

硅藻对不同生态习性桡足类抗氧化相关基因表达的影响

陈志刚, 吴荔生, 吴鼎勋, 王桂忠*

(厦门大学海洋与地球学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术比较了不同生态习性的太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)、安氏伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus annandalei*)和日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicas*)摄食不同浓度的牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)两种硅藻后, 其 *MnSOD*(锰超氧化物歧化酶)和 *GST*(谷胱甘肽转移酶)两种抗氧化相关基因表达水平的变化情况。结果显示: 低浓度的硅藻对哲水蚤类的太平洋纺锤水蚤和安氏伪镖水蚤抗氧化基因表达水平表现出显著的诱导效应, 而高浓度的硅藻则表现为抑制效应, 不论是低浓度还是高浓度的硅藻均能诱导猛水蚤类的日本虎斑猛水蚤抗氧化基因的表达, 表明不同类别的桡足类对硅藻的分子响应存在物种特异性。为评估哲水蚤桡足类对硅藻的影响是否具有适应能力, 进而将哲水蚤桡足类的安氏伪镖水蚤在饲喂上述两种硅藻条件中连续培养了四个世代, 对其每个世代的 *MnSOD* 基因表达水平进行了测定与分析。结果显示: 牟氏角毛藻饲喂的安氏伪镖水蚤第四个世代 *MnSOD* 基因表达水平显著高于第一个世代, 而小新月菱形藻饲喂的安氏伪镖水蚤后三个世代的 *MnSOD* 基因表达水平均显著高于第一个世代, 推测安氏伪镖水蚤可以对两种硅藻产生遗传适应, 并且适应机制可能不同。

关键词: 桡足类; 硅藻; 多世代培养; 基因表达水平; 遗传适应

中图分类号: P 735 **文献标志码:** A

硅藻是海洋中最主要的光合生物, 通过光合作用将光能转化为化学能, 并合成自身的有机物。桡足类摄食硅藻后将硅藻中的能量和物质带入食物链中, 是食物链中物质和能量传递的重要环节。因硅藻与桡足类相互作用的关系直接影响海洋生态系统食物网物质循环与能量流动, 对其开展研究具有重要的理论意义和实际的应用价值。为对两者的关系能有更加全面的认识, 本课题组曾开展了硅藻影响桡足类成活与繁殖的研究, 结果显示^[1-2]: 硅藻类的牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)对哲水蚤桡足类的太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)和安氏伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus annandalei*)的发育和繁殖具有显著的负面影响, 但对底栖桡足类的日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicas*)的

收稿日期: 2019-03-04 **录用日期:** 2019-05-17

基金项目: 国家自然科学基金(41276132)

***通信作者:** gzwang@xmu.edu.cn

负面影响不如上述两种哲水蚤显著;以上述两种硅藻为饵料对安氏伪镖水蚤进行四个世代的连续培养,安氏伪镖水蚤成活率和繁殖力均显著升高,表明不同生态习性桡足类对硅藻的响应具有物种特异性。目前,硅藻影响桡足类的研究主要集中在桡足类产卵量和卵孵化率、幼体胚后发育、成活率、成体性别分化以及平均寿命等生理过程^[3-6],而关于桡足类对硅藻响应的分子机制的研究相对较少。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)与谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)是生物体抗氧化防御系统中重要的两种抗氧化酶,它们主要的功能是清除多余的氧自由基以维持机体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的平衡^[7]。已有研究发现在一些桡足类中 SOD 与 GST 基因的表达水平受重金属^[8]、化学物质^[9]以及微藻毒素^[10]等非生物或生物因子的影响而发生改变。为了更好地了解本研究中三种不同生态习性的桡足类对硅藻响应具有物种特异性的分子机制,研究采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术测定并比较上述三种桡足类摄食上述两种硅藻后其 *MnSOD* 和 *GST* 基因表达水平的变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养条件

研究所用的桡足类分别为哲水蚤类的太平洋纺锤水蚤和安氏伪镖水蚤以及猛水蚤类的日本虎斑猛水蚤,均为本实验室长期培养的种类。用于饲喂桡足类的微藻为硅藻纲的牟氏角毛藻、小新月菱形藻和定鞭金藻纲的球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)。桡足类和微藻的培养按照本课题组所建立的方法^[1-2]进行。

本研究培养桡足类的微藻浓度设置为一个较低浓度($1.70 \mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$)和一个较高浓度($8.50 \mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$),对上述三种不同生态习性的桡足类从第一期无节幼体开始进行培养直至成体,具体的培养按本课题组前期已报道方法^[1-2]进行,取其成体用于基因的测试与分析,以探讨不同浓度的不同微藻对不同生态习性桡足类基因表达水平的影响。本研究的目的是希望了解不同硅藻影响不同生态习性桡足类的分子机制,所以球等鞭金藻是作为对照藻类。用较低浓度($1.70 \mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$)的微藻对安氏伪镖水蚤进行多世代连续培养,取每个世代的成体用于基因测试与分析,以探讨哲水蚤类的安氏伪镖水蚤适应硅藻的分子机制。

本研究中微藻浓度、对照藻类以及多世代培养中桡足类的选择均基于前期的实验生态研究结果^[1-2]。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 合成

取不同设计培养的桡足类成体,每 100 只成体分装于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol 试剂后转移至 -80°C 冰箱保存备用。

按照 Trizol(产品购自 Invitrogen 公司)操作手册提取桡足类总 RNA, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性并利用 ND-2000 Nanophotometer 检测总 RNA 浓度。取 1 μg 总 RNA, 按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT reagent Kit(with gDNA Eraser)操作手册将总 RNA 反转录成 cDNA, 反转录完成后检测 cDNA 质量和浓度, -20°C 保存备用。

1.3 基因的确切及其引物获取

本研究的基因序列从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)查找获得, 目的基因为 *MnSOD* 和 *GST*, 由于没有查到安氏伪镖水蚤的 *GST* 基因序列, 故未能将安氏伪镖水蚤 *GST* 基因纳入此次研究的比较当中。关于内参基因的选择, 已有研究证实 β -Actin 基因在安氏伪镖水蚤^[11]和日本虎斑猛水蚤^[12]中均能稳定表达, 且丰度与多数目标基因相差不大, 故选择此基因作为荧光定量 PCR 的内参基因, 而 α -Tubulin 为太平洋纺锤水蚤中比较合适的内参基因^[13]。各基因引物及其参照文献见表 1, 实验中所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 荧光定量 PCR 所用的引物
Tab.1 Primers for real-time quantitative PCR

基因名称	序列登录号	引物序列	参考文献
<i>α-Tubulin-AP</i>	KT754282	F:5'- ATGTTGCCCTGGACTTTG-3' R: 5'- AGAAGCTGAGGAAGCCACCA-3'	[13]
<i>MnSOD-AP</i>	KT754527	F:5'- AGCGTCATGCTGGTGACCT-3' R: 5'- CTTGAGGTAGTAACCTGCGT-3'	[13]
<i>GST-AP</i>	KT754519	F:5'- AACCTCGCAGAATCCAGAGC-3' R: 5'- GTTCCGCAAGCCACTATAAC	[13]
<i>β-Actin-PA</i>	JK317941	F:5'- ATGTTGCCCTGGACTTTG-3' R: 5'- TAGGTGCTCTGGTGGATGTT	[11]
<i>MnSOD-PA</i>	JK990807	F:5'- CGGTTGTCTCTGCTGAAATCA-3' R: 5'- AGTGAGGTAAAAGACCGTCT-3'	[11]
<i>β-Actin-TJ</i>	AF466280	F:5'- GTGCTGTCCCTGTATGCCTCTG-3' R: 5'- GTCAGGTAGGAGGCAGACCT-3'	[11]
<i>MnSOD-TJ</i>	HQ848280	F:5'- GGTGGATCCGGTGAACCTGAAG-3' R: 5'- CAACCCAATATTATCCGACGGCC-3'	[8]
<i>GST-TJ</i>	DQ088365	F:5'- GGTAGGCGAAGAGATTGGACA-3' R: 5'- ATCGGTTAGACGGTTGCTTC	[14]

注: “基因名称” 后缀的大写字母“AP”代表太平洋纺锤水蚤; “PA”代表安氏伪镖水蚤; “TJ”代表日本虎斑猛水蚤。

1.4 qRT-PCR 反应

20 μL 反应体系: SYBR™ Green Master Mix 10 μL , 正反向引物各 0.8 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 6.4 μL 。

反应条件设定: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 42 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。

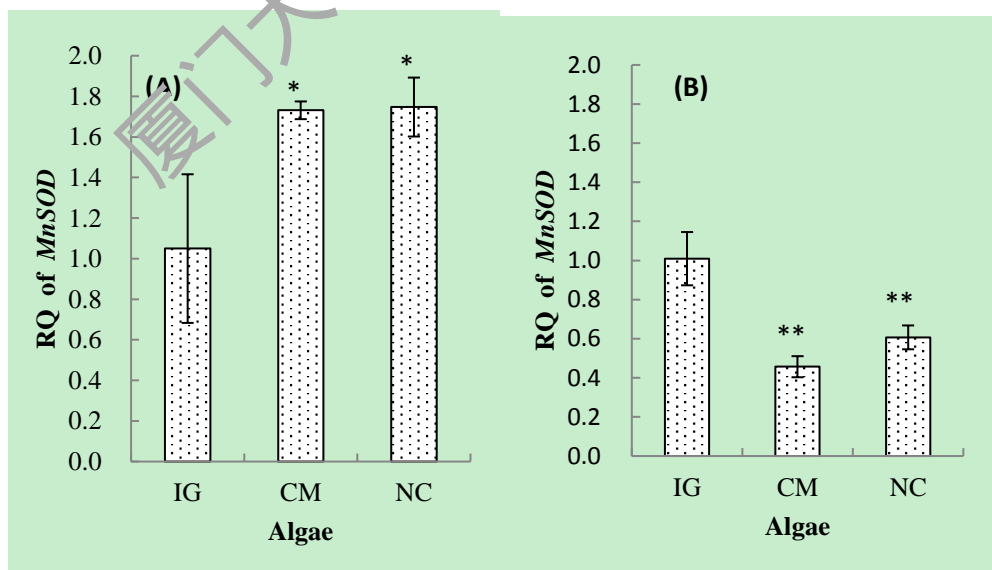
1.5 数据统计与分析

利用荧光定量 PCR 7500 software v2.0.5 获得每个基因的 C_t 值, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析, 分析不同微藻及不同浓度饲喂条件下, 3 种桡足类目的基因相对于内参基因的表达量, 实验所得的数据都以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。不同处理间基因表达水平的差异采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 在分析数据之前先进行正态分布和方差齐性检验, 组间差异采用杜凯氏 HSD 法测试比较, 显著性差异水平 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 分别用*和**表示。

2 结果与分析

2.1 太平洋纺锤水蚤 *MnSOD* 和 *GST* 基因表达水平的变化

不同浓度的两种硅藻对太平洋纺锤水蚤 *MnSOD* 基因表达水平的影响如图 1 所示。当硅藻浓度为 1.70 $\mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 牟氏角毛藻和小新月菱形藻对太平洋纺锤水蚤 *MnSOD* 基因表达有明显的诱导作用(图 1A), *MnSOD* 基因的表达水平分别为对照组的 1.73 倍($p < 0.05$)和 1.74 倍 ($p < 0.05$)。然而, 当硅藻浓度为 8.50 $\mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 两种硅藻培养的太平洋纺锤水蚤 *MnSOD* 基因表达水平受到抑制(图 1B), 并且差异极显著($p < 0.01$)。



(A) 低浓度(1.70 $\mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$); (B)高浓度(8.50 $\mu\text{gC}\cdot\text{mL}^{-1}$); IG 是球等鞭金藻的缩写; CM 是牟氏角毛藻缩写; NC 是小新月菱形藻缩写; * 表示差异显著, $p < 0.05$; ** 表示差异极显著, $p < 0.01$ 。”RQ”表示“相对表达量”。(下同)

图 1 不同浓度硅藻培养的太平洋纺锤水蚤 *MnSOD* 基因的表达

Fig. 1 Transcription of *MnSOD* of *A. pacifica* feeding on diatoms at different concentrations

太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因表达情况与其 *MnSOD* 相近, 如图 2 所示。低浓度的牟氏角毛藻和小新月菱形藻对太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因表达有明显的诱导作用(图 2A), 其表达水平分别为对照组的 1.98 倍($p < 0.05$)和 1.67 倍($p < 0.05$)。高浓度的牟氏角毛藻显著抑制了太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因表达($p < 0.05$), 但高浓度的小新月菱形藻对太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因的表达水平无显著影响($p > 0.05$)(图 2B)。

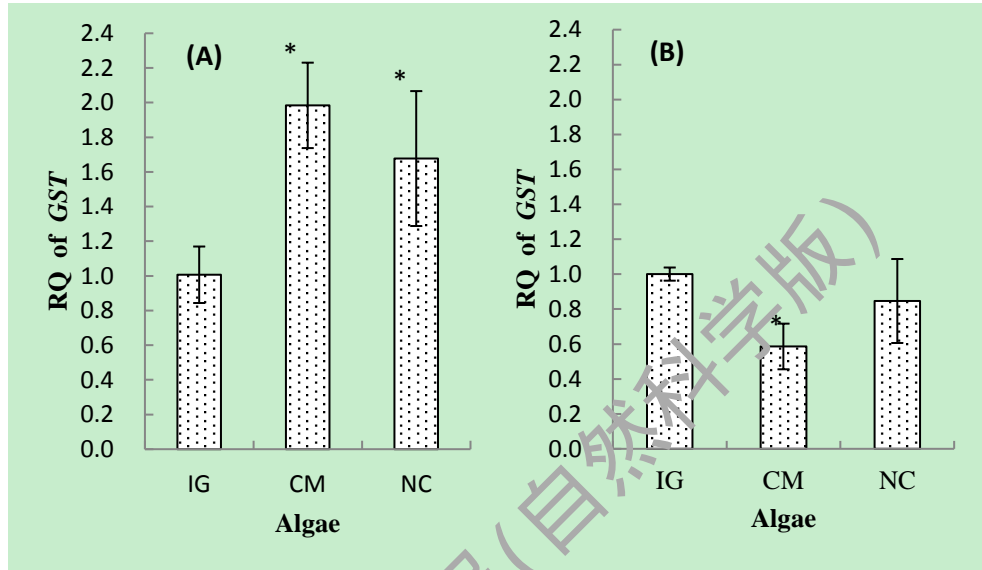


图 2 不同浓度硅藻培养的太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因的表达

Fig. 2 Transcription of *GST* of *A. pacifica* feeding on diatoms at different concentrations

2.2 安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 基因表达水平的变化

不同浓度的两种硅藻培养的安氏伪镖水蚤, 其 *MnSOD* 基因表达水平的变化如图 3 所示: 不同浓度牟氏角毛藻培养的安氏伪镖水蚤其 *MnSOD* 基因的表达水平与对照组无显著性差异($p > 0.05$); 低浓度的小新月菱形藻可诱导安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 基因的表达($p < 0.05$), 但高浓度的小新月菱形藻却有抑制影响, 并且差异极显著($p < 0.01$)。

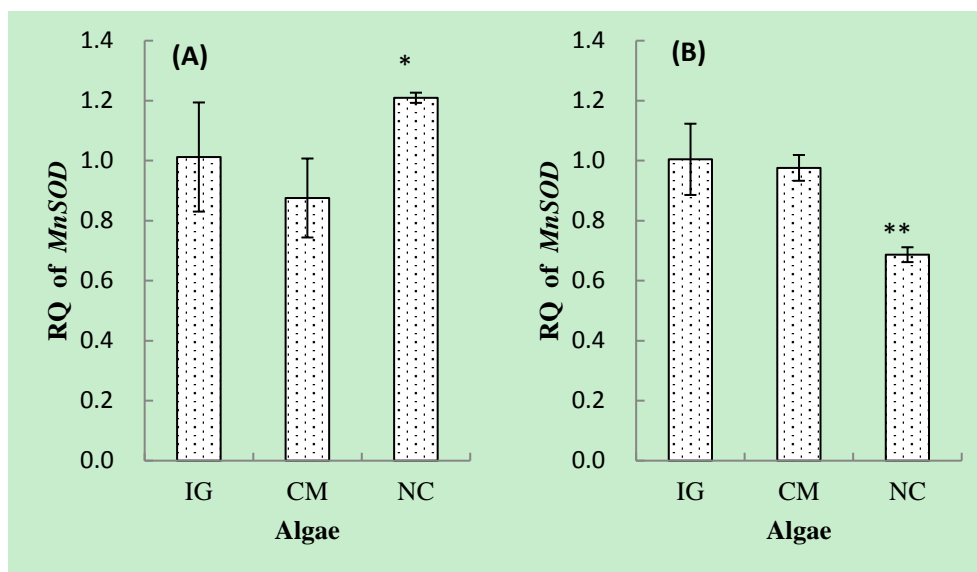


图 3 不同浓度微藻培养的安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 基因的表达

Fig. 3 Transcription of *MnSOD* of *P. annandalei* feeding on algae at different concentrations

2.3 日本虎斑猛水蚤 *MnSOD* 和 *GST* 基因表达水平的变化

不同浓度两种硅藻培养的日本虎斑猛水蚤其 *MnSOD* 基因的表达情况如图 4 所示：低浓度和高浓度的牟氏角毛藻培养的日本虎斑猛水蚤其 *MnSOD* 基因的表达水平与对照组没有显著差异($p>0.05$), 表明 *MnSOD* 基因的表达不受牟氏角毛藻及其浓度的影响, 或影响较小；但是 *MnSOD* 基因的表达受小新月菱形藻的诱导, 藻的浓度越高, 诱导效应越显著, 在低浓度和高浓度小新月菱形藻培养条件下, 其 *MnSOD* 表达量分别为对照组的 1.35 倍($p<0.05$)和 1.5 倍($p<0.01$)。

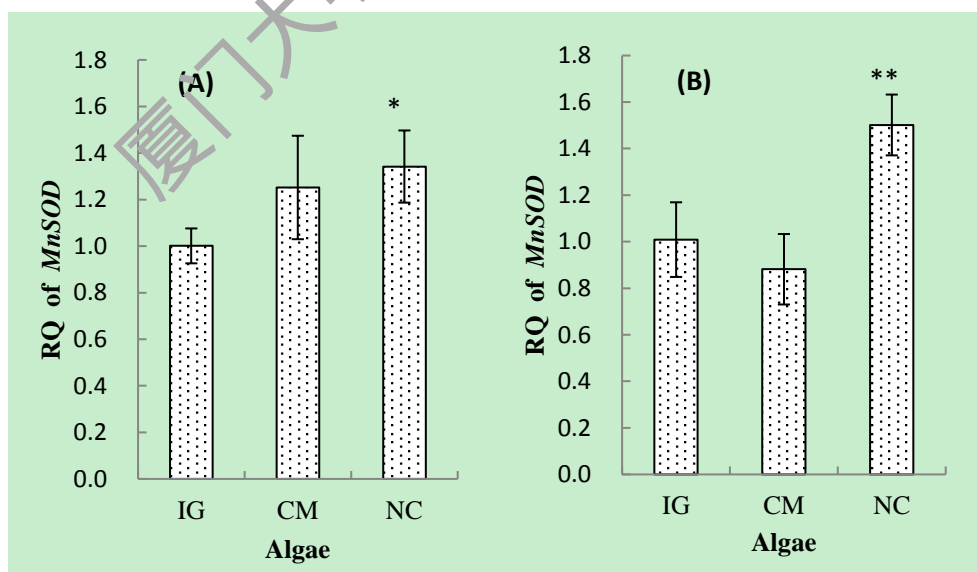


图 4 不同浓度微藻培养的日本虎斑猛水蚤 *MnSOD* 基因的表达

Fig. 4 Transcription of *MnSOD* of *T. japonicas* feeding on algae at different concentrations

不论是用高浓度还是低浓度的牟氏角毛藻培养的日本虎斑猛水蚤，其 *GST* 基因表达水平与对照组无显著差异(图 5, $p>0.05$)。小新月菱形藻对日本虎斑猛水蚤 *GST* 基因表达有显著的诱导效应，低浓度和高浓度的小新月菱形藻培养的日本虎斑猛水蚤其 *GST* 基因表达量分别为对照组的 4.4 倍和 11.3 倍，差异极显著($p<0.01$)。

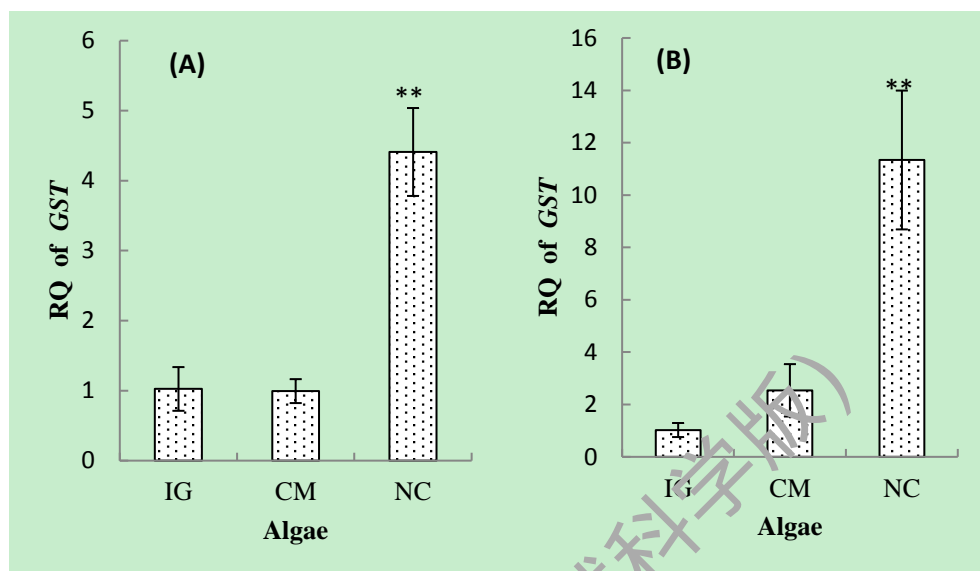
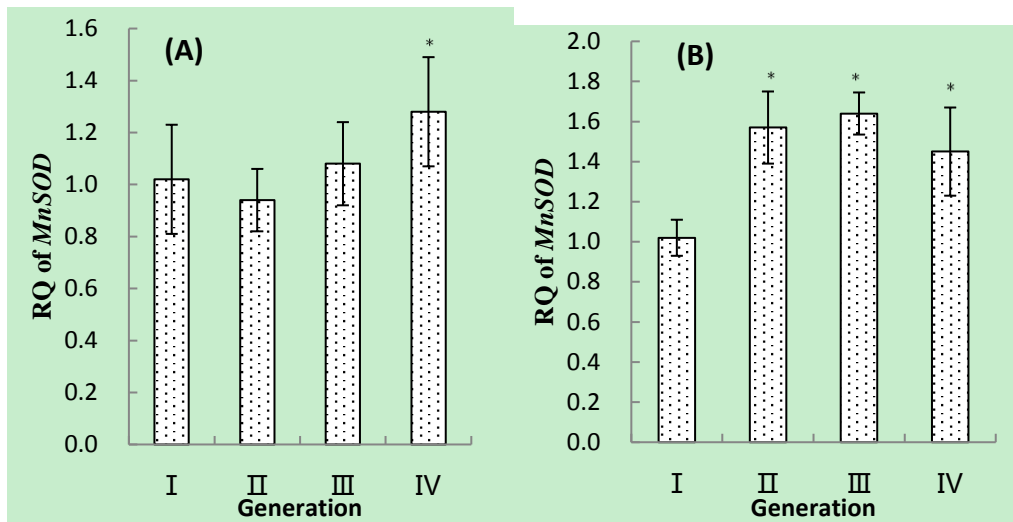


图 5 不同浓度微藻培养的日本虎斑猛水蚤 *GST* 基因的表达

Fig.5 Transcription of *GST* of *T. japonicus* feeding on algae at different concentrations

2.4 多世代培养下安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 基因表达水平的变化

用牟氏角毛藻多世代饲养安氏伪镖水蚤，*MnSOD* 基因在不同世代安氏伪镖水蚤的表达水平如图 6A 所示：在四个世代的培养中，安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 基因表达水平是逐代升高，第四个世代升高最显著($p<0.05$)。用小新月菱形藻多世代饲养安氏伪镖水蚤，与第一世代安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 表达量相比，第二、第三和第四个世代的 *MnSOD* 表达量显著上调(图 6B, $p<0.05$)，分别为第一世代表达量的 1.57，1.64 和 1.45 倍。



(A)牟氏角毛藻；(B)小新月菱形藻。

图 6 两种硅藻培养的安氏伪镖水蚤基因表达水平在不同世代时的变化

Fig. 6 Transcription of gene expression of *P. annandalei* feeding on over four generations

3 讨论

本研究结果显示,低浓度硅藻培养的三种桡足类其 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达水平上调,两种基因表达水平的提高意味着机体防御能力的增强,这可能是由于硅藻产生的次级代谢产物诱导桡足类产生了大量的 ROS,为保护机体不受 ROS 的氧化损伤,机体需要表达出更多的抗氧化酶来清除过量的 ROS。这个研究结果与前人的研究报道类似,如:中华哲水蚤 (*Calanus sinicus*)摄食能产醛的中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)后,其 *SOD* 基因表达水平显著高于对照组^[10];短凯伦藻 (*Karenia brevis*)分泌的神经性贝毒可诱导海格兰哲水蚤(*Calanus helgolandicus*)*SOD* 基因表达水平上调^[15];海区中的海格兰哲水蚤通过 *GST* 基因表达水平的提高,来抵御硅藻分泌的脂类氧化物的负面影响^[16]。

在本研究结果中,高浓度硅藻培养的三种桡足类其基因表达变化的模式明显不同:日本虎斑猛水蚤 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达水平上调,即在高浓度的硅藻环境中仍然具有较强的活性氧清除能力,这可能与日本虎斑猛水蚤适应了底栖的生活环境有关。Kim 等^[18]曾发现暴露在重金属污染环境中的日本虎斑猛水蚤其 *SOD* 基因表达水平与对照组相比显著上调,认为出现这种结果的原因与日本虎斑猛水蚤所处的底栖环境有关,即底栖沉积物中累积的各种有害物质驱使底栖桡足类日本虎斑猛水蚤进化出相应的适应机制,从而对环境具有较强的耐受性^[17]。相反,本研究中高浓度硅藻培养的太平洋纺锤水蚤与安氏伪镖水蚤其 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达却受到了抑制,这可能是由于高浓度的硅藻诱导桡足类产生了过量的 ROS,超出其清除能力,因此抑制了其抗氧化酶基因的表达,这种结果与 Wang 等 (2009) ^[18] 报道的现象很相似。值得注意的是,低浓度的小新月菱形藻对太平洋纺锤水蚤 *GST* 基因表达

水平有显著的诱导作用，而高浓度的小新月菱形藻对 *GST* 基因的表达却无显著影响，其原因尚不清楚，需进行更深入的研究。根据以上结果很容易得出结论：日本虎斑猛水蚤比太平洋纺锤水蚤和安氏伪镖水蚤对硅藻具有更高的耐受性，这与我们前期的生态实验研究结果相一致。即：高浓度的硅藻对太平洋纺锤水蚤与安氏伪镖水蚤的成活率、繁殖力都有显著的抑制影响，但对日本虎斑猛水蚤的成活率、繁殖力的影响不显著^[2]。本研究中三种桡足类对同种硅藻的响应具有明显的物种特异性，可能与三种桡足类所处的栖息环境不同有关^[19]。

用小新月菱形藻和牟氏角毛藻连续四个世代培养安氏伪镖水蚤，安氏伪镖水蚤的 *MnSOD* 基因表达水平显著升高(图 6)，这与本课题组先前的实验生态研究结果相一致。在先前的实验生态研究中，也是用小新月菱形藻和牟氏角毛藻连续四个世代培养安氏伪镖水蚤，安氏伪镖水蚤的成活率与繁殖力随培养世代的延长而逐步升高^[2]。据此我们推测，哲水蚤类的安氏伪镖水蚤在长期投喂硅藻后，对硅藻造成的负面影响可产生遗传适应。前人也有类似的研究报道，如：Colin & Dam 发现，长期经历亚历山大藻(*Alexandrium*)赤潮的纺锤水蚤能够发展出应对机制，当再次摄食亚历山大藻时，不会受该藻产生的毒素所影响^[20]；瑞典西部海岸是经常爆发玛氏骨条藻(*Skeletonema marinoi*)赤潮的海区，长期生活在该海区中的海格兰哲水蚤，能在摄食该硅藻 24h 后提高 *SOD*、*GST* 以及 *CAT*(过氧化氢酶)等基因的表达水平，以抵御玛氏骨条藻诱导产生的自由基的毒性影响^[21]。这些研究报道均表明，桡足类对微藻的毒性效应具有遗传适应能力。

此外，还需要提出的是，两种硅藻培养的安氏伪镖水蚤其 *MnSOD* 基因在四个世代中具有不同的表达模式：小新月菱形藻培养的安氏伪镖水蚤其 *MnSOD* 基因表达水平在第二个世代就显著升高，并在随后的两个世代仍然维持较高的表达水平；而牟氏角毛藻培养的安氏伪镖水蚤其 *MnSOD* 基因表达水平在第四个世代才显著升高。这种差异可能与两种硅藻所分泌的次级代谢产物不同有关^[22]。是否如此，今后需进一步开展研究予以证实。

4 结论

本研究的结论主要有以下两个方面：1) 摄食同种硅藻的不同生态类型桡足类其 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达水平具有明显的物种特异性。低浓度硅藻对太平洋纺锤水蚤和安氏伪镖水蚤 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达有明显的诱导作用，高浓度硅藻表现为抑制作用；无论是低浓度还是高浓度硅藻对日本虎斑猛水蚤 *MnSOD* 与 *GST* 基因表达都表现为诱导作用。2) 长期培养在硅藻类的小新月菱形藻和牟氏角毛藻的环境中，安氏伪镖水蚤对硅藻所产生的负面影响会产生遗传适应。

参考文献：

-
- [1]陈志刚, 王桂忠, 吴荔生, 等. 3 种海洋浮游微藻影响太平洋纺锤水蚤存活, 发育和繁殖的比较研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 3: 007.
- [2]CHEN Z, WANG G, ZENG C, et al. Comparative study on the effects of two diatoms as diets on planktonic calanoid and benthic harpacticoid copepods[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 2018, 329(3): 140-148.
- [3]CAROTENUTO Y, IANORA A, BUTTINO I, et al. Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? [J].Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002,276(1):49-66.
- [4]CAMUS T, ZENG C. Reproductive performance, survival and development of nauplii and copepodites, sex ratio and adult life expectancy of the harpacticoid copepod, *Euterpina acutifrons*, fed different microalgal diets[J].Aquaculture Research, 2012,43(8):1159-1169.
- [5]FONTANA A, d'IPPOLITO G, CUTIGNANO A., et al. LOX-induced lipid peroxidation mechanism responsible for the detrimental effect of marine diatoms on zooplankton grazers[J]. Chembiochem, 2007,8(15):1810-1818.
- [6]MIRALTO A, BARONE G, ROMANO G, et al. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction[J]. Nature, 1999,402(6758):173-176.
- [7]PAN L, ZHANG H. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 144(1):67-75.
- [8]KIM B M, RHEE J S, PARK G S, et al. Cu/Zn-and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants[J]. Chemosphere. 2011, 84(10):1467-1475.
- [9]HANSEN B, ALTIN D, VANG S, et al. Effects of naphthalene on gene transcription in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda) [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 86(2) : 157-165.
- [10]LAURITANO C, CAROTENUTO Y, VITIELLO V, et al. Effects of the oxylipin-producing diatom *Skeletonema marinoi* on gene expression levels of the calanoid copepod *Calanus sinicus*[J]. Marine Genomics, 2015, 24:89-94.
- [11]JIANG J L, WANG G Z, MAO M G, et al. Differential gene expression profile of the calanoid copepod, *Pseudodiaptomus annandalei*, in response to nickel exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2013, 157(2):203-211.
- [12]RHEE J S, RAISULDDIN S, LEE K W, et al. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(1): 104-112.
- [13]YANG F, XU D, ZHUANG Y, et al. Characterization and analysis of ribosomal proteins in two marine calanoid copepods[J]. 中国海洋湖沼学报(英文版), 2016, 34(6): 1258-1268.
- [14]LEE Y M, PARK T J, JUNG S O, et al. Cloning and characterization of glutathione S-transferase gene in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its expression after exposure to endocrine-disrupting chemicals[J]. Marine Environmental Research, 2006, 62: S219-S223.
- [15]LAURITANO C, CAROTENUTO Y, PROCACCINI G, et al. Changes in expression of stress genes in copepods feeding upon a non-brevetoxin-producing strain of the dinoflagellate *Karenia brevis*[J]. Harmful Algae, 2013, 28:23-30.
- [16]LAURITANO C, ROMANO G, RONCALLI V, et al. New oxylipins produced at the end of a diatom bloom and their effects on copepod reproductive success and gene expression levels[J]. Harmful Algae, 2016, 55:221-229.

-
- [17]HWANG D S, LEE J S, RHEE J S, et al. Modulation of p53 gene expression in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to alkylphenols[J]. Marine Environmental Research, 2010, 69:S77-S80.
- [18]WANG M H, WANG G Z. Biochemical response of the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to cadmium[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 57(4):707-717.
- [19]ZHENG Y, DAM H G, Avery D E. Differential responses of populations of the copepod *Acartia hudsonica* to toxic and nutritionally insufficient food algae[J]. Harmful Algae, 2011, 10(6):723-731.
- [20]COLIN S P, DAM H G. Comparison of the functional and numerical responses of resistant versus non-resistant populations of the copepod *Acartia hudsonica* fed the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Harmful Algae, 2007, 6(6):875-882.
- [21]LAURITANO C, CAROTENUTO Y, MIRALTO A, et al. Copepod population-specific response to a toxic diatom diet[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e47262.
- [22]POHNERT G, LUMINEAU O, CUEFF A, et al. Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods? [J]. Marine Ecology Progress Series, 2002, 245:33-45.

Effects of diatoms on expression of antioxidant related genes in copepods of different ecological habits

CHEN Zhigang, WU Lisheng, WU Dingxun, WANG Guizhong*

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: *MnSOD* and *GST* gene expression were determined by Real-time quantitative PCR in copepods with different ecological habit, when feeding on diatoms of *Chaetoceros muelleri* or *Nitzschia closterium* f. *minutissima* at different concentrations. The copepods are pelagic calanoid copepods of *Acartia pacifica* and *Pseudodiaptomus annandalei* and benthic hapacticoid copepod of *Tigriopus japonicas*. The results were as follows: Gene expression were induced significantly in *A. pacifica* and *P. annandalei* feeding on two diatoms at lower concentration, while restrained on higher diatom concentration. Whereas *MnSOD* and *GST* gene expression were induced in *T. japonicas* feeding on both lower and higher concentration of diatoms. The results suggested that gene expression response of copepod to diatoms are species-specific. To evaluate whether calanoid copepod had the capacity to acclimatize to diatoms, *P. annandalei* was cultured for four generations on the two diatoms and *MnSOD* gene expression was determined for each generation. It was shown that *MnSOD* gene expression level were significant higher on the forth generation than the first generation when fed on *C. muelleri*, however, when fed on *N.*

closterium f. *minutissima*, *MnSOD* gene expression level showed a trend of increasing with the progress of generation demonstrating that *P. annandalei* might have been adapted to two diatoms with different mechanisms.

Keywords: copepod; diatom; multigeneration culture; gene expression; genetic adaption

厦门大学学报(自然科学版)