

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22320120153449

廈門大學

博士学位论文

基于心率测评的鲍对高温耐受性的研究

Studies on Heat Tolerance in Abalone Based on the
Measurement of Heart Rate

陈楠

指导教师姓名: 柯才焕教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2016年11月

论文答辩时间: 2016年12月

2016年12月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

摘要.....	I
Abstract.....	IV
第一章 绪论	7
1.1 鲍在中国的养殖现状.....	7
1.2 温度对养殖贝类的影响.....	9
1.2.1 温度变化对贝类生长发育及存活的影响.....	9
1.2.2 温度变化对贝类能量代谢的影响.....	11
1.2.3 温度变化对贝类免疫系统的影响.....	12
1.3 软体动物热耐受性的研究进展.....	15
1.3.1 牡蛎.....	15
1.3.2 贻贝.....	16
1.3.3 扇贝.....	17
1.3.4 鲍.....	17
1.4 阿氏拐点温度的研究进展.....	21
1.5 本研究的意义和内容.....	22
1.5.1 研究意义.....	22
1.5.2 研究内容.....	23
第二章 鲍心率 ABT 测定方法的建立	24
2.1 材料与方法.....	25
2.1.1 鲍心率测定装置的搭建.....	25
2.1.2 不同条件下鲍心率 ABT 的测定.....	26
2.1.3 心率 ABT 测定方法的可行性检验.....	28
2.2 结果.....	29
2.2.1 干露及不同水温条件下鲍的心率.....	29
2.2.2 鲍心率 ABT 测定的影响因素.....	31

2.2.3 心率 ABT 测定方法的可行性检验.....	35
2.3 讨论.....	36
第三章 心率 ABT 测定方法的验证.....	38
3.1 材料与方法.....	39
3.1.1 实验动物及驯化条件.....	39
3.1.2 鲍摄食峰值温度的测定.....	39
3.1.3 半致死温度 (LT ₅₀) 的测定.....	39
3.1.4 Kaplan-Meier 存活曲线的绘制.....	40
3.1.5 临界热最大值 (CTM) 的测定.....	40
3.1.6 数据处理.....	40
3.2 结果.....	41
3.2.1 鲍摄食峰值温度的测定.....	41
3.2.2 鲍半致死温度 (LT ₅₀) 的测定.....	42
3.2.3 鲍 Kaplan-Meier 存活曲线的绘制.....	44
3.2.4 临界热最大值 (CTM) 的测定.....	45
3.3 讨论.....	47
第四章 鲍不同高温耐受性群体的转录组比较分析.....	50
4.1 材料与方法.....	51
4.1.1 皱纹盘鲍红壳品系的海上养成实验.....	51
4.1.2 皱纹盘鲍不同品系心率 ABT 的测定.....	51
4.1.3 转录组分析.....	51
4.1.4 数据处理.....	59
4.2 结果.....	59
4.2.1 皱纹盘鲍红壳品系的海水养成实验.....	59
4.2.2 皱纹盘鲍不同群体心率 ABT 的测定.....	59
4.2.3 洋下群体与红壳色群体的转录组分析.....	60
4.3 讨论.....	73

第五章 鲍种间杂交子代的温度耐受性研究	80
5.1 材料与方法.....	82
5.1.1 种间杂交子代心率 ABT 的测定.....	82
5.1.2 温度应激.....	82
5.1.3 实时荧光定量 PCR (RT-PCR)	82
5.1.4 甲基化敏感扩增多态性分析 (MSAP)	83
5.1.5 数据分析.....	87
5.2 结果.....	88
5.2.1 种间杂交子代心率 ABT 的测定.....	88
5.2.2 HSP70 与 90 基因的 RT-PCR 分析.....	89
5.2.3 甲基化敏感扩增多态性分析.....	92
5.3 讨论.....	95
第六章 对高温适应过程中鲍遗传多样性的改变	99
6.1 材料与方法.....	100
6.1.1 材料背景.....	100
6.1.2 鲍心率 ABT 的测定.....	101
6.1.3 微卫星分析.....	101
6.1.4 数据分析.....	103
6.2 结果.....	105
6.2.1 晋江 (F3) 与连江群体的 ABT 测定	105
6.2.2 遗传多样性分析.....	105
6.3 讨论.....	110
第七章 论文的主要结论和创新点	113
7.1 论文的主要结论.....	113
7.2 创新点.....	114
7.3 不足与展望.....	114
参考文献	115

在学期间发表的论文	135
致谢	136

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	IV
Chapter 1 Introduction	7
1.1 The abalone aquaculture in China	7
1.2 The influence of temperature on the farming shelifish	9
1.2.1 The influence on growth and survival.....	9
1.2.2 The influence on energy metabolism	11
1.2.3 The influence on immune system	12
1.3 The study of heat tolerance in mollusc	15
1.3.1 Oyster	15
1.3.2 Mussel	16
1.3.3 Scallop.....	17
1.3.4 Abalone	17
1.4 The study of Arrhenius Breakpoint Temperature	21
1.5 The objective and significance of this study	22
1.5.1 Research significance.....	22
1.5.2 Research contents.....	23
Chapter 2 The establishment of evaluation method based on cardiac performance	24
2.1 Materials and methods	25
2.1.1 The experimental facility	25
2.1.2 Measurement of ABT with different conditions	26
2.1.3 The feasibility test of measurement of ABT	28
2.2 Result	29
2.2.1 The heart rate of abalone when exposure to air and at different	

temperature	29
2.2.2 The influence factors of ABT.....	31
2.2.3 Feasibility test	35
2.3 Discussion	36
Chapter 3 The verification of measurement of ABT	38
3.1 Materials and methods	39
3.1.1 Animal and acclimation	39
3.1.2 Measurement of temperature of maximum food consumption.....	39
3.1.3 Mesurement of lethal temperature	39
3.1.4 The drawing of Kaplan-Meier survival curve.....	40
3.1.5 Mesurement of critical thermal maximum.....	40
3.1.6 Statistic analysis	40
3.2 Result	41
3.2.1 Temperature of maximum food consumption	41
3.2.2 Lethal temperature (LT ₅₀)	42
3.2.3 Kaplan-Meier survival curve	44
3.2.4 Critical thermal maximum	45
3.3 Discussion	47
Chapter 4 Transcriptom analysis of <i>H. discus hannai</i> populations with different heat tolerance	50
4.1 Materials and methods	51
4.1.1 Grow out experiment	51
4.1.2 Measurement of ABT among different <i>H. discus hannai</i> populaitons .51	51
4.1.3 Transcriptom analysis	51
4.1.4 Statistic analysis	59
4.2 Result	59
4.2.1 Grow-out experiment of Red population	59
4.2.2 The ABT of different populaitons in <i>H. discus hannai</i>	59

4.2.3 Transcriptom analysis of YX and Red populations.....	60
4.3 Discussion.....	73
Chapter 5 The study of heat tolerance in interspecies hybrid and parents.....	80
5.1 Materials and methods	82
5.1.1 Measurement of ABT of different hybrids and parents	82
5.1.2 Heat exposed.....	82
5.1.3 Quantitative real-time PCR (RT-PCR).....	82
5.1.4 Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP).....	83
5.1.5 Statistic analysis.....	87
5.2 Result.....	88
5.2.1 Measurement of ABT in hybrids and parents	88
5.2.2 RT-PCR analysis of Heat shock protein 70 and 90	89
5.2.3 MSAP analysis	92
5.3 Discussion.....	95
Chapter 6 The genetic diversity of abaloen when adapted to the high temperature condition	99
6.1 Materials and methods	100
6.1.1 Backgroud	100
6.1.2 Measurement of ABT.....	101
6.1.3 Microsatellite analysis	101
6.1.4 Statistic analysis.....	103
6.2 Result.....	105
6.2.1 The ABT of Jinjiang (F3) and Lianjiang population.....	105
6.2.2 Genetic diversity of different populations	105
6.3 Discussion.....	110
Chapter 7 General conclusion and innovation.....	113
7.1 General conclusion.....	113

7.2 Innovations	114
7.3 Perspectives	114
References	115
Projects and publications	135
Acknowledgements	136

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

鲍是海产八珍之首，2015年，我国的鲍产量已经超过13万吨，其中福建省的产量占全国的80%。皱纹盘鲍为温带种，原分布于我国黄、渤海海域，1990年代后期南移福建后，获得了极大发展，由此福建逐步成为我国鲍养殖的主产区。但福建海域的夏季高水温往往导致鲍的高死亡率，这一直困扰着鲍养殖产业的发展。因此，培育耐高温的养殖新品种显得尤为重要，而其中建立鲍的耐高温性状的准确测评方法是品种培育的关键。本研究中，我们通过测定阿氏拐点温度（Arrhenius breakpoint temperature, ABT），建立了基于心率测定的鲍对高温耐受性的评测方法，利用这一方法结合转录组学、表观遗传学对鲍的不同耐高温特性的机制进行了探究；以鲍心率 ABT 测定为基础，结合微卫星分析，我们还探讨了鲍在高温适应中的遗传多样性的变化。本研究结果有望为鲍耐高温新品种培育提供科学依据。

1. 鲍心率阿氏拐点温度（Arrhenius Breakpoint Temperature, ABT）测定方法的建立

研究了升温速率、个体大小、驯化温度、性别及饥饿情况等因素对皱纹盘鲍心率 ABT 测定的影响，结果表明，ABT 仅与暂养温度有关，其余因素对 ABT 的影响极小。最终确定的皱纹盘鲍 ABT 测评的基础条件为：水温 20 °C 驯化，升温速率 1 °C/10 min。利用这一评测方法对皱纹盘鲍、西氏鲍及西盘鲍的心率 ABT 进行测定，结果显示，它们的 ABT 值依次为：西盘鲍 32.50 ± 0.71 °C、西氏鲍 31.30 ± 1.52 °C、皱纹盘鲍 30.00 ± 1.23 °C。

2. 心率 ABT 测评方法的验证

以皱纹盘鲍、西氏鲍和西盘鲍为研究对象，以半数致死温度、Kaplan-Meier 存活曲线、临界热最大值为研究方法，对三个群体鲍的耐高温性状进行了测定，三种测定方法的结果与心率 ABT 测定值基本相同，表明心率 ABT 适用于鲍对高

温耐受性的研究。而且与其他方法相比，心率 ABT 的测定方法有着可单个个体测定、实验样品量少、灵敏性和准确度高、周期短和损耗少等优点。

3. 鲍不同高温耐受性群体的转录组比较分析

利用心率 ABT 的评测方法，对皱纹盘鲍 5 个群体即洋下、东山、红壳色、日本以及长岛群体的耐高温性状进行测定比较，筛选出了 ABT 值最高与最低的洋下群体和红壳色群体。并以红壳色群体的 ABT 值作为胁迫条件，对两个群体的鳃组织进行转录组测序。对照组中，两个群体间存在 535 个差异基因，其中 374 个基因上调，161 个基因下调（红壳色群体 VS 洋下群体），KEGG 注释的结果表明，差异基因集中在淀粉与蔗糖代谢、氧化磷酸化以及糖类的代谢与吸收通路。红壳色群体中，对照组与应激组间共发现了 3370 差异基因，其中 2217 个基因上调，1153 个基因下调（热应激组 VS 对照组）。而在洋下群体中，仅发现 1351 个差异基因，其中 1121 个上调，230 个基因下调。热应激组与对照组间的差异基因都可注释到的通路包括了内质网蛋白加工、NOD-受体的信号通路、TNF 信号通路、泛素介导的蛋白质水解、抗原的加工和递呈、细胞凋亡等通路。转录组的分析结果表明热耐受群体面对高温胁迫时，采取了一种更具针对性且高效的应对方式，表现为热应激前后转录差异的基因数少但以热休克蛋白为代表的起保护作用基因上调倍数更高。

4. 鲍种间杂交子代对高温耐受性的研究

本研究中利用心率 ABT 测定方法，对皱纹盘鲍与绿鲍及绿鲍与西氏鲍杂交子代对高温的耐受性进行了研究，结果表明同皱纹盘鲍与西氏鲍杂交子代一样，鲍种间杂交子代对高温的耐受性都优于亲本。以皱纹盘鲍、西氏鲍和西盘鲍的鳃、外套膜和血细胞为材料，研究了 HSP70 与 HSP90 两个基因在不同温度条件下的表达情况，在高温条件（33 °C）下，除血细胞中的 HSP70 基因，其他组织中皱纹盘鲍 HSP70 与 HSP90 基因的表达量均显著低于另外两个群体，这可能是皱纹盘鲍热耐受性差的原因之一。以三个群体不同温度条件下的鳃组织为实验材料，进行甲基化敏感扩增多态性（MSAP）分析，结果显示，三者的总甲基化水平都

呈现先降低后升高的趋势，除 27 °C 下的西氏鲍外，其他温度条件下，皱纹盘鲍的总甲基化水平都高于另外两个群体。低甲基化水平可能有利于抗逆基因的表达，因而这是西氏鲍与西盘鲍对高温耐受性强的原因之一。

5. 对高温适应中鲍遗传多样性的变化

本章研究中，比较了晋江品系（皱纹盘鲍北方群体与日本群体杂交后在南方连续多代自繁）与连江品系（皱纹盘鲍北方群体与日本群体杂交子代，且采用南北接力的养殖模式）的心率 ABT 值，结果表明在南方海区三代自繁后，晋江品系的耐高温能力优于连江群体。微卫星的分析显示，在对南方海区高温环境适应过程中，鲍群体的遗传多样性逐渐降低，且非中性位点多样性丢失程度强于中性位点。此外，对晋江品系不同世代的结果显示，在对高温环境的适应中，一些稀有基因随着自繁世代地增加，其频率逐步提高。

关键词：鲍；阿氏拐点温度（ABT）；转录组；MSAP；杂交

Abstract

The Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, is one of the most commercially important species in China. It naturally occurs in Shandong and Liaodong Peninsulas of China, Korea Peninsula, Japan and the Russian Far East waters. In the late 1990s, the Pacific abalone was introduced from the coastal areas within or close to the abalone's natural habitats (temperate area) to subtropical area (East China Sea) and now Fujian province accounts for nearly 80% of total abalone production in China. However, The summer temperature of these regions is much higher than that in its natural habitats. Even though the domestication has been carried out for nearly 20 years, mortality in summer for Pacific abalone remains the most serious issue for aquaculture in southern China. Therefore, it is important to cultivate the new varieties with better heat tolerance and an efficient method that can precisely predict abalone thermal performance is the key point. In this article, Arrhenius Breakpoint Temperature (ABT) was used to describe the different tolerance to heat stress of abalone, and we tried to explain the results with transcriptome and DNA methylation. Besides, with the help of microsatellites, we observed the dynamic changes of genetic diversity during acclimatization. The results acquired in this study would provide scientific foundations for the breeding of new varieties.

1. The establishment of evaluation method based on cardiac performance

We studied several factors, including heating rate, shell length, acclimation temperature, sexuality and starvation, to check whether these factors would have influence on the measurement of ABT. The results showed that, the measurement of ABT was only influenced by acclimation temperature. Then the ABTs of *Haliotis discus hannai* (DD), *H. gigantea* (GG) and their hybrid were achieved by 20 °C acclimation and 1 °C/10min of heating rate. These three groups possessed different

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.