

DOI: 10.12264/JFSC2023-0024

## 中华绒螯蟹分子育种群体与传统育种群体的耐低氧性能

关伟晔<sup>1, 2, 3</sup>, 周振旗<sup>1, 2, 3</sup>, 谢昕洋<sup>1, 2, 3</sup>, 侯鑫<sup>1, 2, 3</sup>, 王军<sup>1, 2, 3</sup>, 王成辉<sup>1, 2, 3</sup>

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306

**摘要:** 本研究通过低氧-复氧处理, 分析了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的分子育种群体(M 选育系)与传统育种群体(JH 选育系)的低氧耐受性能差异。结果显示, M 选育系与 JH 选育系在低氧状态下的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)分别为(0.952±0.058) mg/L 和(1.000±0.053) mg/L。在低氧处理 12 h 时, 两系的血细胞总数(THC)均达最高峰, M 选育系(26.58×10<sup>6</sup> 个/mL)高于 JH 选育系(23.88×10<sup>6</sup> 个/mL), 但差异不显著( $P>0.05$ ); 而在低氧处理 24 h 时, M 选育系的 THC 显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。在低氧处理 3 h 和 24 h 时, M 选育系的血蓝蛋白含量均高于 JH 选育系( $P>0.05$ )。在低氧处理 3 h 和 12 h 时, M 选育系与 JH 选育系的血淋巴中葡萄糖含量分别下降 9.55% 与 14.64%。在低氧处理 3 h 和 12 h 时, M 选育系的肝胰腺中糖原含量显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。在整个低氧期间, M 选育系的肝胰腺中可溶性蛋白含量均高于 JH 选育系, 而乳酸含量均低于 JH 选育系( $P>0.05$ ); M 选育系的总抗氧化能力(T-AOC)和过氧化氢酶(CAT)活性均高于 JH 选育系, 且 M 选育系在复氧 24 h 后的超氧化物歧化酶(SOD)活性也显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。在低氧处理 3 h 和 12 h 时, M 选育系的低氧诱导因子(*Es-HIF-1α*)与葡萄糖转运蛋白(*Es-GLUT4*)基因表达均显著上调。研究表明, M 选育系具有更强的氧运输能力、更高的糖原和可溶性蛋白储备与抗氧化水平, 具备更好的耐低氧性能。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 低氧刺激; 育种群体; 糖代谢; 抗氧化能力

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)04-0447-10

分子标记辅助育种(molecular marker-assisted selection,MAS)是借助与目的基因紧密关联的分子标记来选择优秀个体, 从而实现对目标性状进行改良的一种育种方式<sup>[1-3]</sup>。该方法能在生物发育早期就进行目标性状的选育, 不需经历完整的发育周期, 缩短了育种进程<sup>[4-5]</sup>。相比传统的选择育种或杂交选育, 分子标记辅助育种能够更高效、精准地聚合目标性状所需基因。同时, 分子标记辅助育种不改变生物基因结构, 仅利用基因内部特异性序列进行选育, 已广泛应用于水生生物<sup>[6-8]</sup>。我国的分子辅助育种研究进展较快, 相关研究已较深入<sup>[9]</sup>。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹, 是我国名特优水产养殖对象。目前, 我国中华绒螯蟹的成蟹年养殖产量达 80 万 t<sup>[10]</sup>, 但国审新品种只有 5 个。面对庞大的中华绒螯蟹养殖产业, 良种贡献仍然十分薄弱。中华绒螯蟹作为底栖的无脊椎动物, 且具有开放式血液循环系统, 其生长更易受到环境条件影响, 如温度<sup>[11]</sup>、溶解氧<sup>[12]</sup>。有研究发现, 低氧环境不仅影响中华绒螯蟹的蜕壳生长和繁殖<sup>[13-14]</sup>; 而且会增加遭受病害的风险<sup>[15-16]</sup>。目前, 国内已育成多个耐低氧的鱼类新品种<sup>[17]</sup>, 而中华绒螯蟹的育种仍以生长性状为主, 耐低氧的抗逆育种尚未见报道。

收稿日期: 2023-02-16; 修订日期: 2023-02-27.

基金项目: 上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系建设项目(沪农科产字(2022)第 4 号).

作者简介: 关伟晔(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程. E-mail: 2101916947@qq.com

通信作者: 王成辉, 教授, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程. E-mail: wangch@shou.edu.cn

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 又名生长分化因子8(growth differentiation factor-8, GDF-8), 属于TGF- $\beta$ 超家族中的一员<sup>[18]</sup>, 因其对动物骨骼肌的生长发育有负调控作用而得名<sup>[19-20]</sup>。有研究发现, MSTN 参与了低氧条件下对骨骼肌生长发育的调控<sup>[21-23]</sup>。MSTN 在同一物种中具有较高的突变多样性, 表现出明显的遗传效应和较广泛的育种应用<sup>[24-26]</sup>。本实验室以 MSTN 有关单核酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点作为分子育种辅助标记<sup>[27-28]</sup>, 建立了中华绒螯蟹分子育种群体。本研究通过低氧-复氧处理, 比较分子育种群体和传统育种群体的低氧耐受性能差异, 以期为中华绒螯蟹耐低氧种质资源开发和良种创制提供依据, 为 MSTN 用于水产动物的抗逆育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与装置

本研究中所用的分子育种群体是以 MSTN 的 5 个 SNP 标记构建的分子标记辅助育种群体<sup>[29]</sup>, 简称 M 选育系。另一选育群体为与 M 选育系相同规格亲本繁育的“江海 21”品种(以生长和体型作为育种性状, 品种登记号: GS-02-03-2015), 简称 JH 选育系。两个选育群体均饲养于上海海洋大学水产动物种质实验站(上海浦东新区新场镇), 平均体重为(21.2±2.17) g, 四肢健全, 活力良好。运回实验室后, 在 200 L 的塑料圆桶中暂养和适应 7 d 后开始正式试验。低氧胁迫装置为自制的塑料箱, 规格为长×高×宽=56 cm×29 cm×22 cm, 用保鲜膜密闭。

### 1.2 低氧胁迫实验

实验采用低氧静态胁迫法: 向自制低氧胁迫装置内注入提前曝气 24 h 的自来水, 然后往水体中不断注入氮气, 直至水体溶解氧含量降至 2.0 mg/L (便携式溶氧仪实时监测), 形成低氧条件。将已在背甲上作好标记的 M 选育系与 JH 选育系各 20 只蟹放于同一装置内, 随后对装置覆盖保鲜膜, 以隔绝空气, 稳定实验水体中的溶解氧。试验共设 3 个重复, 每个选育系各 60 只蟹。实验期间每隔 2 h 测量 1 次溶解氧含量, 维持溶解氧在 2.0 mg/L 左

右。在低氧状态的 0、3、12、24 h 和复氧后的 24 h (即 24 h 低氧结束后马上曝气增氧 24 h), 从各重复中随机取出 M 选育系与 JH 选育系各 3 只蟹, 抽取 200  $\mu$ L 血淋巴与 ACD 抗凝剂 1:1 混合, 于 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液于-80 °C 冰箱中保存。同时解剖并取肝胰腺, 于液氮中迅速冷冻后保存于-80 °C 冰箱中备用。

**1.2.1 24 h 半致死浓度(LC<sub>50</sub>)测定** 根据预实验中 24 h 低氧时的存活个体数最大和最小的溶解氧含量(1.2~0.7 mg/L), 设置 0.8、1.0、1.2 mg/L 3 个浓度梯度。每个梯度设置 3 个重复, 每个重复中放入 M 选育系与 JH 选育系各 10 只蟹进行半致死浓度(LC<sub>50</sub>) 实验, 24 h 后记录各个重复的死亡蟹数。通过 SPSS 28.0 软件的线性回归法计算 LC<sub>50</sub> 及 95%置信区间。

**1.2.2 血细胞计数** 抽取 20  $\mu$ L 上述血淋巴液涂布于血细胞计数板上进行血细胞计数, 每个样本设置 3 次计数重复, 取其平均值, 根据如下公式换算成血细胞总数(total hemocyte counts, THC):

$$\text{THC}(\text{个/mL}) = N \times 5 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

式中,  $N$  为计数板上 5 个中方格的血细胞数量总和。

**1.2.3 血蓝蛋白含量测定** 参照 Nickerson 等<sup>[30]</sup>的方法, 取上述血淋巴样品 30  $\mu$ L 与双蒸水进行 1:10 稀释, 应用紫外分光光度计测定在 334 nm 波长处的吸光值, 参照如下公式换算成血蓝蛋白含量:

$$\text{血蓝蛋白含量}(\text{mmol/L}) = 2.69 \times E_{1\text{cm}}^{1\%}$$

式中,  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  表示血淋巴稀释液在光径为 1 cm 石英比色皿中的吸光度值。

**1.2.4 糖代谢指标测定** 血淋巴液中的糖代谢指标测定: 取上述血淋巴液 20  $\mu$ L, 按 1:49 比例与 0.9% 生理盐水混合, 应用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定葡萄糖(GLU)和乳酸(LD)含量。

肝胰腺组织中的糖代谢指标测定: 称取解冻后的 0.1 g 肝胰腺组织, 按 1:9 比例与预冷的 0.9% 生理盐水混合进行研磨匀浆, 随后 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 应用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行可溶性蛋白(TP)、肝糖原(LG)等糖代谢相关指标测定。

**1.2.5 抗氧化能力指标测定** 上述肝胰腺匀浆取上清液, 应用南京建成生物工程研究所的试剂盒

进行总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化指标测定。

**1.2.6 糖代谢相关基因表达分析 应用 TaKaRa RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂盒从 100 mg 肝胰腺中提取总 RNA, 应用 YEASEN 反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录合成 cDNA。随后根据中华绒螯蟹基因组序列<sup>[31]</sup>设计如下 3 个基因的荧光定量 PCR 检测引物: 缺氧诱导因子-1α (*Es-HIF-1α*; F-CCAGGAGATGGACGAGTACC, R-TGTAGTG-GTAGAGCGAGCTG)、葡萄糖转运蛋白 4 (*Es-GLUT4*; F-GTGACACCAACGACGTACAG, R-AGGGTTGGGTTCATGACGAT)、乳酸脱氢酶(*Es-LDH*; F-CTGGGCCATAGGTCTCTCTG, R-ACAGGAG-CGAGTGTCTTCA), 选取泛素/核糖体 S27 基因<sup>[32]</sup>作为内参基因。qRT-PCR 反应体系共 20 μL: cDNA 模板 1.0 μL、上下游引物各 0.4 μL、缓冲液 10.0 μL、DEPC 水 8.2 μL。反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 56 °C 10 s, 共 40 个循环, 每个样品设置 3 个技术重复。定量结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达量<sup>[33]</sup>。**

### 1.3 数据分析

数据以平均值±标准差显示, 采用 Excel 2007 与 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法, 统计学上显著性差异为  $P<0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 两选育系耐低氧能力差异

**2.1.1 死亡率与半致死浓度 LC<sub>50</sub>** 半致死浓度实验中的 M 选育系与 JH 选育系死亡情况见表 1。溶解氧在 1.2 mg/L 时 M 选育系 3 个重复中均没有实验蟹死亡, 而 JH 选育系的死亡蟹数分别为 2、1、0 只。溶解氧在 1.0 mg/L 时, M 选育系的死亡蟹数上升至 3、2、2 只, JH 选育系上升至 4、6、2 只。溶解氧下降至 0.8 mg/L 时, 仅 M 选育系一个重复中的死亡蟹数为 8 只, 另 2 个重复和选育系均全部死亡。根据线性回归法计算出 M 选育系的低氧半致死浓度为(0.952±0.058) mg/L, JH 选育系半致死浓度为(1.000±0.053) mg/L。

表 1 中华绒螯蟹两选育系在半致死试验中的死亡个体统计( $n=10$ )

Tab. 1 Dead individuals of the two breeding lines of *Eriocheir sinensis* in the semi-lethal test ( $n=10$ )

溶解氧含量 /(mg/L DO)	M 选育系死亡数 death number of M breeding line			JH 选育系死亡数 death number of JH breeding line			
	重复 1 repeat 1			重复 2 repeat 2			
	重复 3 repeat 3	重复 1 repeat 1	重复 2 repeat 2	重复 3 repeat 3	重复 1 repeat 1	重复 2 repeat 2	重复 3 repeat 3
1.2	0	0	0	2	1	0	
1.0	3	2	2	4	6	2	
0.8	10	10	8	10	10	10	

**2.1.2 血细胞总数和血蓝蛋白含量差异** 低氧-复氧处理后, M 选育系与 JH 选育系不同时间点血细胞总数(THC)和血蓝蛋白含量的动态变化见图 1。THC 在 M 选育系与 JH 选育系间均呈先升后降的趋势, 在 12 h 时均达最高峰, 其中 M 选育系达到  $26.58 \times 10^6$  个/mL, JH 选育系则为  $23.88 \times 10^6$  个/mL, 但两者无显著差异( $P>0.05$ )。而在 24 h 时, M 选育系的 THC 显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ ), 复氧后两者间也差异显著( $P<0.05$ )。随着低氧胁迫时间延长, M 选育系与 JH 选育系的血蓝蛋白含量不断升高, 并在 24 h 时达到最高值, 期间在 3 和 24 h 时, M 选育系的含量均高于 JH 选育系, 但无显著差异( $P>0.05$ )。结合 M 选育系的 THC 和血蓝蛋白含量在多个时间点高于 JH 选育系, 说明 M 选育系在氧运输能力上要高于 JH 选育系。

### 2.2 低氧对两选育系糖代谢的影响

**2.2.1 糖代谢指标差异** 经低氧-复氧处理后, M 选育系与 JH 选育系血淋巴中的葡萄糖、乳酸与肝胰腺中的糖原、可溶性蛋白含量变化见图 2。在整个实验过程中, M 选育系与 JH 选育系血淋巴中葡萄糖(血糖)含量总体呈下降趋势, 但无显著差异( $P>0.05$ )。在胁迫初期 3 h 时, M 选育系与 JH 选育系血糖含量分别下降了 9.55% 与 14.64%。各时期 M 选育系的乳酸含量均低于 JH 选育系, 但无显著差异( $P>0.05$ )。M 选育系在 3 h 和 12 h 时的肝胰腺中, 糖原含量显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。M 选育系的肝胰腺中可溶性蛋白含量在各时期均高于 JH 选育系, 但无显著差异( $P>0.05$ )。综合以上的糖代谢生理生化指标, 表明 M 选育系具备更高的糖原储备及可溶性蛋白含量, 同时乳酸堆积的速率更慢。

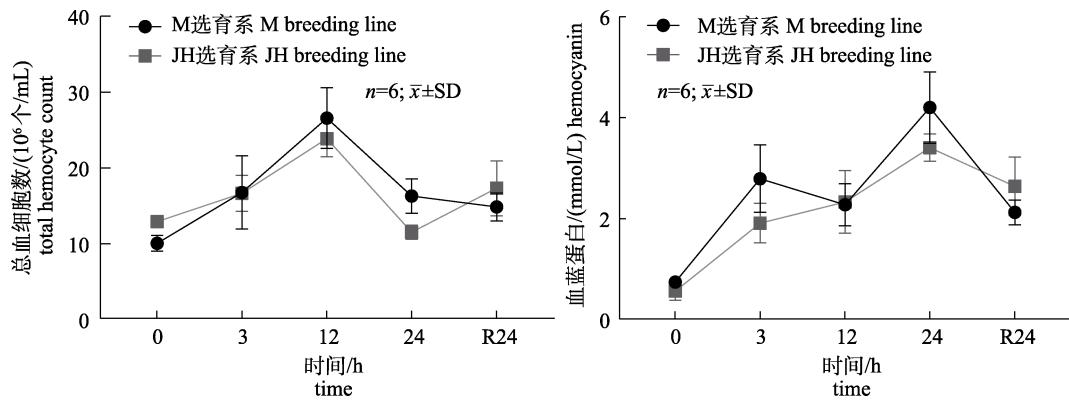


图1 中华绒螯蟹两选育系在低氧-复氧状态下的THC和血蓝蛋白含量变化

Fig. 1 Changes of THC and hemocyanin contents in the two breeding lines of *Eriocheir sinensis* under hypooxygen-reoxygenation conditions

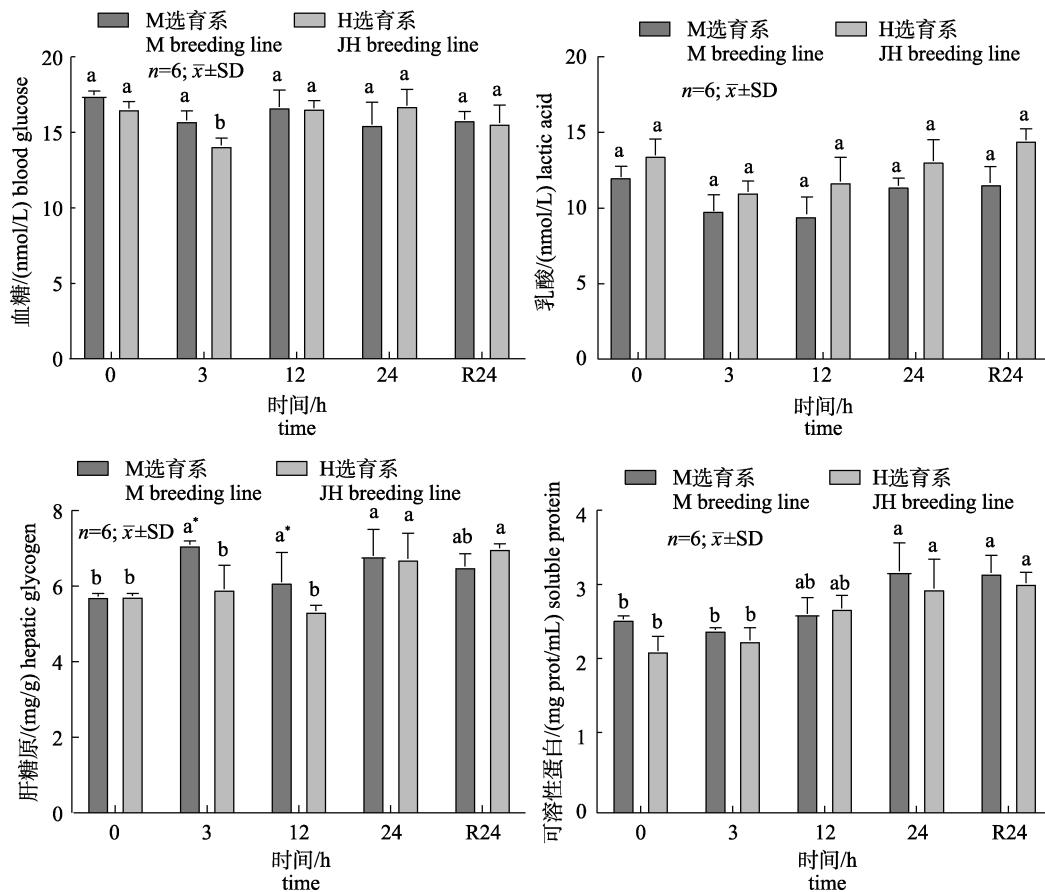


图2 中华绒螯蟹两选育系在低氧-复氧状态下的血糖、乳酸、肝糖原和可溶性蛋白含量变化

同一选育系的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), \*表示同一时间不同选育系差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 2 Content changes of blood glucose, lactic acid, liver glycogen and soluble protein in the two breeding lines of *Eriocheir sinensis* under hypooxygen-reoxygenation conditions

Different lowercase letters in the same breeding line indicate significant differences ( $P<0.05$ ), \* indicates significant differences among different breeding lines at the same time.

## 2.2.2 糖代谢相关基因的表达差异 3个糖代谢相关基因(*Es-HIF-1α*、*Es-GLUT4*、*Es-LDH*)在不同时间点的相对表达量结果显示(图3): *Es-HIF-1α*

和 *Es-GLUT4* 表现为相同的表达模式, 均是在低氧胁迫 3 h 时 JH 选育系的表达量显著高于 M 选育系( $P<0.05$ ), 而 12 h 时 M 选育系的表达量显著

高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。M 选育系这 2 个基因在 24 h 时的表达量均低于 JH 选育系, 但只有 *Es-HIF-1 $\alpha$*  基因显示出显著的表达差异( $P<0.05$ )。*Es-LDH* 基因在整个低氧-复氧期间, M 选育系和 JH 选育系均无显著的表达差异( $P>0.05$ ), 但表现为复氧 24 h 后的表达量极显著上调( $P<0.01$ )。

### 2.3 抗氧化能力差异

图 4 显示了低氧-复氧后 M 选育系与 JH 选育

系肝胰腺抗氧化酶活性的变化。在低氧胁迫期间, M 选育系的 T-AOC 活性均高于 JH 选育系, 但无显著差异( $P>0.05$ )。M 选育系与 JH 选育系的 SOD 活性均呈先上升后下降趋势, 但复氧 24 h 后 M 选育系的 SOD 活性恢复较快, 显著高于 JH 选育系( $P<0.05$ )。在低氧-复氧期间, M 选育系的 CAT 活性均高于 JH 选育系, 且在 12 h 低氧时差异显著( $P<0.05$ )。

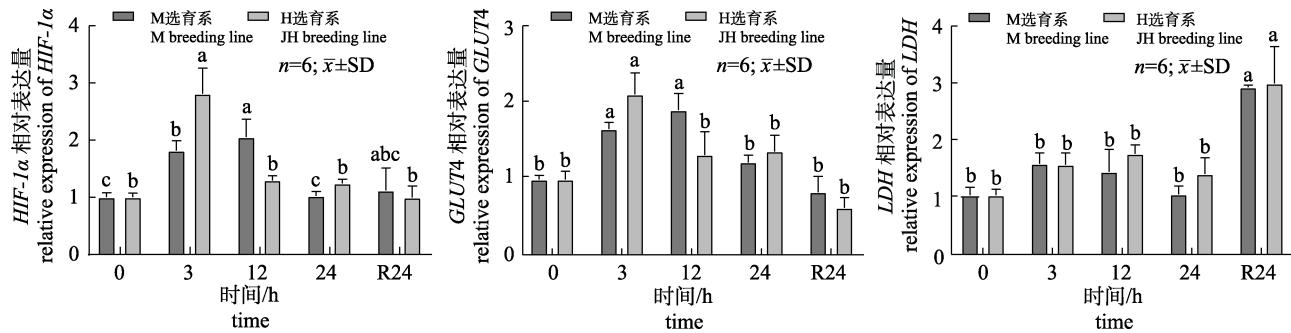


图 3 中华绒螯蟹两选育系在低氧-复氧状态下的 *Es-HIF-1 $\alpha$* 、*Es-Glut4* 与 *Es-LDH* 基因的表达特征。  
同一选育系的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 3 Expression profiles of *Es-HIF-1 $\alpha$* , *Es-Glut4* and *Es-LDH* genes in the two breeding lines of Chinese mitten crab under hypooxygen-reoxygenation conditions  
Different lowercase letters in the same breeding line indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

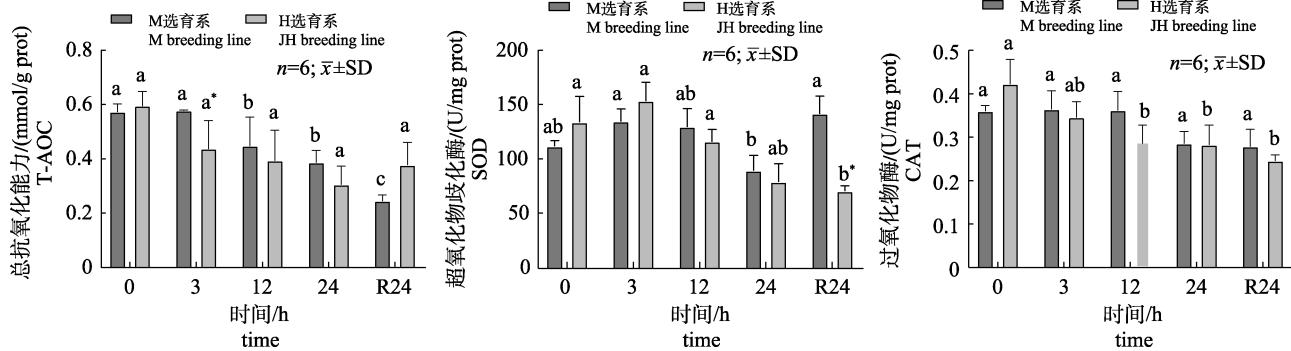


图 4 中华绒螯蟹两选育系在低氧-复氧状态下的抗氧化指标变化

同一选育系的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), \*表示同一时间不同选育系差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 4 Changes of antioxidant indices in the two breeding lines of *Eriocheir sinensis* under hypooxygen-reoxygenation conditions  
Different lowercase letters in the same breeding line indicate significant differences ( $P<0.05$ ), \* indicates significant differences among different breeding lines at the same time.

### 3 讨论

半致死浓度  $LC_{50}$  指标可准确反映生物对逆境的耐受性, 其高低是体内生理、生化、代谢因素的综合体现。甲壳动物的  $LC_{50}$  显著依赖于体重大小以及水温, 由于体重越大的动物耗氧量更小,

即体重越大的动物应对缺氧更具优势。Valverde 等<sup>[34]</sup>指出随着体重的增加, 蜘蛛蟹(*Maja brachydactyla*)的致死氧浓度为(0.88±0.29) mg/L, 这一结果与本研究结果基本一致。在本研究中, M 选育系的  $LC_{50}$  [(0.952±0.058) mg/L] 低于 JH 选育系 [(1.000±0.053) mg/L], 表明 M 选育系的低氧阈值

低于 JH 选育系，在相同低氧环境中存活率相对更高，对低氧环境更加耐受。

血细胞数目 THC 与血蓝蛋白含量是中华绒螯蟹血淋巴中的重要指示物。血细胞主要参与中华绒螯蟹的非特异性免疫反应，分为大颗粒、中颗粒、小颗粒及透明细胞 4 类，且不同类型细胞参与不同的非特异性免疫反应<sup>[35]</sup>。因此，THC 的大小通常被用来衡量中华绒螯蟹的非特异免疫能力。在温度胁迫中，中华绒螯蟹的 THC 随着胁迫温度脱离最适温度范围而减少<sup>[36]</sup>。本研究中，低氧处理的中华绒螯蟹 THC 在短期内均不断增加，表明中华绒螯蟹的 THC 与溶解氧呈负相关关系。血蓝蛋白是一类可与氧结合的铜蛋白，主要负责氧气运输。除了载氧功能以外，血蓝蛋白还参与抗氧化应激、平衡渗透压、载运蜕皮激素、储蓄蛋白质、参与蜕壳后硬化等多种功能<sup>[37]</sup>。在低氧状态下，血蓝蛋白含量变化受到多方面的调节，其中由乳酸堆积导致的体内 pH 下降是重要因素<sup>[38]</sup>。同时，其蛋白结构上有类似于其他抗体及非特异性免疫因子的高度同源序列<sup>[39-40]</sup>，因此在应对环境压力时具有重要免疫作用，可作为一项生化标志物评估生物的抗逆性。相比 JH 选育系，M 选育系更早上调体内血蓝蛋白含量，以应对低氧应激损伤，更快地调整体内载氧能力及非特异性免疫水平。

甲壳动物可以通过降低自身代谢与蛋白质合成、增加鳃通气量及增强氧气运输等手段来抵御低氧状态<sup>[41]</sup>。低氧状态下，甲壳动物发生糖代谢重编程，氧化磷酸化途径减少，糖酵解途径上调，以维持能量供应。糖代谢在低氧应答过程中占重要地位，低氧处理小鼠心肌细胞后发现，糖原的升高保护心肌细胞，避免发生细胞损伤<sup>[42]</sup>。另外，通过缺氧诱导因子 HIF-1 的介导，在低氧条件下可以显著上调 MCF-7 细胞的糖原含量<sup>[15]</sup>。在缺氧婴儿与营养不良婴儿中发现 GLUT4 表达显著下调，且缺氧婴儿的下调更加显著<sup>[43]</sup>，反映出缺氧条件下机体会下调葡萄糖转运能力，减少能量支出的低氧应答策略。本研究中，M 选育系与 JH 选育系明显受到低氧的诱导刺激，从而发生糖代谢重编程。在整个低氧时期，葡萄糖含量相对稳定，

但由于糖酵解途径上调，需要更多的葡萄糖作为供能底物，因此在低氧前期葡萄糖含量有所下降。葡萄糖的稳态受多方面调节，低氧期间糖酵解与糖异生途径均上调，另外，肝糖原的分解加快以维持血糖平衡<sup>[44]</sup>。在中华绒螯蟹对低氧的应对策略中，肝糖原分解成葡萄糖，进入糖酵解途径，最终生成乳酸是关键的途径之一<sup>[45]</sup>。作为无氧糖酵解终产物的乳酸<sup>[46]</sup>，胁迫期间 M 选育系体内乳酸含量较 JH 选育系少，可能是通过糖异生途径降低乳酸水平，提高糖原储备。在不同生物体内的实验结果均表明，高糖原含量更有利生物体在低氧条件下生存。通过对 *Es-HIF-1α*、*Es-GLUT4* 基因表达水平与葡萄糖、肝糖原等生化标志物的关联分析发现，相比 JH 选育系，M 选育系在低氧前期上调 *Es-HIF-1α*、*Es-GLUT4* 与 *Es-LDH* 基因并维持更长时间的高表达，以加快葡萄糖摄取，同时促进糖异生而获得更好的耐低氧能力。

作为无脊椎动物，中华绒螯蟹主要依赖非特异性免疫，其中血细胞通过吞噬、裂解、释放抗菌肽等途径参与免疫防御机制<sup>[47]</sup>。另外，一些体液免疫因子也发挥着重要的作用。然而，溶解氧的减少可对中华绒螯蟹的免疫防御机制产生负面影响<sup>[48-49]</sup>。低氧状态下中华绒螯蟹血细胞及相关抗氧化酶活性上调，活性氧与丙二醛等物质累积，增加中华绒螯蟹感染疾病的风险<sup>[16]</sup>。低氧逆境下 ROS 的积累对中华绒螯蟹抗氧化系统造成严重影响，过量 ROS 的积累容易发生脂质、蛋白质氧化损伤。ROS 的清除主要依靠两条途径，分别为抗氧化酶催化分解途径以及非酶促反应清除途径<sup>[50-51]</sup>。SOD、CAT、T-AOC 抗氧化酶直接或间接参与中华绒螯蟹抗氧化反应。SOD 直接参与对氧自由基 ROS 的清除，将 ROS 作为酶促反应的底物<sup>[52]</sup>，生成的产物之一为过氧化氢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；超量的过氧化氢可对机体的抗氧化系统造成严重损伤，抑制抗氧化酶活性。T-AOC 是机体抗氧化能力的一项重要指标，反映酶与非酶等抗氧化能力的总和。机体抗氧化系统由多个组分共同参与，使得抗氧化系统更加稳定，另外联合多个组分将更全面地进行抗氧化能力评估。同时，可溶性蛋白含量作为抗性筛选标记物，其含量越高，代表机体应对逆境、

调节能量代谢的能力越强<sup>[53]</sup>。本研究中, 相较 JH 选育系, 在低氧处理前期 M 选育系的 T-AOC 维持较高水平, SOD、CAT 在低氧处理后期维持较高水平, 显示在应激状态下 M 选育系有较好的 ROS 清除能力, 因此受到的氧化损伤较少。

综上所述, 本研究通过对中华绒螯蟹分子标记辅助育种群体(M 选育系)与传统育种群体(JH 选育系)的低氧胁迫过程发现, M 选育系的血蓝蛋白、可溶性蛋白、肝糖原指标均高于 JH 选育系, 且乳酸的含量较低。同时, M 选育系的 *Es-GLUT4* 在胁迫前半期的表达上调缓慢, 转录应答和体内糖代谢在适应性调整上优于 JH 选育系。因而, M 选育系具有更好的低氧耐受能力, 不仅可作为中华绒螯蟹耐低氧抗逆选育的基础群体, 而且也为剖析中华绒螯蟹的低氧胁迫分子机制提供了研究材料。此外, 本研究也提出 *MSTN* 可用于中华绒螯蟹的生长与耐低氧的多性状分子标记辅助育种, 为下阶段的中华绒螯蟹分子育种提供指导。

## 参考文献:

- [1] Nazarul H, Sana C, Neha N, et al. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2021, 19(1): 128.
- [2] Wang Y Q, Sun Z Q, Zheng Z, et al. Present situation and prospect of crop molecular marker-assisted selection breeding[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(5): 6-12. [王亚琦, 孙子淇, 郑峥, 等. 作物分子标记辅助选择育种的现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 6-12.]
- [3] Lu C Y, Kuang Y Y, Zheng X H, et al. Advances of molecular marker-assisted breeding for aquatic species[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 36-53. [鲁翠云, 匡友谊, 郑先虎, 等. 水产动物分子标记辅助育种研究进展[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 36-53.]
- [4] Karunarathna K, Mewan K, Weerasena O, et al. A functional molecular marker for detecting blister blight disease resistance in tea (*Camellia sinensis* L. )[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 40: 351-359.
- [5] Wannemuehler S D, Yue C Y, Shane W W, et al. Estimated implementation costs of DNA-informed breeding in a peach breeding program[J]. *HortTechnology*, 2020, 30(3): 356-364.
- [6] Xu K, Duan W, Xiao J, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 187-201.
- [7] Tong J G, Sun X W. Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish[J]. *Science China-Life Sciences*, 2015, 58: 178-186.
- [8] Wong L L, Razali S A, Deris Z M, et al. Application of second-generation sequencing (SGS) and third generation sequencing (TGS) in aquaculture breeding program[J]. *Aquaculture*, 2022, 548(2): 737633.
- [9] Shao Z, Wang Y L, Liu L, et al. Analysis on the development trend of molecular marker-assisted breeding from the perspective of two dimensions of papers and patents[J]. *China Seed Industry*, 2021(2): 14-20. [邵卓, 王娅丽, 刘璐, 等. 论文与专利双维度视角下分子标记辅助育种发展态势分析[J]. 中国种业, 2021(2): 14-20.]
- [10] Bureau of Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China Fishery Statistical Yearbook 2022*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022. [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. 2022 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.]
- [11] Zhang K J, Jiang P F, Wang J, et al. Effects of different temperatures on growth and gut microbiota of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(2): 384-393. [张凯军, 姜鹏飞, 王军, 等. 不同温度对中华绒螯蟹生长及肠道微生物菌群的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 384-393.]
- [12] Xu W G, Wang C, He J, et al. Ecological effects of bottom water layer aeration systems in intensively-reared juvenile *Eriocheir sinensis* ponds[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(3): 60-67. [徐文刚, 王春, 何杰, 等. 底层增氧在中华绒螯蟹幼蟹集约化培育池塘中的生态学效应[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 60-67.]
- [13] Qiu R, Cheng Y X, Huang X X, et al. Effect of hypoxia on immunological, physiological response, and hepatopancreatic metabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture International*, 2011, 19: 283-299.
- [14] Ji H, Feng G P, Zhuang P, et al. Standard metabolism and asphyxiation point of female non-ovigerous and ovigerous *Eriocheir sinensis* from the Yangtze Estuary[J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(4): 410-419. [姬慧, 冯广朋, 庄平, 等. 长江口中华绒螯蟹抱卵前后的标准代谢和窒息点[J]. 海洋渔业, 2020, 42(4): 410-419.]
- [15] Bao J, Li X D, Xing Y N, et al. Effects of hypoxia on immune responses and carbohydrate metabolism in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 2735-2744.

- [16] Wang Y Q, Huang C, Geng C, et al. Effects of hypoxia stress and spiroplasma eriocheiris infection on the survival and apoptosis of *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(8): 1249-1255. [汪雅琴, 黄晨, 耿超, 等. 低氧胁迫和螺原体感染对中华绒螯蟹存活和细胞凋亡的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(8): 1249-1255.]
- [17] Guo H H, Hu Z, Zhang J G, et al. Research progress on breeding of fish environmental tolerance and stress resistance[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(1): 70-95. [郭红会, 胡振, 张金刚, 等. 鱼类环境耐受性与抗逆性育种研究进展[J]. 水产学报, 2023, 47(1): 70-95.]
- [18] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [19] Alexander H, Jenny O, Tea S, et al. IGF1 stimulates greater muscle hypertrophy in the absence of myostatin in male mice[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2017, 234(2): 187-200.
- [20] Wang Q, McPherron A C. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation[J]. *The Journal of Physiology*, 2012, 590(9): 2151-2165.
- [21] Ross Caleb I, Shute Robert J, Ruby Brent C, et al. Skeletal muscle mRNA response to hypobaric and normobaric hypoxia after normoxic endurance exercise[J]. *High Altitude Medicine & Biology*, 2019, 20(2): 141-149.
- [22] Li L X, Wang J, Bai Y, et al. Effect of hypoxia on the muscle fiber switching signal pathways CnA/NFATc1 and myostatin in mouse myocytes[J]. *Acta Histochemica*, 2019, 121(5): 539-545.
- [23] Elliott B, Renshaw D, Getting S, et al. Acute hypoxia rapidly alters myotube size in vitro and myostatin signalling *in vivo*[J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(1): 1167.1.
- [24] Yang H R, Zeng Z Q, Yang Y, et al. Research progress of myostatin in fish[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2022, 61(5): 1-8.
- [25] Zhao H B, Peng K, Wang Y F, et al. Progress of studies on myostatin of fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 227-231. [赵浩斌, 彭扣, 王玉凤, 等. 鱼类肌肉生长抑制素研究进展[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 227-231.]
- [26] Wei Z Y, Bai C L, Li G P. Genetic effect and breeding application of myostatin gene mutation in beef cattle[J]. *Current Biotechnology*, 2018, 8(3): 197-205, 277. [魏著英, 白春玲, 李光鹏. 牛肌肉生长抑制素基因突变的遗传效应与育种应用[J]. 生物技术进展, 2018, 8(3): 197-205, 277.]
- [27] Chen Y P, Wu L, Chen X W, et al. Polymorphism of mstn gene and its association with growth traits in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 293-299. [陈义培, 吴廉, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹MSTN基因SNPs多态性及与生长性状的关联分析[J]. 水生生物学报, 2018, 42(2): 293-299.]
- [28] Yue W C. Study on breeding potential and gene function of silent mutation of Es-MSTN gene in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [岳武成. 中华绒螯蟹肌肉抑制素基因 Es-MSTN 同义突变的育种价值和基因功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [29] Yue W C, Yang H, Hou X, et al. Effects of synonymous mutation on transcription and translation efficiency of Es-MSTN gene in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(4): 497-504. [岳武成, 杨鹤, 侯鑫, 等. 中华绒螯蟹肌肉抑制素基因 (MSTN)同义突变对基因转录和翻译效率的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(4): 497-504.]
- [30] Nickerson K W, Holde K. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin-I. Circular dichroism and absorption spectra[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2015, 39(4): 855-872.
- [31] Wang J, Chen X W, Hou X, et al. "Omics" data unveil early molecular response underlying limb regeneration in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Science Advances*, 2022, 8(37): eabl4642.
- [32] Huang S, Chen X W, Wang J, et al. Selection of appropriate reference genes for qPCR in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Varunidae)[J]. *Crustaceana*, 2017, 90: 275-296.
- [33] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $-\Delta\Delta C_T$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] Valverde J C, Aguado-Gimenez F, Hernandez M D, et al. Oxygen consumption response to gradual hypoxia in spider crab, *maja brachydactyla*: critical and lethal oxygen saturations and recovery ability[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2012, 43(3): 433-441.
- [35] Hong Y H, Yang X Z, Cheng Y X, et al. The composition and classification of hemocytes from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and primary research on immunological functions[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(8): 1213-1222. [洪宇航, 杨筱珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹的血细胞组成、分类及免疫学功能[J]. 水产学报, 2017, 41(8): 1213-1222.]
- [36] Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, et al. Effect of temperature change on immunochemical indexes of *Eriocheir sinensis*[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007,

- 13(6): 818-822. [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 不同温度胁迫方式对中华绒螯蟹免疫化学指标的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 818-822.]
- [37] Pan L Q, Jin C X. A review on hemocyanins of crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(3): 484-491. [潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 484-491.]
- [38] Whiteley N, Taylor E, El Haj A. Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans[J]. Journal of Thermal Biology, 1997, 22(6): 419-427.
- [39] Pless D D, Aguilar M B, Falcón A, et al. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 409(2): 402-410.
- [40] Young L S, Luel L B, Kenneth S. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10): 7927-33.
- [41] McMahon B R. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans[J]. Respiration Physiology, 2001, 128(3): 349-64.
- [42] Ayelet V, Mamedova Liaman K, Vladimir S, et al. Glycogen metabolism in rat heart muscle cultures after hypoxia[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2003, 254(1-2): 311-8.
- [43] Shen G M, Zhang F L, Liu X L, et al. Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia[J]. FEBS letters, 2010, 584(20): 4366-4372.
- [44] Camm E, Martin - Gronert M S, Wright N L, et al. Prenatal hypoxia independent of undernutrition promotes molecular markers of insulin resistance in adult offspring[J]. The FASEB Journal, 2011, 25: 420-427.
- [45] Hara Y, Watanabe N. Changes in expression of genes related to glucose metabolism in liver and skeletal muscle of rats exposed to acute hypoxia[J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04334.
- [46] Xiao S S. Physiological effects of hypoxia stress on young *Eriocheir sinensis* and its nutrition improvement countermeasures[D]. Shanghai: East China Normal University, 2020. [肖生. 低氧胁迫对中华绒螯蟹幼蟹的生理影响及其营养改善对策研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.]
- [47] Maciel J E S, Souza F, Valle S, et al. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(1): 61-65.
- [48] Liu S, Zheng S C, Li Y L, et al. Hemocyte-mediated phagocytosis in crustaceans[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 268.
- [49] Zhang C, Wang X D, He J Q, et al. Neural excitotoxicity and the toxic mechanism induced by acute hypoxia in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Aquatic Toxicology, 2022, 245: 106131.
- [50] Xu M J, Zhang J X, Huang G Y, et al. Effects of L-tryptophan and melatonin on the serum glucose level and antioxidant capacity in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 91-99. [徐敏杰, 张佳鑫, 黄根勇, 等. L-色氨酸和褪黑激素对中华绒螯蟹血清血糖水平及肝胰腺抗氧化能力的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(1): 91-99.]
- [51] Jia H N, Shi M M, Bian Y (L /Y), et al. Effects of nano-selenium on immune protection and antioxidant capacity of *Eriocheir sinensis* under hypoxia stress[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(6): 100-109. [贾慧凝, 侍苗苗, 卞永乐, 等. 纳米硒对低氧胁迫下中华绒螯蟹免疫保护和抗氧化能力的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(6): 100-109.]
- [52] Wang L, Han Y N, Jin S, et al. Effects of aqueous copper on reactive oxygen species content and anti-oxidation capacity of major tissues in *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(7): 1261-1268. [王丽, 韩艳楠, 金珊, 等. 水体 Cu<sup>2+</sup>对三疣梭子蟹主要组织 ROS 含量和抗氧化能力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(7): 1261-1268.]
- [53] Kong X H, Wang G Z, Li S J, et al. Impact of low temperature acclimation on soluble proteins and soluble sugars in *Scylla serrata*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(2): 257-260. [孔祥会, 王桂忠, 李少菁, 等. 低温驯化对锯缘青蟹可溶性蛋白与可溶性糖的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(2): 257-260.]

## Study on hypoxia tolerance in a molecular breeding population and traditional breeding population of *Eriocheir sinensis*

GUAN Weiye<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Zhenqi<sup>1,2,3</sup>, XIE Xinyang<sup>1,2,3</sup>, HOU Xin<sup>1,2,3</sup>, WANG Jun<sup>1,2,3</sup>, WANG Chenghui<sup>1,2,3</sup>

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Hypoxia tolerance is an important target trait in biological breeding. In this study, the differences in hypoxia tolerance between a molecular breeding population (M breeding line) and a traditional breeding population (JH breeding line) of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) were analyzed through hypoxia and reoxygenation treatment. The results showed that the semi-lethal concentrations (LC50s) of the M and JH breeding lines were (0.952±0.058) mg/L and (1.000±0.053) mg/L, respectively. At 12 h of hypoxia treatment, the total number of blood cells (THCs) of the two lines was the highest, and that the THC of the M breeding line ( $26.58 \times 10^6$  cells /mL) was higher than that of the JH breeding line ( $23.88 \times 10^6$  cells /mL) with no significant difference ( $P>0.05$ ) between the two. However, the THC of the M breeding line was significantly higher than that of the JH breeding line ( $P<0.05$ ) after 24 h of hypoxia treatment. The serum blue protein content of the M breeding line was significantly higher than that of the JH breeding line at 3 and 24 h of hypoxia treatment ( $P>0.05$ ). At 3 h of hypoxia treatment, the glucose contents in the hemolymph of the M and JH breeding lines decreased by 9.55% and 14.64%, respectively. The glycogen content in the hepatopancreas of the M breeding line was significantly higher than that of the JH breeding line at 3 and 12 h of hypoxia ( $P<0.05$ ). During the entire hypoxia period, the soluble protein content in the hepatopancreas of the M breeding line was higher than that of the JH breeding line, but the lactic acid content was lower than that of the JH breeding line ( $P>0.05$ ). The total antioxidant capacity and catalase activity of the M breeding line were higher than those of the JH breeding line, whereas the superoxide dismutase activity of the M breeding line was significantly higher than that of the JH breeding line after 24 h of reoxygenation ( $P<0.05$ ). The expression of the hypoxia-inducible factor (*Es-HIF-1α*) and glucose transporter (*Es-GLUT4*) were significantly upregulated in the M breeding line at 3 and 12 h of hypoxia. These results showed that the molecular breeding population displayed stronger oxygen transport capacity; and higher glycogen, stored soluble protein, and antioxidant levels; indicating increased hypoxia tolerance than that of the traditional breeding population.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; hypoxia stimulation; breeding populations; glucose metabolism; antioxidant capacity

**Corresponding author:** WANG Chenghui. E-mail: wangch@shou.edu.cn