

付胜利, 姜皓译, 王玉香, 等. 陵水才女虫自然感染程度对香港牡蛎凋亡及免疫相关基因表达的影响[J]. 渔业研究, xxxx, xx(x): 1–9.
Fu S L, Jiang H Y, Wang Y X, et al. The effects of *Polydora lingshuiensis* natural infection on the apoptotic and immune functions of Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*)[J]. Journal of Fisheries Research, xxxx, xx(x): 1–9.

陵水才女虫自然感染程度对香港牡蛎凋亡及免疫相关基因表达的影响



付胜利^{1,2}, 姜皓译¹, 王玉香¹, 卢洁^{1,2}, 姚托^{1,2}, 叶灵通^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部水产品加工重点实验室/
农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 三亚热带水产研究院, 海南 三亚 572426)

摘要: 【背景】香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 作为中国华南沿海地区重要的经济贝类, 在水产养殖中占据关键地位, 对当地渔业经济贡献巨大。才女虫 (*Polydora* spp.) 是香港牡蛎常见的寄生虫之一, 其寄生于贝壳中, 感染严重时可引发“黑壳病”, 甚至凿穿贝壳, 侵入软体部位, 激发免疫反应, 影响香港牡蛎的品质与经济价值。【目的】探究才女虫不同感染程度对香港牡蛎凋亡及免疫相关基因的影响。【方法】本研究采集了广东省珠海市荷包岛的香港牡蛎样本 49 个。首先应用形态和分子鉴定方法检测感染的才女虫种类, 再采用图像处理 Photoshop (PS) 技术统计才女虫感染导致的香港牡蛎黑壳面积占比并进行感染程度分级; 结合实时荧光定量 PCR 技术, 对比外套膜和肝胰腺组织在才女虫不同感染等级下香港牡蛎凋亡及免疫相关基因的差异表达。【结果】结果显示, 珠海荷包岛的香港牡蛎所感染的才女虫为陵水才女虫 (*Polydora lingshuiensis*); 通过 PS 技术统计得出, 才女虫感染致香港牡蛎右壳黑壳面积占比为 4.07%~53.59%, 其中感染等级为 I 级的有 0 个, II 级的有 3 个, III 级的有 25 个, IV 级的有 21 个; 相对于 II 级感染, IV 级感染的牡蛎外套膜和肝胰腺凋亡相关基因 (*Caspase-2*, *Caspase-3*, *Caspase-8*, *FasL*, *IAP*, *BAX*) 出现上调, 免疫相关基因 (*SABL*, *defension*, *lysozyme*, *C3*) 出现下调; Spearman 相关性分析表明, 才女虫造成黑壳面积占比与外套膜和肝胰腺的 *Caspase-3* 和 *Bax* 的表达呈正相关, 与 *SABL* 的表达呈负相关, 其中与 *Caspase-3* 的表达正相关尤为强烈。【结论】黑壳面积占比可评估香港牡蛎状态, 与凋亡、免疫基因表达相关, 该研究为防治“黑壳病”和保障香港牡蛎养殖产业发展提供理论依据与探索方向。

关键词: 才女虫; 香港牡蛎; 外套膜; 肝胰腺; 凋亡; 免疫反应

中图分类号: S944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096–9848 (xxxx) 00–0001–09

香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*), 俗称 (Lamellibranchia)、翼形亚纲 (Pterimorppia)、珍珠“白蚝”, 隶属于软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 珠贝目 (Pterioidea)、牡蛎科 (Ostreidae)、巨砺属

收稿日期: 2025-04-11

修回日期: 2025-04-29

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-49); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2023TS03); 海南省自然科学基金资助 (325QN511)

第一作者: 付胜利, 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为贝类寄生虫病害防控。E-mail: fushengli@scsfri.ac.cn

通信作者: 叶灵通, 男, 副研究员, 博士, 研究方向为渔业生物病害。E-mail: lingtong2753@126.com

©《渔业研究》编辑部。本文为使用 CC BY-NC-ND 4.0 许可协议的开放获取作品。

© Editorial Office of Journal of Fisheries Research. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

(*Crassostrea*)^[1-2]。其主要分布于广东、广西地区,在福建、海南地区也有少量分布,常生长在低潮线附近及入海口区域^[3]。香港牡蛎肉质鲜美,营养丰富,深受广大消费者的喜爱,具有极高的经济价值。据统计,2023 年香港牡蛎年产量高达 190×10^4 t,已成为沿海渔民的重要经济支柱^[4]。然而,在牡蛎养殖过程中极易感染包括才女虫(*Polydora*)在内的多毛类寄生虫^[5-6],这一问题给牡蛎养殖业带来巨大挑战。

才女虫病在全球范围内广泛流行,在部分地区危害尤为严重^[6-7]。才女虫能够在贝壳上穿凿管道,致使壳内面形成黑褐色的痂皮,俗称“黑壳病”^[8-9]。这些管道的出现,严重损害了贝壳的完整性,特别是闭壳肌周围的贝壳变得异常脆弱,在日常养殖操作过程中极易破裂。当虫体进一步钻穿贝壳、侵入软体部时,会直接对软体组织造成侵害。被侵害的组织周围会出现炎症反应,局部形成脓肿或溃疡,同时还会产生一种特殊的臭味,严重影响了牡蛎的品质。据资料记载,1994 年才女虫引发的“黑壳病”,致使河北昌黎沿海各养殖区 5 cm 以上的扇贝成贝死亡率达到 30%~50%^[10];在 2~3 龄的马氏珠母贝母贝和 3~4 龄的育珠贝中,感染才女虫后,母贝死亡率高达 71%,育珠贝死亡率更是达到 89%,且严重影响珍珠的质量^[11]。才女虫对九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)同样危害巨大,能够感染鲍苗、成鲍和亲鲍,被感染的鲍鱼贝壳易碎,贝体消瘦,严重时甚至导致死亡^[12]。在澳大利亚,也曾有过才女虫感染造成鲍鱼养殖业遭受严重经济损失的报道^[13]。

目前,对才女虫的研究已在多个方面取得了一定成果,涵盖形态分类、分子系统发育、栖居习性、生殖方式和幼体发育等领域^[14-17]。利用转录组学分析发现才女虫感染会影响香港牡蛎和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)细胞能量代谢、免疫应答、物质运输方面^[18-19]。本研究旨在深入探究这一问题,通过采集广东省珠海市荷包岛自然感染才女虫的香港牡蛎样本,运用图像处理(Photoshop, PS)技术精确统计才女虫感染导致的香港牡蛎黑壳面积占比,据此将样本分为低度感染组、中度感染组和高度感染组。随后,结合实时荧光定量 PCR 技术,对比不同感染程度下香港牡蛎凋亡和免疫相关基因的差异表达。本研究成果不仅有助于揭示香港牡蛎应对才女虫感染的内在机制,还能为

牡蛎养殖业寄生虫病的防控提供坚实的理论依据,对于保障牡蛎养殖业的可持续发展具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 牡蛎样品采集

广东省珠海市荷包岛牡蛎养殖区近 5 年来一直是才女虫感染高发区,感染率为 90% 以上。2024 年 10 月 28 日,在该海区牡蛎养殖场(21°53'0"N、113°9'16"E)随机采集香港牡蛎 49 个,带回实验室后冲洗干净并称重,测量壳高和壳长等性状指标。将牡蛎敲开,根据内壳的管道有无判断是否感染才女虫,并统计才女虫感染率,然后取牡蛎的外套膜和肝胰腺置于液氮速冻后于 -80 ℃ 保存;对牡蛎右壳进行拍照用于统计黑壳面积占比;用钳子和镊子小心地将牡蛎壳中的才女虫挑出,用于才女虫的形态和分子鉴定,活体观察后将一部分才女虫保存于 10% 福尔马林溶液中,一部分才女虫保存于无水乙醇中。中国水产科学研究院南海水产研究所实验动物福利与伦理委员会批准动物实验,批准编号为 nhdf2025-13。

1.2 才女虫物种鉴定与分组

1.2.1 才女虫形态鉴定

将活体才女虫挑出后置于装有原海水的凹载玻片中,滴少量 5% 氯化镁(MgCl_2)溶液麻醉虫体,然后在体式解剖镜下(Leica, M-125)对其口前叶、脑后脊、鳃和肛部等形态特征进行观察。对于粗足刺刚毛等较为微小的结构,可将虫体压片,置于生物显微镜下观察。

1.2.2 DNA 提取与测序

切取乙醇保存的才女虫样品 30~50 mg 置于新离心管中,开盖将乙醇晾干。参照软体动物组织 DNA 抽提试剂盒(美基生物,广州)的使用说明书进行样品 DNA 提取。使用才女虫属线粒体细胞色素 C 氧化酶 I(COI)引物对 X1-FF2(5'-CCTW-GTDTACCTRTCWTAATT-3')/X1-R6(5'-CCTG-TAAATARAGGGAATCA-3')和 X1-F2(5'-CCWG-ATATRGCAATTC-3')/X1-R2(5'-GCKARYCAD-CTAAATACTTTAA-3')扩增才女虫序列,目标序列长度为 982 bp/685 bp^[20]。PCR 扩增体系(25 μL):模板 DNA 2 μL 、PCR Mix(东盛,广州)12.5 μL 、上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、灭菌 ddH_2O 8.5 μL 。扩增反应程序:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

扩增产物用 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测，将单一条带的 PCR 样品进行测序。

1.2.3 才女虫感染程度统计

将清晰拍摄的含黑壳牡蛎照片导入 PS，然后选用快速选择工具或魔棒工具初步选中整个牡蛎贝壳，通过“窗口—直方图”记录贝壳选区的像素总数，设为 A；依据黑壳与正常贝壳的色差，调整魔棒工具容差，仔细选中黑壳部分，并用套索工具完善选区，确保仅涵盖黑壳区域，再通过“窗口—直方图”记录黑壳选区的像素数，设为 B。运用公式“黑壳面积占比 = $B \div A \times 100\%$ ”，用黑壳像素数 B 除以贝壳像素总数 A，即可得出黑壳面积在整个贝壳面积中的占比。参考 Laura 等^[21]的标准，将感染等级分为 I 级：零星管道存在，黑壳可见，无 U 型管；II 级：少于 2 个 U 型管道并少于 10% 的壳表面被侵染；III 级：超过 2 个 U 型管道或 10%~25% 的表面被侵染；IV 级：表面超过 25% 被侵染。

1.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

针对才女虫感染等级为 II 级、III 级和 IV 级的牡蛎，从每个等级中随机选取 3 个样品，抽提其外套膜和肝胰腺的 RNA。RNA 抽提使用 Trizol 试剂 (Vazyme, 中国) 并按照试剂说明书操作，NanoDrop 2000 (NanoDrop, 美国) 测定 RNA 浓度和纯度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。使用反转录试剂盒 (Vazyme) 并按照试剂盒说明书操作，将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。将反转录后的样品以牡蛎 β -actin 和 gapdh 为内参基因^[3]，按照 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒 (Vazyme) 操作，在 ABI 7500 real-time PCR 仪上进行 qRT-PCR，测定相关基因的表达，设置 qRT-PCR 程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s；60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算各基因相对表达量。引物在广州天一辉远生物科技有限公司合成，引物序列及相关信息见表 1。

表 1 实验所用引物序列
Tab. 1 The primer sequences used in this study

引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
X1-FF2	CCTWGTDATACTRTCWTAATT	HK-P53-F	AAGAGTCAACGCCAACACC
X1-R6	CCTGTAAATARAGGGAATCA	HK-P53-R	CCAGACACATGAACTGAAAGAGG
X1-F2	CCWGATATRGCAATTC	HK-Bax-F	GTGACCAAGTAAACCCAAGTGC
X1-R2	GCKARYCADCTAAATACTTTAA	HK-Bax-R	CTGTTAATCCTAGGCCGACGA
HK-Casp3-F	CGGCAGTGAGGATGAGGTG	HK-SABL-F	TTACTTTTAACTCTCCTGCTTTGTT
HK-Casp3-R	GATACTTCGTCAGTCGTGGC	HK-SABL-R	AATACTCGTTTTCCATTTTGGCC
HK-Casp2-F	GCTGTAGCTTACGTTTGTGCC	HK-galectin-F	CTTGACGGAGGGAGCAGAGT
HK-Casp2-R	TTTGCTGTCTTTCGCCCTT	HK-galectin-R	GGTTAGCATTACGGACGACCAC
HK-Casp8-F	TCACGGCAACAGTCTCCAAC	HK-lysozyme-F	TGGAACAAGTTTAAAGGCGTG
HK-Casp8-R	GCATTCCGGCATACTCAAC	HK-lysozyme-R	CCCAGTATCTGAGAGTGGATGG
HK-Casp7-F	GAGATGGTCAGAATAGCAAGAAGTC	HK-C3-F	TACAACATATCGAAACACCACACTACC
HK-Casp7-R	TGATTGGATCATTGGGTAAATAAAA	HK-C3-R	TTGCGGACCCAATCACCTAC
HK-FasL-F	TGCAAATAAAGCAAAGTGGGAA	HK-gapdh-F	GGATTGGCGTGGTGGTAGAG
HK-FasL-R	TTGGTTAGATTGATCGAGGAAGTC	HK-gapdh-R	GTATGATGCCCTTTGTGTGAGTC
HK-IAP-F	GAAAAACCTAAGCACCCAAAGTAT	HK- β -actin-F	CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT
HK-IAP-R	TCCACCACCACAGAAAAAGC	HK- β -actin-R	TGGGCACCTGAATCGCTCGTT

1.4 数据统计与分析

所有试验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。数据采用 Graph Pad Prism 5.0 数据绘图，以 One-way ANOVA 及 Tukey 法 (Tukey honestly significant difference 检验) 进行单因素方差分析及显著性检验，若 $0.01 < P \leq 0.05$ ，表示差异显著 (*)；若 $P \leq 0.01$ ，表示差异极显著 (**)。

2 结果

2.1 才女虫种类鉴定及感染程度统计

根据才女虫的粗足刺刚毛形态、鳃与巾钩刚毛的起始体节及结构、触手形态、色素类型等形态特征，结合课题组关于陵水才女虫的流行病学调查结果^[18]可初步鉴定为陵水才女虫。随机挑取 10 条才

女虫样品, 进行线粒体 COI 基因扩增和测序, 与 Genbank 数据库中才女虫序列比对, 结果显示与陵水才女虫 COI 基因相似度均为 100%, 进一步确认感染种类为陵水才女虫。对右壳黑壳面积占比进行统计并分类, 感染等级为 I 级的有 0 个, II 级的有 3 个, III 级的有 25 个, IV 级的有 21 个 (图 1)。

2.2 陵水才女虫感染对香港牡蛎外套膜和肝胰腺细胞凋亡的影响

qRT-PCR 结果显示 (图 2), 在外套膜中, 与 II 级感染牡蛎相比, III 级感染牡蛎样品中的凋亡相关基因 (*Caspase-7*, *Caspase-8*, *FasL*) 均出现显著上调 ($P \leq 0.05$); IV 级感染牡蛎样品中的凋亡相关基因 (*Caspase-2*, *Caspase-3*, *Caspase-7*, *Caspase-8*, *FasL*, *IAP*, *P53*, *BAX*) 均出现显著上调 ($P \leq 0.05$)。在肝胰腺中, 与 II 级感染牡蛎相比, III 级感染牡蛎样品中的凋亡相关基因 (*FasL* 和 *BAX*) 在均出现显著上调 ($P \leq 0.05$); IV 级牡蛎样品中的凋亡相关基因 (*Caspase-2*, *Caspase-3*, *Caspase-8*, *FasL*, *IAP*, *BAX*) 均出现显著上调 ($P \leq 0.05$)。

2.3 陵水才女虫感染对香港牡蛎外套膜和肝胰腺免疫功能的影响

qRT-PCR 结果显示 (图 3), 在外套膜中, 与 II 级感染牡蛎相比, III 级感染牡蛎样品中的免疫相关基因 (*lysozyme*) 出现显著下调 ($P \leq 0.05$); IV 级感染牡蛎样品中的免疫相关基因 (*SABL*, *defension*, *lysozyme*, *C3*) 均出现显著下调 ($P \leq 0.05$)。在肝胰腺中, 与 II 级感染牡蛎相比, III 级感染牡蛎

样品中的免疫相关基因 (*SABL*, *lysozyme*, *C3*) 均出现显著下调 ($P \leq 0.05$); IV 级牡蛎样品中的免疫相关基因 (*SABL*, *defension*, *lysozyme*, *C3*) 均出现显著下调 ($P \leq 0.05$)。

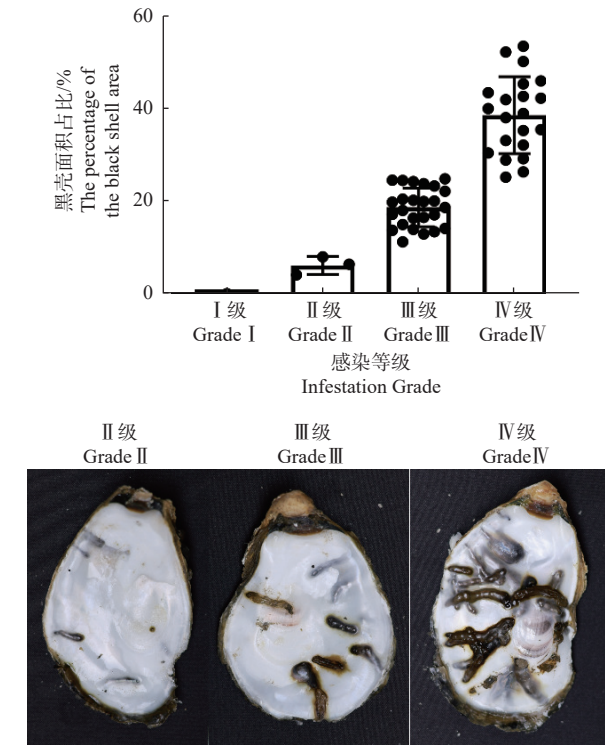


图 1 香港牡蛎右壳黑壳面积占比统计及分类

Fig. 1 Statistics and classification of the black shell area ratio within the right shells of *C. hongkongensis*

注: 黑色圆点代表香港牡蛎。

Note: The black dots represent *C. hongkongensis*.

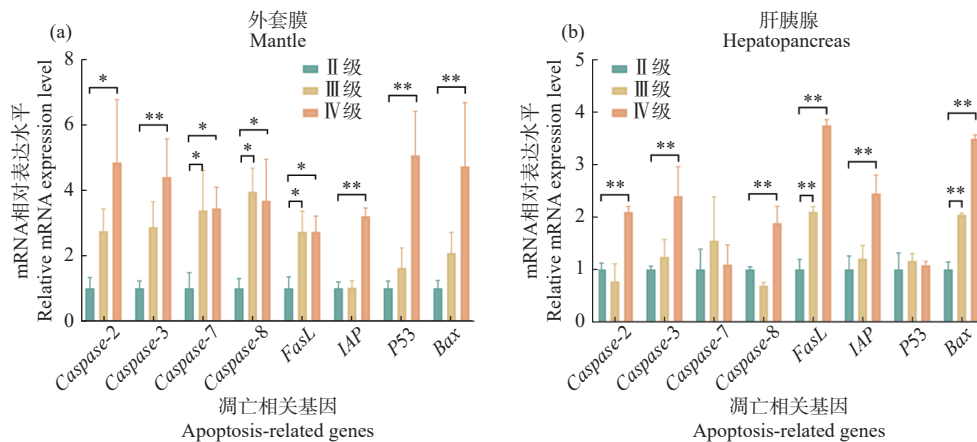


图 2 陵水才女虫感染等级为 II 级、III 级和 IV 级的香港牡蛎外套膜 (A) 和肝胰腺 (B) 凋亡相关基因差异表达

Fig. 2 Differential expression of apoptosis-related genes in the mantle (A) and hepatopancreas (B) of *C. hongkongensis* with three infestation grades of *P. lingshuiensis* (Grade II, Grade III and Grade IV)

注: * $0.01 < P \leq 0.05$, 表示差异显著; ** $P \leq 0.01$, 表示差异极显著。图 3 同此。

Notes: * $0.01 < P \leq 0.05$ indicates a significant difference; ** $P \leq 0.01$ indicates an extremely significant difference. It's the same as figure 3.

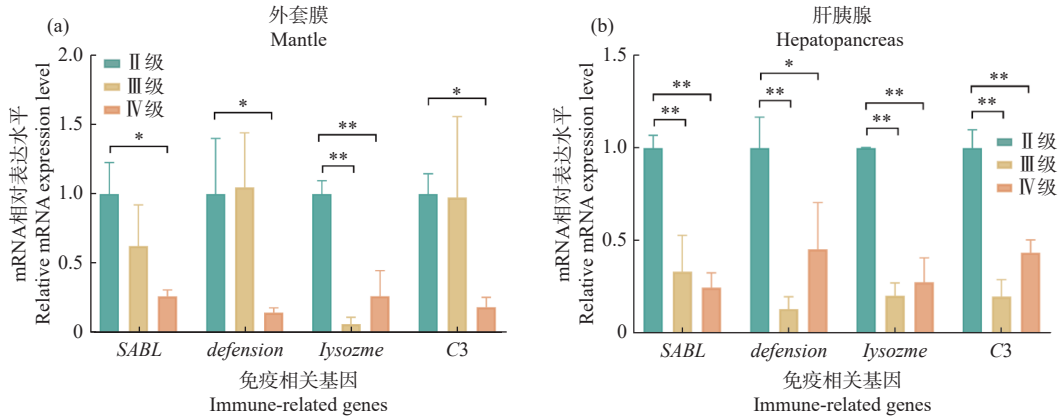


图 3 陵水才女虫感染等级为 II 级、III 级和 IV 级的香港牡蛎外套膜 (A) 和肝胰腺 (B) 免疫相关基因差异表达

Fig. 3 Differential expression of immune-related genes in the mantle (A) and hepatopancreas (B) of *C. hongkongensis* with three infestation grades of *P. lingshuiensis* (Grade II, Grade III and Grade IV)

2.4 基因表达与黑壳的关联分析

根据 Spearman 相关性分析, 在外套膜组织中, 香港牡蛎黑壳面积占比与 *Caspase-2*、*Caspase-3*、*Caspase-7*、*Caspase-8*、*IAP*、*P53*、*Bax* 的表达呈正相关, 与 *SABL* 和 *C3* 的表达呈负相关, 其中与

Caspase-2 和 *Caspase-3* 的表达正相关尤为强烈 (图 4A)。在肝胰腺组织中, 香港牡蛎黑壳面积占比与 *Caspase-3*、*FasL*、*IAP*、*Bax* 的表达呈正相关, 与 *SABL* 和 *lysozyme* 的表达呈负相关, 其中与 *Caspase-3* 的表达正相关尤为强烈 (图 4B)。

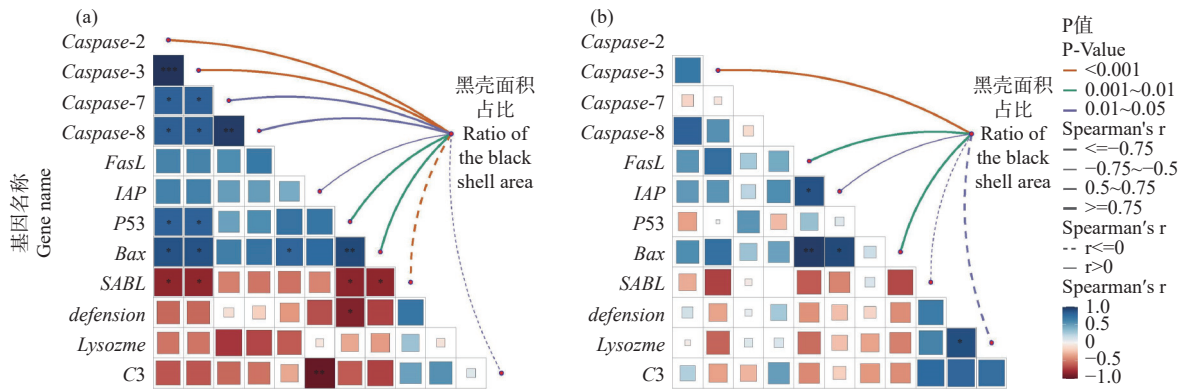


图 4 牡蛎黑壳面积占比与外套膜 (A) 和肝胰腺 (B) 不同基因表达参数之间的 Spearman 相关性分析

Fig. 4 Spearman correlation analysis between the black shell area ratio of *P. lingshuiensis* and the expression parameters of different genes in the mantle (A) and hepatopancreas (B)

3 讨论

3.1 陵水才女虫自然感染程度差异诱导香港牡蛎细胞凋亡响应变化

细胞凋亡是受基因调控的程序性死亡, 在维持内环境稳态、抵御病原体感染中至关重要^[22]。本研究中, III级感染牡蛎样品的外套膜和肝胰腺组织凋亡相关基因相较于II级感染呈现显著上调, 表明随着陵水才女虫感染程度加深, 相关凋亡途径在外套膜中已被明显激活。从凋亡相关基因表达结果来看, 在IV级感染状态下, 外套膜和肝胰腺中的细胞凋亡相关机制被更为广泛且强烈地激活。综

合外套膜与肝胰腺的实验结果来看, *FasL* 作为死亡受体配体, 能与靶细胞表面的 *Fas* 受体结合^[23], *Caspase-2* 和 *Caspase-8* 分别作为死亡受体途径的起始蛋白酶^[24], 其上调意味着这条凋亡途径在才女虫感染过程中被启动, 这可能是香港牡蛎应对才女虫感染的一种自我保护机制, 通过启动细胞凋亡来清除受感染细胞, 维持机体健康。*Caspase-3* 和 *Caspase-7* 作为细胞凋亡执行阶段的关键蛋白酶^[24], 其表达上调可能促使细胞凋亡发生, 进而有效地清除被才女虫感染或损伤的细胞, 以防止感染进一步扩散, 在牡蛎对抗才女虫感染的防御过程中发挥着至关重要的作用。*BAX* 基因是促凋亡蛋白家族的

重要成员,能促进线粒体释放细胞色素 c 等凋亡因子,从而激活下游 Caspase 级联反应^[25],其在Ⅳ级感染牡蛎外套膜中的显著上调,进一步推动了细胞凋亡进程。P53 基因作为重要的肿瘤抑制基因,在细胞应激和 DNA 损伤等情况下被激活,它可以通过调控下游一系列基因的表达来诱导细胞凋亡或细胞周期阻滞^[26],此次在Ⅳ级感染牡蛎外套膜中的上调,表明细胞可能启动了 P53 介导的凋亡途径来应对感染。

从另一个角度看,过度的细胞凋亡或许也会对牡蛎的正常生理功能产生负面影响,例如干扰细胞正常的代谢活动、破坏组织完整性等,最终致使其生长和免疫能力下降,影响牡蛎的生存与繁衍。其中, IAP 通常具有抑制细胞凋亡的功能^[27],但其在Ⅳ级感染牡蛎外套膜中也显著上调,这可能是机体试图平衡过度凋亡的一种反馈调节机制。然而即便如此,整体凋亡仍被显著激活,说明感染压力过大,导致外套膜和肝胰腺中的细胞凋亡相关机制被更为广泛且强烈地激活。

3.2 陵水才女虫自然感染对香港牡蛎免疫相关基因表达的影响

在牡蛎的外套膜组织中,相对于Ⅱ级感染牡蛎,免疫相关基因(lysozyme)在Ⅲ级牡蛎样品中出现显著下调。lysozyme 通常在免疫防御中通过水解细菌细胞壁的肽聚糖起到杀菌作用^[28],其在Ⅲ级感染牡蛎外套膜中的表达下调,表明此时牡蛎通过溶菌酶进行的免疫防御能力可能有所减弱。而在Ⅳ级牡蛎样品中,免疫相关基因(*SABL*, *defension*, *lysozyme*, *C3*)均出现显著下调。模式识别受体(PRRs)家族中的 *SABL* (Scavenger receptor class B-like protein) 基因表达下调,这意味着牡蛎对病原体相关分子的识别能力下降,与Ⅱ级感染时相比,其启动先天性免疫反应的能力受到抑制。抗菌肽(AMP)中的 *defension* 基因表达下调, *defension* 作为重要的抗菌肽^[29],其表达下调可能显著削弱牡蛎对才女虫及继发细菌感染的抵抗能力。同时,作为补体激活途径中的核心成分^[30], *C3* 基因表达下调表明补体系统的激活受到抑制,牡蛎通过补体系统进行免疫防御的能力也随之降低。

在肝胰腺组织中,相对于Ⅱ级感染牡蛎,免疫相关基因(*SABL*, *lysozyme*, *C3*)在Ⅲ级牡蛎样品中均出现显著下调。这表明在肝胰腺中,从Ⅲ级感染开始,牡蛎对病原体的识别能力(*SABL*)、通过溶菌酶杀菌的能力以及补体系统激活能力均受

到抑制。而在Ⅳ级牡蛎样品中,免疫相关基因(*SABL*, *defension*, *lysozyme*, *C3*)均出现显著下调($P \leq 0.05$),这进一步证实了随着感染程度加重,肝胰腺中的免疫相关基因表达普遍受到抑制,牡蛎在肝胰腺部位的免疫防御功能被严重削弱。

4 结论

本研究首次明确珠海荷包岛香港牡蛎所感染才女虫为陵水才女虫,并系统量化了其感染程度,黑壳面积占比可评估香港牡蛎状态,其与外套膜和肝胰腺的 *Caspase-3* 和 *Bax* 的表达呈正相关,与 *SABL* 的表达呈负相关,其中与 *Caspase-3* 的表达正相关尤为强烈,揭示了不同感染程度下香港牡蛎凋亡与免疫相关基因的表达变化。该发现不仅为监测香港牡蛎受才女虫感染状况提供了关键分子指标,还为深入剖析香港牡蛎病害分子调控网络提供了理论依据,有望助力开发更为有效的病害防控策略,对推动华南沿海地区香港牡蛎健康养殖和渔业经济可持续发展具有重要指导价值。

参考文献 (References):

- [1] 杨悦. 香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 水解酶基因 *Chhd* 的克隆及功能研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2022.
Yang Y. Cloning and functional study of a novel hydrolase gene *Chhd* of *Crassostrea hongkongensis* [D]. Nanning: Guangxi University, 2022.
- [2] 王海艳. 中国近海常见牡蛎分子系统演化和分类的研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2004.
Wang H Y. Study on the molecular phylogeny and taxonomy of common oysters in China seas [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004.
- [3] Fu S L, Yao T, Lu J, et al. Dynamic changes of antioxidant, immune function, and apoptosis in the hepatopancreas of Hong Kong Oyster (*Crassostrea Hongkongensis*) under high salinity stress [J]. Journal of Shellfish Research, 2025, 43(3): 431–440.
- [4] 中华人民共和国农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural

- Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2024 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2004.
- [5] Sato-Okoshi W, Okoshi K, Abe H, *et al.* Polydorid species (Annelida: Spionidae) associated with commercially important oyster shells and their shell infestation along the coast of Normandy, in the English Channel, France [J]. *Aquaculture International*, 2023, 31(1): 195 – 230.
- [6] Martinelli J C, Gross J A, Anderson D, *et al.* First record of shell-boring polychaetes in Pacific oyster (*Magallana gigas*) seed[J]. *Aquaculture*, 2025, 596: 741846.
- [7] 高燕. 才女虫生物学特征及其寄生行为的基础研究 [D] 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2011.
- Gao Y. Study on the biological characters and the parasitic behavior of *Polydora*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011.
- [8] Ye L T, Wu L, Wang J Y, *et al.* First report of black-heart disease in Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* spat caused by *Polydora lingshuiensis* in China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2019, 133(3): 247 – 252.
- [9] Zhang H K, Wang N L, Zhang C X, *et al.* Pathogenesis of black shell disease and its effects on survival and growth in the noble scallop *Chlamys nobilis*[J]. *Aquaculture*, 2024, 578: 740044.
- [10] 崔秀林. 扇贝养殖中黑壳病的发生和预防 [J]. 河北渔业, 1995 (2): 16.
- Cui X L. The occurrence and prevention of black shell disease in scallop aquaculture[J]. Hebei Fisheries, 1995 (2): 16.
- [11] 杨慧英. 合浦珠母贝寄生多毛类流行病学调查及生活史研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Yang H Y. Studies on epidemiology and life cycle of parasitological Polychaeta in *Pinctada fucata*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [12] 刘慧玲. 蕾贝才女虫发育阶段的形态观察 [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23 (6): 8 – 11.
- Liu H L. Morphological observation on development stages of *Polydora ciliata*[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 23(6): 8 – 11.
- [13] McDiarmid H, Day R W, Wilson R S. The ecology of polychaetes that infest abalone shells in Victoria, Australia[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(4): 1179 – 1188.
- [14] Radashevsky V I, Al-Kandari M, Malyar V V, *et al.* A twin of *Polydora hoplura* (Annelida: Spionidae) from the Arabian (Persian) Gulf, with review of primers used for barcoding of Spionidae[J]. *Zootaxa*, 2024, 5529(2): 245 – 268.
- [15] Winkler F M, Díaz-González A, Valdivia M V, *et al.* First insight on the genetic base of the heritable variation of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) resistance to *Polydora hoplura* infestation[J]. *Aquaculture Reports*, 2024, 37: 102237.
- [16] González-Ortiz L, Hernández-Alcántara P, Rodríguez-Villanueva V, *et al.* Infestation levels of *Nodipecten sub-nodosus* (Bivalvia: Pectinidae) by the borer *Polydora* sp. (Polychaeta: Spionidae) in Ojo de Liebre Lagoon, Mexican Pacific[J]. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2024, 52(5): 741 – 751.
- [17] Selifanova M, Demianchenko O, Noskova E, *et al.* ORFans in mitochondrial genomes of marine polychaete *Polydora*[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2023, 15(12): evad219.
- [18] 郭长钰, 王江勇, 孙敬锋, 等. 香港牡蛎感染才女虫后外套膜与鳃的转录组测序及差异表达基因分析 [J]. 天津科技, 2024, 51 (8): 37 – 44.
- Guo C Y, Wang J Y, Sun J F, *et al.* Transcriptome sequencing and differential expression gene analysis of mantle and gills of *Crassostrea Hongkongensis* infected with *Polydora*[J]. *Tianjin Science & Technology*, 2024, 51(8): 37 – 44.
- [19] 毛俊霞, 张晓森, 郝振林, 等. 感染才女虫虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 转录组表达分析 [C]//中国动物学会·中国海洋湖沼学会贝类学分会第十八次学术讨论会摘要集. 西安, 2017.
- Mao J X, Zhang X S, Hao Z L, *et al.* Transcriptome expression analysis of yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) infected by *Polydora haswelli*[C]//The 18th Academic Symposium of the Malacological Society of China, jointly organized by the Chinese Society for Zoology and the Chinese Society of Oceanology and Limnology. Xi'an, 2017.
- [20] 曹超, 黄圣洲, 叶灵通, 等. 陵水才女虫与威氏才女虫的比较和地理分布研究 [J]. 南方水产科学, 2017, 13 (1): 33 – 42.
- Cao C, Huang S Z, Ye L T, *et al.* Comparison and geo-

- graphical distribution of *Polydora lingshuiensis* and *P. websteri*[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(1): 33 – 42.
- [21] Núñez-Pons L, Mazzella V, Pfingsten L, *et al.* Heterogeneous microbiomes associate with shell-boring *Polydora hoplura* (Polychaeta, Spionidae) affecting the flat oyster *Ostrea edulis*[J]. *Aquaculture*, 2025, 595: 741522.
- [22] Fu S L, Ding M M, Yang Y J, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of caspase-6 in puffer fish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 490: 311 – 320.
- [23] Mao M G, Xu J, Liu R T, *et al.* Fas/FasL of pacific cod mediated apoptosis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 119: 104022.
- [24] Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, *et al.* A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis[J]. *Molecular Neurobiology*, 2023, 60(10): 5805 – 5837.
- [25] Spitz A Z, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, 43(3): 206 – 220.
- [26] Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2022, 29(5): 946 – 960.
- [27] Neophytou C M, Trougakos I P, Erin N, *et al.* Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance[J]. *Cancers*, 2021, 13(17): 4363.
- [28] Lin S M, Jiang Y, Chen Y J, *et al.* Effects of Astragalus polysaccharides (APS) and chitooligosaccharides (COS) on growth, immune response and disease resistance of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 70: 40 – 47.
- [29] 吴宁, 陈梦玫, 王素芳. 贝类免疫机制的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2017, 24 (1): 68 – 71.
- Wu N, Chen M M, Wang S F. Research progress of shellfish immune mechanism[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2017, 24(1): 68 – 71.
- [30] Zarantonello A, Revel M, Grunenwald A, *et al.* C3-dependent effector functions of complement[J]. *Immunological Reviews*, 2023, 313(1): 120 – 138.

The effects of *Polydora lingshuiensis* natural infection on the apoptotic and immune functions of Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*)

FU Shengli^{1,2}, JIANG Haoyi¹, WANG Yuxiang¹, LU Jie^{1,2}, YAO Tuo^{1,2}, YE Lingtong^{1,2*}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China;

2. Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572426, China)

Abstract: [Background] As an important economic mollusc along the coastal areas of South China, the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*) holds a crucial position in aquaculture and significantly contributes to the local fishery economy. *Polydora* spp. is a kind of common shell-boring parasites of the *C. hongkongensis*. Severe infestation of *Polydora* spp. can cause the “black shell disease”; the parasites even bore through the shell and invade the soft parts, triggering an immune response, which affecting the quality and economic value of the *C. hongkongensis*. [Objective] To explore the effects of different *Polydora* spp. infestation degrees on the apoptosis and immune-related genes of the *C. hongkongensis*. [Methods] In this study, a total of 49 *C. hongkongensis* samples were collected from Hebao Island, Zhuhai City, Guangdong Province. Firstly, the worms were identified by the morphological observations and molecular approach. Then, the image processing technology of Photoshop (PS) was used to count the proportion of the black shell area of the *C. hongkongensis* caused by the infection of *Polydora* spp. and classify the infection degrees. Combined with the real-time quantitative PCR technology, comparison of the apoptosis and immune-related gene expression difference were made in the mantle and hepatopancreas tissues of the *C. hongkongensis* with different *Polydora* spp. infestation grades. [Results] The results showed that the worms were identified as *Polydora lingshuiensis* based on morphological and molecular characteristics. The proportion of the black shell area within the right shell of the *C. hongkongensis* caused by *Polydora lingshuiensis* infestation ranged from 4.07% to 53.59%. Among them, there were 0 samples with the infestation level of Grade I, 3 samples with Grade II, 25 samples with Grade III, and 21 samples with Grade IV. Compared with the oyster’s infestation at Grade II, it was up-regulated in the apoptosis-related genes (*Caspase-2*, *Caspase-3*, *Caspase-8*, *FasL*, *IAP*, *BAX*) in the mantle and hepatopancreas of the oysters infested with Grade IV, and down-regulated in the immune-related genes (*SABL*, *defension*, *lysozme*, *C3*) were. The Spearman correlation analysis showed that the proportion of the black shell area was positively correlated with the expressions of *Caspase-3* and *Bax* in the mantle and hepatopancreas, and negatively correlated with the expression of *SABL*, especially the positive correlation with the expression of *Caspase-3* was particularly strong. [Conclusion] The proportion of the black shell area can be used to assess the status of the *C. hongkongensis*, and it is related to the expression of apoptosis and immune genes. This study provides a theoretical basis and exploration direction for the prevention and treatment of the “black shell disease” and the protection of the development of the *C. hongkongensis* aquaculture industry.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; *Polydora lingshuiensis*; mantle; hepatopancreas; apoptosis; immune response