达的影响可能是独立进行的。对实验进行优化发现, 在盐度为 31, 胁迫时间为 36 h 时 α -淀粉酶基因表达量最高, 说明盐度 31 为九孔鲍的最适盐度。由于九孔鲍大多在海区养殖, 影响其生长及基因表达的因素复杂而多变, 而本研究只考察了盐度和胁迫时间这两个因子, 对于海水的温度、流速等方面并未进行研究, 因此有待于进一步研究其他环境因子对九孔鲍 α -淀粉酶基因表达量的影响。

参考文献:

- [1] Pandey B, Saini M, Sharma P. Molecular phylogenetic and sequence variation analysis of dimeric α -amylase inhibitor

- genes in wheat and its wild relative species[J]. *Plant Gene*, 2016, 6: 48–58.
- [2] Koyama I, Komine S I, Iino N, et al. α -amylase expressed in human liver is encoded by the AMY-2B gene identified in tumorous tissues[J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 309(1): 73–83.
- [3] Bunyatang O, Chiropongsatonkul N, Bangrak P, et al. Molecular cloning and characterization of a novel bi-functional α -amylase/subtilisin inhibitor from *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 101: 76–87.
- [4] Glen K L, Grapes L, Suwanosopee T, et al. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp[J]. *Anim Genet*, 2005, 36: 235–236.
- [5] Zhang Y. Comparative study of cultured effect, early growth and digestive enzymes activity in *Meretrix meretrix* of different shell colors[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [张雨. 不同壳色文蛤的养殖效应、早期发育生长以及消化酶活性比较[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [6] Tang L W, Xu Z, Cheng J C. Activities of four digestive enzymes in various developmental larvae and in alimentary canals at various sizes of *Apostichopus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 275–277. [唐黎王, 许重, 程骏驰. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性[J]. *水产科学*, 2007, 26(5): 275–277.]
- [7] Xin J J, Liu X L, Li X L, et al. PCR-RFLP polymorphism of alpha-amylase gene and its association with growth traits of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(3): 124–130. [辛静静, 刘小林, 李喜莲, 等. 凡纳滨对虾 α -淀粉酶基因 PCR-RFLP 多态性与生长性状的相关分析[J]. *海洋学报*, 2011, 33(3): 124–130.]
- [8] Li L. Genomic structure, SNP screening, growth association and ecological response of α -amylase gene in the pearl oyster *Pinctada fucata*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [李璐. 合浦珠母贝 α -淀粉酶基因结构、SNP 筛选、生长关联与生态响应研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [9] Tang X H. Structure and expression analysis of three types of pyruvate kinase and α -AMY gene of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and screening of SNPs markers related to growth traits[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [唐小红. 草鱼 3 种丙酮酸激酶和 α -淀粉酶基因的结构、表达分析和生长相关标记筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [10] Homaei A, Ghanbarzadeh M, Monsef F. Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 83: 306–314.
- [11] Cai Y Y, Zhang Y, Wei R F. Overview of Shellfish[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979. [蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论[D]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.]
- [12] Yu S S, Wang Q L, Meng X L, et al. Effects of salinity fluctuation on the expression of *hsp70* and *hsp90* gene in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(9): 22–27. [于姗姗, 王青林, 孟宪亮, 等. 盐度骤变对仿刺参 *hsp70* 及 *hsp90* 基因表达的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(9): 22–27.]
- [13] Diehl W J. Osmoregulation in echinoderms[J]. *Comp Biochem Physiol A: Physiol*, 1986, 84(2): 199–205.
- [14] Zhou W W. Effect of storm on the breeding environment of *Holothuroidea* and emergency countermeasures[J]. *Scientific Fish Farming*, 2006(11): 39. [周维武. 暴雨对海参养殖环境的影响与应急对策 [J]. *科学养鱼*, 2006(11): 39.]
- [15] Chen Z P, Zhu J B, Chen H X. Central composite design used to optimize bifendate liposone prescriptions[J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 25(5): 377–379. [陈志鹏, 朱家璧, 陈洪轩. 利用中心复合设计法优化联苯双酯脂质体处方[J]. *南京中医药大学学报*, 2009, 25(5): 377–379.]
- [16] Qian J H, Li Z M, Chen S H. Synergistic effects of temperature and salinity on activities of amylase and Na^+/K^+ -ATPase in juvenile scallop *Chlamys nobilis* (Reeve)[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(5): 269–276. [钱佳慧, 栗志民, 陈树河. 温度和盐度对华贵栉孔扇贝幼贝淀粉酶和 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的联合效应[J]. *水产科学*, 2015, 34(5): 269–276.]
- [17] Chen C S, Zhong Y P, Wu Y P. The effect of salinity on food intake, growth and survival of *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 22(1): 41–45. [陈昌生, 钟幼平, 吴永沛. 盐度对九孔鲍摄食、生长及存活的影响[J]. *水产学报*, 2000, 22(1): 41–45.]
- [18] Yan X Z, Wang G Z, Li S J. Effects of water salinity on energy budget of *Haliotis diversicolor aquatilis*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(8): 1520–1526. [阎希柱, 王桂忠, 李少菁. 盐度对九孔鲍能量收支的影响[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(8): 1520–1526.]
- [19] Martello L B, Tjeerdema R S. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone[J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 51(3): 351–362.
- [20] Wang Y N, Wang H, Zhu X W, et al. Joint effects of water temperature and salinity on the expression of gill *Hsp70* gene in *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(12): 3467–3473. [王亚男, 王辉, 朱晓闻, 等. 温度、盐度对马氏珠母贝 *Hsp70* 基因表达

- 量的联合效应[J]. 应用生态学报, 2012, 23(12): 3467–3473.]
- [21] Du Y, Sun X, Xu N J. Effects of different salinity and iron concentration on growth, nitrate reductase activity and its expression in *Chlorella*[J]. Ecological Science, 2012, 31(4): 441–445. [杜宇, 孙雪, 徐年军. 不同盐度和 Fe^{3+} 浓度对小球藻生长、硝酸还原酶活性及基因表达的影响[J]. 生态科学, 2012, 31(4): 441–445.]
- [22] Han Q. The effects of hunger on the trypsin activity and its mRNA expression level of juvenile *Lateolabrax japonicus*[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2009. [韩强. 饥饿对鲈鱼稚鱼胰蛋白酶活性的影响及其 mRNA 的定量研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2009.]
- [23] Chen C S, Zhong Y P, Wu Y P. The effect of salinity on food intake, growth and survival of *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(1): 41–45. [陈昌生, 钟幼平, 吴永沛, 等. 盐度对九孔鲍摄食、生长及存活的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 41–45.]
- [24] Laiz C N R, Sangiao A S, Guzm N J M, et al. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism [J]. Aquaculture, 2005, 250(3–4): 849–861.
- [25] Pschoiou E, Mamuris Z, Panagiotaki P, et al. The response of digestive proteases to abrupt salinity decrease in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2007, 147(2): 156–163.
- [26] Vargas C L, Saavedra E, Oyarz N R, et al. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of sub-antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities[J]. Fish Physiol Biochem, 2015: 1–13.
- [27] Wang Y. Effects of low-salt stress on the growth, physiological and biochemical indexes of juvenile *Lateolabrax japonicus*[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2008. [王艳. 低盐胁迫对鲈鱼稚鱼生长及生理生化指标的影响[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2008.]
- [28] Huang K, Yang H K, Zhan G, et al. Effect of salinities on digestive enzyme activities of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Science, 2007, 31(3): 37–40. [黄凯, 杨鸿昆, 战歌, 等. 盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2007, 31(3): 37–40.]
- [29] Xu Y Q, Wu W J, Ding Z K, et al. Analysis of i-type lysozyme gene from *Crassostrea hongkongensis* and the effect of temperature on the gene expression[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2012, 31(6): 69–75. [许友卿, 吴卫君, 丁兆坤, 等. 近江牡蛎 i-型溶菌酶基因分析及温度对基因表达的影响[J]. 热带海洋学报, 2012, 31(6): 69–75.]
- [30] Liu H Y, Zhang H, Chen L, et al. The expression of Mn-SOD gene in larval mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* under salinity stress[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(1): 17–21. [刘海映, 张红, 陈雷, 等. 盐度胁迫下口虾蛄 Mn-SOD 基因的表达分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(1): 17–21.]
- [31] Xie D, Xu S, Wang S, et al. Cloning, tissue expression, and nutritional regulation of the α -amylase gene in the herbivorous marine teleost *Siganus canaliculatus*[J]. Aquaculture, 2016, 454: 229–236.

Synergistic effects of salinity and stress duration on alpha-amylase expression in *Haliotis diversicolor supertexta*

QIAN Jiahui, LI Zhimin, LIU Jianyong, AI Jialin

Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: *Haliotis diversicolor supertexta* is mainly distributed in coastal waters off southern China and is a warmwater, economically important shellfish. *H. diversicolor supertexta* is characterized by rapid growth, a short breeding cycle, suitability for high density cultivation, and is nutritious, so there is high demand among consumers. Guangdong is often affected by typhoons, so more rain falls there than in other provinces. Sea salinity drops when rainfall increases, and the osmotic pressure in aquatic animals varies because of salinity changes, which can result in massive mortalities of abalone. *H. diversicolor supertexta* is a local species in Guangdong, making it particularly susceptible. Response surface methodology (RSM) is a collection of statistical and mathematical techniques to optimize a process. This methodology generates an empirical mathematical model that defines the effect of an independent variable on a response of interest to optimize the response. RSM has been applied in ecotoxicological studies of marine bivalve larvae and to investigate the effects of environmental variables on embryonic and larval development. RSM has not been used in any gastropod nutritional studies. In this study, the synergistic effects of salinity and stress duration on alpha-amylase gene expression were assessed using central composite design and RSM. The results show that the linear effects of salinity on alpha-amylase gene expression were not significant ($P>0.05$), but the linear effect of stress duration was significant ($P<0.05$), suggesting that expression of the amylase gene was affected by stress duration. In addition, the quadratic effects of salinity on amylase gene expression were significant ($P<0.05$), but the quadratic effects of stress duration on amylase gene expression were not significant ($P>0.05$). No synergism was detected between salinity and stress duration. The RSM model equation for the relationship between amylase gene expression and the two factors was established ($R^2=80.05\%$). The Adj. R^2 value was 65.80%, and the Pre. R^2 values was 50.18%, suggesting a good model fit for prediction. Maximal amylase gene expression was observed when salinity was 31, and stress duration was 36 h. *H. diversicolor supertexta* is affected by many factors, as it is cultured in a marine environment. Additional factors should be studied in the future.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; alpha-amylase; salinity; stress duration; gene expression; synergistic effects

Corresponding author: LIU Jianyong. E-mail: liujy70@126.com