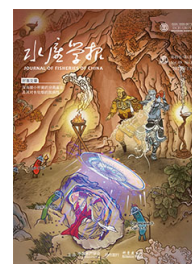


DOI: 10.11964/jfc.20230714082

氧化三甲胺饲料强化对三疣梭子蟹蜕壳及在低盐下存活和渗透调节的影响



吴岑艳¹, 林维钊¹, 史策^{1,2}, 母昌考¹, 王春琳¹, 叶央芳^{1*}

1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学, 水产生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832

第一作者: 吴岑艳, 从事三疣梭子蟹健康养殖技术研究, E-mail: 513495017@qq.com

摘要:

【目的】探究氧化三甲胺(TMAO)对三疣梭子蟹在低盐下存活和渗透调节的影响。

【方法】采用不同浓度的TMAO(0、0.2%、0.4%和0.8%)饲料强化三疣梭子蟹幼蟹15 d, 并进行急性低盐(盐度为4)胁迫。

【结果】饲料添加TMAO能提高三疣梭子蟹的蜕壳率, 其中0.8% TMAO添加组的幼蟹蜕壳率提高最明显, 在第15天时达到最大值(53.9%±0.4%)。经TMAO强化后, 三疣梭子蟹在低盐下的存活率都有所提高。其中0.2% TMAO添加组强化效果最好, 低盐胁迫216 h的存活率可达75%, 显著高于对照水平。此外, 经TMAO强化的三疣梭子蟹在低盐下都具有相对较高的血清渗透压、后鳃Na⁺-K⁺-ATP酶活性及其α亚基基因表达水平和各组织的TMAO累积量。

【结论】TMAO强化可提高三疣梭子蟹在低盐下的存活率, 可能与TMAO促进三疣梭子蟹蜕壳, 增强无机离子和渗透调节物质参与的渗透压调节有关。

关键词: 三疣梭子蟹; 低盐; 存活; 氧化三甲胺; 渗透调节



通信作者: 叶央芳, 从事蟹类代谢和微生态调控机制研究。现任中国生物物理学会代谢组学分会理事。先后主持国家自然科学基金青年基金1项(2012年)和面上项目3项(2017年、2021年和2024年), E-mail: yeyangfang@nbu.edu.cn

资助项目: 国家自然科学基金(32373150); 浙江省农业重大技术协同推广计划(2020XTTGSC03)

收稿日期: 2023-07-16

修回日期: 2024-03-12

文章编号:

1000-0615(2025)01-019609-10

中图分类号: S 963.73

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)

盐度是水产养殖环境中的一个重要理化因子, 影响着甲壳类动物的地理分布、生理功能和生存状态^[1-2]。随着水体环境的盐度变化, 甲壳类动物体内的渗透压也会随之改变^[3]。甲壳类动物适应水域盐度变化的生理途径是进行自主的渗透调节。无机离子是甲壳类动物形成渗透压的物质之一, 甲壳类动物通过鳃与外界的离子转运交换达到体内的渗透平衡^[4-5]。离子转运酶负责离子在细胞内外的转运^[6]。甲壳类动物的离子转运酶有Na⁺-K⁺-ATP酶、V-ATP酶和HCO₃⁻-ATP酶等, 其中Na⁺-K⁺-ATP酶是最关键的离子转运酶, 负责细胞内外Na⁺和K⁺的转运, 对维持动物细胞的渗透平衡具有重要作用^[7]。除无机离子外, 渗透调节物质在调节细胞的渗透压方面也发挥着重要作用^[8]。渗透调节物质是一类能增强细胞抵抗渗透压能力的小分子有机化合物^[9]。根据化学结构的不同, 渗透调节物质可分为多元醇类和糖、氨基酸及其衍生物以及甲胺类化合物^[10]。其中三甲胺氧化物(TMAO)属于甲胺类渗透调节物质, 广泛存在于海洋动物中^[11-14]。TMAO可能与海洋动物的



渗透调节有关, 如海水生活的鳎 *Pleuronectes flesus* 肌肉 TMAO 水平约比适应于淡水生活的鳎肌肉水平高 1 倍^[15]。

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是我国重要的海水养殖经济蟹类。虽然三疣梭子蟹是一种广盐性物种, 但适宜的生长盐度为 20~35, 过低的盐度会导致三疣梭子蟹生长缓慢、发育延滞和存活率下降。如三疣梭子蟹 II 期幼蟹在盐度为 11 的条件下胁迫 120 h 存活率为 40%; 而在盐度为 9 的条件下胁迫 96 h 存活率为 35%。低盐度 (11.7) 会导致 V 期幼蟹的变态率降至 13.33%, 并伴随着蜕壳未遂, 直至死亡^[16]。三疣梭子蟹的养殖区主要分布在我国东南沿海的近海海域, 且多为开放式池塘, 养殖水体很容易受到外界环境因子的干扰, 如台风过境时的大规模降水和水坝泄洪等, 均可导致水体盐度的急剧下降。如何提高三疣梭子蟹在低盐下的存活率并生长, 成为三疣梭子蟹养殖中的一个难题。

TMAO 是三疣梭子蟹遭受低盐胁迫时肌肉中最主要累积的小分子有机化合物, 可能是三疣梭子蟹在低盐下存活的代谢响应策略^[17]。预先进行 TMAO 强化可能可以提高三疣梭子蟹的低盐耐受能力。为验证这个假设, 本实验对三疣梭子蟹幼蟹进行了为期 15 d 的不同浓度的 TMAO (0、0.2%、0.4% 和 0.8%) 饲喂强化, 再进行三疣梭子蟹的低盐 (4) 胁迫实验。通过比较分析三疣梭子蟹的蜕壳率和在低盐下的存活率、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATP}$ 酶及其基因表达和各组织中的 TMAO 含量, 以探究 TMAO 在提高三疣梭子蟹耐低盐能力中的作用, 为三疣梭子蟹在低盐下养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三疣梭子蟹幼蟹共 260 只 (15.0 ± 3.5) g, 于 2022 年 7 月购自宁波市咸祥一水产养殖场, 以避光和充氧的方式运至宁波大学中试基地。把每只蟹放入四周带小孔的塑料篮中 (长 30.0 cm×宽 20.5 cm×高 12.5 cm), 并随机平均分配到 4 个帆布池中 (长 1.5 m×宽 1.0 m×高 0.8 m), 每个帆布池装有 500 L 天然海水 (pH 8.1, 盐度 26)。对海水进行 24 h 曝气, 使溶解氧维持在 5 mg/L

以上。每日 16:00—17:00 按蟹体重的 5% 喂食基础配合饲料 (宁波天邦股份有限公司)。基础配合饲料的主要营养成分包括粗蛋白 ($\geq 40\%$), 粗脂肪 ($\geq 6\%$)、粗纤维 ($\geq 5\%$)、粗灰分 ($\geq 18\%$)、水 ($\geq 12\%$)、总磷 ($\geq 1.2\%$) 和赖氨酸 ($\geq 2\%$)。喂食后 1 h 检查蟹的蜕壳和死亡情况, 捞出残饵、死蟹以及蜕下的壳, 同时视情况换水 30%~50%。暂养 1 周后用于 TMAO 添加实验。

TMAO (化学纯, 纯度 97%) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。氯仿、异丙醇、乙醇和 0.9% 的生理盐水购自国药集团。螃蟹 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATP}$ 酶 ELISA 检测试剂盒和 TMAO 的 ELISA 检测试剂盒购自上海桥社生物科技有限公司。总 RNA 提取试剂盒购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司, 反转录试剂盒和 Magic-SYBR Mixture 试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司, 定量 PCR 试剂盒购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。

手持式组织匀浆机 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国); LightCycler[®]480 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士); 渗透压仪 Fiske 210 (ADVANCED, 美国); Spectra Max 酶标仪 (Molecular Devices, 美国)。

1.2 实验方法

实验设置和样品采集 三疣梭子蟹在低盐胁迫后肌肉 TMAO 含量为 1 mg/g ^[17], 根据饲料投喂量, 设置 TMAO 在饲料中的 3 种添加量分别为 0.2%、0.4% 和 0.8%, 并以不添加 TMAO 的饲料为对照 (CK)。采用喷洒法把 TMAO 添加到饲料, 即把特定浓度的 TMAO 水溶液均匀地喷洒至颗粒饲料表面, 待自然阴干后, 用封口袋密封, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。把暂养后的三疣梭子蟹随机分布到 12 个帆布池中 (长 1.5 m×宽 1.0 m×高 0.8 m), 每个帆布池 20 只。每 3 个帆布池为 1 组, 共 4 组。对每组幼蟹分别投喂上述 4 种不同浓度的 TMAO 饲料。设置 TMAO 强化投喂时间为 15 d, 养殖管理同暂养。每天观察和记录幼蟹的蜕壳和死亡情况。强化结束后, 把每个帆布池的海水换成 500 L 低盐度海水 (pH 8.1, 盐度 4), 对幼蟹进行急性低盐胁迫。分别于胁迫 6、12、24、48、72 和 216 h 从每个帆布池中随机取 2 只健康活泼的幼蟹, 得到每组的重复数 $n=6$ (3 个养殖池重复,

2个幼蟹重复)。把采集的幼蟹置于冰水中麻醉后, 用1 mL注射器在游泳足基膜处抽取1 mL血淋巴, 置于1.5 mL离心管中。再采集鳃(后3对)、肌肉和肠道组织, 分别置于冻存管中, 于-80 °C保存备用。在低盐胁迫期间, 对幼蟹不喂食, 其他养殖管理同暂养, 观察和记录各取样时间段蟹的死亡情况。

蜕壳率及存活指标分析 TMAO强化过程中的幼蟹蜕壳率计算公式: 蜕壳率(%) = 蜕壳的幼蟹数/幼蟹总数×100%。用Kaplan-Meier生存概率 $S(t_i)$ 估计幼蟹在低盐下的生存率, 公式: $S(t_i) = S(t_{i-1})(1-d_i/n_i)$ 。式中, t_i 表示第*i*个时间点, d_i 表示事件在 t_i 时间点发生的数目(只), n_i 表示在 t_i 时间点的幼蟹存活总数(只)。

渗透压的测定 血淋巴样品在4 °C下静置过夜, 将凝血块戳破, 在3 000 r/min下离心5 min, 收集上清液。取20 μL血清用冰点渗透压仪Fiske 210测定渗透压。

Na⁺-K⁺ATP酶活性测定 按照螃蟹Na⁺-K⁺ATP酶ELISA检测试剂盒的操作步骤测定血清的Na⁺-K⁺ATP酶活性。

Na⁺-K⁺ATP酶α亚基的qPCR分析 取0.1 g鳃组织样品, 根据总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA, 使用Nanodrop 2000超微量分光光度计评估RNA质量。根据RNA反转录试剂盒说明书, 将RNA反转录成第一链cDNA, 使用Na⁺-K⁺ATP酶α亚基基因特征性引物对F4(CAAGTGCCGTTCTGCTGGT)和R4(CTTGATGGGAATGTTGAGTCTTTG)^[18]进行PCR扩增。PCR反应体系为20 μL, 其中2 μL cDNA、1 μL正向/反向引物(10 μmol/L)、6 μL ddH₂O和10 μL SYBR Premix Ex Taq MasterMix (2×)。PCR反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火/延伸34 s, 40个循环。以18S rRNA基因为内参基因, 引物序列为18S-F(AGGAGGAGGTTGAGAAGATTGT)和18S-R(GCAGCTTGGTTTCCAGGTAG)。使用2^{-ΔΔC_t}方法计算目的基因mRNA相对表达量。定量PCR试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

TMAO测定 按照螃蟹TMAO ELISA检测试剂盒的操作步骤测定低盐胁迫下幼蟹各组织的TMAO含量。

数据分析 幼蟹的生存概率采用Log-

rank (Mantel-Cox) test 总体检验进行生存数据分析。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)统计数据在组间的显著性差异, 以 $P < 0.05$ 为组间差异达到显著水平, 最后通过GraphPad Prism 8.0软件作图。实验过程中操作人员严格遵守宁波大学实验动物伦理规范, 并按照宁波大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

2 结果

2.1 TMAO添加对三疣梭子蟹蜕壳的影响

TMAO添加能提高三疣梭子蟹幼蟹在正常盐度下的蜕壳率(图1)。从养殖第4天开始, TMAO添加组幼蟹的蜕壳率逐渐提高, 其中高浓度TMAO(0.8%)组幼蟹的蜕壳率提高最显著, 在第15天时达到最大值(53.9%±0.4%), 显著高于对照组和其他2个添加组($P < 0.05$)。相比之下, 中、低浓度TMAO添加对幼蟹蜕壳率的影响较小, 且中浓度TMAO的影响总体上低于低浓度TMAO, 但在15 d强化后两组幼蟹的蜕壳率都达到约40%, 且显著高于对照水平($P < 0.05$)。

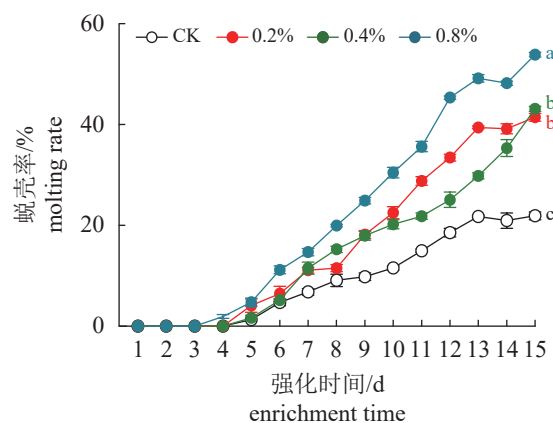


图1 TMAO添加对三疣梭子蟹在正常盐度下蜕壳率的影响

不同小写字母表示同一时间组间存在显著差异($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effect of TMAO addition on the molting rate of *P. trituberculatus* under normal salinity condition

Different lowercase letters indicate significant difference between groups at the same time ($P < 0.05$), the same below.

2.2 TMAO强化对三疣梭子蟹在低盐下存活的影响

为揭示TMAO强化是否能提高三疣梭子蟹幼蟹在低盐下的存活能力, 本研究观察了经TMAO强化15 d的幼蟹在盐度骤降到4后的存活情况。结果发现, 经TMAO强化后的幼蟹在

低盐下的存活率并未快速提高, 而是在适应一段时间后才开始显示出存活优势 (图 2), 且是低浓度 TMAO 组率先在 48 h 内稳定存活率, 216 h 的存活率达 75%, 为 4 个组中最高, 显著高于对照水平 ($P < 0.05$)。中浓度和高浓度组幼蟹的存活率分别在低盐胁迫 48 和 12 h 后不再下降, 216 h 的存活率约为 60%, 高出对照水平 21.5%。

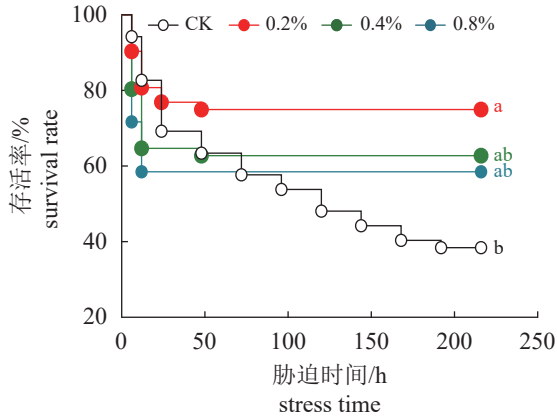


图 2 TMAO 强化后三疣梭子蟹低盐存活率
Fig. 2 Survival rate of *P. trituberculatus* under low salinity condition after TMAO enrichment

2.3 TMAO 强化对低盐下三疣梭子蟹血清渗透压的影响

实验测定了幼蟹血清渗透压在低盐下的时序变化, 结果发现, 在未添加 TMAO 的对照幼蟹进入低盐环境后, 血清渗透压从正常的 729.4 mOsm/kg 直接降至 400.80 mOsm/kg, 在 48 h 内降至最低点 342.83 mOsm/kg, 之后略有回升并趋于稳定 (图 3)。低浓度 TMAO 强化未能遏制幼蟹血清渗透压在低盐下的快速下降, 但在低盐胁迫 6 h 后显著提升血清渗透压, 并在 24 h 时达到 514 mOsm/kg, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 之后逐渐下降, 并在 72 h 后趋于对照水平。中浓度和高浓度 TMAO 强化能显著延滞幼蟹血清渗透压的快速下降 ($P < 0.05$), 但都在 72 h 后降至对照水平。

2.4 TMAO 强化对三疣梭子蟹后鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性及其基因表达的影响

为进一步了解 TMAO 强化对三疣梭子蟹幼蟹渗透调节关键酶的影响, 本研究测定了后鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在低盐下的活性变化。发现

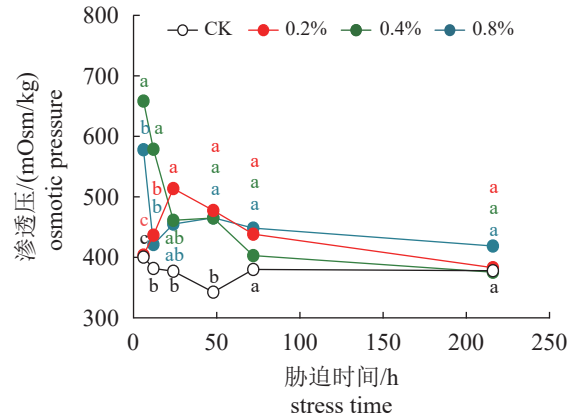


图 3 TMAO 强化后低盐条件下三疣梭子蟹血清渗透压变化
Fig. 3 Changes of serum osmotic pressure of *P. trituberculatus* under low salinity condition after TMAO enrichment

TMAO 强化能显著提高幼蟹后鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在低盐下的活性 (图 4-a), 但不同强化浓度产生的影响各异。主要表现在 TMAO 强化浓度越高, 对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的提升作用越快, 高浓度 TMAO 组在低盐胁迫 6 h 时 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性最高, 为 30.47 U/mL, 而中浓度组推迟到 48 h, 低浓度则在实验结束时才显示出较高的酶活性。同时, 在 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶 α 亚基的基因表达上同样发现, TMAO 强化对 α 亚基表达的显著促进作用 (图 4-b), 而且中、高浓度 TMAO 的促进作用显著高于低浓度, 并都表现出较持久和稳定的效果。

2.5 TMAO 强化对三疣梭子蟹各组织 TMAO 水平的影响

实验测定了各组织在低盐胁迫后的 TMAO 水平。结果发现, 在对照组中, 鳃组织中的 TMAO 含量最低, 但在高浓度 TMAO 强化后, 鳃组织中的 TMAO 累积量在低盐胁迫 48 h 时提升到 665.96 ng/mL (图 5-a), 接近于血清、肌肉和肠道中 TMAO 强化后在低盐下的最高值 (图 5-b~d), 并维持到实验结束。其他 2 个 TMAO 浓度也能显著提高鳃组织在低盐下的 TMAO 累积量, 但累积量显著低于高浓度组 ($P < 0.05$)。不同浓度 TMAO 强化也同时提高血清、肌肉和肠道组织在低盐下的 TMAO 累积量, 但提升程度弱于鳃组织; 相比较而言, 中、高浓度 TMAO 的提升效果在低盐胁迫初期较显著, 在胁迫后期大多恢复到对照水平。

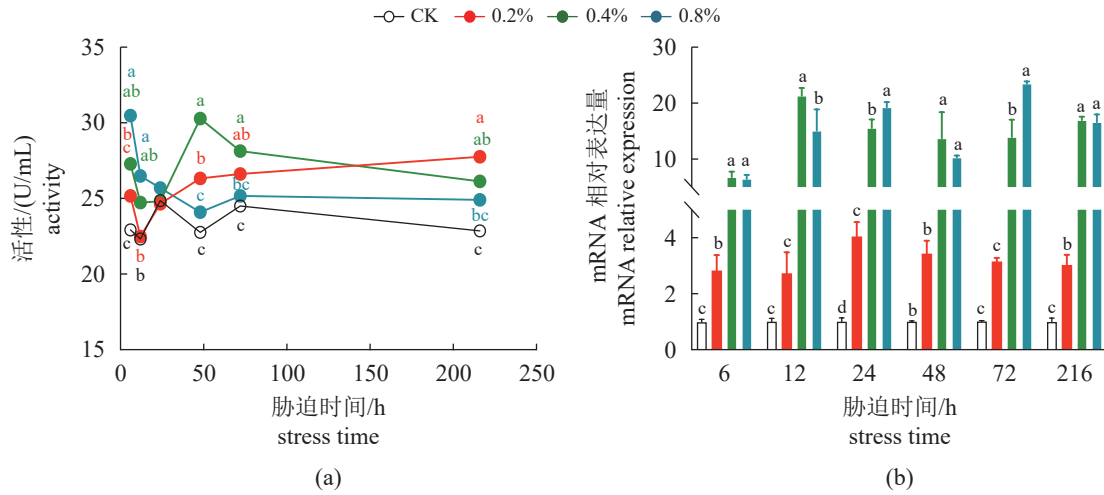


图 4 TMAO 强化对低盐下三疣梭子蟹后鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性 (a) 及其 α 亚基因表达 (b) 的影响
 Fig. 4 Effect of TMAO enrichment on the Na⁺-K⁺-ATPase activity (a) and gene expression of its α subunit (b) in the posterior gill of *P. trituberculatus* under low salinity condition

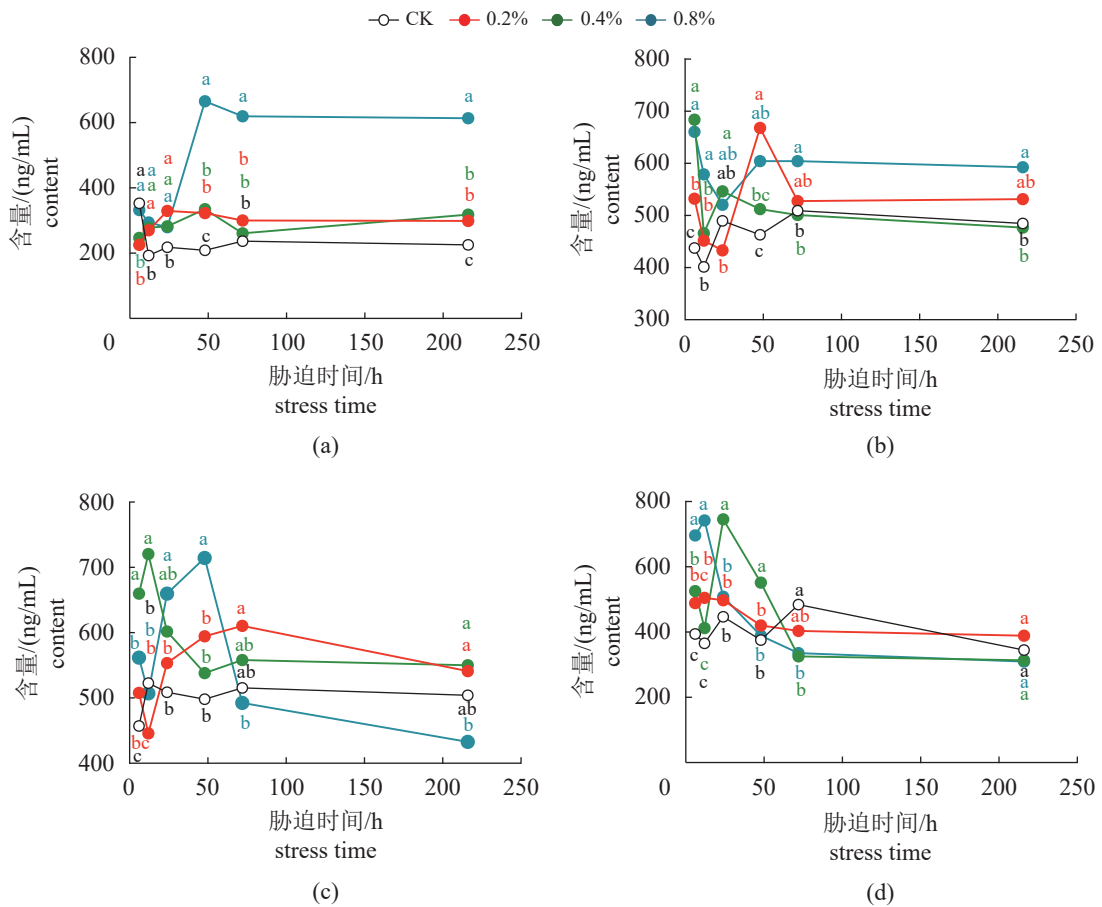


图 5 TMAO 强化对低盐下三疣梭子蟹鳃 (a)、血清 (b)、肌肉 (c) 和肠道 (d) TMAO 含量的影响
 Fig. 5 Effect of TMAO enrichment on the of TMAO contents in the gill (a), serum (b), muscle (c) and gut (d) of *P. trituberculatus* under low salinity condition

3 讨论

3.1 TMAO 添加对三疣梭子蟹蜕壳和在低盐下存活的作用

蜕皮或蜕壳是节肢动物和部分爬行动物得以生长、发育、繁殖和附肢再生的重要生命活动^[19-20]。动物的蜕皮或蜕壳受内因(如蜕皮激素、蜕皮抑制激素、蜕皮激素受体和性腺发育)和外因(如温度、盐度、光照和营养盐)的协同控制^[21-22]。蟹类是典型的靠蜕壳实现生长的动物,蟹的一生需要蜕壳 18 次。每次蜕去旧的外壳,包括鳃、前肠、后肠的外膜和肠的残留物^[23-24]。在蜕皮或蜕壳过程中,水和空气被快速吸入蟹的体内,随后外骨骼逐渐硬化^[25-26]。与蜕壳前相比,蟹的体型和体重明显增加。蜕壳死亡综合征(molt death syndrome, MDS)是甲壳类动物由于无法完全分离旧壳而死亡的现象^[27]。在本研究中,三疣梭子蟹在低盐下死亡的主要原因即是 MDS,这可能是外界盐度骤降导致的。路允良等^[28]也观察到低盐度 15 下三疣梭子蟹Ⅶ期幼蟹的 MDS 现象。而远海梭子蟹(*P. pelagicus*)幼蟹当暴露在低盐度 10 的环境下,死亡率显著提高,且大多死于 MDS^[29]。类似的死亡现象也发生在红星梭子蟹(*P. sanguinolentus*)从盐度 30 进入盐度 10 时^[30]。其他甲壳类动物也普遍存在低盐下存活率下降的现象,如日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[31]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[32]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[33]和口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)^[34]等。显然,蜕壳是甲壳类动物生长和存活的前提。在本研究中,添加 TMAO 能提高三疣梭子蟹的蜕壳率,而提高的蜕壳率可能使三疣梭子蟹免于低盐下的 MDS,从而提高低盐下的存活率。但 TMAO 的添加量不是越高越好,添加 0.2% 的 TMAO 强化效果最好。

3.2 TMAO 强化对三疣梭子蟹在低盐下的渗透调节作用

已有研究表明,甲壳类动物在盐度胁迫下主要通过调节渗透压来维持机体的渗透平衡^[1-2],而渗透压调节主要依靠鳃上皮细胞的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶^[35-37]。低盐胁迫可激活甲壳类动物 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,但在一段时间后恢复并趋于稳定。如拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)大眼幼

体和幼蟹及日本囊对虾仔虾的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在低盐下的活性变化都呈现出类似特征^[38-40]。三疣梭子蟹在遭受低盐胁迫时,鳃组织的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性也产生剧烈波动,但波动方式略有不同,如在遭遇台风强降水 12 h 后,三疣梭子蟹鳃组织的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性显著下降^[41]。而在受到盐度 10 胁迫的 12~24 h 时 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性下降,在 24~48 h 时酶活性上升,最后在 72 h 时酶活性恢复稳定^[42]。这种酶活性变化差异可能与研究者的测定时间有关,也可能与甲壳类动物所处的不同生理状态有关。但这些研究都表明低盐显著影响 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的活性,而且具有一定程度的抑制作用。而 TMAO 强化能显著提高 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,并在 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶 α 亚基基因的相对表达上也佐证了这一现象。表明 TMAO 可通过促进 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶基因表达和酶活性,维持三疣梭子蟹在低盐下相对较高的血清渗透压。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶每执行一次离子转运,都需要消耗 ATP。因此维持三疣梭子蟹血清中的高渗环境是一个耗能的过程,而低盐下三疣梭子蟹因 MDS 导致的死亡,推测与能量不足有关,这是由于蜕壳也需要消耗大量的能量^[43]。

作为海洋动物体内普遍存在的一种天然渗透调节物质,TMAO 本身也参与生物体的渗透调节^[11]。实验发现,低盐胁迫可导致三疣梭子蟹肌肉中大量累积 TMAO,且耐低盐品系具有更快速累积 TMAO 的能力^[17]。尽管肌肉通常是鱼类、甲壳类和头足类动物累积 TMAO 最高的组织^[44-47],但并非是响应低盐胁迫最敏感的组织。本研究发现,鳃组织在低盐胁迫下对 TMAO 的累积量变化最明显,其次是血清和肠道,而肌肉的 TMAO 累积量变化最小,表明鳃、血清和肠道组织在低盐条件下维持三疣梭子蟹渗透压平衡中起重要作用。海洋动物中 TMAO 的来源之一是自身合成。如青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)和美洲胡瓜鱼(*Osmerus mordax*)的肝脏中都存在三甲胺氧化酶,能把三甲胺氧化成 TMAO^[48]。TMAO 的另一个来源是直接从事环境中获取。如大部分硬骨鱼都不能合成 TMAO,必须通过摄食虾等无脊椎动物或海藻等获取 TMAO^[49]。因此,用含有 TMAO 的饲料投喂尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),可在其肌肉中检测到 TMAO;若停止投喂,尼罗罗

非鱼肌肉中的 TMAO 含量逐渐降低甚至消失^[50]。在本研究中, 投喂 TMAO 直接提高了三疣梭子蟹各组织的 TMAO 含量, 推测是三疣梭子蟹在低盐下维持高渗透压的另一种有机小分子渗透调节策略。

参考文献 (References):

- [1] Sang H M, Fotedar R. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latissulcatus* Kishinouye, 1896) reared at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2004, 234(1-4): 601-614.
- [2] Parado-Esteva F D, Quintino E T. Influence of salinity on survival and molting in early stages of three species of *Scylla* crabs[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2011, 63: 1-6.
- [3] 冯广朋, 卢俊, 庄平, 等. 盐度对中华绒螯蟹雌性亲蟹渗透压调节和酶活性的影响 [J]. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 468-473.
Feng G P, Lu J, Zhuang P, *et al.* Effects of salinity on osmotic regulation and enzyme activities in mature female *Eriocheir sinensis*[J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 468-473 (in Chinese).
- [4] Romano N, Zeng C S. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure[J]. *Aquaculture*, 2012, 334-337: 12-23.
- [5] Long X W, Wu X G, Zhao L, *et al.* Physiological responses and ovarian development of female Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* subjected to different salinity conditions[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 8: 1072.
- [6] 文玉杰, 李晓玫. 钠钾 ATP 酶的信号转导功能新进展 [J]. *生理科学进展*, 2005, 36(2): 159-162.
Wen Y J, Li X M. New progress in signal transduction function of sodium potassium ATPase[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2005, 36(2): 159-162 (in Chinese).
- [7] Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(5): 979-989.
- [8] 刘振英, 叶央芳, 李竹. 有机小分子渗透调节物质及其保护功能 [J]. *生命科学*, 2013, 25(4): 410-415.
Liu Z Y, Ye Y F, Li Z. Low-molecular-weight organic osmolytes and their protective functions[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(4): 410-415 (in Chinese).
- [9] Macchi F, Eisenkolb M, Kiefer H, *et al.* The effect of osmolytes on protein fibrillation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3): 3801-3819.
- [10] Charest R P, Chenoweth M, Dunn A. Metabolism of trimethylamines in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and marine and freshwater pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*)[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1988, 158(5): 609-619.
- [11] Yancey P H, Blake W R, Conley J. Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(3): 667-676.
- [12] Lenky C C, McEntyre C J, Lever M. Measurement of marine osmolytes in mammalian serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 420(1): 7-12.
- [13] Kelly R H, Yancey P H. High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates, and decapod crustaceans[J]. *The Biological Bulletin*, 1999, 196(1): 18-25.
- [14] Zerbst-Boroffka I, Kamalynow R M, Harjes S, *et al.* TMAO and other organic osmolytes in the muscles of amphipods (Crustacea) from shallow and deep water of Lake Baikal[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 142(1): 58-64.
- [15] Lange R, Fugelli K. The osmotic adjustment in the euryhaline teleosts, the flounder, *Pleuronectes flesus* L. and the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L.[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1965, 15(3): 283-292.
- [16] 管卫兵, 宣富君. 气候变化影响渔业资源生殖动力的研究范式——以东海三疣梭子蟹种群为例 [J]. *渔业信息与战略*, 2019, 34(4): 279-285.
Guan W B, Xuan F J. A research paradigm of climate impacting reproductive dynamics of fishery resources: a case study of *Portunus trituberculatus* population in the East China Sea[J]. *Fishery Information & Strategy*, 2019, 34(4): 279-285 (in Chinese).
- [17] Ye Y F, An Y P, Li R H, *et al.* Strategy of metabolic phenotype modulation in *Portunus trituberculatus* exposed to low salinity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(15): 3496-3503.
- [18] Han X L, Liu P, Gao B Q, *et al.* Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in swimming crab *Portunus trituberculatus*: molecular cloning, characterization, and expression under low salinity stress[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(4): 828-837.

- [19] Ghanawi J, Patrick Saoud I. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868)[J]. *Aquaculture*, 2012, 358-359: 183-195.
- [20] Huang H Y, Fu C R, Chen X L, *et al.* Molt-inhibiting hormone (MIH) gene from the green mud crab *Scylla paramamosain* and its expression during the molting and ovarian cycle[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(11): 2665-2675.
- [21] Gong J, Ye H H, Xie Y J, *et al.* Ecdysone receptor in the mud crab *Scylla paramamosain*: a possible role in promoting ovarian development[J]. *Journal of Endocrinology*, 2015, 224(3): 273-287.
- [22] Daoud D, Lambert Y, Audet C, *et al.* Size and temperature-dependent variations in intermolt duration and size increment at molt of Northern Shrimp, *Pandalus borealis*[J]. *Marine Biology*, 2010, 157(12): 2655-2666.
- [23] Xu Z N, Liu A, Li S K, *et al.* Hepatopancreas immune response during molt cycle in the mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13102.
- [24] Zou E M. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: a current review[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 293: 113470.
- [25] Perry H, Trigg C, Larsen K, *et al.* Calcium concentration in seawater and exoskeletal calcification in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *Aquaculture*, 2001, 198(3-4): 197-208.
- [26] Wilder M N, Huong D T T, Jasmani S, *et al.* Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant fresh-water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes with the molt cycle[J]. *Aquaculture*, 2009, 292(1-2): 104-110.
- [27] Ye L, Jiang S G, Zhu X M, *et al.* Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2009, 290(1-2): 140-144.
- [28] 路允良, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响 [J]. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 237-245.
- Lu Y L, Wang F, Zhao Z Y, *et al.* Effects of salinity on growth, molt and energy utilization of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 237-245 (in Chinese).
- [29] Romano N, Zeng C S. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(2): 222-228.
- [30] 廖永岩, 许振煜, 吴邦臣. 盐度和温度对红星梭子蟹存活和摄饵的影响 [J]. *生态学报*, 2010, 30(13): 3396-3405.
- Liao Y Y, Xu Z Y, Wu B C. The effect of salinity and temperature on survival and food intake of *Portunus sanguinolentus*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(13): 3396-3405 (in Chinese).
- [31] 陈坚, 边平江. 低盐度对日本对虾养殖的影响 [J]. *浙江海洋学院学报*, 1994, 13(4): 289-292.
- Chen J, Bian P J. An influence of the low salinity upon tiger shrimp *Penaeus japonicas*[J]. *Journal of Zhejiang College of Fisheries*, 1994, 13(4): 289-292 (in Chinese).
- [32] 龙晓文, 吴旭干, 刘智俊, 等. 盐度对脊尾白虾存活、生长和蜕壳的影响 [J]. *广东农业科学*, 2014, 41(23): 111-115,130.
- Long X W, Wu X G, Liu Z J, *et al.* Effects of salinity on survival, growth and molt of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(23): 111-115,130 (in Chinese).
- [33] 陈劲松, 周发林, 江世贵, 等. 斑节对虾幼虾不同家系的耐低盐能力比较 [J]. *水产学报*, 2017, 41(5): 687-693.
- Chen J S, Zhou F L, Jiang S G, *et al.* Salinity tolerance of *Penaeus monodon* across different breeding families[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 687-693 (in Chinese).
- [34] 刘海映, 张嵩, 邢坤, 等. 盐度对口虾蛄仔虾摄食、存活和掘穴的影响 [J]. *海洋科学*, 2016, 40(11): 121-128.
- Liu H Y, Zhang S, Xing K, *et al.* The effect of salinity on survival, food intake, and burrowing behavior in post-settlement mantis shrimp, *Oratosquilla oratoria*[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(11): 121-128 (in Chinese).
- [35] Whiteley N M. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2011, 430: 257-271.
- [36] Furriel R P M, McNamara J C, Leone F A. Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 126(3): 303-315.
- [37] Fagan M J, Saier Jr M H. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, 38(1): 57-99.
- [38] 亓磊, 顾孝连, 蒋科技, 等. 盐度对拟穴青蟹幼蟹存活、生长和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 [J]. *海洋科学*, 2013, 37(2): 56-60.
- Qi L, Gu X L, Jiang K J, *et al.* Effect of salinity on the survival,

- growth and Na^+/K^+ -ATPase activity of early juvenile mud crabs, *Scylla paramamosain*[J]. Marine Science, 2013, 37(2): 56-60 (in Chinese).
- [39] 元磊, 蒋科技, 顾孝连, 等. 盐度突降对拟穴青蟹大眼幼体生长发育和 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响 [J]. 海洋渔业, 2011, 33(2): 201-206.
- Qi L, Jiang K J, Gu X L, *et al.* Survival, development and Na^+/K^+ -ATPase activity of *Scylla paramamosain* megalopa in low salinities[J]. Marine Fisheries, 2011, 33(2): 201-206 (in Chinese).
- [40] 潘鲁青, 栾治华. 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 699-703.
- Pan L Q, Luan Z H. The effects of salinity on development and Na^+/K^+ -ATPase activity of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 699-703 (in Chinese).
- [41] 陈夏月, 任永宽, 李连君, 等. 台风过境对养殖三疣梭子蟹抗氧化系统及 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的影响 [J]. 海洋学研究, 2018, 36(3): 101-106.
- Chen X Y, Ren Y K, Li L J, *et al.* Effect of typhoon on the antioxidant system and Na^+ , K^+ -ATPase activity in *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Marine Sciences, 2018, 36(3): 101-106 (in Chinese).
- [42] 江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 酶活性的影响 [J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1475-1480.
- Jiang S, Xu Q H. Influence of salinity stress on the activity of gill Na^+/K^+ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1475-1480 (in Chinese).
- [43] Zhang M, Zhang X X, Tran N T, *et al.* Molting alters the microbiome, immune response, and digestive enzyme activity in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. mSystems, 2021, 6(5): e00917-21.
- [44] Wang K, Shen Y J, Yang Y Z, *et al.* Morphology and genome of a snailfish from the Mariana Trench provide insights into deep-sea adaptation[J]. Nature Ecology & Evolution, 2019, 3(5): 823-833.
- [45] Cocker J E. Adaptations of deep sea fishes[J]. Environmental Biology of Fishes, 1978, 3(4): 389-399.
- [46] Samerotte A L, Drazen J C, Brand G L, *et al.* Correlation of trimethylamine oxide and habitat depth within and among species of teleost fish: an analysis of causation[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2007, 80(2): 197-208.
- [47] Raymond J A, Devries A L. Elevated concentrations and synthetic pathways of trimethylamine oxide and urea in some teleost fishes of McMurdo Sound, Antarctica[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1998, 18(4): 387-398.
- [48] Goldstein L, Dewitt-Harley S. Trimethylamine oxidase of nurse shark liver and its relation to mammalian mixed function amine oxidase[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1973, 45(4): 895-903.
- [49] Anthoni U, Børresen T, Christophersen C, *et al.* Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fish?[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1990, 97(3): 569-571.
- [50] Niizeki N, Daikoku T, Hirata T, *et al.* Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide from choline in the teleost tilapia, *Oreochromis niloticus*, under freshwater conditions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 131(3): 371-386.

Effect of trimethylamine-N-oxide dietary enrichment on the molting of the swimming crabs (*Portunus trituberculatus*) and their survival and osmoregulation under low salinity

WU Cenyang¹, LIN Weichuan¹, SHI Ce^{1,2}, MU Changkao¹, WANG Chunlin¹, YE Yangfang^{1*}

1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2. Key Laboratory of Aquacultural Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China

Abstract: To investigate the effects of trimethylamine-N-oxide (TMAO) enrichment on the survival and osmoregulation of *Portunus trituberculatus* under low salinity conditions, *P. trituberculatus* juveniles were fed diets containing different concentrations TMAO (0, 0.2%, 0.4% and 0.8%). Following a 15 day-TMAO enrichment period, the *P. trituberculatus* were subjected to low salinity (4) stress. The results showed that dietary TMAO supplementation increased the molting rate of *P. trituberculatus* under normal salinity (26). Specifically, the highest molting rate was observed in the 0.8% TMAO-supplemented group, reaching 53.9%±0.4% on day 15. All TMAO concentrations enhanced the survival rate of *P. trituberculatus* under low salinity stress. Notably, the 0.2% TMAO-enriched group exhibited the highest survival rate of 75% at 216 h of low salinity stress, which was significantly higher than the control group ($P<0.05$). Furthermore, the TMAO-enriched *P. trituberculatus* displayed higher serum osmotic pressure, gill $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity, mRNA gene expression of the α subunit of this enzyme, and TMAO content in various tissues compared to the control. This study suggests that TMAO enrichment may enhance the survival of *P. trituberculatus* under low salinity conditions by promoting molting and improving osmotic regulation through the use of inorganic ion and osmolytes. These findings provide a potential dietary supplement for the aquaculture of *P. trituberculatus* in low salinity environments.

Key words: *Portunus trituberculatus*; low salinity; survival; trimethylamine-N-oxide; osmotic regulation

Corresponding author: YE Yangfang. E-mail: yeyangfang@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32373150); Collaborative Promotion Program of Zhejiang Province Agricultural Technology of China (2020XTTGSC03)