

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2022.1103

干露温度对拟穴青蟹幼蟹存活、血蓝蛋白和细胞凋亡相关基因表达的影响

戚杉杉^{1,2,3}, 史策^{1,2,3*}, 王春琳^{1,2,3}, 叶央芳^{1,2,3}, 母昌考^{1,2,3}, 李荣华^{1,2,3}, 任志明^{1,2,3}, 吴清洋^{1,2,3}

(1.宁波大学 教育部水产生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315832; 2.浙江省海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315832; 3.农业农村部绿色海水养殖重点实验室(部省共建), 浙江 宁波 315832)

摘要: 研究了 17、25 和 33 ℃ 3 个干露温度对拟穴青蟹幼蟹存活、血蓝蛋白和细胞凋亡相关基因表达的影响。结果发现, 17 ℃组拟穴青蟹幼蟹存活率最高为 58.93%, 且存活时间最长为 144 h; 33 ℃组存活率最低为 17.86%, 且存活时间最短为 120 h。17、25 和 33 ℃组的血蓝蛋白分别在 48、96、48 h 达到峰值, 25 ℃和 33 ℃组的皮质醇含量在 96 h 时显著高于其他时间点($P<0.01$), 而活性氧 ROS 含量随干露时间增加而上升。在基因表达方面, 干露时间增加导致 *bax* 基因和 *bcl-2* 基因上调, 其中 17 ℃和 33 ℃组在干露 24 h 时的 *bax/bcl-2* 比值大于 1, 且显著高于其他时间点($P<0.05$), *caspase-3* 基因表达量在 17 ℃和 33 ℃组干露 24 h 时也显著高于其他时间点($P<0.01$)。双因素方差分析表明, 温度、干露及其两者的交互作用均显著影响了拟穴青蟹幼蟹的存活率($P<0.01$)。以上研究结果表明, 温度和干露胁迫对拟穴青蟹幼蟹存活的影响可能是通过应激反应和凋亡途径介导的, 17 ℃是拟穴青蟹幼蟹最适宜的运输温度。

关键词: 拟穴青蟹; 干露胁迫; 温度; 氧化应激

中图分类号: S983

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2023) 06-0057-07

干露是指水生动物离开水体停留在空气、沙或土壤等介质的一种状态^[1], 水生动物离水后能存活的时间为“露空时间”。露空时间越长, 表明耐干露能力越强^[2]。在生产过程中, 干露胁迫通常发生在水生动物运输过程中, 随着运输时间的增加, 干露胁迫对水产动物机体造成的损伤会不断加剧, 最终会导致动物死亡, 并造成经济损失^[3]。

温度是水生动物生存所需的重要非生物环境因素之一, 环境温度会显著影响变温动物的生理状态^[4]。干露和温度能够共同影响甲壳动物的生理状态, 进而影响其存活率。例如, 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)在 5 ℃条件下, 干露运输 48 h, 存活率可高达 93%^[5]; 锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)在 12 ℃条件下, 运输 26 h, 存活率可达

100%^[6]; 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)在 25 ℃环境下, 干露 2 h, 存活率可达 93%^[7]; 斑节对虾(*Penaeus monodon*)在 25 ℃环境下, 干露 1 h, 存活率为 85%^[8]。

甲壳动物在干露胁迫下会使氧气供给受阻^[9], 造成 CO₂ 积累, 并导致呼吸性中毒, 从而降低氧气与血蓝蛋白的结合能力^[10]。干露胁迫和高温容易导致氧化应激, 产生大量活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS), 而过量的 ROS 会抑制 DNA 聚合酶活性, 并阻碍 DNA 修复, 最终导致细胞凋亡的产生^[11]。甲壳动物为应对氧化应激, 进化出一套强有力的抗氧化酶系统, 可以在干露过程中去除大量积累的 ROS, 保护细胞组织免受氧化损伤^[12]。

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属于节肢动

收稿日期: 2022-11-04.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省“三农六方”科技协作计划(2021SNLF029); 三门县政府指引(服务)项目(浙建科三-2022-004号); 王宽诚幸福基金。

第一作者: 戚杉杉(1998-), 女, 浙江慈溪人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产养殖。E-mail: 1151585417@qq.com

*通信作者: 史策(1985-), 男, 辽宁锦州人, 副教授, 主要研究方向: 水产设施及养殖技术。E-mail: shice3210@126.com

物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea), 通常分布在中国、越南和日本等国沿海, 其生长快速、经济价值高、肉质鲜嫩、营养丰富, 受广大消费者喜爱, 在国内外市场上供不应求^[13]。运输是拟穴青蟹市场销售活动的重要组成部分^[14], 拟穴青蟹耐干露能力强^[15], Cheng 等^[16]研究了拟穴青蟹暴露于空气中的免疫和生理反应, 而顾文彬^[17]研究了拟穴青蟹干露-再浸润胁迫下的生理应答及细胞凋亡机制, 但未对不同温度对拟穴青蟹干露状态下存活和生理状态的影响进行研究。

因此, 本研究比较了不同干露温度对拟穴青蟹幼蟹的存活、应激反应和细胞凋亡相关基因表达的影响, 旨在解析拟穴青蟹对不同温度干露的生理响应, 为优化拟穴青蟹运输技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验于 2021 年 10 月 22 日开始, 养殖地点在宁波大学中试基地。实验设置 17、25、33 °C 3 个干露温度组。3 个 150 cm×100 cm×80 cm 的帆布池用于 3 个不同干露温度处理组, 每个帆布池中有 8 个 30 cm×30 cm×30 cm 干露容器, 容器由不透明塑料板平均分成 9 个相等区域, 每个容器底部各放 1 个支架, 每个处理组有 8 个重复, 每个重复 7 只蟹。帆布池中水位与支架高度相平, 通过加热棒和制冷机控制帆布池水温, 以控制拟穴青蟹干露温度。

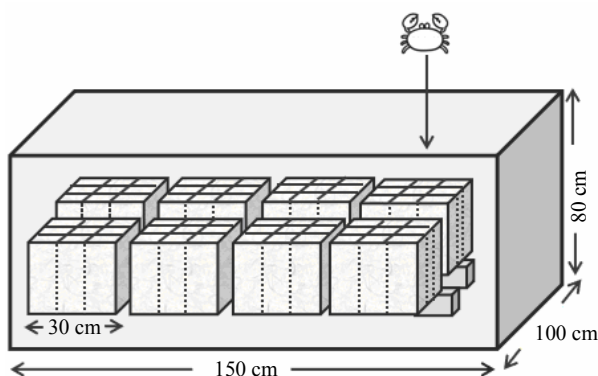


图 1 干露实验装置

1.2 实验动物

用于实验的拟穴青蟹幼蟹(体质量 (32.25 ± 13.52) g)来源于浙江三门佳顺水产合作社, 在实验室环境暂养 5 d, 以缓解因运输及环境变化产生的

应激反应, 暂养水温为 22~24 °C, 海水盐度为 25‰, 暂养期间, 溶解氧 $>5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氨氮和亚硝酸盐 $<0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 暂养期间不投喂饲料。待暂养结束后, 挑选体重相近、附肢完整的拟穴青蟹幼蟹 168 只; 同时, 将帆布池中水温调节到实验设计温度, 将拟穴青蟹幼蟹随机分配到 3 个大帆布池中的 24 个干露容器内, 每个容器放 7 只, 每隔 12 h 观察实验蟹存活状态, 并统计记录各处理组实验蟹的存活数据。当实验蟹附肢运动能力下降、口器开口并伴有发泡现象等状况时, 则判定为死亡个体。

1.3 样本采集

各温度组在实验开始的 0、24、48、96 h 进行取样, 每个时间点干露容器中各取 1 只拟穴青蟹幼蟹, 总共数量为 8 只, 若数量不足 8 只, 则至少取 3 只以上拟穴青蟹幼蟹。使用 1.5 mL 一次性注射器在拟穴青蟹幼蟹的游泳足基部抽取血淋巴, 并将迅速解剖采集的实验蟹肝胰腺置于 1.5 mL 离心管中, 液氮速冻后, 转入-80 °C 下保存, 以备后续分析。血淋巴经抗凝处理后在 4 °C 冰箱中静置过夜, 将静置后的血淋巴于 4 °C 条件下, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血清并进行分装, 分装后于-80 °C 超低温冰箱保存。

1.4 存活率

采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析法, 计算不同干露温度组各时间点拟穴青蟹幼蟹存活情况。

1.5 血清血蓝蛋白、皮质醇和活性氧的测定

血清血蓝蛋白、皮质醇和 ROS 检测采用 ELISA 试剂盒(上海桥杜生物科技有限公司)测定。往预先包被所测指标抗体的包被微孔中依次加入标本、标准品、HRP(过氧化物酶)标记的检测抗体, 然后将微孔板在 37 °C 下孵育 60 min, 并用洗涤液彻底洗涤, 在过氧化物酶和酸的作用下, 用于显色的底物 TMB(四甲基联苯胺)由蓝色变为黄色, 反应最终溶液的黄色深度与所需测得的含量成正比, 单位均为 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.6 基因表达分析

实验蟹肝胰腺样本在液氮环境下于研钵中充分研磨, 然后取少量组织粉末(50~100 mg)放入加有 1 mL Trizol 试剂(15 596 026, Invitrogen, USA)的无 RNase 的 EP 管中提取总 RNA。用 RNase-Free DNase(TaKaRa, 中国)去除基因组 DNA 污染后, 用

表 1 本研究中用于实时 PCR 的特异性引物

引物名称	引物序列(5'→3')	参考文献
<i>bax-F</i>	GAGGGACAGTGAAGCAGTGGTAGT	文献[3]
<i>bax-R</i>	GCAGTTGAGATTTGGTAAAGGTGGG	
<i>bcl-2-F</i>	CCTTGCCGAGTTCACCGTGC	文献[11]
<i>bcl-2-R</i>	GGCAGCCAGTCCAAGCCCAAT	
<i>caspase-3-F</i>	ACGAAGTGAGGGGATTATGCC	文献[16]
<i>caspase-3-R</i>	CAGCCCATCCAGCGAGC	
<i>β-actin-F</i>	GAGCGAGAAATCGTTCGTGAC	文献[18]
<i>β-actin-R</i>	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG	

凝胶电泳法检测 RNA 的完整性和纯度。按照 HiFiScript cDNA 试剂盒(康为世纪生物科技有限公司, 上海)说明书的操作步骤, 将 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR 绿色荧光染料在荧光定量 PCR 仪(LightCycler96, Roche 公司, 瑞士)上进行实时 PCR 检测。本研究以 β -actin 作为内参基因, 分别测定了 *bax*、*bcl-2*、*caspase-3* 的表达情况。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对所有定量数据进行分析。所用引物序列见表 1^[18]。

1.7 数据分析

数据均以平均值±标准误差表示, 实验结果用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 采用 Tukey 多重比较事后检验分析, 以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。此外, 温度与干露时间交互作用采用双因素方差(Two-way ANOVA)分析。

2 结果与分析

2.1 不同温度下干露对拟穴青蟹幼蟹存活率的影响

不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹生存曲线如图 2 所示。由图可见, 随着干露过程中温度的升高, 拟穴青蟹幼蟹死亡率增加, 并随干露时间的延长, 死亡率也增加。在 24、48、96 h 时, 17 °C 存活率分别为 96.43%、89.29%、58.93%; 25 °C 存活率分别为 91.07%、78.57%、32.14%; 33 °C 存活率分别为 85.71%、50%、17.86%。17 °C 组存活时间最长为 144 h, 33 °C 组存活时间最短为 120 h。

2.2 不同温度下干露对拟穴青蟹幼蟹血淋巴指标的影响

不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹血淋巴血

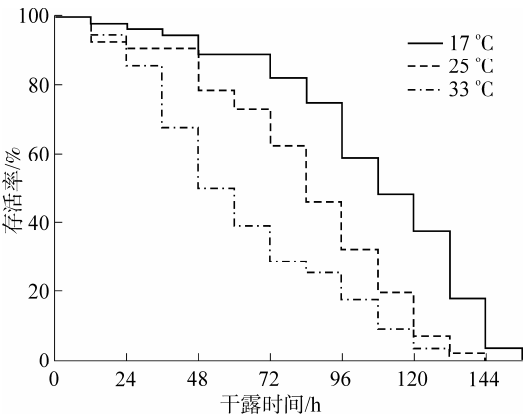
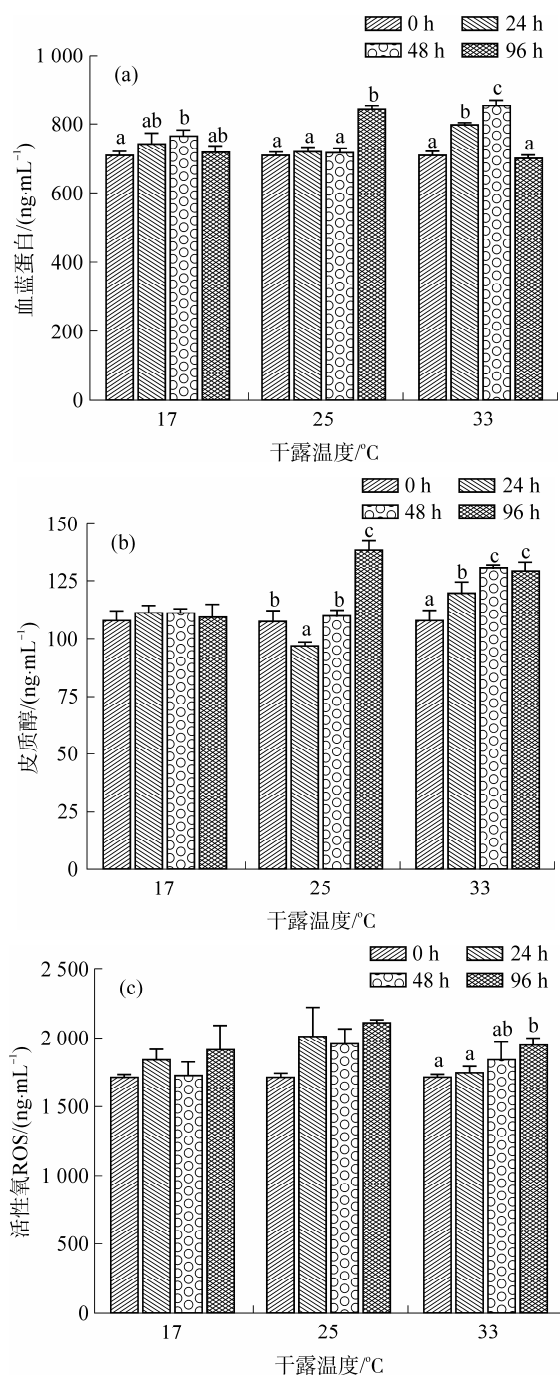


图 2 不同干露温度下拟穴青蟹幼蟹生存曲线

蓝蛋白质量浓度变化如图 3(a)所示, 可见 17 °C 在干露 48 h 时显著高于其他时间点($P<0.05$), 33 °C 组在干露 48 h 时显著高于其他时间点($P<0.01$), 而 25 °C 组在干露 96 h 时血蓝蛋白质量浓度达到顶峰($P<0.01$)。不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹血淋巴皮质醇质量浓度变化如图 3(b)所示, 可见皮质醇质量浓度在 25 °C 和 33 °C 组均出现上升趋势, 且在干露 96 h 时显著高于其他时间点($P<0.01$), 而 17 °C 组无显著变化($P>0.05$)。不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹血淋巴 ROS 质量浓度变化如图 3(c)所示, 可见 ROS 浓度在 33 °C 组 96 h 时显著高于其他时间点($P<0.05$), 而其他实验组无显著变化($P>0.05$)。

2.3 不同温度下干露对拟穴青蟹幼蟹的细胞凋亡相关基因表达

不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹 *bax* 表达量如图 4(a)所示, 可见在 17 °C 组 *bax* 表达量在干露 24 h 时达到最高($P<0.05$), 33 °C 组 *bax* 表达量在干露 96 h 时显著高于其他时间点($P<0.05$), 而 25 °C 组



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图同。

图3 不同温度干露对拟穴青蟹幼蟹各时间点血淋巴血蓝蛋白(a)、皮质醇(b)和活性氧 ROS(c)质量浓度的影响

bax 表达量无显著变化($P > 0.05$)。不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹 *bcl-2* 表达量如图 4(b)所示, 可见各温度组 *bcl-2* 表达量均在干露 48 h 时达到顶峰 ($P < 0.01$)。不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹 *bax/bcl-2* 比率如图 4(c), 17 °C 和 33 °C 组 *bax/bcl-2* 比值

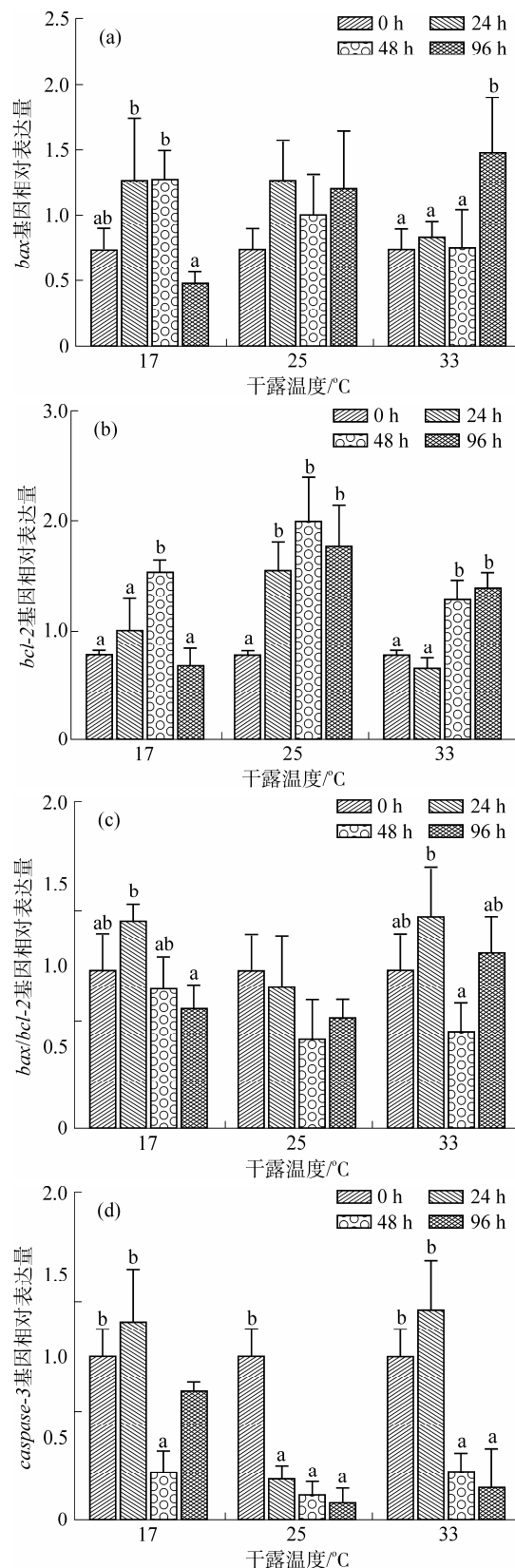


图4 不同温度干露对拟穴青蟹幼蟹各时间点 *bax*(a)、*bcl-2*(b)、*bax/bcl-2*(c)、*caspase-3*(d)基因表达量的影响

在干露 24 h 时均大于 1 且显著高于其他时间点($P < 0.05$)。不同温度干露情况下拟穴青蟹幼蟹 *caspase-3* 表达量如图 4(d)所示, 由图可见 17 °C 和 33 °C 组 *caspase-3* 表达量在干露 24 h 时也显著高于其他时间点($P < 0.01$)。

2.4 温度和干露时间对拟穴青蟹幼蟹的交互作用

表 2 为采用双因素方差分析对干露温度、干露时间及干露温度和时间对拟穴青蟹幼蟹各测定指标影响的分析结果。可以看出, 干露温度对 *bax* 和 *caspase-3* 基因相对表达量无显著影响($P > 0.05$), 干露时间对各指标都有显著性影响($P < 0.05$), 干露温度和干露时间对拟穴青蟹幼蟹存活率、血蓝蛋白、皮质醇和 *bax* 基因有交互作用。

表 2 双因素方差分析结果

指标	因素		
	干露温度	干露时间	干露温度×干露时间
存活率/%	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
血蓝蛋白/(ng·mL ⁻¹)	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
皮质醇/(ng·mL ⁻¹)	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
ROS/(ng·mL ⁻¹)	$P < 0.01$	$P < 0.01$	NS
<i>bax</i>	NS	$P < 0.05$	$P < 0.01$
<i>bcl-2</i>	$P < 0.05$	$P < 0.01$	NS
<i>bax/bcl-2</i>	$P < 0.05$	$P < 0.01$	NS
<i>caspase-3</i>	NS	$P < 0.01$	NS

注: NS 代表无显著性差异。

3 讨论

本研究中, 干露温度和干露时间对拟穴青蟹幼蟹存活率均存在影响, 随着干露温度上升, 拟穴青蟹幼蟹存活率下降; 在 17 °C 时, 拟穴青蟹幼蟹在 96 h 时存活率仍有 58.93%, 而在 33 °C 时, 拟穴青蟹幼蟹在 96 h 时存活率仅为 17.86%。类似研究也同样表明温度升高也会导致三疣梭子蟹和菲律宾蛤仔在干露过程中存活率下降, 在 5 °C 下, 三疣梭子蟹在 48 h 时的存活率有 93.3%, 而在 10 °C 条件下存活率为 0%^[5]; 温度为 15 °C 时, 菲律宾蛤仔在 72 h 仍有 85.3% 的存活率, 但当温度为 25 °C 时, 菲律宾蛤仔在 72 h 时已经全部死亡^[19]。与以上研究结果相似, 随着干露时间增加和温度上升, 拟穴青蟹幼蟹存活表现下降: 幼蟹在 17 °C 条件下存活时

间能达到 144 h, 但 33 °C 条件下则仅为 120 h。本研究中, 不同温度处理组是通过水浴方式达到, 各处理均保持了一定湿度, 因此即使在干露状态下的拟穴青蟹存活时间仍然较长。同时, 由于温度与干露存在交互作用, 因此高温和干露的共同胁迫会显著降低拟穴青蟹存活率。

由于血蓝蛋白具有输氧功能, 而干露胁迫会导致欧洲螯龙虾(*Homarus Gammarus*)和锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[20-21]出现呼吸性酸中毒, 进而降低氧气与血蓝蛋白的结合能力^[10]。本研究中各处理组的拟穴青蟹幼蟹血淋巴血蓝蛋白浓度在干露过程中总体呈上升趋势, 且 33 °C 组血蓝蛋白含量显著高于其他温度组, 其原因可能是因为高温加剧了低氧胁迫, *hif-1* 基因表达上调, 从而增加血蓝蛋白合成^[22]。此外, 血蓝蛋白作为一种多功能蛋白, 还具有免疫防御功能, 因此另一种可能是温度和干露胁迫激活了拟穴青蟹的免疫系统, 导致血蓝蛋白水平上调。

不适宜的温度和缺氧等情况会引发水生动物的应激反应^[23], 而皮质醇是应激反应指标之一^[24]。本研究中 25 °C 和 33 °C 组的皮质醇浓度在干露过程中显著增加, 而且 ROS 含量也随之上升, 表明干露导致应激反应, 并对机体造成了氧化损伤^[25]。由于 ROS 能够抑制 DNA 聚合酶活性并阻碍 DNA 修复, 进而可能导致细胞凋亡^[12], 而细胞凋亡是一种由基因调控的程序性细胞死亡, 在清除受损和坏死细胞以及维持动态平衡方面起着至关重要的作用^[26]。Bcl-2 和 BAX 蛋白是调节内源性细胞凋亡的 Bcl-2 蛋白家族的成员, Bcl-2 蛋白可以预防细胞凋亡, 而 BAX 蛋白可以促进细胞凋亡^[27]。在蛋白水平上, BAX/Bcl-2 的比值大于 1, 代表线粒体途径被激活, 细胞发生凋亡^[28]。本研究中拟穴青蟹的 *bax/bcl-2* 比值在 17 °C 和 33 °C 干露胁迫 24 h 时均大于 1, 同时其 *caspase-3* 基因表达量也达到顶峰, 表明此时细胞凋亡可能处于较高水平。

4 结论

本文探究了不同干露温度对拟穴青蟹幼蟹存活、血蓝蛋白水平、氧化应激和细胞凋亡相关基因表达的影响。研究结果发现不同温度下的干露均导致拟穴青蟹氧化应激、皮质醇水平上升, 以及细

胞凋亡相关基因表达变化,且温度和干露具有交互作用。高温和干露胁迫可能通过氧化应激和细胞凋亡途径降低拟穴青蟹存活表现,17℃是拟穴青蟹幼蟹最适宜的运输温度。

参考文献:

- [1] Madenjian C P, Rogers G L, Fast A W. Predicting night time dissolved oxygen loss in prawn ponds of Hawaii: Part II. A new method[J]. *Aquacultural Engineering*, 1987, 6(3):209-225.
- [2] 姜令绪, 刘群, 王仁杰, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)幼体不同干露温度下死亡率的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1):127-131.
- [3] Gu W, Zhou Y, Tu D, et al. Identification and characterization of apoptosis regulator Bax involved in air-exposure stress of the mud crab, *Scylla paramamosain* Estampador, 1949[J]. *Crustaceana*, 2017, 90(11/12):1373-1390.
- [4] 许友卿, 曹占旺, 丁兆坤, 等. 高温对鱼类的影响及其预防研究[J]. *水产科学*, 2010, 29(4):235-242.
- [5] 谢佳彦, 朱爱意. 几种重要水产品活体运输技术研究[J]. *水产科学*, 2010, 29(9):532-536.
- [6] 陈水春, 储霞玲, 班庭辉, 等. 3种龙虾的休眠温度及低温休眠技术研究[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(4):489-494.
- [7] Duan Y F, Zhang J S, Dong H B, et al. Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49:91-99.
- [8] 姜娜, 王芳, 路允良, 等. 干露对三疣梭子蟹抗氧化和应激能力的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(12):1996-2004.
- [9] Defur P L. Systemic respiratory adaptations to air exposure in intertidal decapod crustaceans[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 1988, 28(1):115-124.
- [10] Allen B J, Rodgers B, Tuan Y H, et al. Size-dependent temperature and desiccation constraints on performance capacity: Implications for sexual selection in a fiddler crab[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012, 438:93-99.
- [11] Cheng C H, Su Y L, Ma H L, et al. Effect of nitrite exposure on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Chemosphere*, 2020, 239:124668.
- [12] Duan Y F, Zhang J S, Dong H B, et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2):354-365.
- [13] Bao J, Li X, Xing Y, et al. Respiratory metabolism and antioxidant response in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during air exposure and subsequent reimmersion [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10:907-916.
- [14] Yang H N, Ye H H, Huang H H, et al. Characterization and expression of Sp *Hsp60* in hemocytes after challenge to bacterial, osmotic and thermal stress from the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(4):1185-1191.
- [15] 谢龙伟, 刘文雄. 锯缘青蟹人工育苗技术[J]. *中国水产*, 1992(5):30-31.
- [16] Cheng C H, Ma H L, Deng Y Q, et al. Immune and physiological responses of mud crab (*Scylla paramamosain*) under air exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2020, 233:108767.
- [17] 顾文彬. 拟穴青蟹干露胁迫应答及其细胞凋亡机制的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [18] Dong Z, Mao S, Chen Y, et al. Effects of air-exposure stress on the survival rate and physiology of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Aquaculture*, 2019, 500:429-434.
- [19] 王文文. 干露胁迫对菲律宾蛤仔免疫指标和基因表达的影响[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- [20] Taylor E W, Whiteley N M. Oxygen-transport and acid-base-balance in the hemolymph of the lobster, homarus-gammarus, during aerial exposure and resubmersion[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1989, 144(1):417-436.
- [21] Varley D G, Greenaway P. The effect of emersion on haemolymph acid-base balance and oxygen levels in *Scylla serrata* Forskal (Brachyura: Portunidae)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1992, 163(1):1-12.
- [22] Brouwer M, Brown-Peterson N J, Larkin P, et al. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 341(1):16-31.
- [23] 王琦, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) *HSP70* 和 *ferritin* 基因表达的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2):409-414.
- [24] Kubokawa K, Watanabe T, Yoshioka M, et al. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female *Sockeye salmon* during the breeding season[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(3/4):335-

- 349.
- [25] Li J, Chen P, Liu P, et al. The cytosolic manganese superoxide dismutase cDNA in swimming crab *Portunus trituberculatus*: Molecular cloning, characterization and expression[J]. Aquaculture, 2010, 309(1/2/3/4):31-37.
- [26] Wyllie A H, Kerr J, Currie A R. Cell death: The significance of apoptosis[J]. International Review of Cytology, 1980, 68:251- 306.
- [27] 苗国英. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)凋亡相关基因功能研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- [28] Wang J, Zhang P, Shen Q, et al. The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense*[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e64020.

Effects of air-exposure temperature on survival, hemocyanin and expression of apoptosis-related genes in juvenile mud crab *Scylla paramamosain*

QI Shanshan^{1,2,3}, SHI Ce^{1,2,3}, WANG Chunlin^{1,2,3}, YE Yangfang^{1,2,3}, MU Changkao^{1,2,3},
LI Ronghua^{1,2,3}, REN Zhiming^{1,2,3}, WU Qingyang^{1,2,3}

(1.Key Laboratory of Aquaculture Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315832, China;

3. Key Laboratory of Green Mariculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ningbo 315832, China)

Abstract: The effects of air-exposure temperatures (17, 25 and 33 °C) on the survival and apoptosis-related gene expression of juvenile mud crab *Scylla paramamosain* were investigated. The results showed that the 17 °C group had the highest survival rate, while the 33 °C group had the lowest survival rate. Hemocyanin in 17, 25 and 33 °C groups peaked at 48, 96, and 48 h, respectively. Cortisol content in 25 °C and 33 °C groups was the highest at 96 h ($P<0.01$); whereas reactive oxygen species (ROS) content increased with extending air-exposure duration. In terms of gene expression, *bax* and *bcl-2* genes were significantly up-regulated with increasing air-exposure duration. Two-way analysis of variance showed that temperature, air-exposure and their interaction significantly affected the survival rate of juvenile mud crab ($P<0.01$). Based on the above research results, the effects of temperature and air-exposure on the survival of juvenile mud crab may be mediated by stress response and apoptosis pathway. In addition, the optimum temperature for the transportation of juvenile mud crab was 17 °C.

Key words: mud crab *Scylla paramamosain*; air-exposure; temperature; oxidative stress

(责任编辑 章践立)