

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16255

微胶囊饲料对马氏珠母贝育珠性能、生长基因和矿化基因表达的影响

王庆恒^{1,2}, 廖永山¹, 杨创业¹, 郝瑞娟¹, 邓岳文^{1,2}, 杜晓东^{1,2}

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524088

摘要: 本研究分析了自主研发的微胶囊饲料替代微藻对马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)育珠性能、生长相关基因和矿化相关基因表达的影响。共设置了 3 个实验组, 其中, EG1 组投喂亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*), EG2 组投喂微胶囊饲料+亚心形扁藻, EG3 组投喂微胶囊饲料。养殖 170 d 后, 比较马氏珠母贝的育珠性能、闭壳肌生长相关基因 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 以及外套膜的中央膜和边缘膜矿化相关基因 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 的表达。结果表明: (1)各組间马氏珠母贝育珠贝的存活率、留核率不存在显著性差异($P>0.05$), 所采收珍珠的珍珠层厚度及平均质量也不存在显著性差异($P>0.05$); (2)各实验组间马氏珠母贝闭壳肌中 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 的相对表达量不存在显著性差异($P>0.05$); (3)各实验组间马氏珠母贝中央膜中 *DPT* 和 *N19* 的相对表达量差异不显著($P>0.05$), EG2 和 EG3 组 *pearlin* 的表达量显著性高于 EG1 组($P<0.05$), *pif177* 在 EG3 组中的表达量显著性高于 EG1 和 EG2 组($P<0.05$); (4)各实验组间马氏珠母贝边缘膜中 *pearlin*、*DPT* 和 *N19* 的相对表达量差异不显著($P>0.05$), EG2 和 EG3 组 *pif177* 的表达量显著高于 EG1 组($P<0.05$)。研究结果说明, 该微胶囊饲料可以替代部分微藻进行育珠生产, 为进一步研发马氏珠母贝的人工配合饲料及开展工厂化育珠积累了参考资料。

关键词: 微胶囊饲料; 马氏珠母贝; 育珠性能; 生长基因; 矿化基因

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0516-08

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)广泛分布于中国广东、广西和海南等沿海海区, 是我国海水珍珠培育的主要贝种。目前, 马氏珠母贝的养殖模式都是利用近岸海湾或港口, 采用笼具进行立桩式和浮筏式养殖, 受到环境的极大制约, 台风暴雨等自然灾害常常造成大量贝体死亡, 养殖设施毁坏, 严重影响了海水珍珠产业的发展^[1]。室内工厂化育珠可以降低海水珍珠产业的风险, 是提高珍珠质量和产量必然的发展方向, 该养殖模式的首要任务是解决马氏珠母贝的饲料问题。

微胶囊饲料可以减少营养物质在养殖水体的溶失, 改善水质, 已有鱼、虾、双壳贝类的幼体培

育中应用微胶囊饲料的研究报道^[2-5]。2013 年以来, 广东海洋大学海水珍珠培育研究室致力于研制马氏珠母贝固态微胶囊配合饲料^[1, 6-7]。本研究使用自主研发的微胶囊饲料替代微藻投喂马氏珠母贝育珠贝, 室内养殖 170 d 后, 比较了马氏珠母贝的育珠性能和闭壳肌(adductor muscle, A)生长相关基因表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)、成纤维细胞生长因子 18(fibroblast growth factors 18, FGF18)、生长激素诱导的跨膜蛋白(growth hormone-inducible transmembrane protein, GHITM)、转化生长因子 β 受体 I 型(transforming growth factor receptor type I, TβR

收稿日期: 2016-08-23; 修订日期: 2016-11-09.

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020208122); 国家贝类产业体系专项(CRAS-048); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(Z2014009; A201308A06).

作者简介: 王庆恒, 副教授. E-mail: wangqingheng@163.com

通信作者: 杜晓东, 教授. E-mail: gdhddxd@hotmail.com

I)及外套膜的中央膜(mantle center, MC)和边缘膜(mantle edge, ME)中矿化相关基因 *pearlin*、*Dermatopontin(DPT)*、*pif177* 和 *N19* 的表达水平,分析微胶囊饲料对马氏珠母贝育珠性能、生长和矿化相关基因表达的影响,为下一阶段进一步优化饲料配方、开展工厂化育珠工作积累基础数据和参考资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用微胶囊饲料配方详见 Wang 等^[7]报道的微胶囊饲料 S2, 其粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量分别为 26.3%、1.41%和 31.5%, 生产工艺见文献[8]。育珠贝贝龄为 2 龄, 规格 5.8~6.4 cm; 珠核直径为 6.0 mm, 平均质量为(0.34±0.02) g。

1.2 实验设计

2015 年 4 月, 育珠贝由同一位技术员进行植核后, 随机分为 3 个实验组(experimental group, EG)养殖育珠。每个实验组设 3 个重复组, 每个重复组 100 个马氏珠母贝, 3 个实验组分别投喂亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)(EG1)、微胶囊饲料+亚心形扁藻混合物(EG2)、微胶囊饲料(EG3)。养殖水体为 500 L, 水体的溶解氧(DO)保持在 5.00 mg/L 以上, 水温 21.5~30.5℃, 盐度为 30。实验贝吊养于距水面 50 cm 处。利用自动投饵器或者连接脉冲式电源开关的水泵每天投饵 12 次, 投喂时间 00:00、2:00、4:00、6:00、8:00、10:00、12:00、14:00、16:00、18:00、20:00 与 22:00, 每次投喂量见表 1, 每次投饵前利用定时插排进行定时定量排水。养殖 170 d 后, 比较分析各组育珠贝的育珠性能, 测定闭壳肌和外套膜部分生长相关基因和矿化相关基因的相对表达量。

表 1 各实验组饲料投喂量
Tab. 1 Feeding doses for each group of pearl oyster *Pinctada fucata martensii*

饲料 diet	EG1	EG2	EG3
亚心形扁藻/L <i>Platymonas subcordiformis</i>	40	20	—
微胶囊饲料/g microcapsuled diet weight	—	1.5	3

注: 亚心形扁藻浓度为 4×10⁴ cell/mL.
Note: Density of *Platymonas subcordiformis* was 4×10⁴ cell/mL.

1.3 实验方法

1.3.1 植核贝育珠性能的测定 实验结束后, 统计育珠贝存活数及珍珠数等。每粒珍珠质量(pearl weight, PW)由电子天平称量, 精确到 0.01 g; 珍珠层厚度(pearl thickness, PT)由深圳莫廷 OSG-1000 珍珠层厚度无损检测仪测量。养殖期间植核贝存活率(survival rate, SR)和植核贝留核率(retention rate, RR)的计算公式如下:

植核贝存活率(SR)=实验结束时植核贝个数/实验开始时植核贝个数×100%;

植核贝留核率(RR)=实验结束时植核贝珠核数/实验结束时植核贝个数×100%;

1.3.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 实验结束时, 从每个重复组取样 8 个个体, 解剖剪取闭壳肌(A)、外套膜的中央区(MC)和边缘区(ME), 利用液氮速冻后转至-80℃冰箱保存。采用 Trizol 法提取闭壳肌(A)、中央膜(MC)和边缘膜(ME)的总 RNA; 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品完整性, 用超微量分光光度计 NANO DROP 2000 检测 RNA 的纯度和浓度; 取 1 μg 总 RNA, 用 M-MLVRTase cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)反转录试剂盒合成 cDNA, 并将 cDNA 保存在-20℃冰箱备用。

1.3.3 引物的合成 运用 Primer Premier 5.0 软件, 依据 qRT-PCR 引物的设计原则, 分别设计出生长相关基因(*EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I*)、矿化相关基因(*pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19*)和内参基因 *GAPDH* 的 qRT-PCR 引物(表 2), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。设计引物的序列来源于马氏珠母贝珍珠囊转录组数据库^[9]和 NCBI。

1.3.4 实时荧光定量分析 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 在闭壳肌(A)的表达; 检测 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 在马氏珠母贝外套膜的中央膜(MC)和边缘膜(ME)的表达, 反应体系以 A、MC 和 ME 的 cDNA 第一条链为模板, 反应条件: 95℃预变性 2 min; 95℃变性 15 s, 60℃退火延伸 1 min, 共 40 个循环。ABI step one Software 系统分析荧光定量 PCR 结果。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	用途 application
<i>EGFR</i> -F	TGAGTTGTTTCAGATGACGGATG	qRT-PCR
<i>EGFR</i> -R	CTTCTCAGGACCCGCCCC	
<i>FGF18</i> -F	GGTGGAATTGATACGTTGATC	qRT-PCR
<i>FGF18</i> -R	GAAATGTTACCCGTCTGTGCC	
<i>GHITM</i> -F	GAGGAGGTACGACAGCGAGTT	qRT-PCR
<i>GHITM</i> -R	GGGTCATCCACGCCAGTT	
<i>TβR I</i> -F	AACTCCGACCTTGGCACCCC	qRT-PCR
<i>TβR I</i> -R	TAGGCGAAAAACGCAACGAT	
<i>pearlin</i> -F	GCTGGATACCCTACGACA	qRT-PCR
<i>pearlin</i> -R	TCCACATCTTAGCCACTCA	
<i>DPT</i> -F	ATGTCACCATAACAAAACCA	qRT-PCR
<i>DPT</i> -R	GCTCATCCCAGTCATTAC	
<i>pif177</i> -F	TGCTGCCATCACGTGAGTATG	qRT-PCR
<i>pif177</i> -R	GACTTCCCTTTCTCACACTTCCA	
<i>N19</i> -F	TTTCACTTTTGATGGGTATGGC	qRT-PCR
<i>N19</i> -R	CGGTTATGACTGCTTTGTTGC	
<i>GAPDH</i> -F	CACTCGCCAAGATAATCAACG	内参基因 reference gene
<i>GAPDH</i> -R	CCATTCCTGTCAACTTCCCAT	

1.4 数据处理

实时荧光定量的结果以 *GAPDH* 为参照基因, 根据目的基因和 *GAPDH* 的 C_t 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[10] 计算目的基因的表达情况。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较了组间育珠性状、生长相关基因与矿化相关基因表达量的差异; 若差异显著, 利用 Tukey 法进行均值比较, 显著性水平设为 0.05。利用 SPSS19.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 各实验组育珠性状的比较

各实验组马氏珠母贝育珠性能的分析结果见表 3。实验期间各组马氏珠母贝植核贝的存活率、留核率、珍珠层厚度及平均每粒珍珠的质量均不存在显著性差异 ($P>0.05$)。其中 EG1 组具有最大

的留核率; EG2 组的存活率分别比 EG1 和 EG3 提高了 16.07% 和 18.18%, 珍珠层厚度分别比 EG1 和 EG3 提高了 10.58% 和 9.10%。

2.2 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 在闭壳肌的表达差异

养殖 170 d 后, 测定 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 在闭壳肌(A)的表达量(图 1)。分析结果表明, 各实验组间马氏珠母贝闭壳肌的 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 的相对表达量不存在显著性差异 ($P>0.05$)。

2.3 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 在中央膜的表达差异

养殖 170 d 后, 测定 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 在中央膜(MC)的相对表达量(图 2)。各实验组间马氏珠母贝中央膜中 *DPT* 和 *N19* 的相对表达量

表 3 各实验组马氏珠母贝育珠性能的比较
Tab. 3 The pearl production traits of *Pinctada fucata martensii* in the experimental groups

项目 item	EG1	EG2	EG3	P
存活率/% survival rate	62.22±15.06	72.22±5.56	61.11±16.67	0.353
留核率/% retention rate	73.08±5.44	65.83±5.89	63.39±1.26	0.053
珍珠层厚度/μm pearl thickness	242.36±13.06	268.02±30.30	245.67±14.13	0.326
珍珠质量/(g·粒 ⁻¹) pearl weight	0.45±0.02	0.46±0.03	0.45±0.02	0.971

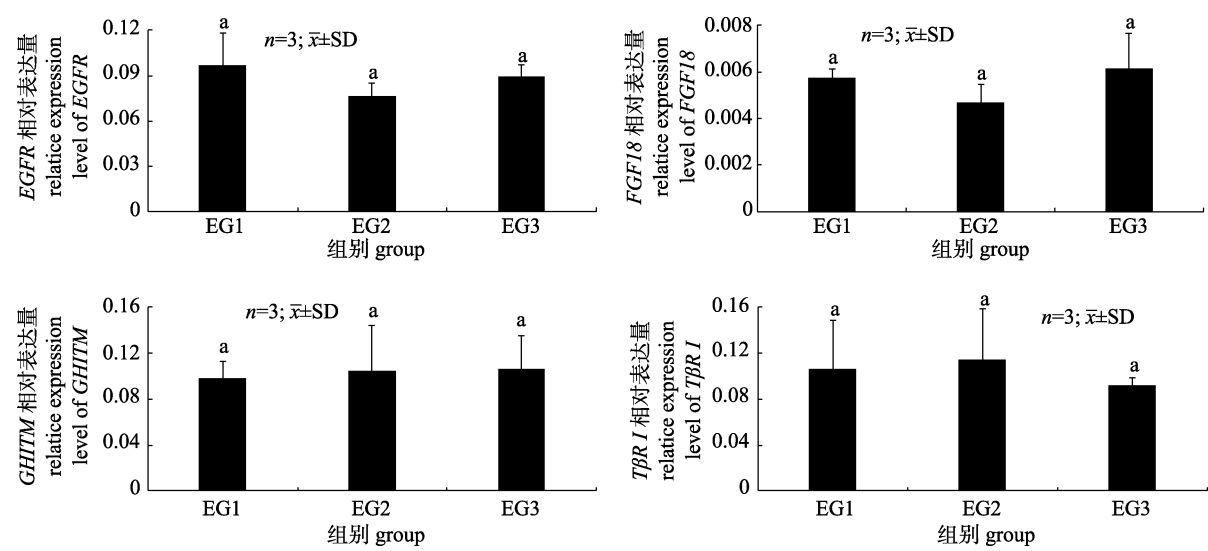


图 1 EGFR、FGF18、GHITM 和 TβR I 在闭壳肌中的相对表达量
具有不同字母的数值间差异显著(P<0.05).

Fig. 1 Relative expression level of EGFR, FGF18, GHITM and TβR I mRNA in the adductor muscle of *Pinctada fucata martensii*
Values with different letters are significantly different (P<0.05).

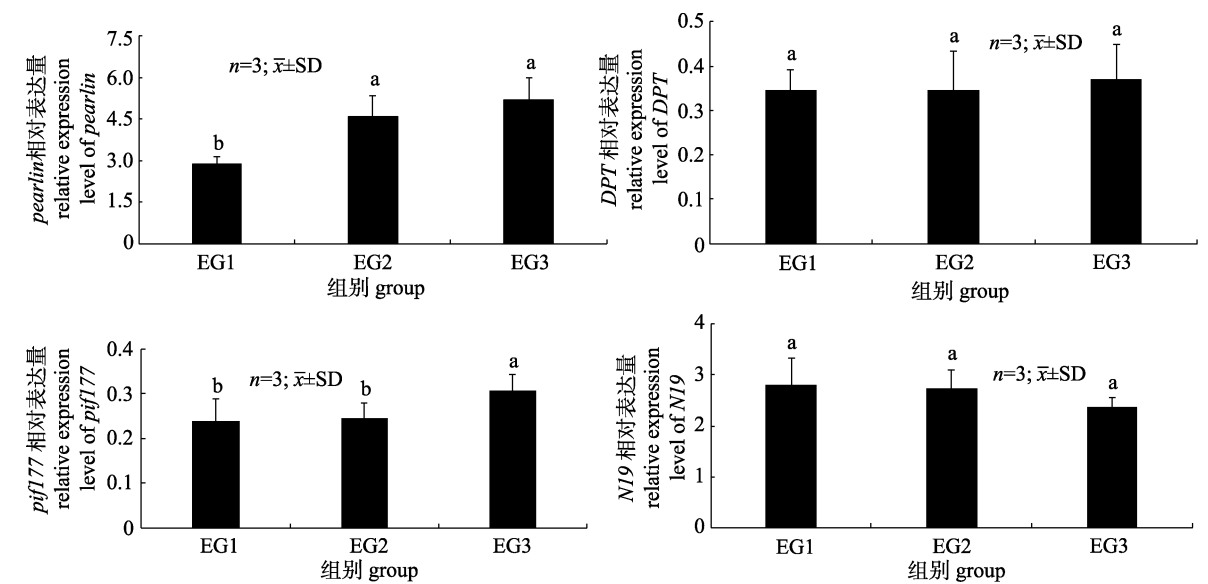


图 2 pearlin、DPT、pif177 和 N19 在中央膜中的相对表达量
具有不同字母的数值间差异显著(P<0.05).

Fig. 2 Relative expression level of pearlin, DPT, pif177 and N19 mRNA in the mantle center of *Pinctada fucata martensii*
Values with different letters are significantly different (P<0.05).

不存在显著性差异(P>0.05); *pearlin* 和 *pif177* 的相对表达量存在显著性差异(P<0.05)。其中 EG1 组的马氏珠母贝的 *pearlin* 基因的表达量显著低于 EG2 组和 EG3 组(P<0.05); EG3 组的马氏珠母贝的 *pif177* 基因的表达量显著高于 EG1 组和 EG2 组(P<0.05)。

2.4 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 在边缘膜的表
达差异

养殖 170 d 后, 测定 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 在边缘膜(ME)的表达量(图 3)。各实验组间马氏珠母贝边缘膜中 *pearlin*、*DPT* 和 *N19* 的相对表达量不存在显著性差异(P>0.05); *pif177* 的相对表

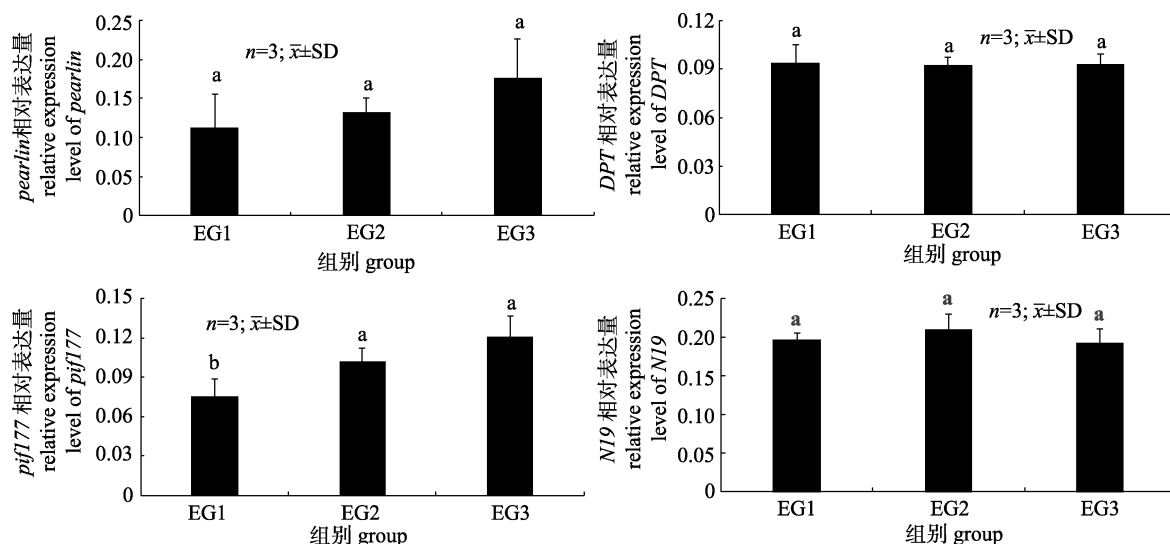


图 3 *pearlin*、*DPT*、*pifl77* 和 *N19* 在边缘膜中的相对表达量
具有不同字母的数值间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative expression level of *pearlin*, *DPT*, *pifl77* and *N19* mRNA in the mantle edge of *Pinctada fucata martensii*
Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

达量存在显著性差异 ($P < 0.05$), EG1 组的马氏珠母贝的 *pifl77* 基因的表达量显著低于 EG2 组和 EG3 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

自 20 世纪 60 年代以来, 马氏珠母贝育珠养殖模式基本采用近岸立桩养殖与海区浮筏养殖。这两种养殖模式的缺陷是养殖过程中容易受到海区自然环境的影响。此外, 近岸污染物日益增加也会导致育珠贝成活率的降低。20 世纪 80—90 年代, 流沙湾海区育珠贝的成活率(从植核手术到珍珠收获)为 50%~65%^[11-12]; 但是近 2、3 年流沙湾海区育珠贝的成活率不超过 30%。因此, 改变现有育珠模式十分迫切。在探索马氏珠母贝育珠贝养殖模式过程中, 科研工作者先后建立了育珠贝池塘休养与海区养殖模式、池塘养殖模式等^[13-15]。例如, 黄甫等^[14]报道了利用池塘育珠可以提高育珠贝的成活率、留核率, 并且池塘条件下便于人为控制及管理操作。开展室内工厂化育珠首先要解决珍珠贝的饵料问题, 马氏珠母贝是滤食性贝类, 主要利用鳃丝和鳃丝上的纤毛运动来滤食水环境中的单胞藻类等; 但是单胞藻类的培养容易受到气温、光照等因素的影响, 因此影响育珠贝养殖模式改变的瓶颈是马氏珠母贝人工饲料的研

发。目前, 有关贝类的固态人工饲料的研发主要见于鲍(*Haliotis discus*)^[16-17]。2013 年以来, 课题组与合作单位开展了马氏珠母贝微胶囊饲料的研究, 先后比较了人工饲料对稚贝生长、成活率、免疫指标与矿化基因表达量的影响^[1, 6-7]。本研究中各组间马氏珠母贝育珠贝的存活率、留核率、珍珠层厚度及平均每粒珍珠的质量均不存在显著性差异 ($P > 0.05$), 这说明微胶囊饲料可以替代部分微藻进行马氏珠母贝育珠生产。

珍珠贝的正常生长是育珠生产顺利进展的根本保障, 生长相关基因的正常表达是生物体正常生长的前提。*EGFR* 是一种膜表面受体, 可以与配体(表皮生长因子、转化生长因子等)结合, 进而调节细胞的生长、增殖和分化等^[18-19]; *FGF18* 是成纤维细胞生长因子家族的重要成员之一, 在细胞生长、胚胎发育、形态形成等方面发挥重要的作用^[20-21]; *GHITM* 属于 Bax inhibitor-1 (BI-1) 家族成员, 在生长发育和细胞凋亡等方面发挥重要的作用^[22-24]; *TβR I* 存在于细胞膜表面, 通过与其配体的结合也参与调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡等^[25]。课题组前期研究表明 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR I* 的表达量与壳长、壳高、壳宽、壳重、总重、总干重、软体干重和软体湿重 8 个生长性状均呈正相关^[26], 说明通过检测这 4 个基

因的表达可以反映珍珠贝的生长状况。本研究检测了马氏珠母贝闭壳肌中 *EGFR*、*FGF18*、*GHITM* 和 *TβR1* 在3个实验组中的表达水平, 结果显示没有显著性差异 ($P>0.05$), 这一结果表明该微胶囊饲料替代微藻在一定程度上可以满足马氏珠母贝生长发育的需求, 与杨创业等^[6]研究结果类似。

生物矿化是无机矿物质在蛋白质、糖蛋白或多糖等有机大分子的精确调控下形成有序沉淀的过程^[27]。贝壳和珍珠都是典型的生物矿化产物, 其中的基质蛋白是调节晶体成核、取向、形态及多态性的关键因素^[28]。为了探索珍珠贝生物矿化的机制, 已经从马氏珠母贝中鉴定并获得了数十种矿化相关蛋白或基因, 如 *nacrein*、*mis60*、*msi31*、*aspein*、*KRMP*、*N16* 和 *pif177* 等^[29-30]。本研究检测了3个实验组中马氏珠母贝外套膜边缘膜和中央膜中4个矿化相关基因 *pearlin*、*DPT*、*pif177* 和 *N19* 表达水平差异。结果显示这4个矿化基因在各实验组间呈现出不同的表达趋势: *DPT* 和 *N19* 在中央膜和边缘膜的相对表达量差异不显著, 说明微胶囊饲料的添加没有对这两个基因的表达产生影响; 而中央膜 *pearlin* 在微胶囊饲料添加组中的表达水平显著高于未添加组, 同时, 微胶囊饲料添加组的 *pif177* 在边缘膜的表达水平也显著高于未添加组, 说明微胶囊饲料的添加显著性刺激了 *pearlin* 和 *pif177* 的表达。*pearlin* 是文石层间的基质蛋白, 通过将 Ca^{2+} 传递给正在成核的文石层, 参与珍珠层的形成^[31]。*pif177* 是一种酸性基质蛋白, 通过特异性结合文石晶体, 促进文石晶体成核, 调节马氏珠母贝珍珠层的形成^[32]。综合这4个基因的表达, 可以推测微胶囊饲料在一定程度上刺激了珍珠层的形成, 这可能是微胶囊饲料添加组珍珠层厚度略微高于未添加组的原因。但目前, 对于矿化基因间的调控和互作关系尚不清楚, 且本研究只是检测了4个矿化基因, 不足以分析饵料营养差异对马氏珠母贝生物矿化过程影响的全貌, 但从上述珍珠层厚度、单粒珍珠的质量等生产指标来看, 在实验周期内珍珠层的沉积速度无明显差异, *pearlin* 和 *pif177* 的表达差异对珍珠质沉积的影响尚有待继续深入研究。

综上所述, 微胶囊饲料替代部分微藻进行室

内工厂化育珠是可行的, 但是在后续的工作中还需进一步优化饲料配方, 以期微胶囊饲料逐渐替代微藻, 为工厂化育珠生产奠定基础。

参考文献:

- [1] Yang C Y, Luo S J, Wang Q H, et al. Evaluation of the applicability of a microencapsulated diet developed for the pearl oyster, *Pinctada martensii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 442-449. [杨创业, 罗少杰, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝微胶囊饲料的适用性研究[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 442-449.]
- [2] Lazo J P, Dinis M T, Holt G J, et al. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*)[J]. Aquaculture, 2000, 188(3-4): 339-351.
- [3] Chi S Y, Tan B P, Dong X H, et al. Effect of supplementation microcapsule or crystalline methionine in diets on related enzyme activity of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 110-118. [迟淑艳, 谭北平, 董晓慧, 等. 微胶囊蛋氨酸或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼相关酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 110-118.]
- [4] Kurmalay K, Jones D A, Yule A B, et al. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and on combinations of both[J]. Aquaculture, 1989, 81(1): 27-45.
- [5] Numaguchi K. Effect of an artificial diet on early spat growth of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. Fish Sci, 2002, 68(3): 694-696.
- [6] Yang C Y, Wang Q H, Sun R J, et al. Growth rate and expression of mineralization gene of pearl oyster *Pinctada martensii* fed on microcapsuled diets[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(8): 1681-1687. [杨创业, 王庆恒, 孙瑞椒, 等. 微胶囊饲料对马氏珠母贝生长性状和矿化基因表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1681-1687.]
- [7] Wang Q H, Yang C Y, Du X D, et al. Growth performance and biochemical composition of juvenile pearl oyster *Pinctada martensii* fed on artificial diets[J]. Aquac Int, 2016, 24(4): 995-1005.
- [8] Sun R J. One production methods of Golden Pomfret seedlings opening microcapsules material: China, 201110176721.4[P]. 2011, 11, 02. [孙瑞椒. 一种金鲳鱼苗微囊开口料的生产方法: 中国, 201110176721.4[P]. 2011, 11, 02.]
- [9] Zhao X X, Wang Q H, Jiao Y, et al. Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by

- transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Mar Biotechnol, 2012, 14(6): 730–739.
- [10] 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.
- [11] Deng C M, Lin Y, Du T, et al. Experiment on pre-operation treatment of *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. Journal of Zhanjiang Fisheries College, 1995, 15(1): 6–9. [邓陈茂, 林养, 杜涛, 等. 马氏珠母贝的术前处理试验[J]. 湛江水产学院学报, 1995, 15(1): 6–9.]
- [12] Xie R Z, Liu J Y, Deng C M, et al. Effect of pre-operation treatment and indoor-pond recuperation to *Pinctada martensii* (Dunker) on output and quality of pearl[J]. Marine Sciences, 1999, 23(4): 14–16. [谢仁政, 刘建勇, 邓陈茂, 等. 术前处理和室内水池休养对提高珍珠产量和质量的影响[J]. 海洋科学, 1999, 23(4): 14–16.]
- [13] Li F. The test report of culturing pearl in the pond by using *Pinctada martensii*[J]. Fisheries Science and Technology of Guangxi, 1999(4): 9–11. [李芳. 马氏珠母贝池塘育珠试验报告[J]. 广西水产科技, 1999(4): 9–11.]
- [14] Huang F, Deng C M, Fu S, et al. Culturing pearl in the pond by using *Pinctada martensii* and water quality control[J]. Scientific Fish Farming, 2010(4): 39–40. [黄甫, 邓陈茂, 符韶, 等. 马氏珠母贝池塘育珠及其水质调控[J]. 科学养鱼, 2010(4): 39–40.]
- [15] Jia Y H, Wen X, Yan B. The test of segmented culture of pearl by using *Pinctada martensii*[J]. Aquatic Science and Technology Information, 2010, 37(6): 279–281. [贾友宏, 文雪, 阎冰. 马氏珠母贝分段育珠试验[J]. 水产科技情报, 2010, 37(6): 279–281.]
- [16] Chen Z Q, Lin Q H, Zhu Q G, et al. Effects of microencapsulated diet on the growth performance of crossbred juvenile abalone[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(3): 206–210. [陈章群, 林清海, 朱庆国, 等. 微胶囊饲料对杂交鲍苗生长性能的影响[J]. 福建农业学报, 2013, 28(3): 206–210.]
- [17] Wang Y, Zhu Q G, Pan R Z, et al. Effect of microencapsulated feed on immunity and growth of juvenile abalones[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(6): 575–579. [王云, 朱庆国, 潘瑞珍, 等. 稚幼鲍微囊饲料对鲍苗免疫和生长的影响[J]. 福建农业学报, 2014, 29(6): 575–579.]
- [18] Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling[J]. Mol Syst Biol, 2005, 1(1): 2005.0010
- [19] Chen W S, Lazar C S, Poenie M, et al. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor[J]. Nature, 1987, 328(6133): 820–823.
- [20] Moore E E, Bendele A M, Thompson D L, et al. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(7): 623–631.
- [21] Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10[J]. J Biol Chem, 2002, 277(9): 7493–7500.
- [22] Zhou J, Zhu T, Hu C, et al. Comparative genomics and function analysis on B11 family[J]. Comput Biol Chem, 2008, 32(3): 159–162.
- [23] Reimers K, Choi C Y, Bucan V, et al. The growth-hormone inducible transmembrane protein (Ghitm) belongs to the Bax inhibitory protein-like family[J]. Int J Biol Sci, 2007, 3(7): 471–476.
- [24] Yoshida T, Nagata S, Kataoka H. Ghitm is an ortholog of the Bombyx mori prothoracic gland-derived receptor (Pgdr) that is ubiquitously expressed in mammalian cells and requires an N-terminal signal sequence for expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(1): 13–18.
- [25] Kingsley D M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms[J]. Gen Dev, 1994, 8(2): 133–146.
- [26] Chen W Y. Correlation analysis of pearl production and growth traits with the related genes from *Pinctada martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014. [陈伟耀. 马氏珠母贝育珠和生长性状与相关基因的关联分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.]
- [27] Cui F Z. Biomineralization[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2012. [崔福斋. 生物矿化[M]. 北京: 清华大学出版社, 2012.]
- [28] Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, et al. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins[J]. Nature, 1996, 381(6577): 56–58.
- [29] Gu Z F, Yin X L, Yu C C, et al. Expression profiles of nine biomineralization genes and their relationship with pearl nacre thickness in the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, Dunker[J]. Aquac Res, 2014, 46(2): 268–275.
- [30] Dong B B, Huang R L, Wang Q H, et al. Effects of ocean acidification on nacre formation and expression of related genes in *Pinctada martensii*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(8): 39–46. [董冰冰, 黄荣莲, 王庆恒, 等. 海洋酸化对马氏珠母贝珍珠层形成的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(8): 39–46.]
- [31] Montagnani C, Marie B, Marin F, et al. *Pmarg*-pearlin is a

matrix protein involved in nacre framework formation in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*[J]. ChemBioChem, 2011, 12(13): 2033–2043.

[32] Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, et al. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation[J]. Science, 2009, 325(5946): 1388–1390.

Effects of replacement of dietary microalgae with microencapsulated diet on pearl production traits, gene expression related to growth and mineralization in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*

WANG Qingheng^{1,2}, LIAO Yongshan¹, YANG Chuangye¹, HAO Ruijuan¹, DENG Yuewen^{1,2}, DU Xiaodong^{1,2}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Pearl Breeding and Processing Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Zhanjiang 524088, China

Abstract: The effects of replacement of a dietary microalgae with a microencapsulated diet on gene expression related to pearl production traits, growth and biomineralization were studied in the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Three experimental groups were set up: EG1 was fed the marine green alga *Platymonas subcordiformis*; EG2 was fed a mixed diet of the microcapsules and the algae; and EG3 was fed only the microcapsules. The expression level of the growth-related genes *EGFR*, *FGF18*, *GHITM*, and *TβR I* in the adductor muscle (A), and the biomineralization-related genes *pearlin*, *DPT*, *pif177*, and *N19* in the mantle central (MC) and mantle edge (ME), were detected and compared among the three treatments after a 170-day indoor farming period. The results showed that survival rate, retention rate, the pearl nacre thickness, and average mass of the harvested pearls did not significantly differ ($P>0.05$) among the three groups. The relative gene expression level of *EGFR*, *FGF18*, *GHITM*, and *TβR I* in the A did not significantly differ among the three treatments ($P>0.05$). Whereas the relative expression level of *DPT* and *N19* in the MC did not significantly differ among the three treatments ($P>0.05$), the relative expression level of *pearlin* was higher in EG2 and EG3 than in EG1, and the expression level of *pif177* was higher in EG3 than in EG2 and EG3 ($P<0.05$). No significant differences were detected in the relative expression levels of *pearlin*, *DPT*, and *N19* in the ME among the three treatments ($P>0.05$); however, the relative expression of *pif177* was higher in EG2 and EG3 than in EG1 ($P<0.05$). These results suggest that the microencapsulated diet can replace part of the microalgae diet, which may be helpfully applied in future studies of artificial feed development for pearl oyster *P. fucata martensii*.

Key words: microencapsulated diet; *Pinctada fucata martensii*; pearl production traits; growth gene; mineralization gene

Corresponding author: DU Xiaodong. E-mail: gdhddxd@hotmail.com