

中华绒螯蟹蜕壳生长及其与相关基因表达的 关联分析

陈 娇 岳武成 陈晓雯 慈元吉 黄 姝 王 军 王成辉*

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: 蜕壳是甲壳动物常见的生长发育现象,但对调控蜕壳与生长的内在机制尚缺乏足够了解。本研究在室内条件下,对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 一个蜕壳周期内的个体蜕壳与生长现象进行了连续观察,分析了2个蜕壳相关基因,即蜕皮激素受体基因 (*EcR*) 和维甲类 X 受体基因 (*RXR*),以及1个生长相关基因肌肉生长抑制素基因 (*MSTN*) 的表达及其与生长性状的相关性。结果发现,中华绒螯蟹在蜕壳后会出现一个跳跃式生长期,之后进入了一个缓慢持续上升过程,当营养物质积累到一定程度(肥满度达60%左右时)时启动下一次蜕壳;*MSTN* 基因的表达与壳长 ($r = -0.450, P < 0.05$)、壳宽 ($r = -0.410, P < 0.05$) 增长率呈显著负相关,而与肥满度呈显著正相关 ($r = 0.450, P < 0.05$), *EcR* 和 *RXR* 基因的表达与体重、壳长和壳宽的增长率均没有显著相关性;相对来说, *MSTN* 在蜕壳后的表达量越高,则增重率越小;而 *EcR* 和 *RXR* 在蜕壳后表达量越高,其增重率越大。本研究结果表明,中华绒螯蟹在蜕壳后其生长具有一定的规律性,肥满度可以作为衡量中华绒螯蟹体内营养积累启动蜕壳的指标, *EcR*、*RXR* 及 *MSTN* 基因表达与生长表型具有一定的相关性。

关键词: 中华绒螯蟹; 蜕壳; 生长性状; 基因表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 06-1059-12

Observation on Individual Molting, Growth and Association Analysis with Relative Gene Expression in Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

CHEN Jiao YUE Wu-Cheng CHEN Xiao-Wen CI Yuan-Ji HUANG Shu
WANG Jun WANG Cheng-Hui*

Key Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Molting is an essential biological process for the growth and development of crustaceans, however,

基金项目 上海市中华绒螯蟹产业技术体系项目[沪农科(产)字2010-4号], 上海市科委崇明科技专项项目(No. 13391912102)和上海市工程技术中心建设项目(No. 03DZ2251800);

* 通讯作者, E-mail: wangch@shou.edu.cn;

第一作者介绍 陈娇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物种质资源与种苗; E-mail: 1203675454@qq.com.

收稿日期: 2015-07-02, 修回日期: 2016-02-26 DOI: 10.13859/j.cjz.201606014

the molecular mechanism of molting on growth regulation is little known. In this study, molting and growth performance were individually observed under the indoor laboratory condition, and gene expression level of two molting-related genes (ecdysteroid receptor gene, *EcR*; retinoid X receptor, *RXR*), and one growth related gene (myostatin, *MSTN*) were investigated using quantitative RT-PCR method (Table 1 and Fig. 4). A total of 60 juvenile crabs in each male and female groups were reared in 120 water closets of 60 L with 1 individual in each closet for two molting times. The growth traits (body weight, carapace length, carapace width, and merus length of second foot) were measured for each crab at the initial stocking stage, on the fifth day after the first molting and the second day after the second molting. Meantime, muscle and hepatopancreas tissues were immediately collected and stored in -80°C freezer after growth traits measurements at the second molting for further gene expression analysis. The correlation analysis was conducted between the expression level of the three genes (*EcR*, *RXR* and *MSTN*) and growth traits using SPSS software. A sharp gaining of body weight was found after molting, followed by a slow and continuous increment in post-molting stage (Fig. 1, 2). Condition factor that could be used as an index indicating the next molting was initiated when it accumulated over 60% (Fig. 3). There was no significant correlation between the conditional factor and morphological character (Table 2). Significant negative correlation was found between *MSTN* expression level and the growth rate of carapace length ($r = -0.450, P < 0.05$) and carapace width ($r = -0.410, P < 0.05$), but significantly positive correlation was detected between *MSTN* expression level and condition factor ($r = 0.450, P < 0.05$) (Table 3). There was no significant correlation between the *EcR* and *RXR* expression levels and the rate of weight increment, carapace length, and carapace width increment. Generally, higher expression of *MSTN* indicated lower rate of weight increment, and higher expression of *EcR* and *RXR* indicated higher rate of weight increment (Fig. 5, 6). This research indicates that a regular pattern on the growth performance, and condition factor measuring nutrient substance content could be used as an indicator showing the initiation of the next molting, and the gene expression of *EcR*, *RXR*, and *MSTN* are correlated with the growth traits in the juvenile Chinese Mitten Crab.

Key words: Chinese Mitten Crabs, *Eriocheir sinensis*; Molting; Growth traits; Gene expression

蜕壳是甲壳动物特有的生物学现象, 其许多重要的生物学过程如生长、发育、繁殖、断肢再生等均取决于蜕壳的顺利进行(张堂林等 1999, 张列士等 2001)。因而, 甲壳动物的蜕壳与生长之间的关联性是国内外学术界普遍关注的科学问题(姜仁良 1993, Chang et al. 2011, Jung et al. 2013, 汪春建等 2013, Abuhagr et al. 2014)。甲壳动物的蜕壳是一个有规律的周期性过程, 每次蜕壳都伴随着明显的外部形态变化, 如蜕去旧壳、长出新壳、体重增加、断肢再生等(张堂林等 1999, 焦满静 2013)。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属节肢动物门 (Arthropoda) 甲壳纲 (Crustacea) 十足目

(Decapoda) 方蟹科 (Grapsidae) 绒螯蟹属, 其一生中经历约 18 ~ 21 次蜕壳(张列士等 2001, 王武等 2013)。中华绒螯蟹在蜕壳时会吸收大量水分, 而在完成蜕壳后, 水分逐渐被生长的组织所替代, 当营养物质积累和生长发育到一定程度后会启动下一次蜕壳。然而, 在每次蜕壳周期中, 中华绒螯蟹生长发育到何种程度, 体内营养积累到什么状态时才会启动下一次蜕壳, 目前鲜有研究报道。此外, 中华绒螯蟹的体重增长幅度还取决于蜕壳间期长短和蜕壳后的增长率大小。相关研究表明, 中华绒螯蟹蜕壳后的体重增长差异极大, 有的个体蜕壳后体重增长率可达 160%, 而有的增长率不

到 10% (张列士等 2001, 张超 2007, 焦满静等 2013, 黄姝等 2014)。蜕壳后的增长率差异是否与蜕壳前营养积累有关(如肥满度), 尚不得而知。因而, 开展中华绒螯蟹蜕壳周期内的个体生长观察, 有利于我们更为深入了解中华绒螯蟹的蜕壳与生长规律。

另一方面, 甲壳动物的蜕壳是受多种相关基因共同调节的复杂生物学过程 (Tarrant et al. 2011, Abuhagr et al. 2014), 如蜕皮激素受体基因 (ecdysteroid receptor gene, *EcR*)、维甲类 X 受体基因 (retinoid X receptor gene, *RXR*)、蜕皮抑制激素基因 (molt inhibiting hormone gene, *MIH*) 等。其中, *EcR* 和 *RXR* 基因会形成异源二聚体, 协同参与中华绒螯蟹的整个蜕壳过程 (王瑶等 2014, Shyamal et al. 2015)。此外, 肌肉生长抑制素基因 (myostatin gene, *MSTN*) 在控制骨骼肌生长发育和分化上有十分重要的作用, 其功能在脊椎动物中已有较多的研究 (杨威等 2003, Dschietzig 2014)。近年来, 国际上对 *MSTN* 基因在虾蟹类中的研究已有相应的报道 (Covi et al. 2010, Qian et al. 2013, Lee et al. 2015), 但未有关于中华绒螯蟹的研究报道。*EcR*、*RXR* 与 *MSTN* 均是与中华绒螯蟹蜕壳与生长发育密切相关的功能基因, 因此开展这 3 个基因的表达研究, 以及与个体生长的关联分析, 可从表型与分子水平来探究中华绒螯蟹的蜕壳与生长规律。

本文在实验室条件下开展了中华绒螯蟹在一个蜕壳周期内的蜕壳与生长观察, 并对蜕壳与生长发育相关基因进行表达分析, 探讨中华绒螯蟹蜕壳后体重、肥满度和相关基因表达的变化规律及其与生长发育的相关性, 探讨中华绒螯蟹蜕壳生长的生理学和分子遗传学基础, 以便为生产上中华绒螯蟹的养殖与管理提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与饲养方式

2014 年 3 月, 挑选本实验室的中华绒螯蟹

良种选育系蟹种雌雄各 60 只, 其中雌蟹体重为 (9.18 ± 0.40) g, 雄蟹体重为 (10.06 ± 0.44) g, 分别放养在 120 个容积为 60 L 的水槽中, 每个水槽放养 1 只。水槽内种植苦草 (*Vallisneria natans*), 每天早晚各投喂商业配合饲料 (上海阳恩饲料有限公司) 1 次, 每 3 d 换 1 次水, 并保持每个水槽内的饲养环境一致。实验时间为一个蜕壳周期, 即从第一次蜕壳到完成下一次蜕壳所经历的时间。

1.2 数据与组织采集

实验蟹放入水槽前, 每只个体分别测量其体重、壳长、壳宽和第二步足长节长等生长性状。当实验蟹完成第一次蜕壳后, 每天定时测量其体重一直到完成第二次蜕壳。第一次蜕壳后第 5 天 (壳硬化后) 测量每只蟹的壳长、壳宽和第二步足长节长等性状。每只实验蟹在完成第二次蜕壳后的第 2 天测量上述生长相关性性状后, 取其肌肉、肝胰腺等组织经液氮速冻后, 保存于 -80°C 冰箱, 用于后续相关基因的表达分析。

1.3 相关基因表达分析

随机抽取上述低温冰箱中保存的 25 只实验蟹的肌肉、肝胰腺组织提取总 RNA, 提取方法参照 Axygen-RNA 提取试剂盒 (Axygen, USA) 进行。使用宝生物工程 (大连) 有限公司 Prime Script™ RT-PCR Kit 试剂盒进行反转录合成 cDNA。根据已有的蜕皮激素受体基因 (*EcR*, NCBI 序列号 KC823045.1)、维甲类 X 受体基因 (*RXR*, NCBI 序列号 KF179131.1) 和肌肉抑制素基因 (*MSTN*, NCBI 序列号 EU650662.1) 序列设计荧光定量 PCR 引物, 以 β -actin 基因作为内参 (表 1)。使用 SYBR® Premix Ex Tag™ II 荧光染料 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 以及 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪对上述基因的表达量进行检测。

1.4 数据处理

利用 SPSS Statistics 20.0、EXCEL 2010 等软件对每只实验蟹蜕壳后的生长性状进行统计分析。肥满度由体重与壳长的比值所得, 基因

表 1 *EcR*、*RXR* 和 *MSTN* 基因的荧光定量 PCR 检测引物Table 1 Quantitative RT-PCR primers for detecting expression of *MSTN*, *EcR* and *RXR* genes

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>MSTN</i> -RT (F)	CTGACCGTCGATTTCGTGGA	<i>MSTN</i> qRT-PCR
<i>MSTN</i> -RT (R)	GGGCGTACAGGAAGGGACAC	
<i>EcR</i> -RT (F)	GCCACACTTCAACGAGAAGA	<i>EcR</i> qRT-PCR
<i>EcR</i> -RT (R)	GCTGTTTCCAAACACAATGC	
<i>RXR</i> -RT (F)	ACTGCTGCAATGACGTGGAA	<i>RXR</i> qRT-PCR
<i>RXR</i> -RT (R)	GCTCGTCAGGTTAGGTGGTG	
β -actin F	TCATCACCATCGGCAATGA	β -actin qRT-PCR
β -actin R	TTGTAAGTGCTCTCGTGGATG	

相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法确定 (Livak et al. 2001)。生长与基因表达量的关联性分析采用 SPSS Statistics 20.0 双变量相关性分析。具体公式与参数如下: $R_{BW}(\%) = (W_{Bn} - W_{Bn-1}) / W_{Bn-1}$, $R_{CL}(\%) = (L_{Cn} - L_{Cn-1}) / L_{Cn-1}$, $R_{CW}(\%) = (W_{Cn} - W_{Cn-1}) / W_{Cn-1}$, $R_{FL}(\%) = (L_{Fn} - L_{Fn-1}) / L_{Fn-1}$, $F_C = (W_B / L_C^3) \times 100\%$ 。式中, R_{BW} 为体重增长率 (%), W_B 为体重 (g); R_{CL} 为壳长增长率 (%), L_C 为壳长 (mm), R_{CW} 为壳宽增长率 (%), W_C 为壳宽 (mm), R_{FL} 为第二步足长节长的增长率 (%), L_F 为第二步足长节长 (mm), n 为蜕壳次数, F_C 为肥满度 (%)。

2 结果

2.1 个体生长动态

2.1.1 体重动态变化 中华绒螯蟹蜕壳后, 体重呈跳跃式增加, 实验个体蜕壳后第 1 天的体重平均增加 52.90% (13.27% ~ 77.05%), 然后进入一个增长非常缓慢的蜕壳间期 (图 1)。蜕壳后每天定时测量体重, 蜕壳后第 10 天平均体重比蜕壳后第 1 天增长了 6.34%, 蜕壳后第 20 天比蜕壳后第 1 天增长了 9.16%, 蜕壳后第 30 天比蜕壳后第 1 天增长了 9.83%, 而进入下一次蜕壳前 1 天的平均体重比蜕壳后第 1 天增长了 11.19%。表明中华绒螯蟹在蜕壳后, 其体重增长为一个缓慢的持续上升趋势, 蜕壳后前 10 天的体重增长相对较快, 之后体重增长逐渐放缓。

2.1.2 形态性状变化 与体重不同, 中华绒螯蟹壳长、壳宽及第二步足长节长这些外部形态特征在蜕壳完成时既已固定, 在整个蜕壳间期不再变化, 要到下一次蜕壳后才能完成再一次的跳跃式增长。从一个蜕壳周期内 (完成两次蜕壳) 的壳长、壳宽、第二步足长节长的变化趋势 (图 2) 看, 相对于体重, 这些性状蜕壳后的增长幅度较小, 壳长每次蜕壳后平均增长 13.98%, 壳宽平均增长 14.22%, 第二步足长节长平均增长 13.73%。表明中华绒螯蟹在蜕壳后, 各形态性状的增长率较为一致。

2.2 肥满度

中华绒螯蟹在蜕壳后, 其肥满度从蜕壳前的 59.11% 下降到蜕壳后第一天的 54.64%, 差异极显著 ($P < 0.01$)。随着蜕壳后营养物质的积累, 肥满度逐步上升, 蜕壳后第 5 天其肥满度显著高于蜕壳后第 1 天 ($P < 0.05$), 到蜕壳后第 8 天其肥满度极显著高于蜕壳后第 1 天 ($P < 0.01$)。蜕壳后第 10 天的肥满度平均达 58.18%, 蜕壳后第 20 天平均达 59.66%, 蜕壳后第 30 天平均达 60.05%, 而到下次蜕壳前 1 天的肥满度平均达 61.49% (图 3)。表明中华绒螯蟹蜕壳后, 其营养积累指标——肥满度达 60% 以上时将启动下一次蜕壳。

2.3 *EcR*、*RXR* 和 *MSTN* 基因的表达检测

对随机抽取的 25 个样本进行 RT-PCR 的电泳 (图 4) 检测发现, *EcR* 基因在肝胰腺组织中的 Ct 阈值为 23.58 ~ 30.91, *RXR* 基因在肝胰

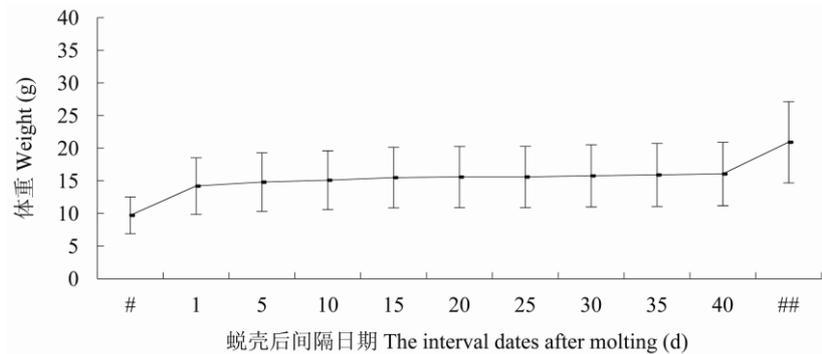


图 1 实验中华绒螯蟹个体蜕壳后的体重日动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of daily body weight for each Chinese Mitten Crab after molting

#. 初始体重; ##. 第二次蜕壳后的体重。#. Initial body weight; ##. Body weight of the second molting.

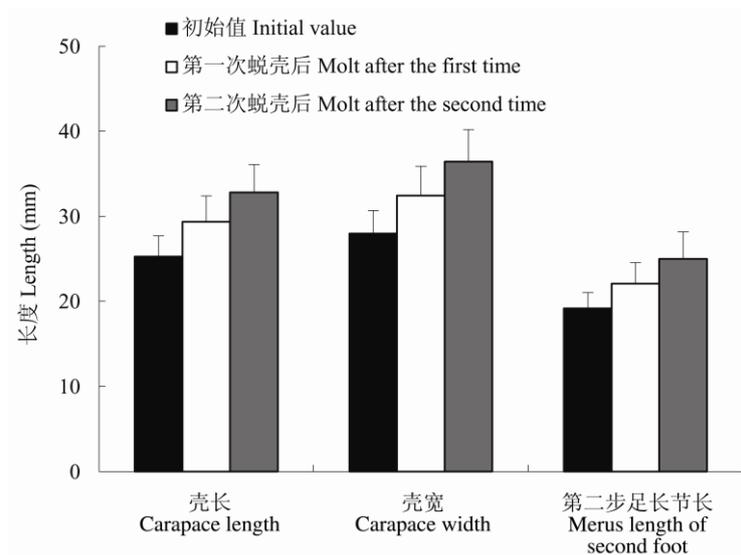


图 2 实验中华绒螯蟹蜕壳后壳长、壳宽和第二步足长节的生长情况

Fig. 2 The increment characteristics of carapace length, width and merus length of second foot in Chinese Mitten Crabs after molting

腺组织的 Ct 阈值为 24.76 ~ 35.33, *MSTN* 基因在肌肉组织的 Ct 阈值为 21.89 ~ 31.35, 表达较为稳定。

2.4 关联性分析

2.4.1 生长性状间关联性分析 对蜕壳前的中华绒螯蟹肥满度与蜕壳后生长性状的增长率进行相关分析发现, 蜕壳前的肥满度与蜕壳后体重增长率、壳宽增长率均不存在相关性 ($P > 0.05$), 第一次蜕壳前肥满度与第一次蜕壳后的

壳长增长率存在显著的相关性 ($r = 0.407$, $P < 0.05$), 但第二次蜕壳前肥满度与第二次蜕壳后的壳长增长率却无相关性 ($P > 0.05$) (表 2)。总体上看, 中华绒螯蟹蜕壳前的肥满度对蜕壳后生长性状增长率影响较少。

2.4.2 基因表达间的关联性分析 通过对三个基因 (*EcR*、*RXR* 和 *MSTN*) 的相对表达量进行相关性分析发现, *EcR* 基因与 *RXR* 基因的表达呈极显著正相关 ($r = 0.973$, $P < 0.01$), 而 *MSTN*

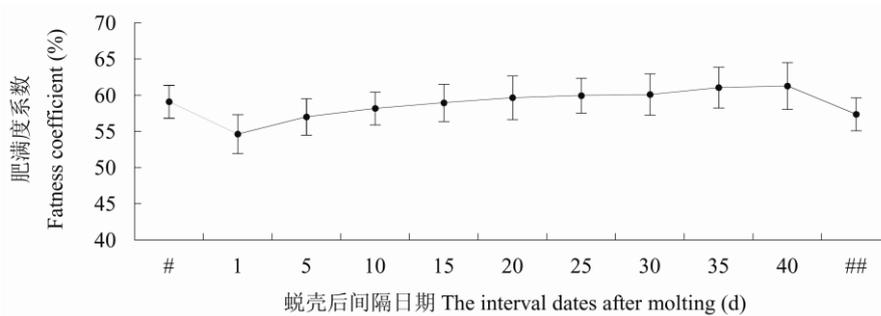


图 3 实验中华绒螯蟹蜕壳后日肥满度动态

Fig. 3 The daily dynamic changes of conditional factors for each Chinese Mitten Crab after molting

#. 初始肥满度; ##. 第二次蜕壳后的肥满度. #. Initial conditional factor value; ##. Conditional factor value of the second molting.

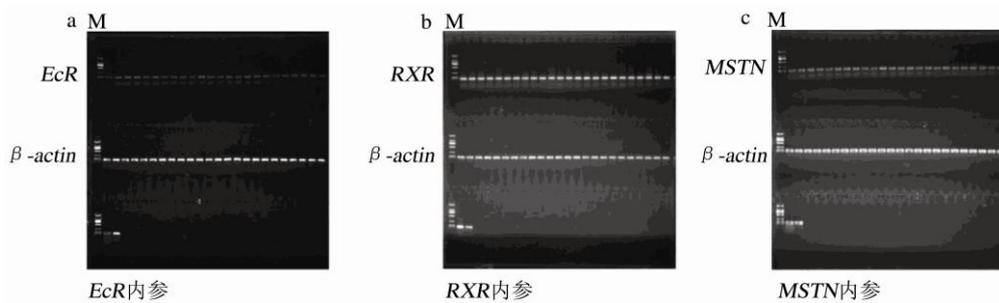


图 4 *EcR*、*RXR* 和 *MSTN* 基因的定量表达检测

Fig. 4 The expression detection for the *EcR*, *RXR* and *MSTN* genes

a. *EcR* 基因在肝胰腺组织中的表达检测; b. *RXR* 基因在肝胰腺组织中的表达检测; c. *MSTN* 基因在肌肉组织中的表达检测。

a. The expression detection for the *EcR* gene in hepatopancreas; b. The expression detection for the *RXR* gene in hepatopancreas; c. The expression detection for the *MSTN* gene in muscle.

基因与 *EcR* ($r = -0.195, P > 0.05$)、*RXR* ($r = -0.190, P > 0.05$) 基因的表达量均不相关。由此表明, *EcR* 基因与 *RXR* 基因具有显著的协同作用, 而 *MSTN* 基因与 *EcR*、*RXR* 基因不存在显著的相互作用。

2.4.3 基因表达与性状间的关联性分析 通过对三个基因的表达量与生长性状进行相关性分析(表 3)发现, 壳长、壳宽增长率与 *MSTN* 基因的表达呈显著负相关, 肥满度与 *MSTN* 基因的表达呈显著正相关, *EcR* 与 *RXR* 基因的表达与各生长指标均没有相关性。

进一步对三个基因表达量与生长性状分析发现: 三个基因的相对表达量与增重率和壳长、壳宽及第二步足长节长的增长率均呈直线关

系。其中, *MSTN* 与 4 个生长性状的函数关系为单调递减直线函数(图 5), *EcR*、*RXR* 与以上 4 个生长性状的函数关系为单调递增直线函数(图 6, 7)。根据荧光定量结果将三个基因的相对表达量分为三类 (< 0.1 ; $0.1 \sim 0.2$; > 0.2), 发现在蜕壳后 *MSTN* 的表达量越高, 则增重率越小; 而 *EcR* 和 *RXR* 的表达量越高, 其蜕壳后的增重率越大(图 8)。

3 讨论

中华绒螯蟹的甲壳(外骨骼)形成固化后, 将形成固定的组织结构框架, 无法继续生长, 因此中华绒螯蟹在生长过程中必须一次次蜕去旧的甲壳, 长出新壳, 才能完成生长。有研究

表 2 实验中华绒螯蟹肥满度与蜕壳后体重、壳长、壳宽增长率的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between conditional factors and growth rate of body weight, carapace length and width in Chinese Mitten Crabs

蜕壳次数 Molting times	肥满度与体重增长率 Conditional factors vs. weight increment rate	肥满度与壳长增长率 Conditional factors vs. carapace length increment rate	肥满度与壳宽增长率 Conditional factors vs. carapace width increment rate
1	- 0.067 ($P > 0.05$)	0.407 ($P < 0.05$)	0.330 ($P > 0.05$)
2	0.125 ($P > 0.05$)	0.200 ($P > 0.05$)	0.353 ($P > 0.05$)

表 3 实验中华绒螯蟹的生长指标与相关基因表达的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between growth characteristics and relative gene expression in Chinese Mitten Crabs

生长指标 Growth index	基因 Gene		
	<i>MSTN</i>	<i>EcR</i>	<i>RXR</i>
增重率 Weight increment rate	- 0.270 ($P > 0.05$)	0.086 ($P > 0.05$)	0.121 ($P > 0.05$)
壳长增长率 Carapace length increment rate	- 0.450 ($P < 0.05$)	0.001 ($P > 0.05$)	0.029 ($P > 0.05$)
壳宽增长率 Carapace width increment rate	- 0.410 ($P < 0.05$)	0.168 ($P > 0.05$)	0.164 ($P > 0.05$)
第二步足长节增长率 Merus length increment rate of second foot	- 0.260 ($P > 0.05$)	0.042 ($P > 0.05$)	0.079 ($P > 0.05$)
肥满度 Conditional factors	0.450 ($P < 0.05$)	0.161 ($P > 0.05$)	0.205 ($P > 0.05$)

认为甲壳类的生长决定于它蜕壳的次数和每次蜕壳的增长量(杨培根等 1998),且蜕壳后群体增长均为上升趋势(何杰 2005)。中华绒螯蟹在蜕壳过程中,大量吸收水分,体重明显增加,而在蜕壳后的生长中,体重则缓慢生长,水分逐渐为组织生长所代替(杨培根等 1998)。朱清顺等(2007)的研究结果也表明,中华绒螯蟹蜕壳后体重呈现飞跃式的增加,是由于中华绒螯蟹在蜕壳后大量吸水,身体膨胀所致。本研究同样也观察到中华绒螯蟹在蜕壳后体重、壳长及壳宽等都出现极显著变化,而在蜕壳间期的体重变化较为平缓。相对来说,蜕壳后前 10 d 的体重增长相对较快,之后体重增长逐渐放缓。蜕壳后第 2 天体重的飞跃式增加正是由于蜕壳吸水所致;10 日之内体重变化较大,推测是由于蜕壳后甲壳还未完全硬化还会继续吸水;10 日之后体重增长进入平台期,是由于水分逐渐为组织生长所代替。同样,中华绒螯蟹的形态性状在蜕壳后也会发生飞跃式的生长,但形态性状在蜕壳后是一次性长足,在蜕

壳间期是微量增长甚至不会增长,只有到下一次蜕壳才会有明显的生长,且相对于蜕壳后体重的增长,形态性状增长显著较小。杨培根等(1998)的研究中也指出,中华绒螯蟹在蜕壳后壳宽相对增长率平均为 10.53%,体重相对增长率平均为 33.22%,而未蜕壳中华绒螯蟹几乎停止生长。

曾经有学者将肥满度作为判定动物对环境适应的生理状态和营养状况的综合指标,如在三疣梭子蟹(*Portunus tritubercatus*)中已将肥满度作为衡量其生长状况好坏的重要指标之一(郑海波等 2008,高保全等 2012)。还有学者将肥满度接近 0.6(60%)的中华绒螯蟹,视为规格较大的优质蟹(杨品红等 2014)。有研究表明,中华绒螯蟹在生长过程中随着体内营养物质不断增加,积累到一定程度就促使蜕壳的发生(何杰 2005)。本实验研究结果表明,蜕壳后与蜕壳前肥满度差异极显著,刚蜕完壳的肥满度最低,蜕壳后第 8 天极显著高于蜕壳后第 1 天,到蜕壳后第 30 天肥满度达到 60.05%,

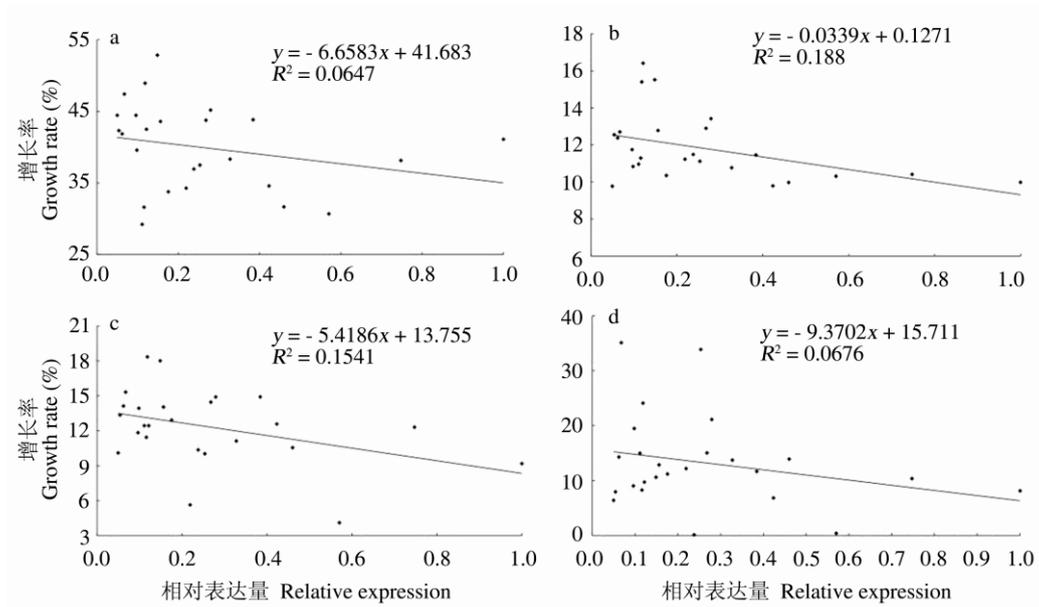


图 5 实验中华绒螯蟹的 *MSTN* 基因相对表达量与生长特性的关系

Fig. 5 Relationship between *MSTN* gene expression and growth characteristics in Chinese Mitten Crabs

a. 体重; b. 壳长; c. 壳宽; d. 第二步足长节长。a. Body weight; b. Carapace length; c. Carapace width; d. Merus length of second foot.

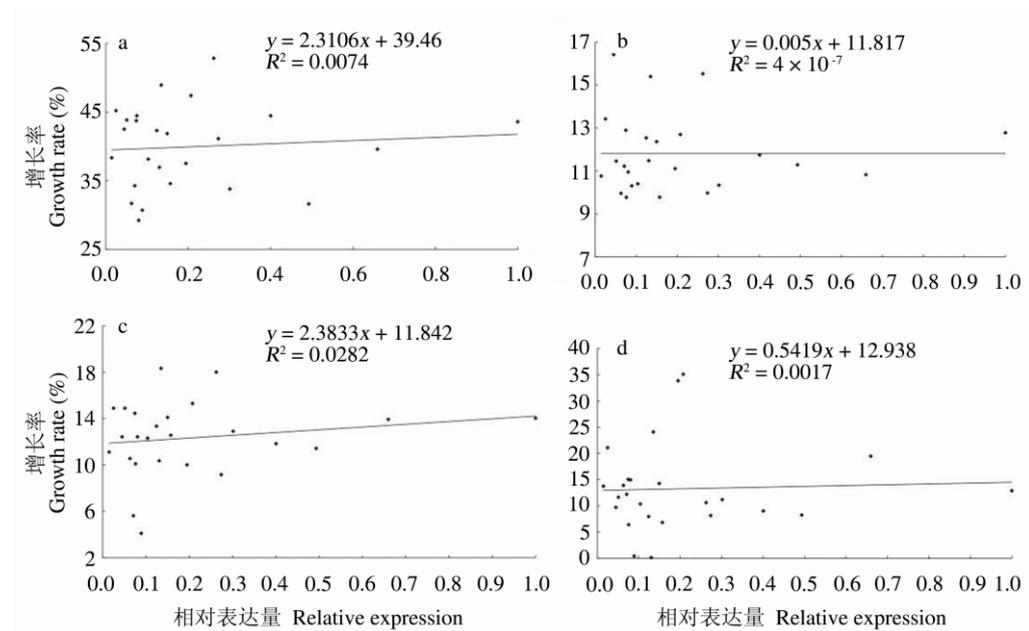


图 6 实验中华绒螯蟹的 *EcR* 基因相对表达量与生长特性的关系

Fig. 6 Relationship between *EcR* gene expression and growth characteristics in Chinese Mitten Crabs

a. 体重; b. 壳长; c. 壳宽; d. 第二步足长节长。a. Body weight; b. Carapace length; c. Carapace width; d. Merus length of second foot.

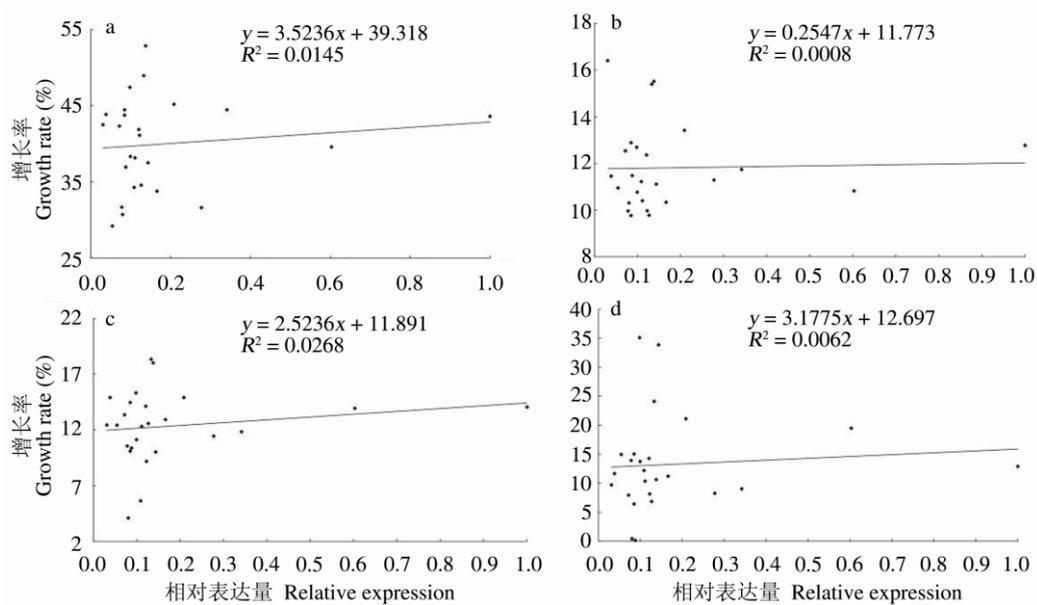


图 7 实验中华绒螯蟹的 *RXR* 基因相对表达量与生长特性的关系

Fig. 7 Relationship between *RXR* gene expression and growth characteristics in Chinese Mitten Crabs

a. 体重; b. 壳长; c. 壳宽; d. 第二步足长节长。a. Body weight; b. Carapace length; c. Carapace width; d. Merus length of second foot.

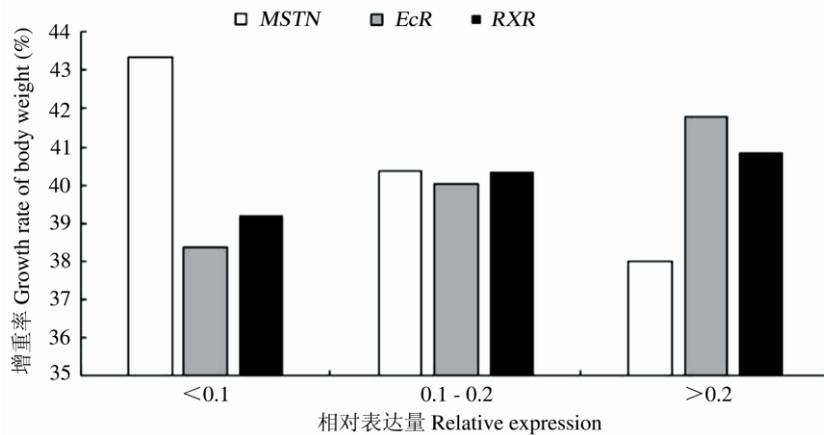


图 8 实验中华绒螯蟹的 *MSTN*、*EcR* 和 *RXR* 基因相对表达量与增重率的关系

Fig. 8 Relationship between *MSTN*、*EcR* and *RXR* gene expression and weight growth rate in Chinese Mitten Crabs

说明刚蜕完壳的中华绒螯蟹还没有营养物质的积累, 在随后的生长过程中, 体内开始慢慢积累营养物质, 肥满度也会随之达到高峰。本次实验的观察结果表明, 肥满度在达到 60% 时大部分中华绒螯蟹会蜕壳, 因此我们推测中华绒螯蟹蜕壳后随着营养物质的积累肥满度逐渐升

高, 当达到 60% 左右时将启动下一次蜕壳。

中华绒螯蟹的生长必须要通过蜕壳来完成, 而蜕壳与生长发育是通过蜕皮激素调节实现的 (Tarrant et al. 2011)。然而蜕皮激素需要与蜕皮激素受体结合成二聚体才能起作用, 因此 *EcR* 作为蜕皮激素靶位点与蜕皮激素的变化

和功能具有一致性 (Techa et al. 2013)。大量的研究表明, *EcR* 的表达与甲壳类生物的生长发育密切相关, 平分大额蟹 (*Metopograpsus messor*) 在生长与蜕壳时期的 *EcR* 表达量显著高于非生长时期的表达量, 即 *EcR* 表达较高的季节, 其体重的增重率也相应较大 (Shyamal et al. 2015); 在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中, *EcR* 的高表达发生在肌蛋白合成时期, 此时期体重会迅速增加 (Gong et al. 2015); 在甲壳动物桡足类中, *EcR*、*RXR* 表达很低时会进入滞育期而停止生长 (Clark et al. 2013)。本文研究结果也发现, *EcR* 与 *RXR* 相对表达量与增重率、壳长和壳宽等增长率呈正相关性, 即 *EcR* 与 *RXR* 表达量越高, 其增重率、壳长和壳宽等增长率也会较大。

生长相关基因 *MSTN* 是生长转化因子基因家族的重要成员, 抑制了成肌细胞的分化和增殖, 进而调控生长发育 (濮剑威 2011)。在许多不同物种的研究中, *MSTN* 均被认为是肌肉生长的负调控因子, 缙蛭 (*Sinonovacula constricta*) 的生长与 *MSTN* 表达的关联性研究表明, *MSTN* 基因参与缙蛭的肌肉生长调控, 其中有 6 个 SNP 位点与体重、壳长、壳宽有显著相关性 (Niu et al. 2015)。在医学上通过抑制 *MSTN* 活性, 减低 *MSTN* 表达量从而增加肌肉生长量, 以此用来治疗肌肉萎缩、营养不良等症状 (Dschiertzig 2014)。还有研究者利用基因敲除技术观察到缺失 *MSTN* 基因的小鼠 (*Mus musculus*) 表现出肌肉肥大和肌纤维增多等症状, 导致骨骼肌肌肉质量显著增加, 缺失 *MSTN* 基因的小鼠平均体重超过正常小鼠的 261% (马毅 2005)。同样在甲壳动物中, 注射 *MSTN* dsRNA 的对虾 (*Penaeus orientalis*) 实验组体重增长率显著降低, 这说明 *MSTN* 高表达是不利于增重的 (Lee 2004)。在黑背陆地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) 中, *MSTN* 表达量下降会导致肌肉中蛋白质转换率提高, 而 *MSTN* 表

达量上升会导致胸肌重量下降 (Covi et al. 2010)。本文的研究结果同样表明, *MSTN* 表达与中华绒螯蟹的增重率呈现负相关性, 在 *MSTN* 高表达的中华绒螯蟹个体中, 其增重率较小, 推测 *MSTN* 的调控机制可能是通过抑制成肌细胞的增殖从而抑制中华绒螯蟹肌肉的生长。

综上所述, 中华绒螯蟹在蜕壳后, 其体重增长为一个缓慢的持续上升趋势, 蜕壳后前 10 天的体重增长相对较快, 之后体重增长逐渐放缓。蜕壳后随着营养物质的积累, 当肥满度达 60% 以上时将启动下一次蜕壳。*MSTN* 基因在蜕壳后表达量越高, 其增重率越小; 而 *EcR* 和 *RXR* 在蜕壳后表达量越高, 其增重率越大。

参 考 文 献

- Abuhagr A M, Blindert J L, Nimitkul S, et al. 2014. Molt regulation in green and red color morphs of the crab *Carcinus maenas*: gene expression of *molt-inhibiting hormone* signaling components. *The Journal of Experimental Biology*, 217(5): 976–808.
- Chang E S, Donald L, Mykles D L. 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. *General and Comparative Endocrinology*, 172(3): 323–330.
- Clark K A J, Brierley A S, Pond D W, et al. 2013. Changes in seasonal expression patterns of ecdysone receptor, *retinoid X receptor* and an A-type allatostatin in the copepod, *Calanus finmarchicus*, in a sea loch environment: An investigation of possible mediators of diapause. *General and Comparative Endocrinology*, 189(8): 66–73.
- Covi J A, Bader D B, Chang E S, et al. 2010. Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a *myostatin*-like factor during atrophy induced by molting or unweighting. *The Journal of Experimental Biology*, 213(1): 172–183.
- Dschiertzig T B. 2014. *Myostatin* — From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clinica Chimica Acta*,

- 433(6): 216–244.
- Gong J, Yu K, Shu L, et al. 2015. Evaluating the effects of temperature, salinity, starvation and autotomy on molting success, molting interval and expression of *ecdysone receptor* in early juvenile mud crabs, *Scylla paramamosain*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 464(5): 11–17.
- Jung H, Lyons R E, Hurwood D A, et al. 2013. Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. *Reviews in Aquaculture*, 5(2): 77–110.
- Lee J H, Momani J, Kim Y M, et al. 2015. Effective RNA-silencing strategy of *Lv-MSTN/GDF11* gene and its effects on the growth in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 179(1): 9–16.
- Lee S J. 2004. Regulation of muscle mass by *myostatin*. *Biology*, 20(4): 61–86.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Niu D, Wang L, Bai Z, et al. 2015. Identification and expression characterization of the *myostatin* (*MSTN*) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Gene*, 555(1): 297–304.
- Qian Z, Mi X, Wang X, et al. 2013. cDNA cloning and expression analysis of *myostatin/GDF11* in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(1): 30–39.
- Shyamal S, Anilkumar G, Bhaskaran R, et al. 2015. Significant fluctuations in *ecdysteroid receptor* gene (*EcR*) expression in relation to seasons of molt and reproduction in the grapsid crab, *Metopograpsus messor* (Brachyura: Decapoda). *General and Comparative Endocrinology*, 211(1): 39–51.
- Tarrant A M, Behrendt L, Stegeman J J, et al. 2011. *Ecdysteroid receptor* from the American lobster *Homarus americanus*: *EcR/RXR* isoform cloning and ligand-binding properties. *General and Comparative Endocrinology*, 173(9): 346–355.
- Techa S, Chung J S. 2013. *Ecdysone and retinoid-X receptors* of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Cloning and their expression patterns in eyestalks and Y-organs during the molt cycle. *Gene*, 527(1): 139–153.
- 高保全, 刘萍, 李健, 等. 2012. 三疣梭子蟹 4 个野生群体肥满度的初步研究与比较分析. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, (增刊 1): 51–53.
- 何杰. 2005. 中华绒螯蟹池塘生态养殖群体生长特征研究. *水利渔业*, 25(6): 10–11.
- 黄姝, 王中清, 茅海成, 等. 2014. 中华绒螯蟹在实验室条件下的成蟹阶段蜕壳与生长观察. *上海海洋大学学报*, 23(3): 359–365.
- 姜仁良, 朱大白. 1993. 虾蟹类的蜕壳和生长. *水产科技情报*, 20(2): 55–57.
- 焦满静. 2013. 中华绒螯蟹蜕皮机制与影响因素的研究. 河北: 河北大学理学硕士学位论文, 1–6.
- 马毅. 2005. 肌肉抑制素基因工程疫苗原型的研究. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 1–5.
- 濮剑威. 2011. 草鱼肌肉生长抑制素基因克隆及功能研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1–4.
- 汪春建, 朱冬发, 亓一舟, 等. 2013. 三疣梭子蟹蜕皮周期中 *MIH* 基因 mRNA 水平与蜕皮激素浓度变化. *水生生物学报*, 37(1): 22–28.
- 王武, 王成辉, 马旭洲. 2013. 河蟹生态养殖. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 54–57.
- 王瑶, 杨志刚, 沈城, 等. 2014. 中华绒螯蟹 *EcR* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析. *水产学报*, 38(5): 651–661.
- 杨培根, 李晨虹. 1998. 笼养中华绒螯蟹的蜕壳与生长. *上海水产大学学报*, 7(2): 158–161.
- 杨品红, 李梦军, 黄春红, 等. 2014. 大通湖中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 品质分析与评价. *海洋与湖沼*, 45(3): 637–643.
- 杨威, 王琨, 陈岩, 等. 2003. 重组肌肉抑制素功能分析及其对鸡肌肉发育的抑制作用. *生物化学与生物物理学报*, 35(11): 1016–1022.
- 张超. 2007. 中华绒螯蟹幼蟹蜕壳与生长的初步研究. *水利渔业*, 27(2): 58–60.

- 张列士, 陆锦天. 2001. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 蜕壳和生长的研究进展. 水产科技情报, 28(6): 246-250.
- 张堂林, 李钟杰. 1999. 中华绒螯蟹幼蟹蜕壳的生态学观察. 湖泊科学, 11(4): 333-337.
- 郑海波, 夏文水. 2008. 中华绒螯蟹的品质分析与比较. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 1-18.
- 朱清顺, 柏如法. 2007. 池塘养殖的中华绒螯蟹与长江野生中华绒螯蟹生物学特性比较. 江苏农业学报, 23(3): 218-223.