

DOI: 10.12264/JFSC2024-0160

盐碱胁迫对罗氏沼虾存活、酶活性及转录表达的影响

章鑫^{1,2}, 邹松保^{2,3}, 高强^{2,3}, 周聃², 倪蒙², 刘梅², 张明磊⁴, 采克俊¹, 原居林^{1,2}

1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000;

2. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江 湖州 313001;

3. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

4. 山东省淡水渔业研究院, 山东 济南 250013

摘要: 盐碱水中的高碳酸盐碱度是影响水生甲壳动物生存的重要因素之一。为探讨盐碱胁迫对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 存活、酶活性及基因表达的影响, 本研究摸索了盐度和碳酸盐碱度对罗氏沼虾苗的半致死浓度(LC₅₀)以及最低有影响浓度(LOEC), 探究了盐碱胁迫对罗氏沼虾幼苗鳃和肝胰腺中渗透调节和抗氧化相关酶活性以及基因表达的影响。结果显示, 盐度对罗氏沼虾苗的 96 h-LC₅₀ 为 27.1, 96 h-LOEC 为 16.5; 碱度对罗氏沼虾苗的 96 h-LC₅₀ 为 230.7 mg/L, 96 h-LOEC 为 96.6 mg/L; 并且盐碱交互作用表现出协同效应。罗氏沼虾幼苗鳃和肝胰腺中碱性磷酸酶(AKP)和钠钾腺苷三磷酸酶(Na⁺-K⁺-ATPase)活性随胁迫时间延长呈先降后升的趋势, 鳃中钙腺苷三磷酸酶(Ca²⁺-ATPase)则呈现相反的变化趋势; 肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)活性在胁迫中期(72 h 和 120 h)达到最低水平, 而过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽 S 转移酶(GST)活性增加, 碳酸酐酶(CA)活性在胁迫过程中呈现先降后升的趋势, 但盐碱胁迫程度所产生的影响差异不显著; 转录组分析揭示鳃和肝胰腺对盐碱胁迫的响应不同, 鳃组织中涉及细胞外空间/区域(如四次跨膜蛋白)、细胞对外源刺激响应(脂肪醛脱氢酶)、次级活性跨膜转运蛋白如相关基因在盐碱胁迫下表达上调; 盐碱胁迫抑制了肝胰腺的细胞外空间/区域相关基因表达, 但促进了碳水化合物跨膜转运蛋白[如类脂质运载蛋白]相关基因表达上调, 这表明罗氏沼虾可能通过协同的渗透压调节策略(包括增强鳃的离子转运和提高肝胰腺的碳水化合物跨膜转运)来适应盐碱环境。本研究结果可为揭示罗氏沼虾在盐碱环境中的适应机制提供科学依据。

关键词: 罗氏沼虾; 盐碱胁迫; 酶活性; 差异表达基因; 渗透压调节; 离子转运; 盐碱水

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)08-0883-14

盐碱水广泛分布于世界各地, 具有高盐度、高碱度、高 pH、主要离子比例失衡、缓冲性能差等特点。大多数水生动物在盐碱水中难以生长繁殖, 使得盐碱水域成为低产水资源, 极大地限制了盐碱水资源的利用^[1]。我国约有 9913.3 万 hm² 盐碱地和约 4600 万 hm² 盐碱水域, 遍及 19 个省、市和自治区, 主要集中在东北、华北、西北内陆

地区以及东部沿海地带。目前, 已有 10 余种适合盐碱水养殖的水产种类被发现, 包括凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、异育银鲫(*Carassius auratus*)、大鳞鲫(*Luciobarbus capito*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和青蛤(*Cyclina sinensis*)等^[2-6]。为了有效利用盐碱水资源, 迫切需要培育更多的耐盐碱养

收稿日期: 2024-05-31; 修订日期: 2024-07-09.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2401005); 浙江省重大技术协同推广项目(2022XTTGSC02); 浙江省属科研院所专项(2024YSZX01, 2024YSZX04).

作者简介: 章鑫(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为盐碱水渔业. E-mail: Sanjin9930@163.com

通信作者: 原居林, 博士, 研究员, 研究方向为淡水养殖环境修复及健康养殖技术研究. E-mail: yuanjulin1982@163.com

殖品种,并深入研究水生生物对盐碱胁迫的适应性机制。

盐碱胁迫显著影响水生生物的生长发育、组织功能、生理代谢和基因表达^[7]。研究表明,低盐度、高碱度以及盐碱复合胁迫均会影响脊尾白虾的生长速度和卵巢发育^[8];高盐度胁迫会导致凡纳滨对虾肝小管细胞坏死,仔虾存活率下降,蜕皮周期延长,进而影响其生长速率^[9-10]。在碱度胁迫下,脊尾白虾鳃柱细胞和肾细胞的结构发生显著变化^[11],凡纳滨对虾鳃中离子转运相关酶活性发生显著改变,鳃和肝胰腺中抗氧化相关酶活性显著降低^[12]。盐度和碱度胁迫均会导致中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[13]、凡纳滨对虾^[14]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[15]氧化应激和免疫功能受损。研究表明凡纳滨对虾可通过代谢和离子调控相关基因的高表达来应对盐度和碱度胁迫^[12]。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)由于其体型大、生长快、养殖周期短、抗病性好等优势而具有广泛的全球市场^[16-17]。目前的研究主要集中于盐度或碱度对罗氏沼虾的生长、生理与基因表达等方面的影响^[10,18-20],鲜见关于罗氏沼虾对盐碱交互胁迫适应机制的研究报道。因此,本研究拟确定盐碱胁迫下罗氏沼虾的半致死浓度(lethal concentration 50, 96 h-LC₅₀)和最低有影响浓度(lowest observed effect concentration, 96 h-LOEC),通过对鳃和肝胰腺酶活定量和转录组测序分析,从生理和分子层面揭示罗氏沼虾对盐碱环境的适应机制。

1 材料与方法

1.1 盐碱胁迫对罗氏沼虾的 96 h-LC₅₀和 96 h-LOEC

通过添加氯化钠(NaCl)和碳酸氢钠(NaHCO₃)开展盐度和碱度的单因素胁迫实验,分别设置盐度(0、10、15、20、25)和碱度(60、140、180、240、380、440 mg/L)浓度梯度,各组 3 个平行。碱度测定采用酸滴定法(SL 83—1994)。分别以 0 盐度和 60 mg/L 碱度作为对照组。实验初始每组各放入 100 尾幼苗(体长 0.7~1 cm),记为 N_0 ,水温(26±2)℃。

96 h 后记录各组罗氏沼虾的个体死亡数,记为 N_1 ,计算死亡率(mortality)= $N_1/N_0 \times 100\%$ 。

根据盐碱单因素胁迫实验得到的罗氏沼虾 96 h-LC₅₀和 96 h-LOEC,设置 3×3 的盐碱交互胁迫实验(盐度:2、5、7;碱度:100、230、360 mg/L),各组 3 个平行,每个平行放入 100 尾虾,胁迫 96 h。其他条件同单因素胁迫实验。

1.2 酶活性测定

选用养殖 40 d 的幼虾(体长 3~5 cm,体重 3~4 g)投放于 15 L 水的玻璃缸中。根据 1.1 得到罗氏沼虾幼苗的半致死浓度,设置对照组(60 mg/L)、低浓度组(120 mg/L)、高浓度组(220 mg/L) 3 个碱度梯度,盐度均为 5,每组设 3 个平行,曝气 24 h 后各组投入 30 尾幼虾。胁迫 24、72、120 和 168 h 后各组分别取 3 尾,分离鳃和肝胰腺组织,液氮冷冻后置于-80℃冰箱中保存以备测定。将样品和 0.9%生理盐水按重量体积比 1:9 匀浆成 10%组织匀浆,之后离心 10 min (4℃, 3000 r/min),取上清进行酶活性测定。其中鳃组织测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、钠钾腺苷三磷酸酶(Na⁺-K⁺-adenosine triphosphatase, Na⁺-K⁺-ATPase)以及钙腺苷三磷酸酶(Ca²⁺-adenosine triphosphatase, Ca²⁺-ATPase)活性、肝胰腺组织测定碱性磷酸酶、钠钾腺苷三磷酸酶、钙腺苷三磷酸酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase, GST)。总蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝蛋白法,标准化各项酶活数据,以便样品间的比较。以上指标均采用相应试剂盒测定(南京建成有限公司,中国),并在多功能酶标仪(Synergy 2, BioTek, 美国)检测吸光度值。

1.3 RNA 提取、高通量测序及数据分析

重复采集 1.2 各组 168 h 的鳃和肝胰腺样品用于转录组测序。利用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen)提取总 RNA,用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific)完成浓度及纯度和检测,并用琼脂糖电泳进行完整性检测。使用 Oligo (dT)磁珠富集 RNA 中带有 polyA 尾的 mRNA,随后采用离子打断的方式将 mRNA 随机打断为 300 bp 左右的片

段。以片段化的 mRNA 为模板, 利用随机寡核苷酸为引物, 逆转录合成 cDNA。利用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 构建的文库利用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 2100, USA)完成质量检测。文库的双端测序(PE150)在 Illumina NovaSeq 测序平台上完成(派森诺, 上海)。

原始数据的控制用 fastp (v0.22.0)去除序列接头、低质量(QV<20)、过短(长度<50 bp)的序列^[21]。高质量的干净序列利用 Trinity (v2.15.1)软件拼接得到转录本, 将多样本组装的转录本进行聚类生成 unigenes 基因集^[22]。通过对比 NR、GO、KEGG、eggNOG、Swiss-Prot、Pfam 数据库完成 unigenes 的基因功能注释。利用 RSEM (v2.15)计算基因表达量 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million), DESeq (v1.38.3)软件进行组间的差异表达分析^[23], 以表达差异倍数 $|\text{Log}_2\text{Fold Change}|>1$ 和显著性 $P<0.05$ 为阈值筛选差异表达基因。利用 topGO (v2.50.0)查找差异表达基因显著富集的 GO term^[24]; 使用 clusterProfiler (v4.6.0)完成 KEGG 通路富集分析^[25], 数据可视化使用 R (v4.1.2)完成^[26]。

1.4 数据处理

实验数据采用 Origin 2021 软件处理, 对死亡率和浓度对数进行回归分析并采用一次函数进行拟合, 根据一次函数方程计算最低有影响浓度和半致死浓度。酶活性测定结果以均数±标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。统计分析在 SPSS 27.0 (IBM, 美国)软件完成, 利用单因素方差分析(ANOVA)结合 Duncan 多重比较检验组间的差异显著性($P<0.05$)。使用 GraphPad Prism (v9.5)完成图形可视化。

2 结果与分析

2.1 盐碱胁迫对罗氏沼虾的 96 h-LC50 和 96 h-LOEC

罗氏沼虾在 96 h 内受到不同盐碱浓度的单因素急性胁迫实验结果如表 1 所示。盐度胁迫回归方程为 $y=233.7x-284.7$ ($R^2=0.98$), 计算得出盐度对罗氏沼虾幼苗的 96 h-LC₅₀=27.1 (95%置信区间: 25.2~29.6); 96 h-LOEC=16.5 (95%置信区间: 12.4~20.7)。碱度胁迫回归方程为 $y=132.3x-262.7$ ($R^2=0.99$), 计算得出碱度对罗氏沼虾幼苗的 96 h-LC₅₀=230.7 mg/L (95%置信区间: 182.6~299.9 mg/L); 96 h-LOEC=96.6 mg/L (95%置信区间: 42.6~135.2 mg/L)(图 1)。

盐碱交互胁迫下罗氏沼虾 96 h 的死亡率如表 2 所示。罗氏沼虾的死亡率与盐碱交互的浓度呈正相关。根据表 2 计算碱度为 100、230、360 mg/L 时, 罗氏沼虾幼苗的 96 h 半致死盐度分别为 9.2、5.2、0.8。对数据进行二次多项式回归分析, 设盐度为 x_1 , 碱度为 x_2 , 死亡率为 y , 分析得出 96 h 的回归模型: $y=4.770-3.034x_1+1.053x_1^2+0.045x_2+0.002x_1x_2$ ($R^2>0.95, P<0.05$)。盐度和碱度交互项系数为正数, 盐碱交互对罗氏沼虾的胁迫表现为协同作用。

2.2 盐碱胁迫对罗氏沼虾鳃酶活的影响

罗氏沼虾鳃中免疫酶及离子转运酶活性变化如图 2 所示。罗氏沼虾鳃 AKP 活性在处理期间波动幅度较大(88.52~10788.57 U/L)。同一时期不同浓度组间差异不显著, 实验组和对照组 AKP 活性均随时间显著降低($P<0.05$), 在 120 h 含量最低(88.52~151.89 U/L), 在 168 h 呈现回升的趋势(图 2a)。而 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性呈现先降后升的趋

表 1 盐度和碱度对罗氏沼虾的 96 h 急性胁迫
Tab. 1 96 h salt-alkaline stress on *Macrobrachium rosenbergii*

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

盐度 salinity	$\log_{10}(\text{盐度})$ $\log_{10}(\text{salinity})$	死亡率/% mortality	碱度/(mg/L) alkalinity	$\log_{10}(\text{碱度})$ $\log_{10}(\text{alkalinity})$	死亡率/% mortality
0		4.00	60	1.778	6.33
10	1.000	1.33	140	2.146	7.33
15	1.176	1.00	180	2.255	20.67
20	1.301	7.33	240	2.380	47.00
25	1.398	45.33	380	2.580	84.33
			440	2.644	100.00

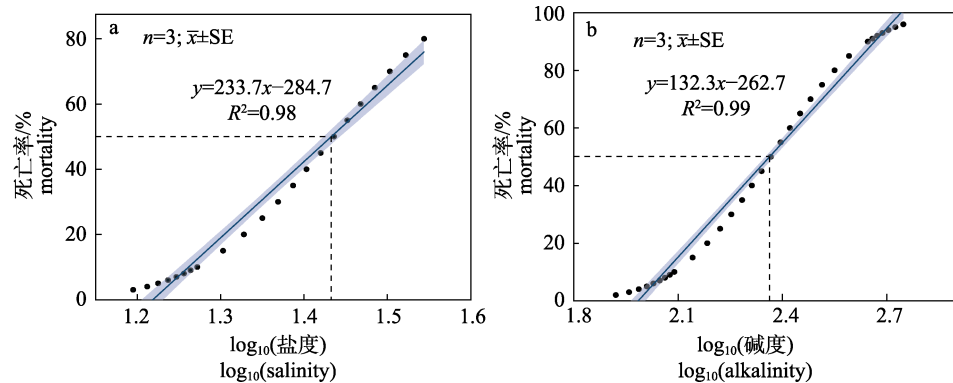


图 1 对数转化的盐碱浓度与罗氏沼虾死亡率的回归分析
辅助虚线标注了半致死率所对应的浓度。

Fig. 1 Regression analysis between log-transformed salt-alkaline concentration and mortality of *Macrobrachium rosenbergii*
The auxiliary dashed line indicates the concentration corresponding to the half lethal rate.

表 2 盐碱交互对罗氏沼虾的 96 h 急性胁迫
Tab. 2 96 h salt-alkali interactive stress on *Macrobrachium rosenbergii*

n=3; $\bar{x} \pm \text{SD}$		
盐度 salinity	碱度/(mg/L) alkalinity	死亡率/% mortality
0	60	4.67
2	100	18.00
2	230	30.67
2	360	62.33
5	100	25.33
5	230	39.33
5	360	71.67
7	100	42.33
7	230	68.00
7	360	99.67

势, 实验组在 120 h 含量最低(1.17~2.60 U/mg prot)。同一时期不同浓度组间的比较显示: 低浓度组

(120 mg/L)在 72 h 显著高于其他两组($P<0.05$), 高浓度组(220 mg/L)在 120 h 显著低于其他两组($P<0.05$, 图 2b)。鳃 Ca^{2+} -ATPase 活性在时间上呈现单峰型的响应规律: 初始含量最低(0.03~0.06 U/mgprot), 在 120 h 达到最高水平(1.66~2.48 U/mgprot), 随后在 168 h 显著降低($P<0.05$)。各时期不同浓度组间的差异不显著($P>0.05$), 但在 72 h 和 120 h 高浓度组的含量略高于其他两组(图 2c)。

2.3 盐碱胁迫对罗氏沼虾肝胰腺酶活的影响

罗氏沼虾肝胰腺 AKP 最高含量远低于鳃(3391.37 U/L vs. 10788.57 U/L), AKP 在两个组织都呈现先降后升的 U 形规律, 肝胰腺在 72 h 时 AKP 含量最低(111.37~329.51 U/L)。同一时期不同浓度组间差异不显著, 除 72 h 低浓度组含量显著高于其他两组($P<0.05$, 图 3a)。盐碱胁迫下肝胰腺 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ (1.31~6.71 U/mgprot)和 $\text{Ca}^{2+}\text{-}$

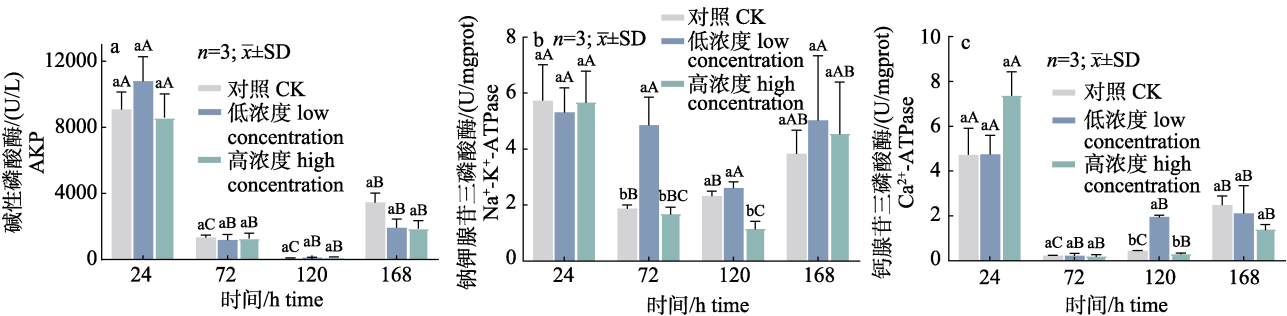


图 2 盐碱胁迫下罗氏沼虾鳃生理参数的变化

不同小写字母表示同一时间不同组间的显著差异($P<0.05$); 不同大写字母表示同一碱度在时间上的显著差异($P<0.05$)。
Fig. 2 Physiological responses in gill of *Macrobrachium rosenbergii* under salt-alkaline stress
Different lowercase letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$);
Different capital letters indicate significant differences among different times in the same group ($P<0.05$).

ATPase (0.22~7.41 U/mgprot)的含量相当, 且均在处理中期(72 h 和 120 h)含量较低。同一时期的组间比较显示: 高浓度组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 在 72 h 显著升高, 而低浓度组 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 在 120 h 显著升高($P<0.05$, 图 3b、3c)。

肝胰腺抗氧化相关酶对盐碱胁迫的响应不同: (1) SOD 活性随时间先降后升(36.96~268.27 U/mgprot), 对照组在 72 h 活性最低, 实验组在 120 h 活性最低($P<0.05$), 实验组和对照组均在 168 h 活性最高, 平均含量变化幅度为 4.3~5.1 倍; 同一时期组间比

较显示, 高浓度组在 72 h 显著高于其他两组; 低浓度组在 120 h 显著高于其他两组(图 3d)。(2) CAT (7.73~21.83 U/mgprot)和 GST (6.54~47.20 U/mgprot)在时间上的波动较小, 高浓度组在 72 h 的含量显著高于其他两组($P<0.05$, 图 3e、3f)。

CA 活性在初始最高(约 115 ng/mL), 在 72 h 和 120 h 显著降低(约 22%~27%), 末期 168 h 活性回升至初始的 88%但仍显著低于初始水平($P<0.05$)。同一时期的组间比较无显著差异, 除 72 h 的低浓度组 CA 含量显著高于其他两组($P<0.05$, 图 3g)。

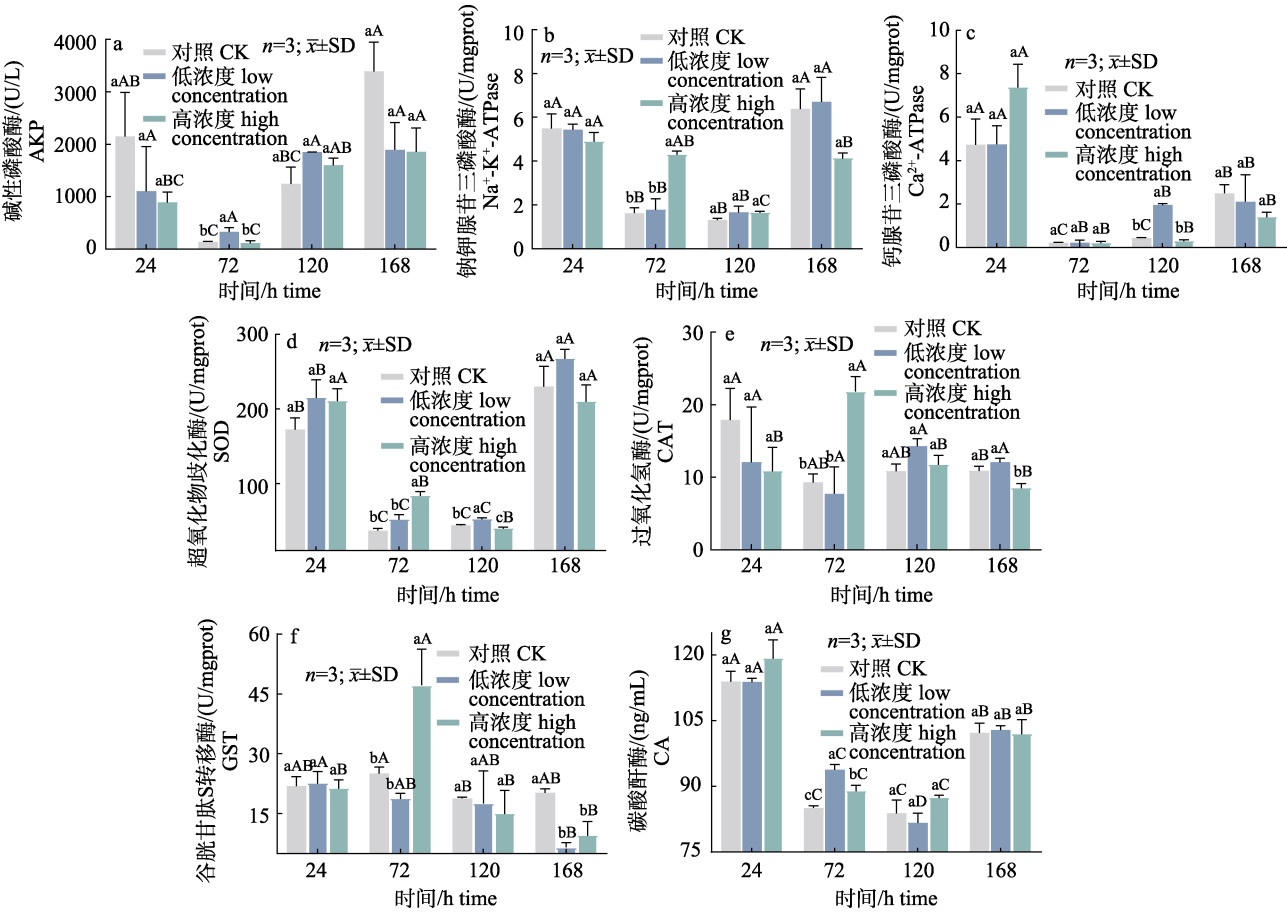


图 3 盐碱胁迫下罗氏沼虾肝胰腺生理参数的变化

不同小写字母表示同一时间不同组间的显著差异($P<0.05$); 不同大写字母表示同一碱度在时间上的显著差异($P<0.05$)。

Fig. 3 Physiological responses in hepatopancreas of *Macrobrachium rosenbergii* under salt-alkaline stress
Different lowercase letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P<0.05$);
Different capital letters indicate significant differences among different times in the same group ($P<0.05$).

2.4 盐碱胁迫后罗氏沼虾转录组分析

2.4.1 转录组测序概况 对鳃和肝胰腺共测序 18 个转录组, 经过质控后分别共获得 69.54 Gb 和 67.19 Gb 的干净序列, 碱基 Q30 均大于 96%, 有

效数据和有效碱基的比例均大于 98% (表 3), 说明测序质量符合生物信息学分析要求。表达分析揭示盐碱胁迫后罗氏沼虾鳃和肝胰腺各组中多数基因(>55%)的 FPKM 值范围在 0.1~10 (图 4a~4d),

表明鳃和肝胰腺在不同浓度组之间的分布模式相似, 以及不同浓度组之间测序覆盖率偏差较小。主成分分析(principal component analysis, PCA)表明, 鳃的高浓度组内相似性较高, 3 个不同浓度组间基因表达模式的区分不明显; 肝胰腺 3 个浓度组内样本分布较为离散, 不同浓度组间基因表达模式的区分不明显(图 4c、4f)。

2.4.2 差异表达基因分析 鳃和肝胰腺盐碱胁迫后分别产生 2622 和 2922 个去冗余的差异表达基因(DEGs), 上调基因高于下调基因数量(图 5a、5c)。差异表达基因数在鳃和肝胰腺的组间分布规律不同。鳃中高浓度组的表达上调(993)和下调(884)

基因数量约为其他两组的 3 倍; 肝胰腺中高浓度组的差异表达基因略高于低浓度组(上调: 621 vs 499; 下调: 498 vs 437), 但两者均低于低-高浓度的上调(864)和下调(746)基因数目。MA 图(M-versus-A plot)在表达量和差异倍数上突显上调和下调差异基因的分布, DEGs 数目显著低于无显著差异基因, 只在组间比较中占 0.6%~1.9% (图 5b、5d)。

2.4.3 差异表达基因 GO 富集分析 GO 富集分析显示, 鳃组织的差异表达基因注释到的功能主要包括“细胞外空间/区域(GO: 0005615, 0005576)”“次级主动跨膜转运蛋白活性(GO: 0015291)”和“离子运输(GO: 0006811, 0006820)”等(图 6a)。肝胰

表 3 罗氏沼虾鳃和肝胰腺样品测序数据组装结果统计

Tab. 3 Statistics of assembly results of sequencing data of gills and hepatopancreas samples of <i>Macrobrachium rosenbergii</i>							
样品 sample	碱度/(mg/L) alkalinity	分组 group	组织 tissue	原始数据 raw reads	过滤数据 clean reads	有效数据/% clean reads	Q30/% content
S60_1	60	对照组 control group	鳃 gill	47976202	47349158	98.69	96.59
S60_2	60	对照组 control group	鳃 gill	50301244	49617942	98.64	96.57
S60_3	60	对照组 control group	鳃 gill	49121180	48437306	98.61	96.54
S120_1	120	低浓度 low concentration	鳃 gill	54956362	54173864	98.58	96.54
S120_2	120	低浓度 low concentration	鳃 gill	45431640	44814286	98.64	96.55
S120_3	120	低浓度 low concentration	鳃 gill	52749660	52079258	98.73	96.82
S220_1	220	高浓度 high concentration	鳃 gill	50613604	50085284	98.96	97.07
S220_2	220	高浓度 high concentration	鳃 gill	50241920	49619274	98.76	96.77
S220_3	220	高浓度 high concentration	鳃 gill	66366748	65490228	98.68	96.57
G60_1	60	对照组 control group	肝胰腺 hepatopancreas	45340624	44784486	98.77	96.85
G60_2	60	对照组 control group	肝胰腺 hepatopancreas	47019470	46423168	98.73	96.69
G60_3	60	对照组 control group	肝胰腺 hepatopancreas	45437404	44941818	98.91	97.20
G120_1	120	低浓度 low concentration	肝胰腺 hepatopancreas	51912868	51329906	98.88	96.94
G120_2	120	低浓度 low concentration	肝胰腺 hepatopancreas	62120074	61401366	98.84	96.89
G120_3	120	低浓度 low concentration	肝胰腺 hepatopancreas	47366806	46776044	98.75	96.81
G220_1	220	高浓度 high concentration	肝胰腺 hepatopancreas	52992422	52296878	98.69	96.69
G220_2	220	高浓度 high concentration	肝胰腺 hepatopancreas	51203006	50547142	98.72	96.66
G220_3	220	高浓度 high concentration	肝胰腺 hepatopancreas	48047814	47339106	98.52	96.52

注: S60_1、S60_2 和 S60_3 表示对照组罗氏沼虾鳃组织 3 个生物学重复, S120_1、S120_2 和 S120_3 表示低碱度组罗氏沼虾鳃组织 3 个生物学重复, S220_1、S220_2 和 S220_3 表示高碱度组罗氏沼虾鳃组织 3 个生物学重复, G60_1、G60_2 和 G60_3 表示对照组罗氏沼虾肝胰腺组织 3 个生物学重复, G120_1、G120_2 和 G120_3 表示低碱度组罗氏沼虾肝胰腺组织 3 个生物学重复, G220_1、G220_2 和 G220_3 表示高碱度组罗氏沼虾肝胰腺组织 3 个生物学重复; Q30: 碱基识别准确率在 99.9% 以上的碱基所占百分比。

Note: S60_1, S60_2, and S60_3 represent three biological replicates of the gill tissue of the control group of *Macrobrachium rosenbergii*. S120_1, S120_2, and S120_3 represent three biological replicates of the gill tissue of the low alkalinity group of *M. rosenbergii*. S220_1, S220_2, and S220_3 represent three biological replicates of the gill tissue of the high alkalinity group of *M. rosenbergii*. G60_1, G60_2, and G60_3 represent three biological replicates of the liver and pancreas tissue of the control group of *M. rosenbergii*. G120_1, G120_2, and G120_3 represent three biological replicates of the liver and pancreas tissue of the low alkalinity group of *M. rosenbergii*. G220_1, G220_2, and G220_3 represent three biological replicates in the liver and pancreas tissues of the high alkalinity group of *M. rosenbergii*; Q30: The percentage of bases with an accuracy rate of 99.9% or higher in base recognition.

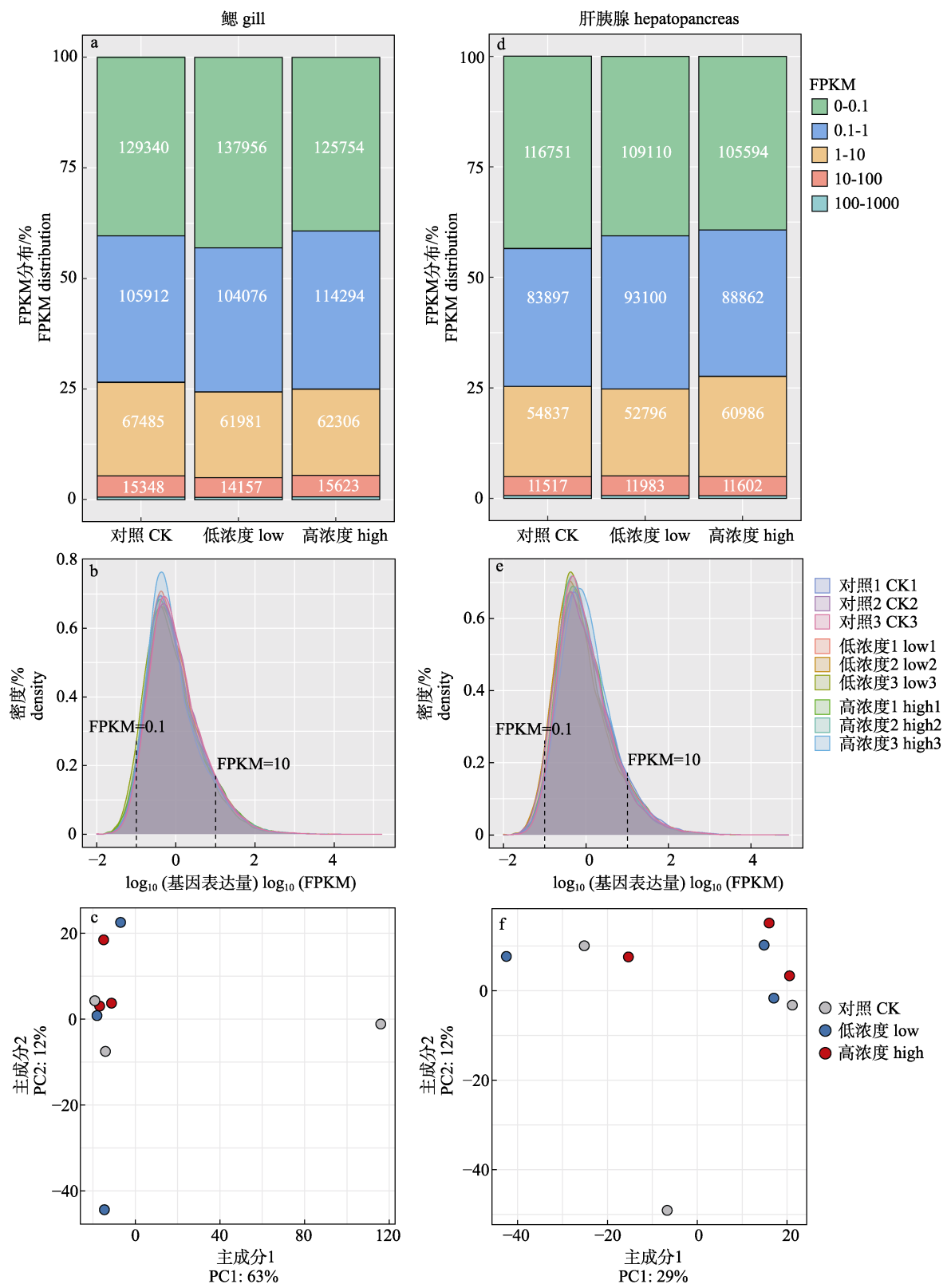


图 4 盐碱胁迫下罗氏沼虾鳃(a、b、c)和肝胰腺(d、e、f)的转录表达

a、d 为各处理基因表达水平的分布; b、e 为全部基因表达丰度的密度图; c、f 为基于所有转录组数据的 PCA 分析。

Fig. 4 Overview of transcriptomes in gills (a, b, c) and hepatopancreas (d, e, f) of *Macrobrachium rosenbergii* under salt-alkaline stress
a and d are distribution of gene expression levels in each treatment. b and e are density plot of expression abundance of all genes. c and f are PCA analysis based on all transcriptome data.

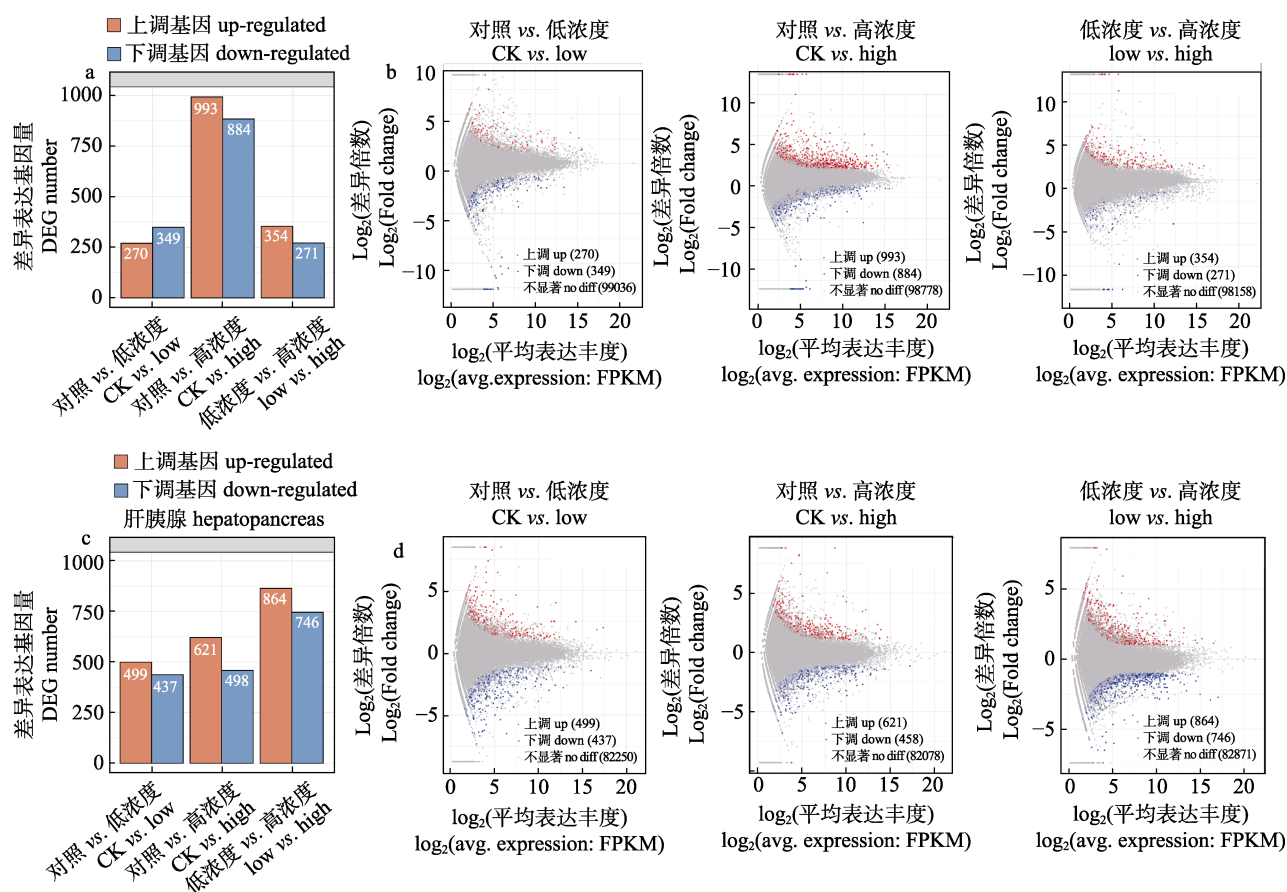


图 5 盐碱胁迫下罗氏沼虾鳃(a、b)和肝胰腺(c、d)差异表达可视化

a、c 为上调和下调差异表达基因数目; b、d (MA 图)为差异基因在平均表达丰度和差异倍数上的分布。

Fig. 5 Visualization of genes expression changes in the gills (a and b) and hepatopancreas (c and d) of *Macrobrachium rosenbergii* between any two of salt-alkaline treatments

a and c are the number of up/down-regulated DEGs. b and d (MA plots) are the distribution of DEGs in terms of expression levels and fold changes.

腺的差异表达基因主要富集于:“细胞外空间/区域”“溶酶体/液泡腔(GO: 0043202, 0005775)”“氨离子代谢过程(GO: 0097164)”。碳水化合物跨膜转运相关的功能在肝胰腺被显著富集(GO: 0051119, 0015145, 0015149, 0005355, 0015152, 0015766, 0008643, 0015144, 0005402, 图 6b)。

2.4.4 差异基因表达分析 鳃和肝胰腺对盐碱胁迫的表达响应不同(图 7)。鳃中共 91 个 DEGs (上调 53, 下调 38)涉及细胞外空间/区域(extracellular space/region), 主要编码 4 次跨膜蛋白(tetraspanin), 钠-氯共转运蛋白(sodium-chloride cotransporter), 硫氧还蛋白(thioredoxin), 蛋白酶 A (cathepsin A) 等, 这些基因在高浓度和低浓度胁迫下的表达相比对照组分别高出约 0.46 倍和 0.22 倍(Log₂Fold change, 图 7a)。10 个编码次级活性跨膜转运蛋白

(secondary active transmembrane transporter)的 DEGs 在高浓度组(0.76 倍)和低浓度组(0.12 倍)的表达上调。涉及细胞对外源刺激响应(cellular response to xenobiotic stimulus)的 DEGs 主要注释到脂肪醛脱氢酶(fatty aldehyde dehydrogenase)分别上调表达 0.52 倍和 0.42 倍。而离子传输(ion transport)和阴离子传输(anion transport)相关基因在高浓度(-0.59 倍和-0.88 倍)和低浓度(-1.19 倍和-1.69 倍)均表达下调(图 7a)。

肝胰腺的细胞外空间/区域的相关基因(64 个 DEGs)表达受抑制(高浓度组: -0.69 倍和低浓度组: -1.19 倍), 其中编码铁蛋白(ferritin)的 DEGs 表达显著下调。高浓度和低浓度胁迫均显著抑制溶酶体/液泡腔(lysosomal/vacuolar lumen, -1.09~-1.71 倍)和铵离子代谢过程(ammonium ion metabolic

process, $-0.08\sim-0.89$ 倍)相关基因的表达, 溶酶体/液泡腔相关基因主要注释到 legumain-like 蛋白, 参与铵离子代谢过程主要是 γ -丁基甜菜碱双加氧酶(γ -butyrobetaine dioxygenase)。值得注意的是, 以类

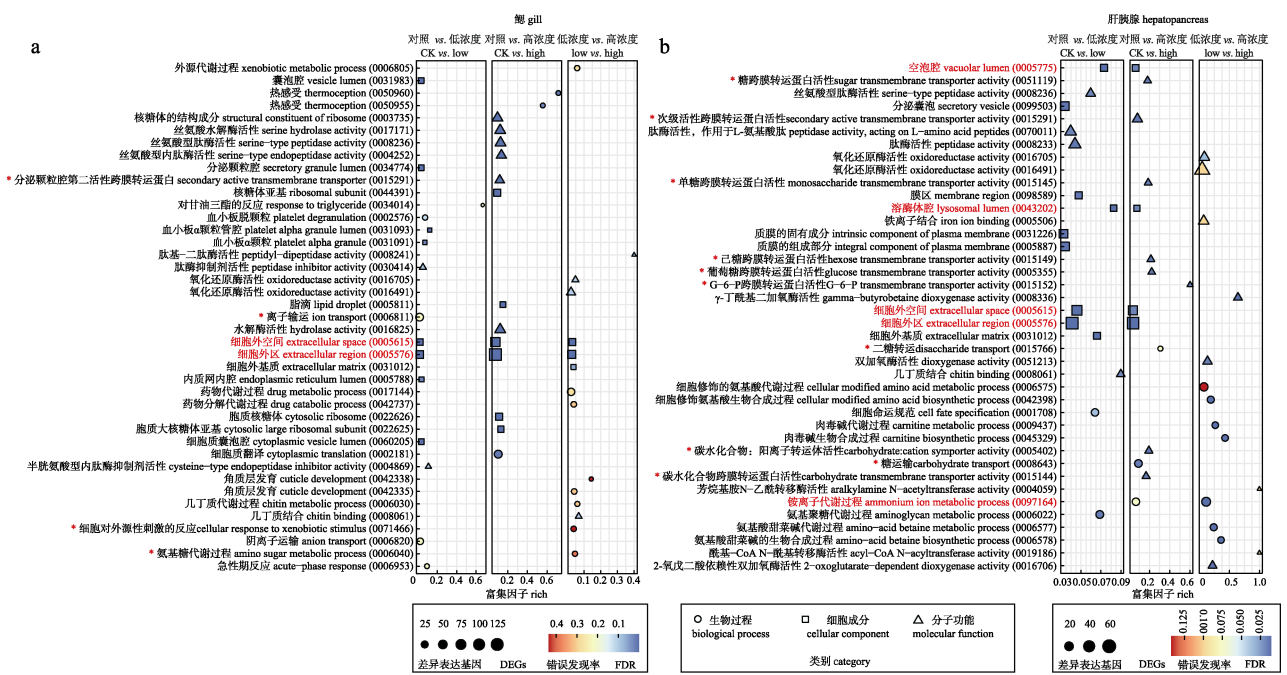


图 6 盐碱胁迫下罗氏沼虾鳃(a)和肝胰腺(b)差异表达基因 GO 富集分析

显著差异的 GO items 富集于任意两组或全部组间比较用红色突出; 涉及盐碱胁迫潜在功能代谢标注于红色星(*)。

Fig. 6 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the gills (a) and hepatopancreas (b) of *Macrobrachium rosenbergii* under salt-alkaline stress

Significant differences in GO items are enriched between any two or all groups, highlighted in red for comparison; the potential functional metabolism related to salt alkali stress is marked with a red star (*).

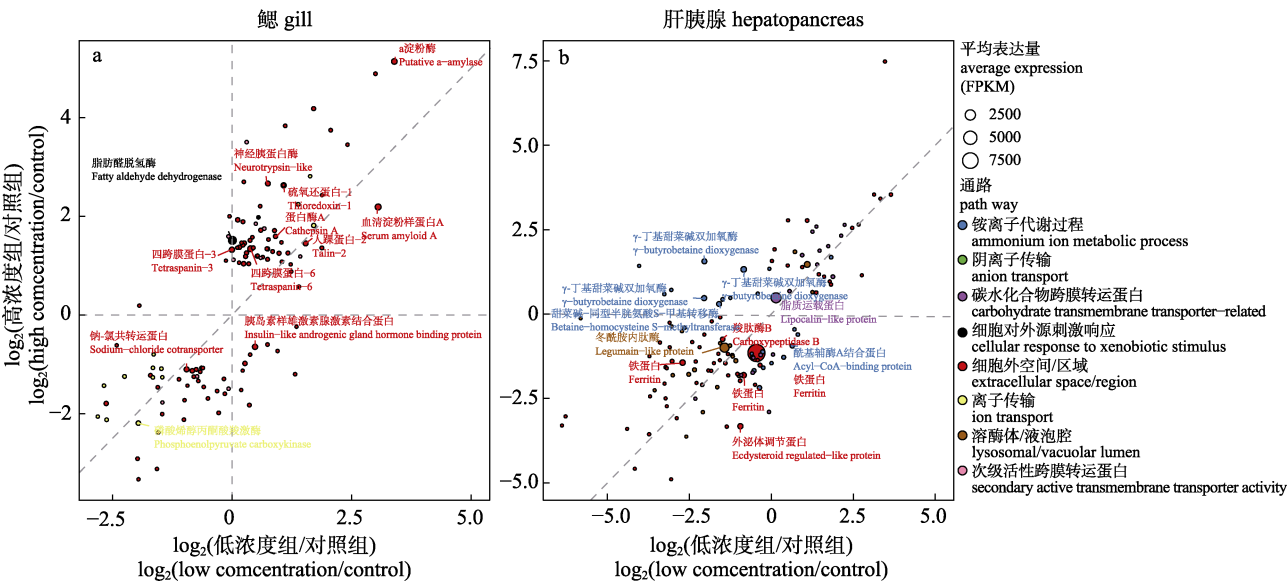


图 7 罗氏沼虾鳃(a)和肝胰腺(b)响应盐碱胁迫的差异基因相对表达水平

每个圆圈代表一个单独的基因, 圆圈大小表示表达丰度。

Fig. 7 Relative expression levels of significantly differentially expressed genes in gills (a) and hepatopancreas (b) of *Macrobrachium* in response to salt-alkaline stress

Each circle represents a separate gene, and the size of the circle indicates expression abundance.

脂质运载蛋白(lipocalin-like protein)为代表的碳水化合物跨膜转运蛋白(carbohydrate transmembrane transporter)相关基因在高浓度(0.37 倍)和低浓度(0.58 倍)胁迫下的表达均明显上调(图 7b)。

3 讨论

3.1 罗氏沼虾对盐度和碱度的耐受性

罗氏沼虾作为广盐性物种其幼体发育期需要在微咸水中完成^[27-28]。本研究,罗氏沼虾的半致死盐度为 27,最低有影响盐度为 16。这与先前的研究一致,罗氏沼虾幼苗半致死盐度约为 25,盐度超过 30 时死亡率显著上升^[29]。对比分析显示,罗氏沼虾对盐度的耐受性要高于凡纳滨对虾、大鳞鲃等耐盐碱水产动物^[30]。碱度胁迫的结果显示,罗氏沼虾幼苗的半致死碱度值为 230 mg/L,最低有影响的碱度值为 96 mg/L。与 González-Vera 和 Broton 等^[31]的研究结果接近,碱度超过 250 mg/L 罗氏沼虾幼苗死亡率显著上升,碱度的增加严重影响罗氏沼虾的生存。此外,盐度和碱度交互胁迫实验结果显示,盐碱双因素胁迫导致罗氏沼虾幼苗的存活率显著降低,表明盐度和碱度对罗氏沼虾幼苗具有协同作用。

3.2 盐碱胁迫对罗氏沼虾鳃和肝胰腺酶活性的影响

碱性磷酸酶(AKP)是生物体免疫反应中重要的代谢类调控酶^[32]。罗氏沼虾鳃和肝胰腺中的 AKP 活性均随时间先降后升,说明罗氏沼虾对盐碱环境的适应性较强,免疫酶活性具有较好的恢复功能。柳飞等^[32]研究发现,低盐度下长期高碳酸盐碱度(≥ 500 mg/L)胁迫会促进脊尾白虾肝胰腺 AKP 活性。本研究中,168 h 的高浓度组肝胰腺的 AKP 含量显著高于 24 h 时,表明高碱度对罗氏沼虾肝胰腺中 AKP 活性具有诱导作用,以应对高碱度对机体的损伤。

渗透压调节通过离子转运酶维持机体的酸碱平衡^[33]。相关酶主要包括 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ 和 CA; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 主动跨膜运输 Na^+ 和 K^+ ,在胞内环境的相对稳定发挥重要作用^[34]; $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ 利用 ATP 水解的能量从细胞内泵出 Ca^{2+} ,维持细胞质较低的 Ca^{2+} 浓度; CA 为 $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$

和 Na^+/H^+ 的电中性交换提供 H^+ 和 HCO_3^- ,维持机体内环境稳定^[35]。本研究中,除鳃中 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 呈现单峰型的变化规律外,其余均呈现先降后升的 U 形变化规律,表明罗氏沼虾渗透压调节过程具有迟滞性,并且这 3 种酶在应对盐碱胁迫过程中具有协同作用。罗氏沼虾鳃和肝胰腺离子转运酶活性短时间内显著降低,可能是应激导致体内 Na^+ 、 HCO_3^- 等离子浓度迅速升高,从而抑制鳃和肝胰腺中的离子转运酶活性以降低细胞膜的通透性^[36];而在后期(168 h)酶活性升高可能是由于罗氏沼虾的主动调节作用,这与尼罗罗非鱼在碱度胁迫下离子转运酶活力的变化相似^[37]。此外, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的变化趋势与脊尾白虾^[38]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[39]和凡纳滨对虾^[40]相似,且 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 在总 ATP 酶活性的占比高达 70%,说明 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 在罗氏沼虾应对高碱胁迫的渗透调节中发挥主导作用^[34]。

抗氧化反应是水生动物体内重要的防御机制,通过清除活性氧自由基保护机体免受氧化损伤^[41]。本研究中, SOD 活性先降后升,不同于脊尾白虾^[32]、中国对虾^[37]和青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[42]在急性碳酸盐碱度胁迫下抗氧化酶活性先升后降的规律,可能是不同的物种对盐碱胁迫的应激反应存在差异,以及盐碱交互胁迫导致抗氧化系统激活时间延长。此外,高碱度导致肝胰腺 GST 活性先升后降,说明碱度胁迫会引起机体产生大量解毒代谢酶,但高碱度对机体的毒性效应超过解毒酶的代谢速率则会导致大分子酶类受到损伤,酶活性呈现抑制趋势。

3.3 盐碱胁迫对罗氏沼虾转录组的影响

急性盐碱胁迫下罗氏沼虾 DEGs 上调多于下调基因数量,表明罗氏沼虾基因表达水平更为活跃,通过增强基因表达来适应盐碱环境。本研究中,鳃中与“细胞外空间/区域”“次级主动跨膜转运蛋白活性”和“离子运输”相关的基因显著富集;而肝胰腺中与碳水化合物跨膜转运相关的功能显著富集。涉及“细胞外空间/区域”的 DEGs 主要注释到四次跨膜蛋白,该蛋白在促进细胞间及细胞内信号转导发挥重要作用^[43];其次钠-氯共转运蛋白能够 Na^+ 和 Cl^- 离子回收和酸碱平衡调节。这

与 Qin 等^[44]研究结果相似: 脊尾白虾在 826 mg/L 碳酸盐碱度胁迫 36 h 后, DEGs 在离子转运等 GO 条目上显著富集。同时, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性在后期升高的变化进一步证明了鳃的离子转运响应在罗氏沼虾维持酸碱平衡过程中发挥重要作用。

肝胰腺中铁蛋白基因表达下调表达最为显著, 研究表明铁离子不仅是碳水化合物代谢酶的活化因子, 参与细胞内 ATP 的生成, 还具有免疫和生理防御功能, 可直接参与 CAT 等酶类的合成以催化各种生物化学反应, 鱼类缺铁时抗氧化酶活性低于正常水平^[45]。因此, 罗氏沼虾可能通过调节肝胰腺内铁元素的代谢来影响抗氧化能力, 这与肝胰腺中 CAT 活性的表达一致。溶酶体具有细胞内消化作用、防御功能以及能够清除细胞内衰老和多余的细胞器, 溶酶体降解可以和细胞在胁迫下的自噬达到代谢平衡^[46], 溶酶体的表达受抑制会影响其降解功能, 表明盐碱胁迫下罗氏沼虾肝胰腺出现炎症反应。脊尾白虾在响应低盐胁迫时, 溶酶体信号通路的差异表达基因最多, 溶酶体降解功能受影响, 与本研究结果一致^[47]。此外, 碳水化合物跨膜转运蛋白相关基因表达上调, 这与凡纳滨对虾、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 在胁迫下的反应相类似。急性碱性胁迫下凡纳滨对虾肝胰腺碳水化合物分解代谢相关调控基因上调, 以及氨胁迫下三疣梭子蟹能量代谢增强^[48]。甲壳类动物通过调整自身的能量代谢强度和模式以适应外界环境, 如三羧酸循环、碳水化合物代谢、脂质代谢等的改变^[48]。Klepsatel 等^[49]指出能量代谢的调控是水生生物在毒性应激下生存的关键, 调节渗透压所需能量占生物体总能量的 20%~50%^[50]。因此, 罗氏沼虾通过增强鳃的离子转运和提高肝胰腺的能量代谢可能是其适应盐碱环境的关键。

4 结论

本研究通过探究罗氏沼虾幼苗在盐碱胁迫下的生理和分子响应机制, 揭示了其复杂的适应策略。盐度和碱度对罗氏沼虾的存活率具有显著影响, 尤其是盐碱交互作用表现出协同效应。在生理调节方面, 罗氏沼虾通过调节鳃和肝胰腺中离

子转运酶活性, 主要是 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, 维持细胞内外的离子平衡。抗氧化反应方面, SOD、CAT 和 GST 活性的变化显示出其对抗氧化损伤的有效应对。转录组分析进一步揭示了罗氏沼虾鳃中离子转运相关基因高表达, 以及肝胰腺能量代谢相关基因表达增强对渗透压调节发挥着重要作用。这些发现为深入理解罗氏沼虾对盐碱胁迫的生理和分子机制提供了重要线索。

参考文献:

- [1] Lin J X, Peng X Y, Hua X Y, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Leymus chinensis* seedlings under salt-alkali stress and nitrogen deposition conditions: From osmotic adjustment and ion balance[J]. RSC Advances, 2018, 8(26): 14500-14509.
- [2] Chen X Z, Lai Q F, Yao Z L, et al. Green aquaculture technology model for saline alkali water[J]. China Fisheries, 2020(9): 61-63. [陈学洲, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式[J]. 中国水产, 2020(9): 61-63.]
- [3] Feng J X, Gao C S, Guo G J, et al. Research report on sustainable development of water industry in Henan Province [J]. Henan Fisheries, 2015(5): 3-6. [冯建新, 高春生, 郭国军, 等. 河南省水产业可持续发展调研报告[J]. 河南水产, 2015(5): 3-6.]
- [4] Yao Z L, Ying C Q, Zhou K, et al. Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 1-12. [么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1-12.]
- [5] Wang H, Geng L K, Fang W H, et al. Studies on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Penaeus chinensis*, transplanted to the northwest inland salt waters[J]. Marine Fisheries, 1997, 19(1): 9-12. [王慧, 耿隆坤, 房文红, 等. 中国对虾往西北内陆咸水水域移植的生产性试养研究[J]. 海洋渔业, 1997, 19(1): 9-12.]
- [6] Xiao G H, Liu L J, Zhang C W, et al. Raising shrimp *Penaeus chinensis* in saline-alkali water[J]. Hebei Fisheries, 2006(8): 30, 34. [肖国华, 刘丽杰, 张长未, 等. 盐碱地苦咸水养殖中国对虾试验[J]. 河北渔业, 2006(8): 30, 34.]
- [7] Li X Q, Li X X, Leng X J, et al. Effect of different salinities on growth and flesh quality of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(3): 343-348. [李小勤, 李星星, 冷向军, 等. 盐度对草鱼生长和肌肉品质的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(3): 343-348.]
- [8] Zhang X H, Li J T, Wang J J, et al. Effects of long-term

- saline-alkaline stress on growth and ovary development of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 049611. [张秀红, 李吉涛, 王佳佳, 等. 长期碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 2024, 48(4): 049611.]
- [9] Li L S, Dai X L. Effects of salinity on *Macrobrachium rosenbergii* physiology, biochemistry and gene expression related to molting at different molting stages[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(8): 2302-2311. [黎兰诗, 戴习林. 盐度对不同蜕皮时期罗氏沼虾生理生化及蜕皮相关基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2022, 53(8): 2302-2311.]
- [10] Su J Q, Zhu H P, Zhu C B, et al. Effects of salinity and Na^+/K^+ ratio on survival and histological structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(5): 45-53. [苏家齐, 祝华萍, 朱长波, 等. 盐度和钠离子/钾离子对凡纳滨对虾幼虾存活与组织结构的影响[J]. 南方水产科学, 2021, 17(5): 45-53.]
- [11] Ge Q Q, Wang J J, Li J T, et al. Effect of high alkalinity on shrimp gills: Histopathological alternations and cell specific responses[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 256: 114902.
- [12] Gao W H, Tian L, Huang T H, et al. Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture Reports, 2016, 4: 125-129.
- [13] Zhao L, Long X W, Wu X G, et al. Effects of water salinity on osmoregulation and physiological metabolism of adult male Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(1): 27-34. [赵磊, 龙晓文, 吴旭干, 等. 水体盐度对中华绒螯蟹成体雄蟹渗透压调节和生理代谢的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(1): 27-34.]
- [14] Pan Y, Wang R C, Luo Y J, et al. Analysis of the nutritive composition in muscle of marine cultured and fresh-water cultured *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(6): 828-834. [潘英, 王如才, 罗永巨, 等. 海水和淡水养殖南美白对虾肌肉营养成分的分析比较[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 2001, 31(6): 828-834.]
- [15] Ding S, Wang F, Guo B, et al. Effects of salinity fluctuation on the molt, growth, and energy budget of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(2): 419-423. [丁森, 王芳, 郭彪, 等. 盐度波动对中国对虾稚虾蜕皮、生长和能量收支的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(2): 419-423.]
- [16] Zhao Y L, Wang Q, Du N S, et al. Embryonic development of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea: decapoda): I. Morphogenesis of external structures of embryo[J]. Acta Zoologica Sinica, 1998, 44(3): 249-256. [赵云龙, 王群, 堵南山, 等. 罗氏沼虾胚胎发育的研究: I. 胚胎外部结构形态发生[J]. 动物学报, 1998, 44(3): 249-256.]
- [17] Luo J P, Liu P M, Gao Q X. Research progress in selective breeding of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Biotic Resources, 2023, 45(1): 16-27. [罗金萍, 刘培敏, 高权新. 罗氏沼虾良种选育研究进展[J]. 生物资源, 2023, 45(1): 16-27.]
- [18] Yang S P, Ding S J, Sun C B, et al. Effect of diet and salinity on the growth and survival rate of juvenile shrimps of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Tropical Biology, 2014, 5(2): 101-106. [杨世平, 丁树军, 孙成波, 等. 饵料和盐度对罗氏沼虾幼虾生长和存活率的影响[J]. 热带生物学报, 2014, 5(2): 101-106.]
- [19] Adhikari S, Chaurasia V S, Naqvi A A, et al. Survival and growth of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) juvenile in relation to calcium hardness and bicarbonate alkalinity[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2007, 7(1): 23-26.
- [20] Day P V, Huong H K, Truc P T T, et al. Effects of salinity and alkalinity on growth and survival of all-male giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879) juveniles[J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2022, 74: 1-14.
- [21] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [22] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, et al. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. Nature Protocols, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [23] Anders S. Analysing RNA-Seq data with the DESeq package [J]. Molecular Biology, 2010, 43(4): 1-17.
- [24] Alexa A, Rahnenführer J. Gene set enrichment analysis with topGO[J]. Bioconductor Improv, 2009, 27: 1-26.
- [25] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, et al. ClusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. The Innovation, 2021, 2(3): 100141.
- [26] R Core Team. The R project for statistical computing [EB/OL]. <http://www.R-project.org>.
- [27] Lam T J. Aquaculture in Southeast Asia. A historical overview [J]. Aquaculture, 1980, 20(4): 389-390.
- [28] Limpadanai D, Tansakul R. Culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in a small reservoir[J]. Aquaculture, 1980, 20(3): 257-260.
- [29] Mallasen M, Valenti W C, Ismael D. Effects of nitrate concentration on larval development of the giant river prawn,

- Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Applied Aquaculture, 2004, 14(3-4): 55-69.
- [30] New M B, Nair C M. Global scale of freshwater prawn farming[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(7): 960-969.
- [31] González-Vera C, Brown J H. Effects of alkalinity and total hardness on growth and survival of postlarvae freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879)[J]. Aquaculture, 2017, 473: 521-527.
- [32] Liu F, Li J, Li J T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1137-1147. [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137-1147.]
- [33] Zhang W L. Study on adaptation mechanism of *Exopalaemon carinicauda* to carbonate alkalinity stress at low salinity[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2022. [张伟丽. 低盐度下脊尾白虾碳酸盐碱度适应机制研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2022.]
- [34] Liu C Q, Wang J X, Zhang Y J, et al. Effects of salinity and Na^+/K^+ in percolating water from saline-alkali soil on the growth of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(6): 1337-1342. [刘存歧, 王军霞, 张亚娟, 等. 盐碱地渗水盐度与钠钾比对凡纳滨对虾生长的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1337-1342.]
- [35] Pan L Q, Liu H Y. Review on the osmoregulation of crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 109-114. [潘鲁青, 刘泓宇. 甲壳动物渗透调节生理学研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 109-114.]
- [36] Rodríguez A, Gallardo M A, Gisbert E, et al. Osmoregulation in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 26(4): 345-354.
- [37] Wang Y, Zhao J L, Zhao Y, et al. Influence of alkalinity on serum osmolality, ion concentration and ion transport enzymes activity of *Oreochromis niloticus*[J]. Ecological Science, 2017, 36(4): 12-20. [王燕, 赵金良, 赵岩, 等. 碱度对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶活力的影响[J]. 生态科学, 2017, 36(4): 12-20.]
- [38] Zhou Y J. Effects of saline-alkali stress on growth, reproduction and immune function of *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023. [周玉洁. 盐碱胁迫对中国对虾生长、繁殖及免疫功能的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.]
- [39] Jin C X, Pan L Q. Preliminary studies on physiological adaptive mechanism of *Procambarus clarkii* osmoregulation under different ambient salinities[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 894-899. [金彩霞, 潘鲁青. 盐度变化对克氏原螯虾渗透调节影响机制的初步研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 894-899.]
- [40] Sun H Y, Zhang L P, Ren C H, et al. The expression of Na, K-ATPase in *Litopenaeus vannamei* under salinity stress[J]. Marine Biology Research, 2011, 7(6): 623-628.
- [41] Hu G F, Li Z, Liang H W, et al. Effects of cadmium on SOD and CAT in hepatopancreas, antennary gland and gill of *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(9): 1806-1811. [呼光富, 李忠, 梁宏伟, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰腺触角腺及鳃中 SOD 和 CAT 活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1806-1811.]
- [42] Wang Z, Yao Z L, Lin T T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1212-1218. [王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1212-1218.]
- [43] Gui L, Wang B, Li F H, et al. Reviews on the immunological function of tetraspanins[J]. Advances in Biochemistry and Biophysics, 2008, 35(11): 1231-1238. [桂朗, 王兵, 李富花, 等. 四跨膜蛋白超家族 tetraspanins 的免疫功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(11): 1231-1238.]
- [44] Qin Z, Ge Q Q, Wang J J, et al. Comparative transcriptomic and proteomic analysis of *Exopalaemon carinicauda* in response to alkalinity stress[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 759923.
- [45] Kong Y X, Ma X B, Wang G Q. Research progress on biological function of iron and its application in fish[J]. Feed Industry, 2024, 45(8): 56-63. [孔雨昕, 马喜波, 王桂芹. 铁的生物学功能及其在鱼类中的应用研究进展[J]. 饲料工业, 2024, 45(8): 56-63.]
- [46] Meng X L, Jayasundara N, Zhang J Y, et al. Integrated physiological, transcriptome and metabolome analyses of the hepatopancreas of the female swimming crab *Portunus trituberculatus* under ammonia exposure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 228: 113026.
- [47] Zou H, Sun J, Yu F, et al. Effect of cadmium on lysosomes in BRL 3A cells[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(12): 1602-1608. [邹辉, 孙建, 于凡, 等. 镉暴露对 BRL 3A 细胞溶酶体的影响[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1602-1608.]
- [48] Shen Y, Wang X Q, Cao M, et al. Transcriptome analysis of *Exopalaemon carinicauda* under low salinity stress[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(5): 19-32. [沈晔, 王兴强, 曹梅, 等. 脊尾白虾对低盐胁迫响应的转录组学分析[J]. 南方水产科学, 2020, 16(5): 19-32.]

- [49] Klepsatel P, Gálíková M, Xu Y J, et al. Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 33667.
- [50] Ern R, Huong 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.

Effects of salt-alkaline mixed stress on survival, enzyme activity, and transcriptomic profiling of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

ZHANG Xin^{1,2}, ZOU Songbao^{2,3}, GAO Qiang^{2,3}, ZHOU Dan², NI Meng², LIU Mei², ZHANG Minglei⁴, CAI Kejun¹, YUAN Julin^{1,2}

1. School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China;
2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province; Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;
3. East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
4. Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Ji'nan 250013, China

Abstract: High carbonate alkalinity in saline-alkaline water is considered a crucial factor that affects the survival of crustaceans. However, the information regarding the saline-alkaline adaptation mechanisms of *Macrobrachium rosenbergii* is currently limited. This study aimed to investigate the effects of saline-alkaline stress on the survival, enzyme activity, and transcriptomic profiling of *M. rosenbergii* by determining its semi-lethal concentration (LC₅₀) and lowest observed effect concentration (LOEC) of salinity and carbonate alkalinity for its larvae. Additionally, the study examined the effects of saline-alkaline stress on osmoregulation, antioxidant enzyme activities, and transcriptional expression in the gills and hepatopancreas of *M. rosenbergii*. Results showed that the 96 h-LC₅₀ of salinity for *M. rosenbergii* larvae was 27.1, with a 96 h-LOEC of 16.5, whereas the 96 h-LC₅₀ of carbonate alkalinity was 230.7 mg/L, with a 96 h-LOEC of 96.6 mg/L. Furthermore, salt-alkali interaction exhibited synergistic effects. Enzyme activity analysis revealed initial decreases followed by increases over time for alkaline phosphatase and Na⁺-K⁺-ATPase activities in the gills and hepatopancreas, whereas Ca²⁺-ATPase activity in the gills exhibited the opposite pattern. Superoxide dismutase activity in the hepatopancreas reached its lowest level during the mid-term stress period (72 h and 120 h), whereas catalase and glutathione S-transferase levels increased. Carbonic anhydrase activity showed an initial decrease followed by increase during the treatment process, with no significant differences observed among different saline-alkaline stress. Transcriptomic analysis revealed distinct responses of the gills and hepatopancreas to saline-alkaline stress. Up-regulated genes associated with extracellular space/region (e.g. tetraspanin), cellular response to xenobiotic stimulus (e.g. fatty aldehyde dehydrogenase), and secondary active transmembrane transporters were observed in the gills under saline-alkaline stress. Genes involved in the extracellular space/region were down-regulated in the hepatopancreas, whereas carbohydrate transmembrane transport related genes (e.g. lipocalin-like protein) were upregulated. These results suggest that *M. rosenbergii* adapts to saline-alkaline environments through coordinated osmotic regulation strategies, which include increased ion transport in the gills and enhanced carbohydrate transmembrane transport in the hepatopancreas. This study provides scientific evidence for understanding the adaptation mechanisms of *M. rosenbergii* in saline-alkaline environments.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; salt-alkaline stress; enzyme activity; differentially expressed genes; osmotic regulation; ion transport; salt alkaline water

Corresponding author: YUAN Julin. E-mail: yuanjulin1982@163.com