

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16167

皱纹盘鲍南北方群体的高温应激和生长差异

姚托¹, 贾艳丽^{1,2}, 何健¹, 王瑞旋¹, 王江勇¹

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 天津农学院 水产科学系, 天津 300384

摘要: 为研究皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)经过杂交和南方养殖后, 南方群体(杂交群体)是否与北方群体(自交群体)在适温性上是否产生了差异, 从而是否更加适应南方高温环境, 本研究开展了皱纹盘鲍南北方群体的高温应激和南方地区养殖实验。高温应激实验中: 经过 30℃ 应激后, 南方群体恢复期所有取样组织中 HSP70 在 0 h 的表达量都显著高于北方群体($P<0.05$), HSP90 在外套膜和肝胰脏中的表达量也高于北方群体(鳃中的表达量略低但差异不显著); 经过 33℃ 应激后, 南方群体 HSP70 和 HSP90 在足、外套膜和鳃 0 h 表达量都显著高于北方群体($P<0.05$)。养殖实验中: 从 12 月开始至翌年 2 月水温不超过 17.11℃, 为北方群体的快速生长期, 生长快于南方群体; 从 3 月开始, 水温逐渐超过 20℃, 北方群体生长慢于南方群体, 同时北方群体开始出现死亡现象, 7 月北方群体大量死亡, 存活数量不足 30 粒。综合 HSP70、HSP90 的高温应激表达和养殖实验结果, 可以得出: 皱纹盘鲍经过杂交和南方累代养殖后, 适温上限有所提高, 已与北方群体产生较大差异, 可适应较高的水温; 30℃ 水温刺激下南北方群体的 HSP70 的相对表达量与对高温的耐受性具有正相关性, 可以在鲍的抗高温选育种中进行辅助筛选。

关键词: 皱纹盘鲍; 南北方群体; 温度; 应激; 生长

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0258-10

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、前鳃亚纲(Prosobranchia)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae)、鲍属, 是一种重要的海水养殖贝类, 具有很高的营养和药用价值^[1]。中国沿海主要分布 7 种鲍^[2-3], 其中皱纹盘鲍为最主要的经济种类。皱纹盘鲍主要分布在辽东半岛、山东半岛及江苏北部沿海^[4], 成鲍适宜生长水温为 10~22℃, 当水温高于 26℃ 或低于 0℃ 时, 往往会出现大量死亡^[5]。由于北方冬季寒冷, 室内越冬时需对海水进行升温处理, 要消耗大量能源^[6]。为节约成本, 一些育苗厂家开始尝试在南方海区进行越冬的方式, 该方式得到业界肯定^[7]。另外, 杂交育种理论在实践中的应用结果显示, 不仅皱纹盘

鲍的生长速度得到提升, 适温上限也得到提高^[7], 例如, 2 龄‘西盘鲍’[以日本长崎县的西氏鲍(*Haliotis gigantea*)群体经 4 代群体选育获得的西氏鲍长崎选育系为母本, 经 4 代群体选育获得的皱纹盘鲍晋江选育系为父本, 杂交获得的子一代]平均体重比父本皱纹盘鲍提高 6.3%, 养殖成活率分别提高 33.4%^[8]; ‘大连 1 号’杂交鲍(皱纹盘鲍中国大连群体×日本岩手群体), 使皱纹盘鲍的生长速度提高 20%, 适温上限提高 4~5℃^[9]。皱纹盘鲍杂交幼鲍在闽东内湾度夏过程中, 生长快于北方, 成活率稍低于北方^[10], 目前皱纹盘鲍杂交鲍已在浙江、福建及粤东地区进行周年养殖^[5, 10-11]。经过杂交和南方的长期累代养殖, 已经逐渐适应南方的高温环境, 在最适生存温度上与北方群体产

收稿日期: 2016-05-30; 修订日期: 2016-07-21.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-48); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201301F04); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2014TS29).

作者简介: 姚托(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事贝类遗传育种方面研究. E-mail: yao-tuo@163.com

通信作者: 王江勇(1971-), 男, 博士, 研究员, 主要从事渔业生物病害方面研究. E-mail: wjy104@163.com

生较大分歧。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类高度保守的蛋白, 从低等原核生物到高等哺乳动物中都广泛存在, 对生物在热胁迫环境下的生态适应及生物进化上起着重要的作用^[12-13]。HSP70 和 HSP90 是热休克蛋白家族中的重要成员, 在温度^[14-17]、细菌感染^[18-19]、蛋白类^[20-21]、盐度^[22-23]、理化因子^[24-25]及营养组成^[26]发生变化的刺激下能够被快速诱导并大量表达, 协助变性蛋白复性, 免受胁迫损伤, 维持正常的细胞机构和功能, 以适应环境变化。基于皱纹盘鲍经过杂交和长期南北区域化养殖的差异, 我们研究了南北方群体对温度的适应性; 由于热休克蛋白对温度敏感^[27], 其表达量的高低与对高温的耐受性相关^[28-30], 本研究选取 HSP70 和 HSP90 作为指标, 观察其在不同温度应激条件下不同组织的相对表达量变化, 研究皱纹盘鲍南北方群体对高温的耐受性变化, 为贝类的杂交和区域化养殖提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

2014 年冬季, 实验所用皱纹盘鲍南方群体(揭阳)取自广东惠来县华生水产养殖有限公司为皱纹盘鲍和日本盘鲍的杂交群体, 北方群体(青岛)为中国科学院海洋研究所馈赠的皱纹盘鲍自交群体, 南方群体壳长为(24.56±0.23) mm, 北方群体壳长为(24.38±0.19) mm, 大小无显著差异。不同群体皱纹盘鲍取来后放入深圳实验基地水泥池中暂养 2 周, 流水饲育, 大量充气, 每天下午 5 点投喂 1 次, 第 2 天早上全量换水, 冲走饵料残渣及排泄物。此时水温 22℃, 盐度 33.4, 溶氧 5.65 mg/L, pH 约为 8.05。

1.2 方法

1.2.1 热激实验 实验设置 3 个温度梯度, 分别为 22℃(对照组)、30℃和 33℃, 每组 3 个平行, 每个平行 30 只。热激实验开始时, 将自然水温(22℃)下的不同群体皱纹盘鲍直接放到 30℃和 33℃水体中热激 1 h 后放回自然海水中, 为防止不同群体在同一设定温度条件下产生温差, 将两个不同群体标记后放入同一 60 L 大白桶中进行热激。在

热激前、热激结束后(恢复期)的 0 h、1 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 分别从每个平行取 3 只鲍, 取足、外套膜、鳃和肝胰脏放入 RNA 保存液中, -20℃冰箱冻存。

总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 使用 Trizol Reagent(东盛)提取总 RNA, 经测定浓度及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性后, 以随机引物合成 cDNA 第一链, cDNA 制备后置于-20℃冰箱中保存。

引物设计 根据 GenBank 中皱纹盘鲍 HSP-70(GL84181081)和 HSP90(GL261826171)cDNA 全序列, 以管家基因 β -actin(AY380809.1)作为内参, 使用软件 Primer Premier 5.0 设计实时定量引物, 其引物序列如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 1 Nucleotide sequences of primers for RT-PCR

引物名称 primer	引物序列 primer sequence
HSP70-F	CCAGGCCAGCATAGAGATCG
HSP70-R	CAGTGTGCCACGGAAGAGAT
HSP90-F	GCCTTGAAGTCCAGAGGAT
HSP90-R	GGGAGGAGACCAGACGATTG
β -actin-F	GGGACAGAAGGACAGCTACG
β -actin-R	ACACGGAGCTCGTTGTAGAAG

HSP70 和 HSP90 相对表达量的测定 采用 SYBR Green 法, 在 Illumina Eco 实时荧光定量仪上进行 PCR 扩增反应。反应采用 10 μ L 系统, 包括: 高压灭菌水 3.5 μ L, SYBR Green PCR Mix (2 $\times$)5 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L。反应条件为: 95℃ 30 s, 然后 40 个循环(95℃ 5 s, 60℃ 30 s), 反应结束后制备熔解曲线, 其反应条件为: 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s。每个反应设置 3 个复孔, 阴性对照以灭菌水代替 cDNA 模板。HSP70 和 HSP90 在不同群体、不同组织、不同时间点相对表达量的计算, 以 β -actin 为内参, 以对照组 22℃ 0 h Hsp70 和 Hsp90 mRNA 水平为基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[31]确定各个取样点热休克蛋白 mRNA 的相对表达量。

1.2.2 南方海区养殖实验 将南北方群体分开养殖于深圳实验基地的两个水泥池中, 水泥池长 1.5 m, 宽 1.5 m, 池中水深 1 m, 每个水泥池中放

置鲍的数量为 200 粒。养殖期间流水饲育, 大量充气, 每天下午 5 点投喂一次, 第 2 天早上全量换水, 冲走饵料残渣及排泄物。养殖实验开始后, 每月固定日期测量南方和北方群体每组 100 粒皱纹盘鲍个体的壳长、壳高和鲜重, 每周测量水温变化。随着水温的升高, 累积死亡率上升, 视群体数量相应减少测量个体数, 但每组不得少于 30 粒, 若某一群体存活总数少于 30 粒则停止实验。

1.3 数据处理

使用 SPSS 19.1 软件独立 t 检验检测对照组与实验组在同一时间点的热休克蛋白表达量及生长变化, 显著性差异设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 高温应激后 HSP70 的表达量变化

南北方群体经过 30℃ 水温刺激后, Hsp70 的表达量在 0 h 出现最大值, 但南方群体在足、外套膜、鳃和肝胰脏 4 个组织的表达量显著大于北方群体 ($P < 0.05$) (图 1A-D); 恢复期随着时间的延长表达量都表现出下降的趋势, 至 12 h 已基本恢复到最低水平, 24 h 部分组织 Hsp70 表达量有上升趋势(如南方群体 4 个组织和北方群体的外套膜、肝胰脏)。

南北方群体在经过 33℃ 高温刺激后, Hsp70 表达量的变化趋势为先上升后下降, 在足、外套

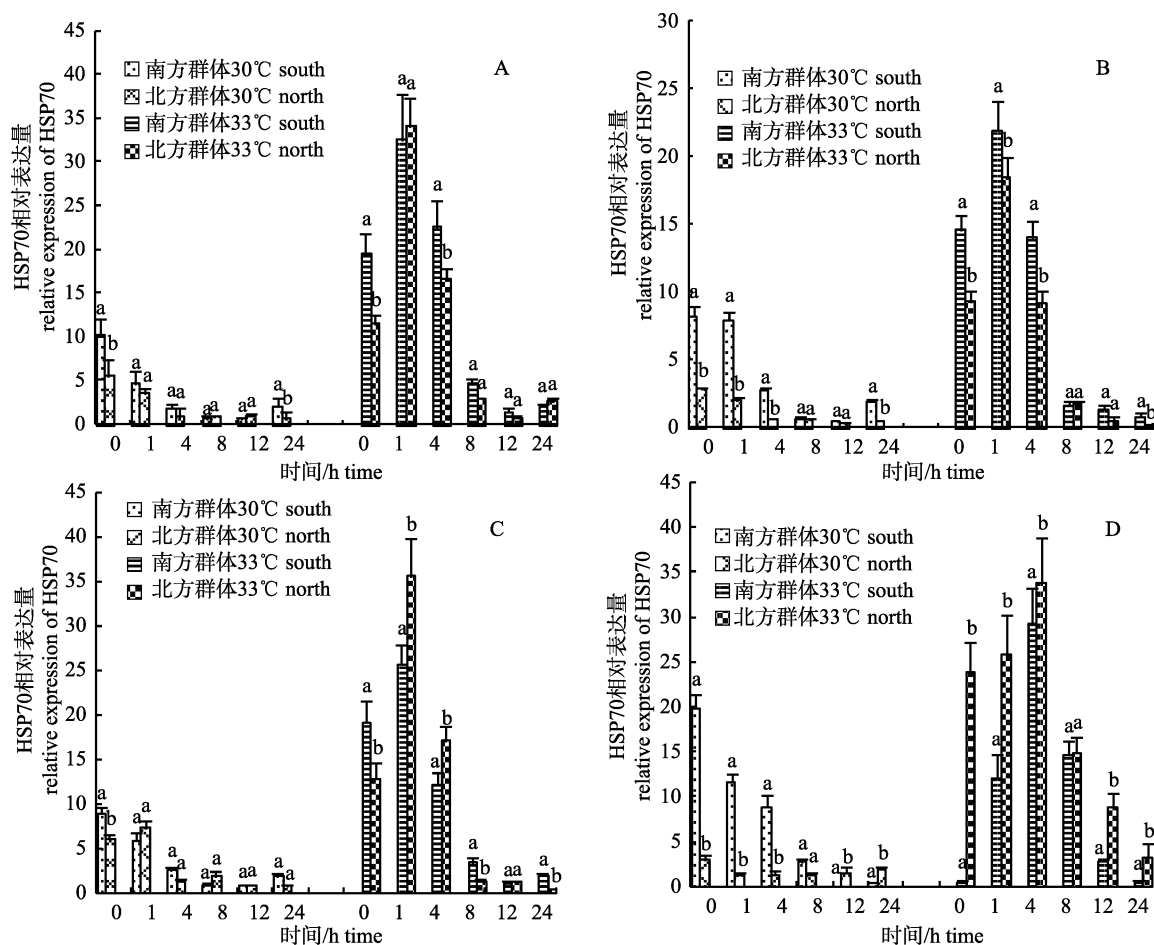


图 1 30℃ 和 33℃ 应激后皱纹盘鲍南北方群体不同组织 HSP70 表达量变化

A: 足中 HSP70 的表达量变化; B: 外套膜中 HSP70 的表达量变化; C: 鳃中 HSP70 的表达量变化; D: 肝胰脏中 HSP70 的表达量变化。相同时间点各组没有相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Expression level of HSP70 gene in different tissues of south and north groups of *Haliotis discus hannai* after 30℃ and 33℃ heat stress

A: expression level of HSP70 gene in the foot; B: expression level of HSP70 gene in the mantle; C: expression level of HSP70 gene in the gill; D: expression level of HSP70 gene in the hepatopancreas. Data in the same time without same letters are significantly different ($P < 0.05$).

膜和鳃中表达量的最大值出现在高温刺激后的 1 h, 而在肝胰脏中表达量的最大值出现在刺激结束后的 4 h (图 1A-D)。从图 1(A-B)中可以看出南方群体在 33℃ 刺激结束时表达量显著大于北方群体 ($P<0.05$); 在 12 h 两个群体都已基本恢复到最低水平; 而在图 1D 中, 可以看到北方群体经过 33℃ 刺激后肝胰脏的表达量在 0 h、1 h 和 4 h 要显著大于南方群体 ($P<0.05$), 至 24 h 未恢复到正常水平。

2.2 高温应激后 HSP90 的表达量变化

经过 30℃ 刺激后, 除南方群体肝胰脏中 HSP90 的表达量在 1 h 为最大(图 2D), 其他各组织两个群体的 HSP90 的表达量变化趋势与 HSP70

相似, 都在 0 h 有最大量表达, 然后随着恢复期的延长表达量开始下降, 并在 12 h 基本恢复到最低水平(北方群体肝胰脏的表达量在 24 h 接近最低水平)(图 2A-D)。由图 2A 中看出 0~1 h 南方群体足中 HSP90 的表达量南方群体显著小于北方群体 ($P<0.05$); 图 2C 中 0 h 南方群体鳃中的表达量小于北方群体但差异不显著 ($P>0.05$); 外套膜和肝胰脏中 0~4 h 的表达量南方群体显著大于北方群体 ($P<0.05$)(图 2B, 图 2D)。

由图 2A-D 可以看出, 经过 33℃ 刺激后, 南方和北方群体各组织 HSP90 表达量的变化趋势与在此温度刺激下的 HSP70 表达趋势相似, 表现为先上升后下降, 到 24 h 降到最低水平(南北方群体足

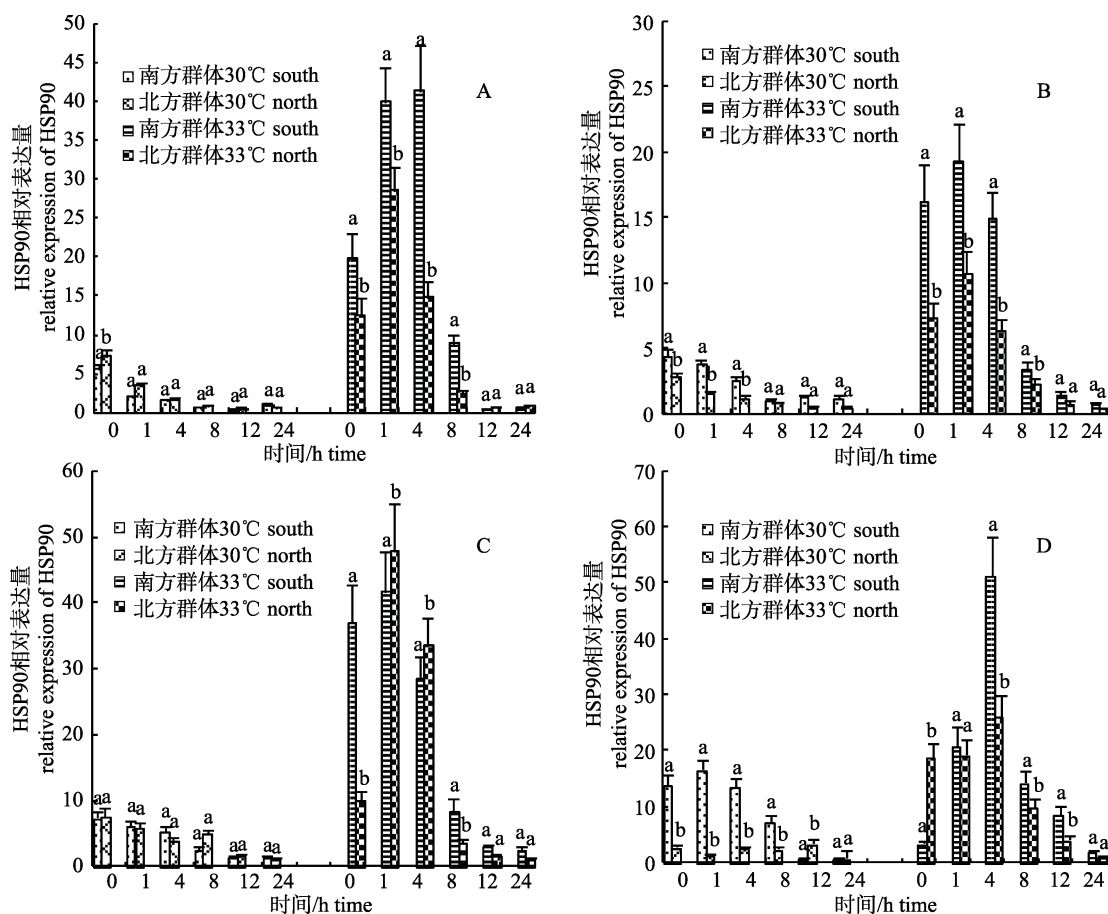


图2 30℃和33℃应激后皱纹盘鲍南北方群体不同组织 HSP90 表达量变化

A: 足中 HSP90 的表达量变化; B: 外套膜中 HSP90 的表达量变化; C: 鳃中 HSP90 的表达量变化; D: 肝胰脏中 HSP90 的表达量变化。相同时间点各组没有相同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 2 Expression level of HSP90 gene in different tissues of south and north groups of *Haliotis discus hannai* after 30°C and 33°C heat stress

A: expression level of HSP90 gene in the foot; B: expression level of HSP90 gene in the mantle; C: expression level of HSP90 gene in the gill; D: expression level of HSP90 gene in the hepatopancreas. Data in the same time without same letter are significantly different ($P<0.05$).

中的表达量最低值出现在 12 h)。南北方群体的胰腺脏和南方群体的足中 HSP90 表达量最大值出现在恢复期的 4 h, 其余各组的表达量最大值出现在恢复期的 1 h。图 2D 中恢复期 0 h 南方群体胰腺脏 HSP90 表达量小于北方群体, 但在 4 h 的表达量显著大于北方群体($P>0.05$); 鳃中 1 h 和 4 h HSP90 表达量南方群体显著小于北方群体(图 2C), 其余各组织中恢复期 0~8 h 南方群体的表达量显著大于北方群体($P<0.05$)。

2.3 深圳地区养殖条件下南北方群体生长的差异

从图 3 可以看出, 生长实验期间温度从 11 月份的 19.7℃ 开始下降达到 1 月份的最低点(14.3℃)后开始回升, 到 6 月份时水温为 28.6℃。实验开始时, 南北方群体在壳长上无显著差异($P>0.05$) (图 4A), 壳宽和鲜重上南方群体显著大于北方群体($P<0.05$) (图 4B, 图 4C)。但随着冬季的到来, 水温不断降低, 到 12 月时北方群体生长速度要快于南方群体, 壳宽与南方群体差异不显著, 但在鲜重上显著低于南方群体($P<0.05$); 1 月和 2 月北方群体壳长显著大于南方群体($P<0.05$), 壳宽和鲜重与南方群体差异不显著; 3 月时水温开始升高, 南方群体生长速度加快, 南北方群体壳长差异不显著, 但壳宽和鲜重已经开始显著大于北方群体($P<0.05$); 4 月以后南方群体在壳长、壳宽和鲜重 3 个指标上都已经显著大于北方群体($P<0.05$)。

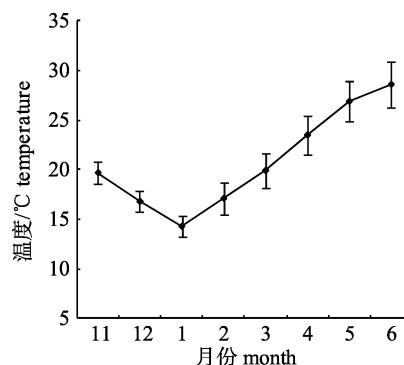


图 3 皱纹盘鲍深圳养殖池塘每月水温变化

Fig. 3 Monthly-changes of water temperature in Shenzhen culturer farm for *Haliotis discus hannai*

3 讨论

3.1 皱纹盘鲍南北方群体在南方生长的差异

海水温度的改变直接影响海洋动物的生长和生理活动的变化^[32], 同时海水温度决定了很多海洋动物的生态位宽度^[33]。生物对高温的抵抗能力可以不仅通过热驯化(temperature acclimatization)得到提高^[34], 也可以通过杂交的方式得以实现。直接将五龄苹浅褐卷叶蛾(*Epiphyas postvittana* Walker)直接置于 43℃ 的水环境中, 23 min 时死亡率达到 99%; 但将苹浅褐卷叶蛾在 35℃ 下预处理 8 h, 再置于 43℃ 时, 死亡率达到 99% 的时间延长至 37.4 min^[35]; 将长牡蛎在 37℃ 下预处理 2 h 后, 在 44℃ 的致死温度水环境中, 生长期可延长 3 周^[36];

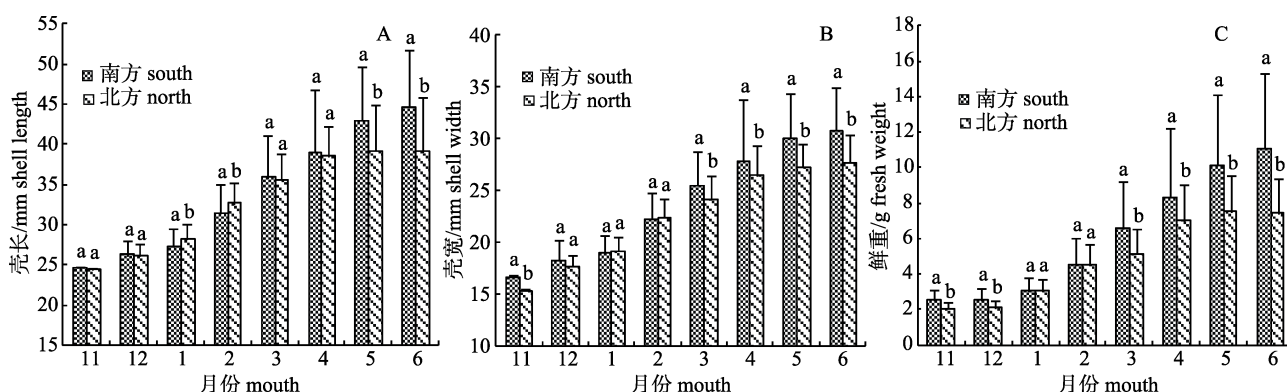


图 4 皱纹盘鲍南方和北方群体的生长变化

A: 壳长变化; B: 壳宽变化; C: 鲜重变化。同时时间点各组没有相同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Growth changes between southern and northern populations of *Haliotis discus hannai*

A: changes of shell length; B: changes of shell width; C: changes of fresh weight. Data in the same time without same letters are significantly different ($P<0.05$).

皱纹盘鲍大连群体与日本群体杂交后, 杂交子代适温上限提高 4~5℃, 使杂交鲍养殖区从黄海北部向南扩展^[9]。这些都说明经过一定的处理, 物种可能会在适温上限上得到提升。杂种优势不仅体现在对适温上限的提高上, 也可以提高生长速度, 缩短养成周期。杂交鲍‘大连1号’, 生长速度提高20%以上, 养成周期缩短 1/4~1/3^[9]; ‘东优1号’杂色鲍(以生长迅速的杂色鲍台湾选育群体为母本和以高抗病性的杂色鲍日本东京大岛选育群体为父本的杂交组合)在生长速度和存活率方面都有显著的优势^[37]。本研究发现皱纹盘鲍与日本盘鲍杂交南养后, 经过累代养殖、长期驯化和选择, 已在适宜生长温度上与北方群体产生分歧, 从8个月的生长实验可以看到北方群体更适应低温环境, 在低温环境下有较快的生长速度; 南方群体已经逐渐适应高温环境, 在一定高温条件下, 生长快于北方群体; 7月时由于北方群体累积死亡率较高, 存活数量已不足30粒, 养殖实验被迫停止; 这些都说明皱纹盘鲍和日本盘鲍杂交南养后, 使杂交鲍的适温范围发生了改变, 与北方群体相比在较高的温度有较快的生长速度。这与‘大连1号’新品种相一致^[9]。

3.2 HSP70和HSP90与生物对高温耐受性的关系

HSP70和HSP90在热休克蛋白家族中占有重要的地位, 具有分子伴侣的功能, 在蛋白质运转、激素受体结合、酶活稳定及修复方面发挥作用^[38]。有研究发现诱导型HSPs的积累决定着真核细胞的耐热性^[39]。Angelidis等^[40]发现, 细胞内HSP70量增加, 细胞抗热性增加, 细胞内Hsp70量减少, 细胞抗热性降低; 热胁迫下甜菜夜蛾幼体的HSP90表达量对其在高温环境下的生存起到保护作用^[41]。在皱纹盘鲍山东群体和辽宁群体的双列杂交实验中, 水温接近生理极限时, 杂交子表达更高的HSP70水平^[42]。这些研究结果说明HSPs的表达量与耐热性具有正相关性, 检测高温刺激后HSP70和HSP90表达量的高低作为衡量皱纹盘鲍南北方群体对高温耐受性的指标具有理论和实践基础。通过对深圳海区皱纹盘鲍南方群体的长期养殖观察发现, 当水温在30℃时, 杂交鲍摄食减少, 反应迟钝, 但死亡率并不高; 当水温超过

30℃时, 杂交鲍开始死亡, 夏季该地区水温最高可以达到33℃, 在此温度下养殖鲍会出现大量死亡, 为杂交鲍的致死温度, 因此选取这两个温度对南北方群体进行热激实验具有重要意义。

3.3 30℃水温刺激后HSP70、HSP90的表达规律

30℃热激1h后, 南北方群体的足、外套膜和鳃中HSP70和HSP90的表达量有所上升, 停止刺激后表达量开始下降(图1A-D, 图2A-D), 与Edwards等^[43]提出的HSP70在正常状态下, 表达量低, 在热应激条件下大量表达的结果相一致。经过30℃热激后, 恢复期0h所有测量组织中南方群体的HSP70表达量都显著高于北方群体($P < 0.05$), 说明皱纹盘鲍经过杂交后, 在应对高温的过程中响应速度快, 表达更多的HSPs, 帮助变性的蛋白重新折叠以恢复活性(图1A-D)。在肝胰脏中, 北方群体HSP90的表达量较低, 而南方群体在1h时达到最大值后开始下降(图2D), 说明30℃开始对皱纹盘鲍产生应激反应, 但并不剧烈, 南北方群体表现出不同的应对策略。经过30℃刺激后, 南方群体HSP90的表达量表现为: 足中显著低于北方群体($P < 0.05$), 鳃中小于北方群体但差异不显著, 外套膜和肝胰脏的表达量都显著高于北方群体($P < 0.05$)。说明在此温度下南方群体表达出更多的HSP70和HSP90来应对高温环境。30℃热激后, 多数组织的HSP70和HSP90的表达量在恢复期的12h达到最低且低于正常水平, 24h有所上升, 可能是由于12h前热休克蛋白的表达量已经足够, 机体更多地参与到变性蛋白的复性过程, 12h过后体内开始补充消耗的热休克蛋白, 以恢复至正常水平。

3.4 33℃水温刺激后HSP70、HSP90的表达规律

在短期33℃应激条件下, 南方群体和北方群体各个组织的热休克蛋白表达量经历了一个由低到高再下降的过程(图1A-D, 图2A-D), 说明该温度已经对南北方群体造成了显著的影响, 应激过程中热休克蛋白的表达量不足, 需要在恢复期继续表达热休克蛋白来帮助降解变性蛋白。从图1A、1B、2A和2B中可以看到南方群体足和外套膜的HSP70和HSP90在0h的表达量都显著大于北方群体, 说明南方群体应对高温的响应速度要

快于北方群体;并且除图 1A 中南方群体足的 HSP70 在 1 h 的最高表达量与北方群体差异不显著外,南方群体 HSP70 和 HSP90 的表达量都要显著大于北方群体。从图 1C 和图 2C 中可以看到,南方群体鳃中 HSP70 和 HSP90 的最高表达量都不如北方群体,但是经过高温刺激后(0 h)的表达量都显著高于北方群体,同样说明南方群体对高温的响应速度快于北方群体。但从肝胰脏应对高温时的休克蛋白表达量来看(图 1D 和图 2D),除 4 h 南方群体 HSP90 的表达量高于北方群体,从响应速度(0 h)和 HSP70 的表达量来看都不如北方群体。说明在 33℃ 高温刺激下,肝胰脏的热休克蛋白表达已经受到抑制,其表达量发生紊乱。

南北方群体 33℃ 水温条件下,足、外套膜和鳃的对热应激的反应较迅速,热休克蛋白的表达在应激后的 1 h 表达量达到最高值(图 1A-D, 图 2A-D),可能是由于这 3 个组织浸润在高温海水中。鳃是呼吸器官,足是运动器官,对温度变化较敏感性,其表达量高于外套膜,这与合浦珠母贝受到热应激的表达一致^[44]。肝胰脏是机体的重要代谢器官,保证肝脏内环境的稳定是机体进行其他生命活动的基础,因此皱纹盘鲍在受到 33℃ 的热刺激后,其 HSP70 和 HSP90 的表达量会在 4 h 出现最高值(图 1D 和图 2D);但同时肝胰脏又是物质代谢最旺盛的器官,为了保证其功能的正常运行,要尽快降解变性蛋白,所以应激后肝胰脏中热休克蛋白的表达量很高^[45],这与地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)消化腺在 35℃ 1 h 应激条件下,在恢复期过程中,3 h 的 HSP70 表达量达到最高相似^[46]。

综上所述,通过皱纹盘鲍南北方群体为期 8 个月的养殖实验和热激条件下 HSP70 和 HSP90 的表达量研究,可以说明皱纹盘鲍通过杂交并南养后,与北方群体产生了较大的适温性差异,改变了原有的适宜生长温度,逐渐适应南方的高水温环境,这为不同贝类杂交育种及高温驯化提供了理论基础;同时南方群体除 30℃ 刺激下的足和鳃 0 h 的 HSP90 表达量较低以及 33℃ 致死温度刺激下肝胰脏热休克蛋白表达发生紊乱外,其他各组在 0 h 的表达量都显著大于北方群体,说明南

方群体热休克蛋白应对高温的响应速度快于北方群体;尤其是南方群体在 30℃ 水温刺激下 HSP70 的表达量在各个组织和各个时间点都要高于北方群体,这与 Cheng 等^[42]发现的杂交群体在高温生理极限状态条件下的 HSP70 表达量高于自交群体相一致。因此通过测量不同群体的 HSP70 在非致死高温条件下的表达量,可以筛选出耐高温群体,以其作为亲本可以有效地进行抗高温选育。

参考文献:

- [1] Gao X S, Wang Q, Wang R B, et al. Abalone[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2000: 1-3. [高绪生, 王琦, 王仁波, 等. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000: 1-3.]
- [2] Gao X S. Abalone[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1995. [高绪生. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995.]
- [3] Lv D H. Studies on the abalone of Chinese coastal water[J]. Studia Marina Sinica, 1978, 14: 89-98. [吕端华. 中国近海鲍科的研究[J]. 海洋科学集刊, 1978, 14: 89-98.]
- [4] Yu L Y, Liu G M, Wang Z H, et al. Advances in genetics and breeding in *Haliotis discus hannai*: a review[J]. Journal of Aquaculture, 2012, 33(1): 48-53. [于连洋, 刘光谋, 王振华, 等. 皱纹盘鲍的遗传育种研究进展[J]. 水产养殖, 2012, 33(1): 48-53.]
- [5] Zhang M, Wang Z S, Gao X S. Comparison on adaptability of abalone *Haliotis discus hannai* Ino to temperatures at different growing stages[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 720-725. [张明, 王志松, 高绪生. 不同生长期皱纹盘鲍对水温适应能力的比较[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 720-725.]
- [6] Nie Z, Ji M, Yan J. Preliminary studies on increased survival and accelerated growth of overwintering juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Aquaculture, 1996, 140: 177-186.
- [7] Wu F C, Liu X, Zhang G F, et al. Effects of the initial size, stocking density and sortin on the growth of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Aquac Res, 2009, 40(10): 1103-1110.
- [8] Ke C H, Luo X, You W W, et al. Xipan abalone[J]. China Fisheries, 2016(3): 53-55. [柯才焕, 骆轩, 游伟伟, 等. 西盘鲍[J]. 中国水产, 2016(3): 53-55.]
- [9] "Dalian no.1" hybrid Pacific abalone[J]. Ocean and Fishery, 2008(11): 40. ["大连 1 号"杂交鲍[J]. 海洋与渔业, 2008(11): 40.]
- [10] Wu F C, Zhang G F. Preliminary study on over-summering

- of juvenile hybrid Pacific abalone in east Fujian inner bay[J]. Marine Sciences, 2009, 33(10): 9–14. [吴富村, 张国范. 皱纹盘鲍杂交幼鲍闽东内湾度夏初探[J]. 海洋科学, 2009, 33(10): 9–14.]
- [11] Ke C H. Present situation and prospect of abalone aquaculture industry in China[J]. China Fisheries, 2013(1): 27–30. [柯才焕. 我国鲍鱼养殖产业现状与展望[J]. 中国水产, 2013(1): 27–30.]
- [12] Parsell D A, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: detradation and reactivation of damaged proteins [J]. Annu Rev Genet, 1993, 27: 437–496.
- [13] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61: 243–282.
- [14] Snyder M J, Ross S. Stress protein (HSP70 family) expression in intertidal benthic organisms: the example of *Anthopleura elegans tissima* (Cnidaria: Anthozoa)[J]. Sci Mar, 2004, 68(suppl. 1): 155–162.
- [15] Liu B, Wang M Y, Xie J, et al. Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(17): 4866–4873. [刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(17): 4866–4873.]
- [16] Zhou X, Dong Y W, Wang F, et al. Effect of rapid temperature change on expression of *hsp70* and *hsp90* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 216–221. [周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 草鱼 *hsp70* 和 *hsp90* 对温度急性变化的响应[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 216–221.]
- [17] Bai X Q, Pang Z G, Zhang W J, et al. Relative expression of genes *hsp70* and *hsp90* in sea urchin *Strongylcentrotus intermedius* in thermal stress[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1034–1039. [白雪秋, 庞震国, 张伟杰, 等. 高温诱导对中间球海胆 *hsp70* 基因和 *hsp90* 基因的表达研究[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1034–1039.]
- [18] Qiang J, Yang H, Wang H, et al. Studies on blood biochemical indices and expression of hepatic HSP70 mRNA of different tilapia strains artificially challenged with *Streptococcus iniae*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 958–968. [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 958–968.]
- [19] Wang R, Huang Y H, Chen M, et al. Analysis of *hsp70* mRNA expression of tilapia infected with *Streptococcus*[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(4): 371–374. [王瑞, 黄艳华, 陈明, 等. 罗非鱼感染链球菌后 *hsp70* 基因表达研究[J]. 广西农业科学, 2010, 41(4): 371–374.]
- [20] Suo J J, Zhang B Z, Sun C L, et al. Effect of calmodulin (CaM) on expression of inducible heat shock protein (HSP70) in mice (*Mus musculus*) preimplantation embryo[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(6): 690–697. [索佳佳, 张保珍, 孙春玲, 等. 钙调蛋白(CaM)对附植前小鼠胚胎热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(6): 690–697.]
- [21] Luo J J, Wu Z M, Zhang B, et al. Effects of metallothionein on expression of lymphocyte apoptosis genes and the HSP70 gene of dairy cattle under heat stress[J]. Acta Prataculture Sinica, 2012, 21(4): 244–251. [罗佳捷, 吴宗明, 张彬, 等. 金属硫蛋白对热应激奶牛牛淋巴细胞凋亡基因和 HSP70 基因表达的影响[J]. 草业学报, 2012, 21(4): 244–251.]
- [22] Wang Y N, Wang H, Luo M M, et al. Effects of simultaneous variation in temperature and salinity on the expression of mantle HSP70 gene in *Pinctada fucata*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(3): 35–41. [王亚男, 王辉, 罗明明, 等. 温度、盐度对马氏珠母贝外套膜 *Hsp70* 基因表达量的联合影响[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(3): 35–41.]
- [23] Wang Y N, Wang H, Zhu X W, et al. Joint effects of water temperature and salinity on 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、盐度对马氏珠母贝鳃 *Hsp70* 基因表达量的联合效应[J]. 应用生态学报, 2012, 23(12): 3467–3473.]
- [24] Wang Y, Li J, Zhang Z, et al. Effects of pH and ammonia-N stresses on HSP90 gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43–50. [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50.]
- [25] Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals[J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(2): 134–142.
- [26] Liao L H, Ge X P, Xie J, et al. Effect of high dietary carbohydrates on plasma cortisol levels and HSP70 expression in allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(4): 819–827. [缪凌鸿, 戈贤平, 谢骏, 等. 高碳水化合物日粮对异育银鲫血浆皮质醇含量和 HSP70 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 819–827.]
- [27] Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena D K, et al. Heat shock

- response: hsp70 in environmental monitoring[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2003, 17(5): 249–254.
- [28] Wang H O, Lei Z R. Cloning and inter-specific altered expression of heat shock gene *Hsp70* in two invasive white flies in response to thermal stress[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(4): 693–701. [王海鸿, 雷仲仁. 两种入侵粉虱热激基因 *Hsp70* 的克隆及温度胁迫下的种间差异表达[J]. 生态学杂志, 2010, 29(4): 693–701.]
- [29] Wei J, Lv Z C, Wang R, et al. Comparative analysis of the copy numbers of *hsp70* and *hsp90* in *Trialeurodes vaporariorum* and three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(6): 647–655. [韦姣, 吕志创, 王韧, 等. 温室粉虱和烟粉虱 3 个隐种中热激蛋白基因 *hsp70* 和 *hsp90* 含量的比较分析[J]. 昆虫学报, 2014, 57(6): 647–655.]
- [30] Tomanek L, Sanford E. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (genus: Tegula)[J]. Biol Bull, 2003, 205(3): 276–284.
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [32] Burge C A, Eakin C M, Friedman C S, et al. Climate change influences on marine infectious diseases: implication for management and society[J]. Annu Rev Mar Sci, 2014, 6: 249–277.
- [33] Bale J S, Masters G J, Hodgkinson I D, et al. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect on insect herbivores[J]. Global Change Biol, 2002, 8(1): 1–16.
- [34] Lin Z T, Zhu J, Weng Y B, et al. Recent Progress in the HSP70[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 34(3): 67–70. [林钟婷, 朱静, 翁银标, 等. 热休克蛋白 70 的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(3): 67–70.]
- [35] Lester P J, Greenwood D R. Pretreatment Induced thermotolerance in lightbrown apple moth (Lepidoptera: Tortricidae) and associated induction[J]. J Econom Entomol, 1997, 90(6): 199–204.
- [36] Piano A, Asirelli C, Caselli F, et al. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe[J]. Cell Stress Chaperones, 2002, 7(3): 250–257.
- [37] You W W, Luo X, Wang D X, et al. Comparisons of morphological characteristics and grow-out performance in new variety “Dongyou No.1” and its parental populations of small abalone *Haliotis diversicolor*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 36(12): 1837–1843. [游伟伟, 骆轩, 王德祥, 等. “东优 1 号”杂色鲍及其亲本群体的形态特征和养殖性能比较[J]. 水产学报, 2010, 36(12): 1837–1843.]
- [38] Zhang J. Heat shock proteins and their biological functions[J]. Surgery Foreign Medical Sciences, 2003(5): 265–268. [张杰. 热休克蛋白及其生物学功能[J]. 国外医学, 外科学分册, 2003(5): 265–268.]
- [39] Parsell D A, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto R I, Tissieres A, Georgopoulos C, eds. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 457–494.
- [40] Angelidis C E, Lazaridis I, Pagoulatos G N. Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cell confers thermoresistance[J]. Eur J Biochem, 1991, 99: 35–39.
- [41] Zhai H F, Jiang X F, Luo L Z. Cloning and expression of HSP90 cDNA in larvae of the beet army worm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) under high temperature stress[J]. Acta Entomologica Sinica, 2010, 53(1): 20–28. [翟会芳, 江幸福, 罗礼智. 甜菜夜蛾 HSP90 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化[J]. 昆虫学报, 2010, 53(1): 20–28.]
- [42] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, et al. Heat-shock protein70 gene expression in four hatchery Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino populations using for marker-assisted selection[J]. Aqu Res, 2006, 37: 1290–1296.
- [43] Edwards J L, King W A, Kawarsky S J, et al. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione[J]. Theriogenology, 2001, 55(1): 209–223.
- [44] Huang G J, Qu N N, Yu D H, et al. Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene in pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 726–732. [黄桂菊, 曲妮妮, 喻达辉, 等. 合浦珠母贝热休克蛋白 hsp70 基因的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 726–732.]
- [45] Ji H, Wu Y K, Li S Z, et al. Changes of HSP70 by Western Blot in three tissues in piglets under cold stress at different time[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2010, 22(2): 44–47. [计红, 吴永魁, 李士泽, 等. 冷刺激不同时间仔猪 3 种组织 HSP70 表达的 Western Blot 检测分析[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2010, 22(2): 44–47.]
- [46] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(4): 1157–1163.

Differences in high temperature stress and growth between southern and northern populations of *Haliotis discus hannai*

YAO Tuo¹, JIA Yanli^{1,2}, HE Jian¹, WANG Ruixuan¹, WANG Jiangyong¹

1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Department of Fishery Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

Abstract: Hybrid abalone (*Haliotis discus hannai*) have been cultured in southern China for many years. Two experiments were performed (high temperature stress and culture in a southern sea area) to study whether a southern population (hybrid population) of Pacific abalone has different high temperature tolerance and is more adapted to that environment than a northern population (inbred population). After a 30°C stress or in the high temperature stress experiment, relative expression of heat shock protein (HSP)70 in the southern population at 0h of the recovery phase was significantly higher in the foot, mantle, gill, and hepatopancreas than those in the northern population ($P<0.05$). At the same time, relative expression of HSP90 in the southern population was significantly higher in the mantle and hepatopancreas than that in the northern population. The relative expression levels of HSP70 and HSP90 in the southern population after the 33°C stressor were significantly higher in the foot, mantle, and hepatopancreas at 0 h in the recovery phase than those in the northern population ($P<0.05$). In another experiment, the most rapid growth period in the northern population occurred from December to February; abalone in the northern population grew faster than those in the southern population and water temperature was no higher than 17.11°C at this time. Water temperature eventually exceeded 20°C in March, when the northern population grew slower than the southern population and mortality increased. Less than 30 abalone in the northern population remained in July. Taken together, we conclude that because hybrid abalone have been cultured for many generations in southern China, they became better adapted to higher water temperature. The relative expression levels of HSP70 in the two populations were positively correlated with heat resistance after the 30°C stressor. These data could be useful for assisted selection in an abalone high temperature resistance breeding program.

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino; southern and northern populations; temperature; stress; growth

Corresponding author: WANG Jiangyong. E-mail: wjy104@163.com