

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19303

盐度对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼渗透调节与耗氧率的影响

刘龙龙^{1,2}, 罗鸣^{1,2}, 陈傅晓^{1,2}, 谭围^{1,2}, 刘金叶^{1,2}, 王永波^{1,2}, 符书源^{1,2},
刘洪涛^{1,3}

1. 海南省海洋与渔业科学院, 海南 海口 571126;
2. 海南热带海洋学院, 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南 三亚 572022;
3. 海南省海洋与渔业科学院, 海南省热带海水养殖技术重点实验室, 海南 海口 571126

摘要: 为研究盐度对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀)渗透调节与耗氧率的影响, 设计实验一, 将(162.5±12.1) g 珍珠龙胆石斑鱼置于不同盐度(6、12、18、24、30)下养殖 10 d, 测定血清渗透压及 Na⁺、Cl⁻、K⁺离子浓度。实验结果表明, 随盐度的升高血清渗透压及 Na⁺、Cl⁻、K⁺离子浓度也随着升高, 各组 [Na⁺]:[Cl⁻] 比值无显著差异($P>0.05$); 经回归分析得到血清等渗点渗透压为 365.95 mOsm/kg, 所对应盐度为 12.75。实验二, 将(26.4±2.7) g 幼鱼置于不同盐度(6、12、18、24、30)下养殖 30 d, 测定在开始暴露后 0 h、3 h、24 h、72 h 鳃 Na⁺/K⁺-ATPase 活性及表达和第 30 天耗氧率, 结果表明鳃 Na⁺/K⁺-ATPase 活性随盐度的增大呈“U”形变化; 鳃 Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 1$ 基因表达量波动较大, 在 72 h 后随盐度增大先降低后增加, 变化趋势与酶活性一致; 第 30 天耗氧率随盐度的增加先降低后增加又降低。综上所述, 珍珠龙胆石斑鱼幼鱼 10 d 内能够完全适应 6~30 盐度急性变化, 耗氧率除了受离子渗透调节的影响, 还可能与其生活史阶段有关。

关键词: 珍珠龙胆石斑鱼; 幼鱼; 盐度; 渗透调节; Na⁺/K⁺-ATPase; 耗氧率

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)06-0692-09

盐度是影响水生生物生理的主要环境因子^[1-2], 盐度改变迫使鱼类自身发生一系列的变化来调整渗透压达到新的动态平衡, 以维持其内环境离子组成和渗透压相对稳定。大量的酶参与渗透调节过程, 其中鳃上皮细胞表面的 Na⁺/K⁺-ATPase 是单价离子转运的主要驱动力^[3], 是维持细胞内稳态的重要活性泵^[4-5], 并且这些渗透调节过程都需要能量^[6]。

石斑鱼(*Epinephelus* sp.)隶属于鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、鲈科(Serranidae), 属暖水、岛礁性鱼类, 广泛分布于热带及亚热带海域。珍珠龙胆石斑鱼是以鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)为父本, 棕点石斑鱼(*Epinephelus*

fuscoguttatus)为母本杂交而成, 又称虎龙杂交斑。与亲本相比, 该杂交斑具有生长速度快、对环境因子耐受性强、病害少等优点^[7], 是中国南方沿海重要经济鱼类, 适宜海水池塘、网箱及工厂化养殖, 栖息环境盐度一般在 25~30。对珍珠龙胆石斑鱼的研究主要集中在生长繁育^[8-10]、饲料营养^[11-15]、投饲技术^[16]、鱼病防治^[17-18]、环境应激等方面^[19-21], 而关于盐度对珍珠龙胆石斑鱼影响的研究相对较少, 主要涉及盐度对生长^[22-23]、组织变化^[24]、耗氧率及排氨率^[25]、胚胎发育^[26]等影响。前期研究已表明珍珠龙胆石斑鱼在低盐条件下具有更好的生长性能^[24], 为进一步探讨其在适应低盐环境下的渗透调节机制, 本研究以盐度变

收稿日期: 2019-10-27; 修订日期: 2019-12-09。

基金项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新专项(2019YFD0900900, 2019YFD0900903); 海南省自然科学基金青年基金项目(319QN250); 国家重点研发计划项目(2019YFB1504304); 现代农业产业技术体系专项(CARS-47)。

作者简介: 刘龙龙(1988-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事热带海水鱼类养殖技术研究。E-mail: silyboylong@163.com

通信作者: 罗鸣, 博士, 副研究员。E-mail: hothawk@yeah.net

化作为胁迫因子,测定在低盐条件下珍珠龙胆石斑鱼血清渗透压、离子水平、 Na^+/K^+ -ATPase 活性及耗氧率变化,旨在为珍珠龙胆石斑鱼在低盐水体养殖、开发盐碱地池塘新品种提供理论依据,从而进一步拓宽养殖空间。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在海南省海洋与渔业科学院琼海实验基地进行。体形较小的鱼比体形大的鱼有更高的表面积/体积比,对外界环境渗透压变化的响应比大鱼更敏感^[27],但由于小鱼血量太少,为采集足够鱼血保证实验检测所需,实验珍珠龙胆石斑鱼采用两种规格,均取自基地,挑选健壮活泼、规格均匀的个体进行实验。实验一中鱼体重为 (162.5 ± 12.1) g;实验二中鱼体重为 (26.4 ± 2.7) g。实验水温 (27.5 ± 0.5) °C,养殖水体 pH 8.0 ± 0.1 ,实验期间连续充气,每天投喂 1 次,投料 1 h 后吸底并接近全量换水。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 实验在室内玻璃钢质圆桶中进行(水体约 0.8 m^3),实验低盐海水采用砂滤自然海水添加淡水配制而成,实验一、实验二均设盐度 6、12、18、24、30(对照)共 5 个盐度梯度,每个梯度设 3 个平行组,实验时将鱼直接从自然海水转入调好的盐度。实验一每桶 5 尾鱼,共进行 10 d,实验结束时,每组随机抽取 3 尾鱼尾静脉取血,取样前禁食 24 h,用丁香油麻醉后置于冰盘取样,取血过程不用抗凝剂,操作要迅速,凝血后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6000\times\text{g}$ 离心 20 min,取上清液用于测量血清渗透压及离子浓度。实验二每桶 20 尾鱼,共进行 30 d,在实验开始后 0 h、3 h、24 h、72 h 随机抽取 3 尾鱼,分别取鳃丝后放入液氮保存,用于测定鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活性及 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ (*NKA $\alpha 1$*)基因的表达,取样操作同实验一;在实验第 30 天测定耗氧率,测定前禁食 24 h。

1.2.2 海水和鱼血清渗透压及离子浓度测定 微孔滤膜抽滤去除实验海水悬浮物,全自动生化分析仪(Chemray 240, 中国)测定海水和鱼血清中的 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 离子浓度;冰点渗透压仪(Osmopro3250,

英国)测定海水和鱼血清的渗透压。用 $[\text{Na}^+]:[\text{Cl}^-]$ 比值估算强离子比,不校正离子活性。

1.2.3 鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性测定 准确称取鳃丝样品,加入 9 倍体积生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制备成 10%匀浆液,2500 r/min 离心 10 min,取上清 0.2 mL 加 0.8 mL 生理盐水稀释成 2%匀浆液。用 Na^+/K^+ -ATPase 试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定鳃 ATP 酶活力,蛋白质含量用总蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所)测定。以每小时每毫克鳃组织蛋白中 ATP 酶产生 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 无机磷的量定义为 1 个 ATP 酶活力单位,即 $\mu\text{mol(P)}/[\text{mg(prot)}\cdot\text{h}]$ 。

1.2.4 总 RNA 提取及反转录 使用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)从珍珠龙胆石斑鱼鳃中提取总 RNA,然后在电泳仪上以 1.0%变性琼脂糖凝胶测定 RNA 质量和产率。用无 RNA 脱氧核糖核酸酶(TaKaRa, 日本)处理 RNA 以去除 DNA 污染,并按照制造商提供的说明,通过逆转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第一链,作为基因表达分析模板。

1.2.5 *NKA $\alpha 1$* 基因表达量的测定 用 Stepone plus 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行珍珠龙胆石斑鱼鳃组织 *NKA $\alpha 1$* 基因的实时定量 RT-PCR 测定。扩增体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中包含 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 美国), $1\text{ }\mu\text{L}$ 引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$), $6\text{ }\mu\text{L}$ 的无核酸酶水和 $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 cDNA 混合物。实时定量 RT-PCR 的反应程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, 然后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。根据珍珠龙胆石斑鱼的 *NKA $\alpha 1$* 基因序列(未发表转录组数据)和内参基因 β -肌动蛋白序列由 Primer Premier 5.0 设计引物对(表 1)。在每个 PCR 反应结束时进行扩增产物的熔解曲线分析,

表 1 *NKA $\alpha 1$* 和内参基因 qPCR 引物序列
Tab. 1 Primers of *NKA $\alpha 1$* and internal reference gene in quantitative PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>NKA $\alpha 1$</i>	F: GGGACAAGGATATGGACGAGC
	R: TGGAGAAACCGCAAACAAC
β -actin	F: CTCTGGGCAACGGAACCTCT
	R: GTGCGTGACATCAAGGAGAAGC

以确认这些反应中存在单个 PCR 产物。用 5 个不同稀释度(每个稀释度 3 个重复)的 cDNA 样品绘制标准曲线,获得 C_T 值后运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算^[28]基因的相对表达量。

1.2.6 耗氧率的测定 仿照 Abou Anni 等^[27]的方法,测定前将实验鱼禁食 12 h,空白对照组(未放鱼)用透明塑料薄膜覆盖封闭,用便携式多参数手持监测仪(In-Situ SMARTROLL MP, 美国)分别测定初始和实验开始后 3 h 溶解氧浓度,耗氧率的计算公式为:

$RO=(O_i-O_t-O_b)V/(mt)$, 式中, RO 为耗氧率[mg/(g·h)]; O_i 、 O_t 和 O_b 分别为初始、 t 时及空白组溶解氧含量(mg/L); V 是实验水体体积(L); m 是鱼体重(g); t 为测量值之间的时间间隔(h)。

1.3 统计分析

数据表示为平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)。采用 SPSS11.0 统计分析,显著性水平为 0.05。应用单因素方差分析(ANOVA)检测各实验组鱼的血清渗透压、离子浓度、鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性、 $NKA\alpha 1$

基因表达及耗氧率的差异显著性;使用 Duncan 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼血清渗透压及离子浓度的变化

由表 2 可知,经过 10 d 的驯化,随着盐度的升高,血清渗透压也逐渐升高,盐度 6 组血清渗透压显著低于对照组($P<0.05$),但与盐度 12 组差异不显著($P>0.05$);盐度 12、18、24 组与对照组无显著差异($P>0.05$)。 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 均随盐度的增大而增大,盐度 6 组 Na^+ 、 Cl^- 浓度明显低于其他组($P<0.05$),其他各组与对照组无显著差异($P>0.05$);各盐度组 K^+ 浓度及 $[Na^+]:[Cl^-]$ 比值无显著差异($P>0.05$)。

不同盐度环境海水的渗透压和离子浓度如表 3 所示,渗透压和离子浓度(Na^+ 、 Cl^- 、 K^+)随海水盐度的升高而增大,在实验期间(10 d),所有盐度处理组均未观察到鱼类死亡。

表 2 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼幼鱼血清渗透压及离子浓度
Tab. 2 Serum osmolality and ionic concentrations of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) in different salinity

$n=3; \bar{x}\pm SD$

指标 item	盐度 salinity				
	6	12	18	24	30
血清渗透压/(mOsm/kg) serum osmolality	355.0±3.27 ^b	366.5±5.31 ^{ab}	375.5±3.68 ^a	380.0±5.94 ^a	382.0±5.71 ^a
Na^+ /(mmol/L)	149.79±4.32 ^b	156.13±3.88 ^a	158.28±5.34 ^a	158.09±3.65 ^a	154.83±3.98 ^a
Cl^- /(mmol/L)	127.35±1.36 ^b	135.97±1.39 ^a	138.18±2.01 ^a	138.40±1.88 ^a	141.01±2.25 ^a
K^+ /(mmol/L)	4.85±0.21	5.09±0.15	5.61±0.12	5.95±0.18	5.39±0.20
$[Na^+]:[Cl^-]$	1.18±0.02	1.15±0.01	1.15±0.01	1.14±0.01	1.10±0.01

注:同行不同字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$)。
Note: Different letters in the same line indicate significant difference among different salinity treatments ($P<0.05$).

表 3 不同盐度海水的渗透压和离子浓度
Tab. 3 Osmolality and ionic composition in different salinity sea water

$n=3; \bar{x}\pm SD$

指标 parameter	盐度 salinity				
	6	12	18	24	30
渗透压/(mOsm/kg) osmolality	155.5±1.82	333.0±2.58	541.0±3.39	711.5±5.98	938.5±8.65
Na^+ /(mmol/L)	72.77±3.68	175.92±2.98	285.54±7.24	370.71±5.39	465.43±8.36
Cl^- /(mmol/L)	74.22±3.21	193.09±4.35	309.59±2.56	431.36±3.98	539.80±4.25
K^+ /(mmol/L)	2.11±0.08	3.41±0.12	4.87±0.09	7.63±1.10	8.93±0.98

线性回归分析表明(图 1), 血清渗透压与环境渗透压呈线性相关($R^2=0.9051$, $P=0.01$), 回归直线与等渗线交点为等渗点渗透压 365.95 mOsm/kg, 所对应海水盐度为 12.75。

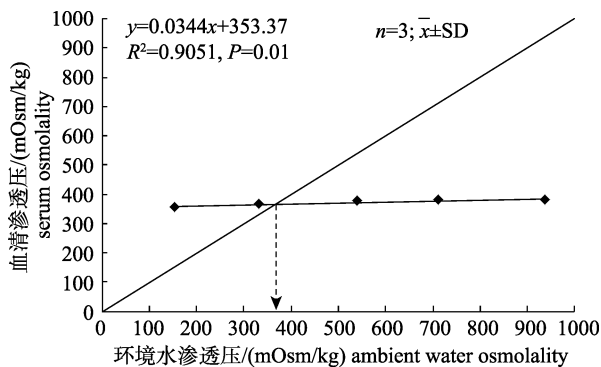


图 1 珍珠龙胆石斑鱼在不同盐度下血清渗透压和环境渗透压的关系

Fig. 1 Relationship between ambient water osmolality and serum osmolality for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)

2.2 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化

图 2 为鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性在不同盐度下随时间的变化, 在暴露 3 h 时, 盐度 6、12 组与对照组没有明显差异($P>0.05$), 盐度 18、24 组酶活显

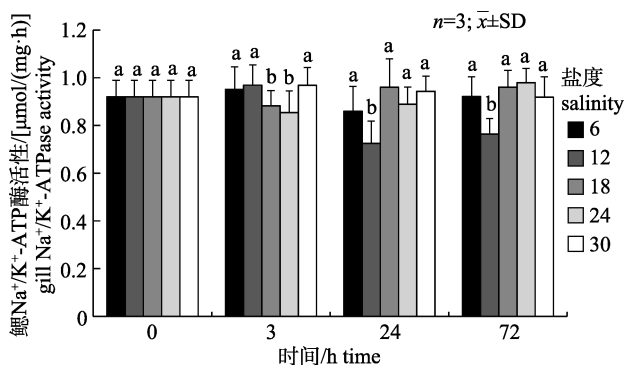


图 2 不同盐度环境下珍珠龙胆石斑鱼鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性

不同字母表示各时间点不同盐度组间具有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 2 Gill Na^+/K^+ -ATPase activity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) in different salinities. Different letters indicate significant difference among different salinity groups at the same time ($P<0.05$).

著低于对照组($P<0.05$); 在暴露 24 h、72 h 时, 盐度 12 组暴露明显下降且均显著低于对照组($P<0.05$), 盐度 6、18、24 组在暴露各时间点与对照组差异均不显著($P>0.05$).

2.3 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼鳃 $\text{NKA } \alpha 1$ 基因表达的变化

盐度变化对珍珠龙胆石斑鱼鳃 $\text{NKA } \alpha 1$ 基因表达的影响如图 3 所示, 在前 3 h 内, 盐度 6、12、24 组鳃 $\text{NKA } \alpha 1$ 基因表达均显著高于对照组($P<0.05$), 盐度 18 组与对照组差异不明显($P>0.05$); 24 h 时盐度 6 组相对表达量最小且显著低于其他组, 对照组相对表达量最高且显著高于其他组($P<0.05$), 盐度 12、24 组差异不明显($P>0.05$); 72 h 后盐度 12 组相对表达量最小, 且显著低于其他组($P<0.05$), 对照组最大且显著高于其他组($P<0.05$).

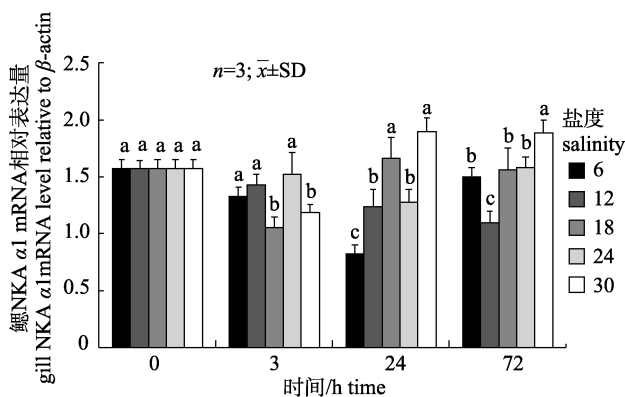


图 3 不同盐度环境下珍珠龙胆石斑鱼鳃 $\text{NKA } \alpha 1$ 基因表达量变化

不同字母表示各时间点不同盐度组间具有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 3 $\text{NKA } \alpha 1$ gene expressions of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) in different salinities. Different letters indicate significant difference among different salinity groups at the same time ($P<0.05$).

2.4 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼耗氧率的变化

盐度对耗氧率的影响如图 4 所示, 在实验第 30 天, 随盐度的增加耗氧率先减小后增加再减小, 盐度 6、24 组耗氧率显著高于其他组($P<0.05$), 盐度 12 组耗氧率最小, 但与盐度 18、30 组无显著差异($P>0.05$).

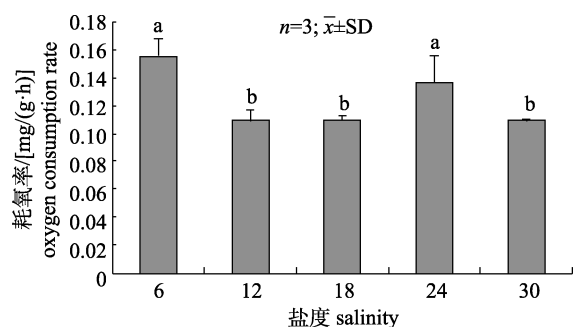


图 4 不同盐度环境珍珠龙胆石斑鱼耗氧率的变化
不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 4 Oxygen consumption rate of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) under different salinities
Different letters indicate significant difference among different salinity treatments ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 盐度对珍珠龙胆石斑鱼血清渗透压及离子浓度的影响

暴露在高渗或低渗水环境中,外界水环境和鱼体内环境之间存在着浓度梯度^[29],除非具备有效的离子和水调节机制,否则将导致血浆渗透压的变化,血浆渗透压的相对稳定可以作为渗透调节有效的标志。盐度对鱼类渗透压的影响在不同鱼类及不同盐度范围内差异很大^[1],本研究中珍珠龙胆石斑鱼在盐度 6 时血清渗透压为 355.0 mOsm/kg,显著低于对照组 382.0 mOsm/kg,但这并不一定意味着鱼体渗透压出现紊乱,而可能只是一个新的平衡信号,鱼类在不同盐度环境血浆渗透压出现波动是一种常见现象^[2],它可以使离子流出的浓度梯度最小化。因此,盐度 6 组的血清渗透压,可能仅仅为珍珠龙胆石斑鱼血清渗透压正常范围的下限。经回归分析得出珍珠龙胆石斑鱼血清等渗点渗透压为 365.95 mOsm/kg,所对应的盐度为 12.75。

Na^+ 和 Cl^- 是体液中的主要电解质,两者在渗透调节中都很关键^[30]。有研究表明外部盐度变化可能会影响血浆的酸碱平衡,当外部盐度突然增加导致血浆 Cl^- 的增加速度高于血浆 Na^+ 增加速度时,常常导致鱼类发生短暂的代谢性酸中毒,因此 $[\text{Na}^+]:[\text{Cl}^-]$ 的比值可以作为判断鱼是否适应低盐海水的一个依据^[31]。在本研究中,盐度 6 组珍珠

龙胆石斑鱼血清渗透压虽然显著低于对照组,但 $[\text{Na}^+]:[\text{Cl}^-]$ 比值无显著差异,且生长良好,无不良应激反应,这表明在 10 d 内各盐度组均完全适应低盐海水。

3.2 盐度对珍珠龙胆石斑鱼鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Na^+/K^+ -ATPase 在调节水和离子平衡方面起着关键作用, Na^+/K^+ -ATPase 活性可以作为评估鱼类渗透调节能力的重要指标,大多数广盐性硬骨鱼类的鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性随盐度变化而发生适应性改变^[32],在非最佳盐度水域养殖鱼类,生长减缓可能是由于 Na^+/K^+ -ATPase 活性增加而带来能量的大量消耗引起^[33]。盐度对广盐硬骨鱼类鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响大体分为两类模式:第 1 类,鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性和氯细胞密度随着外部盐度的增加而增加,即酶活性与外部盐度呈正相关;第 2 类,鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性随内部和外部环境之间渗透梯度差值增大而增加,即“U”形调节模式。 Na^+/K^+ -ATPase 在两类模式中发挥着不同的作用,尤其是在适应低盐环境时。在本研究中, Na^+/K^+ -ATPase 最低活性出现在盐度 12 组,即当血清渗透压和外界环境之间渗透梯度差最小时,此时离子的运输成本较小,渗透调节消耗的能量较低,更多能量用于生长,这之前关于珍珠龙胆石斑鱼在盐度 12 时生长速度最快的研究结果相符^[24]。当渗透梯度差值增大时活性也随着增加,推测鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性随盐度的变化呈“U”形,这与军曹鱼^[34]、褐牙鲈^[35]等研究相似。生活在盐度极端变化环境中的广盐硬骨鱼鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性大多具有“U”形调节模式。“U”形调节可以确保鱼在大多数时间保持相对较低的 Na^+/K^+ -ATPase 活性,同时,它具有提高 Na^+/K^+ -ATPase 活性的巨大潜力,因此能够迅速适应低盐和高盐环境。

3.3 盐度对珍珠龙胆石斑鱼 *NKA α1* 基因表达的影响

Na^+/K^+ -ATPase 是一种跨膜蛋白,它将细胞外 2 个 K^+ 交换为细胞内 3 个 Na^+ ,同时伴随 1 个 ATP 分子水解,它不仅对维持细胞内稳态至关重要,而且为包括鱼鳃在内的许多运输系统提供动力^[36]。*NKA α1* 亚基表达量的改变可能是广盐性鱼类适应

环境盐度的关键因素^[37]。有研究表明,从淡水转移到海水能提高欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[38]、褐鳟(*Salmo trutta*)^[39]鳃 *NKA α1* mRNA 的表达水平。盐度胁迫下 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化可能是由 *NKA α1* mRNA 丰度的改变^[40-41]或蛋白质表达变化^[42]引起的,本实验中,在 3~24 h 内 Na^+/K^+ -ATPase 活性与 *NKA α1* 基因的表达并不一致,可能为初始调整阶段;72 h 后珍珠龙胆石斑鱼鳃 *NKA α1* mRNA 的表达水平与 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化趋势相似,为适应阶段,这表明盐度变化能引起 *NKA α1* 在鳃组织中的表达差异。*NKA α1* 表达量的改变可能是影响 Na^+/K^+ -ATPase 活性的重要因素,在珍珠龙胆石斑鱼渗透调控及盐度适应中起重要作用。

3.4 盐度对珍珠龙胆石斑鱼耗氧率的影响

盐度变化能通过诱导代谢改变来满足渗透调节能量的需求,有研究认为渗透调节的成本与代谢率成正比^[43],即使代谢率很低的物种,渗透调节所消耗能量也占总能量的 20%~50%,有的物种甚至达到 54%~68%^[1]。许多研究通过不同盐度下耗氧率的变化来估算鱼类渗透压调节成本,但研究结果却并不相同,按照渗透调节理论,鱼类在接近等渗点附近时,调节渗透压消耗能量最低,耗氧率最低,如尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[44]、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[45]、锯盖鱼(*Centropomus undecimalis*)^[46]等;但也有研究表明有些鱼类在其最常出现的自然栖息地耗氧率最低,如河鲈(*Perca fluviatilis*)^[47]、底鳉(*Fundulus heteroclitus*)^[48]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[49]等;也有少数研究报道在一定盐度范围内,耗氧率没有显著变化,银鲑幼鱼(*Oncorhynchus kisutch*)分别在淡水、等渗水(盐度 10)及海水(盐度 28)中适应 6 周后,其耗氧率无显著差异^[50]。鱼类对水环境盐度的选择具有偏好性, Morgan 等^[51]认为鱼类某一阶段在最常出现的栖息地环境中代谢率最低,珍珠龙胆石斑鱼养殖栖息地盐度一般在 30 左右,在本研究中,珍珠龙胆石斑鱼耗氧率在等渗点及常见栖息地盐度附近时耗氧率较低,这说明耗氧率除了受离子渗透调节的影响,还可能与鱼类自然栖息地及生活史阶段有关。

本实验通过对低盐养殖过程中血清渗透压、离子浓度、 Na^+/K^+ -ATPase 活性、*NKA α1* 基因表达与耗氧率综合分析,发现珍珠龙胆石斑鱼能够完全适应 6~30 盐度;盐度 30 组是珍珠龙胆石斑鱼一般养殖栖息地盐度,与接近等渗点盐度 12 组相比,尽管耗氧率相差不大,但盐度 30 组鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性却高于盐度 12 组,可能是盐度 30 组在不增加耗氧率的情况下,将一部分能量从其他用途转向离子渗透调节,这也表明盐度 12 比较适合珍珠龙胆石斑鱼的快速生长。

参考文献:

- [1] Bœuf G, Payan P. How should salinity influence fish growth? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2001, 130(4): 411-423.
- [2] Nordlie F G. Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: A review[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2009, 19(4): 481-564.
- [3] Marshall W S, Bryson S E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: An inclusive model of a multi-functional cell[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 119(1): 97-106.
- [4] Stewart H A, Noakes D L G, Cogliati K M, et al. Salinity effects on plasma ion levels, cortisol, and osmolality in Chinook salmon following lethal sampling[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2016, 192: 38-43.
- [5] Zhang Y T, Huang S, Qiu H T, et al. Optimal salinity for rearing Chinese black sleeper (*Bostrychus sinensis*) fry[J]. Aquaculture, 2017, 476: 37-43.
- [6] Lisboa V, Barcarolli I F, Sampaio L A, et al. Acclimation of juvenile *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Mugiliformes: Mugilidae) to different environmental salinities[J]. Neotropical Ichthyology, 2015, 13(3): 591-598.
- [7] Bunlipatanon P, U-taynapun K. Growth performance and disease resistance against *Vibrio vulnificus* infection of novel hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*×*Epinephelus fuscoguttatus*)[J]. Aquaculture research, 2017, 48(4): 1711-1723.
- [8] Ch'ng C L, Senoo S. Egg and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*×giant grouper *E. lanceolatus*[J]. Aquaculture Science, 2008, 56(4): 505-512.
- [9] Chen C, Kong X D, Li Y L, et al. Embryonic and morphological development in the larva, juvenile and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 135-144. [陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交

- 子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 135-144.]
- [10] Kubota S, Longloy A, Singhabun A, et al. Quantitative trait locus mapping of growth-related traits in inter-specific F_1 hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) in a tropical climate[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(12): 5913-5927.
- [11] Liu Y, Wang J Y, Li B S, et al. Effects of dietary cobalt methionine on growth performance, mineral deposition, and hepatic enzyme activities in juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 574-583. [刘云, 王际英, 李宝山, 等. 蛋氨酸钴对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、矿物元素沉积及肝脏酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 574-583.]
- [12] Wu M J, Lu S D, Wu X Y, et al. Effects of dietary amino acid patterns on growth, feed utilization and hepatic IGF-I, TOR gene expression levels of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles[J]. Aquaculture, 2017, 468: 508-514.
- [13] Luo Y, Wu X Y, Li W F, et al. Effects of different corn starch levels on growth, protein input, and feed utilization of juvenile hybrid grouper (male *Epinephelus lanceolatus* × female *E. fuscoguttatus*)[J]. North American Journal of Aquaculture, 2016, 78(2): 168-173.
- [14] Mohd Faudzi N, Yong A S K, Shapawi R, et al. Soy protein concentrate as an alternative in replacement of fish meal in the feeds of hybrid grouper, brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) × giant grouper (*E. lanceolatus*) juvenile [J]. Aquaculture Research, 2018, 49(1): 431-441.
- [15] He R P, Feng J, Tian X L, et al. Effects of dietary supplementation of probiotics on the growth, activities of digestive and non-specific immune enzymes in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(12): 5782-5790.
- [16] Liu X C, Shi H R, He Q, et al. Effect of starvation and refeeding on growth, gut microbiota and non-specific immunity in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus* ♂) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 182-193.
- [17] Chen Y Y, Cai S H, Jian J C. Protection against *Vibrio alginolyticus* in pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*) immunized with an acfA-deletion live attenuated vaccine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 875-881.
- [18] Xu L W, Liu X H, Zhang J Y, et al. Outbreak of enteric microsporidiosis of hatchery-bred juvenile groupers, *Epinephelus* spp., associated with a new intranuclear microsporidian in China[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(2): 183-189.
- [19] De M, Ghaffar M A, Bakar Y, et al. Effect of temperature and diet on growth and gastric emptying time of the hybrid, *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂[J]. Aquaculture Reports, 2016, 4: 118-124.
- [20] De M, Ghaffar M A, Bakar Y, et al. Optimum temperature for the growth form of Tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀) × Giant grouper (*E. lanceolatus* ♂) hybrid[J]. Sains Malaysiana, 2016, 45(4): 541-549.
- [21] Qiu D G, Huang Z C, Zheng L Y, et al. Effects of temperature on respiration and excretion by different sizes of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 295-305. [仇登高, 黄种持, 郑乐云, 等. 温度对不同规格珍珠龙胆石斑鱼(棕点石斑鱼 ♀ × 鞍带石斑鱼 ♂)呼吸和排泄的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 295-305.]
- [22] Noor N M, Das S K, Cob Z C, et al. Effects of salinities and diets on growth of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2018, 18(9): 1045-1051.
- [23] Othman A R, Kawamura G, Senoo S, et al. Effects of different salinities on growth, feeding performance and plasma cortisol level in hybrid TGGG (tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*) juveniles[J]. International Research Journal of Biological Sciences, 2015, 4(3): 15-20.
- [24] Liu L L, Luo M, Chen F X, et al. Effects of salinity on growth, and gill and kidney histological structures of juvenile pearl gentian grouper[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(4): 505-510. [刘龙龙, 罗鸣, 陈傅晓, 等. 盐度对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长及鳃肾组织学结构的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 505-510.]
- [25] Liang H F, Huang D K, Wu Y H, et al. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(2): 30-34. [梁华芳, 黄东科, 吴耀华, 等. 温度和盐度对龙虎斑耗氧率和排氨率的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 30-34.]
- [26] Chu I K C, Nurhamizah B, Dee'Ana Z N, et al. Effect of salinity on embryonic development and hatching of hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus* [J]. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 2016, 9(6): 1278-1285.
- [27] Abou Anni I S, Bianchini A, Barcarolli I F, et al. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832[J]. Aquaculture, 2016, 455: 63-72.
- [28] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000, 46(1-2): 69-81.
- [29] Urbina M A, Glover C N. Effect of salinity on osmoregulation, metabolism and nitrogen excretion in the amphipro-

- mous fish, inanga (*Galaxias maculatus*)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2015, 473: 7-15.
- [30] Kaneko T, Watanabe S, Lee K M. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts[J]. Aqua-BioScience Monographs, 2008, 1(1): 1-62.
- [31] Jensen M K, Madsen S S, Kristiansen K. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na^+ , K^+ -ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.)(J). The Journal of Experimental Zoology, 1998, 282(3): 290-300.
- [32] Velan A, Hulata G, Ron M, et al. Comparative time-course study on pituitary and branchial response to salinity challenge in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Nile tilapia (*O. niloticus*)(J). Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(4): 863-873.
- [33] Sampaio L A, Bianchini A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*(J). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 269(2): 187-196.
- [34] Xu L W, Liu G F, Wang R X, et al. Effects of abrupt salinity stress on osmoregulation of juvenile *Rachycentron canadum* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(7): 1596-1600. [徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 等. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(7): 1596-1600.]
- [35] Pan L Q, Tang X M, Liu H Y, et al. Effects of salinity on plasma osmolality and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*(J). Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(1): 1-6. [潘鲁青, 唐贤明, 刘泓宇, 等. 盐度对褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼血浆渗透压和鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(1): 1-6.]
- [36] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 148(3): 479-497.
- [37] Tang C H, Chiu Y H, Tsai S C, et al. Relative changes in the abundance of branchial Na^+/K^+ -ATPase α -isoform-like proteins in marine euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) acclimated to environments of different salinities[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 2009, 311A(7): 522-530.
- [38] Cutler C P, Sanders I L, Hazon N, et al. Primary sequence, tissue specificity and expression of the Na^+ , K^+ -ATPase α 1 subunit in the European eel (*Anguilla anguilla*)(J). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 111(4): 567-573.
- [39] Madsen S S, Jensen M K, Nhr J, et al. Expression of Na^+/K^+ -ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: In vivo modulation by hormones and seawater[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1995, 269(6): R1339-R1345.
- [40] Scott G R, Richards J G, Forbush B, et al. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2004, 287(2): C300-C309.
- [41] Seidelin M, Madsen S S, Blenstrup H, et al. Time-course changes in the expression of Na^+ , K^+ -ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2000, 73(4): 446-453.
- [42] Tipsmark C K, Madsen S S, Seidelin M, et al. Dynamics of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter and Na^+ , K^+ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*)(J). Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(2): 106-118.
- [43] Rao G M M. Oxygen consumption of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to activity and salinity[J]. Canadian Journal of Zoology, 1968, 46(4): 781-786.
- [44] Farmer G J, Beamish F W H. Oxygen consumption of *Tilapia nilotica* in relation to swimming speed and salinity[J]. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1969, 26(11): 2807-2821.
- [45] Gaumet F, Boeuf G, Severe A, et al. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot[J]. Journal of Fish Biology, 1995, 47(5): 865-876.
- [46] Gracia-Lopez V, Rosas-Vazquez C, Brito-Perez R. Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*(J). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 145(3): 340-345.
- [47] Ern R, Huang D T T, Cong N V, et al. Effect of salinity on oxygen consumption in fishes: a review[J]. Journal of Fish Biology, 2014, 84(4): 1210-1220.
- [48] Kidder III G W, Petersen C W, Preston R L. Energetics of osmoregulation: I. Oxygen consumption by *Fundulus heteroclitus*(J). Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2006, 305(4): 309-317.
- [49] Iwama G K, Takemura A, Takano K. Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water[J]. Journal of Fish Biology, 1997, 51(5): 886-894.
- [50] Morgan J D, Iwama G K. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na^+ , K^+ -ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon[J]. Journal of Fish Biology, 1998, 53(5): 1110-1119.
- [51] Morgan J D, Iwama G K. Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)(J). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1991, 48(11): 2083-2094.

Influence of salinity on osmoregulation and oxygen consumption rate in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)

LIU Longlong^{1,2}, LUO Ming^{1,2}, CHEN Fuxiao^{1,2}, TAN Wei^{1,2}, LIU Jinye^{1,2}, WANG Yongbo^{1,2}, FU Shuyuan^{1,2}, LIU Hongtao^{1,3}

1. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China;

2. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Ministry of Education; Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;

3. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China

Abstract: The effects of salinity on osmoregulation, gill Na^+/K^+ -ATPase activity, gene expression, and oxygen consumption rate of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) were studied. In experiment 1, juvenile hybrid groupers with average weight of (162.5 ± 12.1) g were exposed to different salinities (6, 12, 18, 24, 30) for 10 days. Serum osmolality and ion (Na^+ , Cl^- , and K^+) concentrations were determined. The results showed that serum osmolality and Na^+ , Cl^- , and K^+ concentrations increased with increasing salinity. Serum osmolality and Na^+ and Cl^- from salinity group 6 were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the $[\text{Na}^+]:[\text{Cl}^-]$ ratio between the groups ($P > 0.05$). The isosmotic point was calculated as 365.95 mOsm/kg, corresponding to the osmolality of the ambient water at a salinity of 12.75. In experiment 2, juvenile hybrid groupers with average weight of (26.4 ± 2.7) g were reared at different salinities (6, 12, 18, 24, 30) for 30 d, and the activity and expression of gill Na^+/K^+ -ATPase were measured at 0 h, 3 h, 24 h, and 72 h, as well as the oxygen consumption rate at 30 d. The results showed that the activity change curve of gill Na^+/K^+ -ATPase was U-shaped as salinity increased, and at 3 h, the activity was significantly the lowest at salinity 18 and 24 ($P < 0.05$). After 24 h and 72 h, the activity of salinity 12 was significantly lower than all other groups ($P < 0.05$). The expression levels of the gill *NKA α 1* gene fluctuated greatly, beginning with a decrease and then increasing after 72 h, which was consistent with the enzyme activity. Gene expression in salinity 12 group was significantly lower than that in the other groups ($P < 0.05$). With increasing salinity, the oxygen consumption rate initially decreased, followed by an increase, and then again a decrease. Oxygen consumption was highest in salinity group 6 and was significantly higher than that in salinity groups 12, 18, and 30 ($P < 0.05$). Our findings indicate that the juvenile hybrid grouper can adapt to 6–30 salinity changes well. Near the isosmotic point, Na^+/K^+ -ATPase activity, oxygen consumption rate, and the relative expression of gill *NKA α 1* were lower, suggesting that growth was more favorable near this point. However, the activity of Na^+/K^+ -ATPase was not completely consistent with the oxygen consumption rate in the experiment, indicating the oxygen consumption rate may be related to its life history stage except for regulation of ion permeability.

Key words: hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀); juvenile; salinity; osmoregulation; Na^+/K^+ -ATPase; oxygen consumption rate

Corresponding author: LUO Ming. E-mail: hothawk@yeah.net