

盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响

赵丽慧, 赵金良*, Thammaratsuntorn Jeerawat, 赵岩

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了解鱼类适应盐碱水环境的生理变化机理, 将尼罗罗非鱼从淡水直接转入4个不同盐碱混合梯度组(A组: 盐度10, 碱度1 g/L NaHCO₃; B组: 盐度10, 碱度2 g/L NaHCO₃; C组: 盐度15, 碱度1 g/L NaHCO₃; D组: 盐度15, 碱度2 g/L NaHCO₃)中进行为期96 h的急性胁迫实验, 分别检测胁迫后0、6、12、24、36、48、72和96 h时尼罗罗非鱼的血清渗透压、血清Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度以及鳃中Na⁺-K⁺-ATP酶(NKA)和碳酸酐酶(CA)基因相对表达量的变化过程。结果显示, 血清渗透压、离子浓度以及鳃中NKA基因和CA基因mRNA表达量变化程度均与其盐碱胁迫浓度间呈正相关, 变化过程随着实验时间推移均呈现为先升、后降, 最后趋于平稳。B、D组血清渗透压峰值出现在24 h, A、C组出现在36 h。血清Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度均在24 h达到峰值。B、D组NKA基因mRNA表达峰值出现在24 h, A、C组出现在36 h; 除A组外, 其余各组CA基因mRNA表达峰值时间出现在24 h。研究表明, 尼罗罗非鱼具有一定的盐碱适应能力, 盐碱胁迫下NKA、CA是参与离子转运、渗透压调节的重要转运酶。

关键词: 尼罗罗非鱼; 盐碱胁迫; 渗透压; 离子浓度; Na⁺-K⁺-ATP酶; 碳酸酐酶; mRNA表达
中图分类号: S 965.1
文献标志码: A

为适应不同的水环境条件, 广盐性硬骨鱼类可通过调动高效的离子/渗透调节机能, 维持体液中水分和盐类的平衡, 保持稳定的渗透压。鳃是鱼类主要渗透压调节器官之一, 鳃上皮组织中分布大量的离子细胞, 离子细胞内含有大量膜结构, 顶部、基底部膜上装配不同的离子转运蛋白、共转运子以及转运酶等, 它们共同参与离子的转运过程^[1]。其中, Na⁺-K⁺-ATP酶(Na⁺-K⁺-ATPase, NKA)和碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是直接参与离子转运的主要转运酶^[2-4]。NKA又称Na⁺泵, 是一种普遍存在的跨膜蛋白, 不仅直接参与调控胞内Na⁺浓度, 还为其他离子调节提供能量^[5]。CA主要参与血浆中CO₂水合过程的可逆催化反应(CO₂ + H₂O ⇌ HCO₃⁻ + H⁺), 也可为Cl⁻/HCO₃⁻和Na⁺/H⁺离子交换提供HCO₃⁻、H⁺, 此外, 还参与胞内的酸碱平衡调节^[6-7], 提供

离子转运的能量^[8-10]。

中国内陆盐碱水域资源丰富, 但由于此类水体的高盐碱度、高pH及复杂的离子组成, 常规养殖品种难以生存, 极大地限制了盐碱水域的开发利用^[11]。罗非鱼作为广盐性鱼类, 可以耐受高盐度环境并适应较大范围内的盐度变化^[12]。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长快、易繁殖、适应性强, 是罗非鱼类养殖中的最大品种, 也是世界主要经济养殖品种之一^[13]。雷衍之等^[14]研究表明, 尼罗罗非鱼鱼苗耐碱能力较强, 96 h半致死碱度低于青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)、瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)和鲫(*Carassius auratus*), 但显著高于草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)等。经慢性驯化后的尼罗罗非鱼鱼苗, 可以在盐度20、3 g/L NaHCO₃碱度的

收稿日期: 2014-05-19 修回日期: 2014-06-26

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B03); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49-4B); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206)

通信作者: 赵金良, E-mail: jlzhaol@shou.edu.cn

盐碱水中正常生长^[15]。以上表明,尼罗罗非鱼可作为耐盐碱水产养殖品种开发研究的实验材料。

以往,对尼罗罗非鱼的耐盐、耐碱生理研究多在单盐或单碱度因子下进行^[13,16-19],对盐碱混合双重胁迫条件下生理水平的变化尚不清楚。本实验通过连续观察盐碱急性胁迫 96 h 内,尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度以及鳃离子转运酶基因 mRNA 表达量的变化过程,研究尼罗罗非鱼盐碱胁迫的生理变化,并为其盐碱环境适应的分子生理机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用尼罗罗非鱼于 2012 年 10 月取自上海海洋大学鱼类种质资源实验站,运回实验室后,在养殖中心控温循环水族箱中淡水暂养 1 周以适新环境 $[(25.3 \pm 0.8) ^\circ\text{C}]$,每天定时投喂,及时清理残饵和粪便,保证实验鱼的正常生理活动。选取规格均匀、健康活泼的个体进行急性胁迫实验,平均体质量为 $(86.4 \pm 5.2) \text{g}$ 。

实验用盐碱水需提前配制,先在曝气完全的淡水中加入海水晶,配成各盐碱梯度组所需盐度,再根据实验水的体积称量所需 NaHCO_3 (分析纯)质量,加入盐水中搅拌均匀,稳定 48 h 后使用。盐、碱度分别使用 SG7 便携式盐度计和 HI 83200 多参数水质分析仪检测。

1.2 实验方法

样品采集和处理 根据预实验结果,设置了 4 个盐碱混合梯度组(A 组:盐度 10,碱度 1 g/L NaHCO_3 ;B 组:盐度 10,碱度 2 g/L NaHCO_3 ;C 组:盐度 15,碱度 1 g/L NaHCO_3 ;D 组:盐度 15,碱度 2 g/L NaHCO_3)。实验时,将实验鱼从淡水中取出,直接放入各盐碱混合梯度实验组中,每组

30 尾鱼,设 3 个重复。实验前 1 天及实验期间禁食,实验开始后,每 24 h 换水 1/3,并保持水温为 $(26.3 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,pH 为 8.2 ± 0.4 ,溶解氧为 $(5.6 \pm 0.4) \text{mg/L}$ 。除 D 组(15,2)中有 2 尾死亡外,其余各处理组中均无鱼死亡情况。胁迫后 0、6、12、24、36、48、72 和 96 h 时间点采样,每个重复组中随机取 2~3 尾。

用 1 mL 一次性无菌注射器从尾静脉处抽血,血液注入 1.5 mL 离心管中,4 $^\circ\text{C}$ 静置过夜,分层后离心(5 000 r/min,4 $^\circ\text{C}$,10 min),取出血清待用。抽血后的实验鱼,冰上解剖,快速取出鳃组织,液氮速冻后,放入 -80 $^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存。

血清渗透压与血清 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度的测定

取 10 μL 血清样品,采用 WESCOR VAPRO5520 渗透压仪(Logan, UT, USA)测定血清渗透压。血清 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度采用南京建成生物公司的相应离子检测试剂盒测定,具体操作参照说明书进行,用 Synergy H1 酶标仪检测其吸光值。

鳃中 NKA 、 CA 基因 mRNA 表达

(1) 总 RNA 提取及 cDNA 合成

鳃组织用液氮研磨成粉末,使用 Trizol (Invitrogen)提取总 RNA,琼脂糖 EB 凝胶电泳检测其完整性,并测定总 RNA 浓度和纯度,加入适量的 RNase free dd H_2O 调整至 500 ng/ μL 。用 Prime Script[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒合成 cDNA 第一链,反转录产物于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存待用。

(2) 引物设计与合成

引物参照 GenBank 中尼罗罗非鱼 β -actin (EU887951)、CA-4 (XM_003460163) cDNA 序列和 $\text{NKA} \alpha$ 亚基 cDNA 序列^[20],用 Primer Premier 5.0 软件设计(表 1),由上海生工生物工程股份有限公司合成引物。

表 1 定量 PCR 分析的引物序列
Tab.1 Primer sequences used in real-time PCR assays

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$ annealing temperature	产物大小/bp product size
$\text{NKA}-\alpha$ F	ACGAACCGCATCCTCATCTT	60	132
$\text{NKA}-\alpha$ R	GGAAGGCACAGAACCACCA	60	
CA-4 F	AGCATAACAGTGGATGGAAAGCG	60	125
CA-4 R	GACCAGTTGAGTTGCCTGACATT	60	
β -actin F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	60	122
β -actin R	TGAAGTTGTTGGGCGTTTGG	60	

(3) 鳃 *NKA* 基因和 *CA* 基因的 qPCR 检测

使用荧光定量试剂 Go TaqR qPCR Master Mix (Promega), 采用 SYBR qPCR 法, 以 0 h 鳃总 RNA 反转录获得的 cDNA 溶液, 用 RNase free ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释, 设置 6 个梯度, 以 β -actin 为内参建立标准曲线以及溶解曲线, 验证引物特异性及反应条件, 定量 PCR 引物的扩增效率在 94%~98% 之间。再进行各处理组、不同时间点 *NKA*、*CA* 基因的 qPCR 分析。qPCR 反应条件: 95 °C 2 min, 95 °C 15 s; 60 °C 1 min, 40 个循环; 溶解曲线: 65~95 °C。qPCR 数据分析采用的是 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法。

1.3 数据分析

实验数据利用 SPSS 19.0 统计软件分析, 单因素方差分析进行显著性检验, Duncan 多重比较检测各测量指标的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。利用 Sigmaplot 10.0 软件作图。

2 结果

2.1 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压的影响

血清渗透压值随盐碱胁迫浓度升高而增大, A 组 (10,1) 最低, D 组 (15,2) 最高, B 组 (10,2) 与 C 组 (15,1) 较为接近。随时间推移, 各盐碱混合处理组中血清渗透压均呈现先升后降的趋势, B 组 (10,2)、D 组 (15,2) 中血清渗透压在胁迫后 24 h 达到最大值, A 组 (10,1)、C 组 (15,1) 中血清渗透压 36 h 达到最大值 (图 1)。

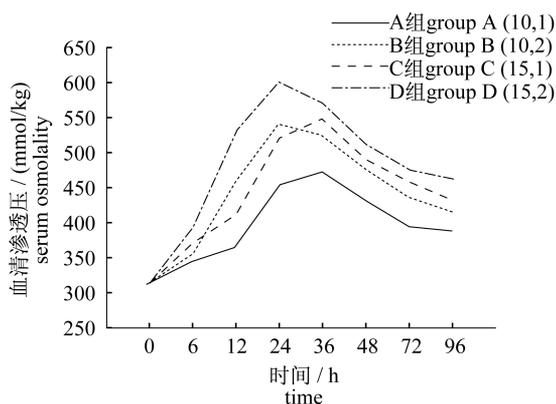


图 1 不同盐碱度急性胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压的影响

Fig. 1 Effects of different salinity-alkalinity on the serum osmolality of *O. niloticus*

2.2 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清离子浓度的影响

随着时间的推移, 各盐碱处理组中, 血清 Na⁺ 浓度均呈现先迅速上升, 24 h 时达到最大值, 然后缓慢下降, 96 h 时浓度高于胁迫开始时的浓度 (图 2)。

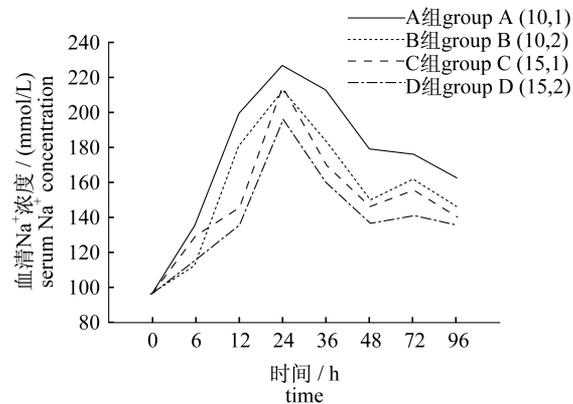


图 2 盐碱对尼罗罗非鱼血清 Na⁺ 浓度的影响

Fig. 2 Effects of different salinity-alkalinity on the serum Na⁺ concentration of *O. niloticus*

Cl⁻ 浓度随着盐碱度的升高而增加。随着时间的推移, 各盐碱处理组中血清 Cl⁻ 浓度也表现为先升高、后降低的趋势, 24 h 达到高峰 (图 3)。

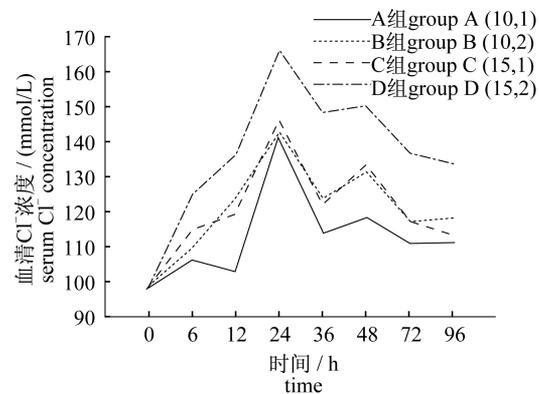


图 3 盐碱度对尼罗罗非鱼血清 Cl⁻ 浓度的影响

Fig. 3 Effects of different salinity-alkalinity on the serum Cl⁻ concentration of *O. niloticus*

随着盐碱度的升高, 血清 K⁺ 浓度增大。随着时间的推移, 各处理组中 K⁺ 浓度在 12 h 后呈现急速增加的变化趋势, 24 h 达到最大值, 然后逐渐下降 (图 4)。

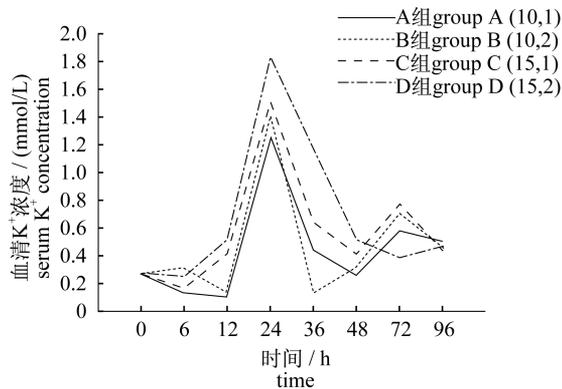


图4 盐碱度对尼罗罗非鱼血清 K⁺ 浓度的影响

Fig.4 Effects of different salinity-alkalinity on the serum K⁺ concentration of *O. niloticus*

2.3 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 NKA 和 CA 基因表达量的影响

不同盐碱处理组中,尼罗罗非鱼鳃中 NKA 基因表达整体上呈现先升后降的变化趋势。A 组 (10,1) 和 B 组 (10,2) 中 NKA 基因表达量较平

稳,变化趋势不明显;C 组 (15,1) 与 D 组 (15,2) 中 NKA 基因表达量相对较高,变化趋势明显。A 组 (10,1)、C 组 (15,1) 中 NKA 基因表达量在 36 h 达到高峰,B 组 (10,2)、D 组 (15,2) 中 24 h 时达到最大值(图 5)。

不同盐碱处理组中,尼罗罗非鱼鳃中 CA 基因表达量均呈现先逐渐增加,达到最高峰,除了 A 组 (10,1) 中表达量达到峰值的时间为 36 h,其他 3 组在 24 h 时达到最高表达量之后,表达量呈缓慢下降趋势(图 6)。

3 讨论

3.1 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压和离子浓度变化的影响

本研究中,尼罗罗非鱼胁迫起始时血清渗透压约为 (312.66 ± 8.74) mmol/kg,随着盐碱胁迫浓度增加,血清渗透压的最高值也随之明显增大,最高盐碱梯度组 (D 组) 中可升至 (598.67 ± 8.06) mmol/kg。血清渗透压升高主要是由于随

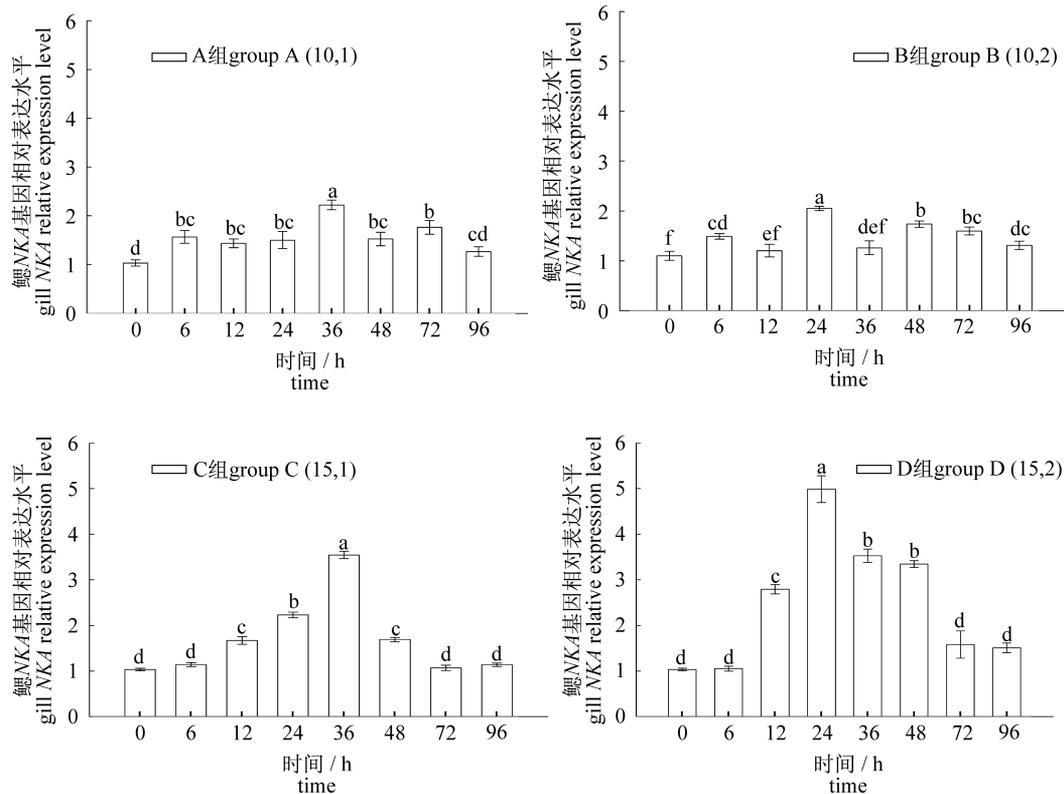


图5 4个盐碱组中尼罗罗非鱼鳃中 NKA 基因表达量(平均值 ± 标准误)

不同上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图注释同此

Fig.5 Relative expression of NKA mRNA in gill of *O. niloticus* under different salinity-alkalinity treatments (mean ± SE)

Different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$), the same as the following

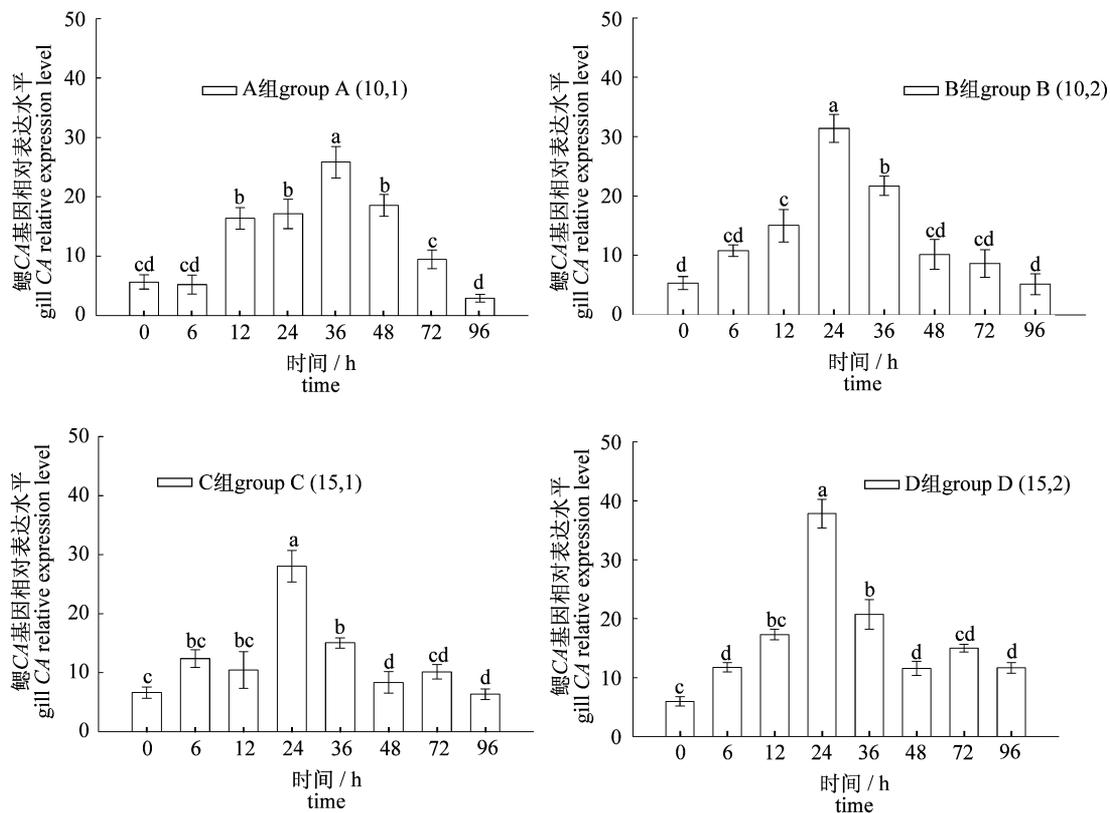


图6 4个盐碱组中尼罗罗非鱼鳃中CA基因表达量(平均值±标准误)

Fig. 6 Relative expression of CA mRNA in gill of *O. niloticus* under different salinity-alkalinity treatments (mean ± SE)

随着盐碱浓度增大,水体中离子浓度随之增高,摄入体内的离子逐渐累加增强引起的。不同盐碱浓度胁迫后,血清渗透压均表现上升趋势,但峰值出现时间点并不一致,A组(10,1)、C组(15,1)在36 h时达到最高值,B组(10,2)、D组(15,2)在24 h时达到最高值。初步推测,可能有以下两种情形:一是采样点间隔较大,血清渗透压峰值出现时间段波动范围较宽(24~36 h);二是由于高碱度(B组、D组中碱度值为2)下的胁迫强度增大,导致体内血清渗透压迅速上升,峰值出现时间提前。之后,不同盐碱浓度处理组中血清渗透压均表现为逐渐下降,并趋于稳定。表明尼罗罗非鱼具有一定的渗透压平衡调节能力,能适应一定范围内的盐碱变化。

本急性胁迫实验中,血清 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 浓度随着时间的推移均呈现了先升高,24 h时达到最大值,后下降并趋于平稳的趋势。在正常耐受范围内,慢性盐度驯化中的大多数广盐性硬骨鱼类血清 Na^+ 、 Cl^- 浓度变化与其渗透压的变化之间往往呈现相同的变化规律,两者基本呈正相关。

K^+ 浓度变化与渗透压浓度变化间是否有明显关联,不同研究者的结论并不一致。例如,威海卡拉白鱼(*Chalcalburnus chalcoides aralensis*)经过为期30 d的盐度胁迫后,血清 Na^+ 、 Cl^- 浓度升高,而 K^+ 浓度降低^[21]。史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)^[22]、尼罗罗非鱼^[18]从低盐驯化到高盐环境后,血清 Na^+ 、 Cl^- 浓度升高,而 K^+ 浓度未发生明显变化。但对比目鱼(*Paralichthys orbignyanus*)来说,慢性盐度驯化中,血清离子 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 浓度均随着渗透压的增加而升高^[23]。在本实验中,尼罗罗非鱼 K^+ 与血清渗透压变化间呈正相关关系,这与青海湖裸鲤^[24]和大鳞鲃(*Barbus capito*)^[25]盐碱胁迫的研究结果基本一致。与单盐因子胁迫相比,盐碱混合胁迫中涉及离子类型更多、离子转运过程更为复杂,本实验中 K^+ 虽并非环境中主要离子,但在体内离子转运中可能扮演重要协调作用。

血清渗透压变化和调节过程还可为罗非鱼的驯化养殖提供一定参考。以往研究指出,在慢性盐度驯化中,罗非鱼从低盐度每驯化到一个较高

盐度时需要 48 h 可达到平衡^[26]。本实验为急性盐碱胁迫实验,但在最低盐碱处理组(盐度 10, 碱度 1 g/L)中,尼罗罗非鱼血清渗透压在胁迫后 48 h 时还未趋于稳定。因此,较之单盐驯化,罗非鱼盐碱混合驯化可能需要更长的时间周期才能完全适应。

3.2 盐碱度对尼罗罗非鱼鳃内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶基因表达量的影响

大量研究表明,广盐性鱼类在高盐和低盐环境适应过程中, NKA 酶活性均有升高的表现^[27-30]。本研究中,盐碱急性胁迫后,尼罗罗非鱼鳃中 NKA 基因 mRNA 表达水平随着时间的推移均表现先升高、到达高峰后降低的变化趋势,这与血清离子浓度、渗透压变化趋势一致,而且密切相关。胁迫开始后, NKA 基因 mRNA 表达水平升高,可能是应急性胁迫后血清离子浓度迅速升高、体内离子浓度调节之需;伴随 NKA 基因 mRNA 表达水平升高, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶合成增加,参与胞内离子向外转运, NKA 基因 mRNA 表达量在 24 ~ 36 h 内达到最大值;随着体内离子浓度开始下降,离子转运压力随之减小, NKA 基因 mRNA 表达水平逐渐下调,并趋于恢复。

随着盐碱浓度的增加, C、D 组中 NKA 基因 mRNA 表达水平较 A、B 组也相应增加,变化趋势更为明显,这是因为高盐浓度(15 盐度)胁迫下,体内 Na^+ 、 Cl^- 浓度上升水平增加,引起 NKA 基因 mRNA 表达量随之增加。实验中, A 组(10, 1)、C 组(15, 1)中 NKA 基因 mRNA 表达量在 36 h 达到高峰, B 组(10, 2)、D 组(15, 2)中 24 h 时达到峰值,与各实验组中血清渗透压峰值出现时间完全一致,表明了 NKA 在盐碱胁迫后血清渗透压调节中起到明显作用。高碱组(碱度 2) NKA 基因 mRNA 表达量高峰出现时间早于低碱组(碱度 1),一定程度上也表明,碱胁迫可能加大对其表达量的影响程度。

3.3 盐碱度对尼罗罗非鱼鳃内碳酸酐酶基因表达量的影响

碳酸酐酶(CA)是生物体内参与渗透压调节、离子调节、酸碱平衡等生理生化过程的核心酶之一^[31]。无论是在高渗还是低渗的调节过程中,硬骨鱼类的碳酸酐酶活性均有增加的表现^[4, 32]。本实验不同盐碱处理组的 CA 基因 mRNA 表达水平随着时间的推移大体上呈先升高、后降低趋势,

这也与血清离子浓度、渗透压变化趋势基本呈现正相关。本实验中的碱成分主要为 NaHCO_3 , 随着盐碱浓度增加,水体中 HCO_3^- 浓度增大,从而引起体内 HCO_3^- 浓度累积增高, CA 主要通过催化可逆反应($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$)迅速降低 HCO_3^- , 共同参与调节渗透压平衡。CA 基因 mRNA 表达量与血清离子浓度、渗透压变化间相一致,表明碳酸酐酶在尼罗罗非鱼盐碱胁迫渗透压调节过程中起重要作用。

本研究中, A 组(盐度 10, 碱度 1 g/L)中 CA 基因 mRNA 最高表达量时间较晚(36 h),这可能是该组中盐碱浓度最低,胁迫压力最小,体内离子转运需求最弱,机体可利用先前自身合成、存储的碳酸酐酶,因而峰值时间出现延迟。其余 3 个盐碱处理组中, CA 基因 mRNA 最高表达量时间点均为 24 h,这也与血清 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 达到峰值时间点基本一致。表明,盐碱胁迫后 24 h 时,尼罗罗非鱼体内的离子压力与转运能力均处于高峰状态^[33-34]。

本研究中观察到,急性盐碱胁迫下,尼罗罗非鱼生理极限期(渗透压峰值、离子浓度)与最高调节期(NKA 基因 mRNA, CA 基因 mRNA 表达峰值)出现时间基本吻合,一方面表明, NKA 、CA 是盐碱胁迫后参与离子转运、渗透压调节的重要转运酶,另一方面也表明了鱼类在维持体内渗透压平衡中的快速应答机制与反馈过程。

参考文献:

- [1] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish [J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 257 - 268.
- [2] Scheiner B G. The sodium pump [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(10): 2424 - 2433.
- [3] Vagin O, Sachs G, Tokhtaeva E. The roles of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ beta 1 subunit in pump sorting and epithelial integrity [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2007, 39(5-6): 367 - 372.
- [4] Henry R P, Stephen G, Dirk W, et al. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, 136(2): 243 - 258.

- [5] Hirose S, Kaneko T, Naito N, *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 136 (4): 593 - 620.
- [6] Marshall W S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293 (3): 264 - 283.
- [7] Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 301 (1): 28 - 47.
- [8] Hwang P, Lee T. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148 (3): 479 - 497.
- [9] Roy L A, Davis D A, Saoud I P, *et al.* Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 147 (2): 404 - 411.
- [10] Zimmera A M, Barcarolli I F, Wood C M, *et al.* Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both freshwater and seawater [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 122 - 123: 172 - 180.
- [11] Wang H, Geng L K, Fang W H, *et al.* Studies on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Peneaus 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. *海洋渔业*, 1997, 19 (1): 9 - 12.]
- [12] Suresh A V, Lin C K. Tilapia culture in saline waters: a review [J]. *Aquaculture*, 1992, 106 (3 - 4): 201 - 226.
- [13] Yao Z L, Li S F, Li X J, *et al.* A primary study on the acclimation to salt-water of Nile tilapia and Israel strain red tilapia [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2003, 12 (2): 97 - 101. [么宗利, 李思发, 李学军, 等. 尼罗罗非鱼和以色列红罗非鱼耐盐驯化初步报告. *上海水产大学学报*, 2003, 12 (2): 97 - 101.]
- [14] Lei Y Z, Dong S L, Shen C G. Study on the toxicity of carbonate-alkaline to fishes [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1985, 9 (2): 171 - 183. [雷衍之, 董双林, 沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究. *水产学报*, 1985, 9 (2): 171 - 183.]
- [15] Zhao L H, Jia J H, Zhao J L, *et al.* Growth comparison among three strains of *Oreochromis niloticus* juvenile in net cage under different salinity-alkalinity waters [J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9 (4): 1 - 7. [赵丽慧, 蔡金华, 赵金良, 等. 不同盐、碱度下3品系尼罗罗非鱼幼鱼网箱养殖的生长比较. *南方水产科学*, 2013, 9 (4): 1 - 7.]
- [16] Li S F, Yan B, Cai W Q. Evaluation of growth, salt tolerance and parents' heterosis contribution in reciprocal hybrids F_2 between *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32 (3): 335 - 341. [李思发, 颜标, 蔡完其, 等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交鱼自繁后代 F_2 耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估. *水产学报*, 2008, 32 (3): 335 - 341.]
- [17] Breves J P, Hasegawa S, Yoshioka M, *et al.* Acute salinity challenges in Mozambique and Nile tilapia: Differential responses of plasma prolactin, growth hormone and branchial expression of ion transporters [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167 (1): 135 - 142.
- [18] Zhuang Q Q. Osmoregulation of ionocytes and Na^+ - K^+ -ATPase a_1 in gill of *O. niloticus* under salinity stress [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [庄青青. 盐度胁迫下尼罗罗非鱼鳃离子细胞和 Na^+ - K^+ -ATPase a_1 的渗透调节. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [19] Bezerra R S, Lin E F, Alencar R B, *et al.* Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (5): 1829 - 1834.
- [20] Fan W J. A study on genes correlated to salt-tolerance of black-chin tilapia (*Sarotherodon melanotheron*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their hybrids [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011. [范武江. 萨罗罗非鱼 (*Sarotherodon melanotheron*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 及其杂交后代耐盐相关基因的研究. 上海: 上海海洋大学, 2011.]
- [21] Wang X H, Lin Y H, Jiang Q L, *et al.* Effects of NaCl on concentration of serum ions, cortisol and

- activities of Na^+ , K^+ -ATPase on tissue in *Chalcalburnus chalcoides aralensis* [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2007, 29 (5): 576 - 580. [王信海, 蔺玉华, 姜秋俚, 等. NaCl 对威海卡拉白鱼血清离子、皮质醇和组织 Na^+/K^+ -ATPase 酶活性的影响. 吉林农业大学学报, 2007, 29 (5): 576 - 580.]
- [22] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* The influence of salinity acclimation on activity of Na^+/K^+ -ATPase in branchial epithelium, concentration of ions and osmolality in serum of *Acipenser schrenckii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30 (4): 444 - 449. [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度驯化对史氏鲟鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响. 水产学报, 2006, 30 (4): 444 - 449.]
- [23] Sampaio L A, Bianchinia A. Bianchinia. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 269 (2): 187 - 196.
- [24] Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31 (3): 664 - 669. [刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响 [J]. 生态学杂志, 2012, 31 (3): 664 - 669.]
- [25] Geng L W, Xu W, Li C T, *et al.* Influence of salinity and alkalinity on serum ion concentrations, serum osmosis and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of *Barbus capito* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18 (2): 458 - 465. [耿龙武, 徐伟, 李池陶, 等. 盐碱对大鳞鲃血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响. 中国水产科学, 2011, 18 (2): 458 - 465.]
- [26] Al-Amoudi M M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water-an experimental study [J]. Aquaculture, 1987, 65: 333 - 342.
- [27] Uchida K, Kaneko T, Yamauchi K, *et al.* Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na^+/K^+ -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry [J]. Journal of Experimental Zoology, 1996, 276 (3): 193 - 200.
- [28] Velan A, Hulata G, Ron M, *et al.* Comparative time-course study on pituitary and branchial response to salinity challenge in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Nile tilapia (*O. niloticus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37 (4): 863 - 873.
- [29] Katoh F, Kaneko T. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time differential double fluorescent staining' technique [J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206: 4113 - 4123.
- [30] Lin Y M, Chen C N, Yoshinaga T, *et al.* Short-term effects of hyposmotic shock on Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 143 (3): 406 - 415.
- [31] Esbaugh A J, Perry S F, Bayaa M, *et al.* Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution [J]. The Journal of Experimental Biology, 2005, 208 (10): 1951 - 1961.
- [32] Kültz D, Bastrop R, Jürss K, *et al.* Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 1992, 102 (2): 293 - 301.
- [33] Gilmour K M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills [J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2012, 184 (3): 223 - 230.
- [34] Velan A, Hulata G, Ron M, *et al.* Comparative time-course study on pituitary and branchial response to salinity challenge in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Nile tilapia (*O. niloticus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37 (4): 863 - 873.

Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*

ZHAO Lihui, ZHAO Jinliang*, Thammaratsuntorn Jeerawat, ZHAO Yan

(Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resource, Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To understand the physiological change processes in adaptation to salinity and alkalinity water, *Oreochromis niloticus* were divided into four groups and directly transferred into four salinity-alkalinity treatments (A: salinity 10, 1 g/L NaHCO₃; B: salinity 10, 2 g/L NaHCO₃; C: salinity 15, 1 g/L NaHCO₃; D: salinity 15, 2 g/L NaHCO₃) from freshwater, and the acute changes of serum osmolality, serum Na⁺, K⁺, Cl⁻ concentration and mRNA expression of Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) and carbonic anhydrase (CA) in gill of different treatments were observed at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h post-transfer, respectively. Results showed that the changes of serum osmolality, serum Na⁺, K⁺, Cl⁻ concentration, and NKA, CA gene mRNA expression were relevant to the salinity-alkalinity stress levels. Meantime, these parameters shared a similar “up-peak-down” change trend. The serum osmolality in B, D treatments reached the peak at 24 h, while A, C treatments at 36 h. Serum Na⁺, K⁺, Cl⁻ concentration in all treatments reached the peak at 24 h. The highest NKA gene mRNA expression in B, D treatments was detected at 36 h, while 24 h in A and C treatments. The highest CA gene mRNA expression in B, C and D treatments was observed at 24 h. These results showed *O. niloticus* could adapt to salinity-alkalinity water to a certain degree, and NKA and CA were involved in ion transportations and osmolality balance under salinity-alkalinity stress.

Key words: *Oreochromis niloticus*; salinity-alkalinity stress; osmolality; ion concentration; Na⁺-K⁺-ATPase; carbonic anhydrase; mRNA expression

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn

《渔业信息与战略》2015 年征订启事

《渔业信息与战略》(原名《现代渔业信息》)创刊于 1986 年,是一本以渔业信息与发展战略为主要研究内容的综合性学术期刊,由中华人民共和国农业部办公厅主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办。本刊以党和国家的重要方针、政策为导向,以渔业发展战略为核心,始终围绕渔业发展中迫切需要解决的重大问题进行理论探讨,反映渔业发展中的新政策、新热点、新动向等,突出在渔业经济发展中的前瞻性、政策性、理论性和指导性,努力使期刊成为指导中国渔业发展的前沿阵地,战略研究者发表见解的乐园,政府、企业、高校和科研院所相关人员的思想库,从事渔业管理、生产经营、理论探索和政策研究人员学习、交流的平台。主要栏目:发展战略,政策研究,理论探索,科技前沿,环球瞭望等。读者对象:政府、行业管理部门、高校、科研院所、涉渔企业、渔业从业者等。

本刊国内外公开发行,季刊,大 16 开,80 页。国内统一刊号:CN 31-2072/S,国际标准刊号:ISSN 2095-3666,邮发代号:4-625,每期定价 12.00 元,全年 48.00 元(含邮费)。全国各地邮局(所)均可订阅,也可随时从邮局汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号 2 号楼(邮编:200090)

电话:021-65807958

联系人:周老师,E-mail:fisheryinfo@163.com。