

DOI: 10.11964/jfc.20240514545

## 夏季北黄海三倍体长牡蛎的养殖环境和健康指标调查



葛平安<sup>1</sup>, 高磊<sup>1</sup>, 王玲<sup>1</sup>, 周柯利<sup>1</sup>, 李磊<sup>2</sup>, 王玲玲<sup>1</sup>, 宋林生<sup>1\*</sup>

1. 大连海洋大学, 辽宁省海洋动物免疫学与疫病防控重点实验室, 辽宁省海洋动物免疫学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 大连玉洋集团股份有限公司, 辽宁 大连 116499

### 摘要:

**【目的】**解析夏季北黄海三倍体长牡蛎的养殖环境和健康状态。

**【方法】**本实验于2023年7—8月在辽宁省大连庄河市王家岛镇(123.07°E, 39.45°N)三倍体长牡蛎浮筏养殖海区开展了3次调查研究。

**【结果】**调查海区表层水温为20.6~24.2℃, 水体叶绿素 $a$  (Chl. $a$ )浓度为1.810~4.395  $\mu\text{g/L}$ , 低于2021年报道的养殖二倍体长牡蛎时同一海区的同期水平。水体中、长牡蛎鳃中共生弧菌的丰度为 $8.40 \times 10^5 \sim 8.20 \times 10^6$  个/L和 $732.43 \sim 2.26 \times 10^4$  个/L, 均低于2021年同期水平。在三次调查研究中, 三倍体长牡蛎闭壳肌糖原含量依次为6.41、8.09和8.10 mg/g, 呈逐渐上升趋势; 鳃丙二醛(MDA)含量依次为17.40、11.76和8.09 nmol/mg prot, 呈显著下降趋势; 血淋巴细胞中细胞因子CgIL17-4、CgIL17-5、CgTNF-1和CgTNF-2的mRNA表达量未见显著差异。

**【结论】**2023年7—8月北黄海三倍体长牡蛎养殖海区Chl. $a$ 浓度、水体中和长牡蛎鳃中共生弧菌丰度均低于2021年同期水平, 闭壳肌糖原含量未见明显下降, 鳃中MDA水平和血淋巴细胞中CgIL17-4、CgIL17-5、CgTNF-1和CgTNF-2的表达量未出现明显异常。研究结果有助于查明夏季北黄海养殖三倍体长牡蛎的健康状态和环境变化特征, 为研发相关技术、规避夏季贝类大规模死亡提供理论依据。

**关键词:**三倍体长牡蛎; 夏季高温; 糖原; 细胞因子; 丙二醛; 北黄海

第一作者: 葛平安, 从事长牡蛎生态免疫学研究, E-mail: [gpa725@163.com](mailto:gpa725@163.com)



通信作者: 宋林生, 从事贝类免疫学研究, E-mail: [lsong@dlou.edu.cn](mailto:lsong@dlou.edu.cn)

资助项目: 国家自然科学基金(41961124009, 32320110); 农业农村部贝类产业技术体系(CARS-49); 农业农村部农业科研杰出人才及其创新团队项目; 辽宁省教育厅项目(JYTMS20230468)

收稿日期: 2024-05-30  
修回日期: 2024-08-28

文章编号:  
1000-0615(2025)04-049611-11  
中图分类号: S 968.3  
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)  
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是我国重要的海水养殖贝类, 2022年全国牡蛎养殖产量达619.95万t, 其中长牡蛎占四分之一<sup>[1]</sup>。近年来, 随着水产育种技术的进步, 三倍体长牡蛎已逐渐成为我国长牡蛎养殖的重要品种<sup>[2]</sup>。与传统养殖的二倍体长牡蛎相比, 三倍体长牡蛎具有生长快、个体大、抗逆性强等优点<sup>[3-4]</sup>。三倍体长牡蛎得到水产养殖产业和消费市场的认可, 其产量已占长牡蛎养殖产量的三分之一以上<sup>[5-6]</sup>。

传统养殖二倍体长牡蛎在夏季易发生病害甚至大规模死亡, 其中涉及夏季高温、病原微生物暴发以及繁殖行为等多因素的共同



作用。夏季我国北方养殖海区海水温度最高达 26~27 °C<sup>[7]</sup>, 超过了长牡蛎的适宜生长温度; 同时海水中弧菌 (*Vibrio* spp.) 等潜在致病菌丰度在显著上升<sup>[8]</sup>。此外, 长牡蛎在 6—7 月处于繁殖季节, 繁殖行为常导致能量剧烈消耗、糖原储存不足、繁殖后抗逆能力下降等压力<sup>[9]</sup>, 这也是造成二倍体长牡蛎在夏季发生病害甚至大规模死亡的重要原因<sup>[10]</sup>。三倍体长牡蛎具有一组额外的染色体 (3n), 无法形成正常配子, 且性腺通常不发育或者较少发育<sup>[11]</sup>, 因此在夏季不会出现因繁殖行为带来的压力<sup>[10]</sup>, 较二倍体长牡蛎具有更高的能量储备和抗逆能力。

本实验于 2023 年 7—8 月对大连庄河市王家岛镇三倍体长牡蛎养殖海区的环境理化因子进行了调研, 包括水质指标、饵料藻种类和丰度以及细菌丰度等, 检测了三倍体长牡蛎能量储存和免疫等相关指标的变化规律, 并通过对比本团队已报道的同一海区二倍体长牡蛎养殖情况<sup>[12]</sup>, 解析夏季养殖三倍体长牡蛎的健康和环境变化特征, 为防控夏季贝类大规模死亡提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

选取辽宁省大连庄河市王家岛镇三倍体长牡蛎浮筏养殖海区为调查区域, 于 2023 年 7 月 9 日、7 月 23 日和 8 月 4 日对养殖中心区采样点 (123.07°E, 39.45°N) 开展了原位水质监测、海水样品采集、微生物样品采集、长牡蛎组织及活体长牡蛎样品采集等工作, 相关数据和样品分别标记为 S709、S723 和 S804 组。样品采集具体过程: 每次调查采样时随机选取 3 个长牡蛎养殖海区作为采样点, 每个采样点采集 1 L 未处理表层海水并加入 10 mL Lugol 氏液固定, 在常温条件下保存用于浮游微藻计数分析; 采集 3 L 表层海水并加入 0.1% 碳酸镁悬浊液后过滤至 0.7 μm 无黏合剂玻璃微纤滤膜 (GF/F 滤膜), 锡纸包裹后于干冰环境保存, 用于叶绿素 *a* (Chl.*a*) 浓度分析; 采集 3 L 表层海水经 0.22 μm 滤膜过滤后, 于 0~4 °C 条件下保存用于水质分析, 取滤膜于干冰环境保存用于细菌丰度分析。每次调查时随机采集 9 只 2 龄三倍体长牡蛎, 平均体重为 (88.27±13.27) g, 取鳃、肝胰

腺、闭壳肌组织和血淋巴细胞样品于干冰环境保存, 同时使用 TRIzol 试剂浸泡后于干冰环境中保存, 用于长牡蛎健康指标分析。实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照大连海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 水质分析

利用 YSI 多参数水质测定仪 (美国) 对表层海水温度、溶解氧含量 (DO)、pH 和盐度 (S) 进行原位监测。依据 GB17378.4—2007 《海洋监测规范》, 分别利用次溴酸盐氧化法、萘乙二胺分光光度法、锌-镉还原法、磷钼蓝分光光度法和硅钼蓝法, 对表层海水样品的铵盐 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)、亚硝酸盐 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝酸盐 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、磷酸盐 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) 和硅酸盐 (SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 浓度进行分析。

### 1.3 浮游微藻分析与鉴定

将 GF/F 滤膜转移至含有 10 mL 90% 丙酮溶液的离心管中, 在 4 °C 下静置 24 h 后使用分光光度法分析 Chl.*a* 浓度<sup>[13]</sup>。将加入 Lugol 氏液的表层海水样品固定浓缩后用于浮游微藻鉴定和计数<sup>[14]</sup>。

### 1.4 细菌丰度分析

分别利用 EZNA™ Water DNA Kit 和 EZNA™ Soil DNA Kit (OMEGA Bio-Tek, 美国) 提取表层海水样品和三倍体长牡蛎组织样品 DNA。使用 NanoDrop 2000 (丹麦) 检测提取的 DNA 质量合格后用于定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR)<sup>[15]</sup> 分析。建立细菌总丰度和弧菌丰度的绝对定量 PCR 标准曲线, 构建待测基因的标准质粒, 测序验证后测定标准质粒浓度, 计算拷贝数后梯度稀释标准质粒, 作为模板进行 RT-qPCR 检测。由于实验样品采集等问题, 第一次调查时未检测鳃中细菌总丰度和弧菌丰度。细菌丰度分析实验所用引物见表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.5 组织糖原和葡萄糖含量分析

取长牡蛎肝胰腺和闭壳肌组织各 0.1 g 置于磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 4 °C 条件下使用匀浆机制成组织匀浆 (10%, 质量体积比), 在 4 °C、2 500 r/min 下离心 10 min, 取上清液进行检测。使用生化检测试剂盒 (BC0345, 北京索莱宝科技有限公司) 测定糖原含量, 使用生化检

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence	用途 purpose
CgIL17-4-F	ACTTGTCCTGGGTTATGTGTAG	RT-qPCR
CgIL17-4-R	TCCAAGAGGAACACGGAGAC	RT-qPCR
CgIL17-5-F	TCTGGCTGACTCTCGTCTTG	RT-qPCR
CgIL17-5-R	GACCCTGTCGTTGCTCTACC	RT-qPCR
CgTNF-1-F	CTTCTCGTCTGCGGCTTCTTT	RT-qPCR
CgTNF-1-R	CAGGGCTGCGGTCTTTCC	RT-qPCR
CgTNF-2-F	CCACTACGCCACTAAGAAACTG	RT-qPCR
CgTNF-2-R	AAGCGACCATTGCGAACTCCAT	RT-qPCR
16S-341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	检测细菌总丰度
16S-534R	ATTACCGCGCTGCTGG	检测细菌总丰度
Vsp-F	GGCGTAAAGCGCATGCAGGT	检测细菌总丰度
Vsp-R	GAAATTCTACCCCTCTACAG	检测细菌总丰度

测试试剂盒 (F006-1-1, 南京建成科技有限公司) 测定葡萄糖含量。

### 1.6 氧化应激相关指标分析

取长牡蛎鳃组织 0.1 g 置于 PBS 中, 4 °C 条件下用匀浆机制成组织匀浆 (10%, 质量体积比), 在 4 °C、4 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液检测。使用生化检测试剂盒 (A003-1-2、A015-1-2、A001-3-2、A007-1-1, 南京建成科技有限公司) 分别测定丙二醛 (MDA) 含量、总抗氧化能力 (T-AOC)、总超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性。

### 1.7 细胞因子表达分析

采用 TRIzol™ Reagent (Invitrogen, 美国) 提取长牡蛎血淋巴细胞总 RNA, 利用电泳分析 RNA 完整性, 并用 NanoDrop 2000 测量样品的  $A_{260}/A_{280}$  比值, 以检验 RNA 纯度。采用 Trans-Script® 反转录试剂盒 (AT311-03, 北京全式金生物技术股份有限公司) 将 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 分析 (表 1)。根据已报道方法确定细胞因子绝对定量标准曲线<sup>[16]</sup>, 将 CT 值代入标准曲线, 得到 CgIL17-4、CgIL17-5、CgTNF-1 和 CgTNF-2 的 mRNA 表达量, 用于后续分析。

### 1.8 数据分析

本研究所有采样实验均设置 3 个重复, 所得数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 将本实验数据与已报道 2021 年研究数据进行对比<sup>[12]</sup>,

通过 IBM® SPSS statistics Version 25.0 软件进行 ANNOVA 变异数分析以及基于 LSD 最小显著差异法的多重比较或独立样本 *t* 检验。当 *P* 值小于 0.05 时, 认为具有显著差异, 多组数据间的差异性 ( $P < 0.05$ ) 使用不同字母 (a、b、c 等) 表示。

## 2 结果

### 2.1 水质理化因子变化

大连庄河市王家岛三倍体长牡蛎养殖海区的水质理化因子分析结果显示, 三次调查的海区表层水温分别为 20.6、21.3 和 24.9 °C, 呈逐渐上升趋势 (表 2)。S804 组调查的 DO 为 6.21 mg/L, 低于 S709 组调查的 6.83 mg/L 和 S723 组调查的 7.15 mg/L。三次调查的 S 分别为 28.83、29.69 和 29.39, 其中 S723 组和 S804 组调查的 S 较 S709 组调查水平有所升高。表层海水 pH 相对稳定, 三次调查结果分别为 7.78、7.70 和 7.83。表层海水营养盐浓度较为稳定, 其中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度为 (0.035±0.003)~(0.070±0.017) mg/L,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度为 (0.003±0.000)~(0.023±0.000) mg/L,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度为 (0.035±0.003)~(0.058±0.007) mg/L,  $\text{PO}_4^-\text{-P}$  浓度为 (0.010±0.003)~(0.020±0.000) mg/L,  $\text{SiO}_4^-\text{-Si}$  浓度为 (0.162±0.010)~(0.310±0.006) mg/L。

### 2.2 Chl.a 浓度和浮游微藻变化

表层海水 Chl.a 浓度在三次调查时分别为 (1.810±0.536)、(2.223±0.059) 和 (4.395±0.816)  $\mu\text{g/L}$ , 其中 S804 组调查结果相对 S723 组调查显著升高 ( $P < 0.05$ ), 增加至 1.98 倍 (表 3)。通过对饵料藻主要为硅藻 (Bacillariophyceae) 和甲

表 2 表层海水水质理化因子变化

Tab. 2 Water quality variation in surface seawater

水质理化因子 water quality	S709	S723	S804
表层T/°C surface T	20.6	21.3	24.2
DO/(mg/L)	6.83	7.15	6.21
S	28.83	29.65	29.39
pH	7.78	7.70	7.83
$\text{NH}_4^+\text{-N}/(\text{mg/L})$	0.070±0.017	0.054±0.002	0.035±0.003
$\text{NO}_2^-\text{-N}/(\text{mg/L})$	0.010±0.000	0.003±0.000	0.023±0.000
$\text{NO}_3^-\text{-N}/(\text{mg/L})$	—	0.058±0.007	0.035±0.003
$\text{PO}_4^-\text{-P}/(\text{mg/L})$	0.020±0.000	0.015±0.005	0.010±0.003
$\text{SiO}_4^-\text{-Si}/(\text{mg/L})$	0.310±0.006	0.234±0.010	0.162±0.010

注: “—”表示未检测, 下同。

Notes: “—” indicates undetected, the same below.

表 3 表层海水 Chl.a 浓度和浮游微藻丰度变化

Tab. 3 Variation of Chl.a concentration and planktonic microalgae abundance in surface seawater

浮游微藻 planktonic microalgae	S709	S723	S804
Chl.a/( $\mu\text{g/L}$ )	1.810 $\pm$ 0.536	2.223 $\pm$ 0.059	4.395 $\pm$ 0.816
硅藻/(个/L) Bacillariophyta	—	6.42 $\times$ 10 <sup>4</sup>	4.03 $\times$ 10 <sup>7</sup>
甲藻/(个/L) Pyrrophyta	—	7.40 $\times$ 10 <sup>3</sup>	2.00 $\times$ 10 <sup>5</sup>

藻 (Pyrrophyta) 的分析发现, S723 组调查时硅藻丰度约为  $6.42 \times 10^4$  个/L, 优势种为中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)。甲藻丰度约为  $7.40 \times 10^3$  个/L, 优势种为叉状角藻 (*Ceratium furca*) 和微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*)。S804 组

调查时硅藻丰度约为  $4.03 \times 10^7$  个/L, 优势种为大型硅藻, 如角毛藻 (*Chaetoceros* spp.) 和中肋骨条藻等。甲藻丰度约为  $2.00 \times 10^5$  个/L, 优势种多为小型甲藻。

### 2.3 水体和鳃中共生细菌丰度变化

通过表层养殖水体浮游细菌丰度分析发现, 三次调查时水体中细菌总丰度分别为  $3.93 \times 10^7$ 、 $2.26 \times 10^8$  和  $2.89 \times 10^9$  个/L, 呈显著上升趋势 ( $P < 0.05$ ) (图 1-a); 三次调查时水体中弧菌丰度分别为  $8.40 \times 10^5$ 、 $4.73 \times 10^6$  和  $8.20 \times 10^6$  个/L, 呈显著上升趋势 ( $P < 0.05$ ) (图 1-b)。S723 组和 S804 组调查时三倍体长牡蛎鳃中细菌总丰度分别为

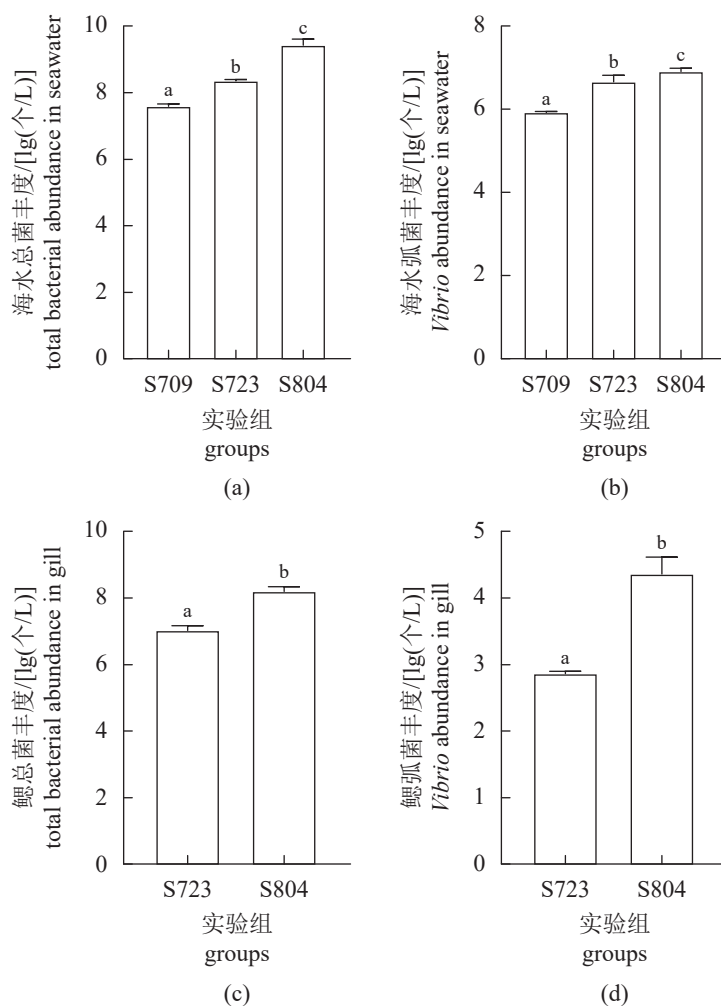


图 1 表层海水和长牡蛎鳃中细菌总丰度和弧菌丰度变化

(a) 表层海水中细菌总丰度, (b) 表层海水中弧菌丰度, (c) 长牡蛎鳃中细菌总丰度, (d) 长牡蛎鳃中弧菌丰度; 不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同。

Fig. 1 The abundance variation of total bacteria and *Vibrio* in the surface seawater and the gill of *C. gigas*

(a) total bacterial abundance in the surface seawater, (b) *Vibrio* abundance in the surface seawater, (c) total bacterial abundance in the gill of *C. gigas*, (d) *Vibrio* abundance in the gill of *C. gigas*; different lowercase letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ); the same below.

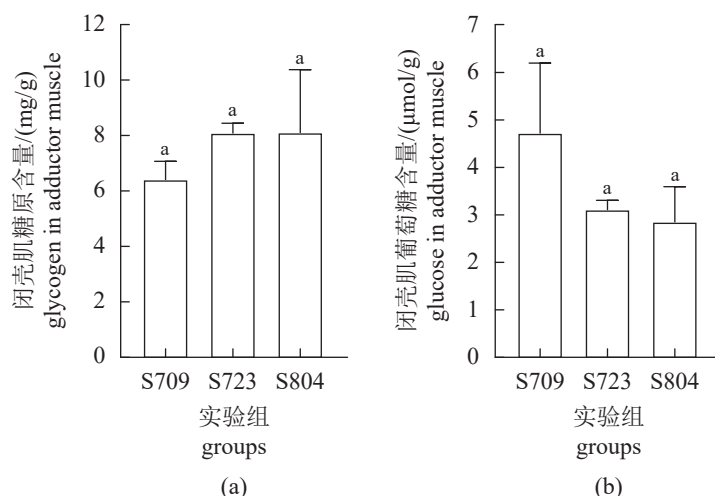


图2 长牡蛎闭壳肌中糖原和葡萄糖含量变化

(a) 闭壳肌糖原含量, (b) 闭壳肌葡萄糖含量。

Fig. 2 The content variation of glycogen and glucose in the adductor muscle of *C. gigas*

(a) glycogen content in adductor muscle, (b) glucose content in adductor muscle.

$1.10 \times 10^7$  和  $1.64 \times 10^8$  个/L, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 1-c); 三倍体长牡蛎鳃中弧菌丰度分别为 732.43 和  $2.26 \times 10^4$  个/L, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 1-d)。

#### 2.4 闭壳肌中糖原和葡萄糖含量变化

三倍体长牡蛎闭壳肌中糖原含量在三次调查期间呈上升趋势, 分别为 6.41、8.09 和 8.10 mg/g, 各样本间差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 2-a)。闭壳肌中葡萄糖含量在三次调查期间呈下降趋势, 分别为 4.72、3.11、2.86  $\mu\text{mol/g}$ , 各样本间差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 2-b)。

#### 2.5 鳃中氧化应激相关指标变化

在三次调查过程中, 三倍体长牡蛎鳃中 MDA 含量分别为 17.40、11.76 和 8.09 nmol/mg prot, 呈显著下降趋势 ( $P < 0.05$ ) (图 3-a)。三次调查中 CAT 活性分别为 18.03、52.66 和 6.71 U/mg prot, 其中 S723 组调查的 CAT 活性显著高于 S709 组和 S804 组调查结果 ( $P < 0.05$ ) (图 3-b)。三次调查中 SOD 活性分别为 42.36、80.37 和 274.97 U/mg prot, 呈显著下降趋势 ( $P < 0.05$ ) (图 3-c)。S723 组和 S804 组调查中 T-AOC 分别为 0.65 和 0.43 U/mg prot, 差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 3-d)。

#### 2.6 血淋巴细胞中细胞因子表达变化

在三次调查过程中, CgIL17-4 的 mRNA 表

达量为 2.95、3.58 和 2.61 lg(拷贝数/mL), S804 组调查结果显著低于前两次调查 ( $P < 0.05$ ) (图 4-a)。CgIL17-5 的 mRNA 表达量在 S709 组调查时为 4.63 lg(拷贝数/mL), S723 组调查和 S804 组调查分别为 3.30 和 3.22 lg(拷贝数/mL), 显著低于 S709 组调查结果 ( $P < 0.05$ ) (图 4-b)。CgTNF-1 的 mRNA 表达量分别为 4.50、4.00 和 4.57 lg(拷贝数/mL), S723 组调查结果相对 S709 组和 S804 组调查显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 4-c)。CgTNF-2 的 mRNA 表达量在三次调查时分别为 4.63、3.64 和 4.46 lg(拷贝数/mL), 其中 S723 组调查结果相对 S709 组和 S804 组调查显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 4-d)。

### 3 讨论

环境胁迫是导致北黄海养殖长牡蛎夏季病害发生的重要原因。温度是导致夏季大规模死亡的首要原因, 已有研究发现, 夏季当温度超过  $21^\circ\text{C}$  时, 会导致长牡蛎免疫功能低下和血淋巴细胞吞噬活性降低<sup>[17]</sup>。其次, DO 不足也会导致长牡蛎代谢紊乱, 从而造成机体损伤<sup>[18]</sup>。此外, pH 降低导致的水环境酸化, 造成长牡蛎血淋巴细胞凋亡和活性氧增加, 从而增加感染病害的风险<sup>[19]</sup>。本实验首先分析了夏季北黄海三倍体长牡蛎养殖海区水质理化因子的变化水平, 包括温度、DO、S 和营养盐浓度等。在温度方面, 7—8 月表层海水温度较正常水温偏高,

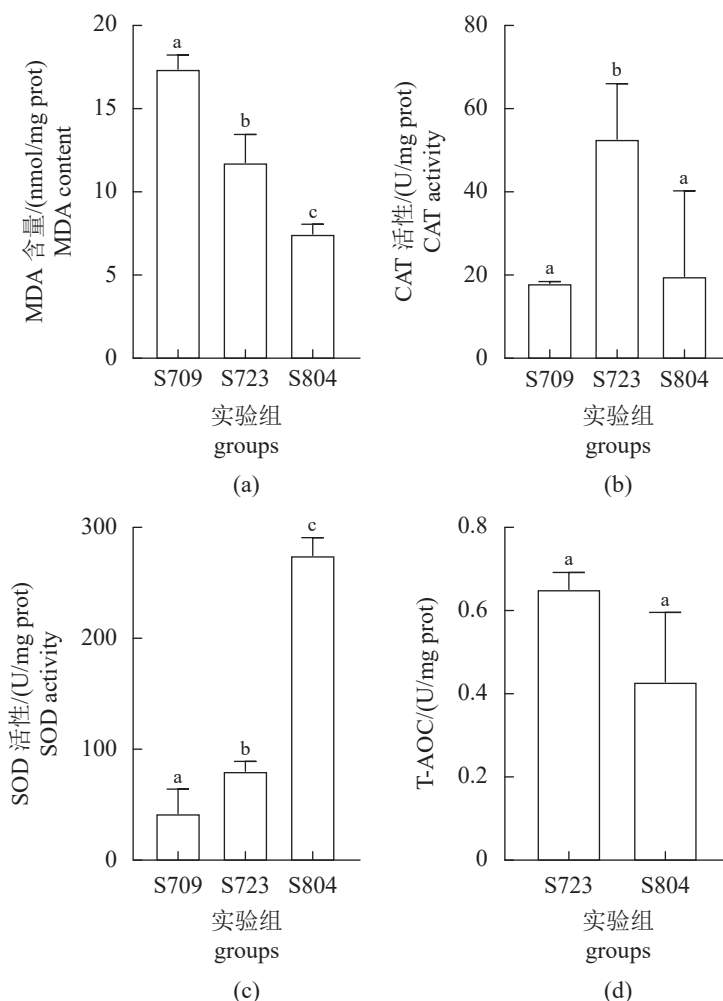


图3 长牡蛎鳃中氧化应激相关指标的变化

(a) MDA 含量, (b) CAT 活性, (c) SOD 活性, (d) T-AOC。

**Fig. 3** The variation of the parameters related to oxidative stress in the gill of *C. gigas*

(a) MDA content, (b) CAT activity, (c) SOD activity, (d) T-AOC.

并逐渐升高, 提示调查期间夏季水环境已对长牡蛎形成高温胁迫<sup>[20]</sup>, 且在7—8月间呈加剧趋势, 养殖风险较高。7—8月中水体DO变化范围为6.21~7.15 mg/L, S变化范围为28.83~29.65, 均处于正常水平<sup>[21-22]</sup>, 未形成明显环境胁迫。营养盐浓度均符合《海水水质标准》(GB 3097—1997)规定的第二类水质标准<sup>[23]</sup>, 未出现营养盐胁迫现象。因此, 在2023年7—8月典型高温时期, 三倍体长牡蛎养殖区主要表现为持续高温胁迫, 未出现DO、S和营养盐等其他环境胁迫。

养殖水体中的浮游微藻是长牡蛎主要的食物来源, 在本研究的7—8月中, 受夏季高温和充足光照影响, 水体Chl.a浓度呈上升趋势。然而, 本研究中Chl.a浓度为1.810~4.395 μg/L,

低于2021年报道的同一海区养殖二倍体长牡蛎的水体Chl.a浓度(1.448~5.505 μg/L)<sup>[12]</sup>。已有研究发现, 三倍体长牡蛎相对二倍体拥有更高的摄食率和饵料代谢率<sup>[24]</sup>, 其生长性状(壳高和个体重量等)显著优于二倍体长牡蛎<sup>[25]</sup>。本实验调查研究的三倍体长牡蛎养殖海域总面积为200~266 hm<sup>2</sup>, 与已报道的2021年二倍体长牡蛎养殖海域总面积基本一致, 2021和2023年中该养殖海区的水文气象和养殖密度等因素变化较小, 因此推测三倍体长牡蛎较高的摄食率可能是导致养殖海区Chl.a浓度下降的原因之一, 提示养殖从业人员应合理控制三倍体长牡蛎的养殖容量。

水环境和组织共生细菌的丰度水平, 特别是潜在病原菌的丰度与养殖长牡蛎健康水平密

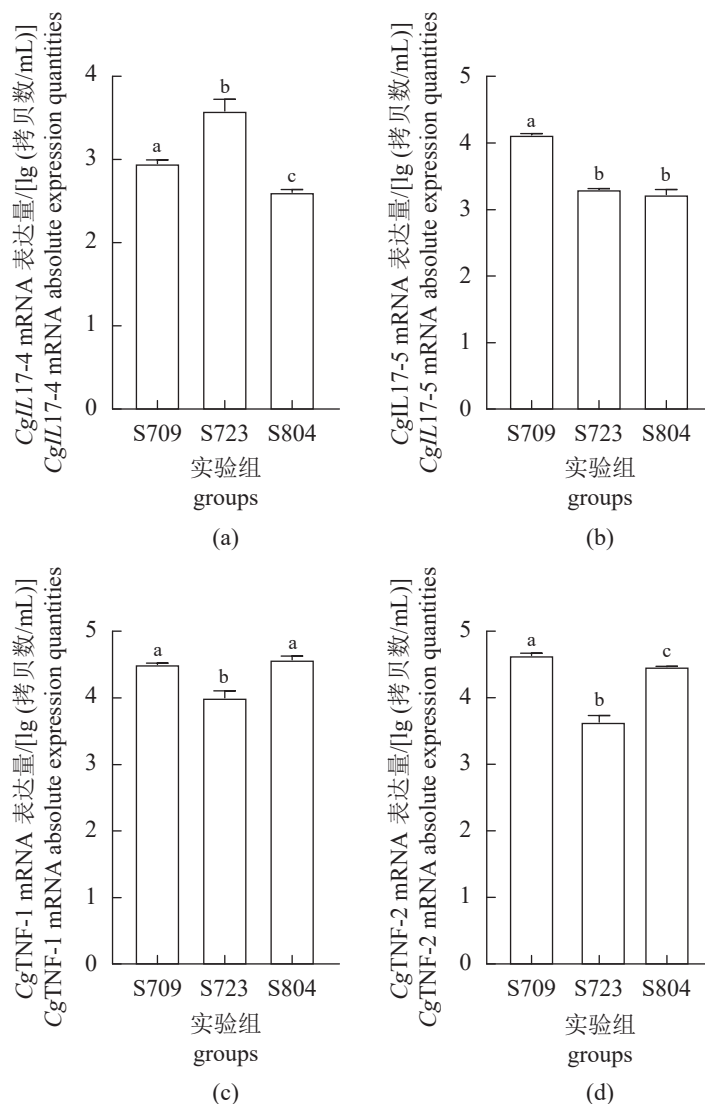


图4 长牡蛎血淋巴细胞中细胞因子 mRNA 表达变化

Fig. 4 The mRNA absolute expression quantities of haemocyte cytokines in *C. gigas*

(a) CgIL17-4 mRNA, (b) CgIL17-5 mRNA, (c) CgTNF-1 mRNA, (d) CgTNF-2 mRNA.

切相关<sup>[26]</sup>, 常处于动态变化和平衡之中。本研究重点检测了水体中和三倍体长牡蛎鳃中共生的细菌总丰度和潜在病原菌——弧菌<sup>[27]</sup>的丰度变化。结果发现水体中和鳃中共生的细菌总丰度在调查期间呈上升趋势, 这可能是由水体温度升高促进细菌大量繁殖导致的<sup>[28]</sup>。值得注意的是, 三倍体长牡蛎鳃中共生弧菌的丰度 ( $732.43 \sim 2.26 \times 10^4$  个/L) 明显低于 2021 年调研的二倍体长牡蛎鳃中共生弧菌的丰度 ( $3.62 \times 10^8 \sim 6.73 \times 10^9$  个/L)。这一方面可能是由于本次调查时水体中弧菌丰度 ( $8.40 \times 10^5 \sim 8.20 \times 10^6$  个/L) 较 2021 年调研时水体弧菌丰度 ( $3.37 \times 10^8 \sim 5.40 \times 10^8$  个/L) 偏低, 另一方面可能是由于三倍体长牡蛎

对环境病原菌具有更高的抗性<sup>[29]</sup>。已有研究表明, 三倍体长牡蛎体内弧菌丰度常低于二倍体长牡蛎<sup>[30]</sup>, 养殖三倍体长牡蛎具有更强的抗逆性, 能够适应更为复杂的水体环境, 提升自身生存率。结果提示三倍体长牡蛎相较二倍体可能具有更低的组织共生弧菌丰度水平。

糖原是双壳类软体动物体内重要的储能物质, 能够为机体生理代谢和胁迫应答过程提供能量。长牡蛎在遭受环境胁迫时, 会加快糖原等物质的代谢速率, 通过牺牲能量储备满足胁迫应答过程中的能量需求<sup>[31]</sup>, 而当糖原储存不足时, 也常导致长牡蛎抗逆能力减弱而出现损伤或死亡。在本研究中, 三倍体长牡蛎糖原含

量变化范围为 6.41~8.10 mg/g, 且在夏季调查期间呈逐渐上升趋势, 这与二倍体长牡蛎在夏季的糖原含量变化规律表现出明显差异。二倍体长牡蛎在夏季时组织糖原含量明显降低, 其最低值常出现在 6 月下旬至 7 月<sup>[32]</sup>。然而, 三倍体长牡蛎性腺在夏季基本不发育, 原本用于性腺发育和繁殖的能量可以被节省并转化为糖原积累<sup>[33]</sup>。已有研究表明, 三倍体长牡蛎在夏季繁殖期的糖原含量明显较高, 是二倍体长牡蛎糖原含量的 2 倍<sup>[9]</sup>。因此, 研究结果提示三倍体长牡蛎的夏季能量代谢模式较二倍体长牡蛎有较大不同, 能够积累较多糖原用于生理代谢和环境胁迫应答。

高温等环境胁迫激活生物的抗氧化防御过程, 并可能导致氧化应激, 造成多种生物大分子损伤, 进而导致组织损伤或死亡<sup>[34]</sup>。目前抗氧化酶活性、总抗氧化能力等氧化应激指标被广泛用于评价各种生物的氧化应激状态。在本研究的调查过程中, SOD 和 CAT 的活性在高温胁迫持续过程中升高, 说明机体启动了抗氧化防御过程, 而 MDA 含量在 7—8 月中呈显著下降趋势, 说明机体应激水平没有随高温胁迫的持续而加剧。然而, 2021 年同一海区养殖的二倍体长牡蛎在夏季具有明显的抗氧化特征, 并形成了轻度氧化应激。已有研究发现, 三倍体长牡蛎通过强化抗氧化防御能力来增强其抗逆性<sup>[35]</sup>, 在抵御环境胁迫时其氧化应激水平明显低于二倍体长牡蛎<sup>[36]</sup>, 能够更好地适应环境变化。但也有报道指出, 三倍体长牡蛎和二倍体长牡蛎在抗氧化能力方面无显著差异<sup>[37]</sup>。以上结果提示, 三倍体长牡蛎在夏季可能具有更高的抗氧化防御能力, 能够明显降低氧化应激发生。

长牡蛎在遭受病原刺激后, 通过释放细胞因子启动免疫防御和应答过程, 细胞因子的变化水平是免疫系统稳态和平衡的重要指标<sup>[38]</sup>, 能够指示长牡蛎机体健康状态。在本研究中, 实验检测了 CgIL17-4、CgIL17-5、CgTNF-1 和 CgTNF-2 4 个与免疫响应状态相关的细胞因子在 7—8 月中的 mRNA 表达量变化<sup>[15, 39]</sup>, 发现在夏季高温胁迫过程中, 三倍体长牡蛎的 4 个细胞因子的表达量未见显著差异, 而在已报道的 2021 年夏季同一海区调查中, 发现二倍体长牡蛎出现了较强的免疫响应。已有研究表明, 三

倍体长牡蛎的血淋巴细胞免疫功能(吞噬功能、细胞凋亡水平等)明显强于二倍体长牡蛎<sup>[40]</sup>。同时, 在三倍体大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中也观察到了更强的抗病毒机制, 其病毒 DNA 积累速度较慢, 病毒 RNA 总拷贝数较低, 吞噬细胞更加活跃<sup>[41]</sup>。因此, 三倍体长牡蛎可能具有更加充分的免疫防御功能和更高的抗逆水平<sup>[41]</sup>。

综上, 2023 年 7—8 月北黄海三倍体长牡蛎养殖海区水体出现高温胁迫, Chl.a 浓度、水体和三倍体长牡蛎鳃中共生弧菌丰度均低于 2021 年同期水平, 闭壳肌糖原含量未见明显下降, 鳃中氧化应激水平和血淋巴细胞中细胞因子 CgIL17-4、CgIL17-5、CgTNF-1 和 CgTNF-2 的表达量未见显著差异。研究结果有助于进一步解析夏季养殖三倍体长牡蛎的健康和环境变化特征, 为防控夏季贝类大规模死亡提供理论依据。

#### 参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 22-23.  
Bureau of Fisheries and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 22-23 (in Chinese).
- [2] 张国范, 王子臣, 常亚青, 等. 三倍体长牡蛎浮筏养殖技术的研究 [J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 68-72.  
Zhang G F, Wang Z C, Chang Y Q, et al. Suspended longline farming in triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(1): 68-72 (in Chinese).
- [3] 尤仲杰, 徐善良, 骆其君, 等. 三倍体太平洋牡蛎垂下式养殖研究 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2002, 21(1): 6-8.  
You Z J, Xu S L, Luo Q J, et al. Studies on the suspended longline farming in triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2002, 21(1): 6-8 (in Chinese).
- [4] 董璐瑶, 赵丽艳, 张恩烁, 等. 不同倍性长牡蛎闭壳肌和精子的组织学和超微结构观察 [J]. 中国水产科学, 2023, 30(4): 433-446.  
Dong L Y, Zhao L Y, Zhang E S, et al. Histological and ultra-structural observation of adductor and sperm of *Crassostrea*



- gigas* with different ploidy[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(4): 433-446 (in Chinese).
- [ 5 ] Guo X M. Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2009, 1(3 - 4): 251-259.
- [ 6 ] 徐雯雯, 郑富强, 于成松, 等. 乳山牡蛎产业发展报告 [J]. 中国水产, 2021(12): 65-70.  
Xu W W, Zheng F Q, Yu C S, *et al.* Report on the development of oyster industry in Rushan[J]. China Fisheries, 2021(12): 65-70 (in Chinese).
- [ 7 ] Park K A, Lee E Y, Chang E, *et al.* Spatial and temporal variability of sea surface temperature and warming trends in the Yellow Sea[J]. Journal of Marine Systems, 2015, 143: 24-38.
- [ 8 ] Samain J F, Dégremont L, Soletchnik P, *et al.* Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes[J]. Aquaculture, 2007, 268(1-4): 227-243.
- [ 9 ] Allen Jr S K, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1986, 102(2-3): 197-208.
- [10] Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 125(3): 359-369.
- [11] 王朔, 薛茗元, 杨璐, 等. 不同育性三倍体长牡蛎性腺发育过程中的营养成分比较 [J]. 水产学报, 2021, 45(1): 88-97.  
Wang S, Xue M Y, Yang Q, *et al.* Comparison of nutritional components of different fertility triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during gonadal development[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(1): 88-97 (in Chinese).
- [12] 高磊, 孔宁, 刘再阳, 等. 夏季北黄海贝类养殖区环境因子、长牡蛎糖原和免疫指标变化的调查 [J]. 水产学报, 2024, 48(4): 049413.  
Gao L, Kong N, Liu R Y, *et al.* Investigation on the variation of environmental factors, glycogen and immune parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in the North Yellow Sea shellfish farming area in summer[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 049413 (in Chinese).
- [13] Lorenzen C J. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations[J]. Limnology, 1967, 12(2): 343-346.
- [14] Liang Y, Zhang G T, Wan A Y, *et al.* Nutrient-limitation induced diatom-dinoflagellate shift of spring phytoplankton community in an offshore shellfish farming area[J]. Marine Pollution Bulletin, 2019, 141: 1-8.
- [15] Langlet J, Kaas L, Greening G. Binding-based RT-qPCR assay to assess binding patterns of noroviruses to shellfish[J]. Food and Environmental Virology, 2015, 7(2): 88-95.
- [16] Zhang Z Y, Gao L, Li Q S, *et al.* The different expression patterns of cytokines in Pacific oyster *Crassostrea gigas* response against bacterial stimulation[J]. Aquaculture, 2023, 575: 739743.
- [17] Malham S K, Cotter E, O'Keeffe S, *et al.* Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival[J]. Aquaculture, 2009, 287(1-2): 128-138.
- [18] Coffin M R S, Clements J C, Comeau L A, *et al.* The killer within: endogenous bacteria accelerate oyster mortality during sustained anoxia[J]. Limnology and Oceanography, 2021, 66(7): 2885-2900.
- [19] Wang Q, Cao R W, Ning X X, *et al.* Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 24-33.
- [20] Meistertzheim A L, Tanguy A, Moraga D, *et al.* Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(24): 6392-6402.
- [21] 廉伟, 温海深, 毛玉泽, 等. 长牡蛎夏季死亡与养殖环境及自身体质关系的初步研究 [J]. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 92-100.  
Lian W, Wen H S, Mao Y Z, *et al.* Study on the relationship between Pacific oyster *Crassostrea gigas* summer mortality with culture environment and organism condition[J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(4): 92-100 (in Chinese).
- [22] 石强. 北黄海夏季温盐年际变化时空模态与气候响应 [J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(4): 469-483.  
Shi Q. Climate response and spatio-temporal modes on the interannual summer changes of temperature-salinity in North Yellow Sea[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(4): 469-483 (in Chinese).
- [23] 国家环境保护局. 海水水质标准: GB 3097—1997[S]. 北京: 环境科学出版社, 2004.  
State Environmental Protection Administration. Sea water quality standard: GB 3097-1997[S]. Beijing: China Environmental

- Science Press, 2004 (in Chinese).
- [24] Hawkins A J S, Magoulas A, Héral M, *et al.* Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Genetics Research*, 2000, 76(3): 273-284.
- [25] Chi Y, Xu C X, Li Q. Influence of ploidy, genetic and environment on production traits of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 2024, 586: 740756.
- [26] 卢钰博. 牡蛎养殖区生态环境调查及影响单体三倍体牡蛎生长的因素 [D]. 烟台: 烟台大学, 2021.
- Lu Y B. Investigation of ecological environment in oyster aquaculture areas and the factors affecting the growth of cultureless triploid oysters[D]. Yantai: Yantai University, 2021 (in Chinese).
- [27] Wang H B, Yang B, Li X, *et al.* Screening of bacterial pathogens associated with mass summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in China[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100672.
- [28] Oberbeckmann S, Fuchs B M, Meiners M, *et al.* Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(3): 543-551.
- [29] 李伟伟, 姜妮妮, 蒋增杰, 等. 夏季高温期三倍体和二倍体长牡蛎生理能量学及碳收支的比较研究 [J]. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 125-134.
- Li W W, Jiang W W, Jiang Z J, *et al.* Comparative study on the feeding metabolism and carbon budget of the triploid and diploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 125-134 (in Chinese).
- [30] Walton W C, Rikard F S, Chaplin G I, *et al.* Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: survival, growth, shape, condition index and *Vibrio* abundances[J]. *Aquaculture*, 2013, 414-415: 260-266.
- [31] Wang X Q, Wang L L, Zhang H, *et al.* Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 1016-1026.
- [32] Patrick S, Faury N, Gouletquer P. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France)[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 328-338.
- [33] Shpigiel M, Barber B J, Mann R. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1992, 161(1): 15-25.
- [34] Xing Z, Gao L, Liu R Y, *et al.* The oxidative stress of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under high-temperature stress[J]. *Aquaculture*, 2023, 577: 739998.
- [35] Samain J F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality[J]. *Aquatic Living Resources*, 2011, 24(3): 227-236.
- [36] Mosca F, Tiscar P G, Hattab J, *et al.* *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) cultivation in southern Adriatic Sea (Italy): a one-year monitoring study of the oyster health[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(6): 2879-2890.
- [37] Li Y G, Xu C X, Li Q. Physiological and gene expression responses of diploid and triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to heat acclimation[J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(18): 6641-6650.
- [38] Duchemin M B, Fournier M, Auffret M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. *Aquaculture*, 2007, 264(1-4): 73-81.
- [39] 孟广玮, 李琪, 徐成勋, 等. 高温胁迫对长牡蛎‘海大3号’品系存活及5项免疫指标的影响 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 738-744.
- Meng G W, Li Q, Xu C X, *et al.* Effects of high-temperature stress on survival and five immune indicators of Pacific oyster ‘Haida No. 3’[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 738-744 (in Chinese).
- [40] Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, *et al.* Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 606-616.
- [41] Brianik C J, Allam B. The need for more information on the resistance to biological and environmental stressors in triploid oysters[J]. *Aquaculture*, 2023, 577: 739913.

## Investigation and research on the cultivation environment and health index of triploid *Crassostrea gigas* in the North Yellow Sea during summer

GE Ping'an<sup>1</sup>, GAO Lei<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>1</sup>, ZHOU Keli<sup>1</sup>, LI Lei<sup>2</sup>,  
WANG Lingling<sup>1</sup>, SONG Linsheng<sup>1\*</sup>

1. Liaoning Key Laboratory of Marine Animal Immunology,  
Liaoning Key Laboratory of Marine Animal Immunology and Disease Control,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;  
2. Dalian Yuyang Group Co., Ltd., Dalian 116499, China

**Abstract:** This study conducted three surveys in the floating raft cultivation area of triploid oysters in Wangjiadao Town (123.07°E, 39.45°N), Zhuanghe City, Liaoning Province, from July to August 2023, to elucidate the cultivation environment and health characteristics of the triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* in the North Yellow Sea during summer. The results revealed that the surface water temperature in the surveyed area ranged from 20.6 to 24.2 °C, posing high-temperature stress on *C. gigas*. The pH of surface seawater remained relatively stable, ranging from 7.70 to 7.83 across the three surveys. The average concentration of Chl.a in the water was 1.810 to 4.395 µg/L, which was lower than that reported in the same area for diploid oysters during the same period in 2021. The abundance levels of total bacteria in the water and in the gill tissues of triploid oysters ranged from  $3.93 \times 10^7$  to  $2.89 \times 10^9$  cells/L and  $1.10 \times 10^7$  to  $1.64 \times 10^8$  cells/L, respectively. The abundance levels of *Vibrio* species in the water and gill tissues of triploid oysters ranged from  $8.40 \times 10^5$  to  $8.20 \times 10^6$  cells/L and from 732.43 to  $2.26 \times 10^4$  cells/L, respectively, both of which were lower than those in the same period in 2021. During the three surveys, the glycogen content of the adductor muscle of triploid oysters increased gradually, with values of 6.41, 8.09, and 8.10 mg/g, respectively. The glucose content in the adductor muscle of triploid oysters was 4.72, 3.11, and 2.86 µmol/g, respectively, with no significant differences among samples ( $P > 0.05$ ). The MDA content in the gills decreased significantly, with values of 17.40, 11.76, and 8.09 nmol/mg prot, respectively ( $P < 0.05$ ). There was no sustained differential expression of cytokine mRNA in haemocytes. In summary, the water in the cultivation area of triploid oysters in the North Yellow Sea experienced high-temperature stress during the summer of 2023, with Chl.a concentration and *Vibrio* abundance in water and gill tissue lower than those in the same period in 2021. The glycogen storage level in the adductor muscle did not show a significant decrease, and there were no apparent abnormalities in the oxidative stress levels in the gill tissues and the expression of cytokines in haemocytes. These findings contribute to a comprehensive understanding of triploid oysters' health and environmental changes in summer cultivation, providing a theoretical basis for preventing and controlling large-scale mortality in summer and promoting the green and high-quality development of the shellfish industry.

**Key words:** triploid *Crassostrea gigas*; summer high temperature; glycogen; cytokines; malondialdehyde, MDA; the North Yellow Sea

**Corresponding author:** SONG Linsheng. E-mail: [lshsong@dlou.edu.cn](mailto:lshsong@dlou.edu.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41961124009, 32320110); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-49); Outstanding Talents and Innovative Team of Agricultural Scientific Research; the Scientific Research Foundation of Higher Education Institutions of Liaoning Province (JYTMS20230468)