

中国科技核心期刊 中文核心期刊

2021

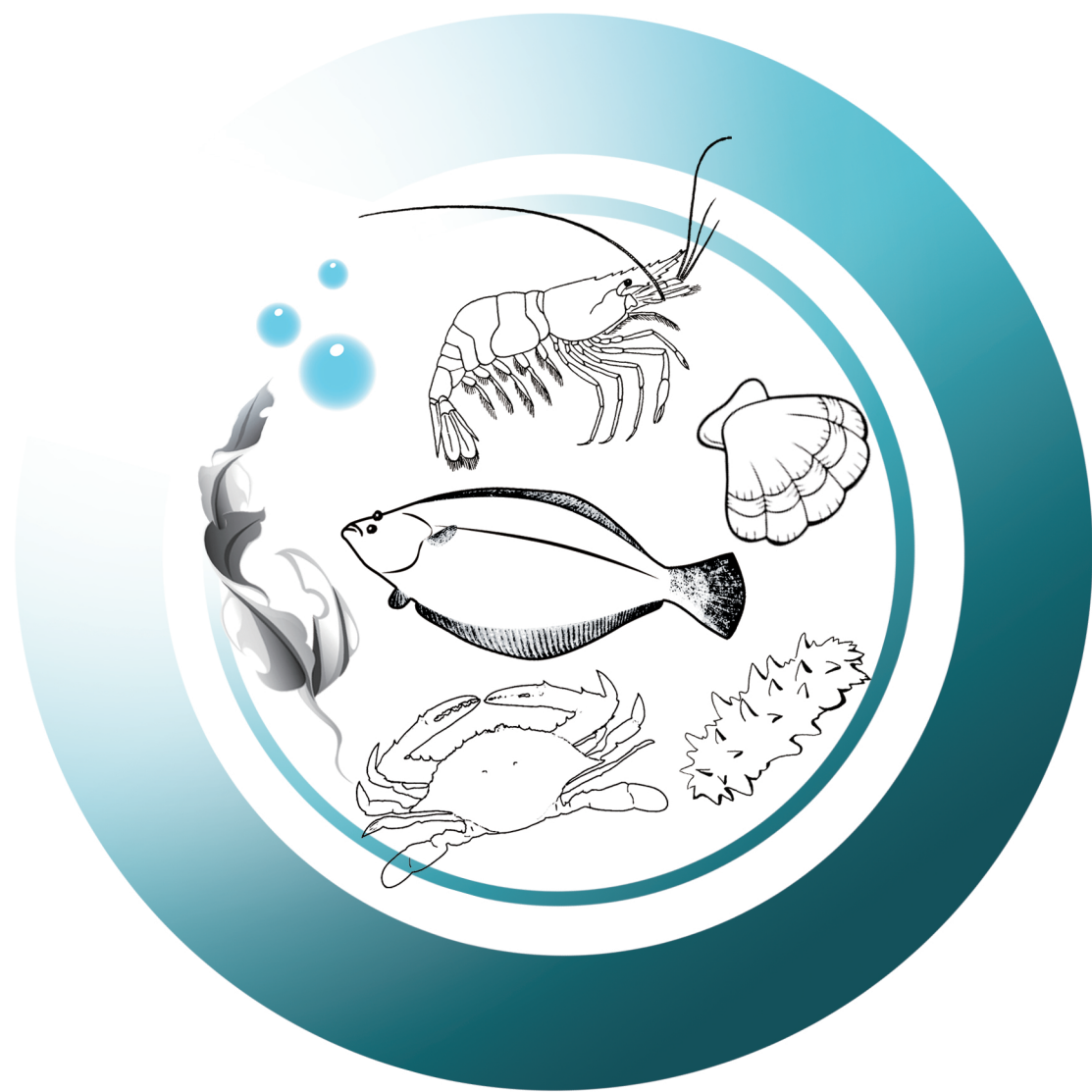
ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

“重要养殖棘皮类种质创制与新对象开发” 专刊

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第42卷 VOL.42 第3期 NO.3



中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

主办



科学出版社
Science Press

出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 42 卷 第 3 期

2021 年 6 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊
中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊
中国科技论文统计源核心期刊
RCCSE 中国权威学术期刊
中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、
中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊
中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊
英国《动物学记录》(ZR)收录期刊
《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊
《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊
《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊
《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

目 次

“重要养殖棘皮类种质创制与新对象开发”专刊

研究综述

- 水产动物种质创制新技术及在海参、海胆遗传育种中的应用..... 丁 君 韩冷姝 常亚青 (1)
- 微藻饵料在经济棘皮动物养殖中的应用及研究进展..... 刘瑞卿 何梅琳 王长海 (17)
- 棘皮动物精子超低温冷冻保存技术研究进展..... 许 帅 孙景春 刘石林 林承刚 张立斌 孙丽娜 杨红生 (26)

研究论文

- 基于 MSAP 技术的刺参选育群体基因组表观与序列遗传多样性分析..... 左 闪 温争争 周红学 倪乐海 孙国华 冯艳微 王卫军 杨建敏 (38)
- 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应..... 温争争 左 闪 陈 梦 周红学 孙国华 冯艳微 王卫军 杨建敏 (46)
- 热带糙海参雌、雄亲参的差异代谢物和差异代谢通路研究..... 吴菲菲 程楚杭 陈 廷 张 鑫 吴小芬 江 晓 任春华 胡超群 (55)
- 仿刺参疣足数量 SNP 遗传力评估..... 倪 萍 任 强 王 静 丁 君 常亚青 王扬帆 胡景杰 包振民 (68)
- 不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征研究..... 谭八梅 王 莹 裴泓霖 夏兴龙 丁 君 常亚青 郝振林 (77)
- 不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构及其影响因素..... 裴泓霖 王 莹 谭八梅 李伟嘉 甄 昊 丁 君 常亚青 (89)
- 刺参池塘养殖系统中 1 株副干酪乳杆菌的分离及其生物学特性研究..... 李 彬 王印庚 廖梅杰 张永刚 荣小军 王锦锦 于永翔 张 正 宁鲁光 (100)
- 刺参“参优 1 号”新品种在不同盐度下的代谢特征和适应性研究..... 王治平 李 彬 秦 蕾 王印庚 廖梅杰 荣小军 张 正 范瑞用 郑 炯 (108)
- 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的代谢特征和适应性研究..... 荣小军 李 彬 廖梅杰 王印庚 王治平 王锦锦 于永翔 张 正 范瑞用 (116)
- 光照强度对紫海胆浮游幼体生长及消化酶活性的影响..... 陈吉圣 席世改 秦传新 郭 禹 潘莞倪 邵广彧 (125)
- 血清素对刺参繁育效果的影响..... 谭 杰 马添翼 陈爱华 周晓群 刘长琳 葛建龙 边 力 陈四清 王学江 (132)
- 低盐和高盐环境下刺参选育品系生长与摄食性能研究..... 赵 斌 胡 炜 李成林 赵洪友 吴 鹏 韩 莎 姚琳琳 王 琦 (139)
- 投喂发酵饲料对刺参能量收支、生长、酶活性及其养殖水质的影响..... 王凤军 廖梅杰 王印庚 李 彬 秦 蕾 王治平 范瑞用 刘 毅 (147)
- 3 种不同体色刺参体壁营养成分的比较研究..... 汤 奎 刘小林 张 帅 刘石林 刘佳亮 范晓腾 王在照 (155)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.42 No.3 June 2021

“ Important Breeding Echinoderm Germplasm Creation and New Object Development” Special Issue

- Application of Germplasm Innovation Technology in Sea Cucumber and Sea Urchin Genetic Breeding DING Jun, HAN Lingshu, CHANG Yaqing (1)
- Progress in Research on Application of Microalgae Bait in Echinoderm Culture LIU Ruiqing, HE Meilin, WANG Changhai (17)
- Progress in Research on Cryopreservation Technology for Echinoderm Sperm XU Shuai, SUN Jingchun, LIU Shilin, LIN Chenggang, ZHANG Libin, SUN Lina, YANG Hongsheng (26)
- Evaluation of Epigenetic and Genome Sequence Diversity in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Selected Population Based on MSAP Technology ZUO Shan, WEN Zhengzheng, ZHOU Hongxue, NI Lehai, SUN Guohua, FENG Yanwei, WANG Weijun, YANG Jianmin (38)
- DNA Methylation Level of Genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at Different Temperatures WEN Zhengzheng, ZUO Shan, CHEN Meng, ZHOU Hongxue, SUN Guohua, FENG Yanwei, WANG Weijun, YANG Jianmin (46)
- Study on Sex Differential Metabolites and Metabolic Pathway of Parental Tropical Sea Cucumbers *Holothuria scabra* WU Feifei, CHENG Chuhang, CHEN Ting, ZHANG Xin, WU Xiaofen, JIANG Xiao, REN Chunhua, HU Chaoqun (55)
- Estimating SNP Heritability for Papillae Number in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* NI Ping, REN Qiang, WANG Jing, DING Jun, CHANG Yaqing, WANG Yangfan, HU Jingjie, BAO Zhenmin (68)
- The Seasonal Structural and Functional Characteristics of Bacterial Community in *Apostichopus japonicus* Culture Pond Water TAN Bamei, WANG Luo, PEI Honglin, XIA Xinglong, DING Jun, CHANG Yaqing, HAO Zhenlin (77)
- Environmental Factors Influence the Seasonal Characteristics of Bacterial Community in the Sediment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds PEI Honglin, WANG Luo, TAN Bamei, LI Weijia, ZHEN Hao, DING Jun, CHANG Yaqing (89)
- Isolation and Biological Characterization of *Lactobacillus paracasei* Isolated from a Sea Cucumber Pond Culture System LI Bin, WANG Yingeng, LIAO Meijie, ZHANG Yonggang, RONG Xiaojun, WANG Jinjin, YU Yongxiang, ZHANG Zheng, NING Luguang (100)
- Metabolic Characteristics and Adaptability of a New Variety of Sea Cucumber “Shenyou No.1” under Different Salinities WANG Zhiping, LI Bin, QIN Lei, WANG Yingeng, LIAO Meijie, RONG Xiaojun, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong, ZHENG Jiong (108)
- Metabolic Characteristics and Adaptability of a New Variety of Sea Cucumber “Shenyou No.1” under Different pH Conditions RONG Xiaojun, LI Bin, LIAO Meijie, WANG Yingeng, WANG Zhiping, WANG Jinjin, YU Yongxiang, ZHANG Zheng, FAN Ruiyong (116)
- Effects of Light Intensity on Growth and Digestive Enzyme Activities of Sea Urchin (*Anthocidaris crassispina*) Larvae CHEN Jishen, XI Shigai, QIN Chuanxin, GUO Yu, PAN Wannan, SHAO Guangyu (125)
- Effects of Serotonin on Reproductive Performance and Offspring Quality of Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus* TAN Jie, MA Tianyi, CHEN Aihua, ZHOU Xiaqun, LIU Changlin, GE Jianlong, BIAN Li, CHEN Siqing, WANG Xuejiang (132)
- Growth and Feeding Performance of Selected Breeding Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Low and High Salt Environments ZHAO Bin, HU Wei, LI Chenglin, ZHAO Hongyou, WU Peng, HAN Sha, YAO Linlin, WANG Qi (139)
- Effect of Fermented Feed on the Energy Budget, Growth, and Enzyme Activities of Sea Cucumber Seedlings and Its Influence on the Water Quality in the Culture System WANG Fengjun, LIAO Meijie, WANG Yingeng, LI Bin, QIN Lei, WANG Zhiping, FAN Ruiyong, LIU Yi (147)
- Comparative Study on the Nutrient Composition in Body Walls of Three Body Color Variants of the Sea Cucumbers, *Apostichopus japonicus* (Selenka) TANG Kui, LIU Xiaolin, ZHANG Shuai, LIU Shilin, LIU Jialiang, FAN Xiaoteng, WANG Zaizhao (155)

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201208003

http://www.yykxjz.cn/

丁君, 韩泠姝, 常亚青. 水产动物种质创制新技术及在海参、海胆遗传育种中的应用. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 01-16
Ding J, Han LS, Chang YQ. Application of germplasm innovation technology in sea cucumber and sea urchin genetic breeding. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 01-16

水产动物种质创制新技术及在海参、 海胆遗传育种中的应用*



丁 君^{1①} 韩泠姝² 常亚青^{1①}

(1. 大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023;

2. 宁波大学海洋学院 宁波 315832)

摘要 随着现代遗传育种理论和生物技术的不断发展与创新,水产育种技术也开始从传统的选择育种、杂交育种技术,逐渐向与分子标记辅助育种、细胞工程育种、全基因组选择育种、分子设计育种、性别控制、基因转移以及基因编辑等现代分子辅助育种技术相结合的方向发展。虽然,我国水产种业已经形成并蓬勃发展,但仍存在良种覆盖率低、研究深度不够等问题和挑战。本文在国内研究的基础上,重点综述了棘皮动物(海参和海胆)的种质资源概况、水产养殖育种新技术及在经济棘皮动物中的应用,并对海参、海胆养殖业提出了建议,以期合理开发我国经济棘皮动物种质资源提供参考,推动水产养殖业绿色发展。

关键词 种质创新技术; 海参; 海胆; 遗传育种

中图分类号 Q953+.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0001-16

随着经济和科技的发展、人口增长对水产品需求的增加以及基础建设和科研经费的投入,水产养殖行业迅速发展(Bostock *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017)。截至 2019 年,我国水产养殖面积为 7.1×10^6 hm^2 , 养殖产量为 5079.07 万 t, 年养殖产值为 9761.89 亿元(农业农村部渔业渔政管理局等, 2019)。水产种质资源是我国渔业生产的重要物质基础和人类重要的食物蛋白源,然而,随着养殖技术的发展和市场需求增多,养殖密度不断增加,栖息地环境恶化、苗种混杂,使现有品种种质退化、生长缓慢、抗逆性降低。因此,种质创制已成为我国水产养殖业研究的重点之一。

“发展养殖, 种业先行”是养殖业一条亘古不变

的法则。种质创制在水产养殖中发挥着重要的作用,良种培育的突破性成果给水产养殖产业带来巨大的发展和提高。种质创制新技术是国内外最为活跃的研究领域之一,随着生物工程技术在水产动物遗传育种中发挥重要作用,逐步建立了多倍体诱导、雌核发育、性别调控、转基因等细胞工程育种技术。高通量测序技术的发展及分子标记的批量开发为分子辅助育种及全基因组育种提供了重要的平台(常亚青等, 2013; 张晓娟等, 2019)。本文重点介绍了棘皮动物(海参和海胆)的种质资源概况、水产养殖种质创制新技术的研究进展以及在经济棘皮动物中的研究现状,探讨了种质创制新技术在水产养殖及经济棘皮动物中的应用以及未来的发展方向。

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901601)和辽宁省高等学校创新团队及创新人才支持计划项目(LT2019003)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901601), and Program for Liaoning Innovative Research Team in University (LT2019003)].

① 通讯作者: 丁 君, 研究员, E-mail: dingjun19731119@hotmail.com; 常亚青, 教授, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

收稿日期: 2020-12-08, 收修改稿日期: 2020-12-30

1 棘皮动物种质资源概况

海参、海胆分别属于棘皮动物门海参纲(Holothuroidea)、海胆纲(Echinoidea),全球有记录的海参约有1000多种、海胆约有850种。海参纲、海胆纲中有较多的经济物种,2019年中国海参养殖年产量达到171700 t,海胆养殖年产量已达8243 t(农业农村部渔业渔政管理局等,2019)。

1.1 海参

海参分布于全球各大洋,主要在热带区和温带区,绝大多数进行底栖生活。温带区海参资源呈单种性,热带区海参资源则呈多种性。目前,世界海参产

量的86%来自热带区,其中,印度洋-西太平洋区是世界上海参种类最多、资源量最大的区域(姜健等,2004; Conand *et al.*, 2010)。中国约有海参120余种,沿海各省均有分布,其中经济价值较高的有10余种(表1),主要分布于温带区和热带区,刺参(*Apostichopus japonicus*)是最主要的经济种类。

1.2 海胆

海胆广泛分布于世界各海域中,营底栖生活。自寒带至热带,从潮间带的浅水区到水深5000 m的深海区,均能见到它们的踪迹。中国已记录的海胆有8目26科60属93种,分布于我国山东、辽宁、浙

表1 我国常见海参的种类、形态特征及分布

Tab.1 Species, morphological characteristics and distribution of common sea cucumbers in China

种类 Species	形态特征 Morphological characteristics	分布 Distribution
刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	体呈圆筒状,背面隆起,上有4~6行大小不等、排列不规则的圆锥形疣足(肉刺)。腹面平坦,管足密集,排列成不规则的三纵带。口偏于腹面,具触手20个。肛门偏于背面。呼吸树发达,无居维氏器。	辽宁、山东、河北等北方沿海
梅花参 <i>Thelenota ananas</i>	俗名凤梨参。体形大,背面疣足很大,呈肉刺状,肉刺基部相连,呈梅花状。	海南、广东、西沙群岛等地
花刺参 <i>Stichopus variegatus</i>	体稍呈四方柱形状,背面散布许多小疣足,排列不规则。腹面管足排列为三纵带,中央带较宽。口偏于腹面,具触手20个。肛门端位,周围没有疣。体色变化大。疣足末端常呈红色。	台湾、海南、雷州半岛、西沙群岛
糙刺参 <i>Stichopus horrens</i>	体呈圆筒状,背面具有大的疣足,沿着背面的2个步带区和腹步带排列为4个不规则的纵行。口大,偏于腹面,具触手20个,有发达的疣足襟部,肛门偏于背面,周围没有疣。腹面管足成二纵带排列,中央带较宽。	台湾、海南、西沙群岛等地
绿刺参 <i>Stichopus chloronotus</i>	体呈四方柱。沿着身体两侧缘和背面步带各有两行交互排列的圆柱形疣足。腹面管足密集,排列为三纵带,中央带较宽。口大,偏于腹面,具触手20个。肛门偏于背面,周围没有疣。	海南、西沙群岛
蛇目白尼参 <i>Bohads chiaargus</i>	体呈圆筒状,生活时,体长为400 m,宽约为10 cm,口偏于腹面,具触手20个。肛门体后端,开口很大。波里氏囊2个,石管1个。居维氏器发达。疣足很小,散布于背面。管足很多,不规则地分布于腹面。体呈浅黄色或浅褐色,背面有许多蛇目状斑纹,排列为不规则的纵行。	西沙群岛等地
黑海参 <i>Halodeima atraatru</i>	体圆筒状,前端较细。口偏于腹面,具触手20个。背面疣足小,腹面管足较多,排列也无规则。无居维氏器。肛门端位。生活在珊瑚礁区。	台湾、海南、西沙群岛
辐肛参 <i>Acinarlecg rara</i>	体呈椭圆形。口偏于腹面,具触手20个,肛门偏于背面,周围有5个钙质齿。背面隆起,表面光滑,仅具稀疏的管足。腹面平坦,管足呈三纵带排列,中央带管足较稀,排列较宽,2侧带管足较多,排列较窄。生活时,体色很明显,背面为褐色到黑褐色,并有不规则的灰白色横斑,或黑斑,肛门附近有界限分明的浅色区。	西沙群岛

续表 1

种类 Species	形态特征 Morphological characteristics	分布 Distribution
白底辐肛参 <i>Actinopyga mauritiana</i>	口大, 偏于底面。触手大, 为 25~27 个, 排列为不规则的内、外 2 圈; 生活时, 围绕触手的疣襟部常表现清楚。背面隆起, 散布一些小疣足, 围绕各疣足基部常有一个白色环, 身体后端的白色环尤为明显。腹面平坦, 密布许多管足, 小个体腹面管足明显排成三纵带, 大个体管足排列常无规则。	台湾南部、海南岛南部、西沙群岛和南沙群岛
棘辐肛参 <i>Actinopyga echinites</i>	口偏于腹面, 具触手 20 个。肛门稍偏于背面, 周围有 5 个白色钙质齿。背面密布许多锥形疣足, 排列无规则。腹面平坦, 管足很多, 排列为 3 纵带。	台湾、广东、海南和西沙群岛
乌皱辐肛参 <i>Actinopyga miliaris</i>	体呈圆筒形。背腹面明显有别。口偏于腹面, 具触手 20 个。肛门端位, 周围有明显 5 个钙质齿。体壁厚。背面散布一些不规则的小疣足。腹面管足排列为三纵带。	海南和西沙群岛
黑乳参 <i>Microthele nobilis</i>	大型种, 体长一般为 30 cm, 宽约为 6 cm。体宽而厚, 两端钝圆。口小, 偏于腹面, 具触手 20 个。肛门稍偏于背面, 周围有 5 个钙化疣, 各疣周围有一小圈小疣。背面有分散的小疣足, 2 侧各有几个大的乳房状突起, 这种突起加工成干海参后有时很显著。腹面管足多而密集, 排列无规则。体壁厚。	台湾、海南和西沙群岛
虎纹海参 <i>Holothuria perricaria</i>	体呈圆筒状, 口偏腹面, 具触手 20 个, 肛门偏背面。背面散布有小而稀疏的管足。腹面管足多而密集, 排列无规则。生活时, 体色美丽; 背面为浅褐色, 有 6~8 个暗褐色横斑和浅色疣足, 横斑中央的疣足常较大而明显。腹面为灰白色。触手为白色, 稍透明。	福建南部广东中部和西部、海南、西沙群岛
糙海参 <i>Holothuria scabra</i>	大型种, 最大者体长可达 70 cm, 口小, 偏于腹部, 具有小型触手 20 个。肛门端位, 周围有 5 组细疣。背面疣足小, 且数目不多; 腹面管足呈疣足状, 小而稀疏, 背面和腹面交界处常有一行边缘腹侧疣。沿着腹面中央有一条明显的纵沟。体壁厚, 体色变化很大, 疣足基部常为白色, 背中部色泽较深, 两边较浅, 腹面则逐渐变为白色。	广东、海南
米氏海参 <i>Holothuria moebii</i>	体呈圆筒状。背面少数疣足。腹面的足发达而密集。口偏于腹面, 具触手 20 个。各触手不仅顶端有分枝, 稍下方也有分枝, 故伸展时稍呈树枝状, 但与瓜参科的枝状触手不同。肛门偏于腹面, 周围有少数细疣。体壁柔软, 管足内有特殊的“H”形骨片。全体为黑褐色, 腹面色泽略浅。	福建南部沿岸
图纹白尼参 <i>Bohadshiu marmorata</i>	口偏于腹面, 具触手 20 个。肛门位于末端, 周围有 5 组细疣。体呈圆筒状。背面有许多分散的疣足。腹面管足较多, 排列不规则。背面常有几个深色大斑块, 组成地图般的花纹。	海南岛南端、西沙群岛

江、福建和广东沿海一带(杜俊义, 2005; Massin *et al.*, 2000)。目前, 已被较好开发并能形成规模性渔获量的经济种类不超过 30 种, 其中, 已开展规模养殖和研究的品种约有 7 个(表 2)。

2 海参、海胆遗传育种应用基础与技术研发

水产养殖产量下降与物种近交衰退及病害直接相关, 且产量和效益取决于其遗传资源的利用率。因此, 了解水产动物的生物学特性至关重要, 许多在产业中影响较大的水产养殖品种, 便是在对其遗传背景

充分了解的基础上培育而成的。刺参具有再生、夏眠、应激排脏、离水后由肛门排水和身体伸缩变形等特殊生理习性和应激反应; 海胆性腺中 n-3、n-6 不饱和脂肪酸含量丰富。开展上述海参、海胆特征遗传性状基础解析及其性状测量技术研发, 对海参、海胆种质创制至关重要。

2.1 分子标记开发、遗传连锁图谱构建与全基因组测序

分子标记辅助育种(Molecular marker-assisted breeding, MAS)是借助与性状紧密相关的分子标记对

表 2 我国常见海胆的种类、形态特征及分布

Tab.2 Species, morphological characteristics and distribution of common sea urchin in China

种类 Species	形态特征 Morphological characteristics	分布 Distribution
中间球海胆 <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	外壳呈低半球形，壳高略小于壳径的 1/2，体型中等，成体的最大壳径可达 90 mm。口面平坦且稍向内凹，反口面隆起稍低，顶部比较平坦。步带区与间步带区幅宽不等，赤道部以上步带区幅宽约为间步带区的 2/3。两区因隆起程度不同，壳形自口面观接近于圆形的圆滑正五边形。	日本北海道和俄罗斯的远东等地沿海及中国北方沿海
马粪海胆 <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	外壳为低半球形，壳很坚固，壳高约为壳径的 1/2，最大壳径约为 60 mm。口面稍向内凹，反口面的隆起程度稍低，顶部较平坦。步带区与间步带区幅宽相等，但膨起程度不同，间步带区比步带区略高，壳形自口面观为类似圆形的圆滑正五边形。	中国及日本沿海
光棘球海胆 <i>Strongylocentrotus nudus</i>	外壳呈半球形，壳高略大于壳径的 1/2，最大壳径可达 100 mm，口面平坦，围口部稍向内凹；反口面比较隆起，顶部呈圆弧形。步带区与间步带区幅宽不等，赤道部以上的步带幅宽约为间步带的 2/3，步带至口面逐渐展宽，围口部周围的宽度可等于甚至略宽于间步带。步带区与间步带区的膨起程度相似，壳形口面观为圆形。	西北太平洋沿岸水域、辽东半岛、山东半岛的黄海一侧海域以及渤海海峡的部分岛礁周围
白棘三列海胆 <i>Tripneustes gratilla</i>	外壳半球形，壳高略大于壳径的 1/2。口面比较平坦，围口部大而凹陷，反口面较隆起，顶系大，凸起程度较高，顶部膨起为低圆丘形。步带区与间步带区幅宽不等，间步带区明显宽于步带区，步带区宽度约为间步带区的 4/5。2 区的膨起程度不同，因而壳形自口面观为接近于圆形的圆滑正五边形。	印度洋和西太平洋区域内分布广，日本南部、澳大利亚、夏威夷等地沿海都产，在中国主要分布于南海海域
紫海胆 <i>Anthocidaris erassispina</i>	壳均呈黑紫色。大棘针形，末端尖锐，长度等于壳的直径，有时会出现 2 侧大棘不均等现象，一侧大棘比相对一侧大棘偏长。本种海胆外形上与光棘球海胆相似，但紫海胆的管足孔每 7~9 对排成一个弧(多为 8 对，管足内骨片呈弓形，两端细尖，背部常有一个突起；步带区至围口部稍微下凹(光棘球海胆则恰恰相反；有孔带至围口部边缘渐渐扩宽成瓣状；大疣较少，步带和间步带各有大疣。	太平洋北部、浙江、福建、厦门、广东等地沿海
细雕刻肋海胆 <i>Temnopleurus toreumaticus</i>	壳形和棘的颜色变化大，外壳从呈低半球形到高圆锥状，棘为浅灰褐色并带有紫褐色的环状斑纹、黑绿色带浅色横斑或浅黄褐色带红紫色斑纹。壳径一般为 4~5 cm，步带稍隆起，宽度约为间步带的 2/3。步带板赤道部以上的水平缝合线上有一较深的三角形凹痕，凹痕的边缘整齐。管足孔 3 对排列成一个弧。顶系稍凸起。各生殖板上有很多小疣。眼板都不接触围肛部。	印度-西太平洋区最普遍的一种，也是我国分布范围最广的种类，在中国北起辽宁、南到海南岛，从北到南的大部分海区都有其自然种群分布
哈氏刻肋海胆 <i>Temnopleurus hardwickii</i>	外形与细雕刻肋海胆极其相似，只是本种的大棘上无深色环状斑纹，步带板水平缝合线上的凹痕边缘更倾斜，内端的凹陷及其步带板也比细雕刻肋海胆的更深些。	中国自然分布水域比细雕刻肋海胆偏北，主要分布在浙江省嵊泗列岛以北的中北部海域

具有性状优势的等位基因或基因型的个体进行直接选择育种，是分子生物学和基因组学的研究成果应用到水产养殖品种选育的技术(鲁翠云等, 2019)。

利用 SSR (Simple sequence repeats) 分子标记技术，对扇贝“渤海红”、墨西哥湾扇贝 (*Argopecten irradians concentricus*) 及其杂交子代 3 个群体共 90 个

个体的遗传多样性进行分析,结果可为扇贝“渤海红”和墨西哥湾扇贝群体种质资源评估和杂交新品种的选育提供理论参考(姚高友等, 2020)。廖梅杰等(2021)利用 SSR 指纹图谱技术对中、韩、俄不同地区刺参群体进行遗传多样性分析和指纹图谱构建,构建的指纹图谱可将 8 个群体分开,为刺参种质资源保护及不同地理种群刺参的鉴别提供技术支撑。

卢超等(2010)应用微卫星富集文库——菌落原位杂交的方法,筛选得到 33 个刺参的微卫星标记。利用 48 个野生刺参个体对 33 个微卫星位点进行评价,结果显示,位点都具有多态性,表明富集文库——菌落原位杂交法筛选微卫星标记比较高效,获得的微卫星标记可以用于刺参的分子遗传学研究。

丁君等(2008)采用磁珠法从中间球海胆基因组中分离富集微卫星 DNA,获得 160 个阳性克隆和 108 个微卫星序列,并对其特征进行了分析。在此基础上,根据微卫星位点的侧翼序列,通过筛选,采用其中的 12 对微卫星 DNA 标记对大连凌水、大连獐子岛、山东荣成 3 个中间球海胆养殖群体的遗传多样性进行了分析。Yan 等(2010)也分离并鉴定了 61 个海胆微卫星标记,所开发的多态性标记已用于选择育种亲本的选择。

QTL 辅助育种是通过遗传标记与性状之间的相关性分析,将一个或多个 QTL 定位到染色体的遗传标记之间,并据此标记进行分子标记辅助育种的方法,其基础是高密度遗传连锁图谱。

在遗传连锁图谱构建方面, Li 等(2009)选择 37 个扩增片段长度多态性(AFLP)引物组合,确定了刺参亲本 484 个多态性标记,生成的图谱将作为构建高分辨率遗传图谱以及绘制功能基因和定量性状基因座的基础,为刺参应用标记辅助选择育种策略开辟道路。Yan 等(2013)基于刺参 2 个 F_1 家族微卫星和 SNP 标记构建了刺参的共有遗传图谱,雄性连锁图包括 157 个基因座,跨度为 1244.9 cM,而雌性连锁图包括 153 个基因座,跨度为 1399.1 cM,共有图谱中鉴定出 22 个连锁群,与刺参的单倍体染色体数一致。刘安然等(2019)利用已构建的刺参高密度遗传连锁图谱,初步定位了体长、体宽、体重、棘刺总数和存活天数(抗病力) 5 个性状相关的 9 个 QTL 区域,获得 81 个 SLAF 标签。Tian 等(2015)采用 2b 限制性位点相关的 DNA 测序(2b-RAD)方法构建了共有 7839 个标记,覆盖率达到 99.57% 的高密度、高分辨率的海参遗传图谱(这是棘皮动物中最高标记密度), QTL 作图和关联分析一致捕获了一个位于连锁群(LG)5 的 5 cM 区域的与生长相关的 QTL,结果表明,涉及精细 QTL 定位和标记辅

助选择(MAS)的强大研究工具将促进染色体分配并改善海参的全基因组装配。

Zhou 等(2015)构建了光棘球海胆和中间球海胆 2 种海胆的遗传图谱,为后续开展 QTL 分析和群体遗传学研究提供了便利。Chang 等(2018)构建了包含 21 个连锁群的中间球海胆的高密度遗传图,检测到 33 个潜在的 QTL,并据此开发了与中间球海胆生长性状、性腺性状相关的 KASP 标记,已应用于新品种开发。

近年来,随着大规模测序成本不断降低,海胆、海参全基因组测序相继完成,为全基因组选择育种技术的研发提供了保证。2006 年 11 月 9 日,休斯敦贝勒医学院(Baylor College of Medicine, BCM-HGSC)人类基因组测序中心宣布完成对紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)基因组测序,其序列长约为 814 Mb,编码约 23300 个基因,此后,绿海胆(*Lytechinus variegatus*)、马粪海胆的基因组序列也分别于 2016 年、2018 年被报道(Erica *et al.*, 2006; Sergiev *et al.*, 2016; Kinjo *et al.*, 2018)。自 2012 年起,中国学者相继破译了数十种水产养殖生物的全基因组序列。Zhang 等(2017)和 Li 等(2018)完成了刺参全基因组测序,构建了刺参全基因组的精细图谱,基因组组装全长为 800~950 Mb,编码约 29000~30350 个基因,助推了刺参重要经济性状解析、全基因组选择育种和分子标记育种。

2.2 经济性状评测

育种目标的选择、育种方案的制定与经济性状评测技术的发展紧密相关,畜禽动物均有较为成熟、系统的经济性状(生产性状)评测体系。而水产动物由于种类繁多、习性各异,除鱼类外,还没有建立起较为完备的经济性状评测指标体系;近年来,由于水产动物育种目标从单纯的生长性状育种向品质、抗逆育种的转变,水产动物经济性状测评和指标体系建立的工作任务更加艰巨。由于海参、海胆年龄确定困难、应激排脏、离水后吐水和身体伸缩变形等特点,其性状测量更为困难。目前,开展的相关工作有 Chang 等(2012)通过对刺参野生、养殖、杂交 3 个群体的鲜活、水煮和干燥标本进行研究,首次建立了准确测定刺参鲜活、水煮以及干燥状态下,刺参棘刺数目的估算标准,即 $P/L \geq 0.05$ (P : 棘刺长度; L : 体长);魏杰等(2007)开发了一种能准确测量活体刺参体长的方法,即利用浓度为 0.5~0.6 mol/L 的 $MgSO_4$ 溶液浸泡海参 1.5~2 h 使之达到不化皮、不吐肠的稳定状态后,可测得活体刺参自然伸长的长度,且微流水刺激 5~6 h 后,海参

即可恢复正常运动、摄食。

近年来,近红外光谱(Near infrared spectroscopy, NIR)被广泛应用于水产品多糖、蛋白质、脂肪、锌、硒和灰分等成分检测当中。相较于其他水产品快速检测方法, NIR 技术有重现性好、效率高、成本低、测试简单、分析快速、样品无破坏性等特点;分析过程无污染,对测试人员要求不高,可在线检测等优点(蓝蔚青等, 2017)。目前,近红外光谱技术逐渐成为应用广泛的无损快速检测技术之一,已被应用在棘皮动物的品质鉴定中。王卫军等(2015)以 94 份具有代表性的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)鲜样组织样本的近红外数据和其对应的化学真实值数据为基础,研究了 NIR 技术预测长牡蛎鲜样组织中水分、糖原、总蛋白质、总脂肪、锌、硒、牛磺酸和灰分 8 种成分含量的可行性。李尚俊(2017)利用便携式近红外光谱仪和傅里叶变换式近红外光谱仪分别对刺参多糖、蛋白质、脂肪、灰分、皂苷、锌和硒 7 种肉质品质成分进行测量及建模。结果显示,根据各参数指标判断便携式近红外光谱仪扫描的光谱测量结果,多糖和蛋白质建模可行,各决定系数(R^2)均大于 0.8,验证集标准差与预测标准差之比(RPD)分别为 2.67 和 2.99,灰分各 R^2 均大于等于 0.9, RPD=3.21>3,表明模型建立良好,可进行含量预测。傅里叶变换式近红外光谱仪对相同样品进行扫描、建模,结果表明,蛋白质各 R^2 均大于 0.85, RPD=2.80,建模可行,但需要进一步的优化,灰分各 R^2 均大于 0.9, RPD=3.26>3,建模效果良好。

当前,代谢组研究为解析水产动物重要经济性状遗传机制提供了有力工具,在代谢物分子遗传参数估计、不同品种(系)的生物标记筛选、代谢分子全基因组关联分析研究(Genome-wide association studies with metaotypes, mGWAS)以及寻找代谢分子与重要经济性状的关系等方面发挥着重要作用。Zhao 等(2020)采用超高效液相色谱质谱分析(UPLCQ-TOF/MS)对辽宁大连、皮口、锦州和山东乳山不同产地海参的体壁代谢物进行了分析,采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和 KEGG 代谢途径分析方法,对不同地理来源的海参的代谢产物进行了评价。结果表明, OPLS-DA 对这 4 个区域海参的体壁代谢物有明显的鉴别作用,差异代谢物主要包括氨基酸和脂类,而 KEGG 代谢途径结果分析表明,脂质代谢、氨基酸代谢和蛋白质代谢与地理来源密切相关。

2.3 经济性状遗传参数测定

遗传参数如遗传力、重复力、遗传相关、近交系

数、亲缘关系等可以反映群体的总体遗传特征。科学合理地利用统计学可准确估计不同遗传背景下重要经济性状的遗传参数,在育种中具有重要的指导作用。

在棘皮动物当中也早已开展遗传参数估计,刺参耳状幼体(初耳、中耳)时期、幼参、成参的生长性状以及刺参重要经济性状已有相关遗传力估计的研究。栾生等(2006)基于全同胞组内相关法估计刺参耳状幼体初、中期体长的遗传力。结果显示,基于刺参耳状幼体体长的加性遗传方差较大,父系半同胞组内相关法计算的狭义遗传力是刺参耳状幼体初、中期体长狭义遗传力的无偏估计值,估计值分别为 0.74 和 0.75。和飞(2016)应用数量遗传学分析和全同胞组内相关法估计了刺参 9 月龄体长、体重和棘刺总数这 3 个生长性状的遗传力。结果显示,9 月龄刺参体长雌性组分、雄性组分和全同胞组分遗传力估计值分别为 0.87、0.8 和 0.86;刺参体重雌性组分、雄性组分和全同胞组分遗传力的估计值分别为 0.20、0.73 和 0.46;棘刺总数雌性组分和雄性组分遗传力的估计值分别为 0.43 和 0.32。李云峰等(2009)对刺参中耳幼体的 27 个全同胞和稚参阶段的 23 个全同胞幼刺参的体长分别进行测量,中耳幼体阶段共测量 81 个个体,稚参阶段共测量 640 个个体,并用 MTDFREML 软件中的混合动物模型对其进行分析,估计刺参早期生长发育的遗传力。结果显示,刺参中耳幼体阶段的体长生长性状遗传力为 0.29,稚参阶段的体长遗传力为 0.49,在刺参的不同发育阶段其体长生长性状的遗传力属于中度遗传力范围,说明刺参的体长生长性状是在加性效应控制下,对刺参进行选择育种具有较大的遗传改良潜力。

海胆幼体、稚海胆及成体生长性状的遗传参数估计(韩奋杰等, 2017; 刘小林等, 2003)及对海胆重要经济性状腺品质的遗传参数估计已被报道(Zhao *et al.*, 2014)。刘小林等(2003)测定虾夷马粪海胆每个母系孵化后 3 月龄和 5 月龄的全同胞幼海胆(40~50 个)后代的体重和壳径,应用数量遗传学原理和半同胞组内相关分析法研究虾夷马粪海胆早期生长发育性状的遗传力。结果显示,3 月龄和 5 月龄海胆体重和壳径的狭义遗传力估计值分别为 0.339~0.523 和 0.316~0.487。分析结果显示,雌性遗传方差组分均显著大于雄性遗传方差组分,雌性遗传方差组分存在显著的母性效应,表明由雄性遗传方差组分估计的遗传力准确可靠,父系半同胞组内相关法计算的狭义遗传力是遗传力的无偏估计值,为海胆选择育种提供了理论指导。Chang 等(2012)构建中间球海胆的选择家系,估

计其生长性状和性腺性状的遗传参数(壳高为 0.24~0.39, 壳径为 0.21~0.48, 体重为 0.16~0.49, 收获期性腺湿重、性腺指数和性腺含水量的遗传力分别为 0.17、0.41 和 0.50), 发现各主要性状具备中度到高度的遗传力, 为中间球海胆选择育种提供了理论指导。韩奋杰等(2017)采用巢式不平衡设计方法, 建立了 44 个中间球海胆全同胞家系, 用于估计中间球海胆幼体及稚海胆生长性状的遗传参数, 采用动物模型和约束性最大似然法(REML)估计中间球海胆幼体和稚海胆生长性状的遗传参数。结果显示, 中间球海胆四腕幼体和八腕幼体体长的遗传力分别为 0.705 ± 0.373 和 0.538 ± 0.444 , 为高度遗传力; 六腕幼体体长和稚海胆壳径的遗传力分别为 $(4.31 \times 10^{-7}) \pm (3.53 \times 10^{-8})$ 和 $(2.97 \times 10^{-7}) \pm (2.38 \times 10^{-8})$, 均接近于 0, 为低度遗传力。因此, 在四腕幼体和八腕幼体时期, 幼体体长具有更好的选育潜力, 而应避免选择六腕幼体和稚海胆时期。

目前, 遗传参数估计可以应用分子标记数据进行估计, 本项目组(大连海洋大学和中国海洋大学团队)对不同地理刺参群体的疣足数量进行重测序全基因组水平的 SNP 遗传力估计, 运用期望最大约束似然法(EM-REML)、平均信息约束似然法(AI-REML)对刺参疣足数量的 SNP 遗传力进行评估。结果显示, $MAF > 0.05$ 时, 在 50 K SNP 基础上均匀抽样不同 SNP 密度的刺参疣足数量, SNP 遗传力估计均值范围为 $(0.566 \pm 0.022) \sim (0.612 \pm 0.003)$; $MAF > 0.1$ 时, SNP 遗传力估计均值范围为 $(0.586 \pm 0.015) \sim (0.615 \pm 0.016)$ 。

3 水产动物育种技术及其在经济棘皮动物中的应用

目前, 杂交育种和选择育种等传统育种技术在海参、海胆新品种培育中仍占主导地位, 随着现代遗传育种理论和生物技术的不断发展和创新, 全基因组选择育种、基因编辑等前沿技术也有尝试和应用, 在今后一段时间内, 海参、海胆育种将在传统育种技术的基础上, 以现代育种技术为补充, 逐步提高育种效率, 实现精准育种。

3.1 杂交育种与杂交优势利用

杂种优势是普遍存在的一种重要生物学现象, 对改良生物的生产性能有重要作用(张国范等, 2004)。第 1 次记载的杂交育种出现于 1760 年(Xu, 2010)。

在海参方面, 农业农村部审定通过的我国海参养殖的第 1 个新品种刺参“水院 1 号”, 其父本为俄罗斯

远东海参, 母本为辽宁大连海域刺参, 经过近 10 年“优中选优”培育而成。该品种有 6 排棘刺, 具有体大、出皮率高、营养价值高、苗种成活率高和生长速度快等优点(Chang *et al.*, 2012)。此外, 我国刺参与其他国家的刺参在杂交育种过程中, 其苗种在生长、存活率及幼体生长速率等方面均表现出明显的杂种优势(胡美燕, 2009; 孙灵毅等, 2013)。

在海胆方面, 丁君(2009)对中国北方地区几种经济海胆的种间杂交和雌核发育进行了研究。杂交子一代在成体生长发育的各项指标中(壳径、壳高、体重、性腺重和性腺指数)均体现出杂种优势, 如虾夷马粪海胆×光棘球海胆组所有性状的杂种优势率均为正值, 范围为 0.32~2.49, 虾夷马粪海胆×紫海胆组的杂种优势率在壳径、壳高、湿重、性腺重和性腺指数方面均为正值, 杂交优势率为 4.00%~49.40%, 具有在生产中应用的潜力。Rahman 等(2005)研究表明, 杂种 F_1 代性腺产量比中亲本提高 45%。

在海参、海胆南方群体与北方群体的杂交中, 获得耐高温、品质优新品种, 是海参、海胆杂交育种的新方向, 但其后代的育性是其需要考虑的重要因素。

3.2 选择育种

选择是育种的基础, 自 20 世纪 70~80 年代起, 群体选育和家系选育已广泛应用于水产生物的遗传育种。1996~2020 年农业农村部审定的 243 个水产新品种中, 有 67 个选育品种是通过群体或家系选育培育而成的。在选择育种技术发展过程中, Henderson (1975)提出的最佳线性无偏预测, 因其能对系统环境误差进行矫正, 得到无偏可稳定遗传的育种值, 在 20 世纪 90 年代开始应用于水产生物遗传育种, 特别是对虾和贝类的遗传育种中广泛应用(常亚青等, 2013)。

孙效文等(2009)研究认为, 开展 DNA 水平的标记辅助育种是科学发展的必然, 既包括育种技术的发展, 从统计学分析, DNA 提供的多位点选择明显优于表型性状提供的少数位点; 又包括基因标记, 它是性状的遗传基础, 从基因或基因组与性状的关系获得的标记是用于选择优良性状最根本的工具。2009 年至今, 基因标记已运用到我国大多数水产养殖动物的种质鉴定和品种选育研究中, 取得了较大进步。董玉等(2016)应用一般线性模型对 46 个 SNP 标记与刺参体重、体长、体宽、体壁重和出肉率性状进行关联研究发现, 8 个 SNP 基因型 BB 与这些生长性状显著相关, 推测基因型 BB 是这些位点的优势基因型。赵欢等(2014)测定定向选育获得的刺参耐高温子一代在高温

下的存活率及热休克蛋白基因表达,从一定程度上验证了高温耐受性的可遗传性,为后续刺参良种培育提供了理论基础。随着生物技术的快速发展以及测序价格的急剧下降,分子标记技术得到快速发展和应用(鲁翠云等,2019)。

利用选择育种的方法,我国先后育成了刺参“崆峒岛1号”、“安源1号”、“参优1号”、“东科1号”、“鲁海1号”等国家审定经济棘皮动物新品种。其中,“参优1号”以抗灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)侵染能力和生长速度作为选育性状,利用群体选育方法构建刺参抗逆选育系,并采用抗病分子标记筛选与验证、抗病功能基因筛选与验证等分子标记辅助选育技术,连续4代培育而成。“参优1号”在6月龄时,灿烂弧菌侵染后成活率提高了11.68%,显著提高抗化皮病的能力;生长速度快,池塘养殖收获时的平均体重相比未经选育群体提高了38.75%(丁君等,2020)。

在海胆方面,我国以大连旅顺、大连凌水和山东荣成3个中间球海胆养殖群体构建基础群体,以体重、壳径和生殖腺颜色为选育指标,采用群体选育辅以家系选育技术,经连续4代选育,培育出中间球海胆新品种“大金”。在相同养殖条件下,与未经选育的中间球海胆相比,26月龄平均体重和壳径分别提高31.7%和10.4%,生殖腺饱满、色泽金光(丁君等,2020)。

在基因组选择育种方面,Meuwissen等(2007)基于分子标记辅助育种提出全基因组水平的选择育种技术。目前,水产动物全基因组选择育种技术处于形成发展期,通过搭建贝类全基因组选择育种分析评估系统(Jiao et al, 2014; Li et al, 2015),培育出新品种栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)“蓬莱红2号”、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)“海益丰12”。李富花等(2020)发明了一种提高水产动物全基因组选择育种效率的方法,即通过SNP分型和表型数据进行GWAS分析,获得每个SNP的P值并按从大到小的排序,选择排序靠前的最优标记组合对育种群体和下一代育种群体进行SNP分型,通过GBLUP、BayesB、ssGBLUP等方法预测基因组育种值,并从高到低进行个体选择,此方法应用于对虾体重性状和大西洋鲑(*Salmo salar*)抗病性状的全基因组选择分析,发现最优标记组合能显著提高全基因组选择的准确率。

新品种的培育将会给水产产业带来巨大的社会效益和经济效益,随着水产育种新技术的开发与应用,海参、海胆选择育种将向着多种方式有机融合的方向发展。

3.3 细胞工程育种技术

细胞工程育种是当今生命科学最前沿的生物技术之一。细胞工程是在细胞水平上进行遗传操作与加工,定向改变或创造新的物种,或创造具有新遗传特征细胞的技术(陈立侨,1997)。细胞工程育种技术包括核移植(核质杂交)、雌(雄)核发育和多倍体育种技术等。

多倍体育种技术是通过增加染色体组的方法来改造生物的遗传基础,培育出符合人们需要的优良品种,养殖实践发现,人工多倍体水产动物通常具有生长速度快、个体大、抗逆性强、不造成种质资源污染的特点,已在生产中广泛应用。目前,多倍体水产动物育种工作(即细胞工程育种)仍是水产经济动物种质改良的重要途径和研究热点(宋灿等,2012),该技术在鱼类和贝类中研究较多,而针对棘皮动物的研究较少。刘筠等(2003)培育出三倍体“湘云鲫”和“湘云鲤”新品种。阙华勇等(2005)培育出牡蛎四倍体。武祥伟等(2019)研究表明,通过四倍体与二倍体杂交产生的三倍体牡蛎生长性状优势明显、糖原含量丰富,并在美国和中国进行商业化生产,现已占据美国市场的70%。

药物诱导和静水压诱导多倍体技术已运用于刺参和海胆,并取得了成功。常亚青等(2002)和Ding等(2007)研究发现,CB与6-DMAP均可诱导刺参产生三倍体和四倍体,采用CB抑制PBI诱导,到达小耳幼体时,可产生9.7%~21.3%的四倍体;6-DMAP抑制PBI诱导三倍体,三倍体诱导率介于7.5%~58%之间。此外,常亚青等(2005)首次将静水压诱导多倍体技术运用在刺参上,并取得了成功。丁君等(2019)优化了静水压诱导刺参三倍体条件,刺参囊胚期三倍化率达到80%以上。

在海胆多倍体诱导方面,常亚青等(2008)已将静水压诱导多倍体技术运用在海胆上,已经成功获得了中间球海胆四倍体胚胎及发育至四腕时期的幼体,于16℃水温下,提前染色分离时间为12 min,60 MPa下静水压处理9 min的最佳诱导条件下,获得四倍体胚胎,取得91.5%的平均倍化率。研究发现,与二倍体比较,四倍体发育时间显著较慢,各期幼体的个体均显著较小,在发育至四腕幼体时,四倍体死亡率高达50%以上,发育至六腕幼体时,四倍体全部死亡,存活率显著低于二倍体。

在海胆雌核发育研究方面,丁君等(2004)采用不同剂量(30~330 mJ/cm²)的紫外线对中间球海胆精子进行照射失活,获得了雌核发育的单倍体胚胎,受精

卵早期和早期囊胚的单倍体率分别达 98.2% 和 70%，但后续研究显示，照射组受精卵发育至破膜囊胚后，出现了大量畸形，27 h 后死亡率达 98%。这可能是由于水产动物中存在较多的隐性致死或有害基因，因而诱发的雌核发育二倍体存活率很低，同时，经紫外线照射的精子本身虽不能参与细胞分裂，但精核仍残留在卵内，对卵的正常发育产生不利的影 响，从而使胚胎生存率降低。曹学彬等(2008)采用紫外线照射使马粪海胆精子遗传失活，用热休克抑制第 1 次卵裂获得雌核发育二倍体。结果表明，热休克法抑制第 1 次卵裂不仅降低了胚胎的畸形率，还提高了胚胎上浮率。

目前在核移植方面，鱼类的研究最为成功(童第周等, 1963)。而针对棘皮动物的核移植技术运用未有报导，具有极大研究空间。

3.4 基于全基因组信息及分子设计等前选育种技术

3.4.1 全基因组关联分析 GWAS 先对研究对象 SNP 标记进行检测，获得基因型，进而将基因型与表型性状进行群体水平统计分析，根据显著性 P 值筛选出与目标性状相关联的候选基因或基因区域(Gajardo *et al*, 2015)。GWAS 要比传统 QTL 法有优势，其具有较高的复杂性状相关基因定位效率。近年来，这种方法在动植物重要经济性状主效基因的筛查和鉴定中得到了广泛应用(Carole *et al*, 2008; Charlier *et al*, 2016)。

与植物、脊椎动物相比较，水产动物的 GWAS 研究起步相对较晚，关于 GWAS 应用的报道较少。Sodeland 等(2013)应用 GWAS 技术对大西洋鲑鱼肉脂肪含量和硬度进行分析。结果发现，影响脂肪含量遗传变异的染色体是 9 号和 10 号，影响鱼肉硬度遗传变异的染色体是 3 号和 11 号。Shi 等(2020)利用 QTL 定位和 GWAS 对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)营养成分分析，确定了 5 个参与脂肪酸代谢的基因，并深入挖掘到了 6 个与肉质相关的基因，为后续选择育种提供了资源。Wang 等(2020)通过 GWAS 鉴定了与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长相关的 SNP，并发现了 1 个调节生长的新基因 *LvMMD2*。

目前，大连海洋大学与中国海洋大学正联合开展水产动物 GWAS 研究。虽然，GWAS 技术已经应用到水产育种工作中，但大部分研究还停留在寻找与目的性状相关的 SNPs 位点/候选区间/候选基因上，只有极少数研究对所获得的目的基因进行过实验验证。在后续的研究中，更多经济水产动物的全基因组测序将完成，在已完成基础群体构建、遗传力等参数固定的情况下，扩大选育群体的规模并结合重测序开展

GWAS 分析，可能是未来经济棘皮物种遗传育种的主要途径之一。

3.4.2 基因编辑 基因编辑是在基因组水平对基因片段进行插入、敲除、替换或修饰等，能高效、定向地编辑目的基因。主要方法有锌指蛋白核酸酶技术(Zinc-finger nuclease, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶技术(Transcription activator-like effector, TALENs)和 CRISPR/Cas9 技术(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein-9 nuclease)等。基因编辑技术作为现下最热门的研究领域之一，在水产养殖业中得到快速发展。Doyon 等(2008)首次利用 ZFN 技术在斑马鱼(*Danio rerio*)中进行基因敲除，得到了 *ntl*、*slc24a5*、*kdrl* 基因的突变体，构建了斑马鱼的基因敲除品系。Hwang 等(2013)利用 CRISPR 技术实现了对斑马鱼 *fh* 基因的敲除；周运迪等(2019)利用 CRISPR 技术建立了青鳉(*Oryzias latipes*) *foxl2* 基因缺失的突变体，表明 *foxl2* 对维持青鳉性腺功能有重要作用。迄今，CRISPR 技术已在许多水产养殖物种中建立了应用，如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大型蚤(*Daphnia magna*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、太平洋牡蛎、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)等(Kim *et al*, 2019; Nakanishi *et al*, 2014; Gui *et al*, 2016; Yu *et al*, 2019; Sasaki *et al*, 2014; Nymark *et al*, 2016)。

CRISPR 技术也应用于模式生物海胆中。Lin 等(2017)将 CRISPR/Cas9 系统应用于海胆胚胎，针对 *Nodal* 基因设计了 6 个引导 RNA (gRNA)，发现其中 5 个 gRNA 在 60%~80% 的注射胚胎中诱导了预期的表型，同时，还开发了 1 种从单个胚胎中分离基因组 DNA 的简单方法。Liu 等(2019)通过 CRISPR/Cas9 系统，敲除海胆中的 *Pks1* 基因，成功诱导出白化病海胆成体，并存活 1 年。这些研究成果有望加快 CRISPR/Cas9 系统在海胆胚胎基因组编辑和分子育种中的应用。

随着海洋生物基因组研究的快速发展，CRISPR 技术也为海洋生物，特别是水产养殖领域的研究带来了前所未有的机遇，今后可重点在提高繁育效率、生长速度、抗逆性和抗病性等方面开展。

3.4.3 基因转移与转基因技术 转基因技术主要是将外源基因或体外重组基因转移到受精卵中，使其在动物体内整合和表达，产生具有新的遗传特征或性状的动物。将外源基因导入的方法有很多种，如基因枪法、显微注射法、电穿孔法、精子介导基因转移法、化学诱导法和病毒转染法等。

转基因技术在水产中的应用多见于转基因鱼，

Zhu 等(1985)首次获得了转基因金鱼, 随后率先在世界上开展了鱼类生长激素转移研究, 获得了生长快、产量高的“超级鱼”, 建立了世界上首例转基因鱼模型(Zhu *et al.*, 1986; 朱作言等, 1989; 崔宗斌等, 1995)。转生长激素鱼促生长效应明显, 可望为水产养殖业带来巨大的经济效益。国内外也有很多学者聚焦于抗性基因的转移, 提高鱼类抗寒和抗病性等, 使鱼类更好的适应环境, 在逆境中生长(Assem *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2001、2002; Blake *et al.*, 2016)。

转基因技术在无脊椎动物中的应用越来越多, 同样集中在提高生长速度和抗逆性方面。在虾蟹和贝类方面, 刘萍等(1996)将生长激素基因导入中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)受精卵中, 获得了转基因虾。刘志毅(2000)首次采用基因枪法将 GFP 基因转入中国对虾受精卵中并表达。Piera 等(2004)分别采用显微注射、电穿孔和转染试剂 3 种方法将外源基因转入凡纳滨对虾中, 发现用 DNA/jetPEI 复合物转染处理效率最高。刘向宇等(2000)以精子为载体将 GCHV (Hemorrhagic virus of grass carp)基因导入中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 作为蟹类转基因的初步研究。Powers 等(1995)首次将生长激素基因转入红鲍(*Haliotis rufescens*)中, 打开了贝类转基因的研究大门。随后又将外源基因导入了白蛤(*Mulina lateralis*)、太平洋牡蛎、大珍珠母贝(*Pinctada maxima*)、合浦珠母贝(*Pteria martensii*)等贝类中并得到了表达(Lu *et al.*, 1996; Cadoret *et al.*, 1997; 胡炜等, 2000; 喻达辉等, 2005)。

McMahon 等(1985)首次利用显微注射法将构建的氨基糖苷 3'磷酸转移酶的 DNA 序列连接到载体, 构建 *piSA* 质粒, 并导入紫海胆卵细胞, 进行体外受精培育, 发现外源基因在海胆整个胚胎发育时期均有表达, 此研究在海胆胚胎转基因技术研究领域迈出了第 1 步, 为后续海胆转基因的深入研究提供了方法和技术参考。海胆作为模式生物, 通过转基因技术, 可将报告基因转入海胆幼体中, 进而阐明特定基因的转录过程, 构建基因调控网络(Rast, 2000; Buckley *et al.*, 2018)。目前, 转基因技术在海参、海胆育种中还未有成功报道。

3.4.4 性别控制技术 自然界中有很多物种的雌雄个体间的形态、颜色或行为等方面存在显著差异, 呈现出“性别二态性”。大量研究发现, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)等品种雄鱼的生长速度显著快于雌鱼(Beardmore *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010; Simco *et al.*, 1989); 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆、圆斑星鲽(*Verasper*

variegatus)等鱼类的雌性个体比雄性大(陈松林, 2013; Bye *et al.*, 1986; Yoneda *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010); 对虾的性别二态性明显, 成年雌虾体重明显大于雄虾(张乃禹, 1985)。通过对生物性别控制, 可加快育种进程, 培育单性品种, 提高经济效益。性别控制技术是指在动物正常繁育生殖过程中, 通过人为干预, 控制成年的雌性动物下一代性别的生物技术。性别控制育种在鱼类等水产养殖动物中应用广泛, 主要技术方法包括种间杂交、人工诱导雌(雄)核发育、三倍体诱导不育群体、外源激素刺激和温度控制。

目前, 性别控制技术已经广泛应用于生产中, 由于海参、海胆不存在性别二态性, 因此, 刺参、海胆性别控制技术报道较少。但在种参培育过程中, 雌参的需求量大于雄参, 如提前预知种参的性别, 则可节约育种成本。陈廷等(2020a、b)报道了鉴别糙海参卵巢发育期雌参个体的方法, 研究了小疣刺参促排卵短肽及其编码基因与应用。Pereira 等(2018)通过基因组和微卫星分析, 在 *Hgr15607* 基因座上, 观察到雌、雄刺参频率分布差异。Láruson 等(2018)通过对雌、雄白棘三列海胆(*Tripneustes gratilla*)组织表达谱分析发现, Sox 家族在雌、雄海胆中表达有差异, 其中, 雄性中的 *SoxH* 基因表达显著高于雌性, 在哺乳动物中, *SoxH* 也参与了雄性生殖细胞的分化。同时发现, *Wnt-4* 基因仅在雄性海胆中存在, 也参与了哺乳动物发育早期雄性化的抑制, 在幼体和成体中被恢复, 因此推断, *Wnt-4* 基因在海胆中可能没有抑制雄性化的作用, 只是在雄性性腺中发挥作用。

4 展望

进入 21 世纪后, 水产养殖对世界水产品供应的重要性已在发达国家达成共识, 海参和海胆是重要的水产养殖动物, 刺参养殖是辽宁省和山东省水产养殖的支柱产业。如何保证刺参和海胆等海珍品产业高效、健康发展, 是应对新时代水产养殖大变革需要回答的问题。以下是对刺参和海胆养殖业的几点思考和建议:

4.1 高度重视海参、海胆种质资源保护

水产种质资源是良种创制、增殖生产和渔业科技发展的物质基础。目前, 世界范围内现存棘皮类动物 6000 余种, 我国约有 500 余种, 其中, 种质资源开发利用存在诸多问题, 如已被开发利用的海参不足 20 种、海胆 6~8 种, 已开展种质评价的种类不足 10 种; 目前, 棘皮动物中仅有刺参、中间球海胆可

进行规模化全人工养殖;药用棘皮类动物具有较大市场需求,但开发利用不足;我国南海暖水性海参和海胆资源丰富,但目前尚没有确切分布名录,且近几年种类和数量呈较快下降趋势,其中,海参已被世界自然保护联盟收入濒危物种红色名录;此外,无序的刺参、海胆苗种交流使现有品种(系)种质退化、生长速度下降,抗逆性降低。针对上述情况,应加强海参、海胆种质资源分布、鉴定、评价、种质保存工作,特别是原种场和良种场建设亟待加强,为海参、海胆种质创新提供物质保障。

4.2 加速海参、海胆遗传育种应用基础研究

近10年来,海参、海胆遗传育种应用基础取得长足进步,刺参、海胆全基因组测序和高密度遗传连锁图谱的完成,为下一步全基因组关联分析和分子标记辅助育种(QTL定位)奠定了基础。但较鱼、虾、贝等而言,刺参、海胆遗传育种应用基础研究依旧薄弱,下一步工作将重点解析海参、海胆重要经济性状的遗传基础,挖掘其中与经济性状相关的分子遗传标记、功能基因、调控原件和优异等位基因变异等,并将鉴定出的有育种价值的功能基因和遗传标记,应用于育种。

4.3 “引种制宜”,创新、集成海参、海胆育种技术(模式)

作为被广泛认知的海珍品,海参、海胆育种目标应不仅局限在生长性状,重点应考虑海参胶原蛋白、酸性粘多糖、皂甙,海胆高不饱和脂肪酸含量等品质性状。同时,应对近年来北方夏季频发的极端天气以及随之而来的海参、海胆病害频发,应关注海参、海胆耐高温、耐低盐以及抗病品种的研发。在育种技术选择方面,针对海参、海胆的繁殖习性和养殖特点,规模化群选结合分子标记辅助育种是目前海参、海胆效率较高的育种方式。概括而言,在育种过程中要“因种制宜”,在传统育种技术基础上,创新、集成育种技术(模式),并研发新品种、规模化繁育和配套养殖技术,培育出满足市场需求、有显示度的海参、海胆优良品种。

4.4 推进海参、海胆种业“育繁推一体化建设”

海参、海胆种业的发展必然要依托“育繁推一体化”建设。这就要求海参、海胆种业相关机构有研发和生产新品种的能力,有向市场推广销售的能力。下一步,产学研单位将通过加强国际、国内交流合作,加强种业信息服务平台建设,推进物联网技术应用,

加大种业企业品种、品牌宣传力度,有序推进海参、海胆种业“育繁推一体化建设”。

参 考 文 献

- Assem SS, El-Zaeem SY. Application of biotechnology in fish breeding. II: Production of highly immune genetically modified redbelly tilapia, *Tilapia zillii*. African Journal of Biotechnology, 2005, 4(5): 449-459
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. Aquaculture, 2001, 197(1-4): 283-301
- Blake A, Crockett R, Nasevicius A. Purple transgenic fluorescent ornamental fish. 2016, United States Patent, 8581023
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, et al. Aquaculture: Global status and trends. Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences, 2010, 365(1554): 2897-2912
- Buckley KM, Dong P, Cameron RA, et al. Bacterial artificial chromosomes as recombinant reporter constructs to investigate gene expression and regulation in echinoderms. Briefings in Functional Genomics, 2018, 17(5): 362-371
- Bye VJ, Lincoln RF. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture, 1986, 57(1-4): 299-309
- Cadoret JP, Boulo V, Gendreau S, et al. Promoters from *Drosophila* heat shock protein and Cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. Journal of Biotechnology, 1997, 56(3): 183-189
- Cao XB, Ding J, Chang YQ. The early embryonic development and the cytological observation of gynogenesis in sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* artificially induced. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(1): 1-7 [曹学彬, 丁君, 常亚青. 人工诱导马粪海胆雌核发育的早期胚胎发育及细胞学观察. 大连水产学院学报, 2008, 23(1): 1-7]
- Carole C, Wouter C, Frédéric R, et al. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. Nature Genetics, 2008, 40(4): 449-454
- Chang YQ, Ding J, Song J, et al. Triploid induction of *Apostichopus japonicus* by hydrostatic pressure. China: CN1586190, 2005-03-02 [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 静水压诱导刺参三倍体的方法. 中国: CN1586190, 2005-03-02]
- Chang YQ, Ding J, Xu YH, et al. SLAF-based high-density genetic map construction and QTL mapping for major economic traits in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Scientific Reports, 2018, 8(1): 820
- Chang YQ, Shi SB, Zhao C, et al. Characteristics of papillae in wild, cultivated and hybrid sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). African Journal of Biotechnology, 2011, 10(63): 13780-13788
- Chang YQ, Tian Y, Zhang WJ. Progress of mariculture biological

- genetic breeding technology in China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(6): 8–15 [常亚青, 田焱, 张伟杰. 我国海洋水产生物遗传育种技术进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 8–15]
- Chang YQ, Xiang JH. Inducement of polyploidy sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Liao). *Journal of Dalian Fisheries University*, 2002, 17(1): 1–7 [常亚青, 相建海. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 多倍体诱导的初步研究. *大连水产学院学报*, 2002, 17(1): 1–7]
- Chang YQ, Yu MZ, Cao XB, *et al.* Induction and cultivation of tetraploid sea urchin. China: CN101103707, 2008-01-16 [常亚青, 于明治, 曹学彬, 等. 海胆四倍体苗种的诱导和培育方法. 中国: CN101103707, 2008-01-16]
- Chang YQ, Zhang WJ, Zhao C, *et al.* Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and gonad traits in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture Research*, 2012, 43(2): 271–280
- Charlier C, Li WB, Harland C, *et al.* NGS-based reverse genetic screen for common embryonic lethal mutations compromising fertility in livestock. *Genome Research*, 2016, 26(10): 1333–1341
- Chen LQ. Cell engineering and aquatic animal breeding. *World Science*, 1997(5): 31–33 [陈立侨. 细胞工程与水产动物育种. *世界科学*, 1997(5): 31–33]
- Chen SL. Fish sex control and cell engineering breeding. Beijing: Science Press, 2013 [陈松林. 鱼类性别控制与细胞工程育种. 北京: 科学出版社, 2013]
- Chen T, Ren CH, Hu CQ, *et al.* A method for identifying female individuals of *Stichopus horrens* during ovarian development. China: CN110720413A, 2020-01-24 [陈廷, 任春华, 胡超群, 等. 一种鉴别糙海参卵巢发育期雌参个体的方法. 中国: CN110720413A, 2020-01-24]
- Chen T, Ren CH, Wu FF, *et al.* Short peptide and its coding gene and application in sea cucumber *Stichopus monotuberculatus*. China: CN110845592A, 2020-02-28 [陈廷, 任春华, 吴菲菲, 等. 小疣刺参促排卵短肽及其编码基因与应用. 中国: CN110845592A, 2020-02-28]
- Conand C, Byrne M. A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. *Marine Fisheries Review*, 1993, 55(4): 1–13
- Cui ZB, Zhu ZY, Cui YB, *et al.* Feeding and metabolism of red carp (*Cyprinus carpio*) transferred with growth hormone gene. *Chinese Science Bulletin*, 1995, 40(16): 1514–1517 [崔宗斌, 朱作言, 崔奕波, 等. 转人生长激素基因红鲤 F₂ 代阳性鱼的摄食及代谢研究. *科学通报*, 1995, 40(16): 1514–1517]
- Ding J, Chang YQ, Cao XB, *et al.* The embryonic development in gynogenesis monoploid in sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*). *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(1): 10–15 [丁君, 常亚青, 曹学彬, 等. 中间球海胆雌核发育单倍体胚胎的初步研究. *大连水产学院学报*, 2004, 19(1): 10–15]
- Ding J, Chang YQ, Wang ZC, *et al.* Polyploidy induction by hydrostatic pressure shock and embryo development of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2007, 25(2): 184–190
- Ding J, Chang YQ. Research progress in conservation and utilization of economic echinoderm. A review. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(5): 645–656 [丁君, 常亚青. 经济棘皮动物种质资源保护与利用研究进展. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(5): 645–656]
- Ding J, Li RL, Chang YQ, *et al.* Isolation of microsatellite markers and genetic diversity analysis in 3 cultured populations of sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*). *Journal of Molecular Science*, 2008, 24(3): 173–179 [丁君, 李润玲, 常亚青, 等. 虾夷马粪海胆微卫星标记制备及对 3 个养殖群体的遗传多样性分析. *分子科学学报*, 2008, 24(3): 173–179]
- Ding J. Research of interspecific cross and gynogenesis in several kinds of economic sea urchin. Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2008 [丁君. 几种经济海胆的种间杂交和雌核发育研究. 大连理工大学博士研究生学位论文, 2008]
- Dong Y, Li Q. Correlation analysis between SNPs and growth traits of *Apostichopus japonicas*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(2): 49–58 [董玉, 李琪. 刺参 SNP 标记与生长性状的关联分析. *海洋湖沼通报*, 2016(2): 49–58]
- Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(6): 702–708
- Du JY. Natural resources, culture and problems of sea urchins of China. *Science Paper Online*, 2005(11): 1409–1429 [杜俊义. 我国海胆自然资源、养殖状况及存在问题. *中国科技论文在线*, 2005(11): 1409–1429]
- Gajardo HA, Wittkop B, Soto-Cerda B, *et al.* Association mapping of seed quality traits in *Brassica napus* L. using GWAS and candidate QTL approaches. *Molecular Breeding*, 2015, 35(6): 1–19
- Gong Z, Ju B, Wan H. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica*, 2001, 111(1–3): 213–225
- Gong ZY, Ju BS, Wang XK, *et al.* Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from *Keratin8*. *Developmental Dynamics*, 2002, 223(2): 204–215
- Gui TS, Zhang JQ, Song FG, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing and mutagenesis of EcChi4 in *Exopalaemon carinicauda*. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2016, 6(11): 3757–3764
- Han FJ, Zhang WJ, Qing YB, *et al.* Estimates of genetic parameters for growth traits in larval and juvenile sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(2): 145–149 [韩奋杰, 张伟杰, 秦宇

- 博, 等. 中间球海胆幼体及稚海胆生长性状的遗传参数估计. 大连海洋大学学报, 2017, 32(2): 145–149]
- He F. Estimation of the heritability of important economic traits and construction of high density genetic linkage map for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [和飞. 刺参(*Apostichopus japonicus*)重要经济性状遗传力估计及高密度遗传连锁图谱的构建. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Henderson CR. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 1975, 31(2):423–447
- Hu MY. Studies on intraspecific hybridization and effects of environmental factors on growth and survival of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. Master's Thesis of Ocean University of China, 2009 [胡美燕. 刺参的种群杂交及环境因子对稚参生长与存活的影响研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Hu W, Yu DH, Wang YP, *et al.* Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of *Pinctada maxima* (Jameson). *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000(2): 165–168 [胡炜, 喻达辉, 汪亚平, 等. 大珠母贝精子介导外源基因转移研究. 生物工程学报, 2000(2): 165–168]
- Hwang WY, Fu YF, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 227–229
- Jiang J, Yang BL, Tai Y. Studies on resources and bioactive substances of sea cucumber. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 537–540 [姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 537–540]
- Jiao W, Fu X, Dou J, *et al.* High-resolution linkage and quantitative trait locus mapping aided by genome survey sequencing: Building up an integrative genomic framework for a bivalve mollusc. *DNA Research*, 2014, 21(1): 85–101
- Kim J, Cho JY, Kim JW, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated myostatin disruption enhances muscle mass in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2019, 512: 734336
- Kinjo S, Kiyomoto M, Yamamoto T, *et al.* HpBase: A genome database of a sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Development, Growth and Differentiation*, 2018, 60(3): 174–182
- Lan WQ, Zhang NN, Liu SC, *et al.* Research progress in the application of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for detection of aquatic products. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2017, 37(11): 3399–3403 [蓝蔚青, 张楠楠, 刘书成, 等. 近红外光谱技术在水产品检测中的应用研究进展. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(11): 3399–3403]
- Láruson ÁJ, Coppard SE, Pespenti MH, *et al.* Gene expression across tissues, sex, and life stages in the sea urchin *Tripneustes gratilla* [Toxopneustidae, Odontophora, Camarodonta]. *Marine Genomics*, 2018, 41: 12–18
- Li FH, Yu Y, Luo Z, *et al.* A method to improve the efficiency of whole genome selection breeding of aquatic animals. China: CN110867208A, 2020-03-06 [李富花, 于洋, 罗正, 等. 一种提高水产动物全基因组选择育种效率的方法. 中国: CN110867208A, 2020-03-06]
- Li H, Wang J, Bao Z. A novel genomic selection method combining GBLUP and LASSO. *Genetica*, 2015, 143(3): 299–304
- Li Q, Chen L, Kong L. A genetic linkage map of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), based on AFLP and microsatellite markers. *Animal Genetics*, 2009, 40(5): 678–685
- Li SJ. Establishment of near infrared models of a variety of components determination in sea cucumbers *Apostichopus japonicus* Selenka. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [李尚俊. 仿刺参多种成分含量近红外模型的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Li YF, Chang YQ, Tian Y, *et al.* Heritability of early growth traits in larval and juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(1): 30–33 [李云峰, 常亚青, 田焱, 等. 仿刺参耳状幼体和稚参阶段的体长遗传力估计. 大连水产学院学报, 2009, 24(1): 30–33]
- Li YL, Wang RJ, Xun XG, *et al.* Sea cucumber genome provides insights into saponin biosynthesis and aestivation regulation. *Cell Discovery*, 2018, 4: 29
- Liao MJ, Wang JJ, Li B, *et al.* Genetic diversity analysis and fingerprint construction for different geographical populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on SSR markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 165–176 [廖梅杰, 王锦锦, 李彬, 等. 基于 SSR 标记的刺参不同地理群体的遗传结构分析及指纹图谱构建. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 165–176]
- Lin CY, Su YH. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Developmental Biology*, 2016, 409(2): 420–428
- Liu AR, Liao MJ, Li B, *et al.* Validation of SNPs associated with important economic traits of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 101–109 [刘安然, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)重要经济性状相关 SNP 标记的验证分析. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 101–109]
- Liu DM, Awazu A, Sakuma T, *et al.* Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system. *Development, Growth and Differentiation*, 2019, 61(6): 378–388
- Liu P, Kong J, Wang QY, *et al.* The studies on the fertilized egg of *Penaeus chinensis* with microinjection of the growth hormone gene. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1996, 3(4): 36–39 [刘萍, 孔杰, 王清印, 等. 显微注射生长激素基因导入中国对虾(*Penaeus chinensis*)受精卵的研究. 中国水产科学, 1996, 3(4): 36–39]
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Heritability of juvenile growth for the sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*.

- Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(3): 206–211 [刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 虾夷马粪海胆早期生长发育的遗传力估计. 中国水产科学, 2003, 10(3): 206–211]
- Liu XY, Wang TH, Zhang Q, *et al.* Preliminary study on sperm as vector for introducing foreign DNA into Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(2): 194–196 [刘向宇, 王铁辉, 张菁, 等. 以精子为载体把外源 DNA 导入中华绒螯蟹的初步研究. 水生生物学报, 2002, 26(2): 194–196]
- Liu Y, Liu SJ, Sun YD, *et al.* Ployploid hybrids of crucian carp × common carp. Review of China Agricultural Science and Technology, 2003, 5(6): 3–6 [刘筠, 刘少军, 孙远东, 等. 多倍体鲫鱼. 中国农业科技导报, 2003, 5(6): 3–6]
- Lu C, Bao ZM, Peng W, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by screening the SSR-enriched library. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(S): 137–141 [卢超, 包振民, 彭薇, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选仿刺参微卫星标记. 中国海洋大学学报, 2010, 40(S): 137–141]
- Lu CY, Kuang YY, Zheng XH, *et al.* Advances of molecular marker-assisted breeding for aquatic species. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 38–53 [鲁翠云, 匡友谊, 郑先虎, 等. 水产动物分子标记辅助育种研究进展. 水产学报, 2019, 43(1): 38–53]
- Lu JK, Chen TT, Allen SK, *et al.* Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(8): 3482–3486
- Luan S, Sun HL, Kong J. Heritability of auricularia larval body length for sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 378–383 [栾生, 孙慧玲, 孔杰. 刺参耳状幼体体长遗传力的估计. 中国水产科学, 2006, 13(3): 378–383]
- Ma HY, Chen SL, Yang JF, *et al.* Isolation of sex-specific AFLP markers in spotted halibut (*Verasper variegatus*). Environmental Biology of Fishes, 2010, 88(1): 9–14
- Massin C, Mercier A, Hamel JF. Ossicle change in *Holothuria scabra* with a discussion of ossicle evolution within the Holothuriidae (Echinodermata). Acta Zoologica, 2000, 81(1): 77–91
- McMahon AP, Flytzanis CN, Hough-Evans BR, *et al.* Introduction of cloned DNA into sea urchin egg cytoplasm: Replication and persistence during embryogenesis. Developmental Biology, 1985, 108(2): 420–430
- Meuwissen T. Genomic selection: Marker assisted selection on a genome wide scale. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2007, 124(6): 321–322
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook. Beijing: China Agricultural Press, 2019 [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. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- Mushegian A, Arnone MI, Sodergren E, *et al.* The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science, 2006, 314(5801): 941–952
- Nakanishi T, Kato Y, Matsuura T, *et al.* CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. PLoS One, 2014, 9(5): e98363
- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, *et al.* A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. Scientific Reports, 2016, 6(1): 24951
- Pereira, VA, Forte JM, Arruda-Júnior JP, *et al.* Identification and characterization of microsatellite loci in west Atlantic sea cucumber *Holothuria grisea* (Selenka 1867). Journal of Genetics, 2018, 97(5): 1363–1369
- Piera SS, Nel CV, Fernanda ROC, *et al.* Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Aquaculture, 2004, 243(1–4): 19–26
- Powers DA, Kirby VL, Cole T, *et al.* Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1995, 4(4): 369–375
- Que HY, Guo XM, Zhang GF, *et al.* Tetraploids induced by inhibiting polar body I with cytochalasin B in Jinjiang oyster, *Crassostrea rivularis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(5): 437–444 [阙华勇, 郭希明, 张国范, 等. 利用细胞松弛素 B 抑制第一极体排放诱导近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*) 四倍体. 海洋与湖沼, 2005, 36(5): 437–444]
- Rahman MA, Uehara T, Lawrence JM. Growth and heterosis of hybrids of two closely related species of Pacific sea urchins (Genus *Echinometra*) in Okinawa. Aquaculture, 2005, 245(1–4): 121–133
- Rast JP. Transgenic manipulation of the sea urchin embryo. Methods in Molecular Biology, 2000, 136: 365–373
- Sasaki H, Yoshida K, Hozumi A, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the ascidian *Ciona intestinalis*. Development, Growth and Differentiation, 2014, 56(7): 499–510
- Sergiev PV, Artemov AA, Prokhortchouk EB, *et al.* Genomes of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus variegatus*: Are there any genomic explanations for the two order of magnitude difference in the lifespan of sea urchins? Aging (Albany NY), 2016, 8(2): 260–271
- Shi RH, Li CY, Qi HG, *et al.* Construction of a high-resolution genetic map of *Crassostrea gigas*: QTL mapping and GWAS applications revealed candidate genes controlling nutritional traits. Aquaculture, 2020, 527: 735427
- Simco BA, Goudie CA, Klar GT, *et al.* Influence of sex on growth of channel catfish. Transactions of the American Fisheries Society, 1989, 118(4): 427–434
- Sodeland M, Gaarder M, Moen T, *et al.* Genome-wide

- association testing reveals quantitative trait loci for fillet texture and fat content in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 2013, 408: 169–174
- Song C, Liu SJ, Xiao J, *et al.* Progress in polyploid organisms research. *Scientia Sinica Vitae*, 2012, 42(3): 173–184 [宋灿, 刘少军, 肖军, 等. 多倍体生物研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42(3): 173–184]
- Sun LY, Zhao Q, Ren LH, *et al.* Crossing and offspring development of sea cucumber *Stichopus japonicus* between Chinese and Korean populations. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(3): 281–286 [孙灵毅, 赵强, 任利华, 等. 中国刺参与韩国红刺参杂交及子代发育特性的研究. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(3): 281–286]
- Sun XW, Lu CY, Jia ZY, *et al.* The progress of molecular marker-based breeding for aquatic species. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 981–990 [孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 等. 水产动物分子育种研究进展. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 981–990]
- Tian M, Li Y, Jing J, *et al.* Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14852
- Tong DZ, Wu SQ, Ye YF, *et al.* Nuclear transfer of fish. *China Scientific Bulletin*, 1963(7): 60–61 [童第周, 吴尚懋, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植. *科学通报*, 1963(7): 60–61]
- Wang D, Mao HL, Chen HX, *et al.* Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations. *Animal Genetics*, 2010, 40(6): 978–981
- Wang Q, Yu Y, Zhang Q, *et al.* The polymorphism of LvMMD2 and its association with growth traits in *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(4): 564–571
- Wang QD, Li ZJ, Gui JF, *et al.* Paradigm changes in freshwater aquaculture practices in China: Moving towards achieving environmental integrity and sustainability. *Ambio*, 2017, 47(4): 410–426
- Wang WJ, Yang JM, Dong YH, *et al.* Establishment of near infrared models of eight components in fresh tissue of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ocean and Limnology*, 2015, 46(4): 845–852 [王卫军, 杨建敏, 董迎辉, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)鲜样组织八种成分含量近红外(NIR)模型的建立. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 845–852]
- Wei J, Chang YQ, Nie ZL, *et al.* The method for measuring the body length of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *China: CN101006922A*. 2007. 01. 25 [魏杰, 常亚青, 聂竹兰, 等. 准确测量活体刺参体长的方法. *中国: CN101006922A*. 2007. 01. 25]
- Wu XW, Zhang YH, Xiao S, *et al.* Heterosis and triploid advantage between Chinese and American populations of Kumamoto oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 465–472 [武祥伟, 张跃环, 肖述, 等. 熊本牡蛎中国群体与美国群体杂交效应及杂交三倍体优势分析. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 465–472]
- Xu YB. Molecular plant breeding. *Field Crops Research*, 2010, 123(2): 183–184
- Yan JJ, Jing J, Mu XY, *et al.* A genetic linkage map of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on microsatellites and SNPs. *Aquaculture*, 2013, 440: 69–71
- Yan JJ, Peng W, Du HX, *et al.* Isolation and characterization of 61 microsatellite markers from sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2(S1): 35–38
- Yao GY, Tan J, Wu YY, *et al.* Genetic analysis of *Argopecten irradians concentricus*, “Bohai Red” and their hybrids. *Progress in Fisheries Science*, 2020, 41(5): 118–126 [姚高友, 谭杰, 吴羽媛, 等. 墨西哥湾扇贝和扇贝“渤海红”及其杂交子代的遗传分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 118–126]
- Yoneda M, Kurita Y, Kitagawa D, *et al.* Age validation and growth variability of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* off the Pacific coast of northern Japan. *Fisheries Science*, 2007, 73(3): 585–592
- Yu DH, Jia XP, Chen SW, *et al.* Optimization of pulse parameters in electroporation of *Pinctada fucata* eggs. *Marine Sciences*, 2005, 29(8): 15–19 [喻达辉, 贾晓平, 陈素文, 等. 合浦珠母贝卵子电击脉冲参数的初步研究. *海洋科学*, 2005, 29(8): 15–19]
- Yu H, Li HJ, Li Q, *et al.* Targeted gene disruption in pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(3): 301–309
- Zhang GF, Liu X, Que HY, *et al.* The theory and application of hybridization and heterosis in marine mollusks. *Marine Sciences*, 2004, 28(7): 54–60 [张国范, 刘晓, 阙华勇, 等. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展. *海洋科学*, 2004, 28(7): 54–60]
- Zhang NY. Mathematical analysis on growth of *Penaeus orientalis kishinouye*. *Marine Sciences*, 1985(4): 1–7 [张乃禹. 中国对虾生长的数理分析. *海洋科学*, 1985(4): 1–7]
- Zhang XJ, Sun LN, Yuan JB, *et al.* The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration. *PLoS Biology*, 2017, 15(10): e2003790
- Zhang XJ, Zhou L, Gui JF. Biotechnological innovation in genetic breeding and sustainable green development in Chinese aquaculture. *Scientia Sinica Vitae*, 2019, 49(1): 1409–1429 [张晓娟, 周莉, 桂建芳. 遗传育种生物技术创新与水产养殖绿色发展. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(11): 1409–1429]
- Zhao C, Sun P, Zhou HS, *et al.* Heritability and phenotypic correlations of gonad sweetness in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture International*, 2014, 22(6): 1737–1742
- Zhao GH, Zhao WF, Han LS, *et al.* Metabolomics analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different geographical origins using UPLC–Q-TOF/MS. *Food Chemistry*, 2020,

- 333: 127453
- Zhao H, Liu SL, Yang HS, *et al.* The study on thermo tolerance of juvenile offspring *Apostichopus japonicus* (Selenka) with directive breeding. *Marine Science*, 2014, 38(9): 1–6 [赵欢, 刘石林, 杨红生, 等. 刺参高温定向选育群体子一代耐温性状的分析. *海洋科学*, 2014, 38(9): 1–6]
- Zhou YD, Wu XX, Zhao HP, *et al.* Generation and phenotype analysis on *foxl2* mutant in Medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(2): 20–30 [周运迪, 吴星星, 赵海萍, 等. 青鳞 *foxl2* 基因敲除突变体的构建与表型分析. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(2): 20–30]
- Zhou ZC, Liu SK, Dong Y, *et al.* High-density genetic mapping with interspecific hybrids of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius*, by RAD Sequencing. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138585
- Zhu Z, Li J, He L, *et al.* Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 1985, 1(1): 31–34
- Zhu ZY, Xu KJ, Li GH, *et al.* Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Science Bulletin*, 1986(14): 988–990
- Zhu ZY, Xu KS, Xie YF, *et al.* Establishment of transgenic fish model. *Scientia Sinica (Chimica)*, 1989(2): 147–155 [朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立. *中国科学(B辑)*, 1989(2): 147–155]

(编辑 马瑾艳)

Application of Germplasm Innovation Technology in Sea Cucumber and Sea Urchin Genetic Breeding

DING Jun¹Ⓐ, HAN Lingshu², CHANG Yaqing¹Ⓐ

(1. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832)

Abstract Along with the development and innovations in genetic engineering and biotechnology, aquaculture breeding has expanded from traditional selective breeding and hybrid breeding to marker-assisted selective breeding, cell engineering breeding, genome-wide genotyping-based selective breeding, molecular design breeding, sex control breeding, gene transfer, gene editing, and other molecular marker-assisted breeding technologies. Although the aquaculture seed industry has advanced, several problems and challenges remain such as the low coverage rate of improved varieties and insufficient research depth. This review provides a detailed analysis of the main advances made in the field of aquaculture technology and summarizes the commercially valuable germplasm resources of echinoderms (sea cucumbers and sea urchins) and their applications. We also propose to the sea cucumber and sea urchin breeding industry to provide a reference for the development of germplasm resources for echinoderms of commercial value and promote the green development of the aquaculture industry.

Key words Germplasm innovation technology; Sea cucumber; Sea urchin; Genetic breeding

Ⓐ Corresponding author: DING Jun, E-mail: dingjun19731119@hotmail.com;
CHANG Yaqing, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201207002

http://www.yykxjz.cn/

刘瑞卿, 何梅琳, 王长海. 微藻饵料在经济棘皮动物养殖中的应用及研究进展. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 17-25

Liu RQ, He ML, Wang CH. Progress in research on application of microalgae bait in echinoderm culture. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 17-25

微藻饵料在经济棘皮动物养殖中的应用及研究进展*



刘瑞卿^{1,2} 何梅琳^{1,2} 王长海^{1,2,3①}

1. 南京农业大学资源与环境科学学院 江苏省海洋生物学重点实验室 南京 210095;
2. 南京农业大学 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心 南京 210095;
3. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005)

摘要 棘皮动物因其富含蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸和其他生理活性物质, 有较高的食用及药用价值, 是我国一类重要的水产经济动物, 需求日益提升, 因此, 发展棘皮动物养殖研究及其产业化十分紧迫。微藻富含蛋白质、碳水化合物、维生素、类胡萝卜素和丰富的多不饱和脂肪酸等营养物质, 在新型水产饲料资源开发中备受关注。微藻作为幼体动物的鲜活饵料, 在促进幼体生长、提高存活率方面显著优于人工饵料, 在棘皮动物养殖中也得到广泛应用。本文对近年来微藻及其生物活性物质在经济棘皮动物(海参和海胆)养殖中的应用及研究进展进行概括总结, 首次围绕微藻在经济棘皮动物生长、发育、变态过程中的作用以及微藻饵料在经济棘皮动物养殖中的应用进行综述, 概括了经济棘皮动物养殖常用微藻种类, 分析了微藻对海参、海胆脂肪酸组成以及免疫功能的影响, 对经济棘皮动物养殖中存在的问题进行探讨并提出建议, 以期为我国海参、海胆养殖业的发展提供参考。

关键词 微藻; 饵料; 海参; 海胆; 变态发育; 不饱和脂肪酸

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0017-09

中国海域棘皮动物种类丰富, 其中, 海参纲(Holothuroidea)、海胆纲(Echinoidea)中许多种类已成为我国主要海产养殖经济物种(表 1)。随着棘皮动物营养价值逐渐被认可, 市场供不应求, 因此, 亟需扩大棘皮动物的养殖范围和规模。棘皮动物养殖期间的死亡率高、生长速度慢、营养品质下降成为限制其产业发展的主要瓶颈, 为满足幼体和成体的营养需求, 优质饵料供应是解决这些问题的关键(Carboni *et al.*, 2012)。海洋动物需要某些必需脂肪酸(EFA), 特别是

n-3 和 n-6 多不饱和脂肪酸(PUFA), 以保证其正常的生长、发育和免疫。已有研究表明, 必需脂肪酸的摄入量能直接影响水产养殖动物幼体的发育和生存(Coutteau *et al.*, 1997; Tocher *et al.*, 2003)。微藻作为鱼、虾、贝类幼体或成体直接或间接的天然饵料, 因其富含蛋白质、脂肪、多糖、维生素、抗氧化物质、色素及微量元素等营养物质, 在新型水产饲料资源开发中备受关注(Abinandan *et al.*, 2015)。其中, 硅藻在棘皮动物(海参和海胆)生长、发育、变态过程中发挥着

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901605)资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901605)]. 刘瑞卿, E-mail: liuruiqing00@outlook.com

① 通讯作者: 王长海, 教授, E-mail: chwang@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-07, 收修改稿日期: 2021-01-11

表1 我国常见海参、海胆养殖种类
Tab.1 Main species of sea cucumber and sea urchins in China

品种 Species	养殖现状 Current breeding situation	常用开口饵料 Common juvenile bait	参考文献 Reference
光棘球海胆 <i>Strongylocentrotus nudus</i>	辽东和山东半岛以及渤海的 部分岛屿主要出口海产品	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> 盐藻 <i>Dunaliella salina</i> 金藻 <i>Chrysophyceae</i> 新月菱形藻 <i>Nitzschia closterium</i>	吴湛辉等, 2010
中间球海胆 <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	分布于辽宁、山东, 为主要 经济养殖动物	纤细角毛藻 <i>Chaetoceros gracilis</i> 菱形藻 <i>Nitzschia</i> 双面曲壳藻 <i>Achnanthes biasoletiana</i>	常亚青等, 2020; 王子臣等, 1997
紫海胆 <i>Anthodiaris crassispina</i>	浙江、福建等南方沿海海胆 类主要经济种类	金藻 <i>Chrysophyceae</i> 角毛藻 <i>Chaetoceros</i>	席世改等, 2020
花刺参 <i>Stichopus variegatus</i> Sempen	华南沿海地区养殖的新品 种, 具有重要经济价值	等鞭金藻 <i>Isochrysis galbana</i> 螺旋藻 <i>Spirulina</i> 海洋红酵母 <i>Phaffia rhodozyma</i> 角毛藻 <i>Chaetoceros</i>	Hu <i>et al</i> , 2010; 王怀洪等, 2017
糙刺参 <i>Holothuria metriatyla</i>	广西东兴、广东中部和西部 以及海南等南方沿海地区, 是一种重要的食用海参	菱形藻 <i>Nitzschia</i> 舟形藻 <i>Navicula</i>	韦丁等, 2010
刺参 <i>Apostichopus japonicus</i> Selenka	中国的黄渤海海域, 养殖技 术较为成熟	盐藻 <i>D. salina</i> 海洋红酵母 <i>P. rhodozyma</i> 角毛藻 <i>Chaetoceros</i>	孙景春, 2012; Shan <i>et al</i> , 2014

关键作用(王吉桥等, 2010a), 在棘皮动物饵料开发中具有广阔前景。本文将围绕微藻在棘皮动物生长、发育、变态过程中的作用以及微藻饵料在棘皮动物养殖中的应用进行综述, 并对微藻在棘皮动物养殖中存在的问题进行讨论并提出建议, 以期为棘皮动物养殖提供更多的方案。

1 微藻在棘皮动物养殖中的应用

1.1 微藻饵料

微藻的大小对海胆生长发育有重要影响, 颗粒过大的微藻无法被海胆幼体摄食, 而一些微藻太小, 脂肪和蛋白含量较低, 饲养效果不佳(史策, 2014)。目前, 海参、海胆养殖中在发育前期常用的饵料藻包括:

1.1.1 硅藻 硅藻属于单细胞真核藻类, 具有硅质化细胞壁, 种类丰富, 可以在不同环境下生存, 对水体营养状态有着较高的敏感性。硅藻分为浮游硅藻和底栖硅藻: 浮游硅藻是棘皮动物浮游期的良好饵料; 底栖硅藻则是棘皮动物在匍匐期的主要饵料(王吉桥等, 2010a)。硅藻富含 EPA(二十碳五烯酸)与 DHA(二十二碳六烯酸)等长链多不饱和脂肪酸(曾蓓蓓等, 2014), 是目前较为常用的养殖饵料。目前, 应用广泛的硅藻包括牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、中

肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、舟形藻、纤细角毛藻和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)。

1.1.2 金藻 金藻没有细胞壁, 个体微小, 内部含有大量的胡萝卜素和天然色素, 颜色多为黄绿色或金褐色。金藻以多糖和脂肪为主要贮藏物, 无淀粉, 其胞内和胞外多糖以及 DHA 等活性物质具有重要的开发价值(Bonfanti *et al*, 2018)。金藻无细胞壁, 容易被水产动物幼体消化吸收, 因此, 被广泛用于水产养殖业中, 是海胆、刺参幼体的优良鲜活开口饵料(Castilla-Gavilán *et al*, 2018)。

1.1.3 盐藻 盐藻是一种无细胞壁的嗜盐单细胞真核藻类, 其细胞外有糖蛋白包被, 可以在高盐环境下生存, 具有非常强的繁殖能力。盐藻富含甘油、胡萝卜素、多糖、蛋白质以及微量元素(Brown, 1991), 在天然色素和功能性食品领域具有极高的研究价值和应用价值(伍先绍等, 2008)。此外, 盐藻多糖能够增强体内巨噬细胞的吞噬功能, 从而提高养殖动物机体免疫能力(钟闰等, 2020)。Basch(1996)研究表明, 杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)是海星幼体的适口饵料, 能够促进海星幼体生长和发育。

1.2 微藻的营养价值和作用

微藻几乎含有所有必需氨基酸, 且大部分氨基酸

与一些水产动物所需氨基酸组成接近(Brown, 1991)。微藻中长链多不饱和脂肪酸是水产动物的关键营养成分, 其在生长性能、膜渗透性、酶活性、免疫功能等方面具有独特的调控作用, 能够提高水产动物的存活率、抗氧化能力、抗应激和抵御疾病的能力(吉红等, 2016; Shahidi *et al*, 2018)。Qi 等(2018)发现, 微藻脂肪酸组成及差异对中间球海胆和光棘球海胆主要卵黄蛋白(MYP)的表达有显著影响, MYP 在海胆体内物质营养运输储存、渗透压调节、免疫功能上发挥着重要作用。在中间球海胆养成期, 投喂牟氏角毛藻的 MYP 表达量显著高于杜氏盐藻和球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)。同时, 提出在该研究中牟氏角毛藻 EPA/DHA 和 EPA/ARA(二十二碳六烯酸)比值明显高于球等鞭金藻, 证明了 EPA、DHA 和 ARA 在海胆性腺发育中发挥着重要作用。此外, 微藻富含 Ca、P、Mg、K、Na、Zn 和 Fe 等矿物元素, 能够满足水产动物营养需求(Levassor *et al*, 2020)。

1.3 微藻增强水产动物抗病能力

微藻富含维生素、植物甾醇、多糖和多酚类等活性物质, 能够增强机体免疫力(Dineshbabu *et al*, 2019; 王吉桥等, 2010b)。微藻还富含类胡萝卜素、虾青素和叶黄素等重要的天然色素, 其中, 类胡萝卜素作为维生素 A 的前体, 同时可作为免疫增强剂(王吉桥等, 2012), 促进水产动物生长和提高存活率。王吉桥等(2012)探究了 β -胡萝卜素和虾青素对仿刺参生长及抗氧化能力的影响, 发现在仿刺参饵料中添加一定量的 β -胡萝卜素, 生长速率与对照相比提高 100%, 同时抗氧化能力也有所提高, 而虾青素对仿刺参抗氧化能力影响更加显著。

细菌是水产动物集约化养殖中的主要致病因素, 且耐药细菌病原体的数量在不断增加。微藻和其含有的天然活性成分都具有抗菌活性, 在鱼虾养殖过程中可以用来杀灭病原菌(赵伟等, 2019)。微藻多糖已被证明具有重要的理化和生物学特性, 盐藻多糖能够抑制金黄色葡萄球菌感染。这些作用可能与盐藻多糖结构中带有硫酸基团, 能进一步活化免疫细胞、增强巨噬细胞的吞噬能力(尹鸿萍等, 2006; Carballo *et al*, 2020; 钟闰等, 2020)。作为一种新的免疫刺激剂具有替代生物活性药物潜力, 减少传统的抗生素使用, 为水产动物养殖保健提供新的思路。

1.4 微藻饵料影响棘皮动物脂肪酸组成

不同的饵料对海胆性腺脂肪酸组成有显著影响(George *et al*, 2010; Cook *et al*, 2000)。因此, 投喂不

同种类的藻类或人工饲料能影响海胆性腺品质。Carboni 等(2012)对比了人工饲料和褐藻对海胆性腺脂肪酸组成的影响, 发现海胆幼体胚胎发育过程中会消耗一些特定的脂肪酸。高摄食油脂含量、DHA/EPA 比值以及高 EPA/ARA 比值的 n-3LC-PUFA(n-3 长链多不饱和脂肪酸)是促进生长的最佳组合。Liu 等(2007)研究表明, 特定 LC-PUFA (DHA/EPA 和 EPA/ARA)之间的比例与它们的绝对含量同样重要, 且较高的 20:3n-3 和 20:4n-3 水平有利于幼体的发育。性腺是海胆的主要食用部分, 其营养成分直接影响产品品质。Carboni 等(2013)发现, 海胆有能力将十八碳多不饱和脂肪酸转化为 LC-PUFA: 饮食输入的 LC-PUFA 生物合成途径的脂肪酸底物(18:2n-6 和 18:3n-3)与它们在性腺中的含量之间的正相关性(Eroldoğan *et al*, 2013), 表明这 2 种脂肪酸的组织水平受饵料水平影响, 从而进一步影响性腺品质。

刺参体壁是主要食用部分, 其营养成分直接影响产品品质。左然涛等(2017)研究表明, 饲料中 DHA 水平显著影响成参体壁营养成分, 在饵料中添加一定量 DHA 时, 刺参体壁中 DHA、n-3 PUFA、DHA/EPA 和 n-3/n-6 PUFA 显著上升, 且不同程度地提高了刺参体壁中酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸等氨基酸的含量。微藻富含多不饱和脂肪酸, 有作为水产动物饵料脂肪来源的潜力, 从而提高水产动物品质。

1.5 微藻改善养殖水体环境

除能量供给外, 微藻能够吸收水产动物幼体排出的 CO_2 和 N、P 元素, 并通过光合作用转化为 O_2 , 达到水体中“ $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ ”平衡、pH 平衡的效果(Abinandan *et al*, 2015; Gonçalves *et al*, 2017)。多种微藻共同使用, 还可使水体中的菌相(菌类结构与数量)处于稳定状态(Pankratova *et al*, 2008), 有利于水生动物的健康生长, 能有效改善养殖水体环境, 且将转化分解的营养物质继续用于自身生长, 并作为水产饵料供给水产动物, 对于改善育苗池的水质有重要作用(常亚青等, 2004)。

1.6 微藻作为饲料添加剂

微藻除了直接作为水产动物的适口饵料外, 还能代替鱼粉、鱼油, 作为人工配合饲料的添加剂, 提高饲料的营养成分(胡冬雪等, 2019; 乔洪金等, 2016)。Cirino 等(2017)用螺旋藻、石莼(*Ulva lactuca*)、贻贝、玉米为主要原料制备海胆饵料, 发现比在自然环境中野生型海胆生长效果更好, 海胆性腺发育至成熟期的时间明显缩短, 表明微藻配合饵料比自然环境微藻饵

料提供更均衡的营养成分, 饲养效果更好。

张宝龙等(2018)研究发现, 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)投喂含有小球藻(*Chlorella vulgaris*)藻粉的饲料, 对黄颡鱼生长、体色以及免疫力有显著影响, 饲料中添加 1.60%小球藻藻粉能诱导机体一氧化氮合酶(NOS)表达, 产生适量的一氧化氮(NO)。NO 通过 NOS 经一系列复杂反应合成, 其通过非特异性的抑制或杀灭细菌、真菌、病毒和寄生虫等, 进而增强机体的非特异性免疫(王广军等, 2009)。微藻所含虾青素对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、金鱼(*Carassius auratus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等水产动物生长有促进作用(金征宇等, 1999; Rehulka, 2000), 且可提高水产动物生长速率及抗氧化能力, 增强机体免疫力(Savoure *et al*, 1995; 赵淑锐等, 2015; 梁英等, 2016)。尽管目前少有微藻作为饲料添加剂在棘皮动物养殖中的报道, 但大量水产动物的研究表明, 微藻在棘皮动物养殖中有广阔的应用前景: 未来

可将高富油脂、蛋白质的微藻作为饲料添加剂, 降低鱼油、动物性蛋白的需求; 加强微藻活性物质的应用, 开发药源微藻产品, 代替传统抗生素、保健品, 增强棘皮动物天然免疫能力。

2 微藻对棘皮动物生长发育的影响

棘皮动物生活史复杂, 海胆受精卵孵化成浮游幼体后, 幼体寻求合适的基质, 沉降转入底栖生活, 开始进行变态并成为稚胆, 再由稚胆至成年性成熟。浮游幼体到稚胆, 是海胆养殖中最关键的一步。摄食习性也从浮游微藻转向底栖微藻(Sonnenholzner-Varasa *et al*, 2018)。海参也需要经历这一过程(Hu *et al*, 2013)。在樽形幼体前, 刺参处于浮游阶段, 主要摄食浮游单细胞藻类; 进入樽形幼体阶段后, 幼体从附着生活转变为底栖碎屑食性生物(隋锡林, 1989), 表 2 总结了不同微藻饲养海参、海胆研究, 证明微藻对棘皮动物生长发育、变态、存活有重要影响。

表 2 不同微藻对海参、海胆生长发育的影响

Tab.2 Effects of different microalgae on the growth and development of sea cucumber and sea urchin

品种 Species	微藻饵料 Microalgae bait	微藻影响 Effects of microalgae feed	参考文献 Reference
绿海胆 <i>Lytechinus variegatus</i>	杜氏盐藻 <i>D. tertiolecta</i>	发育周期不变, 幼体体型更大, 存活率提高	George <i>et al</i> , 2004
拟球海胆 <i>Paracentrotus lividus</i>	杜氏盐藻 <i>D. tertiolecta</i>	发育率、存活率无影响, 生长速度提高	Liu <i>et al</i> , 2007
拟球海胆 <i>P. lividus</i>	菱形藻 <i>Nitzschia</i> 双眉藻 <i>Halamphora coffeaeformis</i>	促进浮游幼体发育, 提高发育率	Castilla-Gavilán <i>et al</i> , 2020
紫海胆 <i>A. crassispina</i>	金藻 <i>Chrysophyceae</i> 角毛藻 <i>Chaetoceros</i> 绿色巴夫藻 <i>Pavlova viridis</i> 扁藻 <i>Platymonas subcordiformis</i> 小球藻 <i>C. vulgaris</i>	不同饵料对紫海胆浮游幼体生长发育的效果有差异, 以金藻、角毛藻为饵料发育速度较快	席世改等, 2020
虾夷马粪海胆 <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	菱形藻 <i>Nitzschia</i> 舟形藻 <i>Navicula</i> 缝舟藻 <i>Rhaphoneis</i> 双菱藻 <i>Surirella</i> 双眉藻 <i>H. coffeaeformis</i>	较好诱导海胆幼体变态, 提高生长和存活率	Xing <i>et al</i> , 2007
仿刺参 <i>A. japonicus</i> Selenka	菱形筒柱藻 <i>Cylindrotheca fusiformis</i>	提高对饲料的利用效率, 有较好生长率	史策, 2014
刺参 <i>A. japonicus</i> Selenka	金藻 <i>Chrysophyceae</i> 盐藻 <i>D. tertiolecta</i> 角毛藻 <i>Chaetoceros</i>	提高刺参免疫力, 对刺参幼体生长、变态有促进作用	白伟, 2018
仿刺参 <i>A. japonicus</i> Selenka	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> 舟形藻 <i>Navicula</i> 双肋藻 <i>Amphipleuraceae</i>	提高海参幼体附着率, 提高增长速率	王吉桥等, 2010a

2.1 海胆

Carboni(2012)研究了不同微藻对拟球海胆生长发育的影响,发现微藻饵料可有效提高海胆幼体变态能力,但不同微藻投喂的幼体成活率和生长存在显著差异。其中,以颗石藻(*Cricosphaera elongate*)为饵料的幼体存活率比其他藻株高3倍,生长速度快20%。Carboni(2012)还发现,海胆幼体发育过程中,海胆幼体口后腕长有显著差异。Kelly等(2000)推测,口后腕的缩短可能与海胆幼体过度进食有关,也可能是当食物充足时,幼体在早期蜕变时分配能量的稳态反应(Strathmann *et al*, 1992; Fenaux *et al*, 1994; Sato *et al*, 2006)。研究表明,微藻饵料能够很好地满足海胆幼体的营养需求。

Brundu等(2016)研究了等边金藻、杜氏盐藻和纤细角毛藻3种微藻混合液作为饵料对海胆幼体生长发育的影响,发现所有摄食组均促进幼体生长发育。受精卵培育10d后,3种藻株混合投喂的海胆幼体生长速度最快,达到八腕幼体的占(79.9±7.8)%,但幼体变态延滞,完成变态的海胆存活率仅为(4.2±3.5)%,显著低于其他处理组(61.8±16.5)%(78.4±10.2)%。表明3种微藻混合饵料是海胆发育前期较优的选择,但不适合在海胆变态期投喂,这可能是由于不同藻类间他感作用(Gross, 2003)分泌的可沉降物质,使底栖环境改变,导致海胆幼体匍匐期变态后的存活率降低。

此外,微藻形成的生物膜有助于海胆浮游幼体向底栖幼体转变(Kawamura *et al*, 1995; Jimmy *et al*, 2003)。Xing等(2007)比较了8种底栖硅藻作为饵料对虾夷马粪海胆匍匐期幼体附着率的影响,发现海胆幼体在菱形藻和双菱缝舟藻(*Rhaphoneis surirella*)上的附着率达到40%,但在咖啡双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)上的附着率仅为6.6%。作者推测该现象与微藻生物膜中分泌的胞外分泌物有直接关系。Castilla-Gavilán等(2020)研究表明,底栖硅藻形成的生物膜有助于海胆幼体变态发育,菱形藻形成的生物膜对幼体附着率显著高于双眉藻形成的生物膜,进一步说明这种差异的原因可能由于生物膜成分的差异,特别是细胞外聚合物的数量。

2.2 海参

海参营养需求的研究尚处于摸索阶段,营养需求标准缺乏,饲料研究落后于产业的发展。微藻饵料同样对海参生长发育有促进作用。许翠娅(2019)对池塘养殖仿刺参过程中附着基上底栖微藻的种类组成、细胞密度和生物量变化进行分析,发现池塘养殖仿刺参稚参的产量和成活率与附着基上底栖微藻的生物量

密切相关。Shi等(2013)发现,摄食14%鲜活菱形筒柱藻与86%海泥混合饲料的刺参有良好的生长速度和能量分配模式。史策(2014)选取营养物质含量更高的叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*)、小新月菱形藻(*Nitzschia closterium f. minutissima*)和钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)混合饲料喂养刺参,发现刺参的生长率反而低于摄食营养物质含量较低的菱形筒柱藻的刺参。作者发现,刺参粪便中的多数菱形筒柱藻细胞发生了较大形变,表明刺参可以较好地破解菱形筒柱藻。水生动物利用微藻细胞内容物的先决条件是通过物理咀嚼或者胃酸、生物酶破坏微藻的细胞壁(Bitterlich, 1985)。虽然菱形筒柱藻蛋白、脂肪含量较低,但其易破解和高比例的呈味氨基酸的特性弥补了营养上的不足,因而其对养殖刺参的饲料效果较好(兰岚等, 2012)。

白伟(2018)探究了不同微藻对刺参浮游幼体生长、免疫、消化及氨基酸组成的影响,发现盐藻对刺参浮游幼体早期饲养效果最好,但盐藻饲喂的耳状幼体期发育缓慢,推测由于盐藻没有细胞壁,在幼体发育的初始阶段更容易被消化。角毛藻在刺参大耳状幼体时期促生效果最好,对幼体的发育和变态有着积极作用。但随着幼体消化系统的逐步完善,营养优势较其他藻种下降,多元化的饵料来源才可满足幼体的营养需求。

3 微藻饵料应用在经济棘皮动物养殖领域存在的问题与前景

3.1 微藻应用在经济棘皮动物养殖中存在的问题及建议

随着国内棘皮动物养殖业的迅猛发展,水产饵料的需求日益增加。由于海参、海胆的幼体摄食能力低下,饵料范围窄,在不同时期对饵料中营养物质的需求不同,要求针对不同时期的幼体营养需求来配套提供高品质的饵料。但多数水产养殖企业自有的微藻饵料生产工艺粗放,难以满足高品质饵料的要求。目前,国内外对海参、海胆幼体发育的营养需求特征与微藻饵料关键营养因子的相关性研究不足,也阻碍了根据幼体营养需求开发适口商品饵料的进程。另外,棘皮动物幼体对外界养殖环境极为敏感,营养不全面或不适合的饵料,可能会导致营养供给不足、幼体生长缓慢和变态发育存活率低等一系列问题,因此,微藻饵料作为棘皮动物幼年期必需的饵料,其产量和品质已成为棘皮动物苗种规模化的主要制约因素之一。目前,市场上微藻饵料产品面临的主要问题:没有统

一的质量标准,商品化的产品稀缺,产品质量和功效不稳定,鲜活饵料保存不易,鲜饵供应与育苗期不匹配等。

针对棘皮动物幼体的营养需要与饵料相关性的研究不完善的问题,有必要进一步加深相关的基础研究,对饵料的关键营养因子,如微藻多不饱和脂肪酸的种类、含量和比例与棘皮动物生长发育相关性进行全面研究,为开发特定营养因子配比的定向高品质饵料提供基础数据。同时,根据微藻的营养特点和生物学功能,培养选育更有价值的不同藻种,扩充微藻饵料的品种。微藻及其生物活性物质作为饲料添加剂,也在棘皮动物养殖中具有极高的应用潜力。微藻高附加值产物,如虾青素、多酚、甾醇等,作为饲料添加剂,可提高棘皮动物免疫力、抗氧化能力,为降低大量抗生素的使用提供可能性。

此外,相关行业应基于微藻高密度培养和营养关联分析尽快制定全面的微藻饵料产品的标准和规范,改善现有的粗放式饵料生产工艺,引导微藻饵料行业的规范化发展,推进新型高效微藻饵料的创制和发展。鲜活饵料产品的开发则一方面需要选育生长迅速、抗逆性强、营养价值高的品种,改善培养工艺来降低生产成本;另一方面则要充分考虑下游企业育苗需求的时效性,做好饵料供应和育苗时间的精准对接,真正形成与棘皮动物育苗配套的鲜饵生产工艺及产业链。只有加速微藻饵料产品的开发和标准化,降低饵料微藻培养和活性物质提取工艺生产成本,才能扩大微藻饵料在棘皮动物养殖中的应用,促进棘皮动物养殖业的进一步发展。

3.2 微藻在经济棘皮动物养殖中的应用前景

微藻富含蛋白质、维生素和脂肪酸等营养物质,作为幼体动物的鲜活饵料,在新型水产饲料资源开发中备受关注。随着对微藻生理生化研究的深入,对微藻高附加值提取物加工工艺的优化,开发特定营养因子配比的定向高品质饵料将极大提高经济棘皮动物养殖效率,且该模式将成为未来动物饵料应用的典型。微藻饵料资源也将为动物饵料工业可持续发展提供广阔的发展前景。

参 考 文 献

- Abinandan S, Shanthakumar S. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 52: 123–132
- Bai W. Effects of different algal diets on the growth, immunity, digestion and nutrient composition of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 [白伟. 不同藻类饵料对仿刺参生长性能、免疫消化及营养组成影响的研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Basch LV. Effects of algal and larval densities on development and survival of asteroid larvae. *Marine Biology*, 1996, 126(4): 693–701
- Bitterlich G. Digestive processes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) studied *in vitro*. *Aquaculture*, 1985, 50(1–2): 123–131
- Bonfanti C, Cardoso C, Afonso C, *et al.* Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal Research*, 2018, 29: 242–248
- Brown MR. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991, 145(1): 79–99
- Brundu G, Vian Monleón L, Vallainc D, *et al.* Effects of larval diet and metamorphosis cue on survival and growth of sea urchin post-larvae (*Paracentrotus lividus*; Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 2016, 465: 265–271
- Carballo C, Mateus AP, Maya C, *et al.* Microalgal extracts induce larval programming and modify growth and the immune response to bioactive treatments and LCDV in *Senegalese sole* post-larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 106(1): 263–272
- Carboni S, Hughes AD, Atack T, *et al.* Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): Effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2013, 164(2): 376–382
- Carboni S, Vignier J, Chiantore M, *et al.* Effects of dietary microalgae on growth, survival and fatty acid composition of sea urchin *Paracentrotus lividus* throughout larval development. *Aquaculture*, 2012, 324–325: 250–258
- Castilla-Gavilán M, Reznicov M, Turpin V, *et al.* Sea urchin recruitment: Effect of diatom based biofilms on *Paracentrotus lividus* competent larvae. *Aquaculture*, 2020, 515: 734559
- Castilla-Gavilána M, Florence B, Bruno C, *et al.* Optimising microalgae diets in sea urchin *Paracentrotus lividus* larviculture to promote aquaculture diversification. *Aquaculture*, 2018, 490: 251–259
- Chang YQ, Gao XS. Artificial seedling and breeding technology of *Strongylocentrotus intermedius* (V). *Fisheries Science*, 2004(10): 45–46 [常亚青, 高绪生. 中间球海胆的人工育苗及增养殖技术(之五). *水产科学*, 2004(10): 45–46]
- Chang YQ, Zhao C, Hu FY, *et al.* Aquaculture of *Strongylocentrotus intermedius* in Fujian coastal areas. *Southern China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 1–9 [常亚青, 赵冲, 胡方圆, 等. 福建沿海试养中间球海胆的初步研究. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 1–9]
- Chang YQ. Biological research and breeding of sea cucumber and sea urchin. Beijing: China Ocean Press, 2004 [常亚青. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004]
- Cirino P, Ciaravolo M, Paglialonga A, *et al.* Long-term maintenance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in culture. *Aquaculture Reports*, 2017, 7: 27–33
- Cook EJ, Bell MV, Black KD, *et al.* Fatty acid compositions of

- gonadal material and diets of the sea urchin, *Psammechinus miliaris*: Trophic and nutritional implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 255(2): 261–274
- Coutteau P, Mourente G. Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology*, 1997, 130(1): 81–91
- Dineshbabu G, Goswami G, Kumar R, *et al.* Microalgae-nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods*, 2019, 62: 103545
- Eroldoğan TO, Yılmaz AH, Turchini GM, *et al.* Fatty acid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effects of n-6 PUFA and MUFA in fish oil replaced diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(4): 941–955
- Fenaux L, Strathmann MF, Strathmann RR. Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnology and Oceanography*, 1994, 1(39): 84–98
- George SB, Lawrence JM, Lawrence AL. Complete larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* fed an artificial feed. *Aquaculture*, 2004, 242(1–4): 217–228
- George SB, Lawrence JM, Lawrence AL. Fertilization and development of eggs of the sea urchin *Lytechinus variegatus* maintained on an extruded feed. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 2(31): 232–238
- Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 2017, 24(SI): 403–415
- Gross EM. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2003, 22: 313–339
- Hu C, Xu Y, Wen J, *et al.* Larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus* sp. (Curry fish). *Aquaculture*, 2010, 300(1–4): 73–79
- Hu CQ, Li HP, Xia JJ, *et al.* Spawning, larval development and juvenile growth of the sea cucumber *Stichopus horrens*. *Aquaculture*, 2013, 404–405: 47–54
- Hu DX, Ma J, Wang CQ, *et al.* Effects of replacement of dietary fish meal by *Nannochloropsis* sp. meal on growth performance, body composition, and serum biochemical indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 21–30 [胡冬雪, 马季, 王成强, 等. 拟微绿球藻粉替代鱼粉对大菱鲆幼鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 21–30]
- Ji H, Xiao FF, Xing JX, *et al.* Research progress on the application of microalgae resources in aquatic feed. *Feed Industry*, 2016, 41(16): 1–12 [吉红, 肖芬芬, 邢君霞, 等. 微藻资源在水产饲料中应用的研究进展. *饲料工业*, 2016, 41(16): 1–12]
- Jimmy RA, Kelly MS, Beaumont AR. The effect of diet type and quantity on the development of common sea urchin larvae *Echinus esculentus*. *Aquaculture*, 2003, 220(1–4): 261–275
- Jin ZY, Guo SD, Lü YH. Effects of astaxanthin-rich *Phaffia* on the body color and growth status of *Macrobrachium rosenbergii*. *Feed Industry*, 1999(20): 27–31 [金征宇, 过世东, 吕玉华. 饲料中添加富含虾青素的法夫酵母对罗氏沼虾的体色及生长状况的影响. *饲料工业*, 1999(20): 27–31]
- Kawamura T, Saido T, Takami H, *et al.* Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, 194(2): 189–199
- Kelly MS, Hunter AJ, Scholfield CL, *et al.* Morphology and survivorship of larval *Psammechinus miliaris* in response to varying food quantity and quality. *Aquaculture*, 2000, 183(3–4): 223–240
- Lan L, Wang QH, He Y, *et al.* Analysis of nutrient components in continuous culture of alga *Cylindrica*. *Journal of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2012, 42(6): 72–75 [兰岚, 王巧晗, 赫勇, 等. 流加-连续培养的筒柱藻营养成分分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2012, 42(6): 72–75]
- Levassor W, Perré P, Pozzobon V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107545
- Liang Y, Huang XL, Tian CY. Advances in studies on marine medicinal microalgae. *Journal of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2016, 46(11): 32–43 [梁英, 黄徐林, 田传远. 海洋药源微藻研究进展. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(11): 32–43]
- Liu H, Kelly MS, Cook EJ, *et al.* The effect of diet type on growth and fatty acid composition of the sea urchin larvae, II. *Psammechinus miliaris* (Gmelin). *Aquaculture*, 2007, 264(1–4): 263–278
- Pankratova EM, Trefilova LV, Zyblykh RY, *et al.* Cyanobacterium *Nostoc paludosum* Kutz as a basis for creation of agriculturally useful microbial associations by the example of bacteria of the genus *Rhizobium*. *Microbiology*, 2008, 77(2): 228–234
- Qi SB, Zhao XW, Zhang WJ, *et al.* The effects of 3 different microalgae species on the growth, metamorphosis and MYP gene expression of two sea urchins, *Strongylocentrotus intermedius* and *S. nudus*. *Aquaculture*, 2018, 492: 123–131
- Qiao HJ, Song ZD, Ma JJ, *et al.* Effects of microalgae supplemented in feed instead of fish oil on growth, body composition and fatty acid composition of *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 56–63 [乔洪金, 宋志东, 马晶晶, 等. 饲料中添加微藻替代鱼油对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 幼鱼生长、体成分及脂肪酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 56–63]
- Rehulka J. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2000, 190(1): 27–47
- Sato Y, Kaneko H, Negishi S, *et al.* Larval arm resorption proceeds concomitantly with programmed cell death during metamorphosis of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Cell and Tissue Research*, 2006, 326(3): 851–860
- Savoure N, Briand G, Amory-Touz MC, *et al.* Vitamin-A status and metabolism of cutaneous polyamines in the hairless mouse after UV irradiation: Action of beta-carotene and astaxanthin. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1995, 65(2): 79–86
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(1): 345–381

- Shan HW, Zhang L, Gao L, *et al.* A comparative study of intensive *Litopenaeus vannamei* culture on four bottom substrates without water change. *Journal of Ocean University of China*, 2014(13): 705–711
- Shi C, Dong SL, Wang F, *et al.* Effects of four fresh microalgae in diet on growth and energy budget of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 2013, 416–417: 296–301
- Shi C. Study on the effect of fresh *Rhomboid tubulosa* (Diatom) on the bait of Chinese ginseng root. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 [史策. 鲜活菱形筒柱藻(硅藻)对刺参饵料效果的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014]
- Sonnenholzner-Varasa JR, Noelia T, Panchana OMM. Breeding, larval development, and growth of juveniles of the edible sea urchin *Tripneustes depressus*: A new target species for aquaculture in Ecuador. *Aquaculture*, 2018, 496: 134–145
- Strathmann RR, Fenaux L, Strathmann MF. Heterochronic developmental plasticity in larval sea urchins and its implications for evolution of non-feeding larvae. *Evolution*, 1992, 46(4): 972–986
- Sui XL. The main factors influencing the larval development and survival rate of the sea cucumber. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1989, 20(4): 314–321 [隋锡林. 影响刺参幼体发育与存活率的主要因子. 海洋与湖沼, 1989, 20(4): 314–321]
- Sun JC. Preliminary study on *Apostichopus japonicus* attachment metamorphosis induced by benthic diatoms. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [孙景春. 底栖硅藻诱导仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼体附着变态的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, 11(2): 107–184
- Wang GJ, Xie J, Yu DG, *et al.* Research progress of nitric oxide and nitric oxide synthase in aquatic animal immune system. *Aquatic Science and Technology*, 2009(3): 1–6, 13 [王广军, 谢骏, 余德光, 等. 一氧化氮及一氧化氮合酶在水生动物免疫系统研究进展. 水产科技, 2009(3): 1–6, 13]
- Wang HH, Yan JX, Feng YQ, *et al.* Embryonic and larval development of sea cucumber *Stichopus herrmanni*. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 606–611 [王怀洪, 严俊贤, 冯永勤, 等. 花刺参胚胎和幼体发育的形态观察. 水产科学, 2017, 36(5): 606–611]
- Wang JQ, Cong WH, Jiang YS, *et al.* Effects of benthic diatom species and density on growth and survival in larval and juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010a, 25(3): 203–209 [王吉桥, 丛文虎, 姜玉声, 等. 底栖硅藻种类和密度对仿刺参幼体和稚参生长与成活的影响. 大连海洋大学学报, 2010a, 25(3): 203–209]
- Wang JQ, Fan YY, Xu ZX, *et al.* Effects of dietary β -carotene and astaxanthin levels on anti-oxidation in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2012, 27(3): 215–220 [王吉桥, 樊莹莹, 徐振祥, 等. 饲料中 β -胡萝卜素和虾青素添加量对仿刺参幼参生长及抗氧化能力的影响. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 215–220]
- Wang JQ, Su JW, Zhang K, *et al.* The effects of dietary vitamin C sources and levels on immunity of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fisheries Science*, 2010b, 29(7): 381–386 [王吉桥, 苏久旺, 张坤, 等. 维生素C剂型和剂量对仿刺参幼参免疫的影响. 水产科学, 2010b, 29(7): 381–386]
- Wang ZC, Chang YQ. Studies on hatching of Japanese sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1997(1): 61–68 [王子臣, 常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究. 中国水产科学, 1997(1): 61–68]
- Wei D, Chen J. Research on nutrient contents of *Holothuria scabra* Jaeger. *Food Science and Technology*, 2010, 35(10): 99–101 [韦丁, 陈健. 糙海参营养成分的探究. 食品科技, 2010, 35(10): 99–101]
- Wu XS, He ZF, Gong X. *Dunaliella salina* and its application in foods. *China Food Additives*, 2008(2): 127–130 [伍先绍, 贺稚非, 龚霄. 杜氏盐藻及其在功能食品中的应用. 中国食品添加剂, 2008(2): 127–130]
- Wu ZH, Lin GM, Dai YY. Technique for big-sized fingerling rearing of *Alosa sapidissima*. *Chinese Fisheries*, 2010(6): 39–41 [吴湛辉, 林国明, 戴玉勇. 光棘球海胆大规格苗种培育技术. 中国水产, 2010(6): 39–41]
- Xi SG, Qin CX, Ma ZH, *et al.* Effects of dietary microalgae on growth and survival of larval development of sea urchin (*Anthocidaris crassispina*). *Southern China Fisheries Science*, 2020, 16(2): 115–120 [席世改, 秦传新, 马振华, 等. 微藻饵料对紫海胆浮游幼体生长及存活影响的研究. 南方水产科学, 2020, 16(2): 115–120]
- Xing RL, Wang CH, Cao XB, *et al.* The potential value of different species of benthic diatoms as food for newly metamorphosed sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture*, 2007, 263(1–4): 142–149
- Xu CY. Effects of shelter type and benthic microalgae on growth and survival of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka in earthen ponds. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(4): 284–292 [许翠娅. 不同类型附着基及其底栖微藻对池塘养殖仿刺参生长和存活的影响. 渔业研究, 2019, 41(4): 284–292]
- Yin HP, Sheng YQ. Study on *in vivo* anti-microbial and anti-inflammatory activities of polysaccharide from *Dunaliella salina*. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2006, 27(6): 361–363 [尹鸿萍, 盛玉青. 盐藻多糖体内抑菌及抗炎作用的研究. 中国生化药物杂志, 2006, 27(6): 361–363]
- Zeng BB, Huang XX, Wei LK, *et al.* Suitable culture conditions and cellular biochemical composition of three diatoms from brackish water. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 320–328 [曾蓓蓓, 黄旭雄, 危立坤, 等. 3种半咸水硅藻的适宜培养条件及其细胞生化成分. 海洋渔业, 2014, 36(4): 320–328]
- Zhang BL, Qu M, Bao LM, *et al.* Effects of different levels of chlolate on the growth and immunity of *Pelteobrus fulvidrus*. *Animals Breeding and Feed*, 2018(9): 48–53 [张宝龙, 曲木, 暴雨梅, 等. 饲料中添加不同水平小球藻对黄颡鱼生长及免疫力的影响. 养殖与饲料, 2018(9): 48–53]
- Zhao SR, Zheng MQ, Wu YT, *et al.* Investigation with ESR on the radical scavenging effect of *Spirulina in vitro*. *Food Research and Development*, 2015, 36(18): 91–94 [赵淑锐,

- 郑美青, 吴英婷, 等. 螺旋藻体外清除自由基的 ESR 研究. 食品研究与开发, 2015, 36(18): 91-94]
- Zhao W, Gao BY, Huang LD, *et al.* Nutritional value, physiological function and disease resistance activity of microalgae and their bioactive components in aquaculture. *Feed Industry*, 2019, 40(8): 9-16 [赵伟, 高保燕, 黄罗冬, 等. 微藻及其生物活性成分在水产养殖中的营养价值、生理功能和抗病活性. 饲料工业, 2019, 40(8): 9-16]
- Zhong R, Wu SW, He XM, *et al.* Antitumor activity and mechanism of exopolysaccharides from *Salina dualiella*. *Science and Technology of Food Industry*, 2020(22): 126-133 [钟闰, 吴思伟, 何秀苗, 等. 杜氏盐藻胞外多糖抗肿瘤活性及其机制研究. 食品工业科技, 2020(22): 126-133]
- Zuo RT, Li M, Qin YB, *et al.* Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA) content on growth performance and nutrient composition in body wall of adult sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2017, 32(2): 172-177 [左然涛, 李敏, 秦宇博, 等. 饲料中 DHA 含量对刺参成参生长及其体壁营养成分的影响. 大连海洋大学学报, 2017, 32(2): 172-177]

(编辑 陈 辉)

Progress in Research on Application of Microalgae Bait in Echinoderm Culture

LIU Ruiqing^{1,2}, HE Meilin^{1,2}, WANG Changhai^{1,2,3}⊙

(1. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biology, Nanjing 210095; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 3. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Ocean University of Jiangsu, Lianyungang 222005)

Abstract Echinodermata are important aquatic animals of commercial value in China. Enriched in proteins, amino acids, unsaturated fatty acids, and other physiologically active substances, they are considered healthy food with increasing consumer demand. Therefore, there is an urgent need to develop and industrialize echinoderm breeding. However, the high mortality rate, slow growth rate, and low nutritional quality during echinoderm breeding are the main bottlenecks limiting the development of the echinoderm industry. It is well known that marine animals require certain essential fatty acids, particularly n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids, for their normal growth, development, and immunity. Essential fatty acids can directly affect the development and survival of juvenile of echinoderms grown in aquaculture. To meet the nutritional needs of juveniles and adults, the supply of high-quality bait is essential to overcome these bottlenecks. Microalgae are rich in proteins, carbohydrates, vitamins, carotenoids, polyunsaturated fatty acids, and other nutrients, and have attracted increased attention in the development of new aquatic feed resources. Fresh bait for young animals is significantly better than artificial bait in promoting growth and improving survival rates. It is also widely used in breeding echinoderms. In this paper, the research progress on the application of microalgae and bioactive chemicals in typical commercial echinoderm (sea cucumber and sea urchin) farming and breeding were reviewed with respect to their effects on the growth, development, and impact on the larval growth. We have summarized the microalgae species commonly used in economic echinoderm breeding and the effects of microalgae on the fatty acid composition and immune status of sea cucumbers and sea urchins were analyzed. Furthermore, the challenges limiting the application of microalgae bait in echinoderm breeding and farming are discussed, and alternative solutions are offered for sea cucumber and sea urchin culture in China.

Key words Microalgae; Bait; Sea cucumber; Sea urchin; Metamorphosis; Unsaturated fatty acids

⊙ Corresponding author: WANG Changhai, E-mail: chwang@njau.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201222002

http://www.yykxjz.cn/

许 帅, 孙景春, 刘石林, 林承刚, 张立斌, 孙丽娜, 杨红生. 棘皮动物精子超低温冷冻保存技术研究进展. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 26–37

Xu S, Sun JC, Liu SL, Lin CG, Zhang LB, Sun LN, Yang HS. Progress in research on cryopreservation technology for echinoderm sperm. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 26–37

棘皮动物精子超低温冷冻保存技术研究进展*

许 帅^{1,2} 孙景春¹ 刘石林^{1,2} 林承刚^{1,2}
张立斌^{1,2} 孙丽娜^{1,2} 杨红生^{1,2,3①}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 中国科学院海洋大科学研究中心 中国科学院海洋牧场工程实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 中国科学院种子创新研究院 武汉 430072)

摘要 棘皮动物(Echinodermata)是无脊椎动物中进化地位最高等的类群,其海参纲(Holothurioidea)和海胆纲(Echinoidea)的一些物种具有非常高的经济价值和营养价值。由于受到人类活动的影响,很多棘皮动物物种数量和生物多样性遭到了严重破坏,种质资源保存迫在眉睫。超低温冷冻保存是种质资源长期保存的重要方法,具有突破地理隔离、实现远缘杂交、保护种质资源、解决种质退化和保护濒危物种等作用。本文综述了海胆、海参和海星 3 种主要棘皮动物的精子超低温冷冻保存研究进展,并展开描述了精子收集、稀释剂和抗冻剂制备、平衡、冷却、解冻和质量评价等精子冷冻保存过程的各个步骤,以为棘皮动物种质资源保存的进一步研究及产业化应用提供参考。

关键词 棘皮动物; 精子; 超低温冷冻保存技术

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0026-12

棘皮动物(Echinodermata)是一类古老、特殊的海洋生物,在 5 亿多年以前的古生代寒武纪即已出现,是无脊椎动物中进化地位最高等的类群。世界范围内现存棘皮动物 7000 余种,化石种类接近 13000 种,几乎全营底栖生活,分布范围广泛,从热带海域到寒带海域,从潮间带到数千米的深海都有分布(廖玉麟等, 2011; Pawson, 2007)。现存的棘皮动物普遍认为可分为 5 个纲,包括海百合纲(Crinoidea)、海星纲(Asteroidea)、

蛇尾纲(Ophiuroidea)、海胆纲(Echinoidea)和海参纲(Holothurioidea)。棘皮动物门为海洋生境所特有,其幼虫两侧对称而成体多五辐射对称,体壁中有 CaCO₃ 为主要成分的内骨骼向外突出成棘刺,有特殊的水管系统辅助摄食、运动和其他功能,在海洋生态系统的结构和功能中发挥着重要作用(廖玉麟等, 2011)。棘皮动物中,海参纲和海胆纲的一些种类具有很高的经济、营养和药用价值,逐渐被人们采捕和养殖。但由

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901602)、山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0502)、泰山学者特聘专家计划、中国科学院“现代海洋牧场构建原理与工程技术创新交叉团队”项目(Y82327101L)和中国科学院国际合作计划(133137KYSB20180069)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Project (2018YFD0901602), Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2018SDKJ0502), Taishan Scholar Program of Shandong Province, Chinese Academy of Sciences “Modern Marine Ranching Construction Principles and Engineering Technology Innovation Cross Team” Project (Y82327101L), and International Partners Program of Chinese Academy of Sciences (133137KYSB20180069)].

许 帅, E-mail: xushuai16@mails.ucas.ac.cn

① 通讯作者: 杨红生, 研究员, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2020-12-22, 收修改稿日期: 2021-01-02

于近几年来采捕过度、养殖规模急剧扩大和近亲交配严重等原因,一些棘皮动物种质退化问题非常明显,良种缺乏、病害发生日趋严重、对病害和环境胁迫的抵抗能力显著降低。以刺参(*Apostichopus japonicus*)为例,在20世纪80年代,人们突破了刺参苗种规模化繁育技术。21世纪以来,养殖产业迅猛发展,刺参成为引领我国第5次海水养殖浪潮的主要品种。然而,从2004年开始,养殖刺参陆续出现大规模死亡现象,并出现种质退化现象,在近几年尤为明显,主要表现为生长速度慢、病害频发、存活率低等问题,导致每年数10亿的经济损失(王印庚等,2014)。野生刺参的资源量和种质质量亦急剧下降,已被世界自然保护联盟纳入濒危物种红色名录(IUCN Red List of Threatened Species, IUCN 红色名录)。群体选育往往被用来解决经济品种种质退化及良种缺乏等问题,但此方法周期较长,且容易存在雌、雄性腺成熟不同步、亲本运输不方便以及配子利用率低等问题。而超低温冷冻保存技术是生物材料进行长期保存的一种有效手段,能有效解决群体选育中的上述问题。对种质资源(包括精子、卵子和胚胎)进行超低温冷冻保存,能够提供不受季节限制的种质资源、提高配子的利用率;扩大杂交育种范围,克服长期近亲交配造成的种质资源衰退;使种质资源运输更加便利,节约遗传育种的资金;拯救珍稀、濒临灭绝的具有优良性状的物种,并可长期不间断的为遗传育种和现代生物技术的研 究提供生物材料,为种质资源的保存和生物多样性的保护开辟了新途径。本文对海胆、海参和海星3种主要棘皮动物的精子超低温冷冻保存研究进行了系统归纳和整理,并展开描述了精子冷冻保存过程的各个步骤,以期对棘皮动物种质资源保存的进一步研究及产业化应用提供参考。

1 精子超低温冷冻保存

1.1 超低温冷冻保存技术原理

超低温冷冻保存技术能够长期、有效保存生物材料,它是指通过向细胞、胚胎和组织器官等添加适当的抗冻液,使其在冷冻过程中免受或降低一系列低温损伤(冰晶损伤、渗透损伤和溶质损伤等)的影响,并通过一定的降温速率,使之快速越过危险区($-15^{\circ}\text{C}\sim-60^{\circ}\text{C}$),最后,投入液氮中(-196°C)进行长期保存的过程(刘清华,2005)。理论上认为,在液氮中保存的生物样品细胞内的一切生化反应处于“暂停”状态,甚至完全停止,可以长时间保存。在需要的时候,以适当的方法可重新解冻、激活液氮中的生物样品,恢复其内部正常的生化反应,使其具有正常的生物学功

能(齐文山等,2014; Liu *et al.*, 2015)。

1.2 精子进行超低温冷冻保存的优点

相对于卵子和胚胎等种质资源,精子的超低温冷冻保存具有其独特的优势。精子体积小,具有单层膜等相对简单的结构,表面积与体积比相对较大,有利于水分和抗冻剂的渗透;而卵子和胚胎体积较大,表面积与体积比减小,并且具有丰富的卵黄、脂肪滴和多隔室生物系统,导致膜通透效率降低,双层半透性膜系统和高的低温敏感性又进一步限制了水分和抗冻剂在膜两边的渗透性(Tsai *et al.*, 2012)。

1.3 精子超低温冷冻保存技术的应用

到目前为止,精子的超低温冷冻保存技术已在人类辅助生殖和牲畜育种中得到广泛应用(Anger *et al.*, 2003; Mocé *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2015; Rozati *et al.*, 2017)。例如,冷冻保存已常规应用于协助马(Janett *et al.*, 2003)和牛(Bhakat *et al.*, 2011)的育种计划。在水生物种中,为突破地理隔离,扩大杂交组合范围,提供不受季节限制的精子库,达到提高遗传育种效率和濒危物种保护的目 的,人们亦对一些水生经济物种开展了精子超低温冷冻保存研究。据统计,已有约200种鱼类的精子被冷冻保存(田永胜等,2009; 齐文山等,2014; Liu *et al.*, 2015),针对软体动物(牡蛎和鲍鱼)、甲壳类(虾和蟹)和棘皮动物(海胆)等水生经济物种的精子也有相应的冷冻保存研究(Dunn *et al.*, 1973; Bhavanishankar *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2007)。但棘皮动物精子冷冻保存研究开展得较晚,且研究内容不够系统全面,没有形成产业化应用的发展模式(田永胜等,2019)。棘皮动物中,海参纲和海胆纲的一些种类自古以来即被作为滋补佳品,常被用来预防和治疗一些疾病,具有重要的经济价值和营养价值(廖玉麟等,2011; Bordbar *et al.*, 2011)。因此,棘皮动物主要的精子冷冻保存研究也集中于这2个纲的物种。

2 棘皮动物精子超低温冷冻保存基本步骤

通常精子超低温冷冻保存过程主要包括精子的收集与质量评估、稀释剂制备、冷冻保护剂制备、精子与冷冻保护剂混合、冷却、储存、解冻和解冻后精子质量评价(图1)。其中,抗冻剂的种类和浓度、稀释液种类、精子与冷冻保护剂混合比例、降温程序和解冻程序等因素均会对解冻后的精子质量产生极大的影响。解冻后评价精子质量的指标包括运动活力、形态变化、受精率、孵化率、细胞器完整性和代谢机能(Liu *et al.*, 2015)。

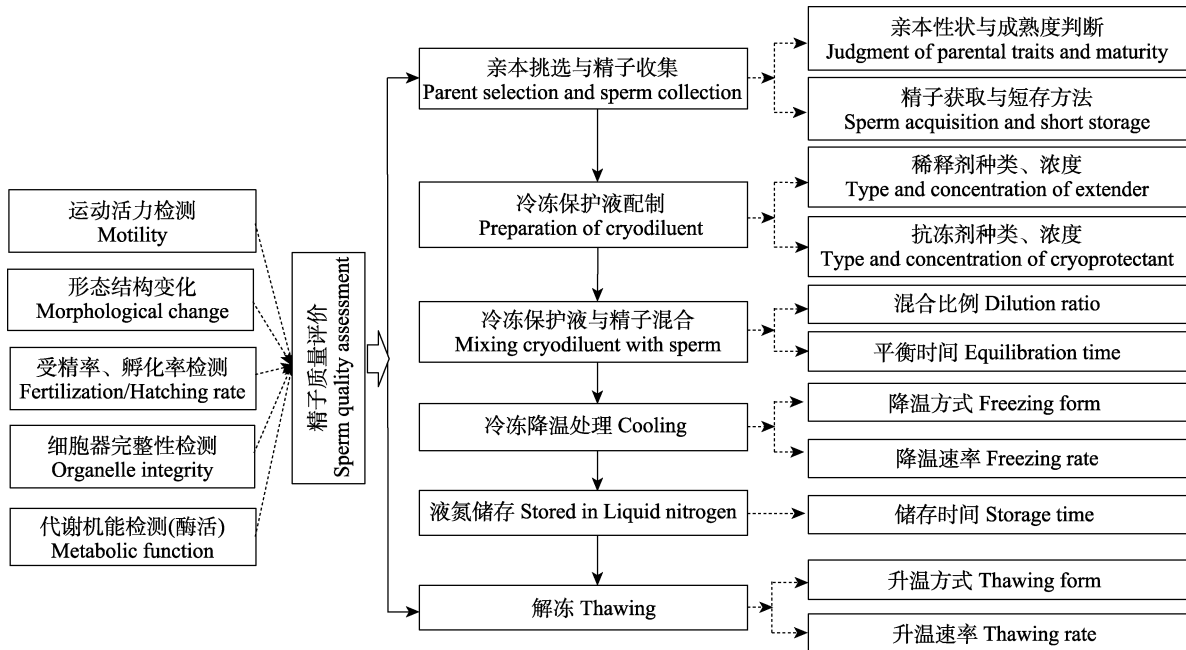


图1 精子超低温冷冻保存技术流程

Fig.1 Basic process for sperm cryopreservation technology

2.1 精子收集与活力检测

海胆和海参等棘皮动物不能根据体型和外表分辨性别,因此,精子和卵子通常是一起收集。一般采用自然排精和获取性腺2种方法收集棘皮动物的精子。自然排精是指通过升高海水温度、阴干或注射KCl溶液等方式诱导棘皮动物排出成熟的精子,但此方法收集精子的质量容易受到粘液、海水或粪便的污染,而且收集的精子难于浓缩(Gwo *et al*, 2002)。获取性腺是收集棘皮动物精子最常使用的方式,广泛应用于海参、海星和海胆等动物的精子收集过程中。Shao等(2006)获取新鲜刺参精液的操作为:当发现白色精液从位于刺参背部的生殖孔中释放出来时,立即挑出雄性刺参,解剖获得成熟雄性性腺并剪碎,用0.5 mm的筛网滤掉性腺管壁碎片,滤出新鲜精液,于4℃保存至使用。用此方法,每只雄性海参可收集约5 ml新鲜精子。

在获取新鲜精液后,立即检测精子活力,以判断是否能用于后续的超低温冷冻。精子的活力可通过光学显微镜统计样本中运动精子的百分比来直接测量(Lyons *et al*, 2005; Vitiello *et al*, 2011; Mizuno *et al*, 2019)。Mizuno等(2019)采用含0.5%胎牛血清的人工海水激活稀释500倍的刺参精子,认为只有活力高于70%的精子才适用于超低温冷冻保存。此外,还可通过计算机辅助精子分析系统(Computer-aided sperm analysis, CASA)来测量精子的运动能力,该系统能客观评估精子的多种运动参数,比主观观察具有更高的

准确性和测量效率(Acosta-Salmón *et al*, 2007)。Adams等(2003)研究表明,同种海胆不同个体的新鲜精子虽然起初的运动活力无显著差异,但经过超低温冷冻保存,解冻的精子质量却存在显著差异。因此,在进行超低温冷冻实验时,将3个雄性个体的精子合并在一起以减少雄性个体精子之间的差异,此方法还解决了从棘皮动物(海胆)单只个体中只能收集到少量精子的问题,这一现象在牡蛎中也有报道(Paniagua-Chavez *et al*, 2001; Dong *et al*, 2007)。新鲜精子的质量是影响精子超低温冷冻保存成功与否的重要因素,冷冻后精子的质量与新鲜精子的质量有着密切的关系(Coloma *et al*, 2011; Orgal *et al*, 2012)。如何选取性腺质量好、精子活力高、精子抗冻能力强的亲本对棘皮动物精子超低温冷冻保存非常重要,如何评价和获取高质量的棘皮动物新鲜精子仍需进一步深入研究。

2.2 稀释剂的选择

普遍认为,精液超低温保存所需稀释液必须具备的性质是抑制精子的活力、维持细胞电解质和渗透压的平衡(Graham *et al*, 1990; 刘清华, 2005)。在海洋鱼类和软体动物精子冷冻保存中,常使用无Ca²⁺的Hank's平衡盐溶液作为稀释剂,其具有抑制精子活化和优化精子渗透压的能力,有利于在冷冻前节省精子中的能量从而保持精子的质量(Dong *et al*, 2005a)。Ca²⁺被认为能够诱导精子的顶体反应,并能导致精子

凝集(Paniagua-Chavez *et al*, 1998), 但在棘皮动物精子冷冻保存研究中, 人工海水或过滤自然海水作为稀释剂已被广泛应用(表1), 而其他成分的稀释剂研究鲜有发表。棘皮动物的精子是能被自然海水激活的, 这显然违反了稀释液需满足抑制精子活力的性质。Gallego等(2014)分析了2种游泳者(河豚和欧洲鳗鱼)和2种无柄者(海胆和海鞘)海洋物种的精子运动参数和形态特征。结果显示, 海胆等无柄者海洋物种的精子被激活后, 精子活力能保持更长的时间(约45 min); Fabbrocini等(2017)研究表明, 海胆精子在激活后可保持1 h的高活力, 并保持相对运动活力达24 h。实验时, 海水用量较少和精子激活后能维持较长时间的活力, 可能是过滤自然海水或人工海水能够作为棘皮动物精子冷冻保存稀释剂的原因。但随着棘皮动物精子在稀释液中时间的延长, 其质量会下降, 在今后研究中, 应继续了解棘皮动物精子的激活机制, 发掘具有更好冷冻保存效果的稀释剂, 从而延长精子的运动能力, 提高冷冻保存后的精子质量。

2.3 抗冻剂的选择

抗冻剂在精子超低温冷冻保存中非常重要, 如果精子在冷冻保存中没有抗冻剂的保护, 解冻后的精子质量极差, 并可能呈粘稠状, 无应用价值。抗冻剂按其穿透细胞膜的能力可分为渗透性抗冻剂(CPA)和非渗透性抗冻剂(co-CPA)(Dong *et al*, 2005b)。

2.3.1 渗透性抗冻剂 渗透性抗冻剂能够快速穿透细胞膜, 渗入细胞内部并与水和电解质结合, 在细胞内产生一定的摩尔浓度, 能够降低细胞内外未结冰电解质溶液的浓度、降低冰点、减少冰晶的形成, 同时, 能避免细胞内水分过分渗出造成细胞皱缩, 从而导致容积损伤(刘清华, 2005; 杨培民等, 2008)。常用的渗透性抗冻剂包括二甲基亚砜(DMSO)、甲醇(METH)、乙二醇(EG)、丙二醇(PG)、二甲基乙酰胺(DMA)和甘油(GLY)等, 其中, DMSO被极广泛应用于海洋鱼类和无脊椎动物精液超低温冷冻保存, 这与DMSO对精子的冷冻保护效果好且适用于大多数物种的精子有关(Liu *et al*, 2015; Shao *et al*, 2006)。同时, DMSO也在棘皮动物精子冷冻保存中提供了良好的冷冻保护作用。DMSO作用的最适浓度范围一般是5%~20%, 但Dunn等(1973)研究发现, DMSO在海星精子冷冻保存中的有效浓度范围是20%~30%, 这可能是由于海星新鲜精液中精子浓度比较低, 需要更多DMSO来起作用(表1)。不同浓度的EG、PG、METH、DMA和二甲基甲酰胺(DMF)被用于棘皮动物精子冷冻保存研究, 但其冷冻保护效果均不如DMSO(Shao

et al, 2006; 表1)。不同物种的精子具有特定的最适抗冻剂种类和浓度范围, 这与其物种特异性有关。例如, Behlmer等(1984)研究发现, GLY比DMSO对螯(*Limulus polyphemus* L.)的精液的保护效果更好; 浓度为10%的GLY也为罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)精子提供了更成功的冷冻保存结果(Akarasanon *et al*, 2004)。GLY已更成功地应用于虾、蟹精子的冷冻保存, 可能是由于GLY是虾、蟹动物脂代谢中的天然中间产物(Jeyalectumie *et al*, 1989)。但是, GLY却对海星、海胆、鲍鱼、牡蛎的精子具有毒害作用, 浓度为5%~40%的GLY能够导致上述物种的精子活力在冷冻前急剧降低(Dunn *et al*, 1973)。PG能有效保护牡蛎和海胆精子, 但其效果不及DMSO(Asahina *et al*, 1978)。

2.3.2 非渗透性抗冻剂(co-CPA) 葡萄糖(GLU)、海藻糖(TRE)、蔗糖(SUC)、蛋黄(Yolk)、甘氨酸(Gly)、聚乙二醇(PEG)和胎牛血清(FBS)等co-CPA在精液超低温冷冻保存中也发挥着重要的作用。co-CPA的添加被发现可显著改善精子冷冻保存后的存活率, 如胎牛血清的添加能够促进日本珍珠贝(*Pinctada fucata martensii*)精子解冻后的运动活力, 可能与胎牛血清能减少冷冻过程中精子所受的渗透效应和离子效应以及增强精子抵抗冷冻损伤的能力有关(Kawamoto *et al*, 2007)。Acosta-Salmón等(2007)研究表明, 单独使用海藻糖可达到与DMSO组合使用时相似的解冻后的精子活力。添加1%或2%的葡萄糖显著改善了解冻后澳洲绿边鲍鱼(*Haliotis laevis*)精子的受精率(Liu *et al*, 2014b)。此外, Liu等(2014a、2014b)研究表明, 甘氨酸在海洋软体动物的精子冷冻保存中起着积极的作用, 已被优先选择作为冷冻保护介质。Dong等(2006)认为, co-CPA具有冷冻保护效果, 与其能在冷冻保存过程中控制溶质的流入和流出来稳定精子膜有关, 鸡蛋黄的作用主要是与精子膜相互作用, 在冷冻过程中可以防止膜上脂类相态的变化以保护精子免受冷休克损伤; 单糖的作用主要是与膜上磷脂相互作用, 可维持膜的稳定性, 促进细胞脱水, 还能为精子的运动提供能量。

2.3.3 抗冻剂之间的组合 为达到更好的精子冷冻保存效果, 通常会将CPA与co-CPA组合搭配使用。Jeyalectumie等(1989)研究表明, 海藻糖单独用于锯缘青蟹(*Scylla serrata*)精子冷冻保存时效果较差, 而海藻糖与DMSO组合使用时, 解冻后精子的活力显著增加。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、细须石首鱼(*Icropogonias undulatus*)精液的低温保存中发现, DMSO与蔗糖或葡萄糖组合使用时, 具有正协同保护

表 1 海洋棘皮动物精子冷冻保存研究内容及结果总结
 Tab.1 Summary of research contents and results in marine echinoderms sperm cryopreservation

物种名 Species	精子采集方式 Collection of sperm	稀释剂+抗冻剂 Extender and Cryoprotectants	冷冻容器 Freezing vessel	稀释比例 Dilution ratio	平衡时间 Equilibration time	非程序两步 降温程序 Freezing	解冻条件 Thawing conditions	最佳结果及冻后精子质量 Best outcome	参考文献 References
海胆 Sea urchin									
绿色球海胆 <i>Strongylocentrotus drobachiensis</i> O.F.Müller	注射 0.5 mol/L KCl 溶液; 过滤自然海水+DMSO (6%、12%、18%、25%和 35%); 2 ml 冻存管			1 : 3; 30 min		降温速率 (-1, -5, -10 °C/min), 25 °C ~ -45 °C, 投入液氮	室温放置 45 min	-5 °C/min, 12%~18% DMSO, 保存 30 d; 精子活力等级 3~4, 受精率 >95%	Dunn 等 (1973)
砂币海胆 <i>Echinarachnius parma</i> Lamarck	解剖获得成熟性腺后剪碎; 过滤自然海水+DMSO (7.5%, 15%, 20%, 30%, 40%); 2 ml 冻存管			1 : 3; 30 min		降温速率 5 °C/min, 从 25 °C 到 -45 °C, 投入液氮	室温放置 45 min	-5 °C/min, 7.5%~15% DMSO, 保存 30 d; 精子活力等级 1, 未做受精率	Dunn 等 (1973)
马粪海胆 <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	解剖获得成熟性腺后剪碎; 过滤自然海水+EG (1.5 和 2 mol/L); 试管 (10 mm × 100 mm)			1 : 25; 15 °C, 1 h		降温速率 (-4.5 °C/min), 从 15 °C 到 -76 °C, 投入液氮	15 °C 水浴	1.5 mol/L EG, 保存 3 d; 精子解冻 10 min 后活力达到最大, 受精率 >66.7%	Asahina 等 (1978)
菱黄真海胆 <i>Evechinus chloroticus</i>	注射 1.5~3 ml 0.5 mol/L KCl 溶液; 含 0.3 或 0.5 mol/L 海藻糖的蒸馏水+EG、PG、DMSO (浓度 2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%和 15%); 0.25 ml 塑料麦管			1 : 5; 1 : 20;		降温速率 (-5 或 -50 °C/min), 从 0 °C 冷却至 -75 °C, 平衡 10 min 后, 投入液氮	15 °C 水浴 30 s	2.5%~7.5% DMSO, 稀释比例 1 : 20, 降温速率 -50 °C/min; 10 ⁶ 个精子/ml 用于受精实验, 可使受精率达 90% 以上	Adams 等 (2004)
青灰拟海胆 <i>Paracentrotus lividus</i> (Lmk, 1816)	注射 1 ml 0.5 mol/L KCl 溶液; 3 种抗冻剂配方 7% DMSO+0.04 mol/L 海藻糖 (Tre)、7% GLY+0.04 mol/L Tre、7% METH+0.04 mol/L Tre; 0.25 ml 麦管, 1.8 ml 冻存管			1 : 12; 3 种: E1 (4 °C, 10 min); E2 (18 °C, 10 min); E3 (4 °C, 10 min+1% 盐度抑制精子运动)		先平衡, 后以 20 或 90 °C/min 2 种降温速率冷却至 -80 °C, 后浸入液氮至少 20 min	30 °C 水浴	作者先验证了是 3 种平衡条件下 3 种抗冻保护剂配方的毒性, 选出每种平衡条件毒性最小的配方, 以此为基础运行 2 种降温速率进行实验, 最佳结果为 E3 Tre-DMSO -20 °C/min; (冻精/鲜精) 存活率 70%/90%, 快速运动精子比例 50%/85%, 与鲜精相比, 50% 的受精卵能正常发育。	Fabbrocini 等 (2014)

续表 1

物种名 Species	精子采集方式 Collection of sperm	稀释比例 Dilution ratio	非程序两步 降温法的降温程序 Freezing	解冻条件 Thawing conditions	最佳结果及冻后精子质量 Best outcome	参考文献 References
	稀释剂+抗冻剂 Extender and Cryoprotectants	平衡时间 Equilibration time				
	冷冻容器 Freezing vessel					
海参 <i>Sea cucumber</i>						
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka)	解剖获得成熟性腺后剪碎; 100%人工海水+ DMSO、甘油(浓度 5%、10%、15%和 20%) 0.5 ml PE 吸管	1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7 和 1 : 9; 室温 6 min	先平衡, 后以-77、-52、-35 和-19°C/min 4 种降温速率(距液氮液面分别 2、4、6 和 8 cm)放置至少 15 min, 投入液氮保存。	37°C 水浴	15% DMSO, 1 : 9, -35°C/min; 解冻后精子保持高活力约 10 min (60%~30%), 冻精受精率约 70%。	Shao 等 (2006)
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka)	解剖获得成熟性腺后剪碎; 人工海水+DMSO、METH、DMF、DMA、PG (浓度 0、5%、10%、15%、20%和 25%); 0.25 ml 麦管	1 : 20; <3 min	先平衡, 后根据样品距液面的高度 (5~17.5cm)调整降温速率 65~5.2°C/min, 冷却至-50°C, 立即投入液氮保存。	20°C 水浴 15 s	20% DMSO, 降温速率 10.4°C/min (距液面高度 15 cm); 冻精解冻后活力最高为(19.3±1.1)%, 受精率为 (89.8±1.7)%, 鲜精(92.7±1.8)%, 无显著差异。	Mizuno 等 (2019)
海星 Starfish						
寻常海盘车 <i>Asterias vulgaris</i> Verrill	解剖获得成熟性腺后剪碎; 过滤自然海水+ DMSO (12%、20%、30%和 40%); 2 ml 冻管	1 : 3; 30 min (碎冰上)	降温速率-5°C/min, 25°C~-45°C, 投入液氮	室温放置 45 min	-5°C/min, 20%~30% DMSO, 保存 30 d; 精子活力等级 3, 未做受精率	Dunn 等 (1973)
紫海星 <i>Pisaster ochraceus</i>	解剖获得成熟性腺后剪碎; 过滤自然海水+ 不同组合及浓度的 DMSO、甘油、蔗糖、蛋黄、肌酸和牛血清蛋白; 1 ml 冻管	1 : 9, 1 : 18	降温速率(距液面距离) 4.7 (40 mm)、9 (25 mm)和 12.6°C/min (10 mm), 静置 20 min 后, 投入液氮。	45°C 水浴	5% DMSO, 1% GLY, 40% 蛋黄, 20% 浓度为 1% 的蔗糖, 1 : 18, 12.6°C/min, 保存时间 2 年; 11%~29% 发育为正常胚胎	Jalali 等 (2012)

效应(Gwo *et al.*, 1991)。在棘皮动物精子超低温冷冻保存中,关于 co-CPA 以及 CPA 与 co-CPA 结合使用的研究相对较少(表 1)。不同物种有其最适种类或浓度的 CPA 和 co-CPA,这一差别可能因为亲本来源的地理位置不同,从而产生了精子相关特征的遗传变异(Thurston *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2005b)。

2.4 精液稀释比例和平衡时间

适宜的稀释比例和平衡时间对精子冷冻保存至关重要,在精子冷冻保存操作过程中,通常将冷冻保护液和精子按一定比例稀释混合并平衡一段时间,以达到用最适数量的冷冻精子实现最优冷冻保存结果的目的(Liu *et al.*, 2015)。

2.4.1 稀释比例 稀释比例是指精子和冷冻保护液在冷冻容器中的混合比例。稀释对精子冷冻保存非常重要,精子稀释程度低可能会导致解冻后精子发生有害凝集,而精子稀释程度高可能会导致精子能量的快速消耗、生理学改变以及精液中保护性成分减少,稀释程度的不当均可导致精子冻存后生存能力的下降(Paniagua-Chavez *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2005a)。Liu等(2015)研究指出,通过自然排精收集的精子浓度较小,其在超低温冷冻保存过程中的稀释倍数也较小,最大稀释倍数为1:10。棘皮动物精子获取方式多为解剖收取性腺,获取精液的精子密度高,在超低温冷冻保存过程中的稀释倍数也较高。研究表明,棘皮动物精子冷冻保存最适的稀释比例范围是1:3~1:20(Dunn *et al.*, 1973; Asahina *et al.*, 1978; Adams *et al.*, 2004; Fabbrocini *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2006; Mizuno *et al.*, 2019)。从不同个体性腺中取出新鲜精液的精子密度不同,若按照统一的稀释比例进行实验存在一定弊端,将精子稀释至特定浓度更能优化实验方案。Dong等(2006、2007)将太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)精子稀释至 1×10^9 个/ml, Liu等(2014b)将绿边鲍鱼精子浓度稀释至 1.6×10^8 个/ml,更有效地开展、比较并优化了精子冷冻保存的相关实验方案。

2.4.2 平衡时间 平衡时间是指精子与冷冻保护液接触混合至开始降温的时间段,平衡时间过短导致抗冻剂不能充分的进入精子细胞膜或与细胞膜结合,不能发挥其抗冻保护的作用;平衡时间过长,抗冻剂的毒害作用会对细胞造成不可逆转的损伤。在以往棘皮动物精子冷冻保存研究中,并没有考虑平衡时间这一因素对冷冻后保存效果的影响,在实验过程中,只设立了单一的平衡时间,没有设置对比, Mizuno等(2019)研究表明,平衡时间必须少于3 min,有的研究设置平衡时间为6~10 min(Shao *et al.*, 2006; Fabbrocini

et al., 2014),甚至为30 min(Dunn *et al.*, 1973)。Zheng等(2018)选取珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)为研究对象,研究了新鲜珠母贝精子在5种不同抗冻剂、5种浓度经历不同平衡时间作用后精子存活率的变化,并利用模型模拟提出了不同种类抗冻剂和不同抗冻剂浓度条件下应有的最大平衡时间,从而判定不同抗冻剂的毒性大小,并初步筛选排除出毒性大且不适用于精子冷冻保存的抗冻剂。

2.5 降温速率和解冻速率

降温速率和解冻速率亦对精子冷冻保存至关重要。降温速率太慢、冷冻效率低,抗冻剂对细胞的毒性作用会加剧,细胞膜上的脂质分子在高浓度电解质溶液中时间太长也会遭受损伤;降温速率太快,细胞膜外的结冰速率会高于细胞内的结冰速率,造成细胞膜外的溶质浓度和渗透压比膜内越来越高,可能造成渗透休克和冰晶损伤、并对细胞产生不可逆影响。解冻速率太慢,重结晶现象会加剧冰晶对细胞膜和细胞器的机械损伤;解冻速率太快,对解冻操作要求高,需要在很短的时间内结束解冻,并且高温可能会对细胞产生热应激,造成不可逆影响(Liu *et al.*, 2015)。因此,适宜的降温速率和解冻速率可以最低限度的降低冷冻保存过程对细胞造成的损伤。

2.5.1 降温速率 在精子超低温冷冻保存研究中,控制降温速率的方法可分为非程序两步降温法和程序降温法。非程序两步降温法通常使用带架子的泡沫聚苯乙烯盒子等工具。首先将样品快速降到距液氮面某一高度处,停留一段时间,使细胞充分脱水以减少胞内冰晶的形成,然后,投入到液氮中长期保存。该方法通过调节样品距液氮面的高度来控制冷冻速率,并通过热电偶测其冷冻速率,具有设备成本低且易于现场操作的优点。目前,棘皮动物精子超低温冷冻保存相关研究均采用非程序两步降温法。例如,在对刺参精液的超低温冷冻保存研究中, Shao等(2006)通过控制样品距液氮液面的高度(2、4、6和8 cm)来调整降温速率为-77、-52、-35和-19℃/min,放置15 min后,立即投入液氮保存,发现当降温速率为-35℃/min时,精子解冻后的受精率最高(70%)。同样, Mizuno等(2019)控制样品距液氮液面的高度为(5~17.5 cm)来调整降温速率为-5.2~65℃/min,将样品冷却至-50℃后,立即投入液氮保存,发现当降温速率为-10.4℃/min(距液氮液面高度15 cm)时,精子解冻后获得最高的受精率为(89.8±1.7)%,与新鲜精子的受精率[(92.7±1.8)%]无显著差异。对比不同的棘皮动物精子冷冻保存的研究发现,同样运用非程序两步降温法,不同研究得出的

最适降温速率差异较大,如-5、-20和-50℃/min。Dunn等(1973)和Asahina等(1978)的研究均表明,适合海胆精子的降温速率约为-5℃/min,而Adams等(2004)通过实验对比却发现,降温速率-50℃/min对海胆精子的冷冻效果明显比-5℃/min效果好,其中的原因有物种及其生存环境的差异,也有研究所使用的降温装置及冷冻容器的不同。

程序降温法指通过程序降温仪等仪器预先设计的冷冻程序来控制样品的冷冻速率,然后将样品投入液氮中保存。此种方法操作简单、能精确控制并灵活改变降温速率及平衡时间,有利于深入研究降温速率对精子冷冻保存的影响,但仪器较为昂贵,方法不易普及。程序降温法在海洋鱼类和软体动物精子冷冻保存研究中有使用,但在棘皮动物中并未使用。作者认为应将程序降温法和非程序两步降温法结合使用,通过程序降温法找到合适的降温速率及降温终点温度,并以此设计适合的装置,通过非程序两步降温法在实验室或养殖场验证与应用。

2.5.2 解冻速率 Liu等(2015)在海洋软体动物精子冷冻保存的解冻温度分为3个范围:低温(<29℃)、中温(30℃~49℃)和高温(>50℃)。按照此标准,以往棘皮动物精子冷冻保存研究的解冻温度属于中低温,解冻温度从室温、15℃~45℃水浴不等(Dunn *et al.*, 1973; Asahina *et al.*, 1978; Adams *et al.*, 2004; Fabbrocini *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2006; Mizuno *et al.*, 2019)。解冻操作的一般步骤为将样品从液氮中取出,置于特定温度水浴解冻,轻轻摇动使温度均匀,待只剩少量固体时立即取出,在空气中继续摇动使其完全融化。作者认为适合某一物种精子冷冻保存的解冻温度应模拟其自然排精、受精时的温度,既保证了有合适的解冻速率,又能保证解冻温度不会对精子产生温度应激。本团队实验结果显示,解冻温度为20℃、37℃和50℃对刺参冷冻保存精子解冻后的活力影响不显著($P>0.05$,未发表数据),这与Anchordoguy等(1988)研究中不同解冻温度对海虾(*Sicyonia ingentis*)冷冻保存精子活力影响的结果相似。但利用受精温度作为解冻温度可能会影响解冻的速率,从而造成解冻时的反玻璃化和重结晶等冷冻损伤。目前,仍缺乏能够为棘皮动物乃至整个水生物种精子的冷冻保存选择合适解冻温度的理论,解冻过程应当成为以后研究的重点。

2.6 精子质量评价

冷冻精子经解冻后应对其质量进行评价,评价精

子质量的参数包括运动活力、形态变化、受精率、孵化率、细胞器完整性及代谢机能(图1)。对冷冻精子进行全面系统的质量评价,并对比新鲜精子的相关参数,有利于进一步研究冷冻保存对精子的损伤机制。

2.6.1 运动活力和形态变化 冷冻精子运动能力测试与前述新鲜精子的运动能力测试相一致,一般有使用光学显微镜统计样本中运动精子的百分比来直接测量和通过CASA系统测量2种方式,近几年,CASA系统由于其较高的准确性和效率而被广泛应用(van der Horst *et al.*, 2018)。众多棘皮动物精子冷冻保存研究中并未使用CASA系统对冷冻保存后的精子进行活力检测,但Fabbrocini等(2017)利用CASA系统的特定分析模型对海胆(*Paracentrotus lividus*)的新鲜精子激活后不同时间的运动参数进行了详细评估,评估的精子运动参数包括精子存活率(TM,活动精子数占总精子数的百分比)、活力(RAP,快速前向运动精子占总精子数的百分比)、密度、存活时间、平均曲线运动速度(VCL, $\mu\text{m/s}$)、平均直线运动速度(VSL, $\mu\text{m/s}$)、平均路径速度(VAP, $\mu\text{m/s}$)、鞭打频率(BCF)、头部的侧摆幅度(ALH)等,并提出使用浓度为0.05%的胎牛血清(BSA)作为抗粘剂。该研究表明,海胆精子在激活后可保持1h的高活力,并保持相对运动活力达24h,比大多数鱼类精液稀释激活后保持高活力的时间更长,不需要抑制活力的过程。Fabbrocini等(2017)的研究为CASA系统在棘皮动物精子冷冻保存研究中的应用奠定基础,为棘皮动物激活后的精子在实验室研究中的应用提供数据支持。

对冷冻精子进行精子形态评估时,传统上是通过扫描或透射电子显微镜观察精子头部、中段、尾巴、顶体、线粒体和细胞核的变化。观察结果为了了解冷冻保存对精子结构上的损伤提供了有效信息(Espinoza *et al.*, 2010)。此外,CASA系统中的辅助形态分析模块还可协助区分精子的形态测量特性,进而提供有关精子冷冻保存后形态学变化及冷冻耐受能力的信息。目前,该技术已应用于山羊(Gravance *et al.*, 1995),欧洲鳗鱼(Asturiano *et al.*, 2007)和鹿(Esteso *et al.*, 2009)等物种,但不适用于海洋软体动物,其对棘皮动物是否适用有待研究。

2.6.2 受精率和孵化率 受精率和孵化率的检测,指测量精子与成熟卵子结合产生受精卵并正常发育的能力,是精子冷冻保存技术的关键步骤。冷冻精子的浓度以及精子与卵子的比率对于成功受精至关重要,较低或较高的浓度和精卵比都会影响受精率。冷冻保存后,大多数精子的顶体和质膜已经受损,受精

能力显著降低(Kurokura *et al*, 1990; Bury *et al*, 1993)。Kurokura 等(1989)研究表明, 冷冻后的海胆精子只有5%~12%在形态上是正常的。Kurokura 等(1990)研究表明, 经冷冻后的牡蛎精子由于顶体被破坏, 丧失了进入卵子的能力, 精子聚集, 导致受精率下降。冷冻保存精子的受精能力低于新鲜精子的受精能力, 因此, 受精实验中需要增加冷冻精子的数量。Adams 等(2004)对海胆新鲜精子和冷冻精子的研究表明, 为获得最大的受精率, 所需新鲜精子浓度约为 $10^5/\text{ml}$ (卵子与精子的比例为 1 : 1000), 而冷冻精子则至少需要 $10^6/\text{ml}$ 的浓度(卵子与精子的比例为 1 : 10000)。Shao 等(2006)也得到了同样的结果, 其研究结果显示, 刺参卵子与冷冻精子的比例为 1 : 10000 时的受精率显著高于二者比例为 1 : 1000 时的受精率 ($P < 0.05$)。

2.6.3 流式细胞术与细胞器完整性 电镜观察精子形态和受精率、检查精子活力等评估步骤执行较缓慢, 相比较而言, 流式细胞术具有在短时间内评估多个精子参数的优点。通过流式细胞仪和荧光显微镜, 可对冷冻前后精子的质膜(SYB/PI 染色, PMI)、线粒体膜电位[罗丹明 123/碘化丙锭(PI)染色, MMP]、顶体(DND/PI 染色, AI)和 DNA(AO 染色)等的完整性或损伤比例进行测定。如 PI 不能通过活细胞膜, 只可透过受损的细胞膜对细胞核染色(呈红色), 罗丹明 123 只可使线粒体功能完整的精子细胞着色(呈绿色), 因此, 通过罗丹明 123/PI 2 种染料进行荧光双染色及流式细胞仪观察, 可检测冷冻解冻后精子膜和线粒体结构及功能的损伤状况(Adams *et al*, 2003)。Adams 等(2004)利用流式细胞术比较了海胆精子在冻前冻后的细胞膜完整性和线粒体功能的变化情况, 研究表明, 较高浓度的 DMSO 在保留精子线粒体功能和膜完整性方面更为有效, 但精子的线粒体功能和膜完整性对冻前冻后不同海胆个体精子间的受精能力基本无影响。

2.6.4 代谢机能 精液经超低温保存后, 由于膜的损伤会导致精子内的酶渗漏到细胞外, 而导致胞内酶的活性降低, 精浆中酶的活性却大大提高。超低温保存还会导致细胞内 ATP 水平的变化。冷冻前后精液中酶活性及水平的分析测定, 不仅是评价低温保存成功与否的重要指标, 也是用来确定细胞损伤部位、研究损伤机理的有效途径(Chauhan *et al*, 1994)。如果参与三羧酸循环的有关的酶活性降低并伴有水平的下降, 则说明为精子提供能量的场所——线粒体受到损伤。常检测的酶主要有琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、 Na^+/K^+ -ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、

过氧化氢酶(CAT)与谷胱甘肽还原酶(GR)等。现有的棘皮动物精子冷冻保存研究中尚未提及冷冻前后精子代谢机能的变化情况, 下一步应借鉴鱼类精子冷冻保存方面的类似研究, 将该指标纳入棘皮动物精子冷冻前后质量评价体系。

3 总结与展望

综上所述, 精子超低温冷冻保存技术已广泛应用于人类辅助生殖、畜牧和水生经济动物育种中。棘皮动物精子冷冻保存的研究内容相对滞后, 此类研究中精子收集常用的方法是解剖获取性腺法; 常用的稀释剂和抗冻剂分别为海水和 DMSO; 平衡时间、稀释比例、降温速率和解冻温度等因素在筛选过程中因实验条件不同而呈现多种结果。应继续借鉴鱼类、软体动物精子的超低温冷冻保存技术, 不断丰富人们对超低温冷冻保存技术作用原理的认识, 同时, 根据棘皮动物精子自身的特点, 重点研究稀释剂的选择、解冻过程和产业化应用等内容。基于上述棘皮动物精子冷冻保存研究进展, 提出以下待解决的问题和建议。

3.1 获取高质量的新鲜精子

高质量的新鲜精子是冷冻保存成功的先决条件, 在进行超低温冷冻保存前, 应保证所用新鲜精子具有低温冷冻价值。为解决这个问题, 应建立一系列评价指标, 在精子冷冻保存前, 统计不同亲本个体的性腺指数、体重和年龄等参数, 并检测新鲜精子的各项运动参数; 用相同的冷冻保存技术流程对上述来自同物种不同个体的精子进行冷冻保存, 并对冷冻保存的精子进行质量评价; 将冷冻前亲本的性状参数及精子的运动参数与其相对应的冷冻保存精子质量评价结果相关联, 筛选影响精子冷冻后质量的关键参数, 做到从表型数据或新鲜精子的运动参数就能选择出高质量的精子。

3.2 开发新型抗冻剂

抗冻剂在冷冻保存技术中发挥着至关重要的作用, 相对来说, DMSO 是目前最符合“低毒、高效”标准的抗冻剂, 即使在低浓度下也能提高膜对 ATP 的渗透能力(Gironi *et al*, 2020)。应不断深入研究各种抗冻剂的保护机制, 根据抗冻剂的保护原理及抗冻剂具备的生化特性, 开发具备低毒、高效特点的新型抗冻剂, 为规范化超低温冷冻保存提供更多的选择。

3.3 优化超低温冷冻保存技术流程

超低温冷冻保存技术中每一种参数的筛选是相

对繁琐的工作, 如果对每一物种都进行重复的工作, 费时费力。应不断加强相关的理论研究, 如超低温冷冻对精子的损伤机制、抗冻剂对精子的保护机制、稀释剂抑制精子活力原理和精子激活机制等, 在此基础上针对每一物种精子的特性, 直接选择最适的稀释剂、渗透性抗冻剂、非渗透性抗冻剂, 并设计最适的降温程序及解冻程序。

3.4 精子超低温冷冻保存技术原理的拓展和应用

种质资源不仅只有精子, 还包含卵子和胚胎等。应将精子冷冻保存技术的原理和经验与卵子和胚胎相关方面的原理和经验相结合, 不断丰富超低温冷冻保存原理, 并应用于生产实践, 建立种质资源库。棘皮动物的卵子和胚胎能否有效冷冻? 冷冻精子和冷冻卵子受精后, 受精率和孵化率如何? 通过冷冻整个性腺得到冷冻的精(卵)母细胞解冻后能否培养为成熟精(卵)子并有效应用? 这一系列问题均有待解决。相信随着科学技术的发展, 研究方法和手段的不断更新, 超低温冷冻保存技术会越来越成熟, 棘皮动物种质资源会得到有效的保护, 可持续地为全人类提供更多优质蛋白质和皂苷等营养物质。

参 考 文 献

- Acosta-Salmón H, Jerry DR, Southgate PC. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology*, 2007, 54(1): 13–18
- Adams SL, Hessian PA, Mladenov PV. Cryopreservation of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) sperm. *CryoLetters*, 2004, 25(4): 287–299
- Adams SL, Hessian PA, Mladenov PV. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2003, 44(1): 45–51
- Akarasanon K, Damrongphol P, Poolsanguan W. Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 2004, 35(15): 1415–1420
- Anchordoguy T, Crowe JH, Griffin FJ, *et al.* Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *sicyonia ingentis*. *Cryobiology*, 1988, 25(3): 238–243
- Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: Indications, methods and results. *Journal of Urology*, 2003, 170(4): 1079–1084
- Asahina E, Takahashi T. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of sea urchin. *Cryobiology*, 1978, 15(1): 122–127
- Asturiano JF, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, *et al.* Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 2007, 42(2): 162–166
- Behlmer SD, Brown G. Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 1984, 7: 193–199
- Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, *et al.* Frozen semen production performance of murrh buffalo bulls. *Buffalo Bulletin*, 2011, 30(2): 157–162
- Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Experimental Zoology*, 1997, 277(4): 326–336
- Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—A review. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1761–1805
- Bury NR, Olive PJW. Ultrastructural observations on membrane changes associated with cryopreserved spermatozoa of 2 polychaete species and subsequent mobility induced by quinacine. *Invertebrate Reproduction and Development*, 1993, 23(2–3): 139–150
- Chauhan MS, Kapila R, Gandhi KK, *et al.* Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia*, 1994, 26(1): 21–26
- Coloma MA, Toledano-Diaz A, Castano C, *et al.* Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology*, 2011, 76(9): 1695–1705
- Dong QX, Eudeline B, Huang CJ, *et al.* Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, 2005a, 50(1): 1–16
- Dong QX, Huang CJ, Eudeline B, *et al.* Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities. *Aquaculture*, 2007, 271(1–4): 537–545
- Dong QX, Huang CJ, Eudeline B, *et al.* Systematic factor optimization for sperm cryopreservation of tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Theriogenology*, 2006, 66(2): 387–403
- Dong QX, Huang CJ, Eudeline B, *et al.* Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, 2005b, 51(2): 176–197
- Dunn RS, McLachlan J. Cryopreservation of echinoderm sperm. *Canadian Journal of Zoology*, 1973, 51(6): 666–669
- Espinoza C, Valdivia M, Dupré E. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2010, 38(1): 121–127
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, *et al.* Identification of sperm-head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reproduction in Domestic Animals*, 2009, 44(2): 206–211
- Fabbrocini A, D'Adamo R, Pelosi S, *et al.* Gamete cryobanks for

- laboratory research: Developing a rapid and easy-to-perform protocol for the cryopreservation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816) spermatozoa. *Cryobiology*, 2014, 69(1): 149–156
- Fabbrocini A, D'Adamo R. Motility of sea urchin *Paracentrotus lividus* spermatozoa in the post-activation phase. *Aquaculture Research*, 2017, 48(11): 5526–5532
- Gallego V, Pérez L, Asturiano JF, *et al.* Sperm motility parameters and spermatozoa morphometric characterization in marine species: A study of swimmer and sessile species. *Theriogenology*, 2014, 82(5): 668–676
- Gironi B, Kahveci Z, McGill B, *et al.* Effect of DMSO on the mechanical and structural properties of model and biological membranes. *Biophysical Journal*, 2020, 119(2): 274–286
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial-function using flow-cytometry. *Biology of Reproduction*, 1990, 43(1): 55–64
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 1995, 44(7): 989–1002
- Gwo JC, Chen CW, Cheng HY. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*, 2002, 58(8): 1563–1578
- Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, *et al.* Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 1991, 94(4): 355–375
- Jalali A, Crawford B. A freezing technique that maintains viability of sperm from the starfish *Pisaster ochraceus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2012, 56(3): 242–248
- Janett F, Thun R, Bettschen S, *et al.* Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Animal Reproduction Science*, 2003, 77(3–4): 213–221
- Jeyalectumie C, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biological Bulletin*, 1989, 177(2): 247–253
- Kawamoto T, Narita T, Isowa K, *et al.* Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, 2007, 54(1): 19–26
- Kurokura H, Namba K, Ishikawa T. Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(11): 1803–1806
- Kurokura H, Yagi N, Hirano R. Studies on cryopreservation of sea urchin sperm. *Aquaculture Science*, 1989, 37(3): 215–219 (in Japanese)
- Liao YL, Xiao N. Species composition and faunal characteristics of echinoderms in China seas. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 729–736 [廖玉麟, 肖宁. 中国海棘皮动物的种类组成及区系特点. *生物多样性*, 2011, 19(6): 729–736]
- Liu QH. Study on spermatozoa cryopreservation and cryodamage in Red Seabream (*Pagrosomus major*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2005 [刘清华. 真鲷(*Pagrosomus major*)精液超低温保存及其低温损伤研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2005]
- Liu YB, Li XX, Robinson N, *et al.* Sperm cryopreservation in marine mollusk: A review. *Aquaculture International*, 2015, 23(6): 1505–1524
- Liu YB, Li XX, Xu T, *et al.* Improvement in non-programmable sperm cryopreservation technique in farmed greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Aquaculture*, 2014a, 434: 362–366
- Liu YB, Xu T, Robinson N, *et al.* Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Cryobiology*, 2014b, 68(2): 185–193
- Lyons L, Jerry DR, Southgate PC. Cryopreservation of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) spermatozoa: Effects of cryoprotectants on spermatozoa motility. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1187–1190
- Mizuno Y, Fujiwara A, Yamano K, *et al.* Motility and fertility of cryopreserved spermatozoa of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Research*, 2019, 50(1): 106–115
- Mocé E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 2009, 110(1–2): 1–24
- Orgal S, Zeron Y, Elier N, *et al.* Season-induced changes in bovine sperm motility following a freeze-thaw procedure. *Journal of Reproduction and Development*, 2012, 58(2): 212–218
- Paniagua-Chavez CG, Buchanan JT, Tiersch TR. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. *Journal of Shellfish Research*, 1998, 17(1): 231–237
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology*, 2001, 43(3): 211–223
- Pawson DL. Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, 2007, 1668: 749–764
- Qi WS, Jiang J, Tian YS, *et al.* Sperm cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 26–33 [齐文山, 姜静, 田永胜, 等. 云纹石斑鱼精子冷冻保存. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 26–33]
- Rozati H, Handley T, Jayasena C. Process and pitfalls of sperm cryopreservation. *Journal of Clinical Medicine*, 2017, 6(9): 1–13
- Shao MY, Zhang ZF, Yu L, *et al.* Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm. *Aquaculture Research*, 2006, 37(14): 1450–1457
- Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, *et al.* Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2015, 61(1): 1–12
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation? *CryoLetters*, 2002, 23(4): 255–262
- Tian YS, Chen SL, Ji XS, *et al.* Cryopreservation of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* sperm. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 97–102 [田永胜, 陈松林, 季相山, 等. 半滑

- 舌鳎精子冷冻保存. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 97-102]
- Tian YS, Tang J, Ma WH, *et al.* Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tulcula* (♂) using cryopreserved sperm. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 36-47 [田永胜, 唐江, 马文辉, 等. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 36-47]
- Tsai S, Lin C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2012, 55(3): 425-433
- van der Horst G, Bennett M, Bishop JDD. CASA in invertebrates. *Reproduction Fertility and Development*, 2018, 30(6): 907-918
- Vitiello V, Carlino PA, Del Prete F, *et al.* Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. *Cryobiology*, 2011, 63(2): 118-124
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Technical monograph for health culture and disease control of sea cucumber. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Yang PM, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Ultrastructure and cryodamage studies of *Patinopecten yessoensis* sperm by electron microscopy. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(1): 98-102 [杨培民, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 虾夷扇贝精子形态结构和超低温冷冻损伤的电镜观察. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 98-102]
- Zheng X, Gu ZF, Huang ZW, *et al.* The effects of cryoprotectants on sperm motility of the Chinese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, 2018, 82: 64-69

(编辑 马瑾艳)

Progress in Research on Cryopreservation Technology for Echinoderm Sperm

XU Shuai^{1,2}, SUN Jingchun¹, LIU Shilin^{1,2}, LIN Chenggang^{1,2},
ZHANG Libin^{1,2}, SUN Lina^{1,2}, YANG Hongsheng^{1,2,3}①

(1. Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences Engineering Laboratory for Marine Ranching, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;

3. Innovation of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Echinoderms hold the highest evolutionary status among the invertebrates and some species in the class Holothuroidea (sea cucumber) and Echinoidea (sea urchin) have very high economic and nutritional values. However, because of the impact of human activities, the number and biodiversity of several echinoderm species have severely declined, and germplasm degradation has been especially prominent in recent years, mainly manifesting as slow growth, frequent diseases, and low survival rates. Therefore, the preservation of germplasm resources is critical. Cryopreservation is an important method for the long-term preservation of germplasm resources. It has the advantages of breaking through geographical isolation, realizing distant hybridization, protecting germplasm resources, solving the problem of germplasm degradation, and protecting endangered species. This article reviews the progress in research on the cryopreservation of sperm of three major echinoderms (sea urchins, sea cucumbers, and starfish), and describes the various steps in sperm cryopreservation processes, such as sperm collection, extender and cryopreservation preparation, balance, cooling, thawing, and quality evaluation, to provide a ready reference for the future research and the industrial application of cryopreservation to echinoderm germplasm resources.

Key words Echinoderm; Sperm; Cryopreservation technology

① Corresponding author: YANG Hongsheng, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201204001

http://www.yykxjz.cn/

左闪, 温争争, 周红学, 倪乐海, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 基于 MSAP 技术的刺参选育群体基因组表观与序列遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 38–45

Zuo S, Wen ZZ, Zhou HX, Ni LH, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. Evaluation of epigenetic and genome sequence diversity in sea cucumber *Apostichopus japonicus* selected population based on MSAP technology. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 38–45

基于 MSAP 技术的刺参选育群体基因组 表观与序列遗传多样性分析*



左 闪^{1,2,3} 温争争^{1,2,3} 周红学⁴ 倪乐海⁵ 孙国华^{3,6①}
冯艳微³ 王卫军³ 杨建敏³

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 3. 鲁东大学农学院 烟台 264025; 4. 山东省农业农村厅 济南 250013; 5. 山东省渔业技术推广站 济南 250013; 6. 烟台海育海洋科技有限公司 烟台 264001)

摘要 抗逆选育引起的遗传变化不仅源于 DNA 序列的变化, 也有来自于表观层面的修饰改变。为探究刺参(*Apostichopus japonicus*)耐高温新品系育种过程中的选育基础群体与选育群体的遗传多样性, 运用 MSAP 技术分析了选育基础群体 F、选育 F₁ 代和选育 F₄ 代的基因组遗传多样性。结果显示, 10 对引物获得的 806 个位点中, 多态性位点为 698 个, 多态性百分比达到 86.60%; 基于非甲基化位点的遗传分析, 选育 F₄ 代香农多态性指数为 0.3981, Nei 基因多样性为 0.2264; 基于甲基化敏感位点分析, 选育 F₄ 代香农多态性指数为 0.5873, Nei 基因多样性为 0.2598, 均高于基础群体; 表观遗传多样性均大于非甲基化位点变异产生的序列遗传多样性, 表明表观变异出现频率高于序列遗传变异。MSAP 甲基化模式分析显示, 选育 F₁ 和 F₄ 代经过选育后获得了一些甲基化水平和模式的改变, 说明经温度胁迫选育, 改变了刺参群体的基因组的甲基化状态。选育 F₄ 代获得的类型 II 的条带数最多, 为 161 条, 明显高于未选育刺参, 为选育获得表观遗传特征。研究结果从遗传物质基础角度揭示了选育群体的遗传改变与进展, 可为抗逆新品种选育中的表观遗传研究提供参考。

关键词 刺参; MSAP; DNA 甲基化; 选育群体; 遗传多样性

中图分类号 S968.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)03-0038-08

刺参(*Apostichopus japonicus*), 又称仿刺参, 生活在岩礁底的浅海中, 广泛分布于西太平洋沿岸浅海。随着刺参养殖规模的迅速扩大, 刺参产业发展面临的种质退化、病害频发、极端气候灾害等严峻问题

日益突出(高凯伦, 2018; 张春云等, 2004)。目前, 刺参苗种产业中亲参的来源主要是遗传背景不清楚的“野生”刺参以及累代繁育的人工养殖刺参, 由此构成的苗种繁育的种质基础群体, 其后代往往出现生长

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901601; 2018YFD0901602)、山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)和泰山产业领军人才(tscy20190114)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Project of Science and Technology Ministry (2018YFD0901601; 2018YFD0901602), Modern Agricultural Technology System of Shandong Province (SDAIT-22-02), and Taishan Industry Leading Talent (tscy20190114)]. 左 闪, E-mail: zs140608@163.com

① 通讯作者: 孙国华, 研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2020-12-04, 收修改稿日期: 2020-12-29

缓慢、个体差异大、应激性差、抗逆抗病性弱等现象, 严重影响了刺参养殖产业的健康发展(侯西坦, 2016; 曲洪霞等, 2016)。与此同时, 近年来气候变化带来的极端高温天气造成山东、辽宁等大面积养殖池塘刺参大量死亡, 对沿海刺参养殖产业带来沉重打击。因此, 培育刺参优良抗逆新品种是解决刺参优良种质匮乏和安全度夏瓶颈问题的重要出路, 刺参种业关乎刺参产业乃至整个水产养殖业的提质增效和稳定发展。针对目前对优良种质的需求, 全国多团队进行了不同表型特征刺参的新品种创制和研发, 本课题组经过连续4代多年的高温驯化和胁迫选育, 培育出一个高温耐受性能提高的刺参新品系, 在养殖生产试验中表现出度夏成活率高、产量提高等优势。

近20年以来, 表观遗传学研究取得了长足进展, 已有研究表明, 遗传表型改变不仅来源于DNA序列的改变, 也存在不依赖序列变化的表观遗传修饰。表观遗传变异研究主要有DNA的甲基化修饰、核小体中组蛋白翻译后修饰、非编码RNA调控、组蛋白变体及受催化的染色质重塑等方面(Wolffe *et al.*, 1999; 王淑妍等, 2016; 康静婷等, 2013)。DNA甲基化是表观遗传修饰的一个重要方式, 也是目前在机制方面研究相对最多、最深入的表观遗传过程(邱峥艳等, 2012)。环境条件变化能够诱导DNA甲基化发生变异, 并且环境条件变化能够诱导具有持续性和可遗传性的DNA甲基化和表观变异(李佳蓉等, 2018)。某些DNA甲基化在多种表观遗传机制中具有中心协调的作用, 可以在后代进行稳定传递, DNA甲基化的这些特性决定其在动植物育种中, 特别是抗逆性状的遗传改良方面具有非常大的应用潜力。在我们的刺参耐高温品系的选育过程中, 其抗逆耐高温性状是在胁迫环境条件下驯化和筛选获得, 这种优良性状是否具有表观遗传层面的遗传基础, 需要进行探究。

甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphisms, MSAP)技术是DNA甲基化模式研究最有效且经济实用的应用技术(Angers *et al.*, 2010; Guarino *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2015), 由于采用的限制酶的位点特性, 可以同时进行甲基化敏感位点表观遗传多样性分析, 也可以进行非甲基化多态位点的遗传多样性分析(吴彪等, 2015; Zhao *et al.*, 2015)。本研究运用MSAP技术分析了刺参育种过程中的选育基础群体和2个选育群体(选育F₁代和选育F₄代)3个刺参群体的DNA甲基化多态性和模式, 揭示不同刺参群体的表观遗传多样性及其遗传结构, 就选育活动对基因组DNA甲基化的影响进行探讨, 以

期从表观遗传学角度来阐释选育过程中的遗传基础的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用群体为刺参耐高温新品系选育过程中的选育基础群体F、选育F₁代和选育F₄代。其中, 基础群体为4个种质保护区野生刺参群体繁殖获得, 选育F₁代和F₄代为选育过程代表群体, 是采用群体选育技术经过浮游幼体期27℃热驯化120 min和16月龄期32℃高温胁迫72 h淘汰选择, 并辅以生长速度筛选获得。在选育生产过程中, 由于亲本较为珍贵, F₂和F₃亲本较少, 没有保留用作分析样本, F₁和F₄作为选育初和选育完成群体可以代表选育过程且能体现选育的遗传特征。3个刺参群体分别记作F、F₁和F₄。从3个群体中分别随机选取18月龄、体重为200 g左右的15头刺参保存待分析。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 剖取待测刺参的肌肉附带内膜组织, 用于全基因组DNA提取, 采用改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法进行(全志星等, 2017)。取组织块约50 mg, 置于预冷的研钵中, 在液氮中充分碾磨后, 加入65℃预热的CTAB裂解液[2% CTAB (W/V), 0.2 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 0.05 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1.4 mmol/L NaCl, 2% β-巯基乙醇(V/V) 1 ml, 1% PVP-40(W/V)], 等体积氯仿抽提上清液后, 用3 mmol/L 醋酸钾和异丙醇沉淀DNA, 最后经无水乙醇漂洗, 加入1 mmol/L NaCl溶解DNA, 通过1.5%琼脂糖电泳检测DNA是否降解, 检测OD_{260 nm/280 nm}以确定DNA的纯度, 存于-20℃中备用。

1.2.2 MSAP实验流程 参考郭婷婷等(2013)的方法并进行优化, 所用引物和接头序列见表1。

选用EcoR I、Msp I和Hpa II进行酶切反应, 分别以2种酶切组合进行样品DNA的酶切, 即EcoR I+Hpa II和EcoR I+Msp I。10 μmol/L的EcoR I-A和100 μmol/L的M-H-A单链等体积混合制备接头, 0.5 μl接头与上述酶切产物15 μl、175 U的T4连接酶在25 μl连接体系下, 16℃水浴过夜, 获得连接产物。以引物E00-A和MH00-T进行预扩增, PCR反应条件: 94℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃延长5 min, 最后4℃保存。以选择性扩增引物的不同组合进行选择性的扩增,

表1 MSAP引物和接头序列
Tab.1 MSAP primer and linker sequence

名称 Name	接头与引物 Linker and primer	接头及引物序列 Sequence of linker and primer
接头 Linker	<i>EcoR</i> I -A	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	M-H-A	5'-GACGATGAGTCTAGAA-3' 3'-CTACTCAGATCTTGC-5'
预扩增引物 Pre-amplification primer	E00-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	MH00-A	5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'
选择性扩增引物 Selective amplification primer	<i>EcoR</i> I	E1 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
		E2 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
		E3 5'-GACTGCGTACCAATTACA-3'
		E4 5'-GACTGCGTACCAATTCAAGT-3'
		E5 5'-GACTGCGTACCAATTCAATC-3'
	M-H	M1 5'-FAMGATGAGTCTAGAACGGTAC-3'
		M2 5'-FAMGATGAGTCTAGAACGGTAG-3'
		M3 5'-GATGAGTCTAGAACGGTTC-3'

注：斜体表示选择性碱基，加粗为核心序列，下划线表示酶切位点

Note: Italic indicates selective bases, bold is core sequence, and underline indicates restriction site

PCR反应条件:94℃预变性2 min,94℃ 30 s,65℃ (每个循环递减1℃) 30 s, 72℃ 1 min, 共进行10个递减循环;94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min, 20个循环,72℃保温延长5 min,最后4℃保存。

1.2.3 MSAP 数据分析 通过优化MSAP实验条件,从不同引物组合中筛选多态性好、重复性高、条带清晰的10对引物组合进行实验分析。利用Quantity One软件标记出5%聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中100~500 bp区间扩增出来的条带。根据扩增产物在2个泳道内有无的情况,可将条带类型分为4种,I型2个泳道均有带;II型H泳道有带,M泳道无带,代表半甲基化位点;III型H泳道无带,M泳道有带;IV型2个泳道均没有带。根据Cervera等(2002)提出的方法,把MSAP二维矩阵数据分为甲基化敏感位点(Methylation-susceptible loci, MSL)和非甲基化位点(Non-methylated loci, NML)两大类。MSL指只能够被*Hpa* II或*Msp* I中的一种酶切开,为(1,0)或(0,1)情况,即甲基化模式(II、III型)记为1,其余模式(I、IV型)记为0。NML指同时能被*Hpa* II和*Msp* I酶切开,为(1,1)情况,即甲基化模式I型记为1,其余模式(II、III、IV型)都记为0。

利用Popgene软件对等位基因数、杂合度、香农多态性指数等种群遗传学参数进行分析和计算。通过NTsys软件将0/1矩阵转化成相应的MSP(甲基化敏感位点)和MISP(甲基化不敏感位点)聚类图谱,基于甲基化敏感位点的表观遗传距离和基于非甲基化位点的遗传距离进行Mantel检验。

2 结果与分析

2.1 刺参群体MSAP多态性及遗传多样性

刺参群体遗传多样性的各项指标显示(表2),10对引物获得的806个位点中,多态性位点数量为698个,多态性位点的百分比为86.60%,表明本研究所用引物组合适用于刺参群体表观遗传多样性的研究。10对引物观察等位基因数(N_o)平均值为1.8767,有效等位基因数(N_e)平均值为1.4809,平均杂合度(H)为0.2897,平均香农多态性指数(I)为0.4439。引物组合E3M3多态性位点百分比高达95.51%,产生的 N_o 、 N_e 、 H 和 I 高于其他所有引物组合,是遗传多样性贡献率最大的引物对;引物组合E1M1的 N_e 、 H 和 I 均为最低值,是遗传多样性贡献率最低的引物对。

2.2 MSL/NML遗传多样性信息

分别对3个刺参群体进行甲基化敏感位点(MSL)和非甲基化位点(NML)的多态性统计与分析(表3),NML百分比在47.7%~50.1%范围内;香农多态性指数 I 为0.3981~0.4662,Nei's基因多样性 H 为0.2264~0.2475,选育基础群体F的种群多态性指数最高。MSL百分比在63%~65%范围内; I 为0.5873~0.6030, H 为0.2598~0.2892。无论是以MSL还是NML计算的遗传多态性指数,选育F₁代和F₄代均小于选育基础群体F,表明选育降低了群体的遗传多样性。选育F₁代和F₄代的NML百分比分别为50.1%和47.7%; I 分

别为 0.4337 和 0.3981; H 分别为 0.2460 和 0.2264。选育 F_1 代和 F_4 代的 MSL 百分比分别为 66% 和 65%; I 分别为 0.5995 和 0.5873; H 分别为 0.2654 和 0.2598。无论是以 MSL 还是 NML 计算的遗传多态性指数,

选育 F_1 代均高于 F_4 代, 说明随着群体选育代数的累加, 群体遗传多样性具有逐渐降低的趋势。同时, 基于 MSL 计算都大于基于 NML 得到的遗传多样性, 表明表观变异出现频率高于基因序列遗传变异。

表 2 引物组合的遗传多样性信息

Tab.2 Genetic diversity information of primer combinations

引物 Primer	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Number of Effective alleles (N_e)	杂合度 Heterozygosity (H)	香农多态性指数 Shannon polymorphism Index (I)	多态位点数 Number of polymorphic sites	总位点数 Total number of sites	多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites
E1M1	1.7833±0.4155	1.4438±0.3418	0.2558±0.1814	0.4012±0.2537	47	60	78.33
E1M3	1.7273±0.4488	1.5096±0.3550	0.2927±0.1950	0.4276±0.2782	48	66	72.73
E2M2	1.9254±0.2648	1.5098±0.3069	0.3034±0.1531	0.4662±0.2019	62	67	92.54
E2M3	1.8955±0.3081	1.5194±0.3019	0.3124±0.1529	0.4707±0.2073	55	67	82.09
E3M1	1.8736±0.3343	1.4515±0.3052	0.2781±0.1608	0.4259±0.2199	76	87	87.36
E3M3	1.9551±0.2084	1.5256±0.2909	0.3188±0.1389	0.4842±0.1787	85	89	95.51
E4M2	1.8082±0.3964	1.4369±0.3260	0.2659±0.1730	0.4047±0.2415	59	73	80.82
E5M1	1.9381±0.2421	1.5278±0.3097	0.3162±0.1484	0.4784±0.1930	91	97	93.81
E5M2	1.9286±0.2589	1.4807±0.3123	0.2934±0.1520	0.4499±0.1988	85	98	86.93
E5M3	1.9314±0.2455	1.4044±0.2806	0.2600±0.1432	0.4303±0.1897	90	102	88.24
平均/总 Mean/Total	1.8767	1.4809	0.2897	0.4439	698	806	86.80

表 3 3 个刺参群体 MSAP 多态性及遗传多样性

Tab.3 MSAP polymorphism and genetic diversity of three *A. japonicus* populations

群体 Population	遗传参数 Genetic parameters	选育基础 F Control F	选育 F_1 Selected F_1	选育 F_4 Selected F_4	
非甲基化位点 Non-methylated loci (NML)	总位点数 Total number of sites	418	390	391	
	多态位点数 Number of polymorphic sites	201	195	187	
	多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites (%)	48.2	50.1	47.7	
	香农多态性指数 Shannon polymorphism index	0.4662	0.4337	0.3981	
	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity	0.2475	0.2460	0.2264	
	甲基化敏感位点 Methylation-susceptible loci (MSL)	总位点数 Total number of sites	399	411	408
		多态位点数 Number of polymorphic sites	251	271	265
多态性位点百分比 Percentage of polymorphic sites (%)		63	66	65	
香农多态性指数 Shannon Polymorphism Index		0.6030±0.0917	0.5995±0.0970	0.5873±0.0986	
Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity		0.2892	0.2654	0.2598	

2.3 刺参群体的甲基化模式

根据 MSAP 获得的 4 种带型进行不同甲基化模

式的统计, 表 4 为 3 个刺参群体甲基化类型统计结果, 类型 I 条带数百分比为 48.39%~51.86%, 选育基础群

体获得的类型 I 条带数最多, 为 418 条; 类型 IV 条带数最少, 占比 12.28%~13.03%。类型 II 条带数百分比为 15.76%~19.98%, 选育 F₁ 和 F₄ 代获得的类型 II 条带数较选育基础群体有所增高, 其中, F₄ 代最多, 为 161 条。选育 F₁ 和 F₄ 代的类型 III 和类型 IV 条带数相近。

半甲基化和全甲基化总体称整体甲基化, 将整体甲基化、半甲基化和全甲基化模式比较分析发现(图 1), 选育基础群体半甲基化低于全甲基化, 2 个选育群体半甲基化位点升高, 整体甲基化水平高于选育基础群体, 选育 F₁ 和 F₄ 代呈现相同的改变趋势。

表 4 3 个刺参群体 DNA 甲基化类型统计

Tab.4 Statistics of DNA methylation types of three *A. japonicus* populations

群体 Population	I 型条带 Type I strip		II 型条带 Type II strip		III 型条带 Type III strip		IV 型条带 Type IV strip	
	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage	数量 Amount	百分比 Percentage
	选育基础 F Control F	418	51.86	127	15.76	162	20.10	99
选育 F ₁ Selected F ₁	390	48.39	159	19.73	152	18.86	105	13.03
选育 F ₄ Selected F ₄	391	48.51	161	19.98	150	18.61	104	12.90

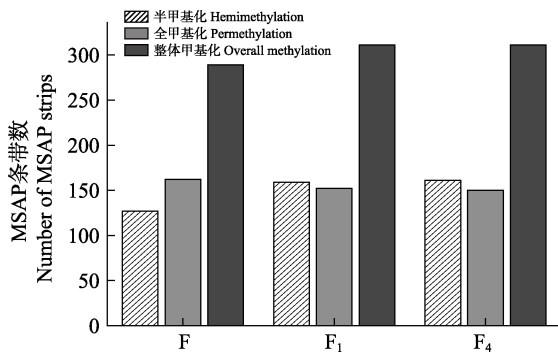


图 1 3 个刺参群体甲基化状态比较

Fig.1 Comparison of the methylation status of three *A. japonicus* populations

2.4 表观遗传距离与遗传距离的 Mantel 检验

对刺参 3 个群体基于甲基化敏感位点和非甲基化位点的遗传距离进行 Mantel 检验, 结果显示, 相关系数 r 值为 0.305~0.480, 平均值为 0.373, 种群的表观遗传距离与序列遗传距离的相关性均达到显著水平($P < 0.01$), 说明基于甲基化敏感位点计算的表观遗传变异一定程度上依赖于序列遗传变异(表 5)。

表 5 3 个刺参群体种群遗传距离与表观遗传距离的 Mantel 检测

Tab.5 Mantel detection of population genetic distance and epigenetic distance of three *A. japonicus* populations

群体 Population	r	P
选育基础 F Control F	0.333	<0.01
选育 F ₁ Selected F ₁	0.305	<0.01
选育 F ₄ Selected F ₄	0.480	<0.01
平均 Average	0.373	-

3 讨论

3.1 DNA 甲基化与遗传育种

生物体通过基因表达的改变来实现表型上的改变, 借助表型上的变化来不断进行生理及行为上的调节, 进而适应环境变化, 在基因表达调控方式中, 作为表观遗传重要内容的 DNA 甲基化是重要途径之一(王忠华等, 2013)。目前, 很多研究已经证明环境胁迫刺激能够使生物体通过改变 DNA 甲基化状态从而调控基因的表达以适应新环境(甄艳等, 2018; 高凯伦, 2018)。生物外界生存环境条件的改变, 不仅可通过 DNA 甲基化修饰对生物体本身产生表观遗传上的变异, 有些 DNA 甲基化修饰还可以经遗传传递给后代(Kakutani *et al*, 1999), 这些环境胁迫诱导的 DNA 甲基化修饰通常认为具有可逆或可丢失性, 但越来越多的研究证明, 有些 DNA 甲基化比较稳定并可以延续若干个世代(Kakutani, 2002), 这种现象称为跨代遗传, 这一特点为 DNA 甲基化等表观遗传变异在动植物育种上的应用提供了可能。DNA 甲基化在优良性状新品种的育种工作中, 尤其是抗逆性状的遗传改良方面具有巨大的应用潜力(Richardson *et al*, 2006; Schmitz *et al*, 2013; Ruizgarcia *et al*, 2005)。

环境胁迫对生物体基因组 DNA 甲基化的影响是复杂多向的, DNA 甲基化的变化不仅可以产生有利的表型变异, 也可能产生有害的表型变异, 而目前进行有益性状表型的育种还不能通过有目的地改变 DNA 甲基化状态来实现。在本研究刺参的耐高温品

系的育种过程中,对选育群体进行了多次的高温胁迫淘汰,这种环境胁迫是否通过 DNA 甲基化的修饰改变获得了有利的表型,增强了刺参选育系的耐高温抗逆性状,需要探究。现阶段利用 DNA 甲基化的检测方法追踪检测刺参育种过程中表观遗传的改变,可以为后期更深入利用表观遗传修饰来进行抗逆品种的培育和遗传改良提供理论依据。

3.2 选育群体的遗传多样性

MSAP 检测到条带分为甲基化敏感位点和非甲基化位点。甲基化敏感位点的多态性是由 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化变化引起,一般认为,甲基化变异易受环境的诱导(Richards *et al*, 2010; Schmid *et al*, 2018; 郭万里, 2006)。本研究中,基于甲基化敏感位点的 Shannon 指数,即能够表示表观遗传多样性的参数,在基础群体和选育群体中有所改变,可以推测选育群体在高温胁迫淘汰选育环境下发生了甲基化变异。非甲基化位点变异主要由基因组序列变异引起,可以利用这些序列变异评估群体遗传多样性。本研究表明,随着选育世代的增加,基于非甲基化位点的 Shannon 多样性指数逐渐降低, $F > F_1 > F_4$, 说明选育的筛选措施降低了种群的遗传多样性,种群的非甲基化位点变异出现随选育增强的渐变特征。另外,基于甲基化敏感位点计算得到的表观遗传多样性都大于基于非甲基化位点变异得到的遗传多样性,在 3 个选育相关种群中,表观变异出现频率高于传统遗传变异,表明在 3 个刺参群体中由 DNA 甲基化引起的表观变异更易受外界环境影响。

一般认为,表观变异比遗传变异更易受环境影响,环境诱导促进表型变异,从而适应环境(Angers *et al*, 2010; Guarino *et al*, 2019; Vaughn *et al*, 2007),快速而直接,且体现一定的独立性,同时,表观遗传变异可促进遗传变异的产生,有助于生物对环境的适应及促进表型上的多样性(Lewis *et al*, 2007; 燕雪飞, 2014)。本研究中,3 个刺参群体基于甲基化敏感位点和基于非甲基化位点的遗传距离相关性分析显示,二者在 3 个种群相关性显著,说明在刺参优良品系的选育过程中,表观变异在一定程度上与遗传变异相互依赖和影响。

3.3 选育对甲基化状态和模式的影响

从刺参选育基础群体 F 和选育 F_1 代、 F_4 代甲基化模式分析结果来看,3 个种群间甲基化模式有较大的不同,其中, F_1 代与 F_4 代的半甲基化位点和整体甲基化位点比较相近,且二者都表现为半甲基化位点

高于各自全甲基化位点。张鹏远(2012)研究表明,不同的地域环境确实对烟草甲基化状态产生了影响;周艳华等(2015)研究也表明,茶树在抗寒响应中出现 DNA 甲基化现象,因此,不同刺参群体甲基化模式存在显著差异,推测是由于选育逆境胁迫适应所致。选育 F_4 代获得的类型 II 条带数最多为 161 条,明显高于未选育刺参,这种改变可认为是选育群体由于选育活动获得的表观遗传上的改变。本研究中,不同刺参群体在选育过程中经历不同的生存环境可能是导致甲基化模式差异的原因。

甲基化状态和模式数据说明,选育改变了 DNA 甲基化水平,并对模式产生了影响,刺参选育 F_1 与 F_4 代经过选育后获得一些甲基化位点的改变,甲基化状态变化趋势相近,说明温度胁迫选育改变了刺参群体的基因组的甲基化状态。这可能是由于基因组原来的甲基化水平、模式等甲基化状态受到选育压力的影响,开启某些功能基因的转录表达等生理代谢过程,致使选育对象产生了适应机制来应对环境胁迫的影响,并且在选育过程中将这种机制传递给了后代。在刺参的抗逆耐高温选育期间,选育材料在胁迫环境响应和适应中,表观遗传修饰可能起到很大作用。

4 结论与展望

本研究利用 10 对 MSAP 引物对 3 个刺参选育群体的遗传多样性及表观遗传多样性进行分析,从遗传物质基础的角度揭示选育群体的遗传改变与进展,为抗逆新品种选育中的表观遗传研究提供了参考。DNA 甲基化在水产动物遗传育种中的研究刚刚起步,但随着 DNA 甲基化分析技术的进步,尤其是随着新一代大规模测序技术的迅速发展, DNA 甲基化相关研究在群体遗传关系分析、分子育种、性状分析及分子标记辅助选择等方面将发挥重要作用。

参 考 文 献

- Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 2010, 19(7): 1283–1295
- Cervera MT, Ruiz GL, Martinez ZJ. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4): 543–552
- Gao KL. The expression of growth-related genes and transcriptome analysis of individual size differences in *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 [高凯伦. 刺参(*Apostichopus japonicus*)生长相关基因的表达及个体大小差异的转录组分析. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]

- Guarino F, Cicutelli A, Brundu G, *et al.* The use of MSAP reveals epigenetic diversity of the invasive clonal populations of *Arundo donax* L. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215096
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome DNA methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 77–82 [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 77–82]
- Guo WL. Molecular genetic and epigenetic diversity and genetic structure of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link.) natural populations endemic to Songnen Plain, China. Doctoral Dissertation of Northeast Normal University, 2006, 22–26 [郭万里. 中国松嫩平原短芒野大麦天然种群分子遗传与表观遗传多样性及其种群遗传结构的研究. 东北师范大学博士研究生学位论文, 2006, 22–26]
- Hou XT. Assessment of important economic traits and genetic diversity of four selective strains of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Tianjin Normal University, 2016 [侯西坦. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同选育品系的重要经济性状评价及遗传差异分析. 天津师范大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, *et al.* Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 1999, 151(2): 831–838
- Kakutani T. Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiology*, 2002, 43(10): 1106–1111
- Kang JT, Liang QJ, Liang C, *et al.* Overview on epigenetics and its progress. *Science and Technology Review*, 2013(19): 66–74 [康静婷, 梁前进, 梁辰, 等. 表观遗传学研究进展. *科技导报*, 2013(19): 66–74]
- Lewis NL, Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: Implications for plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 317–322
- Li JR, Jiang HZ. Application of epigenetics for genetic breeding of domestic animals. *Journal of Economic Animal*, 2018(3): 132–138 [李佳蓉, 姜怀志. 表观遗传学在家养动物遗传育种中的应用. *经济动物学报*, 2018(3): 132–138]
- Qiu ZY, Guo J, Yang C, *et al.* Research progress of DNA methylation in animal genetics and breeding. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(7): 173–178 [邱峥艳, 郭将, 杨春, 等. DNA 甲基化在动物遗传育种中的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7): 173–178]
- Qu HX, Liu XT, Yang YN. Problems and countermeasures in the development of sea cucumber industry. *Agriculture and Technology*, 2016, 36(22): 138–138 [曲洪霞, 刘心田, 杨燕妮. 刺参产业发展存在的问题及应对措施. *农业与技术*, 2016, 36(22): 138–138]
- Quan ZX, Tian JY, Zhang SY, *et al.* Studies on epigenetic diversity variation characteristics of *Flaveria bidentis* genome DNA of four different geographical distributions. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017 [全志星, 田佳源, 张思宇, 等. 不同入侵地区黄顶菊 DNA 表观遗传多样性变化特征. *农业环境科学学报*, 2017, 36(4): 625–634]
- Richards CL, Bossdorf O, Verhoeven KJ. Understanding natural epigenetic variation. *New Phytologist*, 2010, 187(3): 562–564
- Richardson DM, Pysek P. Plant invasions: Merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography*, 2006, 30(2): 409–431
- Ruizgarcia L, Cervera MT, Martinezzapater JM, *et al.* DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta*, 2005, 222(2): 301–306
- Schmid MW, Heichinger C, Schmid DC, *et al.* Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4446
- Schmitz RJ, Schultz MD, Urlich MA, *et al.* Patterns of population epigenomic diversity. *Nature*, 2013, 495(7440): 193–198
- Vaughn MW, Tanurdzic M, Lippman Z, *et al.* Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 2007, 5: 1617–1629
- Wang SY, Guo JF, Liu XT, *et al.* Research progress of abiotic stress induced epigenetic variation in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016(3): 631–640 [王淑妍, 郭九峰, 刘晓婷, 等. 非生物胁迫下植物表观遗传变异的研究进展. *西北植物学报*, 2016(3): 631–640]
- Wang ZH, Wang D. Application of DNA methylation analysis in genetics and breeding of plants and animals. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(4): 435–441 [王忠华, 王迪. DNA 甲基化分析技术在动植物遗传育种中的应用. *生命科学*, 2013, 25(4): 435–441]
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: Regulation through repression. *Science*, 1999, 286(5439): 481–486
- Wu B, Yang AG, Dong YH, *et al.* MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinopten yessoensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 2015, 46(4): 976–982 [吴彪, 杨爱国, 董迎辉, 等. 虾夷扇贝选育群体与野生群体基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 976–982]
- Yan XF. Genetic diversity and differentiation of the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in China. Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2014 [燕雪飞. 中国野生大豆遗传多样性及其分化研究. 沈阳农业大学博士研究生学位论文, 2014]
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ, *et al.* Natural resources culture and problems of sea cucumber worldwide. *Progress in Fishery Sciences*, 2004, 25(3): 89–97 [张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外仿刺参自然资源、养殖状况及存在问题. *渔业科学进展*, 2004, 25(3): 89–97]
- Zhang PY. The MSAP analysis for genomic methylation of tobacco planting in different environments of Dali in Yunnan Province. Master's Thesis of Yunnan University, 2012 [张鹏远. 云南大理地区不同地域环境下烟草基因组甲基化的 MSAP 分析. 云南大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Zhao Y, Chen M, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*

based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 26–32

Zhen Y, Zheng XH, Shi JS. Epigenetic mechanism of plant under stress. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 924–927 [甄艳, 郑秀化, 施季森. 表观遗传调控植物逆境胁迫的

适应机制. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 924–927] Zhou YH, Cao HL, Yue C, *et al.* Changes of DNA methylation levels and patterns in tea plant (*Camellia sinensis*) during cold acclimation. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(7): 1047–1055 [周艳华, 曹红利, 岳川, 等. 冷驯化不同阶段茶树 DNA 甲基化模式的变化. *作物学报*, 2015, 41(7): 1047–1055]

(编辑 冯小花)

Evaluation of Epigenetic and Genome Sequence Diversity in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Selected Population Based on MSAP Technology

ZUO Shan^{1,2,3}, WEN Zhengzheng^{1,2,3}, ZHOU Hongxue⁴, NI Lehai⁵, SUN Guohua^{3,6}⊙,
FENG Yanwei³, WANG Weijun³, YANG Jianmin³

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306; 3. Ludong University, College of Agriculture, Yantai 264025; 4. Department of Agriculture and Rural Affairs of Shandong Province, Jinan 250013; 5. Shandong Fishery Technology Extension Station, Jinan 250013; 6. Yantai Haiyu Ocean Technology Co., Ltd, Yantai 264001)

Abstract *Apostichopus japonicus* is a species of economic importance cultured in northern China. In the past 10 years, the scale of the *A. japonicus* culture has expanded due to increased market demand for products. However, several challenges, such as germplasm degradation and the lack of stress-resistant varieties, have emerged in *A. japonicus* culture. Breeding new varieties is one way to overcome these challenges. New strains (F₁ and F₄) of *A. japonicus* with high temperature resistance were obtained by domestication and screening under environmental stress conditions. The genetic changes caused by breeding under environmental stress conditions not only originated from changes in the DNA sequence, but also from changes due to epigenetic modifications by bisulfite sequencing. To explore the genetic diversity of the selected populations (F₁ and F₄) and the control population (F) which was not subjected to temperature stress of *A. japonicus*, the genetic diversity of control population, selected population F₁, and selected population F₄ were analyzed using methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAP). The results showed that 698 loci were polymorphic among the 806 loci obtained by 10 pairs of primers, and the percentage of polymorphism was 86.60%. Based on the genetic analysis of non-methylated loci, the Shannon polymorphism index of the F₄ was 0.3981 and Nei gene diversity was 0.2264. Based on the analysis of methylation sensitive sites, the Shannon polymorphism index of the F₄ was 0.5873, and Nei gene diversity was 0.2598, both of which were higher than in the parent population. Moreover, the epigenetic diversity was higher than the sequence genetic diversity caused by variation in non-methylated loci, indicating that the frequency of epigenetic variation was higher than that of sequence genetic variation. Analysis of the MSAP methylation patterns revealed some changes in the methylation levels and patterns in the selected F₁ and F₄ after breeding, which indicated that the genome methylation status of the *A. japonicus* population was changed by breeding under temperature stress. The number of type II bands in the F₄ was 161, which was significantly higher than that of control population of *A. japonicus* and may have acquired epigenetic characteristics during breeding. Collectively, our results revealed the genetic changes and progress of the breeding population from the perspective of a genetic material basis and provide a reference for the study of epigenetics in the breeding of new stress resistant varieties.

Key words *Apostichopus japonicus*; MSAP; DNA methylation; Breeding population; Genetic diversity

⊙ Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh_smile@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201204002

http://www.yykxjz.cn/

温争争, 左闪, 陈梦, 周红学, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 46–54

Wen ZZ, Zuo S, Chen M, Zhou HX, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 46–54

刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式 对温度变化的响应*



温争争^{1,2,3} 左 闪^{1,2,3} 陈 梦^{1,2,3} 周红学⁴ 孙国华^{3,5}
冯艳微³ 王卫军³ 杨建敏³

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 上海海洋大学
上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 3. 鲁东大学农学院 烟台 264025;
4. 山东省农业农村厅 济南 250013; 5. 烟台海育海洋科技有限公司 烟台 264001)

摘要 本研究为了探讨刺参(*Apostichopus japonicus*)在不同温度胁迫下的 DNA 甲基化水平与甲基化模式变化,利用全基因组重亚硫酸盐测序技术(WGBS)和酶联免疫吸附法(ELISA)对刺参在 3 个温度下(20℃、26℃和 32℃)的纵肌、呼吸树、消化道和体壁 4 个组织进行分析。WGBS 测序结果显示,在消化道组织中,20℃、26℃和 32℃温度组全基因组总甲基化水平分别为(1.70±0.01)%、(1.79±0.11)%和(1.59±0.04)%,26℃组处于休眠状态,刺参消化道基因组甲基化水平升高,而 32℃组高温胁迫下,甲基化水平下降;在总甲基化位点中,CG 类型是主要的甲基化修饰(96%以上),CHH 和 CHG 位点占比较低;30%甲基化水平的甲基化位点中,CHG 和 CHH 为本类型甲基化的最高点,且显著高于 CG 类型。ELISA 检测结果显示,3 种不同温度下,刺参呼吸树和消化道组织的甲基化水平范围为 2.68%~3.29%,均高于纵肌和体壁组织;温度变化后,刺参呼吸树和消化道组织的总甲基化水平均有显著变化,而纵肌和体壁的总甲基化水平基本不变,表明 DNA 甲基化可能参与刺参的高温胁迫调控机制。刺参应对温度变化过程中 DNA 甲基化水平的研究,从表观遗传学视角解析温度升高对刺参不同组织的影响,可为丰富刺参甲基化研究内容和无脊椎动物的甲基化发生规律提供参考。

关键词 刺参; DNA 甲基化水平及模式; 休眠; 高温胁迫; 全基因组重亚硫酸盐测序技术; 酶联免疫吸附

中图分类号 S968.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)03-0046-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国重要的水产 岸,包括中国黄渤海海域、俄罗斯东部沿岸、日本和
养殖物种之一,自然分布在 35~44°N 的西北太平洋沿 韩国沿岸。刺参是典型的温带种类,水温变化对刺参

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901602)、山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)、泰山产业领军人才(tscy20190114)和国家自然科学基金项目(31602144)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Project of Science and Technology Ministry (2018YFD0901602), Modern Agricultural Technology System of Shandong Province (SDAIT-22-02), Taishan Industry Leading Talent (tscy20190114), and National Natural Science Foundation of China (31602144)].
温争争, E-mail: wenzheng96@126.com

① 通讯作者: 孙国华, 研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2020-12-04, 收修改稿日期: 2020-12-18

的摄食、代谢和生殖发育等各种生理活动有重要影响(曹学顺, 2014)。温度过高或过低都不适宜刺参的生长, 尤其是在高温逆境环境中, 刺参的活动和摄食降低, 甚至体内自由基代谢紊乱、病变死亡(谢兆文等, 2016; 高杨, 2017)。温度变化对刺参生理变化、生长发育和遗传变化的影响研究一直受到广泛关注。

表观遗传学是一种不改变 DNA 序列的可遗传变异, 它的调节机制主要包括 DNA 甲基化修饰、组蛋白修饰、染色体重塑、非编码 RNA 调控等, 这些修饰方式之间相互作用、共同调节基因组的功能(Crabtree, 2020; Kulis *et al.*, 2010), 且这些表观遗传修饰极易受到环境的诱导(康静婷等, 2013)。DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种重要修饰方式, 通过影响核酸空间构象、稳定性及其与蛋白质相互作用方式参与基因表达调控, 进而参与细胞的生长发育、逆境胁迫应答等过程(钟焱等, 2019)。在水产动物中, 环境通过影响 DNA 甲基化水平进而影响基因表达, 从而使生物的生理活动及表型发生变化以适应环境(McGhee *et al.*, 2014)。Navarro-Martin 等(2011)研究发现, DNA 甲基化介导了温度影响欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)性别变化的生物学过程; 吴彪等(2016)研究表明, 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)受到急性升温胁迫处理后, 基因组 DNA 总甲基化率下降; Li 等(2017)发现, 盐胁迫处理半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)肝脏后, 生长相关基因 *igfl* 的外显子甲基化水平与其表达水平呈负相关。在刺参应对逆境响应方面, 也有研究发现, DNA 甲基化在其中发挥重要的调控作用。高杉等(2017)采用甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)分析了健康和“化皮病”刺参体壁组织的甲基化水平差异。李尚俊等(2017)研究发现, 在高温环境下, 刺参的表观修饰相关基因(*DNMT1*、*HDAC3* 和 *MLL5*)的表达量发生显著变化。赵业(2015)研究发现, 刺参夏眠期的甲基化水平高于非夏眠期。邹荣婕等(2014)发现, 经喹类药物处理的刺参组织 DNA 甲基化水平低于对照组, 说明 DNA 甲基化在刺参应对外界刺激的重要作用。

本研究采用全基因组重亚硫酸盐测序技术(WGBS), 对不同温度处理的刺参的消化道组织的全基因组 C 位点甲基化水平进行检测, 探讨温度变化对刺参基因组 DNA 甲基化的影响。同时, 以刺参的体壁、消化道、纵肌和呼吸树为实验材料, 通过甲基化酶联免疫吸附法(ELISA)检测, 分析温度对刺参不同组织的甲基化程度的影响, 探究刺参 DNA 甲基化调控与组织特异性的相关性, 以期从 DNA 甲基化水平解释刺参响应温度变化的生理过程, 为深入研究环境

与表观遗传变异的关系及逆境响应机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 2 龄刺参由山东省东营市华春渔业有限公司提供, 体质量为(130.3±5.5) g, 从养殖池塘养殖群体中随机采集, 定时投喂饲料, 每日换水量为 1/3, 养殖期间持续充气。

1.2 养殖实验与样品采集

实验用刺参在水温为(20.0±0.5)℃的实验室条件下暂养 5 d, 暂养结束后, 分组进行不同温度养殖实验, 对照组(T20)刺参在(20.0±0.5)℃水温下持续养殖至取样; 实验 A 组(T26)从水温(20.0±0.5)℃以 0.6℃/d 的速度在 10 d 内提高至(26.0±0.5)℃后, 维持养殖至取样; 实验 B 组(T32)从水温(20.0±0.5)℃以 0.6℃/d 的速度 10 d 内提高至(26.0±0.5)℃后, 再以 2℃/d 的速度在 3 d 内提高至(32.0±0.5)℃, 保持 2 d。每个实验组设置 3 个平行, 所有实验组刺参样品 15 d 养殖实验后取样, 每个平行组取 10 个刺参, 分别剖取呼吸树、纵肌、消化道和体壁组织, 并用灭菌生理盐水(1.5% NaCl)冲洗, 置于 2 ml 冻存管后迅速放入液氮罐中, 送回实验室, 保存于-80℃。

1.3 基因组 DNA 的提取

DNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 使用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 将各组样品的浓度调整为 100~200 ng/μl, 于-20℃保存备用。

1.4 高温处理后消化道的全基因组 DNA 甲基化测序

重亚硫酸盐 WGBS 实验步骤参考郭添福等(2018)的高分辨率甲基化分析方法, 进一步对样品进行 DNA 甲基化定量。主要构建流程包括: 检测合格的刺参消化道基因组 DNA 样品, 首先, 用超声波打成平均大小为 200~300 bp 的片段, 对打断后的 DNA 片段进行末端修复、腺苷酸化, 并添加接头; 随后, 进行 Bisulfite 处理(EZ DNA Methylation Gold™ Kit, Zymo Research), 经处理后, 未发生甲基化的 C 变成 U, 而甲基化的 C 保持不变; 最后, 对单链 DNA 片段进行 PCR 扩增(KAPA HiFi HotStart Uracil + ReadyMix)得到 DNA 文库, 库检合格后, 利用 Illumina HiSeq 进行高通量测序, 测序读长 PE150, 构建 Bisulfite 全基因组甲基化图谱, 测序在北京诺禾致源有限公司完成。

1.5 ELISA 测定不同组织 DNA 甲基化水平

提取刺参纵肌、呼吸树、消化道和体壁 4 个组织的基因组 DNA, 利用 Zymo Research 公司的 5-mC DNA ELISA 试剂盒检测相应样品基因组 DNA 甲基化水平。具体实验步骤: 待测样品基因组 DNA 和标准品(100 ng)均稀释成 100 μ l 反应液, 于 PCR 仪 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 10 min, 移至 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 缓冲液洗板 3 次, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。最后, 加入甲基化胞嘧啶抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板同上, 并进行显色反应, 酶标仪检测样品吸光度。

1.6 数据统计与分析

测序结果的甲基化水平计算: $ML = mC / (mC + umC)$ 。其中, ML 为甲基化水平, mC 和 umC 分别代表覆盖区域甲基化 C 位点和未甲基化 C 位点的 read 数目。所有实验结果均来自至少 3 次独立实验, 结果为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)。运用 SPSS 19.0 软件对各个组的甲基化水平进行 ANOVA 分析和 Duncan 多重比较, 获得两两之间的统计学差异($P < 0.05$)。

ELISA 测定 DNA 甲基化水平, 通过制备阴性对照(100 ng/ μ l)和阳性对照(100 ng/ μ l)的混合物来制备已知 5-mC 不同百分比的(5%、10%、25%、50%、75%和 100%)标准品, 根据标准品吸光度值所绘制的标准曲线, 即可得到各个样品的整体甲基化水平。

2 结果

2.1 不同处理下刺参消化道 DNA 甲基化模式分析

由全基因组 DNA 甲基化测序(WGBS)结果(表 1)可知, 刺参消化道组织的常温对照组 T20 基因组的甲基化位点数为 5050974 个, T26 组的基因组甲基化位点数为 5315261, T32 组基因组的甲基化位点数为 4714193 个。在所有的处理组和对照组中, CpG(简写 CG)类型甲基化位点数目为 4563209~5134931, 也有一定数量的甲基化胞嘧啶发生在 CHH 位点(116612~141870), 而 CHG 类型甲基化位点相对较少(34372~42059)。

T20、T26 和 T32 温度组的全基因组总甲基化水平分别为(1.70 \pm 0.01)%、(1.79 \pm 0.11)%和(1.59 \pm 0.04%) (表 2), T26 组基因组的总甲基化水平表现为上升, T32 组基因组的总甲基化水平表现为下降, 且低于 T20 组, 方差分析表明, T26 组的总甲基化水平和 T32 组存在显著差异($P < 0.05$)。对不同类型的甲基化来说, C 碱基甲基化水平表现出与总甲基化水平一致的趋势, T26 组 CG 类型 C 碱基甲基化水平较 T20 升高,

而 T32 组较 T26 组降低, 且差异显著($P < 0.05$)。在 2 种非 CG 类型的甲基化模式中, CHG 类型 T20 组与

表 1 甲基化位点数目及类型

样品 Sample	CpG 型 CpG type	CHG 型 CHG type	CHH 型 CHH type	合计 Total
T20_1	4860511	40641	141181	5042333
T20_2	4889681	41815	141808	5073304
T20_3	4853369	41295	142621	5037285
Average	4867854	41250	141870	5050974
T26_1	4954152	37951	124093	5116196
T26_2	5493328	48629	157290	5699247
T26_3	4957312	39598	133429	5130339
Average	5134931	42059	138271	5315261
T32_1	4458106	32955	118511	4609572
T32_2	4665866	36517	119951	4822334
T32_3	4565654	33643	111375	4710672
Average	4563209	34372	116612	4714193

表 2 不同温度下刺参全基因组甲基化水平

Tab.2 The methylation levels of C bases of *Apostichopus japonicus* at different temperature (%)

样品 Sample	mC	mCpG	mCHG	mCHH
T20_1	1.70	14.19	0.08	0.06
T20_2	1.71	14.27	0.08	0.06
T20_3	1.70	14.17	0.08	0.06
Average	1.70 \pm 0.01 ^{ab}	14.21 \pm 0.05 ^{ab}	0.08 \pm 0.00 ^b	0.06 \pm 0.00 ^a
T26_1	1.72	14.46	0.07	0.05
T26_2	1.92	16.04	0.09	0.07
T26_3	1.73	14.47	0.07	0.06
Average	1.79 \pm 0.11 ^b	14.99 \pm 0.91 ^b	0.077 \pm 0.01 ^{ab}	0.06 \pm 0.01 ^a
T32_1	1.55	13.01	0.06	0.05
T32_2	1.63	13.62	0.07	0.05
T32_3	1.59	13.33	0.06	0.05
Average	1.59 \pm 0.04 ^a	13.32 \pm 0.31 ^a	0.063 \pm 0.006 ^a	0.05 \pm 0.00 ^a

注: mC: 全基因组上甲基化 C 位点占全部 C 位点个数的百分比; mCpG: CpG context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比; mCHG: CHG context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比; mCHH: CHH context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比。数据来自至少 3 次独立的生物学重复。不同小写字母为差异显著($P < 0.05$)

Note: mC: Percentage of methylated C sites in the whole genome; mCpG: Percentage of methylated C sites in CpG context region to the total number of C sites; mCHG: Percentage of methylated C sites in CHG context region to the total number of C sites; mCHH: Percentage of methylated C sites in CHH context region to the total number of C sites. Data were at least three independent biological replicates. Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

T32 组存在显著差异($P<0.05$), CHH 类型中 3 组差异不大, 且都呈现低甲基化的变异模式。大部分 DNA 甲基化发生在 CG 类型的 C 碱基上, CG 类型的 C 碱基 DNA 甲基化程度为 13.32%~14.99%, 显示中等的 DNA 甲基化水平。

对 3 个温度下 CG、CHH 和 CHG 位点甲基化与总体甲基化占比情况进行统计, 结果见图 1。mCG 类型甲基化百分比均在 96%以上, mCHH 类型甲基化百分比在 T20、T26 和 T26 组样品分别为 2.79%、2.42% 和 2.57%, mCHG 类型甲基化百分比最少, 均在 1%

以下。

根据测得的甲基化比例, 统计不同甲基化水平的甲基化位点中 3 种类型占各自类型的百分比可以看出(图 2), 在甲基化水平为 30%时, 处于这一水平的 CHG 和 CHH 甲基化位点分别占本类型的 30%左右, 为最高点, 且显著高于 CG 类型, 之后随着位点甲基化水平的增高, 其所占百分比下降; 而随着甲基化位点甲基化水平的增高, CG 类型的百分比总体呈明显的增高趋势, 在甲基化水平为 100%时, 占比达到该类型的最高点。

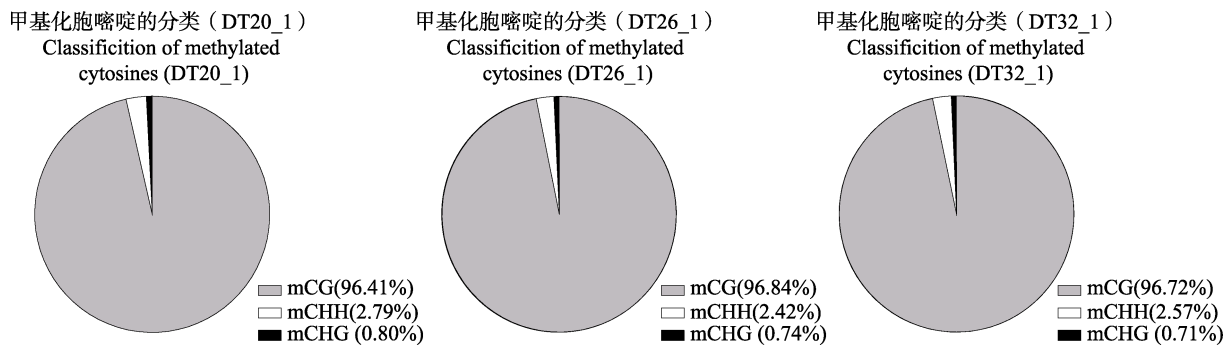


图 1 不同温度条件下甲基化 C 位点的数量及其占总甲基化 C 位点的比例

Fig.1 The number of methylated C sites and their proportion to the total methylated C sites in different sequence environments

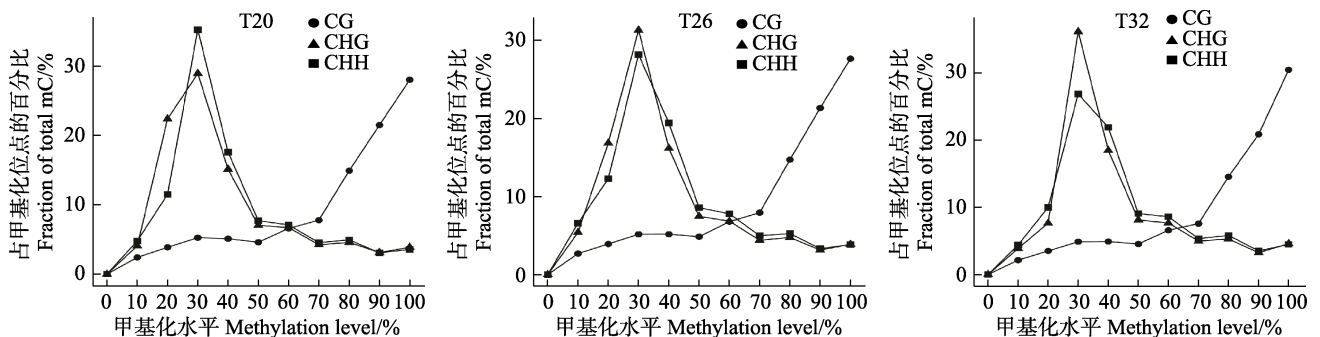


图 2 所有样本甲基化位点水平分布

Fig.2 The level distribution of methylation sites in all samples

图中每个数据来自 3 个生物学重复

Each data in the figure comes from 3 biological replicates

2.2 不同温度下刺参组织间甲基化水平比较

采用 5-mC DNA ELISA Kit 试剂盒检测不同温度条件下刺参的呼吸树、消化道、纵肌和体壁 4 种组织的基因组的甲基化水平, 并进行不同组间方差分析。数据显示, 在 3 种不同温度下, 刺参呼吸树和消化道组织的甲基化水平范围为(2.68±0.10)%~(3.29±0.06)%, 均高于纵肌和体壁组织, 其中, 体壁的甲基化水平在(2.05±0.15)%~(2.11±0.11)%之间, 纵肌的甲基化水平最低, 为(1.68±0.07)%~(1.76±0.03)%。各组织的总甲

基化水平从高到低依次为呼吸树>消化道>体壁>纵肌(图 3)。不同温度对刺参组织的甲基化水平有所改变, T26 组刺参样品消化道和呼吸树组织的甲基化水平显著高于 T20 对照组($P<0.05$), T32 组刺参样品消化道和呼吸树组织的甲基化水平又显著低于 T26 对照组($P<0.05$)。呼吸树和消化道组织的甲基化水平总体呈一致趋势, 在温度从 20℃升至 26℃时, 甲基化水平升高, 而温度继续升至 32℃时, 甲基化水平下降; 而纵肌和体壁组在 3 个温度下的甲基化水平各组间均无显著差异。

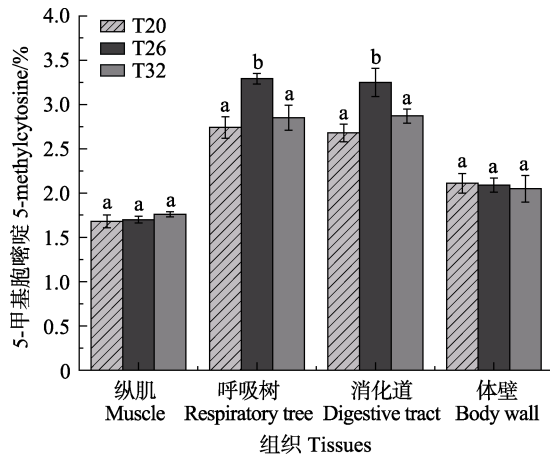


图3 不同温度下 5-mC 甲基化试剂盒检测各组织 DNA 甲基化水平变化

Fig.3 Using 5-mC methylation kit to detect tissues DNA methylation levels under different experimental conditions

不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 不同温度对刺参基因组 DNA 甲基化的影响

研究结果表明, DNA 甲基化参与了海洋动物环境胁迫适应性机制, 诸如盐度(环朋朋, 2018)、重金属(周新文等, 2001)、温度(侯艳雯等, 2019; 王艺雅, 2015)等环境因子的逆境胁迫下, 甲基化会有明显差异。Flores 等(2013)提出, 环境诱导影响 DNA 甲基化的变异, 可能通过增加基因组被标记区域的突变性, 改变生物的表型, 使其适应自然选择。温度一直是影响水产动物生存的重要因素, 在不同温度条件下, 基因组内的甲基化变异能够通过改变某些特定功能基因 DNA 甲基化状态来影响基因的转录, 进而调节生物体内胁迫响应机制等来提高动物的耐寒性或耐热性。朱华平等(2013)分析了耐寒罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)与正常组基因组 DNA 甲基化的差别, 结果表明, 低温诱导 DNA 总甲基化下降, 同时主要发生去甲基化过程。吴彪等(2016)研究发现, 虾夷扇贝受到急性升温胁迫处理后, 基因组 DNA 总甲基化率下降。王翠丽(2019)研究发现, 高温胁迫过程中, 近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)的核心启动子甲基化水平与 *Hsp90* 基因的表达呈负相关。孔宁(2016)研究发现, 在温度、盐度胁迫下, 皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)的表观遗传结构发生改变, 调控相关抗逆基因表达。这些研究结果均表明, 温度变化可诱导水产动物基因或组织的甲基化状态发生改变。

本研究通过 WGBS 和 ELISA 对刺参消化道等组织甲基化水平进行检测发现, 不同温度下刺参组织中的甲基化水平有所改变, 刺参消化道组织和呼吸树组织的 T26 组甲基化水平最高。刺参在 26℃ 养殖环境下处于休眠或生理代谢活动较弱的状态, 这期间刺参消化、呼吸等生理代谢活动调节减弱(Gao *et al.*, 2008)。处于休眠状态的 T26 组刺参基因组甲基化水平的增高, 一定程度上说明刺参这些组织中的一些功能基因受到甲基化调节而表达水平下降, 相应地, 减弱其参与调控的生理代谢活动来维持刺参的休眠状态。刺参消化道组织和呼吸树组织的 T32 组甲基化水平较 T26 组降低。32℃ 是对刺参生命活动产生危害的胁迫温度, 在这个温度下, 刺参会发生系列应激反应以自我保护, 生理反应和活动变化意味着刺参体内需要启动一系列转录表达和调控, 而甲基化水平的降低调节可能起重要作用。

3.2 刺参基因组甲基化模式

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰, 主要有 3 种类型: CG、CHG 和 CHH。在动物中, 胞嘧啶的甲基化多发生于 CpG 二核苷酸序列中, CG 是主要甲基化修饰类型, 非 CG 类型的序列(CHH 和 CHG)在基因中十分少见(Cokus *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015)。脊椎动物通常存在于基因间区和富含重复序列的区域, 而在无脊椎动物中, DNA 甲基化主要发生于基因内部, 基因间区大部分未被甲基化(Schaefer *et al.*, 2010)。在胚胎干细胞研究(Lister *et al.*, 2009)中, CHG 和 CHH 型的甲基化位点分别占 17.3% 和 7.2%。Sun 等(2014)检测到栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)基因组中, 分别有 14.9%~16.5% 的 CpG 类型和 5.1%~6.3% 的 CHG 类型的甲基化位点。不同温度条件下的刺参消化道 DNA 样品经过重亚硫酸盐处理后, 进行 WGBS 测序分析, 甲基化位点类型分析显示, 在所有甲基化胞嘧啶(mCs)中, 有超过 96% 的 CpGs, 且 CG 类型的 C 碱基呈现中等甲基化水平(24.11%~24.48%), CHG 和 CHH 类型的 C 碱基呈现低甲基化水平(0.49%~0.56%)。

在不同温度刺参甲基化模式的对比分析中, 3 个温度组消化道的总甲基化率和 CG 类型 C 碱基甲基化水平之间存在显著差异 ($P < 0.05$), T26 组消化道高于 T20 和 T32 组, CHG 和 CHH 类型的 C 碱基甲基化水平在 2 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。已研究的大多数无脊椎动物表现出镶嵌式的甲基化模式, 无论是在无脊椎动物, 还是脊椎动物, 基因内 CpG 甲基化的功能都是保守的, 它能够抑制基因内部异常转录的起始(Suzuki *et al.*, 2007)。目前, 非 CG 类型的甲基化与基

因表达的关系尚不清楚, 值得更深入的研究。

3.3 组织间的甲基化差异分析

不同组织间的基因组甲基化水平的差异是生物界普遍存在的现象。在水产动物的不同组织间甲基化研究中, 杜盈等(2013)利用 MSAP 技术分析野生组中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和选育品种“黄海 1 号”的甲基化水平时发现, 野生组中国明对虾的纵肌和鳃组织甲基化水平差异极显著($P < 0.05$), 而二者与血液组织的甲基化水平差异极显著($P < 0.01$); “黄海 1 号”的鳃组织和血液组织甲基化水平相近, 都极显著低于纵肌组织($P < 0.01$)。罗少杰(2017)运用甲基化检测技术对马氏珠母贝(*Phyllostachys mollissima*)的边缘膜区、套膜区和中央膜区的基因组甲基化水平进行了研究, 发现各组织甲基化水平具有显著性差异, 其中, 中央膜区的甲基化水平最高[(19.04±2.55)%]。这些结果显示, 无脊椎动物不同组织间甲基化水平存在差异, 可能是由于 DNA 甲基化在细胞分化以及生长发育调控中发挥重要作用(Sun *et al.*, 2014; 何暮春等, 2018)。

果蝇(*Drosophila*)、水蚤(*Daphnia magna*)、牡蛎(*C. gigas*)等部分无脊椎动物的甲基化研究发现, 其基因组甲基化处于较低水平(Regev *et al.*, 1998; Riviere *et al.*, 2013; Hearn *et al.*, 2019)。本研究结果表明, 刺参在不同温度水体中, 不同组织 DNA 总甲基化水平在 1%~4%之间, 并呈现呼吸树、消化道、体壁、纵肌的甲基化程度依次降低的趋势。由于技术原因, 通过 WGBS 和 ELISA 方法测得的消化道甲基化水平存在差异, 但总体属于基因组甲基化水平较低的无脊椎动物类型。在同一温度下, 刺参的不同组织间甲基化水平存在明显差异, 且随着温度的升高, 纵肌和体壁组织甲基化水平基本不变, 而呼吸树和消化道组织的甲基化水平总体趋势一致, 在温度从 20℃升至 26℃时, 甲基化水平显著升高, 而在温度继续升至 32℃时, 甲基化水平显著下降。曹哲明等(2009)认为, DNA 甲基化是基因表达调控的方式, 甲基化程度高的组织相对来说基因表达水平较低。在升温过程中, 消化道的基因表达程度最低, 说明不同组织对温度变化的敏感性不同, 这与之前的研究结果相符。刺参经历高温休眠时期, 呼吸代谢和摄食效率发生改变, 作为这一过程主要的功能器官——消化道和呼吸树受到的影响最大, 同时会发生不同程度的退化和萎缩(Zhao *et al.*, 2015)。

4 总结

本研究对高温胁迫下刺参基因组 DNA 甲基化的变化情况进行了探究。相较于生活在正常水温的个

体, 经历不同温度处理的刺参的表观基因组发生显著性改变, 使得相关基因表达或抑制。目前, 动物在环境温度胁迫下, 全基因组范围内的去甲基化过程和甲基化的协调机制, 以及动物表型的形成和环境适应性的表观遗传机制, 都值得关注。未来研究应该更多关注全基因组表观变化启动的分子机制, 例如, DNA 甲基化对基因表达抑制的调控作用; 以及关注动物中表观遗传变异与物种表型差异、环境适应如何相互联系。表观遗传学在环境胁迫中的作用和机制尚有诸多问题需进一步探讨。

参 考 文 献

- Cao XS. Study on the effect of temperature on the growth, physiology and nutritional components of *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014 [曹学顺. 温度对刺参的生长、生理及营养成分的影响研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. Ecology and Environment, 2009, 18(6): 2011–2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. 生态环境学报, 2009, 18(6): 2011–2016]
- Crabtree JS. Fundamentals of epigenetics. Clinical Precision Medicine. Academic Press, 2020: 27–37
- Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, *et al.* Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. Nature, 2008, 452(7184):215–219
- Du Y, He YY, Li J, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in different tissues of wild and “Yellow Sea No.1” *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 536–543 [杜盈, 何玉英, 李健, 等. 野生和“黄海 1 号”中国明对虾不同组织基因组 DNA 的 MSAP 分析. 中国水产科学, 2013, 20(3): 536–543]
- Flores KB, Wolschin F, Amdam GV. The role of methylation of DNA in environmental adaptation. Integrative and Comparative Biology, 2013, 53(2): 359–372
- Gao F, Yang H, Xu Q, *et al.* Phenotypic plasticity of gut structure and function during periods of inactivity in *Apostichopus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(3): 255–262
- Gao S, Yang AF, Dong Y, *et al.* MSAP analysis of DNA methylation in the body wall of *Apostichopus japonicus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(3): 637–642 [高杉, 杨爱馥, 董颖, 等. 仿刺参“化皮病”体壁组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 水生生物学报, 2017, 41(3): 637–642]
- Gao Y. Effects of variable temperature on immunity and disease

- resistance of *Apostichopus japonicus*. Hebei Fisheries, 2017(9): 1–4, 41 [高杨. 变温对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫力及抗病力的影响. 河北渔业, 2017(9): 1–4, 41]
- Guo TF, Zhang ZY, Chen D, *et al.* Difference analysis of high resolution single base methylation in muscle genome of large white pigs of different genders. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(11): 2326–2339 [郭添福, 张志燕, 陈冬, 等. 不同性别大白猪纵肌全基因组高分辨率单碱基甲基化差异分析. 畜牧兽医学报, 2018, 49(11): 2326–2339]
- He MC, Zhang JY, Liu CL, *et al.* DNA methylation level and pattern in growing *Sepia esculenta* Hoyle. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 46–55 [何暮春, 张金勇, 刘长琳, 等. 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 46–55]
- Hearn J, Pearson M, Blaxter M, *et al.* Genome-wide methylation is modified by caloric restriction in *Daphnia magna*. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 197
- Hou YW, Liu W, Jiang PL, *et al.* Effects of low temperature on DNA methylation of zebrafish ZF4 cells. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 271–279 [侯艳雯, 刘玮, 姜蓬全, 等. 低温对斑马鱼 ZF4 细胞基因组 DNA 甲基化水平的影响. 中国水产科学, 2019, 26(2): 271–279]
- Huan PP. Function of DNA methylation in salinity adaptation of *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [环朋朋. DNA 甲基化在三疣梭子蟹盐度适应中的功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Kang JT, Liang QJ, Liang C, *et al.* Overview on epigenetics and its progress. *Science and Technology Review*, 2013, 31(19): 66–74 [康静婷, 梁前进, 梁辰, 等. 表观遗传学研究进展. 科技导报, 2013, 31(19): 66–74]
- Kong N. Effects of temperature and salinity on growth and development of *Haliothis discus hannai* “97” population. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 [孔宁. 温度、盐度对皱纹盘鲍“97”选群生长发育的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2016]
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*. Academic Press, 2010, 70: 27–56
- Li S, He F, Wen H, *et al.* Low salinity affects cellularity, DNA methylation, and mRNA expression of *igf1* in the liver of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(6): 1587–1602
- Li SJ, Sun GH, Li XY, *et al.* Expression characteristics of epigenetic regulation related genes in *Apostichopus japonicus* under high temperature stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 470–476 [李尚俊, 孙国华, 李雪燕, 等. 高温胁迫下仿刺参表观遗传调控相关基因的表达特征. 中国水产科学, 2017, 24(3): 470–476]
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462(7271): 315
- Luo SJ. Study on DNA methylation difference and function in different regions of mantle of *Phyllostachys mollissima*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2017 [罗少杰. 马氏珠母贝外套膜不同区域的 DNA 甲基化差异及功能研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- McGhee KE, Bell AM. Paternal care in a fish: Epigenetics and fitness enhancing effects on off spring anxiety. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1794): 20141146
- Navarro-Martin L, Viñas J, Ribas L, *et al.* DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, 2011, 7: e1002447
- Regev A, Lamb MJ, Jablonka E. The role of DNA methylation in invertebrates: Developmental regulation or genome defense? *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15(7): 880
- Riviere G, Wu GC, Fellous A, *et al.* DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, 2013, 15: 739–753
- Schaefer M, Lyko F. Lack of evidence for DNA methylation of *Invader4* retroelements in *Drosophila* and implications for *Dnmt2*-mediated epigenetic regulation. *Nature Genetics*, 2010, 42(11): 920–921
- Sun Y, Hou R, Fu X, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86232
- Suzuki MM, Kerr ARW, de Sousa D, *et al.* CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Research*, 2007, 17(5): 625–631
- Wang CL. Effects of high temperature stress on Hsp90 expression and CpG methylation in *Ostrea rivularis* Gould. *Guangxi Sciences*, 2019, 26(4): 424–429 [王翠丽. 高温胁迫对近江牡蛎 Hsp90 表达及 CpG 甲基化的影响. 广西科学, 2019, 26(4): 424–429]
- Wang YY. Effects of high temperature on the methylation level of *Oreochromis mossambicus* genome. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2015 [王艺雅. 高温诱导对罗非鱼全基因组甲基化水平的影响研究. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Wu B, Yang AG, Sun XJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on genomic DNA methylation of *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影

- 响. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 140–146]
- Xie ZW, Wang SK, Lin X, *et al.* Effects of high temperature stress on antioxidant enzymes of *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2016, 35(4): 327–333 [谢兆文, 王寿昆, 林旋, 等. 高温胁迫对仿刺参抗氧化酶等指标的影响. 水产科学, 2016, 35(4): 327–333]
- Zhang Z, Liu G, Zhou Y, *et al.* Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) reveal gradual transition of the genomic methylation pattern in early vertebrates. *BioRxiv*, 2015: 033233
- Zhao Y. Study on gene expression patterns and basic characteristics of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 [赵业. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 夏眠期间基因表达模式及 DNA 甲基化基础特征研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2015]
- Zhao Y, Chen MY, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 26–32
- Zhong Y, Xu H, Peng FL. Significance and research progress of DNA methylation in gene expression regulation. *China Medical Herald*, 2019, 16(14): 33–36 [钟焱, 徐慧, 彭凤兰. DNA 甲基化在基因表达调控中的意义及研究进展. 中国医药导报, 2019, 16(14): 33–36]
- Zhou XW, Zhu GN, Jilisa M, *et al.* Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal ion mixture on the DNA methylation level of *Carassius auratus*. *China Environmental Science*, 2001, 21(6): 549–552 [周新文, 朱国念, Jilisa M, 等. Cu、Zn、Pb、Cd 及其混合重金属离子对鲫鱼(*Carassius auratus*) DNA 甲基化水平的影响. 中国环境科学, 2001, 21(6): 549–552]
- Zhu HP, Lu MX, Huang ZH, *et al.* Effects of low temperature on DNA methylation of *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1460–1467 [朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响. 水产学报, 2013, 37(10): 1460–1467]
- Zou RJ, Jiang XY, Xu YJ, *et al.* Analysis of global DNA methylation impacted by quinoxaline in *Apostichopus japonicus* tissue using high performance liquid chromatography. *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, 33(7): 780–785 [邹荣婕, 姜向阳, 徐英江, 等. 基于高效液相色谱的喹(噁)啉类药物对刺参 DNA 甲基化水平的影响研究. 分析测试学报, 2014, 33(7): 780–785]

(编辑 冯小花)

DNA Methylation Level of Genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at Different Temperatures

WEN Zhengzheng^{1,2,3}, ZUO Shan^{1,2,3}, CHEN Meng^{1,2,3}, ZHOU Hongxue⁴, SUN Guohua^{3,5}①,
FENG Yanwei³, WANG Weijun³, YANG Jianmin³

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306;
3. Ludong University, College of Agriculture, Yantai 264025; 4. Department of Agriculture and Rural Affairs of Shandong Province, Jinan 250013; 5. Yantai Haiyu Ocean Technology Co., Ltd, Yantai 264001)

Abstract The sea cucumber *Apostichopus japonicus* requires its own defense mechanism to resist and adapt to high temperature stress. Epigenetic modification plays an important role in this regulation process. To investigate the changes of DNA methylation level and methylation pattern in *A. japonicus* (2-year-old) under different temperature stress, whole genomic bisulfite sequencing (WGBS) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect whole genome methylation levels of the muscle, respiratory tree, digestive tract, and body wall. Three temperature gradients of 20°C, 26°C, and 32°C were set up in this experiment. The results of WGBS showed that the total genome wide methylation levels of 20°C, 26°C, and 32°C groups were (1.70±0.01)%, (1.79±0.11)%, and (1.59±0.04)%, respectively. The methylation level of the digestive tract genome of *A. japonicus* in the 26°C group increased, while the methylation level of the 32°C group decreased under high temperature stress. Among the total methylation sites, CG type was the main site of methylation modification (more than 96%), and CHH and CHG sites showed relatively low levels of modification. Among the methylation sites at 30% methylation level, CHG and CHH methylation sites showed the highest methylation, and were significantly higher than that of the CG type. The results of ELISA showed that the methylation levels of respiratory tree and digestive tract tissue ranged from 2.68% to 3.29% at three different temperatures, which were higher than those in muscle and body wall tissue. After temperature change, the total methylation level of respiratory tree and digestive tract tissue of sea cucumber changed significantly, while the total methylation level of muscle and body wall remained unchanged, indicating that DNA methylation may be involved in the regulation mechanism of high temperature stress in *A. japonicus*. The study on DNA methylation level of *A. japonicus* in response to temperature change can be used to analyze the effect of temperature rise on different tissues of sea cucumber from the perspective of epigenetics. This research can provide reliable basis for enriching the research content on methylation in *A. japonicus* and the occurrence of methylation in invertebrates.

Key words *Apostichopus japonicus*; DNA methylation and mode; Dormancy; High temperature stress; Whole genome bisulfite sequencing; Enzyme linked immunosorbent assay

① Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh_smile@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201209001

http://www.yykxjz.cn/

吴菲菲, 程楚杭, 陈廷, 张鑫, 吴小芬, 江晓, 任春华, 胡超群. 热带糙海参雌、雄亲参的差异代谢物和差异代谢通路研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 55–67

Wu FF, Cheng CH, Chen T, Zhang X, Wu XF, Jiang X, Ren CH, Hu CQ. Study on sex differential metabolites and metabolic pathway of parental tropical sea cucumbers *Holothuria scabra*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 55–67

热带糙海参雌、雄亲参的差异代谢物 和差异代谢通路研究*



吴菲菲^{1,2#} 程楚杭^{1,2#} 陈廷^{1,3} 张鑫^{1,2} 吴小芬^{1,2}
江晓^{1,3} 任春华^{1,3①} 胡超群^{1,3①}

(1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态学重点实验室 广东省应用海洋生物学重点实验室
中国科学院南海海洋研究所 广州 510301; 2. 中国科学院大学 北京 100049;
3. 中国科学院南海生态环境工程创新研究院 广州 510301)

摘要 本研究基于 LC-MS/MS 代谢物分析方法, 探究了糙海参(*Holothuria scabra*)体腔液中性别特异性代谢物, 同时分析了代谢通路的性别差异。结果显示, 与雄性糙海参(M)相比, 在雌性糙海参(F)的体腔液中共筛选出 1352 个上调代谢物和 943 个下调代谢物。根据数据库比对和注释, 共筛选出 66 个具有显著差异的代谢物($P \leq 0.05$, $VIP \geq 1$), 其中, β -胡萝卜素具有作为性别差异代谢标志物的潜力。结果还显示, 体腔液中会积累其他器官需求较少的代谢产物, 如亚精胺在雌性中浓度较高, 而脂肪酸在雄性中种类多且含量较高, 这些产物可能在体腔液中发挥其他生理功能。另外发现, 雄性体腔液倾向于积累外源物质。通过 KEGG 进行的代谢通路分析表明, 雄性糙海参的性腺发育相关通路——谷胱甘肽代谢、精氨酸脯氨酸代谢、甾类化合物生物合成和酪氨酸代谢均发生在体腔液中; 雌、雄糙海参性腺发育受到性激素影响, 这种影响可能受到多巴胺的调节并具有性别差异。

关键词 糙海参; LC-MS/MS; 体腔液; 性别差异代谢物; 性别差异代谢通路

中图分类号 Q956 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0055-13

糙海参(*Holothuria scabra*)是一种具有较高营养价值、药用价值及经济价值的棘皮动物(廖玉麟, 1997)。20 世纪 80 年代以来, 随着沿海经济快速发展, 糙海参的近海栖息生境遭到严重破坏, 海洋环境条件

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901605)、国家自然科学基金(41906101)、广东省南方海洋科学与工程实验室引进人才重点专项项目(广州)(GML2019ZD0402)、中国科学院战略优先研究计划(XDA13020205)、广东省海洋渔业科技推广项目(SDYY-2018-01)和广东省科技规划项目(2020B1212060058)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901605), National Natural Science Foundation of China (41906101), Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0402), Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020205), Science & Technology Promoting Projects for Oceanic & Fishery in Guangdong Province (SDYY-2018-01), and Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2020B1212060058)].

#共同第一作者: 吴菲菲, E-mail: 630263117@qq.com; 程楚杭, E-mail: m15626473679@163.com

① 通讯作者: 任春华, 研究员, E-mail: rosemary166@sina.com; 胡超群, 研究员, E-mail: hucq@scsio.ac.cn

收稿日期: 2020-12-09, 收修稿日期: 2021-01-07

不断恶化。目前,广西和广东沿海的野生糙海参种群已基本绝迹,华南沿海仅海南东部有少量的野生资源(杨学明等, 2015)。糙海参已被世界自然保护联盟濒危物种红色名录(IUCN 红色名录)列为濒危物种(Lovatelli *et al*, 2004)。因此,人工繁育和养殖糙海参对于恢复糙海参资源显得尤为重要。在人工繁育过程中,糙海参的雌、雄辨别能在很大程度上优化人工繁育过程,但糙海参在外表上无法分辨雌雄(Conand, 1998)。关于海参雌雄差异的研究只在仿刺参(*Apostichopus japonicus*)上有少数相关报道,有研究构建了仿刺参性别特异性图谱,展示了染色体重组率的性别差异(Tian *et al*, 2015; Yan *et al*, 2013); Jiang 等(2019)根据检测产卵前后雌雄仿刺参体腔细胞转录组的免疫特征,描述了仿刺参性别特异性免疫差异,并发现脂肪酸组成可能是导致雌雄免疫差异的原因之一,然后通过蛋白组学揭示了仿刺参繁殖期间体液免疫和生理特性的性别差异,并表示雄性在产卵后可能会具有更强的恢复能力(Jiang *et al*, 2020)。但关于糙海参性别差异的研究尚属空白。因此,对于糙海参性别差异的研究有助于改良糙海参的人工繁育过程,并为糙海参性别决定机制的研究奠定基础。

代谢组学是一门研究生物体内各种生物化学过程的新兴学科,它主要聚焦于生物体内发生的生物化学过程所产生的代谢物,能够帮助研究者了解在某种生物体内已经发生的过程和变化,如代谢通路、能量传递和细胞通信等(Nicholson *et al*, 2002)。影响代谢物产生的因素有很多,如环境因素、生物体内部因素和饮食因素等,性别差异属生物体内部因素,不同性别的同种生物,其体内代谢物和性激素水平有很大差异。在不了解海参性别决定机制的情况下,对海参雌、雄亲参的代谢物差异进行研究,可以帮助了解雌、雄海参性别特异性化学过程和变化(Schock *et al*, 2010)。迄今已有很多关于水产动物代谢物具有性别特异的相关报道。Kleps 等(2007)发现,性别特异性代谢物 AEP (2-Aminoethyl phosphonate)仅存在于雄性蓝蟹(*Callinectes sapidus*)的鳃中,该代谢物可能发挥交配信息素的功能。一些研究发现,贻贝的外套膜脂质含量随繁殖周期的变化具有雌雄差异(Hines *et al*, 2007; Jabbar *et al*, 1987; Lubet *et al*, 1986); Aru 等(2017)使用 $^1\text{H-NMR}$ 技术探究了欧洲蛤仔(*Ruditapes decussatus*)受季节影响的代谢变化,发现了一些性别特异性候选分子标记,发现雄性蛤仔代谢物中的丙氨酸和甘氨酸含量显著高于雌性蛤仔,而乙酰乙酸、胆碱和磷酸胆碱在雌性蛤仔代谢物中的含量较高;克氏螯虾

(*Cherax tenuimanus*)的血淋巴代谢组研究表明,由于生殖活动或生活史的差异,雌、雄克氏螯虾的代谢物具有显著差异(Lette *et al*, 2020)。然而,关于海参性别差异代谢物研究目前尚属空白。海参体腔液浸泡着海参所有内脏(Conand, 1998),可能发挥物质运输和细胞信号传递(Laires, 2012)、性腺发育营养物和催产信息素贮存(Mercier *et al*, 2002)的功能,因此,海参体腔液可能参与性腺的分化和发育。

本研究以热带糙海参为研究对象,针对雌、雄亲参的体腔液进行代谢组学研究,对性别差异代谢物进行分析,推测可能存在的性别间差异代谢通路,以期糙海参性别决定机制以及性别鉴定提供有用的基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 体腔液样本采集

糙海参亲参来源于湛江市美珍种苗有限公司。通过组织学切片鉴定糙海参性别后,选取雌、雄亲参各 6 头,进行体腔液样本采集。将采集的体腔液先用 $100\ \mu\text{m}$ 细胞筛过滤以除去组织碎屑,随后在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12000\ \text{r/min}$ 条件下离心 10 min,以确保体腔细胞及其他微小杂质被完全清除,最后将上清液转移至 50 ml 离心管中,在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻保存备用。

1.2 体腔液样本处理

将体腔液样本置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 下融化,每个样本各取 10 ml,冻干成粉末。向每个冻干样本中分别加入 5 ml 乙腈溶液,震荡混匀 1 min。在 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12000\ \text{r/min}$ 条件下离心 10 min 后,吸取 $450\ \mu\text{l}$ 上清液转移至新的 1.5 ml 离心管中,真空浓缩干燥。加入 $150\ \mu\text{l}$ 含有 2-氯苯丙氨酸($4\ \text{mg/L}$)的 50%乙腈溶液重新溶解上述已浓缩干燥的上清液,通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 膜过滤,获得待测样本。从每个待测样本中各取 $20\ \mu\text{l}$ 溶液混合成质量控制(QC)样本,用于校正分析结果的偏差及由于分析仪器原因所造成的失误。其余样品用于 LC-MS 检测。

1.3 LC-MS 检测

进样顺序:加入混标溶液用于检测仪器状态,仪器状态良好后,加入 QC 样品用于稳定仪器,然后再依次加入空白溶剂(阴性对照)和待测样品,每 10 个样本加入 1 针 QC 样本。

色谱条件:仪器采用 Thermo Ultimate 3000,使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 $1.8\ \mu\text{m}$ ($2.1\times 150\ \text{mm}$) 色谱柱,自动进样器温度设为 $8\ ^\circ\text{C}$,以 $0.25\ \text{ml/min}$ 的流

速、40℃的柱温以及进样 2 μl 进行梯度洗脱, 流动相为正离子 0.1%甲酸水(D)-0.1%甲酸乙腈(C)和负离子 5 mmol/L 甲酸铵水(B)-乙腈(A)。梯度洗脱程序: 0~1 min, 2% A/C; 1~9 min, 2%~50% A/C; 9~12 min, 50%~98% A/C; 12~13.5 min, 98% A/C; 13.5~14 min, 98%~2% A/C; 14~20 min, 2% C-正模式; 14~17 min, 2% A-负模式。

质谱条件: 仪器使用 Thermo Q Exactive Focus, 为电喷雾离子源(ESI), 正负离子电离模式, 正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 2.50 kV, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb。毛细管温度 325℃, 以分辨率 70000 进行全扫描, 扫描范围 81~1000, 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞电压为 30 eV, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.4 数据处理

1.4.1 样本数据预处理及代谢物鉴定和筛选 通过 Proteowizard 软件(v3.0.8789), 将获得的原始数据转换成 mzXML 格式(xcms 输入文件格式), 利用 R(v3.3.2) 的 XCMS 程序包进行峰识别、峰过滤和峰对齐。主要参数有 bw=5、ppm=15、peakwidth=c(5,30)、mzwid=0.015、mzdiff=0.01 及 method="centWave"。得到包括质核比(m/z)、保留时间和峰面积等信息的数据矩阵。为使不同量级的数据能够进行比较, 对数据进行峰面积的批次归一化。代谢物的鉴定首先需确认代谢物的精确分子量(分子量误差 <20 ppm), 然后根据 MS/MS 模式所得的碎片信息, 在 Metlin(<http://metlin.scripps.edu>)、LipidMaps(<http://www.lipidmaps.org>)、mzcloud(<https://www.mzcloud.org>)和帕诺米克自建标准品数据库中进一步匹配和注释所获得代谢物的准确信息。

1.4.2 多元统计分析 在多元统计分析前, 对数据采用 UV 换算以进行标准化处理, 采用主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)的多元统计方法对采集的多维数据进行降维和归类分析, 观察样品的聚集和离散程度。

1.4.3 差异代谢物统计分析及通路分析 差异代谢物的筛选指标为 $P \leq 0.05 + \text{VIP} \geq 1$ 。采用 R(v3.3.2) 中的 cor 函数计算相关系数, 同时采用 R(v3.3.2) 中的 cor.test 函数对代谢物进行关联分析和统计检验, 将 $P \leq 0.05$ 作为差异显著的判断标准。采用凝聚层次聚类分析各组样本的聚类情况, 通过 R(v3.3.2) 中 pheatmap 程序包对数据集进行缩放, 得到代谢物相对定量值层次聚类图, 用来推测已知或未知代谢物的生物学功

能。应用 KEGG 进行代谢网络的预测, 并采用 MetPA 数据库分析 2 组差异代谢物的相关代谢通路, 通过降维算法获得代谢通路中代谢物的相对响应值, 并以此计算代谢通路间的相关系数, 进而绘制代谢通路关联网络图。

2 结果

2.1 性别差异代谢物的鉴定

在本研究中, 采用 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 等多元统计的分析方法对数据进行处理。如 PCA 主成分分析得分图(图 1A)所示, 雌性糙海参(F)组和雄性糙海参(M)组样本表现为组内聚类以及组间离散, 可以看出 F 组和 M 组样本具有差异; 进一步通过 PLS-DA 得分图(图 1B)分析, 结果显示, F 组和 M 组之间表现明显的离散趋势, 可以很好地区分, 表明雌性和雄性样本的代谢物具有显著差异。PLS-DA 置换检验图可以作为评估 PLS-DA 模型可靠有效的标准, 解决模型存在过拟合的问题, 其可靠性标准为(满足其中一个即可): 所有蓝色的 Q2 点从左到右均低于最右的原始蓝色 Q2 点或点的回归线与横坐标交叉或者小于 0, 从图 1C 可以看出, PLS-DA 模型得到的结果是可靠有效的; 图 1D 表示 OPLS-DA 主成分分析得分图, 可以看出, F 组和 M 组能很好地区分, 组内关联性很高, 组间差异很大, 再一次表明雌、雄糙海参体腔液中的代谢物具有显著差异。

本研究采用 $P \leq 0.05$ 及 $\text{VIP} \geq 1$ 作为相关差异代谢物的筛选指标, 与 M 组相比, F 组的体腔液中共筛选出 1352 个上调代谢物和 943 个下调代谢物(图 2)。

2.2 糙海参体腔液中的性别差异代谢物

根据精确分子量及数据库比对, 最终确认 66 个具有显著差异和明确注释的代谢物(表 1)。本研究还对糙海参体腔液中的性别差异代谢物进行凝聚层次聚类分析(图 3A), 显示有 27 个代谢物在雌性体腔液中上调, 39 个代谢物在雄性体腔液中上调, 并且雌性组内以及雄性组内的数据重复性较好。

由表 1 看出, 大多数性别差异代谢产物属于脂类和氨基酸; 与脂肪酸生物合成相关的代谢物, 如硬脂酸(Fold Change_{F/M}=0.448)、肉豆蔻酸(Fold Change_{F/M}=0.428)、丙二酸(Fold Change_{F/M}=0.247)、棕榈酸(Fold Change_{F/M}=0.238)和油酸(Fold Change_{F/M}=0.233)等在雄性体腔液中的含量显著高于雌性; 与性激素相关的脱氢表雄酮(Fold Change_{F/M}=0.506)在

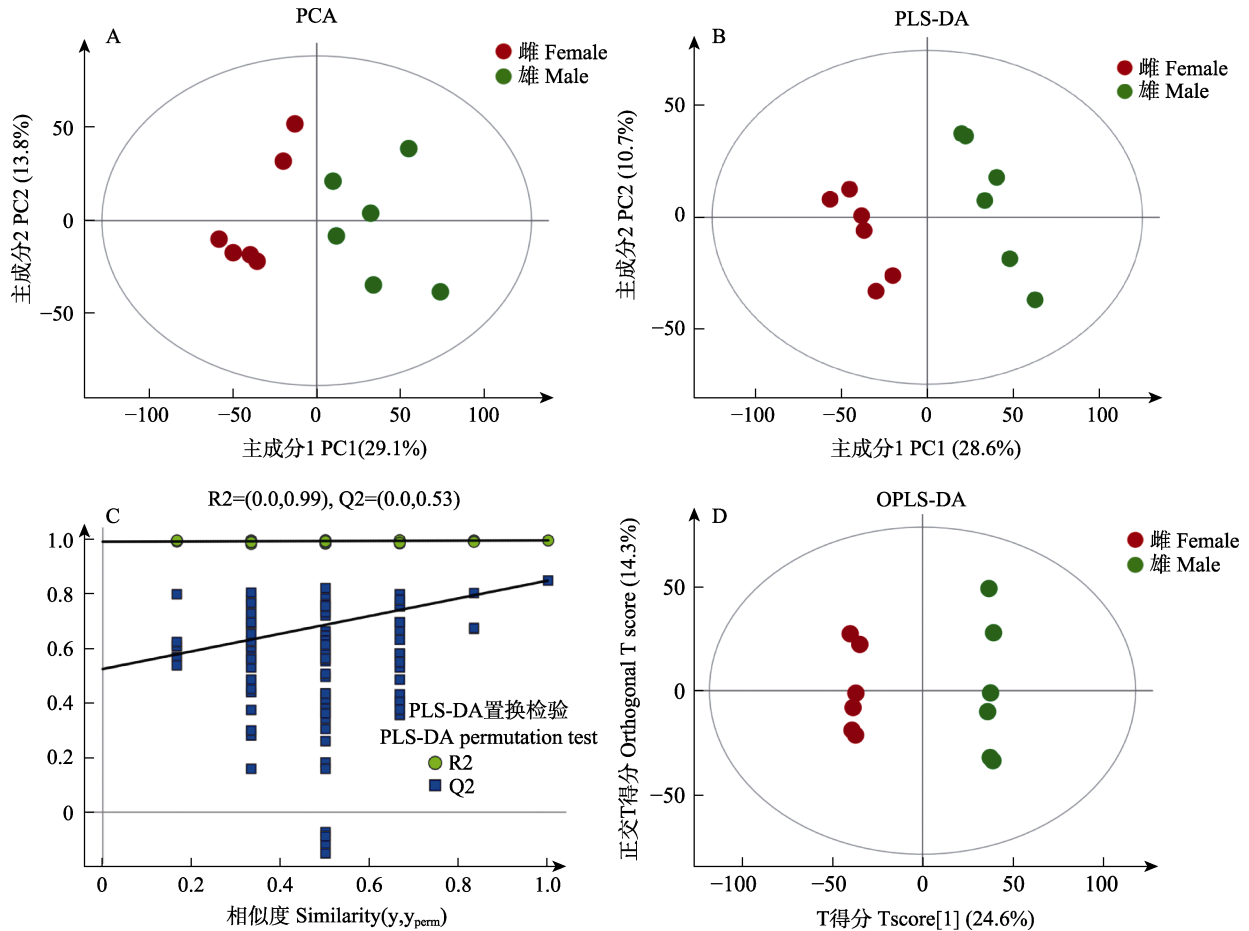


图 1 糙海参体腔液代谢物的多元统计分析及 PLS-DA 置换检验

Fig.1 The multivariate analysis and PLS-DA permutation test of coelomic fluid in *H. scabra*

A: PCA 得分图; B: PLS-DA 得分图; C: PLAS-DA 置换检验得分图; D: OPLS-DA 得分图

R2 和 Q2 是模型验证参数, 分别表示模型可解释度和模型可预测度

A: PCA score plot; B: PLS-DA score plot; C: PLAS-DA permutation test plot; D: OPLS-DA score plot

R2 and Q2, two parameters of permutation test, represent model interpretability and model predictability respectively

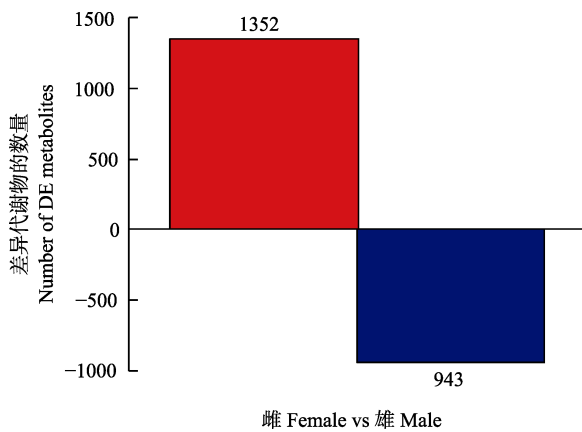


图 2 性别差异代谢物统计柱状图

Fig.2 The statistical histogram of sex-specific metabolites

雄性中的含量也显著高于雌性(图 3B); 同时, 外源物质 2-萘酚(Fold Change_{F/M}=0.050)、异烟酸(Fold

Change_{F/M}=0.134)、尼古丁(Fold Change_{F/M}=0.307)、3-羟基苯乙酸(Fold Change_{F/M}=0.414)和茶碱(Fold Change_{F/M}=0.433)等在雄性体腔液中的含量也远高于雌性, 可能预示着雌、雄糙海参对于外源物质的积累具有一定的差异性。而氨基酸代谢物, 如 3,4-二羟基苯乙二醇(DOPEG) (Fold Change_{F/M}=6.894)、3-吡啶乙腈(Fold Change_{F/M}=4.768)、甲基丙二酸(Fold Change_{F/M}=4.715)、亚精胺(Fold Change_{F/M}=4.602)、p-羟基苯乙酸(4-HPA)(Fold Change_{F/M}=2.715)和 3,4-二羟基扁桃酸(DOMA) (Fold Change_{F/M}=2.075)等在雌性体腔液中的含量显著高于雄性; 另外, 雌性体腔液中的 β-胡萝卜素(Fold Change_{F/M}=8.517)含量远高于雄性(图 3C), 由于 β-胡萝卜素涉及卵子的色素沉积, 具有可作为性别差异代谢标志物的潜力。

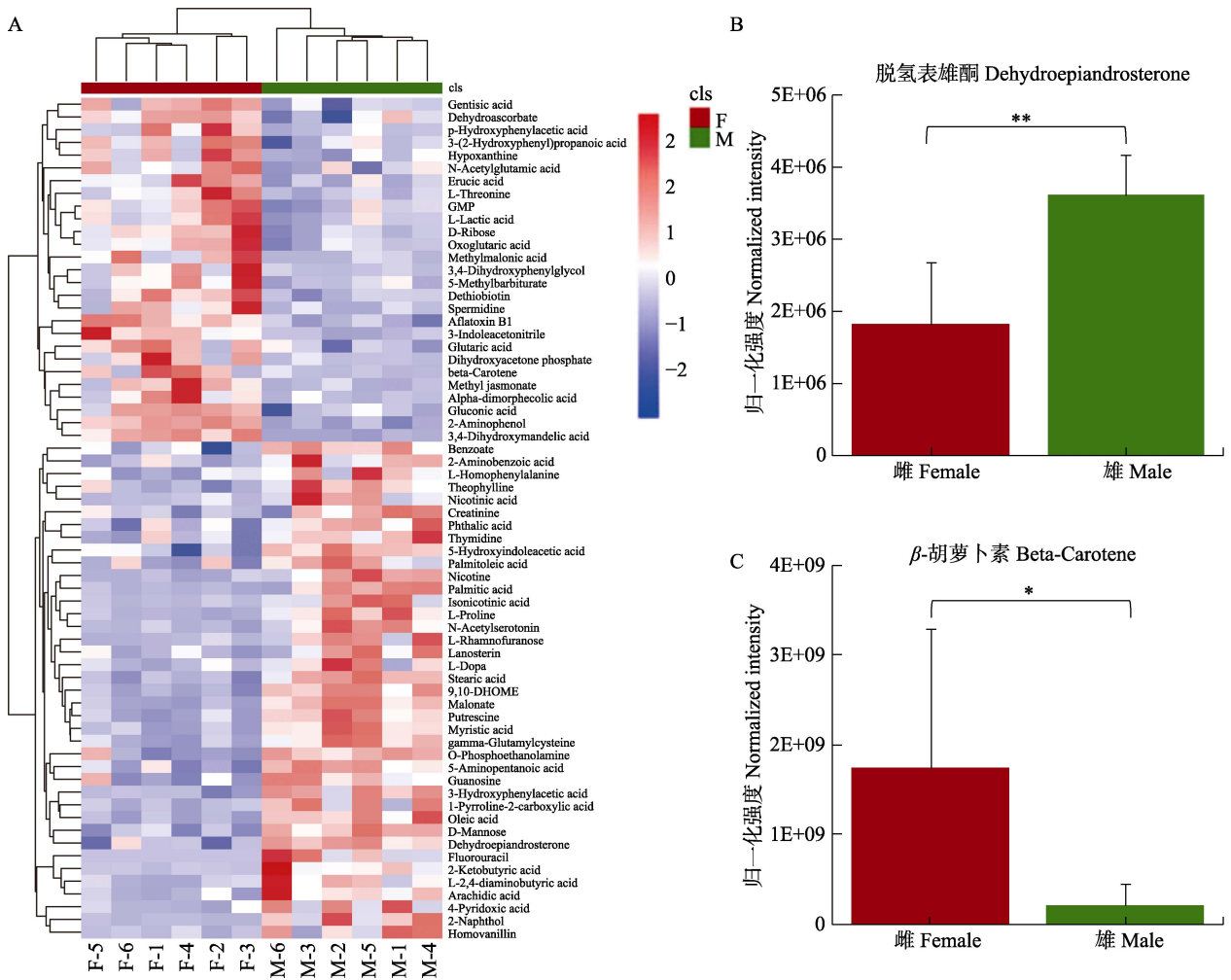


图 3 A: 性别差异代谢物的凝聚层次聚类热图; B: 体腔液脱氢表雄酮柱状图; C: 体腔液中的 β -胡萝卜素柱状图

Fig.3 A: The agglomerate hierarchical clustering heatmap of sex-specific metabolites;

B: Histogram of dehydroepiandrosterone in coelomic fluid; C: Histogram of beta-carotene in coelomic fluid

*代表差异显著, $0.05 < P < 0.1$; **代表差异极显著, $0.01 < P < 0.05$

* represents significant difference, $0.05 < P < 0.1$; ** represents highly significant difference, $0.01 < P < 0.05$

表 1 差异显著的性别差异代谢物 ($P \leq 0.05 + VIP \geq 1$) [按照 $\log_2(FC_{F/M})$ 大小排序]

Tab.1 Significantly different sex-specific metabolites ($P \leq 0.05 + VIP \geq 1$) [The order according to the score of $\log_2(FC_{F/M})$]

名称 Name	一级分类 Super-pathway	二级分类 Sub-pathway	倍性变化 Fold Change _{F/M}	$\log_2(FC_{F/M})$	P
β -胡萝卜素 β -Carotene	脂类 Lipid	类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	8.517	3.090	0.036
3,4-二羟基苯乙二醇 3,4-Dihydroxyphenylglycol	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	6.894	2.785	0.040
磷酸二氢丙酮 Dihydroxyacetone phosphate	糖类 Carbohydrate	糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	5.460	2.449	0.041
3-吲哚乙腈 3-Indoleacetonitrile	氨基酸 Amino acid	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	4.768	2.254	0.006
甲基丙二酸 Methylmalonic acid	氨基酸 Amino acid	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	4.715	2.237	0.025
亚精胺 Spermidine	氨基酸 Amino acid	精氨酸与脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	4.602	2.202	0.029

续表 1

名称 Name	一级分类 Super-pathway	二级分类 Sub-pathway	倍性变化 Fold Change_ F/M	$\log_2(\text{FC}_{\text{F/M}})$	<i>P</i>
茉莉酸甲酯 Methyljasmonate	脂类 Lipid	α -亚麻酸代谢 α -Linolenic acid metabolism	3.934	1.976	0.011
α -二吗啉酸 α -Dimorphelic acid	脂类 Lipid	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	3.280	1.714	0.042
p-羟基苯乙酸 p-Hydroxyphenylacetic acid	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	2.715	1.441	0.049
芥酸 Erucic acid	脂类 Lipid	饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2.261	1.177	0.020
5-甲基巴比妥 5-Methylbarbiturate	核苷酸 Nucleotide	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	2.123	1.086	0.049
3,4-二羟基扁桃酸 3,4-Dihydroxymandelic acid	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	2.075	1.053	0
L-苏氨酸 L-Threonine	氨基酸 Amino acid	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	1.989	0.992	0.029
次黄嘌呤 Hypoxanthine	核苷酸 Nucleotide	嘌呤代谢 Purine metabolism	1.889	0.917	0.026
氨基苯酚 2-Aminophenol	外源物质 Xenobiotics	氨基苯甲酸酯降解 Aminobenzoate degradation	1.825	0.868	0
脱硫生物素 Dethiobiotin	辅因子与维生素 Cofactors and Vitamins	生物素代谢 Biotin metabolism	1.779	0.831	0.012
D-核糖 D-Ribose	糖类 Carbohydrate	戊糖磷酸途径 Pentose phosphate pathway	1.565	0.646	0.008
酮戊二酸 Oxoglutaric acid	糖类 Carbohydrate	柠檬酸循环 Citrate cycle	1.472	0.558	0.015
鸟嘌呤苷酸 GMP	核苷酸 Nucleotide	嘌呤代谢 Purine metabolism	1.366	0.449	0.027
黄曲霉毒素 Aflatoxin B1	外源物质 Xenobiotics	黄曲霉毒素生物合成 Aflatoxin biosynthesis	1.344	0.427	0
3-(2-羟基苯基)丙酸 3-(2-Hydroxyphenyl) propanoic acid	外源物质 Xenobiotics	多环芳烃降解 Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	1.315	0.395	0.022
L-乳酸 L-Lactic acid	糖类 Carbohydrate	丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	1.238	0.308	0.037
N-乙酰谷氨酸 N-Acetylglutamic acid	氨基酸 Amino acid	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	1.211	0.276	0.044
脱氢抗坏血酸 Dehydroascorbate	辅因子与维生素 Cofactors and Vitamins	抗坏血酸和醛糖代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	1.148	0.199	0.014
葡萄糖酸 Gluconic acid	糖类 Carbohydrate	戊糖磷酸途径 Pentose phosphate pathway	1.095	0.131	0.002
龙胆酸 Gentisic acid	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	1.084	0.117	0.007
戊二酸 Glutaric acid	氨基酸 Amino acid	赖氨酸降解 Lysine degradation	1.069	0.096	0.009
O-磷酸乙醇胺 O-Phosphoethanolamine	脂类 Lipid	甘油磷脂 Glycerophospholipid	0.737	-0.441	0.001
苯甲酸酯 Benzoate	外源物质 Xenobiotics	苯甲酸降解 Benzoate degradation	0.677	-0.563	0.005
5-羟基吲哚乙酸 5-Hydroxyindoleacetic acid	氨基酸 Amino acid	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	0.674	-0.569	0.003

续表 1

名称 Name	一级分类 Super-pathway	二级分类 Sub-pathway	倍性变化 Fold Change_ F/M	$\log_2(\text{FC}_{\text{F/M}})$	<i>P</i>
肌酐 Creatinine	氨基酸 Amino acid	精氨酸与脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	0.663	-0.594	0.044
邻苯二甲酸 Phthalic acid	外源物质 Xenobiotics	多环芳烃降解 Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	0.653	-0.614	0.014
5-氨基戊酸 5-Aminopentanoic acid	氨基酸 Amino acid	赖氨酸降解 Lysine degradation	0.607	-0.720	0.002
鸟苷 Guanosine	核苷酸 Nucleotide	嘌呤代谢 Purine metabolism	0.574	-0.802	0.019
棕榈油酸 Palmitoleic acid	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.542	-0.884	0.043
羊毛甾醇 Lanosterin	脂类 Lipid	甾体生物合成 Steroid biosynthesis	0.538	-0.893	0.035
乙酰血清素 N-Acetylserotonin	氨基酸 Amino acid	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	0.536	-0.899	0.005
胸苷 Thymidine	核苷酸 Nucleotide	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	0.525	-0.929	0.019
高香草醛 Homovanillin	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	0.511	-0.970	0.029
脱氢表雄酮 Dehydroepiandrosterone	脂类 Lipid	甾体激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	0.506	-0.984	0.002
γ -谷氨酰半胱氨酸 γ -Glutamylcysteine	肽类 Peptide	γ -谷氨酰氨基酸 γ -Glutamyl amino acid	0.468	-1.095	0.002
硬脂酸 Stearic acid	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.448	-1.160	0.000
茶碱 Theophylline	外源物质 Xenobiotics	咖啡因代谢 Caffeine metabolism	0.433	-1.207	0.012
肉豆蔻酸 Myristic acid	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.428	-1.223	0.002
3-羟基苯乙酸 3-Hydroxyphenylacetic acid	外源物质 Xenobiotics	苯乙烯降解 Styrene degradation	0.414	-1.274	0
L-同苯基丙氨酸 L-Homophenylalanine	氨基酸 Amino acid	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	0.410	-1.286	0.039
2-氨基苯甲酸 2-Aminobenzoic acid	氨基酸 Amino acid	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	0.381	-1.392	0.030
L-多巴 L-Dopa	氨基酸 Amino acid	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	0.379	-1.401	0.048
花生酸 Arachidic acid	脂类 Lipid	不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0.370	-1.436	0.014
L-2, 4-二氨基丁酸 L-2,4-diaminobutyric acid	氨基酸 Amino acid	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	0.360	-1.473	0.024
9,10-DHOME	脂类 Lipid	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	0.356	-1.490	0
1-吡咯啉-2-羧基 1-Pyrroline-2-carboxylic acid	氨基酸 Amino acid	精氨酸与脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	0.349	-1.518	0.011
腐胺 Putrescine	氨基酸 Amino acid	精氨酸与脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	0.341	-1.551	0.001
4-吡哆酸 4-Pyridoxic acid	辅因子与维生素 Cofactors and Vitamins	维生素 B6 代谢 Vitamin B6 metabolism	0.318	-1.654	0.031

续表 1

名称 Name	一级分类 Super-pathway	二级分类 Sub-pathway	倍性变化 Fold Change_ F/M	$\log_2(\text{FC}_F/\text{M})$	<i>P</i>
尼古丁 Nicotine	外源物质 Xenobiotics	烟草代谢物 Tobacco metabolite	0.307	-1.704	0.003
D-甘露糖 D-Mannose	糖类 Carbohydrate	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	0.280	-1.837	0.000
丙二酸 Malonate	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.247	-2.019	0.000
棕榈酸 Palmitic acid	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.238	-2.069	0.004
油酸 Oleic acid	脂类 Lipid	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	0.233	-2.099	0.001
脯氨酸 L-Proline	氨基酸 Amino acid	精氨酸与脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	0.159	-2.657	0.003
烟酸 Nicotinic acid	辅因子与维生素 Cofactors and Vitamins	烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.151	-2.725	0.038
异烟酸 Isonicotinic acid	外源物质 Xenobiotics	药物代谢-其他酶 Drug metabolism-other enzymes	0.134	-2.904	0.018
2-酮丁酸 2-Ketobutyric acid	糖类 Carbohydrate	丙酸代谢 Propanoate metabolism	0.118	-3.081	0.039
L-鼠李糖 L-Rhamnofuranose	糖类 Carbohydrate	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	0.081	-3.627	0.011
2-萘酚 2-Naphthol	外源物质 Xenobiotics	细胞色素影响外源性物质代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome	0.050	-4.323	0.008
氟尿嘧啶 Fluorouracil	未知 Unknown	未知 Unknown	0	-17.298	0.035

2.3 性别差异代谢物相关代谢通路分析

将不同的代谢产物数据导入 KEGG 数据库及 MetPA 数据库进行分析,共获得 38 条性别差异代谢物的相关代谢通路。其中, 雄性差异代谢物多富集于不饱和脂肪酸合成代谢、精氨酸与脯氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、色氨酸代谢和脂肪酸生物合成代谢; 而雌性差异代谢物主要富集于酪氨酸代谢、糖酵解或糖异生和嘌呤代谢。根据富集和影响因子分析得到代谢通路影响因子气泡图(图 4), 其中, 5 个为具有显著性功能的代谢通路(Pathway impact>0.1), 分别为酪氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、甾类化合物生物合成和药物代谢通路。

结合表 1 可知, 雌性糙海参体腔液中含量较高的 DOPEG (Fold Change_{F/M}=6.894)、DOMA (Fold Change_{F/M}=2.075)、4-HPA(Fold Change_{F/M}=2.715)和龙胆酸(Fold Change_{F/M}=1.084)以及雄性体腔液中的高香草醛(Fold Change_{F/M}=0.511)和 L-多巴(L-DOPA) (Fold Change_{F/M}=0.379)均参与酪氨酸代

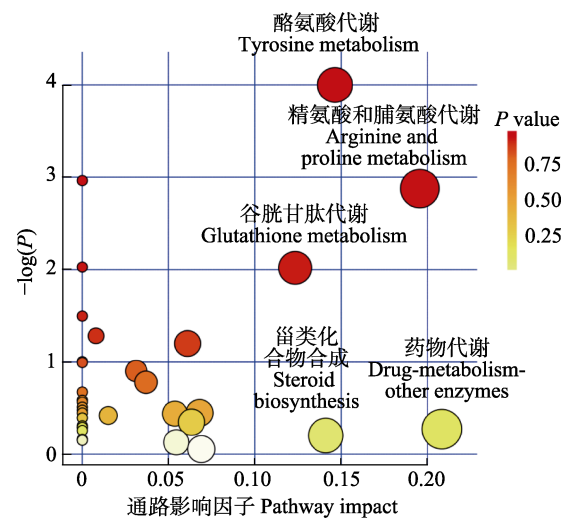


图 4 代谢通路影响因子气泡图
Fig.4 Bubble chart of pathway impact

X 轴代表通路富集, y 轴代表通路影响; 点的大小和颜色深浅代表主要通路的富集程度和影响程度

The x-axis represents pathway enrichment, and the y-axis represents pathway impact. Circle sizes and colors represent pathway enrichment and pathway impact values, respectively

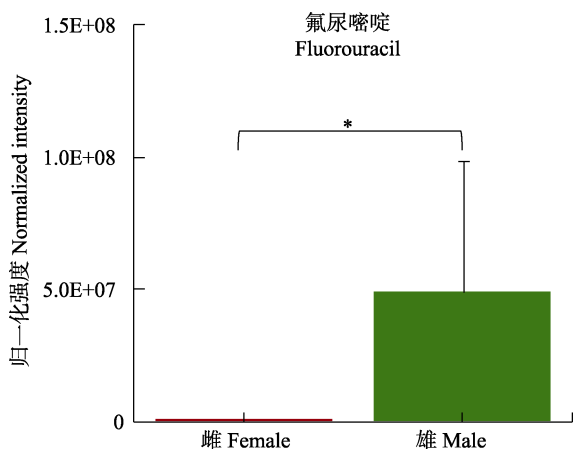


图5 体腔液中氟尿嘧啶柱状图

Fig.5 Histogram of fluorouracil in coelomic fluid

谢; 甾类化合物合成则由雄性差异代谢物羊毛甾醇 (Fold Change_{F/M}=0.538)参与。药物代谢在本代谢组研究中具有较高的影响因子 (Pathway impact=0.20833), 参与其中的代谢物只有氟尿嘧啶, 如图5所示, 氟尿嘧啶只富集于雄性糙海参体腔液中。对体腔液外源物质进行统计后发现, 与雌性相比, 雄性糙海参体腔液更具有积累外源物质的倾向(表2)。

精氨酸和脯氨酸代谢和谷胱甘肽代谢均与精子的发生和成熟相关, 腐胺 (Fold Change_{F/M}=0.341) 和亚精胺 (Fold Change_{F/M}=4.602) 是关键的中代谢物, 腐胺可以生成亚精胺; 表1的结果显示, 腐胺富集在雄性中, 而亚精胺则富集在雌性中, 表明体腔液对这2个代谢物的利用情况具有明显的性别差异。

表2 体腔液外源物质统计

Tab.2 Statistical list of xenobiotics in coelomic fluid

名称 Name	一级分类 Super-pathway	倍性变化 Fold Change _{F/M}	$\log_2(\text{FC}_{F/M})$	<i>P</i>
雌性含量高 High concentration in female				
氨基苯酚 2-Aminophenol	外源物质 Xenobiotics	1.825	0.868	0.000
黄曲霉毒素 B1 Aflatoxin B1	外源物质 Xenobiotics	1.344	0.427	0.000
3-(2-羟苯基)丙酸 3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid	外源物质 Xenobiotics	1.315	0.395	0.022
雄性含量高 High concentration in male				
苯甲酸酯 Benzoate	外源物质 Xenobiotics	0.677	-0.563	0.005
邻苯二甲酸 Phthalic acid	外源物质 Xenobiotics	0.653	-0.614	0.014
茶碱 Theophylline	外源物质 Xenobiotics	0.433	-1.207	0.012
3-羟基苯乙酸 3-Hydroxyphenylacetic acid	外源物质 Xenobiotics	0.414	-1.274	0.000
尼古丁 Nicotine	外源物质 Xenobiotics	0.307	-1.704	0.003
异烟酸 Isonicotinic acid	外源物质 Xenobiotics	0.134	-2.904	0.018
2-萘酚 2-Naphthol	外源物质 Xenobiotics	0.050	-4.323	0.008
氟尿嘧啶 Fluorouracil	未知 Unknown	0.000	-17.298	0.035

3 讨论

3.1 β -胡萝卜素具有作为标志性雌、雄差异代谢物的潜力

海洋生物体内存在着多种类胡萝卜素, 但一般来说, 动物体内不能直接合成类胡萝卜素, 所以这种代谢物的积累可能与生物体的摄食偏好或某些代谢反应修饰有关 (Matsuno, 2001; Liaen-Jensen, 1991; Maoka, 2009)。棘皮动物由于生殖需要, 在性成熟时期, 其体内会积累类胡萝卜素。 β -胡萝卜素在海参中十分常见, 它能保护卵子免受光氧化和氧中毒的损害 (Matsuno *et al.*, 1995), Maoka 等 (2011) 在海参性腺中发现了 β -胡萝卜素的氧化代谢产物角黄素和虾青素,

它们是海参性腺的主要成分。之前也有研究结果表明, 雌性海胆 (*Strongylocentrotus droebachiensis*) 在产卵期间, 其体内类胡萝卜素含量呈现大幅度下降的趋势, 而在性腺恢复过程中, 类胡萝卜素又具有补充的趋势, 而雄性海胆中的类胡萝卜素含量在生殖周期基本保持稳定, 这说明海胆对类胡萝卜素的吸收和利用存在性别差异 (Hagen *et al.*, 2008)。在本研究中, 雌性糙海参体腔液中的 β -胡萝卜素水平显著高于雄性 ($P < 0.05$) (图3C), 由于在性腺成熟期, 体腔液是十分重要的运输介质 (John, 1964), 因此, 我们认为海参对 β -胡萝卜素的吸收和利用也存在性别差异: 在性腺发育过程中, 雌性海参往往需要吸收大量的 β -胡萝卜素来补偿卵子成熟的需求, β -胡萝卜素可能通过体腔液从肠道输送到性腺, 从而发挥保护作用或进行氧化代

谢为卵子提供必需物质(Allen, 1974)。由于雄性海参体内 β -胡萝卜素含量远远低于雌性, 因此, 可将 β -胡萝卜素作为雌、雄差异的标志代谢物, 用来鉴定性腺成熟期糙海参的性别。

3.2 雌、雄糙海参体腔液中的差异代谢物

脱氢表雄酮(Fold Change_{F/M}=0.506)是性激素的来源, 可以转变为睾酮和雌二醇(Henderson, 2007), 在水产养殖中, 其可以作为饲料添加剂诱导杂交罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*)幼体雄性化, 同时还能提高饲料转化率及增加体重(Mohamed *et al.*, 2012), 其在雄性糙海参中的含量显著高于雌性 ($P < 0.05$)(图 3C), 推测在海参体腔液中存在脱氢表雄酮转化过程的雌雄差异。

亚精胺(Fold Change_{F/M}=4.602)同腐胺(Fold Change_{F/M}=0.341)和精胺一样属于多胺, 是最初从人类精液里提取出来的精液蛋白, 在人类体内具有抗氧化作用(Madeo *et al.*, 2018), 亚精胺和腐胺通过参与精氨酸和脯氨酸代谢通路生成精胺(精氨酸→腐胺→亚精胺→精胺), 亚精胺和精胺是形成精子的必要物质, 因此, 一般来说, 雄亲参会更需要亚精胺和腐胺, 而本研究的数据却显示, 在雌性体腔液中, 亚精胺含量显著高于雄性, 腐胺则富集在雄性中; 推测这可能是由于在糙海参亲参生殖活动旺盛时期, 其精氨酸和脯氨酸代谢旺盛, 合成的腐胺首先在体腔液中积累, 随后由亚精胺合成酶(Spermidine synthase)将腐胺转化成亚精胺, 由于精巢的需要, 雄性的亚精胺可以转运到精巢中以满足精子的发育需求, 所以雄性体腔液中的亚精胺含量降低而腐胺不断合成以继续生成亚精胺满足精巢的需求; 而卵巢并不需要亚精胺, 所以它累积在了雌性体腔液中, 并且抑制了腐胺的合成, 造成了亚精胺含量较高而腐胺较低的结果。

同样的, 雄性体腔液中也富集了较多的卵巢需求较大的脂肪酸合成代谢相关代谢物(表 1)。有研究表明, 野生雌性大西洋鲑(*Salmo salar*)在性腺指数上升时, 其血浆中的游离脂肪酸含量大幅度下降, 这些营养物质在很大程度上被分配到性腺中(Booth *et al.*, 1999)。Gianasi 等(2017)也发现, 喂食鱼卵的雌性叶瓜参(*Cucumaria frondosa*)的卵母细胞较大, 性腺所富含的必需脂肪酸的比例较多, 说明卵子的成熟需要大量脂肪酸的积累, 脂肪酸可能从体腔液中转运到性腺, 因而雌性体腔液中的脂肪酸含量明显低于雄性。

综上所述, 糙海参亲参性腺发育相关通路有一部分会在体腔液中发生, 产生的雌、雄性腺发育所必需的代谢产物先积累在体腔液中, 根据性腺发育需求,

代谢产物被转运到性腺中以满足下一步代谢的需求, 造成剩余的代谢产物的种类和数量具有明显的雌雄差异, 但不排除它们在体腔液中另有作用的可能性, 其功能有待进一步研究。

3.3 雌雄亲参的性别差异代谢通路

通过代谢物富集分析发现, 雄性体腔液中的代谢物多参与谷胱甘肽代谢以及精氨酸脯氨酸代谢, 这 2 条代谢通路均在精子的发生和成熟过程中起重要作用(Sies, 1999), 其中, 亚精胺、腐胺和 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -Glutamylcysteine, 3GC)参与谷胱甘肽代谢, 而亚精胺和腐胺也同时参与精氨酸脯氨酸代谢。腐胺(Fold Change_{F/M}=0.341)和 3GC(Fold Change_{F/M}=0.468)在雄性体腔液中含量较高, 腐胺的代谢流向是精胺和亚精胺, 而 3GC 和精胺可进行下一步反应, 从而在精子发生和成熟过程中发挥作用。因此, 雄性体腔液中上述 2 种通路流向精胺的代谢过程较为活跃, 从而能为精子发生与成熟提供需要的营养和能量。本研究的结果显示, 亚精胺在雌性体腔液中含量显著较高(Fold Change_{F/M}=4.602), 由于雌性不需要参与精子发生和成熟过程, 因而在雌性中亚精胺不继续进行下一步代谢而滞留在体腔液中。此外, 雄性差异代谢物羊毛甾醇(Fold Change_{F/M}=0.538)是甾类化合物生物合成的中间代谢产物, 羊毛甾醇可经过一系列生物化学转化, 形成胆固醇和性激素等甾族物质, 表明在糙海参雄性体腔液中性激素的合成通路较为活跃。氟尿嘧啶是参与药物代谢的唯一代谢物, 它只在雄性体腔液中富集(图 5)。氟尿嘧啶是广泛应用于人体治疗的抗肿瘤药物(Jamieson *et al.*, 2014), 由于工业、医药和环境污染等问题, 使得一些化学物质流入土壤和水体, 对生态环境和生物多样性造成了一定程度的损害(Gavrilescu *et al.*, 2015), 为此, 吴海燕等(2012)建立了海参等体内药物残留液相色谱-荧光检测方法。有研究表明, 氟尿嘧啶在水体中浓度低时也会触发蝌蚪的恶性细胞转化过程, 从而导致突变(Araújo *et al.*, 2019), 其对糙海参的具体影响尚未明确。这种氟尿嘧啶浓度的差异预示了糙海参对于化学药物等外源物质的摄取趋向具有显著的性别差异, 表 2 的数据也说明, 无论从种类还是含量上来看, 雄性体腔液比雌性更容易积累外源物质。

酪氨酸代谢可以产生许多重要激素和神经递质, 包括甲状腺素、三碘甲状腺氨酸、肾上腺素、多巴胺和黑色素等(Li *et al.*, 2009), 其中, 多巴胺在鱼类性腺发育期具有激素调控作用(Peter *et al.*, 1988), 并且海胆也具有多巴胺能神经系统(汝少国等, 2015)。雌性体

腔液中的 DOMA 和 DOPEG 以及雄性体腔液中的高香草醛(HMPAL)(Fold Change_{F/M}=0.511)和多巴胺前体 L-DOPA (Fold Change_{F/M}=0.379 (Calvo *et al.*, 2011)均为酪氨酸代谢产物, 这些代谢物的富集表明在海参体腔液中流向多巴胺前体 L-DOPA 的代谢活动十分活跃, 但由于雌、雄体腔液中多巴胺代谢相关酶的表达具有差异, 导致产生的代谢产物种类具有差异, 这一结果与金钱鱼(*Scatophagus argus*)性腺成熟时多巴胺系统具有性别表达差异一致(苏冒亮, 2017), 而这一代谢通路的作用推测与性激素调节有关。

综上所述, 雄性体腔液中的代谢物多富集于谷胱甘肽代谢、精氨酸脯氨酸代谢、甾类化合物生物合成和药物代谢, 涉及精子发生及成熟、性激素合成以及外源物质积累等过程; 同时, 雌、雄体腔液代谢物多参与酪氨酸代谢过程, 该过程涉及激素合成及多巴胺调节激素过程, 表明糙海参雌、雄性腺的发育可能受到多巴胺的影响, 并且这种影响具有性别代谢差异。

4 结论

本研究表明, 体腔液可以积累性腺发育所需要的代谢物, 其中, β -胡萝卜素在糙海参雌性体腔液中大量积累, 可作为雌、雄差异标志代谢物; 体腔液还能够积累性腺发育不需要的代谢物, 如雌性积累亚精胺, 而雄性积累脂肪酸合成通路代谢物, 推测这是由于雌、雄性腺发育所需要的代谢过程有部分在体腔液中发生, 产生的代谢物一部分转运到性腺中为性腺发育提供能量或营养, 其余的代谢物则滞留在体腔液中, 可能具有其他生理作用; 同时发现, 糙海参雌、雄性腺发育过程有性激素的参与, 性激素调节可能受到多巴胺的影响, 并且这种影响具有性别代谢差异; 通过对比外源代谢物的数量和种类, 发现雄性糙海参体腔液相比雌性更容易积累外源物质特征, 其中, 氟尿嘧啶属于环境污染物, 它的积累对雄性糙海参的影响需要进一步的研究。总之, 糙海参雌、雄体腔液代谢物具有明显的性别差异。

参 考 文 献

- Allen WV. Interorgan transport of lipids in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology*, 1974, 47(4): 1297–1311
- Araújo A, Mesak C, Montalvão MF, *et al.* Anti-cancer drugs in aquatic environment can cause cancer: Insight about mutagenicity in tadpoles. *Science of the Total Environment*, 2019, 650(2): 2284–2293
- Aru V, Søren BE, Savorani F, *et al.* The effect of season on the metabolic profile of the European clam *Ruditapes decussatus* as studied by ¹H-NMR spectroscopy. *Metabolites*, 2017, 7(3): 36
- Booth RK, McKinley RS, Ballantyne JS. Plasma non-esterified fatty acid profiles in wild Atlantic salmon during their freshwater migration and spawning. *Journal of Fish Biology*, 1999, 55(2): 260–273
- Calvo AC, Pey AL, Miranda-Vizuete A, *et al.* Divergence in enzyme regulation between *Caenorhabditis elegans* and human tyrosine hydroxylase, the key enzyme in the synthesis of dopamine. *Biochemical Journal*, 2011, 434(1): 133–141
- Conand C. *Holothurians* (Sea cucumbers, Class Holothuroidea). 1998, 1157–1190
- Gavrilescu M, Demnerová K, Aamand J, *et al.* Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 2015, 32(1): 147–156
- Gianasi BL, Parrish CC, Hamel JF, *et al.* Influence of diet on growth, reproduction and lipid and fatty acid composition in the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Aquaculture Research*, 2017, 48(7): 3413–3432
- Hagen NT, Jørgensen I, Egeland ES. Sex-specific seasonal variation in the carotenoid content of sea urchin gonads. *Aquatic Biology*, 2008, 3(3): 227–235
- Henderson VW. Chapter 23-The role of sex steroids in Alzheimer's disease: Prevention and treatment. Lobo RA, *Treatment of the postmenopausal woman* (Third Edition). Academic Press; St. Louis, 2007, 295–306
- Hines A, Yeung WH, Craft J, *et al.* Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. *Analytical Biochemistry*, 2007, 369(2): 175–186
- Jabbar A, Davies JL. A simple and convenient biochemical method for sex identification in the marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1987, 107(1): 39–44
- Jamieson D, Lee J, Cresti N, *et al.* Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2014, 74(4): 667–674
- Jiang JW, Zhao ZL, Pan YJ, *et al.* Proteomics reveals the gender differences in humoral immunity and physiological characteristics associated with reproduction in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Proteomics*, 2020, 217: 103687
- Jiang JW, Zhao ZL, Pan YJ, *et al.* Gender specific differences of immune competence in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* before and after spawning. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 90: 73–79
- John CF. Nutrient transport in starfish I. Properties of the coelomic fluid. *Biological Bulletin*, 1964, 126(1): 33–53

- Kleps RA, Myers TC, Lipcius RN, *et al.* A sex-specific metabolite identified in a marine invertebrate utilizing phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *PLoS One*, 2007, 2(8): 780
- Laires R. Characterization of the coelomic fluid of the starfish *Marthasterias glacialis* in a wound-healing phase. Instituto Superior Tecnico, 2012, November: 1–86
- Lette E, Lawler N, Burnham Q, *et al.* Metabolomic profiling of crayfish haemolymph distinguishes sister species and sex: Implications for conservation, aquaculture and physiological studies. *Freshwater Crayfish*, 2020, 25(1): 89–101
- Li P, Mai K, Trushenski J, *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43–53
- Liaaen-Jensen S. ChemInform Abstract: Marine Carotenoids-Selected topics. *ChemInform*, 1991, 22(4): 747–759
- Liao YL. Echinoderma, Holothuria. *Zoology of China*. Beijing: Science Press, 1997, 1–334 [廖玉麟. 棘皮动物门海参纲. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 1997, 1–334]
- Lovatelli A, Conand C, Purcell P, *et al.* Advances in sea cucumber aquaculture and management. *FAO Fisheries Technical Paper*, 2004, 463: 425
- Lubet P, Brichon G, Besnard JY, *et al.* Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1986, 84(3): 279–285
- Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, *et al.* Spermidine in health and disease. *Science*, 2018, 359(6374): 410–410
- Maoka T. Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 2011, 9(2): 278–293
- Maoka T. Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 483(2): 191–195
- Matsuno T. Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science*, 2001, 67(5): 771–783
- Matsuno T, Tsushima M. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(4): 597–605
- Mercier A, Hamel JF. Perivisceral coelomic fluid as a mediator of spawning induction in tropical holothurians. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2002, 41(1–3): 223–234
- Mohamed A, Traifalgar R, Traifalgar F, *et al.* Dietary administration of dehydroepiandrosterone hormone influences sex differentiation of hybrid red tilapia (*O. niloticus* × *O. mossambicus*) Larvae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2012, 744(7): 447–453
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, *et al.* Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(2): 153–161
- Peter RE, Lin HR, Kraak GVD. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 1988, 74(1–2): 1–10
- Ru SG, Wang CC. Progress on the research of the development and function of the dopaminergic nervous system of sea urchin in the early developmental stage. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 132–138 [汝少国, 王翠翠. 海胆早期多巴胺能神经系统的发育及功能研究进展. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 132–138]
- Schock TB, Stancyk DA, Thibodeaux L, *et al.* Metabolomic analysis of Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, hemolymph following oxidative stress. *Metabolomics*, 2010, 6(2): 250–262
- Sies H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 27(9–10): 916–921
- Su ML. Dopaminergic system in response to the environmental salinity change and influence on the gonadogenesis in the spotted scat (*Scatophagus argus*). Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2017 [苏冒亮. 多巴胺系统在金钱鱼环境盐度适应及性腺发育中的调节机制. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2017]
- Tian ML, Li YP, Jing J, *et al.* Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14852
- Wu HY, Guo MM, Li ZX, *et al.* Determination of tetracyclines residue in aquatic products by HPLC with fluorescence detector. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 102–108 [吴海燕, 郭萌萌, 李兆新, 等. 高效液相色谱-荧光法测定水产品中多种四环素残留. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 102–108]
- Yan JJ, Jing J, Mu XY, *et al.* A genetic linkage map of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on microsatellites and SNPs. *Aquaculture*, 2013, 404–405: 1–7
- Yang XM, Wu MC, Zhang L, *et al.* Annual change of gonadal development in *Holothuria scabra* from Hainan Island. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(6): 1117–1122 [杨学明, 吴明灿, 张立, 等. 海南糙海参性腺发育的周年变化. 南方农业学报, 2015, 46(6): 1117–1122]

Study on Sex Differential Metabolites and Metabolic Pathway of Parental Tropical Sea Cucumbers *Holothuria scabra*

WU Feifei^{1,2#}, CHENG Chuhang^{1,2#}, CHEN Ting^{1,3}, ZHANG Xin^{1,2},
WU Xiaofen^{1,2}, JIANG Xiao^{1,3}, REN Chunhua^{1,3}^①, HU Chaoqun^{1,3}^①

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Institution of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)

Abstract In order to clarify the differences in metabolism between female and male relatives of tropical sea cucumbers (*Holothuria scabra*), the sex-specific metabolites in their coelomic fluid were explored by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry metabolite analysis, and the sex-specific metabolites and pathways were analyzed. The results showed that compared with male sea cucumbers, a total of 1352 up-regulated metabolites and 943 down-regulated metabolites were screened in the coelomic fluid of female sea cucumbers. According to a database comparison and annotation, a total of 66 metabolites with significant differences ($P \leq 0.05$, $VIP \geq 1$) were selected. Among them, β -carotene has the potential to be a gender difference metabolic marker. Spermidine and fatty acids that are less demanded by other organs were found at higher concentrations in females and males, respectively. We speculated that these compounds may be used by other physiological functions. In addition, it was also found that male coelomic fluid tended to accumulate xenobiotics. Metabolic pathway analysis by KEGG showed that the gonadal development-related pathways, glutathione metabolism, arginine and proline metabolism, steroid biosynthesis, and tyrosine metabolism of male sea cucumbers all occurred in the coelomic fluid. The gonadal development of female and male sea cucumbers was affected by sex hormones, which may be regulated by dopamine and have gender differences.

Key words *Holothuria scabra*; LC-MS/MS; Coelomic fluid; Sex differential metabolites; Sex differential metabolic pathway

① Corresponding author: REN Chunhua, E-mail: rosemary166@sina.com; HU Chaoqun, E-mail: hucq@scsio.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201217001

http://www.yykxjz.cn/

倪萍, 任强, 王静, 丁君, 常亚青, 王扬帆, 胡景杰, 包振民. 仿刺参疣足数量 SNP 遗传力评估. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 68-76

Ni P, Ren Q, Wang J, Ding J, Chang YQ, Wang YF, Hu JJ, Bao ZM. Estimating SNP heritability for papillae number in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 68-76

仿刺参疣足数量 SNP 遗传力评估*



倪萍¹ 任强¹ 王静¹ 丁君^{2①} 常亚青²
王扬帆^{1①} 胡景杰¹ 包振民¹

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003;

2. 大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

摘要 随着测序技术的发展, 基于单核苷酸多态性(SNP)分子标记的遗传力估计比传统法准确性更高, 已被广泛应用于动植物育种中。本研究对不同地理仿刺参(*Apostichopus japonicus*)群体的疣足数量进行重测序全基因组水平的 SNP 遗传力估计, 结果显示, 次等位基因频率(Minor allele frequency, MAF) > 0.05 时, 在 50K SNP 基础上均匀抽样, 不同 SNP 密度的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计均值范围为(0.566±0.022)~(0.612±0.003); MAF > 0.1 时, SNP 遗传力估计均值范围为(0.586±0.015)~(0.615±0.016), 说明 50K 低密度 SNP 标记足够捕获数量性状基因座(QTL)大效应和小效应; 同时, 染色体水平 SNP 遗传力估计值显示, 单个染色体对遗传力的贡献和其长度显著相关, 暗示仿刺参疣足数量是一个复杂的数量性状, 与该性状相关的基因效应位点散布在各染色体, 并由多基因共同作用。本研究结果可为海参低密度 SNP 芯片的设计开发及海参遗传参数评估提供一定的理论依据。

关键词 遗传力; REML; SNP; 仿刺参; 疣足数量

中图分类号 Q38 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0068-09

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)是中国传统的海珍品之一, 营养价值高, 药用价值广泛(常亚青等, 2004)。海参养殖业在我国经过十几年的迅猛发展, 已成为海水养殖的主要产业之一(王秀利等, 2006)。然而, 由于刺参养殖的过速发展和不规范运作, 基础研究滞后于刺参养殖产业的发展, 加之基础设施、养殖工艺和方式的滞后, 出现刺参病害频发、种质资源匮乏、成品参品质下降、单位面积产量和产值下降等问题(李成林等, 2010; 张春云等, 2004; 常亚青等,

2006; 赵帅等, 2016); 野生资源过度捕捞和养殖刺参长期近亲繁殖、累代养殖, 也使刺参品种质量逐步下降(封岩, 2019), 刺参的养殖业面临严重威胁。随着人们对仿刺参需求量的增加, 迫切需要对其进行遗传改良, 选育具有优良性状的新品种。遗传参数的估计是水产物选择育种的一项基础工作, 其中, 遗传力是衡量育种进展和育种方法的关键性指标(Falconer *et al.*, 2000)。

遗传力反映亲属间的相似程度和对人工与自然

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901601)和国家自然科学基金项目(32072976; 31900369)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901601), and National Natural Science Foundation of China (32072976; 31900369)]. 倪萍, E-mail: niping@stu.ouc.edu.cn

① 通讯作者: 丁君, 研究员, E-mail: dingjun1119@dlfu.edu.cn; 王扬帆, 教授, E-mail: yfwang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-12-17, 收修改稿日期: 2021-01-18

选择的反应速度, 往往是育种工作的第一步。传统方法利用亲缘关系较近的个体表型间的相关系数及亲缘系数计算遗传力(Lstibůrek *et al.*, 2018; 文超良等, 2019), 在仿刺参遗传力估计中被广泛应用, 例如, 对仿刺参前期浮游阶段耳状幼体体长(栾生等, 2006)、耳状幼体和稚参体长(李云峰等, 2009)、幼参 4 个生长性状(孟思远等, 2010)的遗传力估计等。传统方法利用系谱信息构建亲缘相关矩阵(Numerator relationship matrix, A 阵), 并利用线性混合模型估计遗传力, 对系谱信息的准确性和完整性要求较高(李晶等, 2020); 由于孟德尔抽样误差(Hill, 2014), 基于系谱推断的个体间亲缘关系准确性有限, 并且存在系谱记录错误、部分群体系谱信息不完整或缺失的情况, 使得传统法估计遗传力的准确性存在一定的局限。

随着测序技术的发展, 越来越多的学者利用单核苷酸多态性(SNP)分子标记推断个体间的亲缘关系(Thompson, 1975; Lynch, 1988; Queller, 1989), 通过构建基因组亲缘关系矩阵(Genomic relationship matrix, GRM)(Li *et al.*, 2014; 文超良等, 2019), 进行基于 SNP 分子标记的遗传力估计(SNP 遗传力)(Yang *et al.*, 2017), 并在动植物以及人类群体中得到广泛应用(Ritland *et al.*, 1996; Mousseau *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2002; Visscher *et al.*, 2006)。例如, Yang 等(2010)利用 REML 分析方法估计了 SNP 数据集解释的人类身高表型的变异程度; Guo 等(2018)利用 GCTA 的 REML 估计了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的生长性状(扇贝长、宽、高和湿重)的 SNP 遗传力; Fishback 等(2002)使用 REML 方法估计了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)总长和重量的遗传力。Benjamin 等(2012)将这种基于 GRM 的 REML 分析方法称为 GREML 法。GREML 法可以利用 SNP 数据估计无亲缘关系的个体之间的遗传关系, 然后, 由全基因组 SNP 解释的表型变异比例推断遗传力。与传统方法相比, REML 分析法适用于非均衡资料的方差组分估计, 可大大提高方差组分的估计准确性。本研究利用已完成测序的仿刺参基因组(Li *et al.*, 2018), 对不同养殖地理位置仿刺参群体进行全基因组重测序, 并针对仿刺参重要经济性状疣足数量, 进行全基因组水平的 SNP 遗传力估计, 为丰富仿刺参生长相关的分子育种理论、加快仿刺参优良品种的选育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仿刺参样本与表型

本研究 215 个仿刺参样本分别来自于 8 个不同的

养殖地理位置: 平岛、西小磨、山东栖霞口、鲅蛸岛、中俄杂交仿刺参、旅顺、黄龙尾和俄罗斯海参崴。首先, 对所有仿刺参样本的疣足数量进行统计(表 1)。

表 1 仿刺参样本表型统计
Tab.1 Statistics of papillae number for *A. japonicus*

地理位置 Geographic location	样本量 Size	疣足数量 Papillae Number	
		均值 Mean	标准差 SD
平岛 Pingdao	30	44.5	6.1
西小磨 Xixiaomo	30	50.5	9.2
山东栖霞口 Qixiakou, Shandong	30	40.8	4.4
鲅蛸岛 Bashaodao	30	47.9	9.4
中俄杂交 Hybrid of Chinese and Russian	5	58.4	6.9
旅顺 Lüshun	30	34.2	5.1
黄龙尾 Huanglongwei	30	34.6	4.8
俄罗斯海参崴 Vladivostok, Russia	30	56.7	10.7

1.2 全基因组重测序与参考 SNP 选择

按照动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根, 北京)说明书提取仿刺参基因组 DNA。使用 NanoDrop-2000 超微量紫外分光光度计进行定量分析。

检验合格的 DNA 片段经末端修复、加 polyA 尾、加测序接头、纯化和 PCR 扩增完成整个文库制备。库检合格的文库通过 Illumina Hiseq Xten 的 PE150bp 模式进行测序, 每个样品测序深度为 10×。对测序获得的测序数据进行质量过滤, 使用 Cutadapt 软件(Martin, 2011)去除接头序列, 使用 SolexaQA 软件(Cox *et al.*, 2010)去除质量值低于 20 的碱基, 将得到的高质量测序数据利用 BWA 软件(Li *et al.*, 2009)比对到仿刺参参考基因组。使用 Samtools(Li *et al.*, 2009)进行去重复, GATK(Ye *et al.*, 2009)进行局部重比对, 碱基质量值校正等处理以及 SNP 小片段插入缺失(Small INDEL)的检测, 按照条件“QD<2.0||MQ<40.0||FS>60.0||MQRankSum<-12.5||ReadPosRankSum<-8.0”对 SNP 进行过滤, 得到最终的 SNP 位点集。

筛选 SNP 是为了在重测序获得的高密度 SNP 中减少或删除处于高度连锁不平衡的 SNP, 特别是在有限群体中有相当数量的 SNP 之间存在高度的连锁不平衡关系, 会降低对动物个体遗传参数的估计准确度。本研究采用 SNP 基因频率的平均欧式距离(Average Euclidean distance, AED) (Wu *et al.*, 2016)来筛选 SNPs, 挑选出次要等位基因频率(Minor allele frequency, MAF)大于 0.05 和 0.1 的 50K SNP, 在筛

选出来的 50K SNP 中随机均匀挑选不同密度的 SNP(SNP 数量分别为 5K、10K、15K、20K、25K、30K、35K、40K、45K 和 50K)。

1.3 基于 SNP 的遗传力估计

本研究使用 GCTA(Yang *et al.*, 2011)(gcta_1.93.2beta 版本)的 GREML(Genomic relatedness matrix restricted maximum likelihood)中的期望最大约束似然法(EM-REML)、平均信息约束似然法(AI-REML)对仿刺参疣足数量的 SNP 遗传力进行评估。EM 算法是由 Dempster 等(1977)提出的一种迭代算法,可针对有缺失数据的数据资料,获得参数的最大似然估计值。缺失数据在实际的统计分析中非常普遍,EM 算法的基本思想是用缺失数据在给定参数的某个估计值的条件下的期望代替缺失数据,从而将不完全数据变成完全数据,使得似然函数的最大化变得相对简单。REML 的 AI 算法(平均信息算法)由 Gilmour 等(1995)、Johnson 等(1995)和 Jensen 等(1997)提出,它是将求似然函数最大值的 2 种常见的 Newton-Raphson 算法和 Fisher's scoring 方法结合起来的一种算法(张勤, 2007)。

GCTA 软件的核心即如下所示线性混合模型(Yang *et al.*, 2011):

$$y = Xb + Wu + e$$

式中, y 表示表型, b 表示固定效应协变量的系数, u 表示随机效应自变量的系数, 这里的随机效应指的是所有 SNP 位点对表型的效应, e 表示随机误差。

其中, u 和 e 服从如下正态分布:

$$u \sim N(0, I\sigma_u^2)$$

$$e \sim N(0, I\sigma_e^2)$$

I 为一个 $n \times n$ 的单位矩阵, n 表示样本量。

表型方差用如下公式表示:

$$\text{var}(y) = V = WW' \sigma_u^2 + I\sigma_e^2$$

$$w_{ij} = (x_{ij} - 2p_i) / \sqrt{2p_i(1-p_i)}$$

W 为第 ij 元素的标准化基因型矩阵, x_{ij} 为第 j 个

个体的第 i 个 SNP 的参考等位基因的拷贝数, p_i 为参考等位基因频率。

GCTA 对于样本遗传相似度的定义公式:

$$G_{jk} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{(x_{ij} - 2p_i)(x_{ik} - 2p_i)}{2p_i(1-p_i)}$$

定义所有 SNP 位点的方差:

$$\sigma_G^2 = N\sigma_u^2$$

$$\text{则: } V = G\sigma_G^2 + I\sigma_e^2$$

式中, N 为 SNP 位点数, G 为个体间的亲缘关系矩阵(GRM)。

定义 SNP 遗传力的计算公式:

$$h_{SNP}^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_e^2)$$

对来自不同养殖地理位置的 215 个仿刺参样本进行高通量重测序,获得一组高质量 SNP。构建 GRM 矩阵后,使用 GCTA 的 2 种遗传参数估计方法(AI-REML 和 EM-REML),添加协变量的校正,针对仿刺参疣足数量,分别计算不同密度 SNP 下的 SNP 遗传力估计值及染色体水平的 SNP 遗传力估计值。

2 结果与分析

2.1 仿刺参疣足数量的表型数据分布

从 215 个仿刺参样本疣足数量的频率直方图和概率密度曲线(图 1a)可以看出,本研究不同地域的仿刺参疣足数量大致符合正态分布,表明仿刺参疣足数量性状不受地域环境的影响。考虑到图 1a 中出现大量疣足数量大于 60 的个体,且主要集中在中俄杂交仿刺参和俄罗斯海参崴群体中,因此,利用 R MASS 包中 nlmInb 函数,对 215 个样本数据进行混合正态分布参数的最大似然估计(图 1b),结果显示,样本疣足数量符合 2 个正态分布(均值 39.8、方差 6.79 和均值 54.35、方差 10.9)的最优拟合,说明样本中存在多疣足仿刺参群体情况。进一步把 8 个不同地域的仿刺参群体分为正常群体(平岛、西小磨、山东栖霞口、

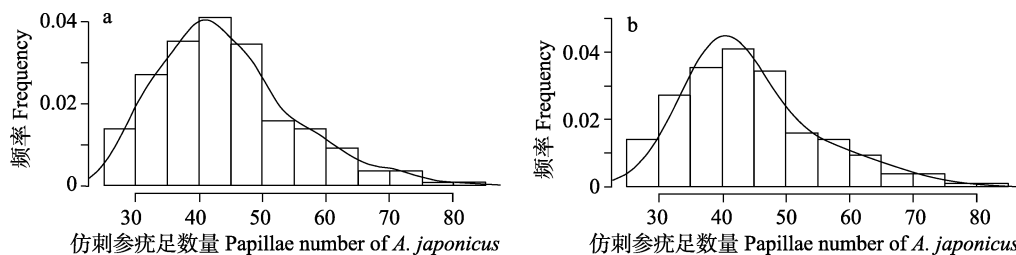


图 1 215 份仿刺参样本疣足数量的频率直方图和概率密度曲线(a)和双重高斯分布最优拟合(b)

Fig.1 True frequency histogram and probability density curve (a) and optimal fitting of a double Gaussian distribution (b) of papillae number for the 215 *A. japonicus* samples

蛭蛸岛、旅顺和黄龙尾)与多疣足群体(中俄杂交仿刺参和俄罗斯海参崴), 并利用 R t.test 函数对上述 2 个群体疣足数量进行 t 检验, 结果差异显著($P<0.01$)。根据上述表型数据分布结果, 本研究将不同地域的仿刺参群体分为正常群体与多疣足群体, 并在 SNP 遗传力估计模型设计群体固定效应, 以校群体分层对 SNP 遗传力估计的影响。

2.2 仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计

本研究全基因组重测序质量较高, GC 分布正常, 对基因组的覆盖度均超过 90%, 高质量 SNPs 数量约为 500 万个。使用 GCTA 的 2 种 REML 分析方法(EM-REML 和 AI-REML)对仿刺参疣足数量的遗传力进行评估, 比较相同密度、相同次要等位基因频率筛选条件下, 不同分析方法得到的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计值。发现通过 2 种方法得到的遗传力估计

值差异极小(表 2, 表 3), 证明本研究采用的分析方法有较好稳定性、可靠性。

除此之外, 本研究对不同密度 SNP 条件下的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计值进行比较, 结果显示, 当 $MAF>0.05$ 时(表 2), 不同密度 SNP 条件下得到的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计均值为(0.566±0.022)~(0.612±0.003), SNP 数量在 5K、10K 时, 得到的 SNP 遗传力估计均值分别为 0.567±0.022、0.588±0.011(AI-REML)和 0.566±0.022、0.587±0.011(EM-REML); SNP 数量在 15K~50K 时, 得到的遗传力估计均值相较于低密度 SNP 遗传力估计均值更大, 且趋于稳定; SNP 数量为 50K 时, 得到的 SNP 遗传力估计均值最高, 分别为 0.612±0.003(AI-REML)和 0.611±0.003(EM-REML)。当 $MAF>0.1$ 时(表 3), 不同密度 SNP 条件下得到的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计均值为(0.586±0.015)~(0.615±0.016), SNP 数量在

表 2 仿刺参疣足数量 SNP 遗传力(MAF>0.05)

Tab.2 SNP heritability estimates for papillae number in *A. japonicus* (MAF>0.05)

SNP 数量 Number of SNPs	计算方法 Analysis Method	V(G)	V(e)	Vp	$h^2\pm SD$	Pval
5K	AI	44.238	33.853	78.091	0.567±0.022	< 0.001
	EM	44.174	33.924	78.099	0.566±0.022	< 0.001
10K	AI	45.734	32.071	77.806	0.588±0.011	< 0.001
	EM	45.671	32.143	77.814	0.587±0.011	< 0.001
15K	AI	46.747	30.142	76.889	0.608±0.024	< 0.001
	EM	46.691	30.208	76.899	0.607±0.024	< 0.001
20K	AI	46.585	30.576	77.161	0.604±0.010	< 0.001
	EM	46.528	30.643	77.170	0.603±0.010	< 0.001
25K	AI	46.830	30.147	76.977	0.608±0.005	< 0.001
	EM	46.772	30.214	76.987	0.608±0.005	< 0.001
30K	AI	46.553	30.796	77.350	0.602±0.005	< 0.001
	EM	46.495	30.864	77.359	0.601±0.005	< 0.001
35K	AI	46.630	30.482	77.112	0.605±0.006	< 0.001
	EM	46.572	30.549	77.121	0.604±0.006	< 0.001
40K	AI	47.019	29.912	76.931	0.611±0.009	< 0.001
	EM	46.962	29.979	76.941	0.610±0.009	< 0.001
45K	AI	46.887	30.140	77.027	0.609±0.002	< 0.001
	EM	46.830	30.207	77.036	0.608±0.002	< 0.001
50K	AI	47.052	29.827	76.879	0.612±0.003	< 0.001
	EM	46.996	29.893	76.889	0.611±0.003	< 0.001

注: V(G): 遗传方差; V(e): 残差方差; Vp: 表型方差; h^2 代表 SNP 遗传力; Pval 代表检验的 P 值, $P<0.001$ 表示差异极显著。下表同

Note: V(G): Genetic variance; V(e): Residual variance; Vp: Phenotypic variance; h^2 : SNP heritability; $P<0.001$: Correlation was significant at 0.001 level. The same as below

表 3 仿刺参疣足数量 SNP 遗传力(MAF>0.1)
Tab.3 SNP heritability estimates for papillae number in *A. japonicus* (MAF>0.1)

SNP 数量 Number of SNPs	计算方法 Analysis Method	V(G)	V(e)	Vp	h ² ±SD	Pval
5K	AI	46.005	31.643	77.648	0.593±0.026	< 0.001
	EM	45.943	31.712	77.655	0.592±0.026	< 0.001
10K	AI	46.098	31.231	77.329	0.596±0.017	< 0.001
	EM	46.039	31.299	77.337	0.595±0.017	< 0.001
15K	AI	45.593	32.107	77.700	0.587±0.014	< 0.001
	EM	45.533	32.176	77.709	0.586±0.015	< 0.001
20K	AI	47.043	30.032	77.075	0.610±0.003	< 0.001
	EM	46.984	30.101	77.085	0.610±0.003	< 0.001
25K	AI	46.885	30.120	77.005	0.609±0.005	< 0.001
	EM	46.830	30.185	77.014	0.608±0.005	< 0.001
30K	AI	47.230	29.590	76.820	0.615±0.016	< 0.001
	EM	47.174	29.655	76.829	0.614±0.016	< 0.001
35K	AI	47.135	29.666	76.801	0.614±0.003	< 0.001
	EM	47.080	29.730	76.810	0.613±0.003	< 0.001
40K	AI	47.212	29.634	76.847	0.614±0.004	< 0.001
	EM	47.156	29.700	76.856	0.614±0.004	< 0.001
45K	AI	46.987	29.928	76.915	0.611±0.004	< 0.001
	EM	46.930	29.995	76.925	0.610±0.004	< 0.001
50K	AI	47.208	29.631	76.840	0.614±0.001	< 0.001
	EM	47.152	29.697	76.849	0.614±0.001	< 0.001

5K、10K、15K 时, 得到的遗传力估计均值分别为 0.593±0.026、0.596±0.017、0.587±0.014(AI-REML) 和 0.592±0.026、0.595±0.017、0.586±0.015(EM-REML); SNP 数量在 20K~50K 时, 得到的遗传力估计均值相较于低密度 SNP 遗传力估计均值更大, 且趋于稳定; SNP 数量为 30K 时, 得到的 SNP 遗传力估计均值最高, 分别为 0.615±0.016(AI-REML)和 0.614±0.016(EM-REML), 并且当 SNP 数量在 35K、40K、50K 时得到的遗传力估计均值均达到 0.614。

2.3 仿刺参疣足数量染色体水平 SNP 遗传力估计

根据已发表的仿刺参基因组和遗传连锁图谱, 共发现 22 个连锁群(Tian *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018), 本研究将 Scaffold 拼接到染色体水平, 并对仿刺参疣足数量进行染色体水平的 SNP 遗传力估计, 对染色体 SNP 遗传力估计值和染色体长度进行回归分析(图 2), 结果显示, 7 号染色体的 SNP 遗传力估计值最小, 为 0.085(MAF>0.05)、0.094(MAF>0.1); 2 号染色体的 SNP 遗传力估计值最大, 为 0.598(MAF>0.05)、0.599(MAF>0.1); 14 号染色体长度最小, SNP 遗传力估计值为 0.269(MAF>0.05)、0.282(MAF>0.1); 1 号染色体长度最大, SNP 遗传力估计值为

0.522(MAF>0.05)、0.526(MAF>0.1)。在 MAF>0.05 和 MAF>0.1 条件下, 单个染色体的贡献和其长度显著相关, 较长的染色体具有明显的线性趋势($P<0.05$), 且遗传力估计值最小的 7 号染色体和长度最小的 14 号染色体均偏离线性回归较远。

3 讨论

遗传力是反映性状遗传能力大小的重要遗传参数, 准确合理的遗传参数估计有助于更好地理解遗传因素对特定群体某一性状的表型影响程度。估计动物个体的 SNP 遗传力, 首先需要筛选出一组适用的 SNP。筛选这些 SNP, 一般需要满足两个条件: 第一, 筛选的 SNP 是该物种基因芯片中共同的 SNP, 这样可以很方便地将这些基因 SNP 芯片用于分子育种, 而不需要重新设计新的芯片或增加芯片中的 SNP 位点; 第二, 选出的 SNP 有较高的信息含量, 其统计准确度要高。Hulsegge 等(2013)采用 LD 的 $r^2>0.30$ 作为删除 SNP 的尺度, 结果表明, 在保持相同准确性的前提下, 使用这个尺度来筛选 SNP, 可以明显降低所需 SNP 标记的数量。同时, 需要筛选信息量高的 SNP, 筛选高信息量的 SNP 可

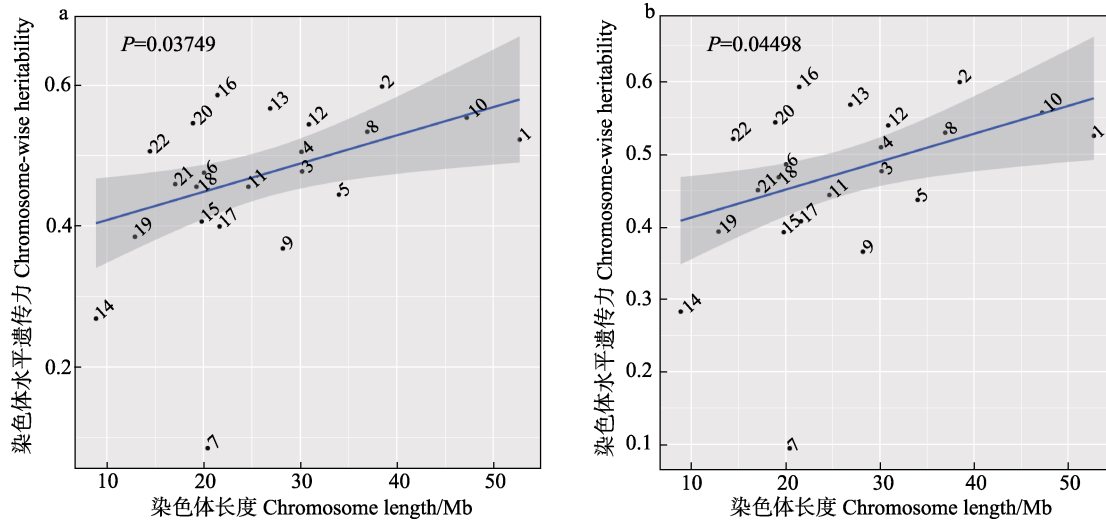


图 2 仿刺参疣足数量染色体水平 SNP 遗传力估计

Fig.2 Chromosome-wise heritability estimates for papillae number in *A. japonicus*

a: MAF>0.05; b: MAF>0.1。数字表示每个染色体的遗传力点估计值; 实线表示染色体遗传力对染色体长度的线性回归
The numbers show the heritability point estimates of each chromosome. The solid lines plot the linear regression of chromosome-wise heritability against chromosome length

以依据不同的统计指标。例如, Hulsegge 等(2013)分别使用 Delta(群体间等位基因频率的绝对差异)、Wright(1978)的 F_{ST} 以及 Weir 等(1984)的 F_{ST} 衡量标记信息量的效果。信息熵(Entropy)(Mitt *et al.*, 2017)也是衡量 SNP 信息量的指标。本研究采用 SNP 基因频率的平均欧式距离(Average Euclidean distance, AED)(Wu *et al.*, 2016)来筛选 SNPs。后续工作将根据上述指标, 挑选信息含量高并可进行准确的遗传参数估计的低密度 SNP 标记。

群体的分层效应会对遗传力估计值的准确性产生影响。本研究根据 215 个仿刺参样本疣足数量的频率直方图和概率密度曲线(图 1)初步将研究样本分为两大类, 一类为来自中国的品种(正常群体), 另一类为俄罗斯以及中国与俄罗斯杂交的品种(多疣足群体)。计算时使用群体分层这一因素作为协变量进行校正, 并得到了稳定结果, 证明本研究使用的分组依据可靠。本研究使用了基于 GCTA 的期望最大约束似然法(EM-REML)和平均信息约束似然法(AI-REML)对仿刺参疣足数量的 SNP 遗传力进行估计, 由估计值结果(表 2、表 3)可知, 此方法得到的 SNP 遗传力估计值均具有较高的稳定性和可信度。此前, 孟思远等(2010)通过建立家系, 使用传统方法估算仿刺参幼参阶段肉刺数目的遗传力, 得到仿刺参肉刺(疣足)数量遗传力为 0.191~0.404。本研究使用 GCTA 的 REML 分析法得到了与传统方法相比更高、更稳定的遗传力估计值, 说明疣足数量主要受加性效应的控制, 对仿

刺参的选择育种具有较大潜力。通过比较不同 SNP 密度下仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计值, 发现当 SNP 数量在 50K 时, 得到的遗传力估计值均已达到稳定, 说明 50K SNP 的密度足够捕获数量性状基因座(QTL)大效应和小效应, 证实了低密度 SNP 用于准确估计遗传参数的可行性。同时, 在全基因组选择方面, Wu 等(2016)通过设计牛的低密度 SNP 芯片, 对育种值估计的准确性进行评估, 获得了较准确的结果, 也证实了低密度 SNP 芯片应用于分子育种的可靠性。由于全基因组分析对样本量要求较高, 通常在 500 以上(Yang *et al.*, 2010), 本研究的样本量为 215, 统计量较少, 容易导致统计结果出现一定程度的偏差, 但所得结果与已报道数据(孟思远等, 2010; 和飞等, 2017)一致。后续工作将扩大样本统计量进行仿刺参数量性状的遗传力评估。

本研究在染色体水平对仿刺参疣足数量 SNP 遗传力进行估计(图 2), 提供性状遗传结构的信息。结果显示, 仿刺参疣足数量是一个复杂的数量性状, 不同染色体上的变异导致了仿刺参疣足数量的变异, 与该性状相关的效应位点散布在各染色体上, 说明了通过重测序的技术手段, 在全基因组上寻找 SNP 的重要性。单个染色体的贡献和其长度显著相关, 表示在每条染色体上可能有多个小到中等效应的变异, 而不是少数具有主要效应的变异。Goddard 等(2009)关于家畜复杂性状的分子标记辅助选择结果也支持这一假设, 该报道称, 性状变异有很大的遗传因素, 但由

于统计力量不足,大多数具有小到中度影响的变异尚未在遗传关联分析中被确认。而 GCTA 可以克服分子标记辅助选择的缺陷,通过全基因组标记面板,所有 QTL 都能和至少 1 个 marker 处于连锁不平衡状态。分析发现,7 号染色体虽不是最小染色体,但其遗传力估计值最低,与此相反,2 号染色体虽不是最大染色体,却具有最大遗传力估计值,说明较大的基因效应位点可能不在 7 号染色体上,而位于 2 号染色体,意味着 QTL 出现在 2 号染色体的概率较大,出现在 7 号染色体上的概率较小。此结果的发现为将来开展仿刺参疣足数量的全基因组关联分析(GWAS)提供了支持。

4 总结

本研究对不同养殖地理位置仿刺参群体进行全基因组重测序,并针对仿刺参重要经济性状疣足数目,使用 GCTA 软件的 GREML 进行全基因组水平的 SNP 遗传力估计,染色体水平 SNP 遗传力估计,同时比较不同密度 SNP 标记条件下的仿刺参疣足数量 SNP 遗传力估计值;结果表明,仿刺参疣足数量 SNP 遗传力为中等遗传力(MAF>0.05 时,0.566~0.612;MAF>0.1 时,0.586~0.615),当 SNP 数量在 50K 时,得到的遗传力估计值均已达到稳定,且染色体 SNP 遗传力与其长度显著相关;说明仿刺参疣足数量是复杂数量性状,由全基因组水平多基因共同作用,且 50K SNP 密度足够捕获 QTL 大效应和小效应。本研究通过分子学研究方法得到可靠的遗传力估计值,有效解决了传统方法系谱记录繁琐,遗传力估计准确性差等问题,为分子育种技术提供了一定理论依据;同时,证明低密度 SNP 标记用于仿刺参分子育种的可能性,可为低密度 SNP 芯片的设计开发提供支持。

参 考 文 献

- Benjamin DJ, Cesarini D, van der Loos MJ, *et al.* The genetic architecture of economic and political preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(21): 8026–8031
- Chang YQ, Ding J, Song J, *et al.* Biological research and culture of sea cucumber and sea urchin. Beijing, Ocean Press, 2004 [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004]
- Chang YQ, Sui XL, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 198–201 [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状、存在问题与展望. 水产科学, 2006, 25(4): 198–201]
- Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 485
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1977, 39(1): 1–38
- Falconer DS, Mackay TFC. Introduction to quantitative genetics. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000 [Falconer DS, Mackay TFC. 数量遗传学导论. 4 版. 北京: 中国农业科技出版社, 2000]
- Feng Y. Family construction, expression of growth-related genes and transcriptome analysis of body wall tissue in *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2019 [封岩. 刺参(*Apostichopus japonicus*)家系构建、生长相关基因的表达及体壁组织的转录组分析. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- Fishback AG, Danzmann RG, Ferguson MM, *et al.* Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture*, 2002, 206(3): 137–150
- Gilmour AR, Thompson R, Cullis B. Average information REML: An efficient algorithm for variance parameter estimation in linear mixed models. *Biometrics*, 1995, 51(4): 1440–1450
- Goddard ME, Hayes BJ. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10: 381–391
- Guo HB, Zeng QF, Li YP, *et al.* Estimating realized heritability for growth in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) using genome-wide complex trait analysis. *Aquaculture*, 2018, 497: 103–108
- He F, Wang YG, Liao MJ, *et al.* Estimation of the heritability of three economic traits in 9-month-old sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 114–121 [和飞, 王印庚, 廖梅杰, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*) 9 月龄主要经济性状遗传力的估计. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 114–121]
- Hill WG. Applications of population genetics to animal breeding, from Wright, Fisher and Lush to genomic prediction. *Genetics*, 2014, 196(1): 1–16
- Hulsege B, Calus MP, Windig JJ, *et al.* Selection of SNP from 50K and 777K arrays to predict breed of origin in cattle. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(11): 5128–5134
- Jensen J, Mantysaari EA, Madsen P, *et al.* Residual maximum likelihood estimation of (Co)variance components in multivariate mixed linear models using average information. *Journal of the Indian Society of Agricultural Statistics*, 1997, 49: 215–236
- Johnson DL, Thompson R. Restricted maximum likelihood

- estimation of variance components for univariate animal models using sparse matrix techniques and average information. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78(2): 449–456
- Li CL, Song AH, Hu W, *et al.* Status analysis and sustainable development strategy of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka aquaculture industry in Shandong Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 126–133 [李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. *渔业科学进展*, 2010, 31(4): 126–133]
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754–1760
- Li H, Glusman G, Hu H, *et al.* Relationship estimation from whole-genome sequence data. *PLoS Genetics*, 2014, 10(1): e1004144
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078–2079
- Li J, Wang J, Kang HM, *et al.* The difference of genetic parameters for carcass and meat quality traits by BLUP and GBLUP methods in Beijing You Chicken. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(1): 35–42 [李晶, 王杰, 康慧敏, 等. 基于 BLUP 和 GBLUP 方法估计北京油鸡胴体和肉质性状遗传参数的差异. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(1): 35–42]
- Li YF, Chang YQ, Tian Y, *et al.* Heritability of early growth traits in larval and juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2009, 24(1): 30–33 [李云峰, 常亚青, 田隰, 等. 仿刺参耳状幼体和稚参阶段的体长遗传力估计. *大连水产学院学报*, 2009, 24(1): 30–33]
- Li YL, Wang RJ, Xun XG, *et al.* Sea cucumber genome provides insights into saponin biosynthesis and aestivation regulation. *Cell Discovery*, 2018, 4(Pt B): 956–960
- Lstibůrek M, Bittner V, Hodge GR, *et al.* Estimating realized heritability in panmictic populations. *Genetics*, 2018, 208(1): 89–95
- Luan S, Sun HL, Kong J. Heritability of auricularia larval body length for sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(3): 378–383 [栾生, 孙慧玲, 孔杰. 刺参耳状幼体体长遗传力的估计. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 378–383]
- Lynch M. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 1988, 5(5): 584–99
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 2011, 17(1): 10–12
- Meng SY, Chang YQ, Li WD, *et al.* Heritability of four growth traits in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2010, 25(6): 475–479 [孟思远, 常亚青, 李文东, 等. 仿刺参幼参阶段 4 个生长性状遗传力的估计. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(6): 475–479]
- Mitt M, Kals M, Pärn K, *et al.* Improved imputation accuracy of rare and low-frequency variants using population-specific high-coverage WGS-based imputation reference panel. *European Journal of Human Genetics*, 2017, 25(7): 869–876
- Mousseau TA, Ritland K, Heath DD. A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity*, 1998, 80(2): 218–224
- Queller DC, Goodnight KF. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 1989, 43(2): 258–275
- Ritland K, Ritland C. Inferences about quantitative inheritance based on natural population structure in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 1996, 50(3): 1074–1082
- Thomas SC, Coltman DW, Pemberton JM. The use of marker-based relationship information to estimate the heritability of body weight in a natural population: A cautionary tale. *Journal of Evolutionary Biology*, 2002, 15(1): 92–99
- Thompson EA. The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics*, 1975, 39(2): 173–188
- Tian ML, Li YP, Jing J, *et al.* Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14852
- Ventura RV, Miller SP, Dodds KG, *et al.* Assessing accuracy of imputation using different SNP panel densities in a multi-breed sheep population. *Genetics Selection Evolution*, 2016, 48(1): 71
- Visscher PM, Medland SE, Ferreira MAR, *et al.* Assumption-free estimation of heritability from genome-wide identity-by-descent sharing between full siblings. *PLoS Genetics*, 2006, 2(3): e41
- Wang XL, Shan X, Qiu XM, *et al.* The polymorphisms of microsatellite DNA from sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Biotechnology Bulletin*, 2006(6): 118–121 [王秀丽, 单雪, 仇雪梅, 等. 海参微卫星 DNA 的多态性. *生物技术通报*, 2006(6): 118–121]
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358–1370
- Wen CL, Sun CJ, Yang N. The concepts and research progress: From heritability to microbiability. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(11): 1023–1040 [文超良, 孙从佼, 杨宁. 从遗传力到肠菌力: 概念及研究进展. *遗传*, 2019, 41(11): 1023–1040]
- Wright S. *Evolution and the genetics of populations, Volume 4: Variability within and among Natural Population*. University of Chicago Press, Chicago, 1978
- Wu XL, Xu JQ, Feng GF, *et al.* Optimal design of low-density SNP arrays for genomic prediction: Algorithm and applications. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161719
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, *et al.* Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Genetics*, 2010, 42(7): 565–569

- Yang J, Lee SH, Goddard ME, *et al.* GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics*, 2011, 88(1): 76–82
- Yang J, Zeng J, Goddard ME, *et al.* Concepts, estimation and interpretation of SNP-based heritability. *Nature Genetics*, 2017, 49(9): 1304–1310
- Ye K, Schulz MH, Long Q, *et al.* Pindel: A pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics*, 2009, 25(21): 2865–71
- Zhang CY, Wang YG, Rong HL, *et al.* Natural resources, culture and problems of sea cucumber worldwide. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(3): 89–97 [张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题. *海洋水产研究*, 2004, 25(3): 89–97]
- Zhang Q. *Calculation methods in animal genetics and breeding*. Beijing: Science Press, 2007 [张勤. *动物遗传育种中的计算方法*. 北京: 科学出版社, 2007]
- Zhao S, Huang X, Wang HF, *et al.* Estimates of repeatability coefficients for papillae number in four populations of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 115–121 [赵帅, 黄旭, 王海峰, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*) 4个群体棘数的重复力估计. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 115–121]

(编辑 冯小花)

Estimating SNP Heritability for Papillae Number in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

NI Ping¹, REN Qiang¹, WANG Jing¹, DING Jun²①, CHANG Yaqing²,
WANG Yangfan¹①, HU Jingjie¹, BAO Zhenmin¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract The estimation of heritability is a fundamental task in the selective breeding of aquatic animals. With the development of sequencing technology, the estimation of heritability based on single nucleotide polymorphism (SNP) markers has been widely used in breeding since it is more accurate than the traditional method. In this study, the genome-wide SNP heritabilities for papillae number in *Apostichopus japonicus* from different geographic locations were estimated, and the results showed that the estimated mean SNP heritabilities with different SNP densities at MAF (minor allele frequency) > 0.05 ranged from 0.566±0.022 to 0.612±0.003, and the estimated mean SNP heritabilities with different SNP densities at MAF > 0.1 ranged from 0.586±0.015 to 0.615±0.016 when sampled uniformly on 50K SNPs, indicating that 50K low-density SNP markers are sufficient to capture both large and small effects of the quantitative trait locus. Chromosome-wise SNP heritability estimates showed that the contribution of an individual chromosome was significantly correlated to its length, suggesting that the papillae number is a complex quantitative trait with effect sites scattered across the chromosomes and shared by multiple genes. The results of this study provide a theoretical basis for the design and development of *A. japonicus* low-density SNP chips and the evaluation of *A. japonicus* genetic parameters.

Key words Heritability; REML; SNP; *Apostichopus japonicus*; Papillae number

① Corresponding author: DING Jun, E-mail: dingjun1119@dlfu.edu.cn; WANG Yangfan, E-mail: yfwang@ouc.edu.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200716002

http://www.yykxjz.cn/

谭八梅, 王萃, 裴泓霖, 夏兴龙, 丁君, 常亚青, 郝振林. 不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 77-88

Tan BM, Wang L, Pei HL, Xia XL, Ding J, Chang YQ, Hao ZL. The seasonal structural and functional characteristics of bacterial community in *Apostichopus japonicus* culture pond water. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 77-88

不同季节刺参养殖池塘水体菌群 结构与功能特征研究*



谭八梅 王萃^① 裴泓霖 夏兴龙 丁君 常亚青 郝振林

(大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

摘要 为解析不同季节刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘水体菌群结构与功能特征, 本研究选取中国北方典型岸基半开放刺参养殖池塘为研究对象, 利用高通量测序技术和生物信息学分析手段, 分别构建了辽宁长海刺参养殖池塘四季水体菌群 16S rRNA 基因测序文库。结果显示, 辽宁长海刺参养殖池塘水体菌群丰度和多样性以夏季最高, 秋季最低。不同季节第一优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria), 次优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes)。春、夏、冬季特异性菌门分别隶属于疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes); 秋季与其他季节相比, 无显著性差异菌门($P>0.05$)。基于 COGs 数据库预测, 水体菌群 24 种功能蛋白存在显著性差异($P<0.05$)。其中, 春、冬季均表现为功能蛋白显著上调, 主要表现在能量生产与转换、核苷酸运输与代谢、碳水化合物运输与代谢、次生代谢物的生物合成、运输与分解代谢、细胞壁/膜/包膜生物发生、细胞的能动性、转录和复制等方面; 夏季水体菌群在碳水化合物运输和代谢功能、翻译、核糖体结构、生物发生功能、细胞壁/膜/包膜生物方面的功能蛋白显著性下调; 秋季水体菌群在细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂、细胞骨架、次生代谢物的生物合成、转运和分解功能蛋白显著下调, 细胞外结构功能蛋白显著上调。研究表明, 刺参养殖池塘水体菌群种类及丰度存在季节性差异, 秋季与其他季节相比, 共有菌群种类较少, 相似性较低; 而水体菌群结构的季节性演替则依赖于其功能的变化。研究结果以期为刺参养殖池塘水体微生态调控提供一定的理论依据。

关键词 刺参; 养殖池塘水体; 菌群; 高通量测序

中图分类号 S967.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0077-12

刺参(*Apostichopus japonicus*)是具有较高经济、营养及药用价值的海水养殖生物(陈士国, 2010; Roggatz

et al, 2018; 曹荣等, 2020)。池塘养殖作为一种重要的刺参增养殖模式, 已经成为刺参养殖产业的重要组成

* 国家自然科学基金(31902395)、国家重点研发计划课题(2017YFC1404503)、南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)和辽宁省大学生创新创业训练计划项目(X202010158011)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31902395), National Key Research and Development Program of China (2017YFC1404503), Guangdong Laboratory of Southern Ocean Science and Engineering (Guangzhou) (GML2019ZD0402), and Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Liaoning Province (X202010158011)]. 第一作者: 谭八梅, E-mail: 3372045970@qq.com

^① 通讯作者: 王萃, 副研究员, E-mail: dlouwangluo@sina.com

收稿日期: 2020-07-16, 收修改稿日期: 2020-08-03

部分(赵艳芳等, 2018)。然而, 随着刺参养殖产业的迅速发展, 养殖水体的污染问题日益严重, 对养殖生物产生了一定危害。

养殖池塘水体的微生物群落, 不仅在水体物质与能量循环中具有重要作用, 而且对养殖生物的健康存在直接或间接的影响(王鑫毅等, 2019)。深入研究水体微生物结构及功能, 不仅可以了解微生物对养殖生物的影响, 也可以利用微生物的特有性质和功能改善水质条件。目前, 利用水体微生物某些特性, 对水中污染物进行转移、转化及降解等一系列生物处理方法和技术, 已得到广泛的认可和利用(付战勇等, 2019)。

刺参作为海洋生物, 水体环境是其生存生长的主要场所, 也是刺参病原菌来源的主要途径(孙静等, 2019)。近年来, 关于刺参养殖池塘水体菌群的研究工作越来越受到研究者关注。Gao 等(2010)在研究刺参养殖池塘水体菌群结构时发现, 变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)等是池塘水体中主要优势菌, 相对丰度为 69.01%~97.21%。窦研等(2016)对普兰店、庄河、旅顺不同地区刺参养殖池塘水体菌群结构特征研究显示, 所调查区域水体优势菌门均为变形菌门和拟杆菌门。关晓燕等(2010)对辽宁普兰店高温季节刺参养殖水体菌群结构特征的研究表明, 6~9 月水体细菌数量不断上升, 且优势菌主要隶属于变形菌门。

目前, 已有的研究大多是基于形态学观察及纯培养等传统方法(冯振飞等, 2008; 高菲等, 2010; 李彬等, 2010), 具有一定的局限性, 不能准确全面地反映养殖环境中微生物群落结构的真实情况。近年来, 高通量测序技术结合生物信息学方法, 为全面解析菌群结构和功能特征开启新途径(温崇庆等, 2016; 刘开辉等, 2017; 肖汉玉等, 2019; 来守超等, 2020)。

本研究选取辽宁长海刺参养殖池塘作为研究对象, 利用高通量测序技术, 解析不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构与功能特征, 以为刺参养殖池塘水体微生态调控提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采样选取的刺参养殖池塘仅养殖刺参单一品种, 且全年不投喂微生态制剂。池塘面积约为 0.1 km², 水深为 2~3 m, 水源来自近海海域, 利用潮汐带来的潮差进水和排水。分别于 2019 年 3 月(春季)、6 月(夏季)、9 月(秋季)和 12 月(冬季), 利用玻璃采水器采集辽宁长海(39°16'42"N, 122°36'5"E)同一刺参养殖池塘

上层(离水面 30 cm 处)和下层(离池底 30 cm 处)水样各 4 L, 低温条件下带回实验室。水样经 0.8 μm 无菌滤膜抽滤后, 测定水质指标; 再经 0.22 μm 醋酸纤维素滤膜抽滤, 滤膜用于细菌总 DNA 的提取。

1.2 环境因子的测定

采用 HACH(HQd)水质分析器, 现场测定盐度(S)、温度(T)、酸碱度(pH 值)、溶解氧(DO)、氧化还原电位(ORP)。总氮(TN)、总磷(TP)、氨氮(NH₄⁺-N)、硝酸盐(NO₃⁻-N)、亚硝酸盐(NO₂⁻-N)、磷酸盐(PO₄³⁻-P)等理化参数测定按照 GB17378-2007 海洋监测规范进行。

1.3 DNA 提取

选用 OMEGA Soil DNA 试剂盒提取刺参养殖池塘水体样品总 DNA, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的浓度、纯度和完整性。

1.4 PCR 扩增与高通量测序

细菌 16S rRNA 基因 V₃~V₄ 片段的扩增引物为 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 806R (5'-G GACTACHVGGGTATCTAAT-3'), 应用 Illumina MiSeq 测序平台完成序列测序。

1.5 数据分析

采用 Usearch 软件, 以 97% 阈值开展 OTUs (Operational taxonomic units)操作分类单元聚类。采用 RDPclassifier 软件以阈值 0.8 进行物种分类操作, 低于该阈值的分类结果划归为 Unclassified 一类。利用 Mothur 软件进行多样性分析。基于物种分类结果, 得到在不同水平上各 Rank 的丰度值, 采用 STAMP 软件, 比较样本或组间丰度差异, 筛选条件为 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 环境因子监测

辽宁长海刺参养殖池塘不同季节的水体环境因子监测结果见表 1。根据中华人民共和国《海水水质标准(GB 3097-1997)》, 所有采样点水质均符合国家 I 类海水标准。从表 1 可以看出, 所监测水质指标均呈现显著性季节差异。其中, 水体盐度在春季和冬季最高, 夏季和秋季较低。从春季到冬季, 水体溶解氧、总有机碳(TOC)、pH、硫化物和化学需氧量(COD)均表现出先降低后升高的趋势, TN、NO₂⁻-N、PO₄³⁻-P 和 TN 表现出逐渐降低的趋势, 氧化还原电位(ORP)、TP、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 则呈先升高后降低的趋势。

表 1 不同季节刺参养殖池塘水体环境因子

Tab.1 Environmental factors of water in *A. japonicus* culture pond in different seasons

环境因子 Environmental factors	季节 Season			
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
温度 T(°C)	16.83±0.06 ^b	23.90±0.10 ^a	16.40±0.00 ^c	0.70±0.20 ^d
盐度 Salinity	30.80±0.00 ^a	28.40±0.00 ^b	26.90±0.00 ^c	30.70±0.00 ^a
pH	8.02±0.01 ^{bc}	7.96±0.06 ^c	8.22±0.02 ^b	8.61±0.20 ^a
DO(mg/L)	9.80±0.08 ^b	7.19±0.03 ^c	10.36±0.08 ^b	16.43±0.99 ^a
TN(mg/L)	2.39±0.03 ^a	2.15±0.08 ^b	1.19±0.01 ^d	1.43±0.01 ^c
TP(mg/L)	0.04±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.08±0.01 ^a	0.05±0.01 ^b
NH ₄ ⁺ -N(mg/L)	0.012±0.000 ^a	0.006±0.002 ^b	0.013±0.002 ^a	0.005±0.000 ^b
NO ₃ ⁻ -N(mg/L)	0.030±0.007 ^b	0.000±0.000 ^c	0.084±0.010 ^a	0.002±0.002 ^c
NO ₂ ⁻ -N(mg/L)	0.013±0.003 ^a	0.000±0.000 ^b	0.013±0.005 ^a	0.000±0.000 ^b
PO ₃ ⁻ -P(mg/L)	0.007±0.000 ^a	0.000±0.000 ^d	0.003±0.000 ^b	0.002±0.000 ^c
Sulfide(mg/L)	0.007±0.000 ^a	0.000±0.000 ^d	0.002±0.000 ^c	0.004±0.001 ^b
COD(mg/L)	1.420±0.02 ^a	0.120±0.02 ^c	0.270±0.03 ^b	0.300±0.02 ^b
TOC(mg/L)	7.810±0.19 ^b	6.860±0.11 ^b	9.47±0.05 ^{bc}	61.82±1.31 ^a
ORP(mV)	101.00±1.00 ^c	150.00±7.00 ^a	126.00±7.00 ^b	68.00±15.00 ^d

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。 Note: Different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

2.2 高通量测序结果

不同季节刺参养殖池塘水体样品经检测得到原始序列 40540~71190 条,其中,有效序列 33663~67711 条,聚类于 372~835 个 OTUs。测序覆盖率为 95.94%~99.66%, 表明测序结果真实反映样本信息(表 2)。

2.3 菌群多样性

2.3.1 α 多样性 辽宁长海刺参养殖池塘水体菌

群丰度和多样性均呈显著的季节性差异(表 2)。根据菌群 Chao 指数和 ACE 指数可知,夏季水体菌群丰度最高,秋季水体菌群丰度最低,春季和冬季介于夏季和秋季之间。根据 Shannon 和 Simpson 指数可知,夏季水体菌群多样性最高,秋季水体菌群多样性最低,冬季略高于春季。

2.3.2 β 多样性

在 OTU 水平上,基于加权 Unifrac 距离对所有样本进行三维坐标分析,结果见图 1。其中,

表 2 高通量测序结果

Tab.2 High throughput sequencing results

样品 Sample	OTU 数目 OTU_num	原始序列 Seq_num	有效序列 Filtered_num	香农指数 Shannon index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	辛普森指数 Simpson index
Spr-W-CH1	517	54683	49271	2.64	539	534	0.17
Spr-W-CH2	527	46658	41594	2.49	533	481	0.21
Spr-W-CH3	533	41542	36519	3.32	687	658	0.10
Sum-W-CH1	835	49227	41927	3.70	2203	1554	0.06
Sum-W-CH2	737	44965	39028	3.64	2009	1391	0.08
Sum-W-CH3	766	40931	33663	3.70	1944	1484	0.06
Aut-W-CH1	432	40540	40199	3.15	1964	1422	0.11
Aut-W-CH2	372	69927	67711	2.90	2287	1595	0.13
Aut-W-CH3	480	71190	67415	2.90	1393	1138	0.13
Win-W-CH1	796	60308	40351	2.89	1597	1052	0.13
Win-W-CH2	765	70511	44015	2.97	1589	1117	0.12
Win-W-CH3	659	62177	45506	2.77	1389	1048	0.15

第1主坐标(PCoA1)的贡献率为73.0%，第2主坐标(PCoA2)的贡献率为14.0%，第3主坐标(PCoA3)的贡献率为8.0%，三者累计贡献率为95.0%。不同组别样品分散于不同象限，表明池塘样品组间菌群结构具有显著差异。养殖池塘四季水体组内样品大多聚集在一起，即显示出较好的生物学重复。秋季水体菌群结构与其他3个季节相比具有显著差异($P<0.05$)，春季和冬季水体菌群相似性最高。

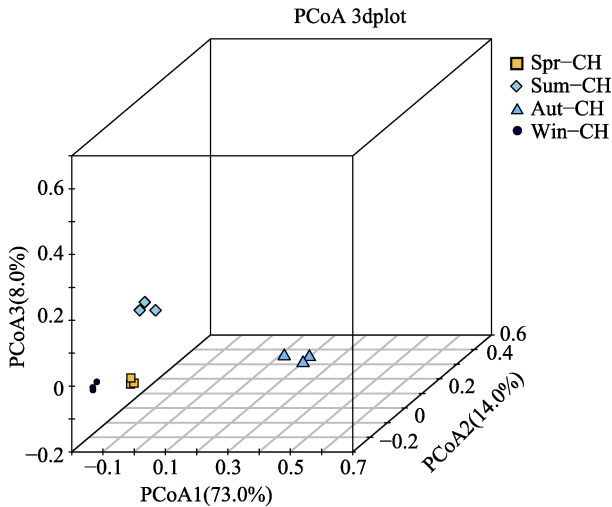


图1 不同季节水体菌群 Unifrac PCoA 图
Fig.1 Unifrac PCoA of water bacterial community in different seasons

2.4 优势菌群结构特征

不同季节刺参养殖池塘水体菌群结构特征如图2所示。从门水平上看，不同季节刺参养殖池塘水体优势菌门主要隶属于变形菌门和拟杆菌门，二者相对丰度最高可达90%以上。其中，变形菌门在全年各季节均为第一优势菌门，相对丰度约占水体菌群的49.66%~70.02%。拟杆菌门均是不同季节的次优势菌门，春、夏、秋和冬的相对丰度分别为27.35%、26.66%、23.33%和19.98%。

从属水平上看，春季刺参养殖池塘水体主要优势菌属为 *Planktomarina*、*Sulfitobacter*、*Litoreibacter*、*Loktanella*、*Amylibacter*、*Candidatus_Pelagibacter*、*Phaeocystidibacter*、*Olleya* 和 *Polaribacter*。夏季水体的主要优势菌属隶属于 *Planktomarina*、*Roseovarius*、*Litoreibacter*、*Candidatus_Pelagibacter*、*Vibrio*、*Halioglobus*、*Phaeocystidibacter*、*Algibacter* 和 *Pseudofulvibacter*。秋季水体的主要优势菌属隶属于 *Pseudoaltertomomas*、*Psychrobacter*、*Shewanella*、*Plaribacter*、*Olleya* 和 *Bizionia*。冬季水体的主要优势菌属隶属于 *Planktomarina*、

Sulfitobacter、*Candidatus_Pelagibacter*、*Amylibacter* 和 *Polaribacter*。优势菌属组成存在显著性季节差异($P<0.05$)。

2.5 差异菌群结构特征

属水平下的水体菌群相似性分析结果表明，不同季节的辽宁长海刺参养殖池塘水体菌群存在显著性差异。其中，秋季与其他季节相比，共有菌群种类较少，相似性较低(图3)。

LEfSe 分析结果显示(图4)，春、夏和冬季水体特异性菌门分别为疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门和厚壁菌门(Firmicutes)，秋季无特异性菌门。春季特异性菌属主要隶属于 *Planktomarina*、*Amylibacter* 和 *Roseibacillus*；夏季特异性菌属主要隶属于 *Owenweeksia*、*Phaeocystidibacter* 和 *Euzebya*；秋季特异性菌属隶属于 *Winogradskyella*、*Cryomorphaceae*、*Bizionia* 和 *Psychrobacter*；冬季特异性菌属主要隶属于 *Candidatus_Pelagibacter* 和 *Sulfitobacter*。

2.6 菌群功能特征

不同季节刺参养殖池塘水体菌群功能预测结果见图5。比对 COGs 数据库 25 种功能蛋白，水体菌群中 24 种功能蛋白存在显著性差异($P<0.05$)。

春季和冬季水体菌群功能具有较高的相似性，表现为功能编码[C,E,F,G,H,I,Q,P,M,N,O,T,U,V,G,J,M]的17种功能蛋白显著上调($P<0.05$)。其中，与代谢相关的全部功能均增强，具体表现在[C]能量的生产与转换，[E]氨基酸的运输和代谢，[F]核苷酸运输与代谢，[G]碳水化合物运输和代谢，[H]辅酶的运输和代谢，[I]脂质转运与代谢，[Q]次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢，[P]无机离子运输与代谢方面。在细胞过程与信号传导方面，菌群功能的增强体现在[M]细胞壁/膜/包膜生物发生，[N]细胞的能动性，[O]翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白，[T]信号传导机制，[U]细胞内运输、分泌和囊泡运输，[V]防御机制。在信息存储与处理方面，[K]转录与[L]复制、重组、修复相关功能蛋白显著增强。

与春季相比，夏季水体菌群功能编码[G,J,M]的功能蛋白显著下调($P<0.05$)。具体表现为[G]碳水化合物运输和代谢功能，[J]翻译、核糖体结构，[M]生物发生功能、细胞壁/膜/包膜生物相关功能的下降。

秋季水体菌群功能编码[D,Q,Z,W]的功能蛋白具有显著性差异($P<0.05$)。在细胞过程与信号方面，表现为[D]细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂，[Z]细胞骨架功能的下降，以及[W]细胞外结构相关功能

的升高。在新陈代谢方面, 具体表现为[Q]次生代谢物的生物合成、转运和分解代谢相关功能的下降。

3 讨论

微生物作为养殖池塘生态系统的重要组成部分, 同时, 作为生产者和分解者, 保证了养殖池塘生态系统中物质循环与能量供给, 对维持生态系统平衡具有至关重要的作用(李博, 2013)。本研究利用高通量测

序技术通过对刺参养殖池塘水体微生物 16S rRNA 基因 V₃~V₄ 片段进行扩增测序, 全面鉴定水体微生物种类特征, 深入解析水体微生物组成情况, 以为养殖水体环境菌群调控和刺参养殖疾病防治提供一定的理论基础。

3.1 不同季节刺参养殖池塘水体优势菌群特征

本研究结果显示, 辽宁长海刺参养殖池塘水体不同季节优势菌门均为变形菌门和拟杆菌门, 二者相对

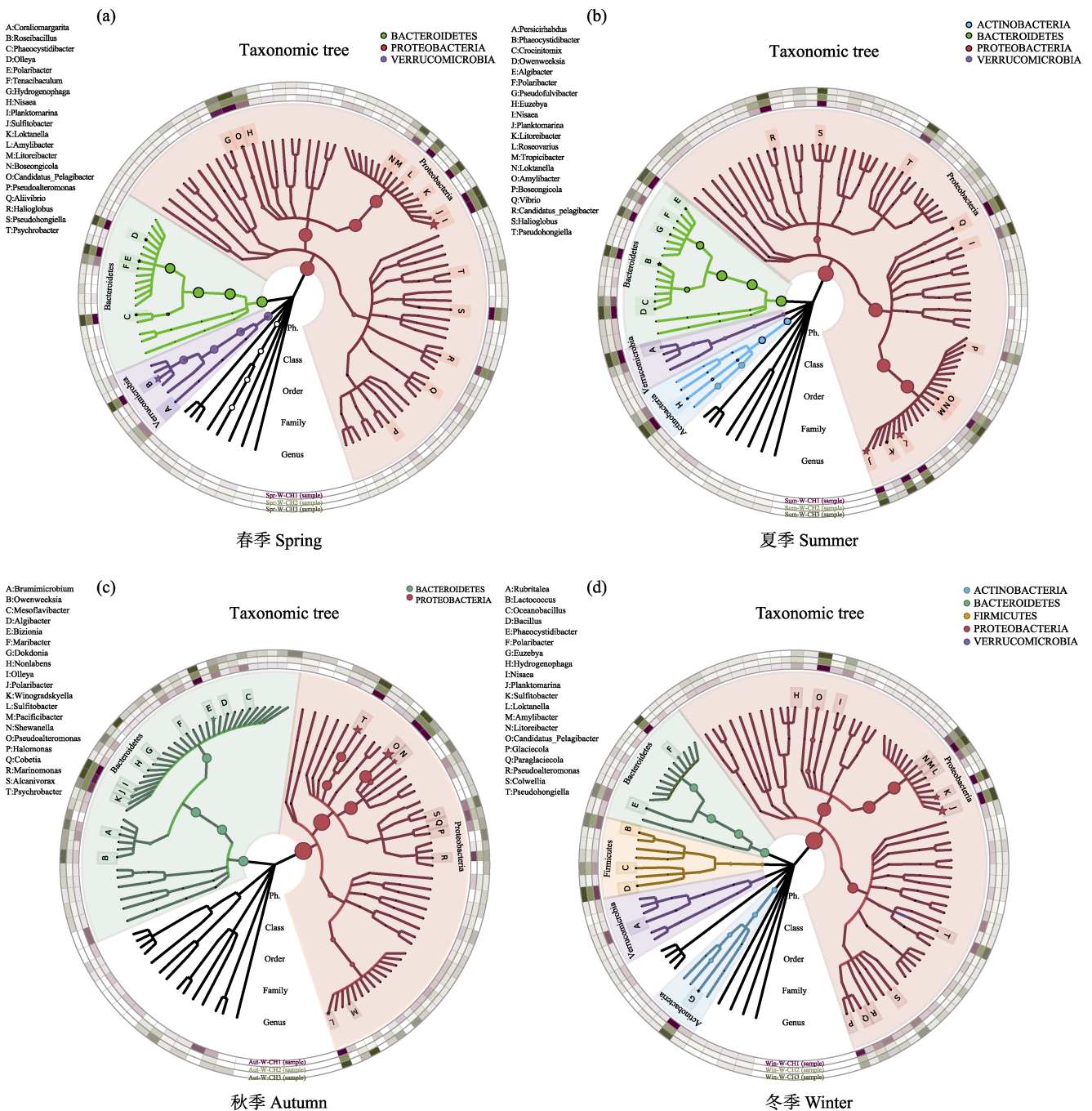


图 2 不同季节水体菌群组成的相对丰度
Fig.2 Relative abundance of water bacterial community in different seasons

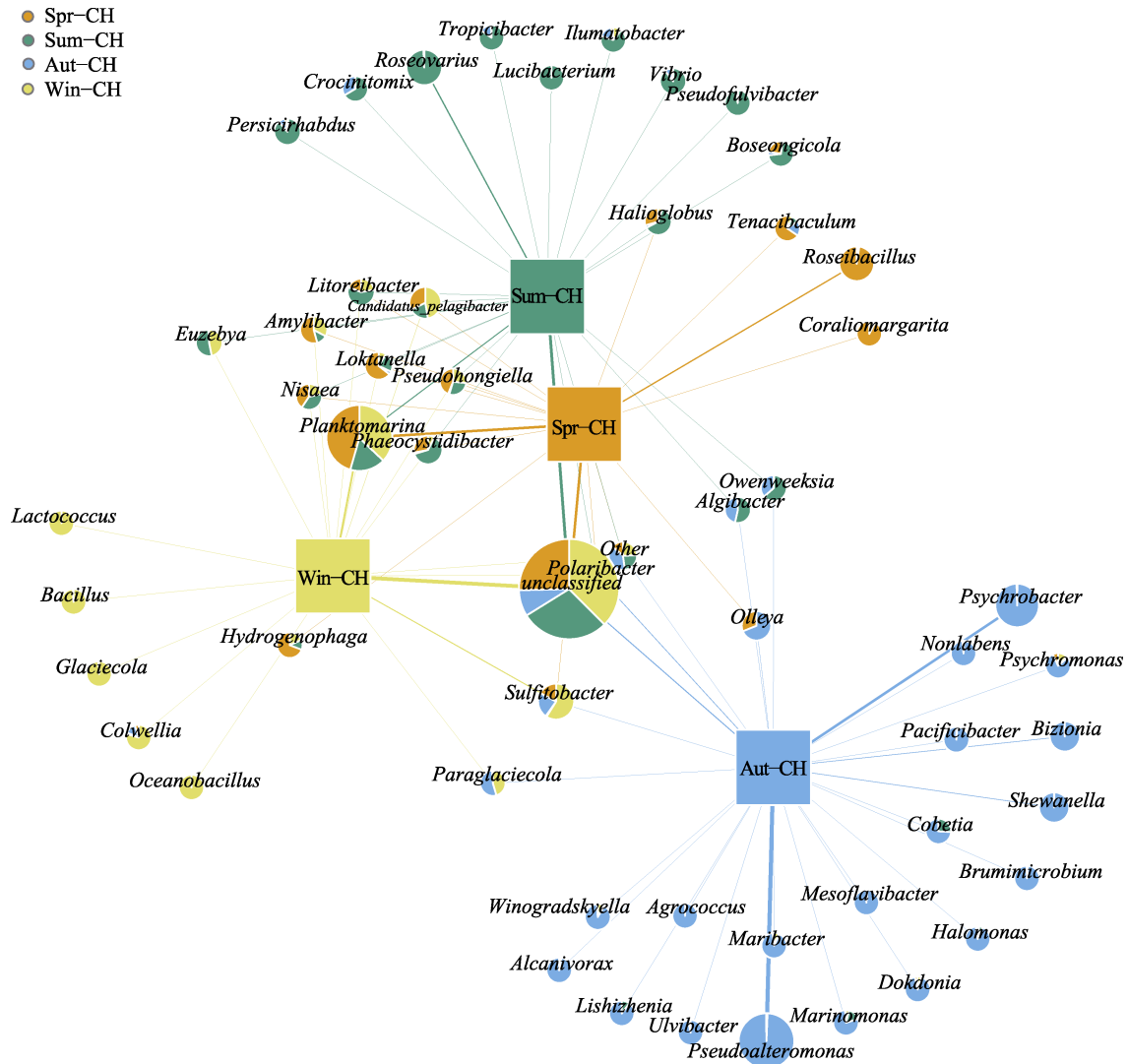


图3 属水平下水体菌群 network 图

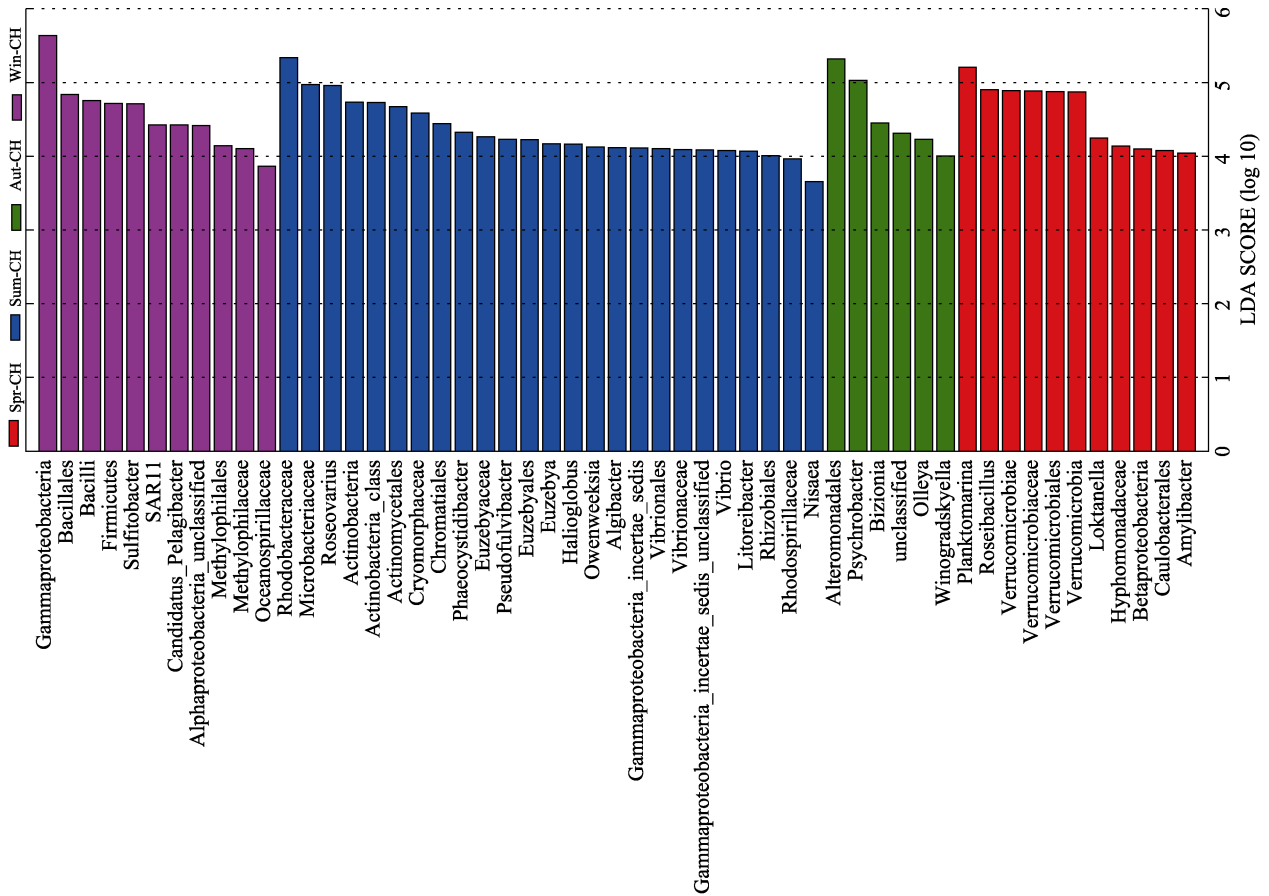
Fig.3 Network diagram of water bacterial community in genus

丰度之和最高可达90%以上,该结果与李建光等(2014)的研究报道相吻合。变形菌群作为第一优势菌门,主要是因为其在原核生物分子生物学分类或表型分类中占据了绝对的优势(Gupta, 2000)。拟杆菌门作为次优势菌门,是海洋浮游细菌的重要组成部分,其菌属能够产生胞外水解酶来降解生物大分子(如几丁质、琼脂等)(施云芬等, 2017),同时,拟杆菌门还能在发酵碳水化合物化合物的同时有效分解纤维细胞壁的多糖,常常与脂质蛋白质等有机物的代谢转换有关,而这些有机物是水体碳循环的重要组成部分,在物质循环中具有重要作用(Chen *et al*, 2018)。

3.2 不同季节刺参养殖池塘水体差异菌群特征

比较不同季节的辽宁长海刺参养殖池塘水体差异菌群结构特征。结果显示,春、夏和冬季具有显著性差异的菌门分别隶属于疣微菌门(16.01%)、放线菌

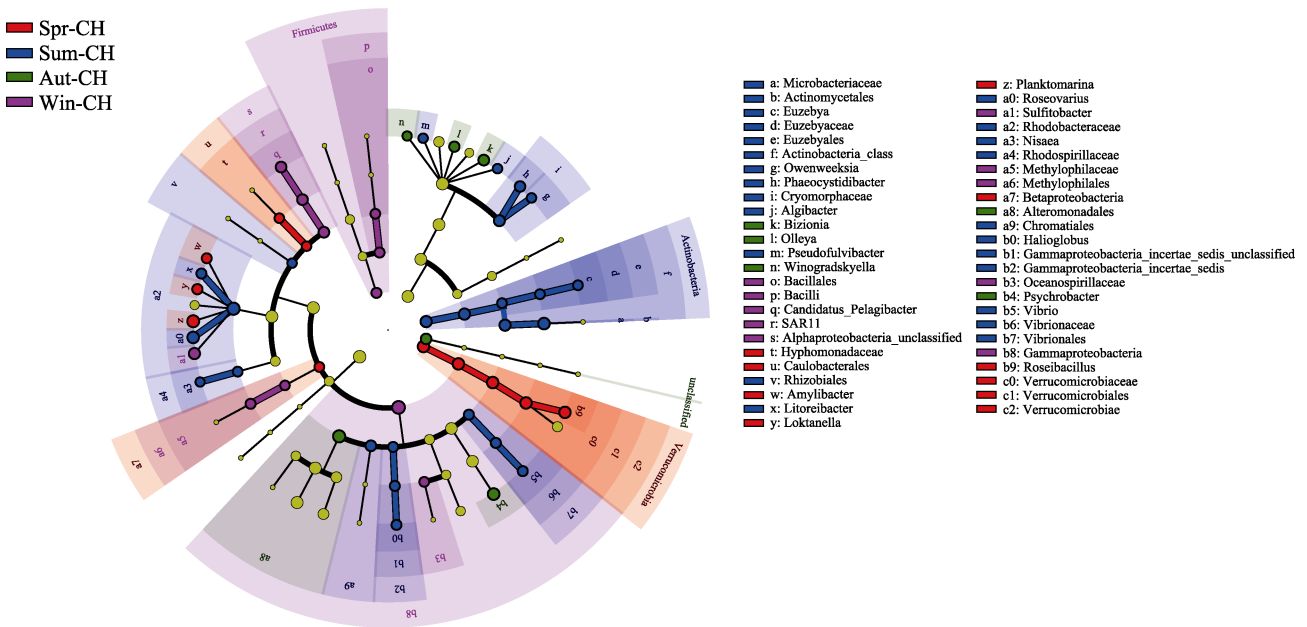
门(11.67%)和厚壁菌门(2.01%);秋季相比于其他季节没有显著的特异性菌群。不同季节特异性菌群的相对丰度与水体的理化因子的相对含量有关,理化因子含量的改变对水体菌群的生长和分布丰度具有一定的影响。研究发现,水体理化因子为微生物生长和繁殖过程提供无机盐和有机物等营养物质,菌群结构特征往往受其所处环境中理化因子浓度的影响(张丽娜等, 2012; Nishiyama *et al*, 2018)。疣微菌门中的微生物广泛存在于水生生态系统中,在生物地球的氮循环中起着重要作用(Bergen *et al*, 2014; Sharp *et al*, 2014; Shen *et al*, 2017)。本研究关于长海刺参养殖池塘不同季节水体所有监测环境因子显示,春季水体总氮含量在四季中最高。池塘生态系统为保持其稳定性,春季水体疣微菌门相对丰度的增加在加快水体氮循环过程中发挥重要作用。具有抗高温特性的放线菌门作为夏季的差异菌门,在养殖池塘水体中具有降解淀粉、蛋白



(a) 不同季节水体菌群LEfSe分析柱状图

(a) LEfSe analysis histogram of water bacterial community in different seasons

Cladogram



(b) 不同季节水体菌群LEfSe分析环形树状图

(b) Annular tree diagram of LEfSe analysis of water bacterial community in different seasons

图 4 不同季节水体菌群 LEfSe 分析

Fig.4 LEfSe analysis of water bacterial community in different seasons

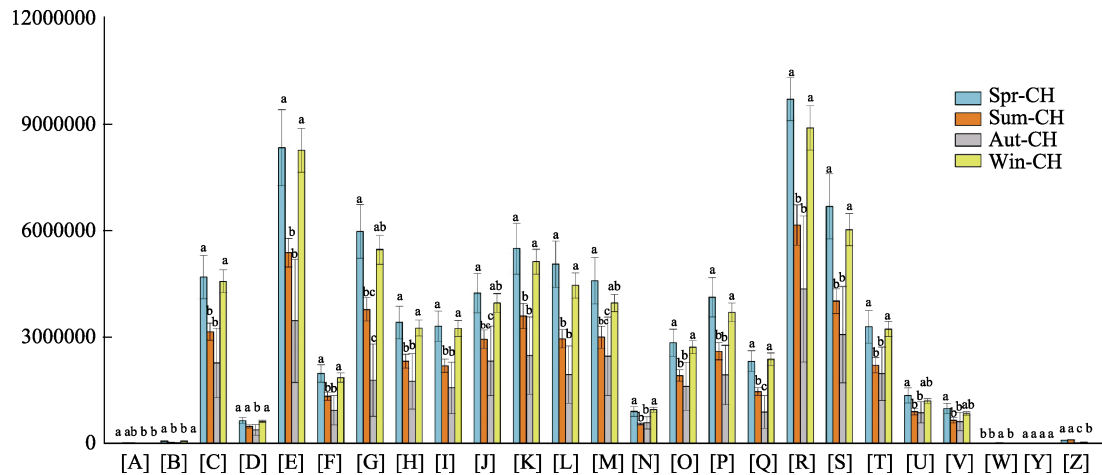


图 5 基于 COG 数据库菌群功能注释

Fig.5 The function of bacterial community prediction based on COG database

[A]: RNA 的处理和修饰; [B]: 染色质结构与动力学; [C]: 能量的生产与转换; [D]: 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割; [E]: 氨基酸的运输和代谢; [F]: 核苷酸运输与代谢; [G]: 碳水化合物运输和代谢; [H]: 辅酶的运输和代谢; [I]: 脂质转运与代谢; [J]: 翻译、核糖体结构与生物发生; [K]: 转录; [L]: 复制、重组和修复; [M]: 细胞壁/膜/包膜生物发生; [N]: 细胞的能动性; [O]: 翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白; [P]: 无机离子运输与代谢; [Q]: 次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢; [R]: 一般的功能预测; [S]: 未知功能; [T]: 信号传导机制; [U]: 细胞内运输、分泌和囊泡运输; [V]: 防御机制; [W]: 细胞外结构; [Y]: 核结构; [Z]: 细胞骨架

[A]: RNA processing and modification; [B]: Chromatin structure and dynamics; [C]: Energy production and conversion; [D]: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; [E]: Amino acid transport and metabolism; [F]: Nucleotide transport and metabolism; [G]: Carbohydrate transport and metabolism; [H]: Coenzyme transport and metabolism; [I]: Lipid transport and metabolism; [J]: Translation, ribosomal structure and biogenesis; [K]: Transcription; [L]: Replication, recombination and repair; [M]: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; [N]: Cell motility; [O]: post-translational modification, protein turnover, and chaperones; [P]: inorganic ion transport and metabolism; [Q]: Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism; [R]: General function prediction only; [S]: Function unknown; [T]: Signal transduction mechanisms; [U]: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; [V]: Defense mechanisms; [W]: Extracellular structures; [Y]: Nuclear structure; [Z]: Cytoskeleton

等大分子的功能, 可以产生抗菌类物质, 并能形成耐热、耐干孢子等优点, 有成为益生菌的潜力(王蓉等, 2013)。本研究结果显示, 环境温度越低, 水体厚壁菌门细菌相对丰度越大。这是因为厚壁菌门下的芽孢杆菌纲大部分微生物, 能够形成抗逆性极强的芽孢, 从而具有极强的环境适应性(宋兆齐等, 2015)。此外, 隶属于厚壁菌门的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可以降低养殖水体中的硝酸盐和亚硝酸盐, 能有效改善刺参养殖水体水质, 提高机体消化酶和非特异性免疫酶活性, 从而促进刺参生长(董春光等, 2015), 推测与冬季水体中检测出较低含量的硝酸盐和亚硝酸盐有关。

3.3 不同季节刺参养殖池塘水体菌群功能特征

通过比对 COGs 数据库 25 种功能蛋白, 刺参养殖池塘水体菌群中 24 种功能蛋白存在显著性季节差异。春季和冬季水体菌群功能具有较高的相似性, 但春季主要体现在新陈代谢等相关功能蛋白显著增强

($P < 0.05$); 冬季主要表现在信息存储与处理、细胞过程与信号相关功能蛋白显著性增强($P < 0.05$)。闫法军(2013)研究发现, 水体菌群功能存在季节性差异与不同季节特异性菌群有关。本研究中, 春季特异性菌门为疣微菌门, 其参与水体氮循环, 加速蛋白质代谢功能(Freitas *et al*, 2012), 进而促使蛋白翻译速度的增强, 引起信息存储于处理相关功能蛋白上调。冬季特异性菌门为厚壁菌门, 其中代表性梭菌纲作为一种专性厌氧菌, 具有很强的降解能力和代谢活性(宋景华等, 2013), 一定程度上可以解释冬季水体菌群新陈代谢的增强。与春季和冬季相比, 夏季的代谢、信息存储与处理、细胞过程与信号相关功能蛋白显著下降($P < 0.05$)。放线菌门作为夏季的特异性菌群, 产生的抗菌素种类与性质具有某些特性, 能够抑制池塘水体中其他革兰氏阳性菌发挥功能(李文均等, 2002), 引起夏季水体菌群相关功能蛋白显著下降。同时, 放线菌能产生生物活性显著的次生代谢产物, 这种次生代谢产物是生命活动非必需的一类小分子有机化合物, 这类有机

化合物的增多,使生命活动必需的化合物相对含量降低(王淑霞等,2007),促使相关的功能蛋白显著下降。

4 结论

本研究通过高通量测序技术揭示了辽宁长海刺参养殖池塘不同季节水体菌群结构与功能的特征。研究发现,随着季节的变化,长海刺参养殖池塘水体菌群结构和功能具有显著演替过程。养殖池塘水体菌群丰度和多样性的最高季节是夏季,最低季节是秋季。同时,水体菌群结构的季节性演替与其功能之间存在一定的相关性,但二者之间的相互作用机制还有待于进一步的深入探究。

参 考 文 献

- Bergen B, Herlemann DPR, Labrenz M, *et al.* Distribution of the verrucomicrobial clade Spartobacteria along a salinity gradient in the Baltic Sea. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6(6): 625–630
- Chen CL, Liu WT, Chong ML, *et al.* Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(4): 466–473
- Chen SG. Structure and bioactivity analysis of several acid polysaccharides from sea animal: Searching for alternatives to Heparin. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [陈士国. 几种海洋动物酸性多糖的结构和活性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- Cao R, Wang SY, Zhao L, *et al.* Nutritional analysis and evaluation of *Apostichopus japonicus* gonads. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2020, 10(2): 23–30 [曹荣, 王善宇, 赵玲, 等. 仿刺参雄、雌性腺营养组成分析与评价. 中国渔业质量与标准, 2020, 10(2): 23–30]
- Chen J, Robb CS, Unfried F, *et al.* Alpha- and beta-mannan utilization by marine Bacteroidetes. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(11): 4127–4140
- Dou Y, Zhao XW, Ding J, *et al.* Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 122–129]
- Dröge S, Limper U, Emtiaz F, *et al.* In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose chafer *Pachnoda marginata*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2005, 51(2): 57–64
- Du T. Seasonal variation of microflora and algal phase structure in sea cucumber aquaculture system and preliminary screening of probiotics. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [杜佗. 刺参大水面养殖系统中菌群、藻相结构的季节变化与益生菌的初步筛选. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Ding SY, Wang L, Xu HC, *et al.* Bacterial community structure and function in the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 210–220 [丁斯予, 王萃, 徐瀚晨, 等. 刺参肠道及养殖环境菌群结构与功能. 生态学杂志, 2019, 38(1): 210–220]
- Dong CG, Yang AG, Sun XJ, *et al.* The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 109–115 [董春光, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的益生作用. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 109–115]
- Fu ZY, Ma YD, Luo M, *et al.* Research progress on the theory and technology of ecological protection and restoration abroad. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(23): 9008–9021 [付战勇, 马一丁, 罗明, 等. 生态保护与修复理论和国外研究进展. 生态学报, 2019, 39(23): 9008–9021]
- Feng ZF, Wang GL, Qian D, *et al.* Microbial flora and quantitative distribution of bacteria in culture ponds of mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, 2008, 27(11): 574–577 [冯振飞, 王国良, 钱冬, 等. 锯缘青蟹养殖环境中细菌类群及其数量分布. 水产科学, 2008, 27(11): 574–577]
- Freitas S, Hatosy S, Fuhrman JA, *et al.* Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *ISME Journal*, 2012, 6(8): 1499–1505
- Fei YT. Study on relationship between microbial community and physical-chemical factors in culture environment and disease occurrence of *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [费聿涛. 刺参养殖环境微生物和理化因子与刺参病害发生关系的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Fei YT, Li QF, Zhang Y, *et al.* Environmental factors causing skin ulcer syndrome occurrence in pond-cultured *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 682–692 [费聿涛, 李秋芬, 张艳, 等. 池塘养殖刺参腐皮综合征发病环境因素分析. 中国水产科学, 2016, 23(3): 682–692]
- Gao F, Sun HL, Xu Q, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the gut contents of *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 671–680 [高菲, 孙慧玲, 许强, 等. 刺参消化道内含物细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析. 中国水产科学, 2010, 17(4): 671–680]
- Gao F, Xu Q, Yang HS. Seasonal variations of food sources in *Apostichopus japonicus* indicated by fatty acid biomarkers analysis. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(5): 760–767
- Gao XY, Xu Y, Liu Y, *et al.* Bacterial diversity, community

- structure and function associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system. *Marine Biodiversity*, 2012, 42(1): 1–11
- Guan XY, Zhou ZC, Chen Z, *et al.* Bacteria diversity analysis on the water of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture pond under high-temperature season based on PCR-DGGE fingerprint technology. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2011, 30(5): 82–88 [关晓燕, 周遵春, 陈仲, 等. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. *海洋湖沼通报*, 2011, 30(5): 82–88]
- Gupta RS. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 367–402
- He C, Huang GQ. On *Apostichopus japonicus* culture in China and major culture provinces. *Fishery Information and Strategy*, 2014, 29(1): 24–30 [何翠, 黄国强. 全国及主要刺参养殖省份刺参养殖状况分析. *渔业信息与战略*, 2014, 29(1): 24–30]
- Lai SC, Fang XY, Tu B, *et al.* Methanogenic potential and community structure of coalbed-methane production water microbiome. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(4): 727–738 [来守超, 方晓瑜, 涂波, 等. 典型煤层水微生物产甲烷潜力及其群落结构研究. *微生物学报*, 2020, 60(4): 727–738]
- Li B, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter. *Marine Sciences*, 2010, 34(4): 64–69 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究. *海洋科学*, 2010, 34(4): 64–69]
- Li B. A preliminary study on bacterial productivity in different grass carp polyculture eco-systems and analysis of bacterial community. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [李博. 草鱼混养生态系统细菌生产力和群落结构的实验研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Li J, Liao MJ, Li B, *et al.* The characteristics of culturable bacterial microflora in the gastrointestinal tract of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during the early developmental stage and its relationship with environmental flora. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 122–131 [李靖, 廖梅杰, 李彬, 等. 养殖刺参早期发育阶段体内可培养细菌的菌群特征及其与环境菌群相关性分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 122–131]
- Li JG, Xu YP, Li XY, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different culture seasons. *Fisheries Science*, 2014, 33(9): 562–568 [李建光, 徐永平, 李晓宇, 等. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. *水产科学*, 2014, 33(9): 562–568]
- Li WJ, Zhang ZZ, Jiang CL. The advance on taxonomic of genues *Thermoactinomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 759–763 [李文均, 张世泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展. *微生物学报*, 2002, 42(6): 759–763]
- Liu KH, Ding XW, Zhang B, *et al.* High-throughput sequencing to reveal fungal diversity in hot springs of Rehai at Tengchong in Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(9): 1314–1322 [刘开辉, 丁小维, 张波, 等. 高通量测序分析云南腾冲热海热泉真菌多样性. *微生物学报*, 2017, 57(9): 1314–1322]
- Liu WS, Guo XZ, Chen YL, *et al.* Analysis of microbial composition and function in the of farmed black-spot frog (*Rana nigromaculata* Howell). *Journal of Economic Zoology*, 2020, 24(1): 1–12 [刘文舒, 郭小泽, 陈彦良, 等. 养殖黑斑蛙(*Rana nigromaculata* Howell)肠道微生物结构与功能分析. *经济动物学报*, 2020, 24(1): 1–12]
- Ma BB, Wu M, Wang ZY, *et al.* The role and mechanism of humic acid in inhibiting the anaerobic production of sulfate by sulfate reducing bacteria. *Water Pollution and Treatment*, 2020, 8(1): 24–30 [马彬彬, 吴敏, 王致远, 等. 腐殖酸对硫酸盐还原菌厌氧还原硫酸盐的抑制效果及其机理研究. *水污染及处理*, 2020, 8(1): 24–30]
- Nishiyama E, Higashi K, Mori H, *et al.* The relationship between microbial community structures and environmental parameters revealed by metagenomic analysis of hot spring water in the kirishima area, Japan. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, 20(6): 202
- Roggatz CC, Mercedes G, Pereira H, *et al.* A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research*, 2018, 32(1): 116–120
- Sara F, Stephen H, Jed AF, *et al.* Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2012, 6(8): 1499–1505
- Sharp CE, Smirnova AV, Graham JM, *et al.* Distribution and diversity of Verrucomicrobia methanotrophs in geothermal and acidic environments. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1867–1878
- Shen CC, Ge Y, Yang T, *et al.* Verrucomicrobial elevational distribution was strongly influenced by soil pH and carbon/nitrogen ratio. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(10): 2449–2456
- Shi YF, Zheng L, Ma H, *et al.* Pilot study and microbial community structure analysis of pulse hydrolysis acidification-A/O bioreactor for treatment of petrochemical wastewater. *Science and Technology Review*, 2017, 533(23): 41–47 [施云芬, 郑蕾, 马慧, 等. 脉冲水解酸化-A/O 生物反应器处理石化废水的中试研究及微生物群落结构解析. *科技导报*, 2017, 533(23): 41–47]
- Song JH, Li G, Zhang SY, *et al.* Analysis of relationship between carbon metabolism of microbial community and physicochemical factors in recirculating ponds. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(5): 70–76 [宋景华, 李谷, 张世羊, 等. 养殖池塘水质理化因子与微生物群落碳代谢的定量关系. *淡水渔业*, 2013, 43(5): 70–76]

- Song ZQ, Wang L, Liu XH, *et al.* Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet. *Biotechnology*, 2015, 25(5): 481–486, 436 [宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性. *生物技术*, 2015, 25(5): 481–486, 436]
- Sun J, Wan XY, Yang Q, *et al.* Case studies: Pathogenic agent and microbiome analysis for zoea of *Litopenaeus vannamei* suffering from an unknown disease. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(5): 134–144 [孙静, 万晓媛, 杨倩, 等. 病例研究: 未知病因的凡纳滨对虾蚤状幼体的病原和微生物组分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(5): 134–144]
- Tang LC, Zhong CH, Lin Q, *et al.* Comparative study on the community structure of epiphytic bacteria in sporophyte and gametophyte stages of kelp *Saccharina japonica*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 58–65 [唐隆晨, 钟晨辉, 林琪, 等. 海带孢子体、配子体时期附生菌群落结构的比较. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 58–65]
- Wang FF. Dynamic changes of bacterial community in shellfish culture and the immune function of CARD-containing protein in oyster *Crassostrea gigas*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 [王飞飞. 贝类养殖水域细菌群落动态变化特征及长牡蛎含 CARD 基因免疫功能的初步研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Wang SX, Zhu TJ, Lu ZY, *et al.* Recent progress in the discovery of new marine-derived actinomycetes and their secondary metabolites. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2007, 32(9): 513–519 [王淑霞, 朱天骄, 卢圳域, 等. 海洋新放线菌及其次级代谢产物研究进展. *中国抗生素杂志*, 2007, 32(9): 513–519]
- Wang XY, Xie X, Jin S, *et al.* Seasonal variation of microflora in *Simonovacula constricta* and its aquacultural pond based on high-throughput sequencing. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(12): 4267–4276 [王鑫毅, 谢骁, 金珊, 等. 基于高通量测序的缢蛏及其养殖池塘菌群结构的季节变化. *应用生态学报*, 2019, 30(12): 4267–4276]
- Wang YG, Rong XJ, Zhang CY, *et al.* Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: Prevention and treatment. *Marine Science*, 2005, 29(3): 1–7 [王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术. *海洋科学*, 2005, 29(3): 1–7]
- Wen CQ, He YY, Xue M, *et al.* Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 130–142 [温崇庆, 何瑶瑶, 薛明, 等. 高通量测序分析 DNA 提取引起的对虾肠道菌群结构偏差. *微生物学报*, 2016, 56(1): 130–142]
- Wang Y, Qiu XM, Wang J, *et al.* Disease situation and its detection advances by biotechnology of *Apostichopus japonicus*. *Biotechnology Bulletin*, 2009(11): 60–64 [王颖, 仇雪梅, 王娟, 等. 刺参病害现状及其生物技术检测的研究进展. *生物技术通报*, 2009(11): 60–64]
- Wang R, He XN, Liu W, *et al.* Potential use of marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Journal of Anhui Agriculture*, 2013, 41(24): 10007–10009 [王蓉, 何晓娜, 刘维, 等. 海洋放线菌作为益生菌在水产养殖中的潜在应用. *安徽农业科学*, 2013, 41(24): 10007–10009]
- Wang JW. Study the effect on the water quality by microorganism in aquatic water. Master's Thesis of Shanxi University, 2007 [王京伟. 微生物对养殖水体水质调控作用的研究. 山西大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Xiao HY, Wang P, Liu JZ, *et al.* Characteristics of bacterial community in Le'an River in winter based on high-throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(1): 181–194 [肖汉玉, 王鹏, 刘君政, 等. 基于高通量测序的乐安江冬季细菌群落特征分析. *微生物学报*, 2019, 59(1): 181–194]
- Yan FJ. Study on microbial community structure and functional diversity from sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) culture ponds. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [闫法军. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)养殖池塘生态系统微生物结构与功能研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Zhao YF, Sheng XF, Ning JS, *et al.* Comparative research on nutritive and functional compositions in *Apostichopus japonicus* cultured in different patterns in north China. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(8): 1795–1801 [赵艳芳, 盛晓风, 宁劲松, 等. 我国北方 3 种主要养殖模式刺参的营养组成与功能性成分差异研究. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(8): 1795–1801]
- Zhang LN, Hao CB, Wang LH, *et al.* Characteristics of the eukaryotic community structure in acid mine drainage lake in Anhui Province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 875–884 [张丽娜, 郝春博, 王丽华, 等. 安徽某铁矿酸性矿山废水中真核生物群落结构特征. *微生物学报*, 2012, 52(7): 875–884]

(编辑 冯小花)

The Seasonal Structural and Functional Characteristics of Bacterial Community in *Apostichopus japonicus* Culture Pond Water

TAN Bamei, WANG Luo^①, PEI Honglin, XIA Xinglong, DING Jun, CHANG Yaqing, HAO Zhenlin

(Dalian Ocean University, Department of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Dalian 116023)

Abstract To investigate the structure and function of the bacterial community in *Apostichopus japonicus* (sea cucumber) culture ponds in Changhai, North China, the bacterial community composition and diversity were seasonally analyzed by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. The results showed that the bacterial richness and diversity were the highest in the summer and the lowest in the autumn. In all seasons, the predominant phylum was Proteobacteria, followed by Bacteroidetes, but higher levels of other bacterial phyla were observed in the spring (Verrucomicrobia), summer (Actinobacteria), and winter (Firmicutes). There were no significant differences in the phyla of autumn with that of other seasons. Predictive functional profiling based on the Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) database (functional codes denoted by [X]) showed significant differences ($P < 0.05$) in 24 aquatic bacterial community proteins. In spring and winter, the proteins for energy production and conversion; nucleotide transport and metabolism; carbohydrate transport and metabolism; secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism; cell wall/membrane/envelope biogenesis; cell motility; transcription; and replication, recombination, and repair were significantly upregulated. Proteins regulating carbohydrate transport and metabolism; translation, ribosomal structure, and biogenesis; and cell wall/membrane/envelope biogenesis were significantly downregulated in summer. In autumn, the proteins regulating cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning; cytoskeleton; and secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism were significantly downregulated, and the proteins for extracellular structures were upregulated. These results indicate that the richness and diversity of the bacterial community in the sea cucumber culture pond are the lowest in autumn and that seasonal changes in the community structure depend on the function. This study provides a theoretical basis for water microecology regulation and the prevention and control of *A. japonicus* diseases.

Key words *Apostichopus japonicus*; Culture pond water; Bacterial community; High-throughput sequencing

① Corresponding author: WANG Luo, E-mail: dlouwangluo@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201207001

http://www.yykxjz.cn/

裴泓霖, 王萃, 谭八梅, 李伟嘉, 甄昊, 丁君, 常亚青. 不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构及其影响因素. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 89–99

Pei HL, Wang L, Tan BM, Li WJ, Zhen H, Ding J, Chang YQ. Environmental factors influence the seasonal characteristics of bacterial community in the sediment of *Apostichopus japonicus* culture ponds. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 89–99

不同季节刺参养殖池塘沉积物 菌群结构及其影响因素*



裴泓霖 王萃^① 谭八梅 李伟嘉 甄昊 丁君 常亚青

(大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

摘要 本研究以辽宁省营口地区刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘为研究对象, 利用高通量测序技术, 构建不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群 16S rRNA 基因测序文库, 解析刺参养殖池塘沉积物菌群的季节性差异和共性, 查明影响沉积物菌群构成的主导环境因子。结果显示, 营口地区刺参养殖池塘沉积物菌群的丰度和多样性以夏季最高, 春秋次之, 冬季最低。不同季节刺参养殖池塘沉积物差异菌群呈显著性季节演替特征($P < 0.05$)。其中, 春季差异菌群主要隶属于拟杆菌门(Bacteroides), 夏季差异菌群主要隶属于酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和浮霉菌门(Planctomycetes), 秋季差异菌群主要隶属于厚壁菌门(Firmicutes), 冬季差异菌群主要隶属于放线菌门(Actinobacteria)。尽管不同季节沉积物细菌组分比例不同, 但第一优势菌门均隶属于变形菌门(Proteobacteria)(相对丰度>43.19%)。环境因子中, 影响刺参养殖池塘沉积物菌群的主导环境因子为温度、总有机碳、总氮和 pH。本研究将为刺参养殖池塘微生态调控提供理论参考。

关键词 刺参; 养殖池塘; 沉积物; 高通量测序; 菌群结构

中图分类号 S967.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0089-11

刺参(*Apostichopus japonicus*)因具有丰富的营养和药用价值, 深受消费者青睐。随着刺参养殖产业的不断发展, 池塘养殖已成为刺参增养殖的重要方式(常亚青等, 2006)。在集约化养殖过程中, 残饵及养殖生物粪便的堆积易引起底质恶化, 对养殖生态系统健康存在潜在危害(董双林, 2015; 王姣, 2016)。

养殖池塘沉积物菌群作为养殖生态系统的重要组成部分, 不仅在水体物质循环及能量流动过程中发挥巨大的作用(Bentzon-Tilia *et al*, 2016), 对其养殖生物的生长、消化、免疫、疾病等均存在相关性(Becker *et al*, 2004; Wang *et al*, 2005; 高菲等, 2010)。研究表明, 蓝细菌(Cyanobacteria)能将溶解有机碳转化为自

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901604)、国家自然科学基金(31902395; 31772849)、南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)、辽宁省教育厅 2019 年度科学研究经费项目(DL201901)和辽宁省大学生创新创业训练计划项目(S202010158006)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901604), National Natural Science Foundation of China (31902395; 31772849), Guangdong Laboratory of Southern Ocean Science and Engineering (Guangzhou) (GML2019ZD0402), Scientific Research Funds of Liaoning Provincial Education Department (DL201901), and Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Liaoning Province (S202010158006)]. 裴泓霖, E-mail: 897544591@qq.com

^① 通讯作者: 王萃, 副研究员, E-mail: dlouwangluo@sina.com

收稿日期: 2020-12-07, 收修改稿日期: 2021-01-04

身的颗粒有机碳,从而完成碳转换与储存(周伟华等, 2007);假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌群能利用反硝化作用将硝酸盐还原为氮气(肖晶晶等, 2009);链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)中某些菌种对有机磷和无机磷的分解具有明显作用(孙亚凯, 2006);脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)、反硝化硫微螺菌(*Thiomicrospira denitrificans*)、多样硫杆菌(*Thiobacillus diversus*)等菌群能从多种还原态无机硫的氧化中获得能量,同时,还原硝酸盐或亚硝酸盐产生氮气(Pokoma *et al.*, 2015);嘉利翁氏菌属(*Gallionella*)、海杆菌属(*Mariprofundus*)、*Sideroxydans* 能够将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,而 Fe^{3+} 可以作为电子受体进行能量代谢,从而完成铁循环(Edwards *et al.*, 2003; Emerson *et al.*, 2004)。因此,有效利用某些微生物的生理功能来保持养殖池塘生态系统的微生态平衡,对防治池塘养殖环境恶化以及促进养殖生物健康生长具有重要意义(王鑫毅等, 2019)。然而,养殖池塘生态系统菌群结构极易受到外部环境理化因子的影响,季节变动、营养物质输入等变化均可造成池塘养殖环境菌群种类和丰度的改变,间接影响养殖生物的生长及健康(Sunde *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2019)。

为探明不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构及其影响因素,本研究选取辽宁省营口地区刺参养殖池塘为研究对象,基于高通量测序技术,揭示不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构的季节性差异和共性,查明影响刺参养殖池塘沉积物菌群结构的主导环境因子,以期对刺参养殖池塘微生态调控和绿色健康养殖提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选取辽宁营口(40°37'46" N; 122°8'59" E)刺参养殖池塘为研究对象,于2019年1月(冬季)、4月(春季)、8月(夏季)、10月(秋季),利用柱状采泥器,在同一刺参养殖池塘对角线两侧离岸1.5 m及正中间处采集表层(5 cm)沉积物样品,装入无菌离心管, -80℃ 冷冻保存。将每次采集的5个沉积物样品等量混匀送检,每个样品进行3次重复。

采样池塘仅养殖刺参单一品种,放养刺参密度约为8~10头/m²,刺参规格约为100 g/头。池塘面积约为0.1 km²,水深2~3 m,底质多泥质,水源来自近海海域,利用潮汐带来的潮差进水和排水。全年不投喂饲料及益生菌,保证刺参自然生长。

1.2 环境因子测定

环境因子监测点位同沉积物采样点,每个采样点测定环境指标均进行3次重复。采用HACH(HQd)水质分析仪器,在养殖池塘现场测定温度、盐度和pH。沉积物总有机碳(TOC)的测定采用重铬酸钾氧化-还原容量法,总氮(TN)采用过硫酸钾氧化法,总磷(TP)采用钼锑抗分光光度法,氨氮(NH₄⁺-N)采用次溴酸盐氧化法,硝酸盐(NO₃⁻-N)采用镉柱还原法,亚硝酸盐(NO₂⁻-N)采用萘乙二胺分光光度法,磷酸盐(PO₄³⁻-P)采用磷钼蓝分光光度法,硫化物采用亚甲基蓝分光光度法,氧化还原电位采用碱性高锰酸钾法。

1.3 DNA提取

选用OMEGA Soil DNA试剂盒提取刺参养殖池塘环境样品总DNA,为确保DNA无降解无污染,DNA浓度要求≥50 ng/μl, OD_{260/280}=1.8~2.0。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA,条带清晰完整、无拖尾,质量合格。

1.4 PCR扩增与高通量测序

细菌16S rRNA基因V₃~V₄片段的扩增引物为341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'),应用Illumina MiSeq测序平台完成序列测序。

1.5 数据分析

采用Usearch软件,以97%阈值开展OTU(Optical Transform Unit)操作分类单元聚类(Blaxter *et al.*, 2005)。选用RDP classifier软件(Wang *et al.*, 2007)进行物种分类操作,阈值设置为0.8,低于该阈值的分类结果被划归为Unclassified一类。利用Qiime软件(Caporaso *et al.*, 2010)进行多样性分析。基于OTU聚类和环境因子信息,利用R语言的Vegan package(Oksanen *et al.*, 2010)进行环境因子相关性分析。通过最大似然法构建进化树。根据物种分类结果得到不同水平上各Rank的丰度值,采用STAMP软件(版本2.1.3),比较样本之间丰度差异, P<0.05为差异显著,比较样本组间丰度差异。

2 结果与分析

2.1 环境因子监测

辽宁营口刺参养殖池塘不同季节沉积物环境因子监测数据如表1所示。根据中华人民共和国国家标准《海洋沉积物质量(GB 18668-2002)》,所有样品均

符合国家 I 类沉积物标准。所监测的环境因子理化指标, 均呈显著的季节性差异。其中, 总氮、氨氮、硝酸盐、总磷和硫化物含量均在夏季最高; TOC 含量在秋季最高, 春季最低。

2.2 高通量测序结果

不同季节刺参养殖池塘沉积物样品高通量测序结果见表 2, 从表 2 可以看出, 共得到原始序列

37690~87024 条, 有效序列 41562~79288 条, 聚类于 36980~3913 个 OTUs。样品测序覆盖率为 95.9%~99.6%, 表明测序结果可以真实反映样本信息。稀释曲线趋于平坦, 表示测序数据深度足够反映样品的多样性。

2.3 α 多样性分析

Chao1 和 Ace 指数常用于估算样品中菌群的丰

表 1 不同季节刺参养殖池塘沉积物环境因子

Tab.1 Environmental factors of sediment in *Apostichopus japonicus* culture pond in different seasons

环境因子 Environmental factor	季节 Season			
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
温度 Temperature(°C)	13.50±0.19 ^b	26.57±0.20 ^a	14.57±0.47 ^b	1.30±0.00 ^c
盐度 Salinity	30.40±0.00 ^a	28.30±0.00 ^b	27.70±0.00 ^c	27.30±0.00 ^d
酸碱度 pH	7.95±0.03 ^a	7.76±0.04 ^b	7.17±0.04 ^d	7.43±0.04 ^c
总氮 TN (mg/kg)	0.21±0.02 ^b	0.29±0.03 ^a	0.03±0.00 ^c	0.05±0.00 ^c
总磷 TP (mg/kg)	0.16±0.00 ^b	0.43±0.04 ^a	0.02±0.00 ^c	0.03±0.00 ^c
氨氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	9.45±0.20 ^b	19.96±1.44 ^a	4.29±0.15 ^c	18.86±1.48 ^a
硝酸氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	5.53±1.68 ^b	7.93±0.21 ^a	5.64±0.14 ^b	0.00±0.00 ^c
亚硝酸氮 NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0.77±0.41 ^a	0.17±0.00 ^b	0.13±0.00 ^b	0.16±0.00 ^b
磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	0.42±0.04 ^b	0.60±0.04 ^a	0.42±0.02 ^b	0.11±0.03 ^c
硫化物 Sulfide (mg/kg)	1.07±0.03 ^d	13.62±1.16 ^a	4.94±0.29 ^b	3.06±0.06 ^c
总有机碳 TOC (mg/kg)	0.44±0.02 ^d	4.00±0.06 ^c	7.34±0.28 ^a	5.23±0.62 ^b
氧化还原电位 ORP (mV)	-182±3 ^c	-222±4 ^a	-133±1 ^d	-168±5 ^b

注: 表中数据为平均值±标准差; 同列数值后不同字母表示差异显著

Note: Data are Mean±SD; Values followed by different letters within the same column are significantly different at 5% level

表 2 高通量测序结果

Tab.2 Results of high-throughput sequencing

样品号 Sample	原始序列 Original sequence	质量控后序列 Quality control sequence	非靶区序列 Not target sequence	嵌合体序列 Chimeric sequence	有效序列 Effective sequence
Spr-YK1	51618	51584	31	5928	41562
Spr-YK2	56702	56674	20	1722	51488
Spr-YK3	41725	41677	13	620	41044
Sum-YK1	39161	38889	26	1081	37782
Sum-YK2	37690	37558	12	566	36980
Sum-YK3	47161	46974	8	633	46333
Aut-YK1	79478	79431	56	1937	77438
Aut-YK2	87024	86978	67	7623	79288
Aut-YK3	79852	79794	54	1123	69617
Win-YK1	40346	40300	94	338	39868
Win-YK2	42720	42694	8	484	42202
Win-YK3	44896	44836	11	355	44470

注: YK 代表营口沉积物样品, 前缀英文缩写分别代表春、夏、秋和冬季。下同

Note: YK stands for sediment samples of Yingkou. The prefix abbreviation stands for spring, summer, autumn and winter, respectively. The same as below

度; Shannon 和 Simpson 指数常用于估算样品中菌群的多样性。

比较不同季节 α 多样性指数得出(图 1), 营口地区刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性具有显著性季节差异。其中, 夏季菌群丰度和多样性显著升高; 其他季节菌群丰度和多样性均有不同程度的下降, 具体表现为秋冬两季菌群丰度极显著性下降($P<0.01$), 且冬季菌群物种丰度达四季最低。

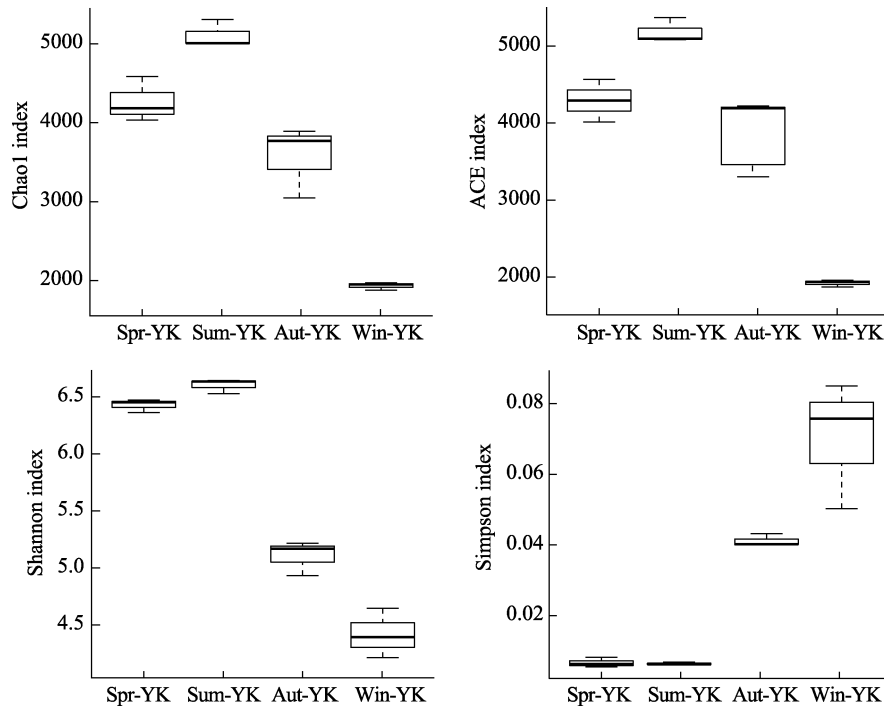


图 1 α 多样性指数

Fig.1 Alpha diversity index

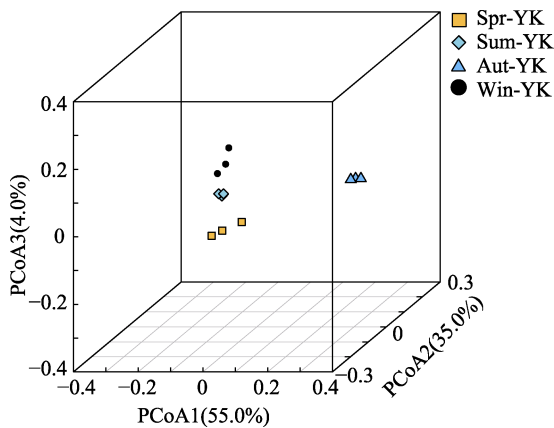


图 2 PCoA 三维分析

Fig.2 PCoA three-dimensional analysis

2.5 菌群结构特征

基于 GraPhlAn 分类和系统发育信息可视化图

2.4 β 多样性分析

在 OTU 水平上, 根据加权 Unifrac 距离对不同季节样本进行三维主坐标分析(图 2)。其中, PCoA1 (Principal Co-ordinates analysis)的贡献率为 55%, PCoA2 的贡献率为 35%, PCoA3 的贡献率为 4%, 总贡献率为 94%。同一季节样品均聚集在一起, 显示出较好的生物学重复性。不同季节相比较, 秋季与其他季节沉积物菌群结构具有显著差异($P<0.05$)。

(图 3)可以看出, 不同季节刺参养殖池塘沉积物第一优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria)(相对丰度>43.19%), 次优势菌门存在显著差异。其中, 绿弯菌门(Chloroflexi)(相对丰度>7%)为春季次优势菌门; 拟杆菌门(Bacteroidetes)(相对丰度>8.13%)为夏季次优势菌门, 厚壁菌门(Firmicutes)(相对丰度>17.96%)为秋、冬季次优势菌门。

菌属水平下, 优势菌属呈现出显著的季节性差异($P<0.05$)。其中, 春季优势菌主要隶属于 *Sulfurovum*、*Thiopfundum*、除硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)、*Desulfosarcina* 和 *Desulfopila*。夏季优势菌属主要隶属于 *Sulfurovum*、*Halioglobus*、*Haliae*、*Thiopfundum*、*Desulfuromonas*、*Desulfopila* 和 *Desulfobulbus*。秋季优势菌主要隶属于 *Sulfurovum*、*Desulfuromonas*、*Desulfuromusa*、*Desulfosarcina*、*Desulfopila* 和海杆菌

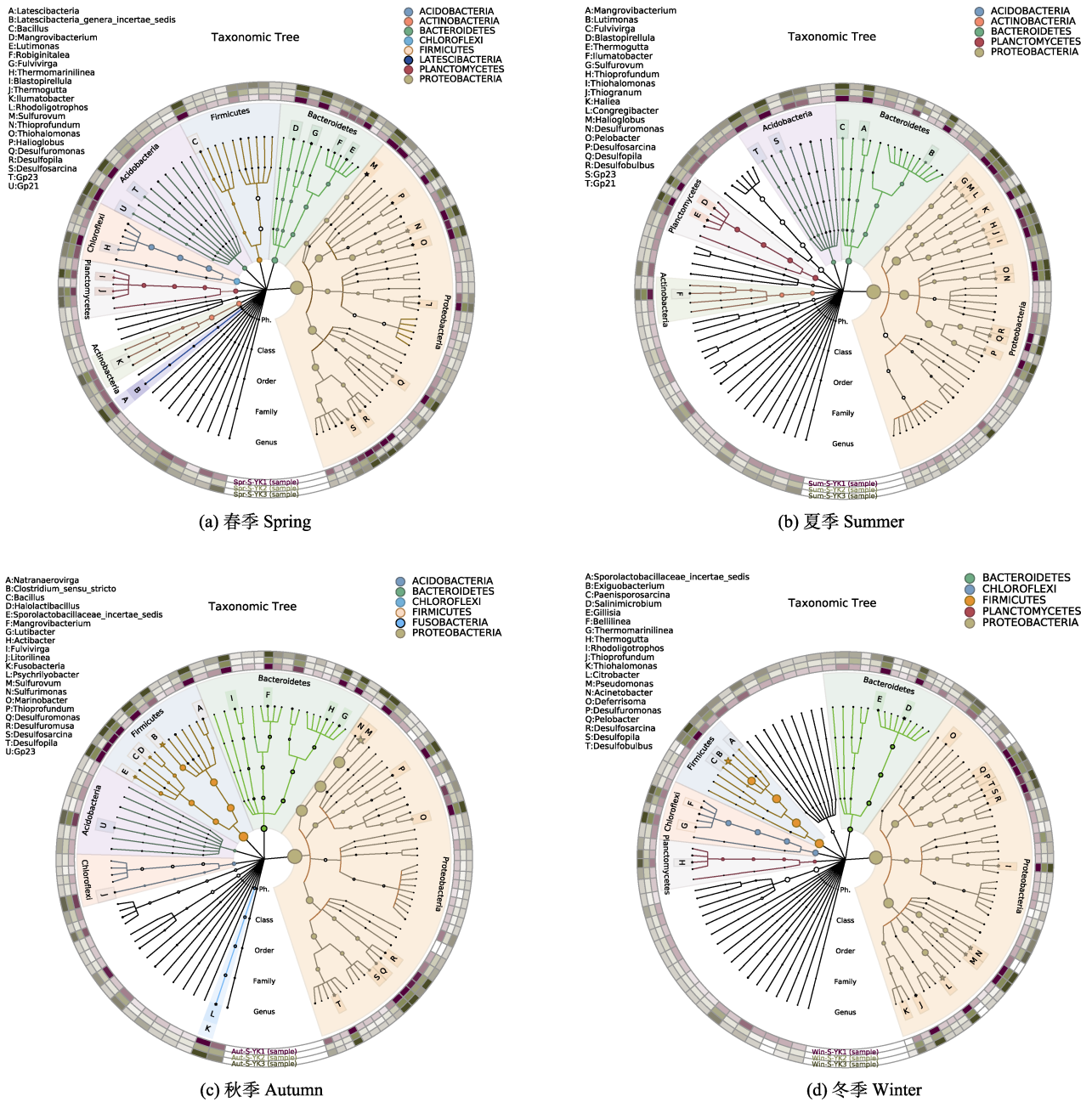


图 3 不同季节沉积物菌群相对丰度
Fig.3 Relative abundance of sediment bacterial community in different seasons

图中是丰度前 100 个物种的进化分类树，并将丰度前 20 个物种所对应的门按不同颜色标出，圈的大小代表丰度大小。外围为热力图，每个环为一个样本，每个样本对应一种颜色，颜色深浅随物种丰度变化

The top 100 species were classified into taxonomic trees, and the top 20 phyla were marked with different colors, and the size of the circle represented the abundance. Each ring is a sample, and each sample corresponds to a color. The color depth varies with species richness

属(*Marinobacter*)。冬季优势菌主要隶属于柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Desulfuromonas*、*Pelobacter*、*Desulfosarcina*、*Desulfopila*、*Desulfobulbus*、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和 *Exiguobacterium*。春、夏、秋、冬 4 季沉积物优势菌属均包含脱硫八叠菌 *Desulfosarcina*、*Desulfuromonas* 和 *Desulfopila*。

LEfSe (LDA Effect Size) 差异性分析结果显示 (图 4), 共有不同分类水平的 98 个细菌类群在 4 个季节中存在显著差异。其中, 变形菌门在 4 个季节中都存在差异菌群, 如柠檬酸杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属是隶属于春季的差异菌属; 外硫红螺旋菌科 (*Ectothiorhodospiraceae*)、交替单胞菌目 (*Alteromonadales*)

是隶属于夏季的差异菌目；弯曲菌目 (Campylobacterales)、*Sulfurovum* 是隶属于秋季的差异菌；着色菌目 Chromatiales、*Thiohalomonas* 是隶属于冬季的差异菌目。此外，春季刺参养殖池塘沉积物差异菌门主要隶属于拟杆菌门(Bacteroides)和酸杆菌门 (Acidobacteria),其代表性差异菌属分别为 *Cytophagla* 和 *Gp21*。夏季沉积物差异菌门主要隶属于酸杆菌门、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 和浮霉菌门 (Planctomycetes), 分别以 *Gp23*、疣微菌科 (*Verrucomicrobiaceae*)和浮霉菌科(Planctomycetaceae)为代表。秋季沉积物差异菌门隶属于拟杆菌门和厚壁

菌门,其代表性差异菌属为 *Mangrovibacterium* 和 *Natranaerovirga*。冬季沉积物差异菌门则隶属于放线菌门(Actinobacteria)以 *Actinomycetales* 为代表。

2.6 菌群结构与环境因子相关性分析

RDA 是将对应分析与多元回归分析混合的一种分析方法。营口地区刺参养殖池塘沉积物菌群与环境因子 RDA(Redundancy Analysis)分析结果显示(图 5), 春季和夏季在第 2 象限中基本处于同一位置,显示影响春夏两季沉积物菌群结构的环境因子相似。根据环境因子与原点的连线长度可知,温度、TN、pH 和

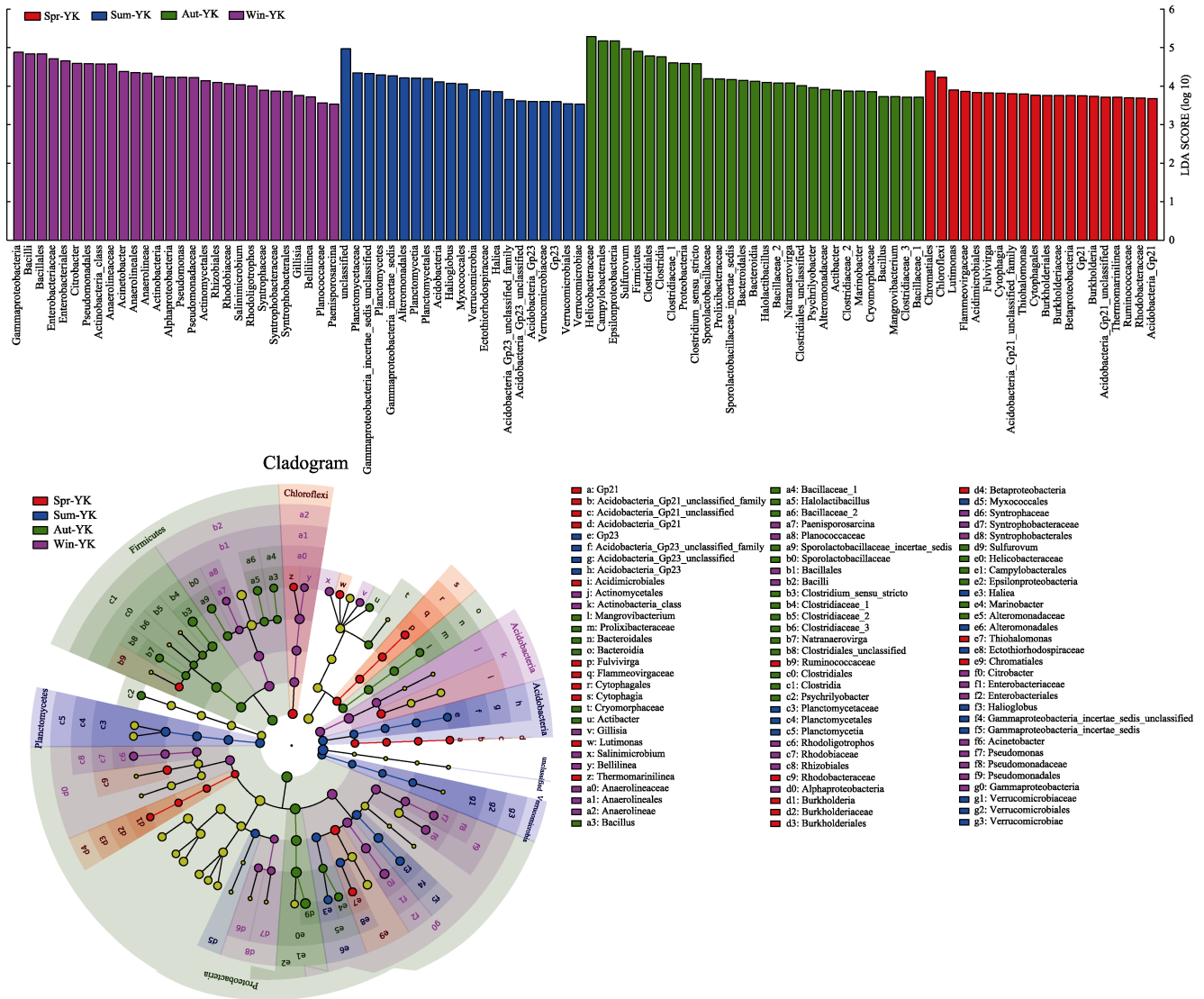


图 4 不同季节沉积物菌群 LefSe 分析

Fig.4 LefSe analysis of sediment bacterial community in different seasons

图中不同颜色代表不同分组, 树枝中不同颜色节点表示在该颜色对应分组中起到重要作用的微生物类群。

黄色节点表示未起到重要作用的微生物类群。图中英文字母表示的物种名称在右侧图例中进行展示

Different colors represent different groups, and different color nodes in the tree represent the microbial groups that play an important role in the corresponding color groups. The Yellow nodes indicate microbial groups that do not play an important role. The species names in English letters are shown in the legend on the right

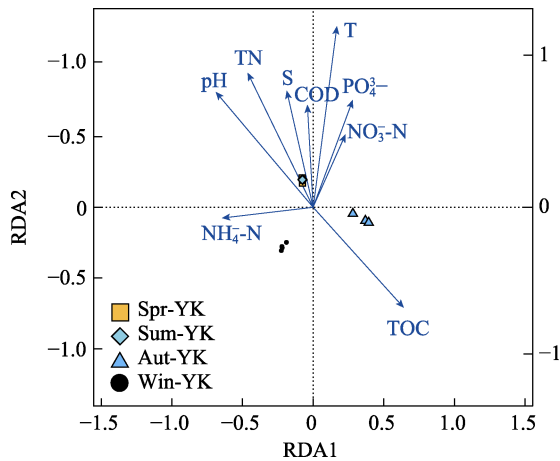


图 5 沉积物菌群与环境因子 RDA 分析
Fig.5 RDA analysis of sediment bacterial community and environmental factors

TOC 是营口刺参养殖池塘沉积物菌群的主导环境因子。其中, 温度、TN、pH 与春、夏季刺参养殖池塘沉积物菌群相对丰度呈正相关, 与秋、冬季菌群相对丰度呈负相关; TOC 与秋、冬季刺参养殖池塘沉积物菌群相对丰度呈正相关, 与春、夏季菌群相对丰度呈负相关。

不同季节刺参养殖池塘沉积物差异菌群与主导环境因子相关性分析结果见表 3。其中, 拟杆菌门与 TOC 含量呈极显著负相关($P<0.01$), 表明拟杆菌门受沉积物有机物质含量影响显著。酸杆菌门与 pH 和 TN 呈极显著正相关($P<0.01$)。疣微菌门和浮霉菌门与 TN 含量呈极显著正相关($P<0.01$)。厚壁菌门与 TN 呈极显著负相关($P<0.01$), 与 TOC 含量呈极显著正相关($P<0.01$)。放线菌门则与 pH 和 TOC 呈显著相关性($P<0.05$)。

表 3 沉积物优势菌群与主导环境因子相关性分析

Tab.3 Correlation analysis between dominant bacterial community and environment factors in sediment

优势菌群 Dominant bacterial community	环境因子 Environment factors			
	温度 Temperature	总氮 TN	pH	总有机碳 TOC
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.652*	0.331	0.189	-0.940**
酸杆菌门 Acidobacteria	-0.762**	0.962**	0.934**	-0.818**
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.748**	0.967**	0.746	-0.566
浮霉菌门 Planctomycetes	0.723**	0.904**	0.782	-0.630*
厚壁菌门 Firmicutes	-0.809*	-0.971**	-0.861	0.710*
放线菌门 Actinobacteria	-0.745*	0.284	0.577	-0.606*

注: 同列中标有**表示差异极显著($P<0.01$); *表示差异显著($0.01<P<0.05$); 无标注则为不显著($P>0.05$)

Note: Data in the same column marked with ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), * indicates significant difference ($0.01<P<0.05$), no mark indicates no significant difference ($P>0.05$)

3 讨论

3.1 不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群多样性

微生物是养殖池塘生态系统的重要组成部分, 在生态系统物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用, 对维持生态系统平衡具有重要意义(Rungrassamee *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2016; 金笑等, 2017)。本研究结果显示, 营口地区不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性呈现出显著的季节演替特征。其中, 夏季刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性最高, 冬季沉积物菌群丰度和多样性则最低。已有的研究表明, 温度是影响环境微生物生命活动的重要因素之一, 高温通过加速细菌体内酶活性, 促进微生物代谢, 加速有机物分解, 为微生物生长繁殖提供有利条件(李彬等, 2010; Cardona *et al.*, 2016)。同时, 氮、磷等营养物质的增多, 也为细菌生长创造了适宜的条件, 使菌群丰度和多样性更丰富(董学兴等, 2019)。营口

地区夏季刺参养殖池塘水环境温度和氮磷含量相对较高, 为沉积物中微生物的繁殖提供了良好的生存环境, 因此, 夏季沉积物菌群丰度和多样性显著高于其他季节。

3.2 不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构及其影响因素

本研究中, 不同季节营口地区刺参养殖池塘沉积物第 1 优势菌门均为变形菌门, 与已有的研究报道一致(窦妍等, 2014、2016; 丁斯予等, 2019)。变形菌门作为养殖池塘环境中的第 1 优势菌门, 主要是由其在原核生物分子生物学分类中的绝对优势所决定的(Gupta *et al.*, 2000)。变形菌门下多个细菌群类均为池塘底栖环境中常见的固氮菌, 参与池塘生态系统氮循环, 在池塘养殖生态系统中占据着重要的生态学地位(刘思亮等, 2002; 龚骏等, 2010)。刺参养殖池塘沉积物除变形菌门为第 1 优势菌门外, 其他优势菌门为拟

杆菌门、酸杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门等,与营底栖生活的缢蛏(*Sinonovacula constricta*)相近(王毅鑫等, 2019),与杂食性的罗非鱼池塘沉积物菌群差别较大(史丽娜等, 2015)。养殖品种食性的差异会导致饲料投入不同,造成池塘沉积物中有机物和营养盐浓度产生差异。除饲料不同之外,刺参的摄食方式为吞食沉积物,造成沉积物菌群结构发生一定改变(于东祥, 2010)。因此,刺参养殖池塘沉积物菌群结构具有特异性。

比较不同季节刺参养殖池塘沉积物菌群结构特征的结果显示,刺参养殖池塘沉积物菌群存在显著的季节性差异,特异性菌群相对丰度与其生境因子之间存在显著性相关,影响沉积物菌群的主导环境因子为温度、TOC、TN 和 pH,且所有主导环境因子均呈现出显著的地域差异。已有的研究表明,微生物生长繁殖所需的营养物质主要依靠环境中的无机盐和有机物,其群落组成对环境因子变化有着较强的敏感性(王轶南等, 2010; Bell *et al.*, 2013; 李建光等, 2014; Yang *et al.*, 2015; Amabebe *et al.*, 2020)。微生物菌群特征是其生境的反映,与环境理化性质密切相关且相互限制影响(闫法军等, 2014)。其中,春季刺参养殖池塘沉积物特异性菌群主要以拟杆菌门为代表。拟杆菌门细菌与微生物蛋白质和脂类等有机物的转化密切相关(Ren *et al.*, 2015),是维持环境碳循环的主要动力,且与春季沉积物环境中 TOC 含量显著性相关。夏季沉积物特异性菌群以酸杆菌门、疣微菌门和浮霉菌门为代表。夏季随着温度的升高,养殖生物代谢加快,排泄物增多,易导致硫、铁等元素在池底大量堆积,使养殖池塘底部沉积物 pH 下降,为具有嗜酸特性的酸杆菌门繁殖提供了有利条件(Barns *et al.*, 2007; 刘彩霞等, 2016)。此外,夏季沉积物中含氮物质的增高会造成水体富营养化,导致蓝藻暴发,也会对水生生物的生长产生不良影响(付莹等, 2018)。然而,疣微菌门细菌的存在可以有效利用夏季沉积物环境中的氮元素,加速氮循环进程(Shen *et al.*, 2017)。夏季沉积环境中高含量的氮和硫,则有利于浮霉菌门细菌的生长繁殖(黄佩蓓等, 2014)。厚壁菌门细菌能够有效利用环境中硝酸盐和亚硝酸盐,进而降低沉积物中的氮含量,作为秋季特异性菌群,与其沉积物中较低的氮含量呈现出一致性。冬季随着气温的下降,沉积物中微生物丰度和多样性均受到不同程度的抑制,而放线菌门细菌因能形成抗逆性极强的芽孢,从而具有极强的环境适应性(王蓉等, 2013),成为冬季沉积物特异性菌群。此外,放线菌门具有降解淀粉、蛋白等大分子的功能,产生的抗菌素类物质能抑制环境中其

他革兰氏阳性细菌发挥作用,有成为益生菌的潜力(李文均等, 2002)。

值得注意的是,夏季刺参养殖池塘沉积物中厚壁菌门相对丰度极显著低于其他季节,相对丰度仅为 0.5%。而隶属于厚壁菌门、芽孢杆菌目(Bacillales)的芽孢杆菌属是典型的益生菌,被广泛用于水产养殖池塘环境微生态调控(杜佗等, 2017)。芽孢杆菌可以产生多种消化酶和营养物质,供养殖动物吸收利用,还可以通过改善水产动物体内微生态环境进而提高动物机体免疫力,同时,具有净化水质和清除自由基的功效(苏艳莉等, 2016)。因此,建议在夏季池塘中添加适当含量的芽孢杆菌,用于协助刺参安全度夏。

4 结 论

本研究结果表明,营口地区刺参养殖池塘沉积物菌群丰度和多样性存在显著性季节变化特征,温度、总有机碳、总氮和 pH 是影响沉积物菌群的主要环境因子。本研究初步探明沉积物菌群与主导环境因子间的相关性,而菌群与环境因子间的互作机制还有待于进一步深入探究。

参 考 文 献

- Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, *et al.* Microbial dysbiosis-induced obesity role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *British Journal of Nutrition*, 2020, 123(10): 1–23
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, *et al.* *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3113–3116
- Becker P, Gillanb D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, 2004, 242(1): 13–30
- Bell TH, Yergeau E, Maynard C, *et al.* Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(6): 1200–1210
- Bentzon-Tilia M, Sonnenschein EC, Gram L. Monitoring and managing microbes in aquaculture-towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(5): 576–584
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, *et al.* Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2005, 360(1462): 1935–1943
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336

- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 157
- Chang YQ, Sui XL, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 198–201 [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增殖养殖现状、存在问题和展望. *水产科学*, 2006, 25(4): 198–201]
- Ding SY, Wang L, Xu HC, *et al.* Bacterial community structure and function in the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 210–220 [丁斯予, 王萃, 徐翰晨, 等. 刺参肠道及养殖环境菌群结构与功能. *生态学杂志*, 2019, 38(1): 210–220]
- Dong SL. On ecological intensification of aquaculture systems in China. *Chinese Fisheries Economics*, 2015, 33(5): 4–9 [董双林. 论我国水产养殖业生态集约化发展. *中国渔业经济*, 2015, 33(5): 4–9]
- Dong XX, Lü LL, Zhao WH, *et al.* Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 501–510 [董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 501–510]
- Dou Y, Ding J, Wang YN, *et al.* Flora diversity in intestine and culture ponds in sea cucumber *Apostichopus japonicus* in Yellow Sea and Bohai in spring. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 572–576 [窦妍, 丁君, 王轶南, 等. 黄、渤海春季刺参肠道及养殖池塘细菌菌群的多样性. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(6): 572–576]
- Dou Y, Zhao XW, Ding J, *et al.* Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 122–129]
- Du T, Li B, Wang YG, *et al.* Screening and characteristic analysis of potential probiotics from large water ponds used for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 180–187 [杜佗, 李彬, 王印庚, 等. 刺参大面积养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特征分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 180–187]
- Edwards KJ, Rogers DR, Wirsén CO, *et al.* Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic α - and γ -Proteobacteria from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2906–2913
- Emerson D, Weiss JV. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: Findings from the field and the laboratory. *Geomicrobiology Journal*, 2004, 21(6): 405–414
- Fu Y, Zhao YR. A review: Toxicity of ammonia and detoxification of ammonia in fish. *Chinese Journal Fisheries*, 2018, 31(3): 49–54 [付莹, 赵玉蓉. 氨氮对鱼类的毒性及鱼类应对氨氮毒性的策略. *水产学杂志*, 2018, 31(3): 49–54]
- Gao F, Sun HL, Xu Q, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the gut contents of *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 55–64 [高菲, 孙慧玲, 许强, 等. 刺参消化道内含物细菌群落组成的PCR-DGGE分析. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 55–64]
- Gong J, Song YT, Zhang XL. Phylogenetic and function diversity of nitrogen cycling microbes in coastal sediments. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 433–444 [龚骏, 宋延静, 张晓黎. 海岸带沉积物中氮循环功能微生物多样性. *生物多样性*, 2013, 21(4): 433–444]
- Gupta RS. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 367–402
- Huang PB, Jiao NZ, Feng J, *et al.* Research progress on Planctomycetes' diversity and ecological function in marine environments. *Microbiology China*, 2014, 41(9): 1891–1902 [黄佩蓓, 焦念志, 冯洁, 等. 海洋浮霉状菌多样性与生态学功能研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(9): 1891–1902]
- Jin X, Kou WB, Yu HT, *et al.* Environmental factors influencing the spatial distribution of sediment bacterial community structure and function in Panyang Lake. *Research of Environment Sciences*, 2017, 30(4): 529–536 [金笑, 寇文伯, 于昊天, 等. 潘阳湖不同区域沉积物细菌群落结构、功能变化及其与环境因子的关系. *环境科学研究*, 2017, 30(4): 529–536]
- Li B, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter. *Marine Science*, 2010, 34(4): 64–69 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究. *海洋科学*, 2010, 34(4): 64–69]
- Li JG, Xu YP, Li XY, *et al.* Characterization of bacterial communities associated with the intestinal tracts and culture environment of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different culture seasons. *Fisheries Science*, 2014, 33(9): 562–568 [李建光, 徐永平, 李晓宇, 等. 不同养殖季节仿刺参肠道与养殖环境中菌群结构的特点. *水产科学*, 2014, 33(9): 562–568]
- Li WJ, Zhang ZZ, Jiang CL. The advance on taxonomic of genus *Thermoactinomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 759–763 [李文均, 张忠泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展. *微生物学报*, 2002, 42(6): 759–763]
- Liu CX, Dong YH, Jiao RZ. Research progress in Acidobacteria diversity in forest soil. *World Forestry Research*, 2016(6): 17–22 [刘彩霞, 董玉红, 焦如珍. 森林土壤中酸杆菌门多样性研究进展. *世界林业研究*, 2016(6): 17–22]
- Liu SL, Liu CQ, Xiao HY. Microbial effect on nitrogen cycle and nitrogen isotope fractionation on the earth's surface: A review. *Geology Geochemistry*, 2002, 30(4): 40–45 [刘思亮,

- 刘丛强, 肖华云. 地表环境氮循环过程中微生物作用及同位素分馏研究综述. 地质地球化学, 2002, 30(4): 40–45]
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, *et al.* Vegan: Community ecology package. R package version 1.18-2. Time International, 2010, 1997(6): 15–17
- Pokorna D, Zabranska J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1246–1529
- Ren G, Ren W, Ying T, *et al.* Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(22): 1–11
- Rungrasamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, *et al.* Bacterial dynamics in intestines of black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 133: 12–19
- Shen CC, Ge Y, Yang T, *et al.* Verrucomicrobial elevational distribution was strongly influenced by soil pH and carbon/nitrogen ratio. Journal of Soils and Sediments, 2017, 17(10): 2449–2456
- Shi LN, Ke XL, Liu ZG, *et al.* Effect of *Houttuynia cordata* floating-bed on the structure and function of bacterial community in the sediments of tilapia aquaculture system. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(14): 64–73 [史丽娜, 可小丽, 刘志刚, 等. 罗非鱼-鱼腥草共生养殖池塘沉积物菌群结构与功能特征. 中国农学通报, 2015, 31(14): 64–73]
- Su YL, Sun SM, Zhu J, *et al.* Advances of *Bacillus subtilis* application in aquaculture. Chinese Fishery Quality and Standards, 2016, 6(6): 32–39 [苏艳莉, 孙盛明, 朱健, 等. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的研究进展. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(6): 32–39]
- Sun YK. The screen of the functional microbial strains and the study on activities of microbial combination communities. Master's Thesis of Tianjin University, 2006 [孙亚凯. 功能性微生物菌株的筛选及组合菌群活性研究. 天津大学硕士学位论文, 2006]
- Sunde M, Sorum H. Self-transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine. Microbial Drug Resistance, 2001, 7(2): 191–196
- Suzuki S, Nakanishi S, Tamminen M, *et al.* Occurrence of *sul* and *tet* (M) genes in bacterial community in Japanese marine aquaculture environment throughout the year: Profile comparison with Taiwanese and Finnish aquaculture waters. Science of the Total Environment, 2019, 669: 649–656
- Wang J. Illumina MiSeq sequencing analyzes microbial community structure in several culture models. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [王姣. 高通量测序技术分析两种养殖模式水环境菌群结构. 上海海洋大学硕士学位论文, 2016]
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261–5267
- Wang R, He XN, Liu W, *et al.* Potential use of marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(24): 10007–10009 [王蓉, 何晓娜, 刘维, 等. 海洋放线菌作为益生菌在水产养殖中的潜在应用. 安徽农业科学, 2013, 41(24): 10007–10009]
- Wang XY, Xie X, Jin S, *et al.* Seasonal variation of microflora in *Sinonovacula constricta* and its aquaculture pond based on high-throughput sequencing. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(12): 4267–4276 [王鑫毅, 谢晓, 金珊, 等. 基于高通量测序的缢蛏及其养殖池塘菌群结构的季节变化. 应用生态学报, 2019, 30(12): 4267–4276]
- Wang YG, Rong XJ, Zhang CY, *et al.* Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: Prevention and treatment. Marine Science, 2005, 29(3): 1–7
- Wang YN, Zhu SW, Chang YQ, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(3): 119–122 [王轶南, 朱世伟, 常亚青, 等. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 119–122]
- Xiao JJ, Guo P, Huo WJ, *et al.* Application of denitrifying microbes to wastewater denitrification. Environmental Science and Technology, 2009, 32(12): 97–102 [肖晶晶, 郭萍, 霍炜洁, 等. 反硝化微生物在污水脱氮中的研究及应用进展. 环境科学与技术, 2009, 32(12): 97–102]
- Xiong JB, Dai WF, Li CH. Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: The guidelines from an ecological perspective. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(16): 6947–6954
- Yan FJ, Tian XL, Dong SL, *et al.* Seasonal variation of functional diversity of aquatic microbial community in *Apostichopus japonicus* culture pond. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(5): 1499–1505 [闫法军, 田相利, 董双林, 等. 刺参养殖池塘水体微生物群落功能多样性的季节变化. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1499–1505]
- Yang Y, Wang Z, He T, *et al.* Sediment bacterial communities associated with anaerobic biodegradation of bisphenol A. Microbial Ecology, 2015, 70(1): 97–104
- Yu DX. Healthy culture technology of sea cucumber. Beijing: Ocean Press, 2010 [于东祥. 海参健康养殖技术. 北京: 海洋出版社, 2010]
- Zhou WH, Wang HK, Dong JD, *et al.* Review on marine carbon sink and development of carbon sink fisheries in South China Sea. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(6): 110–119 [周伟华, 王汉奎, 董俊德, 等. 海南岛三亚湾浮游植物和细菌生物量时空分布特征及环境制约因素研究. 海洋学报, 2007, 29(6): 110–119]

Environmental Factors Influence the Seasonal Characteristics of Bacterial Community in the Sediment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds

PEI Honglin, WANG Luo^①, TAN Bamei, LI Weijia, ZHEN Hao, DING Jun, CHANG Yaqing

(Dalian Ocean University, Agriculture Department Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Dalian 116023)

Abstract Microbial communities are an important part of aquaculture pond ecosystems and play an important role in the processes of nutrient cycling and energy flow. It is, thus, of great importance to explore the seasonal succession characteristics of bacterial communities and factors influencing them for the precise management of sea cucumber ponds. In this study, the bacterial community composition in the sediment of *Apostichopus japonicus* culture ponds in different seasons were analyzed by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis, and the factors influencing the bacterial community were identified. The results showed that the abundance and diversity of the bacteria community in the sediment of sea cucumber culture ponds in Yingkou were highest in summer, followed by spring, autumn, and winter seasons. Significant seasonal differences were observed in the specific bacterial communities of the sediment in different seasons. Among these, Bacteroides phylum was specifically associated with spring, Acidobacteria, Verrucomicrobia, and Planctomycetes were specific phyla observed in summer, Firmicutes was the specific phylum noted in autumn, and Actinobacteria was the specific phylum in winter. Although the proportion of the sediment bacterial community differed across seasons, the predominant phylum in the sediment was the Proteobacteria (relative abundance > 43.19%). The dominant environmental factors affecting the sediment bacterial community were temperature, total organic carbon, total nitrogen, and pH. These findings provide a theoretical reference for microecology regulation in sea cucumber culture ponds.

Key words *Apostichopus japonicus*; Culture pond; Sediment; High-throughput sequencing; Bacterial community

① Corresponding author: WANG Luo, E-mail: dlouwangluo@sina.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201216003

http://www.ykxjz.cn/

李彬, 王印庚, 廖梅杰, 张永刚, 荣小军, 王锦锦, 于永翔, 张正, 宁鲁光. 刺参池塘养殖系统中 1 株副干酪乳杆菌的分离及其生物学特性研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 100-107
Li B, Wang YG, Liao MJ, Zhang YG, Rong XJ, Wang JJ, Yu YX, Zhang Z, Ning LG. Isolation and biological characterization of *Lactobacillus paracasei* isolated from a sea cucumber pond culture system. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 100-107

刺参池塘养殖系统中 1 株副干酪乳杆菌的分离及其生物学特性研究*



李彬¹ 王印庚^{1①} 廖梅杰¹ 张永刚¹ 荣小军¹
王锦锦¹ 于永翔¹ 张正¹ 宁鲁光²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 2. 山东海跃水产科技有限公司 东营 257500)

摘要 本研究利用 MRS 培养基, 从山东东营刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘环境中分离到 56 株乳酸菌。以刺参腐皮综合征 2 种重要致病菌灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为指示菌, 采用牛津杯法测定所分离的乳酸菌对 2 株致病菌的抑制效果, 筛选出 1 株具有较强抑菌活性的乳酸菌 CSND-6, 并对该细菌的形态、胞内产物和胞外产物的抑菌活性、生理生化实验、16S rDNA 序列分析、菌株生长特性及对刺参安全性进行了研究。结果显示, 菌株 CSND-6 对灿烂弧菌和假交替单胞菌的生长具有较好的抑制作用。其中, 胞内产物的抑菌圈分别为 17、22 mm, 胞外产物的抑菌圈分别为 25、31 mm。该菌株对刺参的高浓度浸浴胁迫实验结果表明, 所分离的菌株对刺参是安全的。通过生理生化和 16S rDNA 序列分析表明, CSND-6 属于乳杆菌科(Lactobacillaceae), 与副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei* JCM1171)的相似性为 99.83%。菌株 CSND-6 在 30℃~44℃、pH 为 6~8 范围内生长较快, 24 h 后进入对数生长期, 28~32 h 时达到生长高峰, 最高值达 2.10×10^9 CFU/ml。本研究筛选的副干酪乳杆菌属于刺参池塘养殖环境中土著益生菌, 对刺参的主要病原菌抑制效果较好, 并表现出了较好的生长特性, 可为养殖池塘刺参疾病的生态防控和乳酸菌开发提供参考。

关键词 刺参; 腐皮综合征; 副干酪乳杆菌; 池塘养殖

中图分类号 S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0100-08

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又称刺参, 是池塘或浅海中增养殖的重要海洋经济动物。近年来, 随着养殖环境的恶化和养殖产业规模的迅速扩大, 病害

频发问题已成为产业可持续发展的瓶颈因子之一。对刺参病害的研究显示, 腐皮综合征是刺参育苗和养殖过程中的最主要病害。病原学研究表明, 细菌性病原

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901603)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2021ZX01; 2020TD40)和威海市海洋经济创新发展示范城市产业链协同创新类项目(2013ZHGX2A0801)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901603), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021ZX01; 2020TD40), and Industrial Chain Collaborative Innovation Project for Marine Economic Innovation and Development Demonstration in Weihai (2013ZHGX2A0801)]. 李彬, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-12-16, 收修改稿日期: 2021-01-14

如灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)(张春云等, 2006)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)(王印庚等, 2006)是该疾病的重要致病原。池塘养殖是刺参养殖的最主要养殖模式, 由于刺参养殖池塘面积较大, 使用药物进行病害防控的可操作性受限制, 利用微生物制剂进行池塘水环境和刺参生理状态调控是防控池塘养殖刺参腐皮综合征的重要途径。

乳酸菌制剂是一类不运动、无芽孢、产生大量乳酸的天然活性生态制剂, 能粘附于肠黏膜、改善肠道菌群、增强免疫, 并抑制病原菌在肠道的定殖, 降解水体中的氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)、亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)等有害物质, 具有作为益生菌的巨大潜力, 是近年来养殖动物疾病生态防控应用热点(Cavalcante *et al*, 2020; Wang *et al*, 2015; Zhao *et al*, 2016; Peng *et al*, 2020)。乳酸菌在畜牧生产中应用较为成熟, 但在水产养殖中的应用尚处在探索阶段。目前, 相关研究初步揭示了乳酸菌对养殖动物的增重率、免疫力以及水质的影响。Li等(2018)将植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)添加到刺参饲料中, 对刺参生长及免疫均具有良好的促进作用, 林艾影等(2020)研究表明, 乳酸菌能显著提高军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼增重率、特定生长率以及淀粉酶、胰蛋白酶、脂肪酶的活性; 王国霞等(2010)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)饲料中添加乳酸菌, 可提高溶菌酶和血清过氧化氢酶的活性, 然而, 关于乳酸菌对刺参病害防控的研究鲜有报道。目前, 市场上的乳杆菌产品多为从其他区域或物种分离获得, 从微生物制剂生态安全性的角度来看, 自养殖动物本身或生长环境中筛选土著菌, 开发土著菌的应用潜能, 具有更好的环境适用性和更高的使用安全性。鉴于此, 本研究从山东东营地区刺参池塘环境中筛选对刺参安全的土著乳酸菌并开展其生长特性评价, 以期对刺参池塘病害生态防控提供应用参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 养殖池塘选择 选取位于山东省东营市海跃水产科技有限公司池塘培育的大规格刺参苗种, 池塘面积约为 4 hm^2 , 水深为 $1.5\sim 2 \text{ m}$, 池塘附着基由遮阴网搭建而成, 该池塘为使用 1.5 年的池塘, 投苗规格为 $1\sim 2 \text{ g/头}$, 苗种投放密度为 2 万头/亩, 春、秋季苗种摄食旺盛期投饵, 饵料成分为鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、海带(*Laminaria japonica*)等藻粉。

1.1.2 样品的采集 2018 年 10 月采集底泥样本。采样时, 养殖池水温度为 20°C , 盐度为 29; 采集地点选择在养殖池中央池底, 使用采集器采集池底沉积物, 选取表层为 5 cm 的上层底泥为测试样本, 样本采集后于 4°C 保存, 低温运回实验室。

1.1.3 培养基 LB 培养基: 蛋白胨 5.0 g , 酵母提取物 2.5 g , 氯化钠 5.0 g , 加蒸馏水定容至 1000 ml 。

MRS 固体培养基: 蛋白胨 10.0 g , 牛肉浸粉 5.0 g , 酵母浸粉 4.0 g , 葡萄糖 20.0 g , 磷酸氢二钾 2.0 g , 柠檬酸三铵 2.0 g , 醋酸钠 5.0 g , 磷酸镁 0.2 g , 硫酸锰 0.05 g , 琼脂 15.0 g , 吐温 80 1.0 g , 加蒸馏水定容至 1000 ml 。

MRS 液体培养基: 配方同 MRS 固体培养基, 不加琼脂。

1.1.4 拮抗指示用病原菌 刺参腐皮综合征的 2 株重要的细菌性致病原——灿烂弧菌和假交替单胞菌为本实验室保存的分离自患病刺参的病原菌。

1.1.5 安全性评价用刺参苗种 安全性评价实验所用健康刺参购自东营市海跃水产科技有限公司, 苗种平均规格为 $(22.67\pm 2.56) \text{ g/头}$ 。运抵实验室后暂养 7 d, 用于后续实验。暂养条件: 水温为 16°C , 盐度为 28, pH 为 7.9。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的培养与分离 将采集的底泥样本加入 50 ml 1.5% 的灭菌 NaCl 溶液进行充分稀释溶解, 静置 20 min 后, 吸取上清液, 利用 1.5% 的灭菌 NaCl 溶液进行 10 倍梯度稀释后, 在 MRS 平板上进行涂布, 恒温培养箱进行细菌培养, 培养条件为 37°C , 倒置培养 $24\sim 48 \text{ h}$, 选取适宜稀释度的平板进行菌落计数, 单菌落分离、纯化和保种, 并对保种的菌落于 -80°C 保存。

1.2.2 拮抗菌的筛选 将活化的灿烂弧菌和假交替单胞菌涂布于牛津杯打孔的 LB 平板上, 向牛津杯小孔添加 $150 \mu\text{l}$ 浓度为 $1\times 10^8 \text{ CFU/ml}$ 培养的相应乳酸菌菌液, 37°C 培养 $24\sim 36 \text{ h}$, 测定牛津杯小孔的抑菌圈直径。选取对 2 株致病菌具有最佳抑菌效果的乳酸菌作为候选益生菌, 用于下一步实验。

1.2.3 所筛选乳酸菌产生的胞内产物及胞外产物抑菌效果

(1) 胞内产物及胞外产物的制备 对以 MRS 液体培养基扩大培养获得的候选益生菌培养液进行离心, 4500 r/min 离心 15 min , 采用直径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤上清液, 得到的过滤液即供试菌胞外产物; 离心获得的菌泥使用灭菌的 PBS 冲洗 3 次, 再用超声波方法进行破碎, 制备胞内产物。

(2)胞内产物及胞外产物抑菌效果比较 将活化的灿烂弧菌和假交替单胞菌涂布于牛津杯打孔的 LB 平板上,向牛津杯小孔添加 150 μl 制备的胞内产物和胞外产物,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~36 h,测定牛津杯小孔的抑菌圈直径。根据抑菌圈直径确定胞内产物及胞外产物对致病原的抑菌效果。

1.2.4 候选益生菌对刺参的安全性评价 将暂养稳定后的刺参苗种随机分到容积为 20 L 的 12 个实验水槽中,每个水槽放置 20 头苗种,实验分为 4 组,即 1 个对照组和 3 个实验组,每个组设 3 个平行。安全性实验采用浸浴的方式进行,候选益生菌的浸浴浓度分别设定为 1×10^7 、 1×10^8 和 1×10^9 CFU/ml,以不添加候选益生菌的 3 个水槽作为对照组。安全性实验周期为 30 d,日投饵量为刺参体重的 1%,每天投喂 1 次,水温为 16 $^{\circ}\text{C}$ ~18 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度为 29,每天换水量为 20%,换水后及时补充新培养的益生菌以维持相应的浸浴浓度。实验期间,每天记录刺参活动、摄食、吐脏及死亡情况。

1.2.5 菌株的生理生化鉴定 采用细菌微量生化鉴定管(青岛海博生物)对所筛选的菌株进行生理生化指标的测试。测试结果与《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等,2001)和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文等,1999)进行对比归类后判定菌株类型。

1.2.6 菌株的 16S rDNA 序列分析 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物)提取菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物扩增基因组 DNA,引物序列为 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'),扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后,送青岛擎科梓熙生物技术公司测序。测序结果通过 Blast 检索程序与 NCBI 基因库中相关序列进行比对,并利用 MEGA 6.0 软件构建该菌株的系统发育树。

1.2.7 菌株生长特性研究

(1)温度对菌株生长的影响 分别设定温度为 9 $^{\circ}\text{C}$ 、16 $^{\circ}\text{C}$ 、23 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、44 $^{\circ}\text{C}$ 、51 $^{\circ}\text{C}$ 和 58 $^{\circ}\text{C}$,将所筛选的菌株接种于 300 ml MRS 液体培养基中,置于设置了相应温度条件的细菌振荡培养箱中,180 r/min 恒温培养 24 h,对菌液中的培养细菌计数(刘宇等,2017),确定菌株的最适温度。

(2) pH 对菌株生长的影响 分别设定 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液将 MRS 液体培养基分别调至相应 pH 条件,所筛选的菌株接种于 300 ml 相应的 MRS 液体培养基中,180 r/min 恒温培养 24 h,对菌液中的培养细菌计数(周映华等,2015),确定菌株最适 pH。

(3)菌株生长曲线的绘制 依据上述实验确定菌株最适生长 pH 值和生长温度,将筛选的菌株接种于 300 ml 相应的 pH 条件的 MRS 液体培养基中,设定培养箱温度为最适生长温度,按照 180 r/min 的转速进行振荡培养 52 h。培养期间,每隔 4 h 取样 1 次,测定相应节点的细菌浓度并绘制该菌株的生长曲线。

2 结果

2.1 拮抗菌的筛选

本研究从山东东营刺参养殖池塘环境中分离获得 56 株乳酸菌,分别编号为 CSND-1、CSND-2、CSND-3、...CSND-56。通过对指示菌的拮抗实验,筛选出 1 株对灿烂弧菌和假交替单胞菌的生长具有良好抑制作用的乳酸菌 CSND-6(图 1)。该菌株的菌落表面光滑、边缘清晰、中央隆起,呈乳白色。革兰氏染色阳性,透射电镜观察表明,该菌呈短杆状,为 1.5~2.0 μm ,两端钝圆,无鞭毛,无芽孢(图 2)。

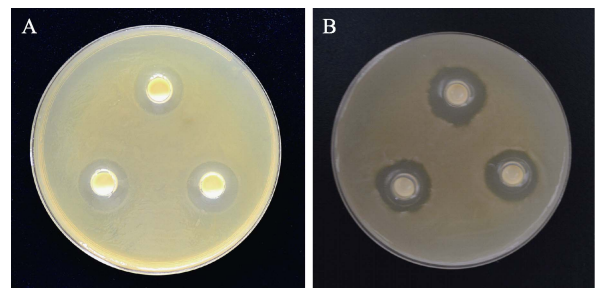


图 1 菌株 CSND-6 对刺参重要病原菌的抑制作用
Fig.1 The antagonistic activities of strain CSND-6 to main pathogens of sea cucumber

A 和 B 指示菌分别为灿烂弧菌和假交替单胞菌
A and B are *V. splendidus* and *P. nigrificiens*, respectively

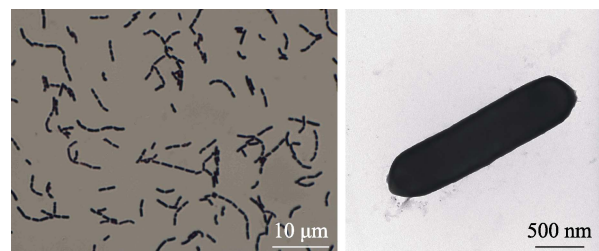


图 2 菌株 CSND-6 的革兰氏染色和透射电镜观察
Fig.2 Gram's staining and TEM photograph of the strain CSND-6

2.2 菌株胞内产物和胞外产物的抑菌效果比较

利用所筛选的 CSND-6 制备该菌株的胞内产物

和胞外产物,测定该菌株对灿烂弧菌和假交替单胞菌的抑菌圈大小见图 3 和表 1。从图 3 和表 1 可以看出,胞内产物对灿烂弧菌、假交替单胞菌的抑菌圈分别为

17、22 mm,胞外产物的抑菌圈分别为 25、31 mm,说明候选菌株 CSND-6 的胞内、胞外产物对指示菌的生长均具有较强的抑制作用。

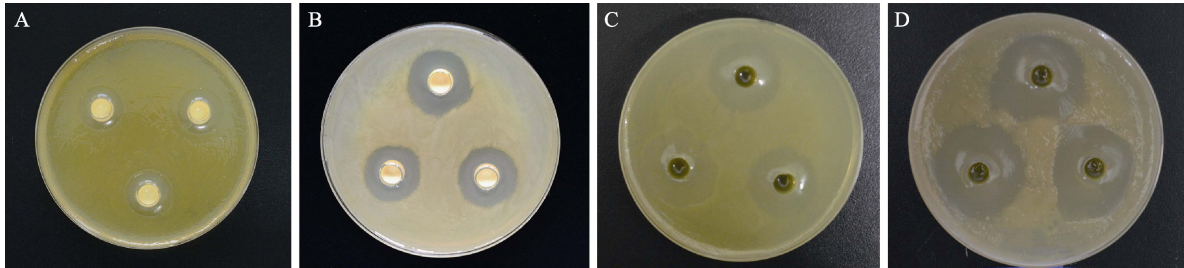


图 3 菌株 CSND-6 胞内及胞外产物对刺参重要病原菌的抑制作用

Fig.3 The antagonistic activities of intracellular products and extracellular products of strain CSND-6 to main pathogens of sea cucumber

A、B 分别为菌株 CSND-6 胞内产物对灿烂弧菌、假交替单胞菌的抑制作用

C、D 分别为菌株 CSND-6 胞外产物对灿烂弧菌、假交替单胞菌的抑制作用

A and B: Effects of antibacterial activity of intracellular products of CSND-6 to *V. splendidus* and *P. nasnigrificiens*, respectively
C and D: Effects of antibacterial activity of extracellular products of CSND-6 to *V. splendidus* and *P. nasnigrificiens*, respectively

表 1 菌株 CSND-6 胞内及胞外产物对刺参重要病原菌的抑制作用

Tab.1 The antagonistic activities of intracellular products and extracellular products of strain CSND-6 to main pathogens of sea cucumber

菌株名称 Strain name	胞内产物抑菌圈直径 Inhibition zone diameter of intracellular products (mm)		胞外产物抑菌圈直径 Inhibition zone diameter of extracellular products (mm)	
	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nasnigrificiens</i>	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nasnigrificiens</i>
	CSND-6	17	22	25

2.3 安全性实验

采用不同浓度的 CSND-6 菌液对刺参苗种的浸浴胁迫实验的安全性结果见表 2。从表 2 可以看出,浸浴浓度分别为 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 CFU/ml 的高浓度胁迫实验组,在整个实验过程中,刺参苗种活力良好,摄食正常,均未发现排脏、发病和死亡的现象,

表 2 菌株 CSND-6 的刺参的安全性实验

Tab.2 Safety testing of strain CSND-6 to sea cucumber *A. japonicus*

组别 Groups	浓度 Concentration (CFU/ml)	胁迫方式 Mode of coercion	排脏数量 (头) Evisceration number	死亡数量 (头) Dead number
CSND-6	1.0×10^7	浸浴	0	0
	1.0×10^8	Dipping bath	0	0
	1.0×10^9		0	0
对照组 Control	0	—	0	0

表明该 CSND-6 菌株对刺参苗种是安全的。

2.4 生理生化鉴定

对筛选的乳酸菌 CSND-6 进行生理生化检测,该菌在 3% NaCl 尿素酶、3% NaCl ONPG、苦杏仁苷、丙二酸盐条件下呈阳性,能利用葡萄糖、甘露醇、蔗糖、山梨醇;氧化酶反应呈阴性,该菌株不液化明胶,不产生 H_2S 气体。参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2011)和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文等, 1999),该菌株属乳杆菌科 (Lactobacillaceae)(表 3)。

2.5 菌株 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建

对菌株 CSND-6 16S rDNA 的相应序列进行扩增、测序获得该菌株的 16S rDNA 序列为 1414 bp。通过 Blast 检索程序与 NCBI 基因库中序列进行比对分析,并使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,结果见图 4。从图 4 可以看出,本研究分离获得的菌株 CSND-6 与副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*

表 3 菌株 CSND-6 的生理生化特征
Tab.3 Physiological and biochemical characteristics of strain CSND-6

生化项目 Biochemical items	CSND-6	生化项目 Biochemical items	CSND-6
无盐胰胨水 No salt tryptone water	-	鼠李糖 Rhamnose	-
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl Tryptone water	-	蜜二糖 Melibiose	-
6% NaCl 胰胨水 6% NaCl Tryptone water	-	3% NaCl ONPG	+
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl Tryptone water	-	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl Urease	+
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl Glucose	+	木糖 Xylose	-
3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl Hydrothion produce	-	3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl Ornithine decarboxylase	-
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl Mannitol	+	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl Lysine decarboxylase	-
3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabionse	-	3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl Arginine dihydrolase	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl Lactose	+	Kovacs 试剂 Kovacs reagent	-
山梨醇 Sorbitol	+	3% NaCl MR-VP	-
苦杏仁苷 Amygdalin	+	3% NaCl 明胶 3% NaCl Gelatine	-
肌醇 Inositol	-	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	-
丙二酸盐 Malonate	+	3% NaCl 蔗糖 3% NaCl Sucrose	+
氧化酶产生 Oxidase strips	-	半固体琼脂 Semi-solid agar	-

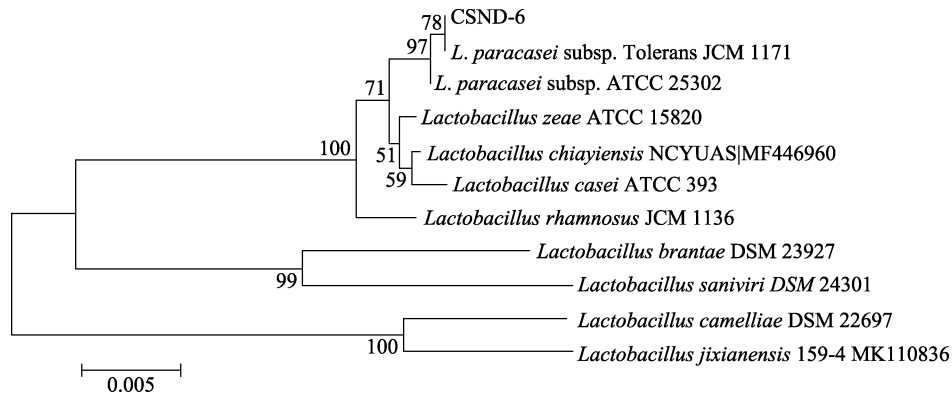


图 4 基于 16S rDNA 序列的菌株 CSND-6 系统发育树
Fig.4 The phylogenetic tree of strain CSND-6 based on 16S rDNA sequence

JCM1171)的相似性最高，为 99.83%。

2.6 菌株的生长特性

2.6.1 温度对菌株生长的影响 测定不同温度对菌株生长的影响见图 5。从图 5 可以看出，在 9℃~58℃ 的实验范围内，菌株的生长速度随培养温度的升高呈先增高再降低的趋势，该菌株在 9℃~51℃ 范围内均可生长，58℃ 时不生长；30℃~44℃ 温度范围内生长较快，最适宜的生长温度为 37℃。

2.6.2 不同 pH 条件对菌株生长的影响 不同 pH 的 MRS 培养基中菌株 CSND-6 的培养结果见图 6。从图 6 可以看出，菌株 CSND-6 在 pH 为 2.0 和 10.0 时不生长；在 pH 为 3.0~9.0 范围内均可以生长；在 pH 为 6.0~8.0 范围内，菌落数量明显高于其他组，pH 为 7.0 时生长速度最快。

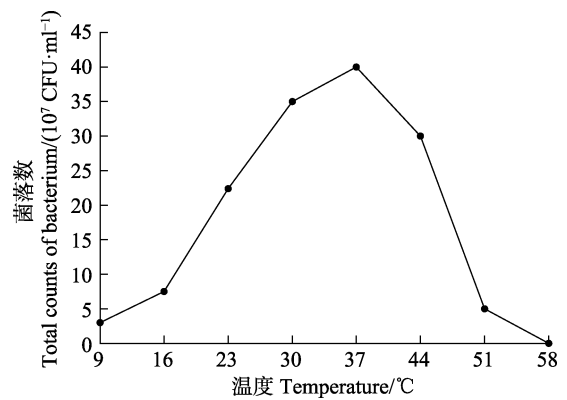


图 5 不同温度下菌株 CSND-6 的生长情况
Fig. 5 Growth of strain CSND-6 in different temperature

2.6.3 生长曲线 以上述实验结果为基础，确定该菌株的最适培养温度为 37℃，最适菌株生长的 pH 为 7.0。按照这一条件配制 pH 为 7.0 的 MRS 培养基，

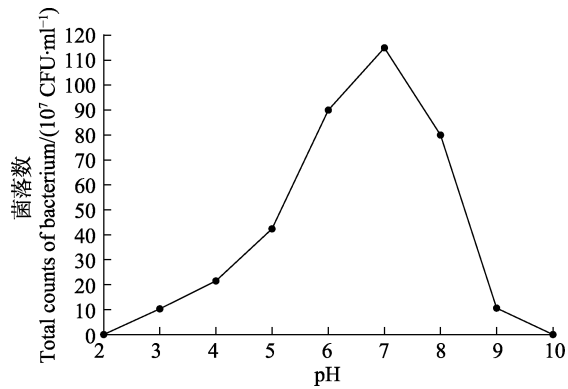


图6 不同pH对菌株CSND-6生长的影响

Fig. 6 Effect of different pH on the growth of strain CSND-6

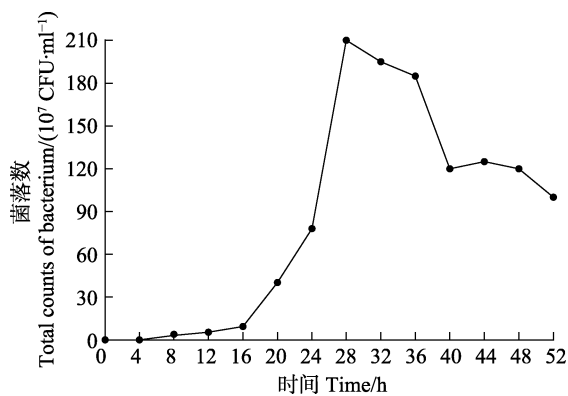


图7 菌株CSND-6在不同时间的生长曲线

Fig. 7 Growth curve of strain CSND-6 in different time

绘制其在 37℃ 培养的生长曲线见图 7。根据 CSND-6 的生长曲线可以看出, CSND-6 在 16 h 之前生长速度较慢, 16 h 后快速生长并进入对数生长期, 28~32 h 期间处于生长高峰期, 其中, 28 h 时菌落数达到峰值, 菌落数为 2.10×10^9 CFU/ml, 32 h 后 CSND-6 生长速度下降, 36 h 后开始进入平台期。

3 讨论

乳酸菌广泛分布于动物肠道中, 能阻碍肠道内特定致病菌的粘附和定殖, 从而起到调节肠道微生态平衡及抑制病原菌的作用(Guo *et al.*, 2020)。目前, 乳酸菌已经应用于畜牧和水产养殖的病害防治过程并对其抑菌机理进行了研究。Atanassova 等(2003)研究表明, 副干酪乳杆菌(*L. paracasei* subsp. M3)能分泌 1 种抗菌素, 抑制细菌、真菌生长; Ashokkumar 等(2011)研究表明, 副干酪乳杆菌产生的细菌素粗提物对鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)具有较强的抑制作用。本研究从山东东营刺参养殖池塘底泥样品中分离获得 1 株具有显著抑菌活性的副干酪乳杆菌, 该菌胞内产物和胞外产物对刺参腐皮综合征重要的致病

原假交替单胞菌和灿烂弧菌均具有较好的抑菌活性, 表明筛选的副干酪乳杆菌在池塘养殖的病害防控中具有良好的应用潜力。

掌握乳酸菌发酵条件及生长规律可对后期开发利用提供重要参考。本研究通过对筛选菌株——副干酪乳杆菌发酵条件和生长曲线的研究, 确定了副干酪乳杆菌 CSND-6 最适生长条件, 温度为 37℃, pH 为 7.0, 且在 16 h 后进入对数生长期, 28~32 h 达到生长高峰期, 28 h 时活菌数量达到高峰, 为 2.10×10^9 CFU/ml。数据与刘宇等(2017)从新鲜的驴粪中获得 1 株驴源干酪乳杆菌 LV1 所测定的生物学特性相似。唐素婷等(2019)对 1 株分离自酱油渣的副干酪乳杆菌的生物学特性研究发现, 相应菌株进入对数生长期的时间(12 h)比本研究筛选的菌株时间短, 但进入生长高峰期的时间(30 h)较长。通过以上研究可以看出, 本研究筛选出的副干酪乳杆菌 CSND-6 生长的温度、酸碱度的范围较广, 并且进入高峰期的活菌数量大, 适宜于产品的开发和池塘养殖环境的推广应用。

益生菌能调节养殖水体的微环境、改善水质条件、抑制病原菌生长, 在水产养殖动物的疾病防控过程中已初见成效, 但养殖水域使用大量益生菌并释放到公共环境中对生态环境的安全不容忽视。Wang 等(2000)研究表明, 在养殖的斑节对虾(*Penaeus monodon*)中发现 1 种新的细菌性白斑病, 该病是由大量使用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)而引发; 骆艺文等(2009)研究发现, 大量使用益生菌——蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)可引起刺参化皮。因此, 养殖过程中益生菌来源的选取及益生菌制剂的科学实用对安全生产也十分重要。

本研究筛选的抑制刺参重要病原菌的副干酪乳杆菌 CSND-6 在高浓度浸浴胁迫刺参时, 实验刺参均健康、活力好, 无吐脏、化皮和死亡现象, 表明该菌对刺参是安全的。关于副干酪乳杆菌在水产养殖动物的应用方面, 夏雨等(2020)研究发现, 在凡纳滨对虾饲料中添加副干酪乳杆菌, 能提升对虾肌肉持水性及 EPA、DHA 含量, 降低肌肉中饱和脂肪酸含量; Cazorla 等(2015)研究表明, 副干酪乳杆菌坚韧亚种(*L. paracasei* subsp. *Tolerans*)能提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼的生长性能并改善其肠道菌群; 桂琳等(2015)在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)饲料中加入干酪乳杆菌等益生菌的实验结果表明, 相应菌株可以显著提高草鱼的生长速度, 并提高消化酶和抗氧化酶活性。张永刚等(2019)自刺参池塘中筛选到 1 株对刺参安全且具有良好抑菌效果的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。本研究所分离的副干酪乳

杆菌 CSND-6 对养殖刺参的生长、消化酶活性以及对养殖环境的调控作用还需进一步的研究探讨。

综上所述,本研究从山东东营地区刺参池塘养殖环境中筛选土著益生菌——副干酪乳杆菌 CSND-6,该菌具有生长温度范围广、抑菌能力强的特点,在刺参池塘养殖环境中快速繁殖形成优势菌并发挥作用的潜能。相关研究对池塘养殖的病害防控具有重要意义,为水产动物乳酸菌类微生态制剂的产业化应用奠定基础。

参 考 文 献

- Ashokkumar S, Krishna RS, Pavithra V, *et al.* Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *International Journal of Current Science Research*, 2011, 1: 109–115
- Atanassova M, Choiset Y, Dalgarrondo M, *et al.* Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87(1–2): 63–73
- Cavalcante RB, Telli GS, Tachibana L, *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100343
- Cazorla AL, Sica MG, Brugnoli LI, *et al.* Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology*, 2015, 31(1): 88–94
- Dong XZ, Cai MY. Common bacteria system identification manual. Beijing: Science Press, 2001, 45–65 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 45–65]
- Guo GX, Li C, Xia B, *et al.* The efficacy of lactic acid bacteria usage in turbot *Scophthalmus maximus* on intestinal microbiota and expression of the immune related genes. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 100: 90–97
- Gui L, Wang XQ, Kang Y, *et al.* Effects of one compound probiotics on growth and antioxidant function of *Ctenopharyngodon idellus*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(5): 83–87 [桂琳, 王晓清, 康银, 等. 一种复合益生菌对草鱼生长和抗氧化功能的影响. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 83–87]
- Li C, Ren YC, Jiang SH, *et al.* Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 69–75
- Lin AY, Wang WZ, Chen G, *et al.* Effects of two lactic acid bacteria on growth performance and activities of digestive and non-specific immune enzymes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(5): 105–110 [林艾影, 王维政, 陈刚, 等. 2 种乳酸菌对军曹鱼幼鱼生长及消化酶、免疫酶活性的影响. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(5): 105–110]
- Ling DW, Dong XZ. Classification and identification of lactic acid bacteria and experimental methods. Beijing: China Light Industry Press, 1999, 130–137 [凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 130–137]
- Liu Y, Yin JY, Jiang BT, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics study of a strain of *Lactobacillus casei* from Donkeys. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2017, 29(6): 16–19 [刘宇, 尹珺伊, 江波涛, 等. 一株驴源干酪乳杆菌分离、鉴定及生物学特性研究. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2017, 29(6): 16–19]
- Luo YW, Hao ZK, Wang YG, *et al.* A *Bacillus cereus* causing “skin ulcer syndrome” of sea cucumber. *Fisheries Science and Technology Information*, 2009, 36(2): 60–63 [骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽胞杆菌. *水产科技情报*, 2009, 36(2): 60–63]
- Peng KD, Koubaa M, Bals O, *et al.* Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 2020, 137: 109544
- Tang ST, Qu XM, Huang GD, *et al.* Isolation, identification and antioxidant properties of *Lactobacillus paracasei* from soy sauce residue. *Food and Machinery*, 2019, 35(10): 11–17 [唐素婷, 区锡敏, 黄桂东, 等. 酱油渣中副干酪乳杆菌的分离鉴定及抗氧化特性研究. *食品与机械*, 2019, 35(10): 11–17]
- Wang GX, Huang YH, Zhou Y, *et al.* Effects of lactobacillus on growth performance, digestive enzyme activities and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 228–234 [王国霞, 黄燕华, 周晔, 等. 乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 228–234]
- Wang JH, Zhao LQ, Liu JF, *et al.* Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(5): 330–336
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 610–616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 610–616]
- Wang YG, Lee KL, Najiah M, *et al.* A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 41(1): 9–18
- Xia Y, Yi HX, Fan RB, *et al.* Effects of dietary lactic acid bacteria on the meat quality of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 74–82 [夏雨, 易华西, 范荣波, 等. 饲喂乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾肉质的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 74–82]
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ. Isolation and identification of

causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123]

Zhang YG, Li B, Wang YG, et al. Screening and characteristic analysis of *Lactobacillus plantarum* from ponds for sea cucumber farming. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 154–162 [张永刚, 李彬, 王印庚, 等. 刺参养殖池塘中一株植物乳杆菌的分离及其生物学特性. 渔业科学

进展, 2019, 40(6): 154–162]

Zhao YC, Yuan L, Wan JL, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 49: 237–242

Zhou YH, Liu HZ, Hu XX, et al. Biological characteristics and stress resistance of a *Lactobacillus paracasei* strain from pickles. Feed Research, 2015(1): 5–8 [周映华, 刘惠知, 胡新旭, 等. 一株泡菜来源副干酪乳杆菌生物学特性及抗逆性研究. 饲料研究, 2015(1): 5–8]

(编辑 陈 严)

Isolation and Biological Characterization of *Lactobacillus paracasei* Isolated from a Sea Cucumber Pond Culture System

LI Bin¹, WANG Yingeng¹①, LIAO Meijie¹, ZHANG Yonggang¹, RONG Xiaojun¹,
WANG Jinjin¹, YU Yongxiang¹, ZHANG Zheng¹, NING Luguang²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;
2. Shandong Haiyue Aquatic Science and Technology Co. Ltd, Dongying 257500)

Abstract A total of 56 strains of *Lactobacillus* were isolated using MRS medium from a sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture pond in Dongying, Shandong Province. Their antibacterial activities were analyzed using the Oxford cup method, and *Vibrio splendidus* and *Pseudoalteromonas nigrifaciens* were used as indicator bacteria. A *Lactobacillus* strain, CSND-6, showed strong antibacterial activity. The morphology, antibacterial activities of intracellular and extracellular components, physiological and biochemical tests, 16S rDNA sequence analysis, growth characteristics, and effects of strain CSND-6 on sea cucumbers were studied. The results showed that strain CSND-6 had a significant inhibitory effect on the growth of *V. splendens* and *P. nigrifaciens*. The inhibition zones of the intracellular components were 17 mm and 21 mm, and that of extracellular components were 25 mm and 33 mm for *V. splendens* and *P. nigrifaciens*, respectively. The safety analysis showed that the strain was safe for sea cucumbers. The results of the physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis showed that the strain CSND-6 belongs to family Lactobacillaceae; the similarity between CSND-6 and *Lactobacillus paracasei* JCM1171 was 99.83%. The strain CSND-6 grew rapidly between 30°C to 44°C and in a pH between 6 to 8. It entered the logarithmic growth phase after 24 h and reached the highest concentration (2.10×10^9 CFU/ml) after 28~32 h. Since strain CSND-6 was isolated from the environment of the sea cucumber culture ponds and exerted strong inhibitory effects on the main pathogenic bacteria of sea cucumbers, it holds potential as an agent to prevent and control infections and diseases in sea cucumber. This study provides the foundation for the development and utilization of probiotics in sea cucumber cultures.

Key words *Apostichopus japonicus*; Skin ulcer syndrome; *Lactobacillus paracasei*; Pond culture

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200331002

http://www.yykxjz.cn/

王治平, 李彬, 秦蕾, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军, 张正, 范瑞用, 郑炯. 刺参“参优 1 号”新品种在不同盐度下的代谢特征和适应性研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 108–115

Wang ZP, Li B, Qin L, Wang YG, Liao MJ, Rong XJ, Zhang Z, Fan RY, Zheng J. Metabolic characteristics and adaptability of a new variety of sea cucumber “Shenyou No.1” under different salinities. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 108–115

刺参“参优 1 号”新品种在不同盐度下的 代谢特征和适应性研究*



王治平^{1,2} 李彬^{2,3} 秦蕾¹ 王印庚^{1,2,3} 廖梅杰^{2,3①}
荣小军^{2,3} 张正^{2,3} 范瑞用⁴ 郑炯⁵

(1. 江苏海洋大学 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 青岛瑞滋集团有限公司 青岛 266408; 5. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266000)

摘要 本研究通过测定盐度为 14~40 条件下, 刺参“参优 1 号”苗种的生长、存活、呼吸代谢及非特异性免疫酶活性差异, 确定其适宜和最适盐度条件及其盐度适应机制。结果显示, 盐度为 23~40 时, 30 d 苗种的存活率(SR)均为 100%; 盐度在 16 以下时, 苗种全部死亡。盐度为 23~40 时, 苗种的特定生长率(SGR)为正值; 盐度为 29~37 时, SGR 较高, 为 0.9932%/d, 盐度为 20 以下时, SGR 降为负值。耗氧率(R_O)和排氮率(R_N)随盐度的变化呈现出以 32 为波谷“M”型变化, 盐度为 32 条件下的 R_O 和 R_N 分别为 0.0130 和 0.00138 mg/(g·h)。不同盐度组刺参的 O:N 值均为 8 左右, O:N 值随盐度升高无显著差异。盐度的升高和降低会引起刺参体腔液中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高($P<0.05$), 在苗种适应盐度胁迫过程中, 各盐度组 SOD 活性的峰值一般在 0 d 出现, 而 ACP、AKP 活性在第 10 天出现峰值, LZM 活性的峰值在 10~20 d。研究表明, 刺参“参优 1 号”适宜的生长盐度为 23~40, 最适盐度范围为 29~37, 盐度变化会导致苗种呼吸代谢和免疫酶活性的变化, 研究结果将为刺参“参优 1 号”苗种的推广提供科学依据。

关键词 刺参“参优 1 号”; 盐度适应; 生长; 呼吸代谢; 非特异性免疫酶活性

中图分类号 S949 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0108-08

刺参(*Apostichopus japonicus*)具有重要的营养和药用价值, 在 20 世纪 80 年代, 其苗种规模化繁育技

术得到突破。进入 21 世纪, 养殖产业迅猛发展, 成为引领我国第 5 次海水养殖浪潮的主要品种。然而,

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901604)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020ZX0101; 2020TD40; 20603022020020)、青岛西海岸新区科技项目(2018-19)和山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901604), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020ZX0101; 2020TD40; 20603022020020), Science and Technology Program of Qingdao West Coast New Area (2018-19), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010)]. 王治平, E-mail: 1194855546@qq.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-31, 收修改稿日期: 2020-04-04

近年来随着产业规模的急剧扩大, 养殖业出现种质退化现象, 表现出生长速度慢、病害频发、存活率低等问题, 导致每年数 10 亿的经济损失(王印庚等, 2014)。中国水产科学研究院黄海水产研究所针对刺参病害问题, 采用群体选育方法, 培育出具有生长速度快、抗病力强、成活率高的刺参“参优 1 号”新品种(GS-01-016-2017)(全国水产技术推广总站, 2018), 为刺参养殖良种化提供了种质基础。刺参是狭盐性海洋动物, 盐度作为重要的环境因子之一, 对刺参的生长存活、呼吸排泄、能量和碳氮收支等生理生态影响显著(龚海滨等, 2009; 袁秀堂等, 2006; Yuan *et al.*, 2010; 孟雷明等, 2013)。随着刺参养殖产业的发展, 尤其是“东参西养”和“北参南养”模式的快速发展, 海参养殖区从最初的刺参自然分布区逐步拓展到黄河三角洲地区和闽、浙沿海。受海域自然盐度及降水、结冰、化冰、蒸发等因素的影响, 各养殖区池塘盐度变化差异显著。本研究对不同盐度下刺参“参优 1 号”的生长存活、呼吸代谢以及免疫酶活性进行了测定, 旨在探明刺参“参优 1 号”对盐度的适应性, 分析不同盐度下, “参优 1 号”苗种的免疫调节、耗氧率、排氨率、生长等代谢特征, 进而确定其最适盐度条件及其耐盐机制, 为该良种在不同地域推广、健康养殖提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用刺参“参优 1 号”苗种由山东青岛瑞滋集团有限公司培育, 苗种规格为(5.00±0.75) g。选取活力良好、健康无异的个体, 在清洁海水中暂养 7 d 后用于后续实验。

1.2 实验方法

根据刺参对盐度的耐受特点, 本研究设定 16 个盐度梯度, 分别为 14、15、16、17、18、20、23、26、29、32、35、36、37、38、39 和 40, 实验用水以砂滤洁净海水为基础, 采用粗盐或淡水调节至相应盐度并分别储备在体积为 1 m³ 的单独的 PP 水槽中。盐度实验所用养殖水槽为容积 30 L 白色塑料水槽, 按照每天降低或升高 1 个盐度对海参进行梯度降盐或升盐。每个盐度实验设置 4 个平行, 其中, 3 个平行实验组用于生长和存活测试, 另外, 1 个平行水槽用于酶指标的测定, 每个平行放置 30 头刺参。实验期间, 每天投喂配合饲料 1 次, 投喂量为刺参体重的 2%, 每天按时投喂并吸底清污, 并更换相同盐度的

海水, 换水量为 50%。观测并记录刺参摄食、体征、生长、死亡等情况, 计算各组存活率(Survival Rate, SR, %)和特定生长率(Specific Growth Rate, SGR, %/d), 测定各组刺参的呼吸代谢及非特异性免疫酶活性的差异。

1.2.1 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种特定生长率和存活率的变化 实验开始时, 称取苗种的初始体重; 实验结束时, 记录苗种的存活数量和终末平均体重, 苗种的 SR 和 SGR 采用以下公式计算:

$$SR = N_t / N_0 \times 100\%$$

$$SGR = (\ln W_t - \ln W_0) \times 100 / t$$

式中, N_0 和 N_t 分别为刺参初始数量和终末存活数量, W_0 和 W_t 分别为刺参初始平均体重和终末平均体重(g), t 为养殖天数。

1.2.2 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种的呼吸代谢变化 各组到达设定盐度 7 d 后, 开始测定相应盐度下刺参的呼吸代谢。实验在 2 L 呼吸瓶中进行, 每个测试瓶中加入相应盐度的海水和刺参, 每个盐度设 3 个平行组, 每组 10 头刺参, 同时, 设立 3 个空白对照组(未放置刺参组)。所有呼吸瓶放入同一个水槽中, 以保持相同的温度条件(16.0℃)。每个呼吸瓶加满相应盐度海水和刺参后, 立即用橡皮塞封口, 封口后 4 h, 采用虹吸法自各实验组取水样, 分别用碘量法(GB 17378.4-2007)和靛酚蓝分光光度法(GB 17378.4-2007)测定水样中溶解氧(DO)和氨氮(NH₄⁺-H)含量, 计算刺参的耗氧率(R_O)和排氨率(R_N)以及氧氮比(O : N)。计算公式如下:

$$R_O = [(O_0 - O_t)V] / (W \times t)$$

$$R_N = [(N_t - N_0)V] / (W \times t)$$

$$O : N = (R_O / 16) / (R_N / 14)$$

式中, O_0 和 O_t 分别为实验结束时对照组和实验组水体的 DO 质量浓度(mg/L), N_0 和 N_t 分别为实验结束时对照组和实验组水体中总氨氮(TN)质量浓度(mg/L), t 为实验持续时间(h); W 为刺参的体重(g), V 为实验水体体积(L)。

1.2.3 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种的非特异性免疫酶活性变化 30 d 的实验周期内, 分别在 0、10、20、30 d 从各盐度组随机取 3 头刺参, 活体解剖取体腔液, 4℃条件下, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液。使用南京建成生物公司的试剂盒并参照试剂盒说明书测定刺参苗种体腔液的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

1.3 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图, 采用 SPSS 18.0 对数据进行单因素方差(One-way ANOVA)分析,

采用 Tukey 检验对数据进行多重分析, $P < 0.05$ 为不同盐度组的相应指标差异显著。

2 结果与分析

2.1 盐度对刺参“参优 1 号”苗种存活率的影响

实验周期内刺参“参优 1 号”苗种在不同盐度条件下的 SR 曲线见图 1。从图 1 可以看出, 低盐对苗种存活影响很大, 盐度为 14 和 15 实验组的苗种在 14 和 24 d 累计死亡率达到 100%; 在 30 d 的养殖期内, 盐度为 16~20 时;“参优 1 号”苗种的 SR 随盐度的升高而增加, 苗种的 SR 由(13.33±4.71)%逐渐增加到(86.67±4.71)%; 盐度为 23~40 的各实验组 SR 均为 100%。

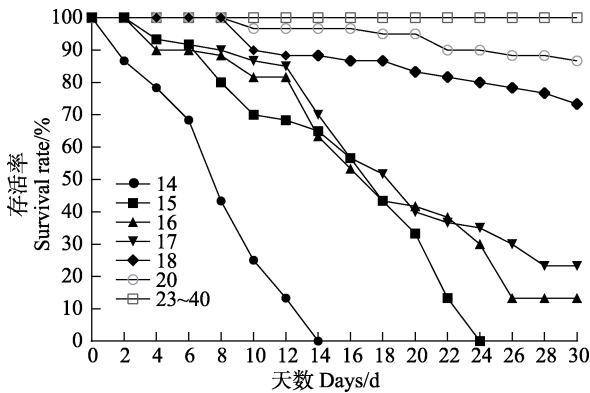


图 1 不同盐度条件对刺参“参优 1 号”苗种存活率的影响
Fig.1 Effect of salinity on survival rate of sea cucumber “Shenyou No.1”

2.2 盐度对刺参“参优 1 号”苗种生长的影响

盐度为 14~16 的各实验组, 由于苗种的 SR 过低, 无法计算 30 d 实验周期内的 SGR; 盐度为 17~40 时, 各实验组“参优 1 号”苗种的 SGR 见图 2。从图 2 可以看出, 盐度在 17~40 之间, 苗种的 SGR 随盐度的增加呈先升高后降低的趋势。盐度为 17~20 时, 苗种的 SGR 为负值; 盐度为 23~40 时, SGR 为正值; 盐度大于 26 时, SGR 显著增高($P < 0.05$); 盐度为 29~37 时, SGR 保持较高的水平, 各组之间的差异不显著($P > 0.05$), 并在盐度为 32 时达到最高, 为 0.9932%/d; 盐度在 37~40 范围内, SGR 随盐度的上升而降低。依据获得的生长参数并通过数学函数推导, 盐度在 17~40 范围内, 盐度和刺参 SGR 的关系可以用以下公式:

$$SGR = -0.0062S^2 + 0.4046S - 5.7849 \quad (R^2 = 0.9602)$$

根据公式推算, 刺参“参优 1 号”在盐度为 32.6 时, SGR 最高。

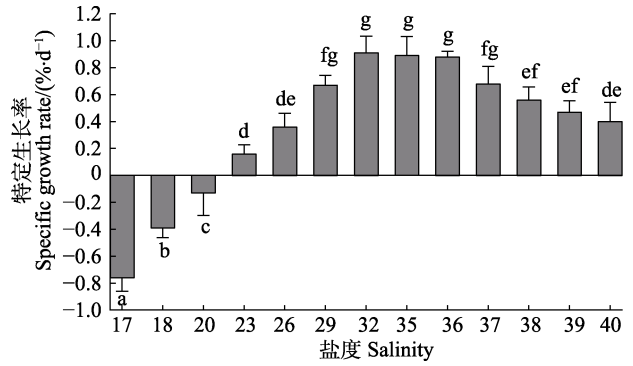


图 2 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种的特定生长率

Fig.2 Specific growth rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different salinity

不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。下同
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).
The same as bellow

2.3 盐度对刺参“参优 1 号”苗种呼吸代谢的影响

不同盐度条件下, 刺参“参优 1 号”苗种的 R_0 计算结果见图 3。从图 3 可以看出, 在盐度为 14~40 时, 苗种随盐度的升高 R_0 呈“M”型波动。盐度在 14~17 范围内 R_0 较低, 各组间无显著差异($P > 0.05$); 盐度高于 18 时, 实验苗种的 R_0 显著增高($P < 0.05$); 盐度为 23~29 时, R_0 处于较高水平, 各组之间的差异不显著($P > 0.05$); 盐度为 26 时, R_0 达到第 1 个高峰值, 为 0.0173 mg/(g·h)。盐度为 32 时, 实验苗种的 R_0 显著降低($P < 0.05$); 当盐度高于 35 时, R_0 逐渐升高, 并在盐度为 37 时达到第 2 个高峰值, 为 0.0196 mg/(g·h); 盐度为 38~40 时, “参优 1 号”苗种的 R_0 随盐度的升高呈下降趋势。

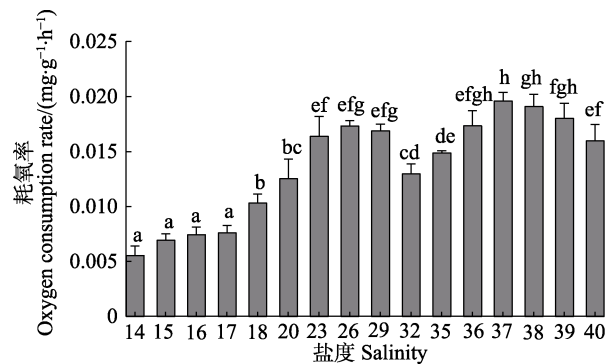


图 3 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种的耗氧率
Fig.3 Oxygen consumption rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different salinity

不同盐度条件下, 刺参“参优 1 号”苗种的 R_N 变化见图 4。从图 4 可以看出, 其变化趋势和 R_0 变化趋势相似,

盐度在 14~29 范围内, 随着盐度的升高, 实验苗种的 R_N 逐渐增高; 盐度为 23~29 时, R_N 达到较高的水平。其中, 盐度为 26 时 R_N 较高, 为 0.00185 mg/(g·h); 盐度为 32 时, R_N 显著降低($P<0.05$); 在盐度为 32~37 范围内, R_N 逐渐升高, 并在盐度为 37 时达到峰值, 为 0.00196 mg/(g·h); 盐度高于 37 时,“参优 1 号”的 R_N 随盐度的升高呈下降趋势。

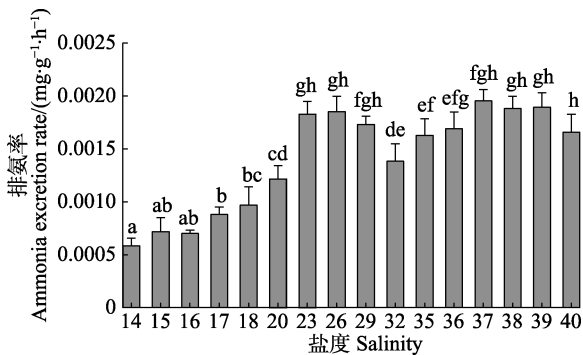


图 4 不同盐度条件下刺参“参优 1 号”苗种的排氨率
Fig.4 Ammonia excretion rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different salinity

不同盐度条件下, 刺参苗种 O : N 值的计算结果见表 1。从表 1 可以看出, 不同的盐度组 O : N 值均在 8 左右, 随盐度的变化无显著差异($P>0.05$)。

表 1 盐度对刺参“参优 1 号”O : N 的影响

Tab.1 Effect of salinity on O : N of sea cucumber “Shenyou No.1”

盐度 Salinity	氧氮比 O : N	盐度 Salinity	氧氮比 O : N
14	8.47±2.27	29	8.56±0.68
15	8.67±2.29	32	8.29±1.53
16	9.30±1.26	35	8.04±0.86
17	7.59±1.24	36	9.03±1.52
18	9.38±0.91	37	8.80±0.81
20	9.13±2.20	38	8.90±1.05
23	7.89±1.38	39	8.39±1.21
26	8.23±0.85	40	8.51±1.62

2.4 盐度对刺参“参优 1 号”苗种非特异性免疫酶活性的影响

在盐度为 14~16 时, 实验结束后, 苗种全部死亡, 无法进行体腔液的获取。盐度为 17 时, 实验结束后, 剩余苗种数量获得的体腔液不足以进行非特异性免疫酶活性的检测。本研究对盐度为 18~40 各实验组苗种的非特异性免疫酶活性进行测定, 结果见图 5~图 8。

由酸性磷酸酶(ACP)的测定结果(图 5)可以看出, 盐度为 18、32、35、36 的实验组, 在实验周期内不同时间点刺参“参优 1 号”苗种的 ACP 活性无显著变化($P>0.05$), 其余实验组 ACP 均呈先升高后降低的趋势, 并在第 10 天时, ACP 活性达到最高, 显著高于其他时间的 ACP 活性, 其中, 盐度为 26 的实验组第 10 天 ACP 活性达到最高。

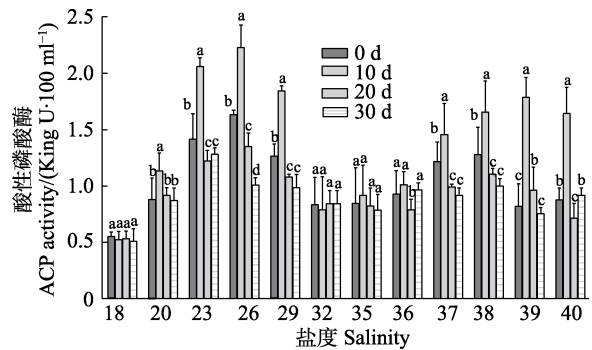


图 5 盐度对刺参“参优 1 号”体腔液酸性磷酸酶活性的影响

Fig.5 Effect of salinity on ACP activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

在 30 d 实验周期内, 各盐度组碱性磷酸酶(AKP)活性的测定结果(图 6)可以看出, 在实验盐度范围内, 随着盐度的增高, 不同盐度组同一时间实验苗种的 AKP 活性呈波浪形波动; 盐度高于 18 时, AKP 的活性逐渐增高, 并在盐度为 23 时达到峰值, 然后逐渐降低; 在盐度为 32 时达到最低值; 盐度高于 32 时, AKP 活性逐渐上升。同一盐度组不同时间点苗种的 AKP 活性变化也存在差异, 其中, 盐度为 32 和 35 时, 不同时间点 AKP 活性差异不显著, 其余盐度组随时间的延长基本呈先升高后降低的趋势, 并在第 10 天达到较高值。

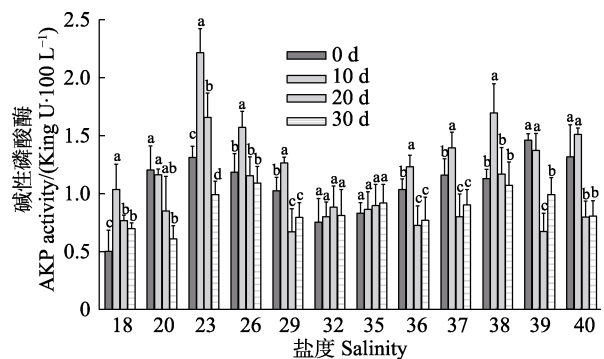


图 6 盐度对刺参“参优 1 号”体腔液碱性磷酸酶活性的影响

Fig.6 Effect of salinity on AKP activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

不同盐度条件下,刺参“参优1号”苗种体腔液溶菌酶(LZM)活性变化见图7。从图7可以看出,在实验盐度范围内,随着盐度的增高,实验苗种不同盐度组在同一时间点的LZM活性呈先升高后降低再升高的“M”型趋势。其中,在盐度为29、39时,LZM活性达到较高值;盐度为32、35时,LZM的活性较低。同一盐度组中,盐度为18时,LZM活性随着实验时间的延长出现下降趋势,其余各组的LZM活性呈先升高后降低的趋势,并在第10天时达到较高值。

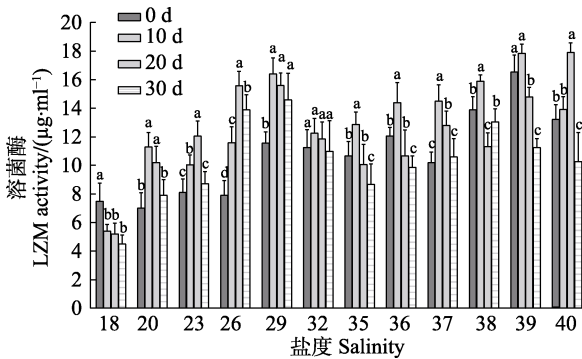


图7 盐度对刺参“参优1号”体腔液溶菌酶活性的影响
Fig.7 Effect of salinity on LZM activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyu No.1”

各盐度条件下,刺参苗种超氧化物歧化酶(SOD)活性变化见图8。从图8可以看出,在盐度为18~29时,0 d各组SOD活性均处于最高水平,随盐度的增加呈先升高后降低的趋势,并在盐度为18~23时,各实验组SOD的活性随时间变化呈逐渐降低的趋势;而盐度为26和29的实验组,SOD的活性呈先降低后升高的趋势;盐度为32的实验组,SOD活性随时间变化无显著差异($P>0.05$);盐度为36~38时,SOD的活性随时间变化呈先降低后升高的趋势,均在第20天时达到最低,并在第30天时又显著上升($P<0.05$)。

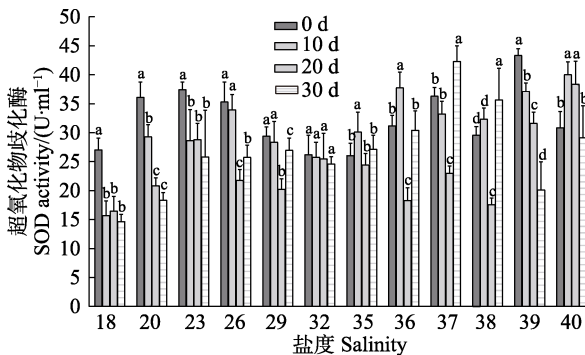


图8 盐度对刺参“参优1号”体腔液超氧化物歧化酶活性的影响

Fig.8 Effect of salinity on SOD activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyu No.1”

3 讨论

3.1 刺参“参优1号”苗种在不同盐度条件下的适应性

盐度作为影响海洋生物生理生态学最重要的环境因子之一,与养殖动物的渗透压调节、生长、发育关系密切(Dong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2018)。棘皮动物缺乏专门的排泄器官,机体不能进行细胞外渗透压调节,当水体盐度变化时,刺参体内的渗透压也会迅速变化,机体细胞通过调节氨基酸和部分离子的浓度来维持与体腔液渗透压平衡(Talbot *et al.*, 2002)。刺参属于典型的狭盐性海洋生物,盐度的变化对刺参的生长和存活有明显影响(陈勇等, 2007; 郑慧等, 2014; Li *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010)。对于选育的新品种而言,选育目标性状决定了其在养殖业中的应用潜力,而新品种生态适应性则决定了其推广范围和区域。刺参“参优1号”是以抗灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)能力和生长速度为选育目标培育出的刺参新品种,为获得最大的良种贡献率,需要对该品种的生态适应范围进行重新评估。

刺参机体对盐度的调节有一个安全阈值,超过这个阈值会影响其生存。本研究结果显示,盐度为18以下,刺参“参优1号”的SR会大幅度降低,这可能是由于盐度超过了其自身调节范围导致。龚海滨等(2009)和张少华等(2004)通过SR测算和生理状态观察的方法,确定了急性盐度骤变条件下,刺参的适宜盐度分别为20~35和18~39,最适生长盐度为25~30。当水体盐度在等渗点附近时,机体用于渗透压调节的能量较少,更有利于刺参的生长和幼体的发育(Asha *et al.*, 2005)。本研究发现,刺参“参优1号”在盐度约为32时SGR最高,这可能是由于盐度为32是刺参等渗点的附近,用于渗透压调节的能量较少,故生长速度最快。本研究通过盐度缓降后30 d的养殖结果表明,刺参“参优1号”的存活盐度为23~40,最适生长盐度为29~37。王吉桥等(2009)研究了60 d实验周期内,盐度骤变对刺参幼参存活和生长的影响,提出采用存活盐度和抑制生长盐度2个概念表示刺参的耐盐性,得出盐度为26是明显的抑制生长的拐点,刺参幼参的存活盐度为26~33,生长适宜盐度为30~33。胡炜等(2012)通过测定逐步降盐(盐度缓降)和盐度突变(盐度骤降)2种实验模式下,盐度对刺参生存、摄食和生长的影响时发现,影响刺参摄食和生长的关键是低盐胁迫的最终盐度而不是改变盐度方式。本研究所测得的刺参“参优1号”的盐度耐受和适宜盐度范围与王吉桥等(2009)研究结果基本一致,说明刺参“参优1号”在选育过程中的盐度耐受适应性未发生显著变

化, 而本研 究所得到的结果范围明显小于龚海滨等(2009)和张少华等(2004)的研究结果。一方面是由于本研究测定周期长(30 d), 远高于前 2 项研究(分别为 168 和 48 h)的监测时间, 另一方面也是由于本研究除了考虑存活率, 同时, 将生长率作为判定其最适盐度的指标, 导致的结果范围显著偏小。

3.2 刺参“参优 1 号”在不同盐度条件下的呼吸代谢特征

盐度的变化会对刺参造成胁迫反应, 进而影响刺参的能量代谢, 表现为呼吸和排泄的不同。水生动物处于等渗点时 R_O 最低, 可能是动物处于等渗点用于渗透压调节的耗能最少。汪洋(2013)对南移刺参在盐度为 20~35 条件下的呼吸代谢测定结果表明, 随着盐度的升高, 刺参的 R_O 和 R_N 均呈先降低再升高的趋势, 且均在盐度为 30 时达到最低。包杰(2008)研究了在盐度为 23~38 条件下, 不同规格青刺参和红刺参呼吸代谢的变化发现, 在所测试的盐度范围内, 刺参的 R_O 和 R_N 变化呈“M”型趋势, 并依据这一趋势得出盐度为 29~32 是青刺参和红刺参的最适盐度范围; 袁秀堂等(2006)对不同规格刺参的盐度呼吸代谢测定表明, 盐度为 31.5 时, 不同规格刺参的 R_O 和 R_N 均最低。本研究结果表明, 刺参“参优 1 号”的 R_O 和 R_N 也以盐度为 32 呈波谷的“M”型趋势, 在低于和高于等渗点苗种的 R_N 均升高, 这可能是由于盐度胁迫带来的渗透压调节需要较多游离氨基酸分解导致, 同时, 也说明盐度为 32 可能最接近刺参“参优 1 号”的体液等渗点。这与前几项的研究结果相一致, 具体等渗点数值的差异应该是因为各研究在具体实验方法中设置的盐度差异不同引起的。将 R_O 和氮排泄结合起来计算代谢的 O:N 值, 可以评估无脊椎动物的能量需求和对营养物质的利用特性并被用作其对环境胁迫指标 (Bayne *et al*, 1978)。本研究结果表明, 盐度对刺参“参优 1 号”的 O:N 值的影响不显著, 与袁秀堂等(2006)和薛素燕等(2009)研究结果相一致, 而与包杰(2008)对青刺参和红刺参的研究结果表明, 不同品系刺参 O:N 值随盐度的变化趋势不同, 这可能是跟刺参品系差异有关。

3.3 刺参“参优 1 号”苗种在不同盐度条件下的非特异性免疫酶活性特征

刺参体腔液细胞是其非特异性免疫系统的承担者, 体腔液细胞可产生多种免疫因子及免疫酶 (Coteur *et al*, 2002; Kudriavtsev *et al*, 2004; 叶海斌等, 2018), 因此, 可以通过检测体腔液细胞中非特异性免疫酶活

性的变化来反应其应对各种胁迫状态下的免疫应答 (田青等, 2014; 徐松涛等, 2017; 韩莎等, 2018)。本研究结果表明, 盐度变化显著影响了刺参“参优 1 号”的非特异性免疫酶指标。对相同盐度 30 d 实验期内酶指标的测定结果可以看出, 在盐度胁迫下, SOD 活性的峰值一般在 0 d 出现, 而 ACP、AKP 活性的峰值在第 10 天出现, LZM 活性的峰值在 10~20 d 出现, 表明体腔细胞在应对盐度变化的过程中, 不同酶指标变化响应时间存在一定差异。相应酶指标对盐度变化在时间上的响应规律与郑慧等(2014)的研究结果一致。但与田青等(2014)检测饥饿胁迫、徐松涛等(2017)检测氨氮胁迫和韩莎等(2018)检测 pH 胁迫条件下的响应变化规律存在显著差异, 这说明刺参在应对不同胁迫条件下, 非特异性免疫酶活性的变化存在很大差异。对不同盐度条件下所检测酶指标活性对比结果可以看出, 在盐度为 18 条件下, 各酶指标的活性都显著低于其他盐度组, 表明在苗种受到致死盐度胁迫时, 机体已无法正常维持其免疫酶活性的调节能力, 这与侯西坦等(2016)的研究结果相一致。而在刺参能存活的 23~40 盐度范围内, 相应酶指标的变化均表现为在适宜盐度内活性较低, 而应对低盐或高盐胁迫时活性显著升高, 表明在受到盐度胁迫后刺参会产生一种应激和保护反应, 通过提高非特异性免疫酶活性以增强免疫力。

综上所述, 在刺参“参优 1 号”苗种养殖生产过程中, 应保持水体盐度在 29~37 范围内, 苗种生长速度较快, 盐度过高或过低均会引起刺参的应激反应, 生理表现为 R_O 和 R_N 升高并引发机体免疫酶活性的变化, 对苗种的生长产生不利影响。因此, 在良种推广过程中, 应根据海域自然盐度条件选择适宜的推广区域, 该新品种在刺参池塘养殖过程中要避免暴雨、结冰等天气造成的盐度波动。本研究结果可为良种在不同模式、不同海域的推广提供科学依据。

参 考 文 献

- Asha PS, Muthiah P. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber (*Holothuria spinifera*) Theel. *Aquaculture*, 2005, 250(3-4): 1-829
- Bao J. Effects of environmental factors on metabolism and growth of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 [包杰. 环境因子对青刺参和红刺参(*Apostichopus japonicus*)代谢与生长及其机制的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008]
- Bayne BL, Widdows J. The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia*, 1978, 37(2): 137-162

- Chen Y, Gao F, Liu GS, *et al.* Effects of temperature, salinity and photoperiod on growth and behavior of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 687–691 [陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响. *水产学报*, 2007, 31(5): 687–691]
- Coteur G, Warnau M, Jangoux M, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (*Echinodermata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, 12(3): 187–200
- Dong YW, Dong SL, Meng XL. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, 2008, 276(1–4): 179–186
- Gong HB, Wang YB, Deng H, *et al.* Study on salinity tolerance of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fishery Science*, 2009(5): 47–49 [龚海滨, 王耀兵, 邓欢, 等. 仿刺参对盐度的耐受能力研究. *水产科学*, 2009(5): 47–49]
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effects of pH stress on growth and immune enzyme activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Marine Science*, 2018, 42(11): 51–58 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对不同规格刺参生长及免疫酶活性的影响. *海洋科学*, 2018, 42(11): 51–58]
- Hou XT, Liao MJ, Li B, *et al.* Tolerance and physiological and biochemical responses to low salt stress in four selected juvenile *Apostichopus japonicus* strains. *Marine Science*, 2016, 40(5): 19–28 [侯西坦, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参 4 个不同选育品系幼参对低盐胁迫的耐受及生理生化响应. *海洋科学*, 2016, 40(5): 19–28]
- Hu W, Li CL, Zhao B, *et al.* Effects of low salinity stress on survival, feeding and growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 92–96 [胡炜, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 92–96]
- Hu M, Li Q, Li L. Effect of salinity and temperature on salinity tolerance of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Fisheries Science*, 2010, 76(2): 267–273
- Kudriavtsev IV, Polevshchikov AV. Comparative immunological analysis of echinoderm cellular and humoral defense factors. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 2004, 65(3): 218–231
- Li L, Li Q. Effects of stocking density, temperature, and salinity on larval survival and growth of the red race of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Aquaculture International*, 2010, 18(3): 447–460
- Meng LM, Wang LL, Lei Y, *et al.* Preliminary study on the effect of salinity on carbon and nitrogen budgets of *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(1): 38–42 [孟雷明, 王丽丽, 雷艳, 等. 盐度对刺参碳、氮收支影响的初步研究. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(1): 38–42]
- National Fishery Technical Extension Center. Guide for the promotion of new aquatic varieties in 2018. Beijing: China Agriculture Press, 2018 [全国水产技术推广总站. 2018 水产新品种推广指南. 北京: 中国农业出版社, 2018]
- Talbot TD, Lawrence JM. The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filigraneus* (*Echinodermata: Ophiuroidea*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 275(1): 1–14
- Tian Q, Rong XJ, Li B, *et al.* Effects of starvation stress on immunity and growth of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 71–76 [田青, 荣小军, 李彬, 等. 饥饿胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫和生长的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 71–76]
- Wang JQ, Zhang XC, Jiang YS, *et al.* Effects of sudden salinity drop on survival and growth of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) at different developmental stages. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(S1): 139–146 [王吉桥, 张筱墀, 姜玉声, 等. 盐度骤降对不同发育阶段仿刺参存活和生长的影响. *大连水产学院学报*, 2009, 24(S1): 139–146]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Wang Y. Preliminary study on the feeding and metabolic physiology of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Ningbo University, 2013 [汪洋. 南移刺参摄食和代谢生理的初步研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Xu ST, Zhao B, Li CL, *et al.* Effects of ammonia-N stress on survival and nonspecific immune enzyme activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 172–179 [徐松涛, 赵斌, 李成林, 等. 氨氮胁迫对不同规格刺参(*Apostichopus japonicus*)存活及非特异性免疫酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 172–179]
- Xue SY, Fang JG, Mao YZ, *et al.* Effects of different salinity on respiration and excretion of young and 1 year old sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) under high temperature. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 975–980 [薛素燕, 方建光, 毛玉泽, 等. 高温下不同盐度对刺参幼参和 1 龄参呼吸排泄的影响. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 975–980]
- Yuan XT, Yang HS, Zhou Y, *et al.* Effects of salinity on respiration and excretion of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(4) [袁秀堂, 杨红生, 周毅, 等. 盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)呼吸和排泄的影响. *海洋与湖沼*, 2006, 37(4): 348–354]
- Yuan XT, Yang HS, Wang L, *et al.* Effect of salinity on energy budget in pond-cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) (*Echinodermata: Holothuroidea*). *Aquaculture*, 2010, 306: 348–351
- Ye HB, Fan Y, Li TB, *et al.* Research progress on immune defense mechanism of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*).

Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(16): 27–29
[叶海斌, 樊英, 李天保, 等. 刺参免疫防御机制研究进展. 安徽农业科学, 2018, 46(16): 27–29]

Zhang LB, Feng QM, Sun LN, *et al.* Differential gene expression in the intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) under low and high salinity conditions. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2018, 25: 34–41

Zhang SH, Zhang XL, Liu ZL, *et al.* Experiment on adaptive

range of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) to salinity. Shandong Fisheries, 2004(12): 9–10 [张少华, 张秀丽, 刘振林, 等. 刺参对盐度的适应范围试验. 齐鲁渔业, 2004(12): 9–10]

Zheng H, Li B, Rong XJ, *et al.* Effects of salinity and dissolved oxygen on non-specific immune enzyme activity in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 118–124 [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 118–124]

(编辑 陈 严)

Metabolic Characteristics and Adaptability of a New Variety of Sea Cucumber “Shenyou No.1” under Different Salinities

WANG Zhiping^{1,2}, LI Bin^{2,3}, QIN Lei¹, WANG Yingeng^{1,2,3}, LIAO Meijie^{2,3①},
RONG Xiaojun^{2,3}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, ZHENG Jiong⁵

(1. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Qingdao Ruizi Group Co., Ltd, Qingdao 266408; 5. Qingdao Fishery Technical Extension Station, Qingdao 266000)

Abstract Salinity is a key ecological factor for the survival of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), and analysis of the adaptation and tolerance mechanisms of new sea cucumber varieties can provide a scientific basis for their promotion. To study the adaptation of a new variety of sea cucumber, “Shenyou No. 1,” the growth, survival, respiratory metabolism, and immune enzyme activities in different salinities (ranging from 14 to 40) were measured. The results revealed that the survival rate was 100% within the salinity range of 23–40, whereas all seedlings died when the salinity was below 16. The specific growth rate (SGR) was positive within the salinity range of 23–40 and reached a peak within the salinity range of 29–37, with the highest SGR being 0.9932%/d at a salinity of 32. With a change in salinity, the oxygen consumption rate and ammonia excretion rate showed a “M” type change, with the trough values obtained at a salinity of 32 with values of 0.0130 mg/(g·h) and 0.00138 mg/(g·h), respectively. The O/N ratio showed no significant difference with the change in salinity. The ACP, AKP, LZM, and SOD activities changed significantly under the high and low salinity stresses. During the adaptation period, the peak of SOD enzyme appeared at 0 d, whereas the peak of ACP and AKP appeared at 10 d, and the peak of LZM appeared at 10~20 d. All the results indicated that the suitable salinity range for the new variety “Shenyou No. 1” was 23–40 and the optimum salinity range was 29–37. Changes in the salinity led to changes in the respiratory metabolism and immune enzyme activity of the seedlings. These results provide a scientific basis for the promotion of the new variety of sea cucumber “Shenyou No. 1.”

Key words Sea cucumber “Shenyou No.1”; Salinity adaptation; Growth; Respiratory metabolism; Immune enzyme activities

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201223003

http://www.yykxjz.cn/

荣小军, 李彬, 廖梅杰, 王印庚, 王治平, 王锦锦, 于永翔, 张正, 范瑞用. 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的代谢特征和适应性研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 116-124

Rong XJ, Li B, Liao MJ, Wang YG, Wang ZP, Wang JJ, Yu YX, Zhang Z, Fan RY. Metabolic characteristics and adaptability of a new variety of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH conditions. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 116-124

刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的代谢特征和适应性研究*



荣小军^{1,2} 李彬^{1,2} 廖梅杰^{1,2①} 王印庚^{1,2} 王治平^{1,2}
王锦锦^{1,2} 于永翔^{1,2} 张正^{1,2} 范瑞用³

(1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

3. 青岛瑞滋集团有限公司 青岛 266408)

摘要 为研究刺参(*Apostichopus japonicus*)“参优 1 号”苗种的适宜 pH 及耐受范围并解析其对水体的酸碱性适应机制, 本研究测定了 pH 6.5~10.0 条件下该良种苗种的生长、存活、呼吸代谢以及非特异性免疫酶活性的差异。结果显示, 在 pH 6.5~9.5 范围内, 30 d 实验周期内苗种的存活率均为 100%, 而在 pH 10.0 条件下苗种全部死亡。在 pH 7.5~8.5 范围内, 苗种特定生长率(SGR)为正值, 且在 pH 为 8.0 时 SGR 最高, 达到 0.541%/d, 而在 pH 低于 7.0 和高于 9.0 时, SGR 为负值, 苗种为负生长。对不同 pH 条件下的耗氧率(R_O)和排氮率(R_N)的测定结果显示, 随 pH 的变化, R_O 和 R_N 均呈现以 pH 8.0 为波谷的“V”型变化, 在 pH 8.0 条件下的 R_O 和 R_N 分别为 19.07 和 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。不同 pH 实验组刺参苗种的氧氮比(O/N)均在 11 左右, O/N 随 pH 变化无显著差异($P>0.05$)。pH 的升高和降低会引起刺参体腔液中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶的活性显著升高($P<0.05$), 在苗种适应 pH 胁迫过程中, 各 pH 组超氧化物歧化酶活性的峰值一般在第 0 天出现, 而溶菌酶的活性峰值在第 10 天出现。研究表明, 刺参“参优 1 号”可存活的 pH 范围为 6.5~9.5, 适宜生长的 pH 范围为 7.5~8.5, pH 变化会导致苗种呼吸代谢和免疫酶活性的改变。本研究结果将为刺参“参优 1 号”苗种的科学化推广提供依据。

关键词 刺参“参优 1 号”; 酸碱度适应; 生长与存活; 呼吸代谢; 非特异性免疫酶活性

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0116-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)自然分布于太平洋西部的中国、俄罗斯、韩国与日本沿海(廖玉麟, 1997)。

20 世纪 80 年代, 刺参人工育苗技术突破后, 刺参养殖业迅猛发展, 目前已成为引领我国第五次海水养殖

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901604)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 20603022020020)和山东省农业良种工程重大课题(2020LZGC015)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China(2018YFD0901604), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD40; 20603022020020), and Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2020LZGC015)]. 荣小军, E-mail: rongxj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-12-23, 收修改稿日期: 2021-01-09

浪潮的主要品种。然而,近年来随着产业规模的急剧扩大,养殖过程中出现的种质退化、疾病频发、产品质量安全等问题日益突出,对刺参养殖的可持续发展构成巨大威胁(王印庚等,2014)。刺参良种选育和规模化推广是解决上述问题的重要手段之一。中国水产科学研究院黄海水产研究所采用群体选育方法,以抗病力和生长速度为选育目标,经过累代选育,培育出生长速度快、抗病力强、成活率高的刺参“参优1号”新品种(GS-01-016-2017),为刺参养殖种质提升提供了种质基础。然而,生物的性状表现是环境和基因共同作用的结果,我国海参养殖区域跨度大、养殖模式多样、水域环境复杂,要充分发挥良种的种质潜力,需要对其生态适应性进行科学评价,相应结果也将有助于良种最适养殖区和养殖模式的确定,进而为获得最佳良种增产贡献率提供科学指导。

pH是水体环境的关键指标,研究表明,pH的升高或降低会对鱼、虾、贝、参等水生动物的存活、生长和免疫酶活性产生直接影响(王双耀等,2013;王芸等,2013;文春根等,2009;韩莎等,2018a)。在池塘养殖过程中,因天气、浮游藻类繁殖、池底大型藻类生长、底质老化、人工投饵或微生物制剂使用等因素的影响,养殖水体的pH值常会发生波动或剧烈变化,监测结果表明,池塘养殖水体的pH值在4.0~10.0范围内大幅度波动(韩莎等,2018b)。近年来,在外海海域,受海洋酸化、赤潮、绿潮等影响,外海的pH值也会发生大幅波动。随着刺参养殖产业的发展,尤其是“东参西养”和“北参南养”模式的快速发展,刺参养殖区从最初的自然分布区逐步拓展到黄河三角洲地区和闽浙沿海,刺参的养殖模式涉及外海底播增殖、滩涂的围堰养殖、池塘养殖以及陆基的工厂化养殖等多种模式,养殖用水的pH受相应因素的影响波动较大,pH值变化会对良种的生理、生长及优良性状的表现产生影响。本研究测定了不同pH条件下刺参“参优1号”的生长、存活、呼吸代谢以及非特异性免疫酶活性变化,旨在探明“参优1号”对pH的适应性,分析不同pH条件下“参优1号”苗种的生长、呼吸代谢和免疫等特征变化,进而确定其最适pH条件及其耐受机制,为该良种的推广提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用刺参苗种为2019年中国水产科学研究院黄海水产研究所在青岛瑞滋集团有限公司培育

的“参优1号”苗种,平均规格为 (5.00 ± 0.75) g/头。选取活力良好的个体,在水槽中暂养7d后进行实验。

1.2 实验方法

根据刺参对pH的耐受特点和各养殖模式下海水的pH变化范围,本研究设8个pH梯度:6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5和10.0。实验所用海水以砂滤洁净海水为基础,利用NaOH或HCl调节至相应pH,采用pH测定仪测定相应pH,配制好的海水分别储备在单独的 1 m^3 的聚丙烯水槽中。各pH实验组所用养殖水槽为塑料水槽,水槽容积为30L。以自然海水pH值为基础,按照每天降低或升高0.5个pH对实验用海水进行酸碱度的梯度降低或升高。每个pH实验设置4个平行,每个平行放置30头刺参,其中3个平行用于测定相应实验条件下苗种的生长和存活,另外1个平行用于呼吸代谢和酶活性测定样品的获取。实验期间的养殖管理:每天投喂配合饲料1次,按照刺参体重的2%投喂,每天定时吸底、清污并补充相同pH的储存海水,换水量为50%。实验期间,每天观察并记录各实验组刺参的摄食、运动状况,及时挑出化皮死亡个体并绘制存活率曲线。根据实验前后刺参存活的个体数和平均体重计算各组存活率(Survival rate, SR)和特定生长率(Specific growth rate, SGR),设置相同的实验条件,在第7天测定各组刺参的呼吸代谢,在0、10、20和30d自各实验组中随机抽取刺参苗种,测定其非特异性免疫酶活性。

1.2.1 不同pH条件下刺参“参优1号”苗种的特定生长率和存活率 实验开始时,测定并计算苗种的初始平均体重。实验过程中,每天观察并记录苗种的存活数量,绘制存活率曲线图。实验结束时,测定并计算终末平均体重,采用以下公式计算苗种的存活率和特定生长率:

$$\text{存活率(SR)} = N_t/N_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(SGR)} = (\ln W_t - \ln W_0) \times 100/t$$

式中, N_0 和 N_t 分别为刺参初始苗种数量和终末存活苗种数量, W_0 和 W_t 分别为刺参苗种的初始平均体重和苗种的终末平均体重(g), t 为养殖天数。

1.2.2 不同pH条件下刺参“参优1号”苗种的呼吸代谢 各组到达设定的pH条件的第7天测定各实验组刺参的呼吸代谢,实验在2L呼吸瓶中进行,每个测试瓶中加入相应pH的海水和刺参,每个pH梯度设3个平行组,每组10头刺参,同时设置3个不添加刺参苗种的呼吸瓶作为空白对照组。所有呼吸瓶放入同一个温度为 16°C 的水槽中以保持相同的温度环境条件(章龙珍等,2009)。每个呼吸瓶放入刺参苗

种并加满相应 pH 的储存海水后,立即用橡皮塞封口,封口 4 h 后用虹吸法收集各呼吸瓶中的水样,用碘量法(GB17378.4-2007)和次溴酸钠氧化法(GB17378.4-2007)测定各样品中的溶解氧(DO)和氨氮(NH₃-N)浓度,根据如下公式计算相应 pH 条件下刺参的耗氧率(R_O)和排氮率(R_N),并进一步测算其氧氮比(O/N)。

$$\text{耗氧率}(R_O)=[(O_0-O_t)V]/(W\times t)$$

$$\text{排氮率}(R_N)=[(N_t-N_0)V]/(W\times t)$$

$$\text{氧氮比}(O/N)=(R_O/16)/(R_N/14)$$

式中, O_t 和 O_0 为实验结束时实验组和对照组水体的溶解氧浓度(mg/L), N_t 和 N_0 分别为实验结束时实验组和对照组水体的氨氮浓度(mg/L), t 为实验周期(h); W 为参与测试的刺参苗种的体重(g), V 为实验的水体体积(L)。

1.2.3 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的非特异性免疫酶活性变化 本研究实验周期为 30 d,分别在 0 d、10 d、20 d、30 d 自各 pH 组中随机抽取 3 头刺参苗种,解剖吸取体腔液,4℃ 条件下,3000 g 离心 10 min,吸取上清液,进行酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定,酶指标测定选用南京建成生物公司的试剂盒。

1.3 数据处理

利用 Graphpad Prism 8.0 软件进行图表绘制,用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),多重分析采用 Turkey 检验,按照 $P<0.05$ 对不同 pH 组相应测定指标的差异进行显著性检测。

2 结果与分析

2.1 pH 对刺参“参优 1 号”苗种存活的影响

实验期间,不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的存活率统计结果见图 1。由图 1 可以看出,pH 值对苗种存活影响很大,在 pH 6.5~9.5 条件下,苗种 30 d 存活率均为 100%,且苗种摄食、运动正常,附着力较强,而 pH 10.0 实验组,苗种活力下降,附着力降低,逐渐沉到水槽底部,摄食减少,部分个体出现化皮和死亡现象,到第 4 天苗种全部死亡,死亡率达 100%。

2.2 pH 对刺参“参优 1 号”苗种生长的影响

由于 pH 10.0 条件下测试苗种全部死亡,无法计算实验周期内苗种的 SGR,对 pH 6.5~9.5 各实验组苗种的 SGR 计算结果见图 2。由图 2 可以看出,在 pH 6.5~9.5 之间,苗种的 SGR 随 pH 升高呈先升高后

降低的趋势。在 pH 6.5~7.0 之间,苗种的 SGR 为负值;在 pH 7.5~8.5 之间,SGR 为正值,在 pH 9.0~9.5 范围内 SGR 降为负值。在 pH 6.5~8.0 之间,苗种的 SGR 显著升高($P<0.05$),在 pH 8.0~9.5 之间,SGR 逐渐降低。其中,在 pH 8.0 实验组 SGR 最高,最高值为 0.541%/d。

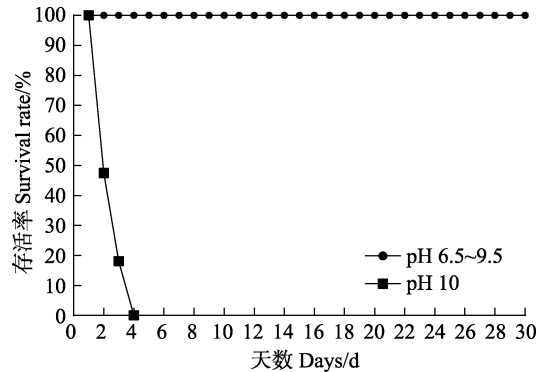


图 1 不同 pH 条件对刺参“参优 1 号”苗种的存活影响
Fig.1 Effect of pH on survival rate of sea cucumber “Shenyou No.1”

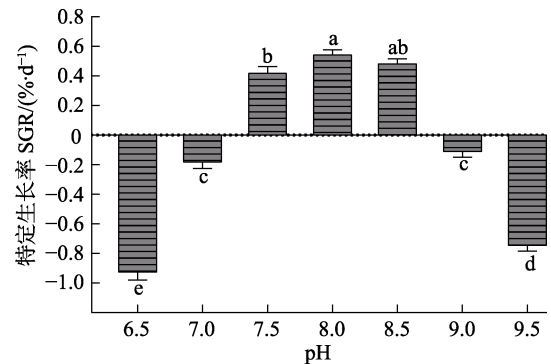


图 2 不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的特定生长率
Fig.2 Specific growth rate of sea cucumber “Shenyou No.1” under different pH

不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同
Different letters indicated significant different ($P<0.05$), the same as below

依据所测得的不同 pH 条件下的苗种的 SGR 数据并通过 excel 数据趋势,推导不同 pH 条件下生长率曲线公式,在 pH 6.5~9.5 范围内,pH 和苗种 SGR 的关系可以用以下公式表示: $SGR = -0.6298p^2 + 10.132p - 40.195$ ($R^2 = 0.9892$)。据公式推算出刺参“参优 1 号”在 pH 条件为 8.04 时,将获得最大的 SGR。

2.3 pH 对刺参“参优 1 号”苗种呼吸代谢的影响

不同 pH 条件下刺参“参优 1 号”苗种的 R_O 的测定结果见图 3。由图 3 可知,在 pH 6.5~9.5 范围内,随 pH 的升高 R_O 呈“V”型变化趋势,在 pH 6.5~8.0

范围内, 随着 pH 的上升 R_O 逐渐降低, 并在 pH 8.0 时达最低[19.07 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$]; 在 pH 8.0~9.5 范围内, 随 pH 的升高 R_O 逐渐升高。 R_O 在 pH 6.5 和 pH 9.5 组间无显著差异($P>0.05$), 均处于较高水平。

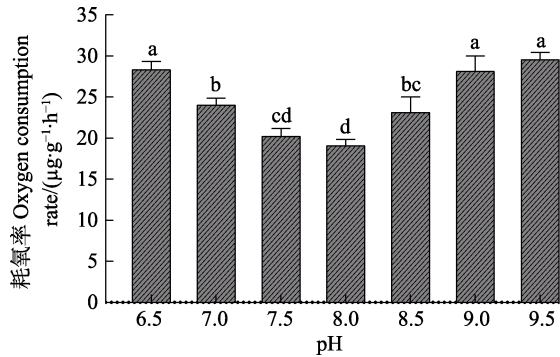


图3 不同 pH 条件下刺参“参优1号”苗种的耗氧率

Fig.3 Oxygen consumption rate of sea cucumber "Shenyou No.1" under different pH

不同 pH 条件下刺参“参优1号”苗种的 R_N 的测定结果见图4。从图4可知, 不同 pH 条件下苗种 R_O 变化趋势相似, 在 pH 6.5~9.5 范围内随着 pH 升高, 实验苗种的 R_N 呈“V”型变化趋势, 并在 pH 8.0 时实验组达到最低谷, 最低值为 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$; 并且苗种 R_N 在 pH 7.5 和 pH 8.5 之间以及 pH 6.5 和 pH 9.5 组间无显著差异($P>0.05$)。

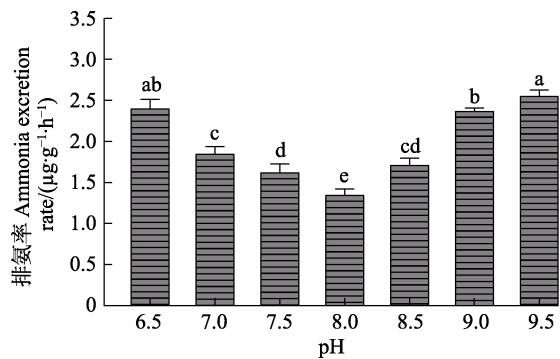


图4 不同 pH 条件下刺参“参优1号”苗种的排氨率

Fig.4 Ammonia excretion rate of sea cucumber "Shenyou No.1" under different pH

根据 R_N 和 R_O 计算不同 pH 条件下刺参苗种的 O/N 结果见表1。从表1可以看出, 不同的 pH 组 O/N 的值均在 11 左右, 在 pH 8.0 组苗种的 O/N 比最高, 为 12.40 ± 1.17 , 但不同 pH 条件下各实验组苗种的 O/N 无显著差异($P>0.05$)。

2.4 pH 对刺参“参优1号”苗种非特异性免疫酶活性的影响

由于在 pH 10.0 组实验过程中测试用苗种全部死

亡, 未对该实验组进行体腔液获取和酶指标的测定。本研究对 pH 6.5~9.5 条件下苗种的非特异性免疫酶活性(包括 ACP、AKP、LZM 和 SOD)的测定结果见图5~图8。

表1 pH 对刺参“参优1号”O/N的影响

Tab.1 Effect of pH on O/N of sea cucumber "Shenyou No.1"

pH	O/N
6.5	10.33 ± 0.89
7.0	11.40 ± 0.18
7.5	10.91 ± 0.25
8.0	12.40 ± 1.17
8.5	11.83 ± 1.51
9.0	10.39 ± 0.58
9.5	10.15 ± 0.16

对各实验组 ACP 酶活力的测定结果见图5, pH 为 8.0 的实验组, 在实验周期内的各时间点刺参“参优1号”苗种的 ACP 活性无显著变化($P>0.05$), 其余实验组 ACP 活性随养殖时间的延长呈波动起伏趋势。对比相同时间节点不同 pH 条件实验组的酶活力结果可以看出, 随着 pH 的升高 ACP 活性呈“V”型波动趋势, 且在 pH 8.0 时达到最低值。

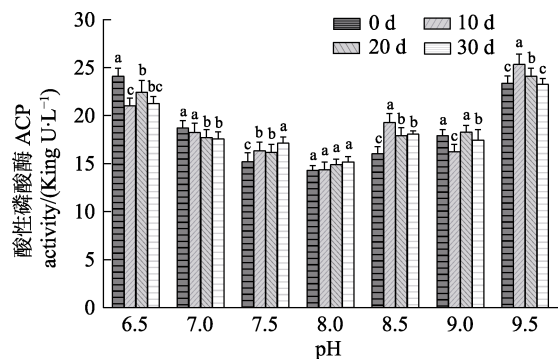


图5 pH 对刺参“参优1号”体腔液 ACP 活性的影响

Fig.5 Effect of pH on ACP activity of coelomic fluid in sea cucumber "Shenyou No.1"

对各实验组苗种 AKP 酶活力的测定结果见图6, 在 pH 6.5~9.5 范围内, AKP 的活性受 pH 影响变化显著, 在 pH 6.5~8.0 范围内, AKP 的活性随 pH 升高而逐渐降低, 并在 pH 为 8.0 时达到最低值, 且 pH 8.0 实验组不同时间点刺参“参优1号”苗种的 AKP 活力没有显著变化($P>0.05$); 在 pH 8.0~9.5 范围内, AKP 的活性随 pH 升高而逐渐升高。

不同 pH 对刺参“参优1号”体腔液中 LZM 活性的影响见图7。从图7可以看出, 在 pH 6.5~8.0 范围内, LZM 的活性随 pH 升高而逐渐降低, 并在 pH

为 8.0 时达到最低值,且 pH 8.0 实验组不同时间点刺参“参优 1 号”苗种的 LZM 活力没有显著变化($P>0.05$),pH 8.0~9.5 范围内,LZM 的活性随 pH 升高而逐渐升高;除 pH 8.0 组外,其他实验组 LZM 的活性随时间均呈先升高再降低的趋势,并在第 10 天到达到峰值。

不同 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液中 SOD 活性的影响见图 8。从图 8 可以看出,在 pH 6.5~9.5 范围内,0 d 和 10 d 时 SOD 活性随 pH 的升高呈“V”型变化趋势,最低值在 pH 8.0;20 d 和 30 d 时 pH 的

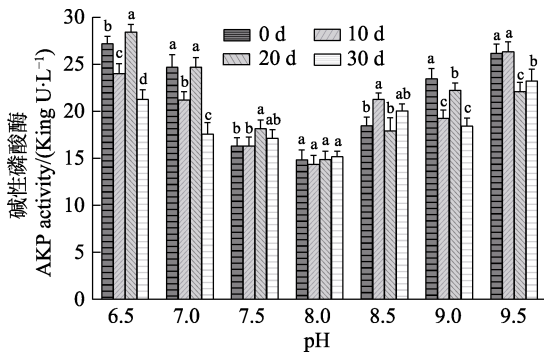


图 6 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 AKP 活性的影响

Fig.6 Effect of pH on AKP activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

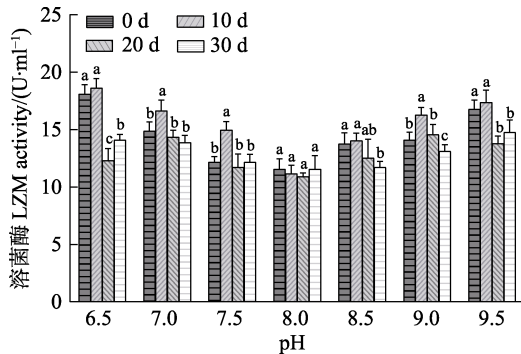


图 7 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 LZM 活性的影响

Fig.7 Effect of pH on LZM activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

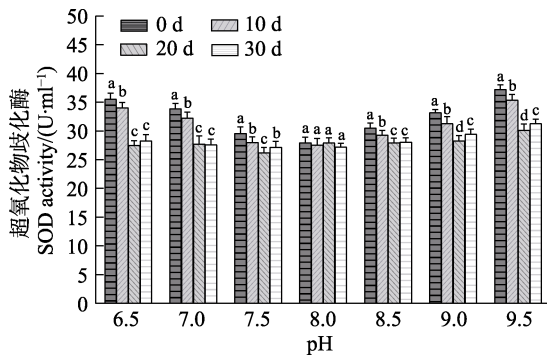


图 8 pH 对刺参“参优 1 号”体腔液 SOD 活性的影响

Fig.8 Effect of pH on SOD activity of coelomic fluid in sea cucumber “Shenyou No.1”

变化对 SOD 的活性影响相对较小;pH 8.0 实验组在实验周期内的不同时间点,刺参“参优 1 号”苗种的 SOD 活力变化不显著($P>0.05$);此外,各实验组 SOD 活性均在 0 d 时最高,在第 10 天时活性呈降低趋势,在 20 d 和 30 d 时活性较低。

3 讨论

3.1 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的适应性

水体 pH 值是水产养殖过程中的一个重要的环境因子,pH 的高低直接影响水生动物的生长及生理代谢(曹善茂等,2015;Hu *et al.*,2015)。刺参在 pH 不适宜时会出现棘刺收缩、身体卷曲、粪便变细变短、池底的残饵量增加等现象。在刺参养殖过程中,水体中的 pH 会因养殖管理、酸雨和水质污染等因素的影响而产生波动,而且不同池塘 pH 也存在差异,对水产新品种而言,选育目标性状决定了其在养殖业中的应用潜力,而新品种生态适应性则决定了其推广范围和区域。刺参“参优 1 号”是以抗灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)能力和生长速度为选育目标培育出的刺参新品种,为获得最大的良种贡献率,需要对该品种的酸碱度适应范围进行评估,以期根据不同区域养殖水域 pH 范围进行合理推广,从而发挥良种的最大贡献率。

水产动物对 pH 的适应范围存在物种的差异。相关研究表明,黄颡鱼(*Pseudobagrus fuvliraco*)在 pH 7.0~8.0 范围内生长较好(崔平等,2018),缢蛏(*Sinonovacula constricta*)在 pH 7.5~9.5 可正常存活(叶博等,2019),中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在幼蟹时期适宜的 pH 范围为 8.0~9.0(刘金生等,2016)。在本研究中,pH 10.0 实验组第 4 天苗种全部死亡,是由于水体碱性过高,刺参出现急性中毒现象;在 pH 7.5~8.5 之间苗种呈正生长,超出或低于此范围,苗种呈现负增长。研究表明,pH 值过高或过低导致海洋生物生长发育缓慢,是因为酸碱度的变化导致生物体内渗透压发生改变,为了维持体内的酸碱平衡,必然会转移部分用于其他生理过程的能量进行反馈补偿性代谢,从而影响了生物其他的正常生理活动,导致生长发育变慢(湛垚垚等,2013)。刘洋等(2020)研究发现,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)幼虫在 pH 低于 7.6 的条件下出现生长停滞现象。Asha 等(2005)研究发现,尖塔海参(*Holothuria spinifera*)幼虫的最适生存 pH 为 7.8,在 pH 达到 9.0 的时候实验个体已全部死亡。本研究缓慢调节 pH 后 30 d 的养殖实验结果表明,刺参“参优 1 号”的存活 pH 为 6.5~9.5,最适生长 pH 为 7.5~8.5。韩莎等(2018b)研究表明,青岛国家海洋科研中心选育

的刺参苗种适宜生长的 pH 范围为 7.6~8.8, 与本研究结果相近。Luo 等(2019)调研了大连刺参养殖池塘的 pH 年变化范围为 7.86~8.38, 表明该地酸碱度符合“参优 1 号”苗种的 pH 适应性, 有利于良种优势性状的发挥。

3.2 刺参“参优 1 号”在不同 pH 条件下的呼吸代谢特征

pH 波动会对水生生物产生一定的刺激, 从而导致呼吸代谢变化(Stumpp *et al.*, 2011、2012)。曹善茂等(2015)研究表明, 中华原钩虾(*Eogammarus sinensis*)在最适 pH 范围内的 R_O 和 R_N 均处在较高水平, Savant 等(1995)的研究也呈现相同的趋势。而朱爱意等(2007)研究显示, 褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)在最适 pH 范围内的 R_O 和 R_N 相对较低, 在 pH 不适时 R_O 和 R_N 会提高。本研究结果显示, pH 8.0 实验组刺参的 R_O 和 R_N 最低, pH 偏移会使 R_O 和 R_N 上升, 是由于在适宜的 pH 下, 机体的基础代谢较低, 耗能较少; 在 pH 胁迫下, 机体需要消耗更多的能量去维持体内的内环境平衡, 此趋势与章龙珍等(2009)对长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)幼鱼的研究结果类似。

氧氮比(O/N)是反映生物对环境适应情况和营养物质供能情况的指标(Ikeda, 1974), 不同的生物之间 O/N 受 pH 影响的变化趋势存在差异。O/N 表示生物体内蛋白质、脂肪和碳水化合物分解代谢之间的关系(曹善茂等, 2015)。Mayzalld(1976)提出, O/N 约为 7 时, 生物体能量完全由蛋白质氧化提供; Ikeda (1974)认为, O/N 约为 24 时, 生物体所需能量由蛋白质和脂肪氧化提供; 如果主要由脂肪或碳水化合物提供, O/N 将变为无穷大(Conover *et al.*, 1968)。相关研究表明, 中华小长臂虾(*Palaemonetes sinensis*)在 pH 4.0~9.0 之间 O/N 呈波动趋势, pH 的升高会使长肋日月贝(*Amusium pleuronectes*)的 O/N 升高, 在 pH 7.7 和 pH 8.7 的水体中文蛤(*Meretrix meretrix*)O/N 显著高于 pH 6.7 和 pH 9.7(姜宏波等, 2017; 严俊贤等, 2018; 杨杰青等, 2016)。本研究表明, pH 的变化对刺参 O/N 无显著影响, 说明 pH 的变化不会改变刺参代谢底物, 与上述研究结果不同的原因可能由于物种差异所致。

3.3 刺参“参优 1 号”苗种在不同 pH 条件下的免疫酶活性特征

水体中 pH 过高或者过低会影响刺参体腔液的酸碱度, 直接影响其各种生理过程。另外, pH 变化还会导致有益微生物的大量死亡, 病原菌及有害生物的

大量繁殖打破了水体中的生态平衡, 进而间接影响到刺参机体的代谢和免疫过程。研究表明, pH 胁迫会影响水产动物免疫酶的活性(魏炜等, 2001; 王维娜等, 2002), 因此, 可以通过检测刺参体内主要免疫酶的活性来反映对 pH 的适应情况。ACP 和 AKP 是动物体内参与免疫防御等活动的 2 种重要的水解酶, 是溶酶体酶的重要标志酶(文春根等, 2009)。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗应激酶, 它可以将机体内过多的 O_2^- 催化生成 H_2O_2 和 O_2 , 从而起到保护机体的作用(Sui *et al.*, 2016)。本研究结果表明, pH 变化显著影响了刺参“参优 1 号”的 ACP、AKP、LZM 和 SOD 活性。从相同 pH 条件下 30 d 实验期内酶指标的测定结果可以看出, LZM 活性在第 10 天最高, SOD 活性在第 0 天最高, 而后开始降低, ACP 和 AKP 则随时间延长呈波动变化, 表明刺参体腔细胞在应对 pH 变化过程中, 不同酶指标的变化响应时间存在差异性。Gullian 等(2017)研究发现, 墨西哥海参体内的 SOD 在 pH 7.7 的时候活性较高。Zhao 等(2010)通过添加酵母多糖进行 pH 胁迫(pH 为 5.5 和 10.0) 24 h 后, 使 LSZ 和 ACP 活性升高, 但其仅代表 24 h 的数据, 并未验证该 pH 条件下海参能否长期存活。赵先银等(2011)研究发现, 对虾的多种酶活性对不同 pH 条件的响应时间也存在差异。从不同的 pH 组之间酶指标的测定结果可以看出, 4 种免疫酶的活性均在最适生长的 pH 8.0 实验组最低, 随着 pH 的偏移, 4 种免疫酶活性均出现升高趋势, 变化趋势与付监贵等(2016)对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的研究结果类似; 樊甄姣等(2006)对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的研究也发现, 在 pH 7.0~9.0 之间, 实验组呈现出随 pH 偏移, 各种酶活性升高的现象; 文春根等(2009)研究发现, 无齿蚌(*Anodonta woodiana*)体内的多种免疫酶活性随 pH 的改变而出现波动变化, 可能是为避免环境对机体的损伤而发生的免疫调节反应, 也可能是由“毒物兴奋效应”所导致(Calabrese *et al.*, 2005)。

综上所述, 在刺参“参优 1 号”苗种养殖生产过程中应保持水体 pH 在 7.5~8.5 范围内, 苗种生长速度较快, pH 过高或过低均会引起刺参的应激反应, 表现为生长下降和存活率降低等现象, 生理指标表现为 R_O 和 R_N 升高以及免疫酶活性发生变化。因此, 在良种推广过程中, 应根据相应海域或养殖模式下的 pH 周年变化范围, 选择适宜的推广区域并控制养殖管理工艺, 避免暴雨、水体污染等自然或人为因素造成 pH 大幅波动, 保障良种在适宜的环境条件下生长, 以获得最佳良种贡献率。

参 考 文 献

- Asha PS, Muthiah P. Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquaculture*, 2005, 250(3-4): 823-829
- Calabrese E, Cook R. Hormesis: How it could affect the risk assessment process. *Human and Experimental Toxicology*, 2005, 24(5): 265-270
- Cao SM, Song B, Wang LM, *et al.* Effect of temperature, salinity and pH on respiration and excretion in gammarid *Eogammarus sinensis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(5): 519-532 [曹善茂, 宋博, 王利明, 等. 温度、盐度和 pH 对中华原钩虾呼吸和排泄的影响. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(5): 519-523]
- Conover RJ, Corner DES. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1968, 48(1): 49-75
- Cui P, Qiang J. Growth and hepatic SOD activity of darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* under influences of water pH and ammonia nitrogen. *Freshwater Fisheries*, 2018(4): 39-44 [崔平, 强俊. pH 与氨氮对黄颡鱼幼鱼生长与肝脏超氧化物歧化酶的影响. *淡水渔业*, 2018(4): 39-44]
- Fan ZJ, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Effect of pH on the immune factors of *Chlamys farreri*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 650-654 [樊甄姣, 杨爱国, 刘志鸿, 等. pH 对栉孔扇贝体内几种免疫因子的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 650-654]
- Fu JG, Zhang LL, Xu L, *et al.* Effects of pH on survival of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and activities of liver function enzymes. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(5): 100-104 [付监贵, 张磊磊, 徐乐, 等. pH 对日本沼虾存活及肝功能相关酶活性的影响. *淡水渔业*, 2016, 46(5): 100-104]
- Gullian KM, Terrats PM. Effect of pH on temperature-controlled degradation of reactive oxygen species, heat shock protein expression, and mucosal immunity in the sea cucumber *Isostichopus badiionotus*. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175812
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effect of pH stress on growth and activities of immune enzyme of different-sized sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Marine Sciences*, 2018a, 42(11): 51-58 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对不同规格刺参生长及免疫酶活性的影响. *海洋科学*, 2018a, 42(11): 51-58]
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Progress in Fishery Sciences*, 2018b, 39(5): 91-98 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018b, 39(5): 91-98]
- Hu M, Li L, Sui Y, *et al.* Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 573-583
- Ikedo T. Nutrition ecology of marine zooplankton. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1974, 22(1): 1-97
- Jiang HB, Bao J, Jiang CJ, *et al.* Effects of pH on survival and respiratory metabolism of Chinese grass shrimp (*Palaemonetes sinensis*). *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(2): 322-330 [姜宏波, 包杰, 姜春玖, 等. pH 对中华小长臂虾存活及呼吸代谢的影响. *动物学杂志*, 2017, 52(2): 322-330]
- Liao YL. *Fauna Sinica Echinodermata Holothuroidea*. Beijing: Science Press, 1997, 148-150 [廖玉麟. 中国动物志 棘皮动物门 海参纲. 北京: 科学出版社, 1997, 148-150]
- Liu JS, Wang J, Yue WC, *et al.* The effect of pH on the molting, growth and related gene expression in juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(4): 96-100 [刘金生, 王军, 岳武成, 等. 水体 pH 对中华绒螯蟹幼蟹蜕壳生长及其相关基因表达的影响. *淡水渔业*, 2016, 46(4): 96-100]
- Liu Y, Yu RH, Zhang Z, *et al.* Effects of different pH on embryo development and larval growth of bay scallop (*Argopecten irradians*). *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 108-114 [刘洋, 于瑞海, 张哲, 等. 不同 pH 对海湾扇贝胚胎发育及幼虫生长发育的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 108-114]
- Luo YM, Cheng Y, Li DH, *et al.* Annual variation of water quality in aquaculture ponds for *Apostichopus japonicus*. *Asian Agricultural Research*, 2019, 11(11): 25-27
- Mayzall P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton IV: The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. *Marine Biology*, 1976, 37: 47-58
- Savant KB, Amte GK. Influence of some environmental factors on respiratory responses in the tropical estuarine crab *Ilyoplax gangetica*. *Journal of Environmental Biology*, 1995, 16(4): 311-317
- Stumpp M, Trübenbach K, Brennecke D, *et al.* Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. *Aquatic Toxicology*, 2012, 110-111: 194-207
- Stumpp M, Wren J, Melzner F, *et al.* CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 160(3): 331-340
- Sui YM, Huang XZ, Kong H, *et al.* Physiological responses to salinity increase in blood parrotfish (*Cichlasoma synspilum* female × *Cichlasoma citrinellum* male). *Springerplus*, 2016, 5(1): 1-12
- Wang SY, Wang X, Jiang ZQ, *et al.* Effects of pH on growth and

- biochemical indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(6): 42–46 [王双耀, 王鑫, 姜志强, 等. pH 值对大菱鲆生长及鱼体生化组成的影响. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 42–46]
- Wang WN, Sun RY, Wang AL, *et al.* Effect of different environmental factors on the activities of digestive enzymes and alkaline phosphatase of *Macrobrochium nipponense*. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(9): 1153–1156 [王维娜, 孙儒泳, 王安利, 等. 环境因子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1153–1156]
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effect of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- Wei W, Zhang HY, Shi AJ. The study of relationship between acid phosphatase activity and oyster defence. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001(4): 413–415 [魏炜, 张洪渊, 石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究. 水生生物学报, 2001(4): 413–415]
- Wen CG, Zhang LH, Hu BQ, *et al.* Effect of pH on the five immune factors of *Anodonta woodiana*. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2009, 33(2): 172–176 [文春根, 张丽红, 胡宝庆, 等. pH 对背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 5 种免疫因子的影响. 南昌大学学报(理科版), 2009, 33(2): 172–176]
- Yan JX, Chen MQ, Wu KC, *et al.* Effect of salinity and pH on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate in Asian moon scallop *Amusium pleuronectes*. Fisheries Science, 2018, 37(2): 181–186 [严俊贤, 陈明强, 吴开畅, 等. 盐度和 pH 对长肋日月贝耗氧率和排氨率的影响. 水产科学, 2018, 37(2): 181–186]
- Yang JQ, Jiang M, Li L, *et al.* Effects of pH and salinity on respiration and excretion in *Meretrix meretrix*. Marine Fisheries, 2016, 38(4): 406–414 [杨杰青, 蒋玫, 李磊, 等. pH、盐度对文蛤呼吸与排泄的影响. 海洋渔业, 2016, 38(4): 406–414]
- Ye B, Cheng ZY, Peng MX, *et al.* Effects of pH and carbonate alkalinity on survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytic ability of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1724–1732 [叶博, 程之扬, 彭茂潇, 等. 急性 pH 和碳酸盐碱度对缢蛏存活率, Na^+/K^+ -ATPase 活性及血淋巴吞噬能力的影响. 水产学报, 2019, 43(8): 1724–1732]
- Zhan YY, Huang XY, Duan LZ, *et al.* Review on the impacts of ocean acidification on nearshore marine life. Journal of Dalian University, 2013, 34(3): 79–84 [湛焱焱, 黄显雅, 段立柱, 等. 海洋酸化对近岸海洋生物的影响. 大连大学学报, 2013, 34(3): 79–84]
- Zhang LZ, Yang JH, Liu JY, *et al.* Effects of water temperature, salinity, pH, and anaesthetics on oxygen consumption rate of juvenile *Siganus canaliculatus*. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(8): 1494–1498 [章龙珍, 杨金海, 刘鉴毅, 等. 温度, 盐度, pH 和麻醉剂对长鳍篮子鱼幼鱼耗氧率的影响. 生态学杂志, 2009, 28(8): 1494–1498]
- Zhao W, Liang M, Zhang P. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka under pH stress. Aquaculture International, 2010, 18(5): 777–786
- Zhao XY, Li J, Chen P, *et al.* Effects of pH stress on survival rate and activities of ion-transport enzyme, immune-related enzymes in three species of shrimps. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(5): 720–728 [赵先银, 李健, 陈萍, 等. pH 胁迫对 3 种对虾存活率、离子转运酶和免疫酶活力的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(5): 720–728]
- Zhu AY, Zhao XJ, Fu J. Study on the oxygen consumption rate and asphyxiation point of *Sebastiscus marmoratus*. Marine Fisheries Research, 2007, 28(1): 95–100 [朱爱意, 赵向炯, 付俊. 褐菖鲉耗氧率及窒息点的初步研究. 海洋水产研究, 2007, 28(1): 95–100]

(编辑 马瑾艳)

Metabolic Characteristics and Adaptability of a New Variety of Sea Cucumber “Shenyou No.1” under Different pH Conditions

RONG Xiaojun^{1,2}, LI Bin^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2①}, WANG Yingeng^{1,2}, WANG Zhiping^{1,2},
WANG Jinjin^{1,2}, YU Yongxiang^{1,2}, ZHANG Zheng^{1,2}, FAN Ruiyong³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Qingdao Ruizi Company, Qingdao 266408)

Abstract To determine the optimal pH conditions and pH adaptation mechanisms of the juveniles new sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) variety "Shenyou No.1", the differences in the growth, survival, respiratory metabolism, and immunoenzyme activity were analyzed under conditions of different pH (range: 6.5~10.0). The results showed that in the pH range of 6.5~9.5, the survival rate of the juveniles was 100% during the 30 days experimental period, whereas all juveniles died at pH 10.0. Within the pH range of 7.5~8.5, the juveniles showed a positive specific growth rate (SGR), and the highest SGR was 0.541%/d at pH 8.0, while the SGR was negative at the pH lower than 7.0 or higher than 9.0. The oxygen consumption rate (R_O) and ammonia excretion rate (R_N) were the lowest at pH 8.0, 19.07 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ and 1.34 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ for R_O and R_N , respectively. The oxygen-nitrogen ratios of the juveniles in different pH groups were approximately 11, and did not differ significantly with a pH change. The activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase, lysozyme, and superoxide dismutase in the coelomic fluid of *A. japonicus* significantly increased at different pH values. While adapting to pH stress, the superoxide dismutase activity in each pH group generally peaked at 0 d, while the lysozyme activity peaked at 10 d. The survival pH of "Shenyou No.1" ranged between 6.5~9.5, and the optimal pH for growth ranged between 7.5~8.5. Our results show that the changes in the pH lead to changes in respiratory metabolism and immune enzyme activity in "Shenyou No.1." These results provide the basis for the popularization of the new sea cucumber variety "Shenyou No.1".

Key words Sea cucumber “Shenyou No.1”; pH adaptation; Growth and survival; Respiratory metabolism; Nonspecific immune enzyme activities

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201219001

http://www.yykxjz.cn/

陈吉圣, 席世改, 秦传新, 郭禹, 潘莞倪, 邵广或. 光照强度对紫海胆浮游幼体生长及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 125-131

Chen JS, Xi SG, Qin CX, Guo Y, Pan WN, Shao GY. Effects of light intensity on growth and digestive enzyme activities of sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) larvae. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 125-131

光照强度对紫海胆浮游幼体生长及消化酶活性的影响*

陈吉圣^{1,2,3} 席世改¹ 秦传新^{1,2①} 郭禹^{1,2} 潘莞倪¹ 邵广或¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点开放实验室

农业农村部南海渔业资源环境科学观测实验站 中国水产科学研究院海洋牧场技术重点实验室 广州 510300;

2. 国家渔业资源环境大鹏观测实验站 深圳 518121; 3. 江苏海洋大学 连云港 222000)

摘要 本研究以紫海胆(*Anthocidaris crassispina*)为研究对象,通过水槽实验方法,模拟分析了自然光周期条件下光照强度对紫海胆浮游幼体生长、存活以及体内消化酶活性的影响,旨在为紫海胆苗种的规模化繁育提供必要的生物学参数。研究发现,在实验设计的光照强度梯度(0、500、1000、2000、3000 lx)内,光照强度对紫海胆浮游幼体的体长、躯干部骨针长度和口后腕骨针长度的影响趋势一致,影响程度由高到低为 500 lx>0 lx>1000 lx>2000 lx>3000 lx。在 500 lx 条件下,紫海胆浮游幼体的体长、躯干部骨针长度和口后腕骨针长度都达到最高,且显著优于其他实验组($P<0.05$),此时脂肪酶和淀粉酶活性最强;在 2000 lx 条件下,紫海胆的胃蛋白酶活性最强;在 3000 lx 条件下,紫海胆浮游幼体发育到 11 d 已全部死亡。研究表明,在 500 lx 光照强度下,紫海胆浮游幼体可保持最佳的生长速度、消化酶活性以及存活率,500 lx 为紫海胆浮游幼体生长发育的最佳光照强度。

关键词 紫海胆;光照强度;生长速度;消化酶活性

中图分类号 S953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0125-07

紫海胆(*Anthocidaris crassispina*)是一种名贵的海珍品,在浙、闽、台、粤、琼等省的沿海海域均有广泛分布,其性腺味道鲜美,且富含蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸等营养物质(席世改等,2020),性腺提取物“波利乃宁”(Bonellin)能抑制癌细胞的生长,可作为抗癌药物的材料(廖承义,1985)。近年来,随着野生紫海胆被过度捕捞,野生资源日渐枯竭,养殖海胆逐渐成为海胆性腺摄取及食用的主要来源,对人工养殖技术需求越来越高。20 世纪以来,许多学者在紫海胆人工育苗、摄食习性及呼吸代谢等方面进行

了系统研究(杨章武等,2001;冯雪等,2012;聂永康等,2016;莫宝霖等,2017;席世改等,2020)。

光照强度(即单位面积上所接受可见光的光通量,单位为 lx)作为水生生物生长的重要环境因子,它直接或间接影响着水生生物的栖息选择、生长发育、摄食、繁殖、昼夜活动节律等生理活动(周显青等,2000;孙德文等,2003;王想等,2020)。相关学者在光照强度对水生生物生长及存活、摄食等方面的影响进行了研究。薛素燕等(2007)研究发现,强光照组刺参幼参的生长明显快于暗光照组;郭文学等

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901605)和中国水产科学研究院中央级科研院所基本科研业务费专项资金(2020SY01)共同资助 [This work was supported by the National Key R&D Program of China (2018YFD0901605), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS (2020SY01)]. 陈吉圣, E-mail: 1653580929@qq.com

① 通讯作者: 秦传新, 副研究员, E-mail: qincx@scsfri.ac.cn

收稿日期: 2020-12-19, 收修改稿日期: 2021-01-19

(2014)研究发现,哲罗鱼(*Hucho taimen*)存活率、体长、体质量及特定生长率参数均随光照强度的增加而增加;光照周期对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)仔稚鱼的摄食、消化酶活力均有显著影响(周胜杰等, 2018; 李宝山等, 2019); 杨军等(2016)研究发现,光照强度影响光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)的聚集率,并验证了光棘球海胆的避光特性。为提高海胆人工养殖技术,对不同光照条件下海胆幼体的生长特性研究至关重要。因此,本研究运用模拟自然光周期的方法,探究不同光照强度对紫海胆浮游幼体不同发育阶段的生长、存活以及体内消化酶活性的影响,不仅可以丰富棘皮动物的生理生态学理论,也可为紫海胆的人工养殖技术的提高提供实践指导和科学依据。

1 材料与方法

1.1 浮游幼体的培育

实验用紫海胆亲体采自福建省厦门附近海域,航空运输至中国水产科学研究院南海水产研究所三亚热带水产研究院。紫海胆亲体经过阴干运输,移入育苗水泥池中,采用流水刺激的方法,使其自然产卵、受精。受精卵经 38 h 发育,于两腕浮游幼体期,用 200 目和 400 目(200 目过滤杂质,400 目收集幼体)筛绢网滤出、清洗,再移至育苗水泥池中培养,培养密度为 0.04 个/ml。

浮游幼体培育期间,每日换水 50%, 08:30 和 17:30 投喂纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)和叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)的等比例混合藻液。每次投喂 $1 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ 个/ml 混合藻液 2 L。浮游幼体培育期间水体体积为 450 L,水温(29.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 ± 0.1 、盐度 31.4 ± 0.9 。藻类均取自中国水产科学研究院南海水产研究所三亚热带水产研究院藻种室,采用 f/2 培养液自然光照培养。实验全程保持每个实验桶的水温、pH 和盐度的相对恒定。

1.2 实验方法

实验设置的光照强度为 0(全黑暗)、500、1000、2000 和 3000 lx,每个梯度设 3 个重复,测定光照强度对紫海胆浮游幼体体长生长和消化酶活性的影响。养殖容器为 760 L 的 PVC 水桶。实验中每组的光照强度通过更换每个水桶上方的灯泡功率及调整光源距离来实现,并用照度计(Lx meter AR813A)于水面上方 3 cm 处测定光照强度。为避免自然光与实验组光源的干扰,每个水桶上方均覆盖黑色遮光布,期间采用

12 L : 12 D(08:00~20:00)光照周期,全黑暗处理每天总计约有 30 min 暴露在光照下进行投喂、换水、吸底等日常操作。

实验自紫海胆两腕浮游幼体期即 2 日龄开始,至 18 日龄变态期结束。根据其发育阶段分别于实验的 8 d(四腕幼体)、11 d(六腕幼体)、16 d(八腕幼体)取样(混匀培育水体,随机多点取样)并保存于 -80°C 冰箱。

光照强度对紫海胆浮游幼体体长的影响实验使用 Toup View 图像分析软件进行拍照并测量大小,具体为各实验组紫海胆浮游幼体样品的体长、躯干部骨针长度和口后腕骨针长度。

光照强度对紫海胆浮游消化酶活性的影响实验采用可见分光光度法,用酶标仪(WD-2012B,北京六一生物科技有限公司)测量各样品消化酶的活性。淀粉酶活性采用北京雷根生物淀粉酶(Amylase)检测试剂盒,胃蛋白酶活性采用北京索莱宝胃蛋白酶(Pepsin)试剂盒,脂肪酶活性用索桥生物脂肪酶(Lipase)试剂盒,具体步骤均按试剂盒说明书进行操作。

1.3 数据处理

数据使用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 统计软件进行正态性和方差齐性检验,所有数值均采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异显著。采用 Origin 8.1 绘制紫海胆浮游幼体体长变化和消化酶活性变化图。

2 结果

2.1 不同光照强度下浮游幼体的生长率

紫海胆浮游幼体的生长数据见图 1,光照强度对紫海胆浮游幼体的体长、躯干部骨针长度和口后腕骨针长度的影响表现一致。趋势由高到低为 500 lx > 全黑暗 > 1000 lx > 2000 lx > 3000 lx。在 500 lx 条件下,紫海胆浮游幼体的体长、躯干部骨针长度和口后腕骨针长度都达到最高,生长最快且显著高于其他实验组($P < 0.05$)。而在 3000 lx 条件下,紫海胆浮游幼体发育到 11 d 于四腕幼体期停止生长,全部死亡。

2.2 不同光照强度下浮游幼体的消化酶活性

紫海胆浮游幼体的脂肪酶活性见图 2,紫海胆四腕幼体阶段的脂肪酶活性随着光照强度的增加呈现先下降后上升的趋势。在光照强度为 1000 lx 时,脂肪酶活性最低。光照强度 500 lx 时,脂肪酶活性最强,但与其他实验组差异不显著($P > 0.05$)。紫海胆六腕幼体阶段的脂肪酶活性活性差别较小,光照强度为

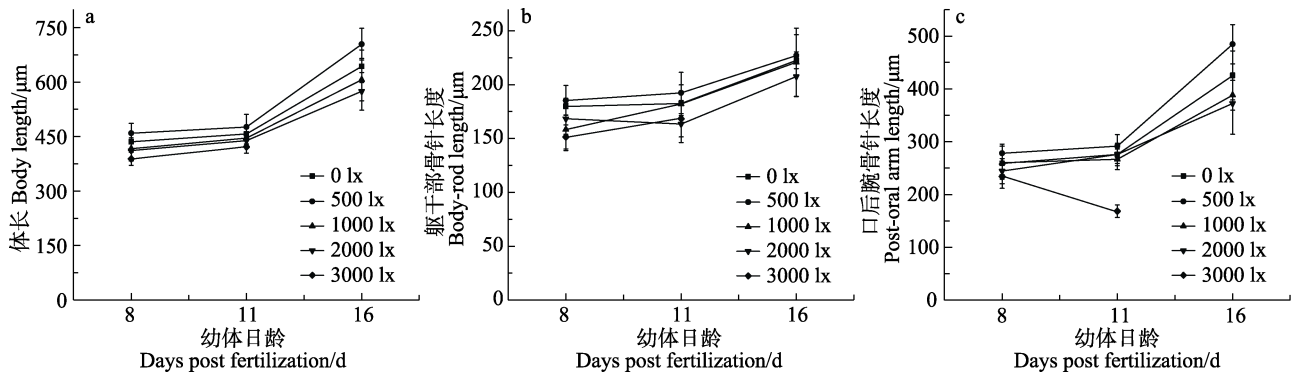


图 1 不同光照强度下浮游幼体体长(a)、躯干部骨针长度(b)和口后腕骨针长度(c)

Fig.1 Effects of light intensity on larval length (a), body-rod length (b), and post-oral arm length (c) of sea urchin larvae

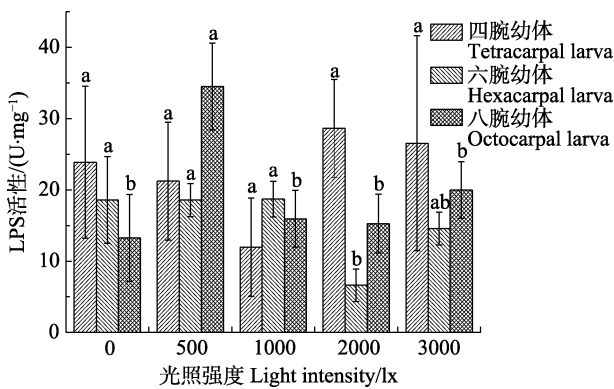


图 2 光照强度对紫海胆浮游幼体脂肪酶活性的影响

Fig.2 Effects of light intensity on lipase activity of sea urchin larvae

上标不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同或含有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下同

Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$), the same or containing same letters means no significant difference ($P > 0.05$). The same as below

1000 lx 时, 脂肪酶活性最低, 与其他实验组差异显著($P < 0.05$)。紫海胆八腕幼体阶段的脂肪酶活性随光照强度增加呈先上升后下降的趋势。光照强度 500 lx 时, 脂肪酶活性最强, 与其他实验组相比差异显著($P < 0.05$)。

紫海胆浮游幼体的淀粉酶活性见图 3, 该阶段淀粉酶活性随光照强度的增加呈先上升后下降的趋势。在光照强度为 500 lx 时, 淀粉酶活性最强, 与其他实验组差异显著($P < 0.05$)。光照强度为 3000 lx 时, 淀粉酶活性最低, 与其他实验组相比差异显著($P < 0.05$)。

紫海胆浮游幼体的胃蛋白酶活性如图 4 所示。紫海胆六腕阶段光照强度对胃蛋白酶活性的影响较大, 随着光照强度的增强呈先下降后上升的趋势。在光照强度为 2000 lx 时, 紫海胆六腕阶段的胃蛋白酶活性最强, 与其他实验组之间差异显著($P < 0.05$)。在光照强度为 3000 lx 时, 胃蛋白酶活性最低, 与其他实验

组之间差异显著($P < 0.05$)。

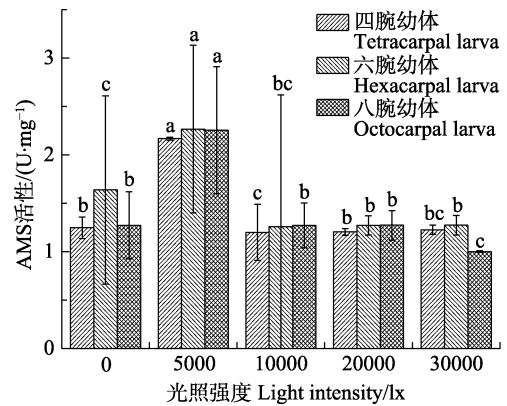


图 3 光照强度对紫海胆浮游幼体淀粉酶活性的影响

Fig.3 Effects of light intensity on amylase activity of sea urchin larvae

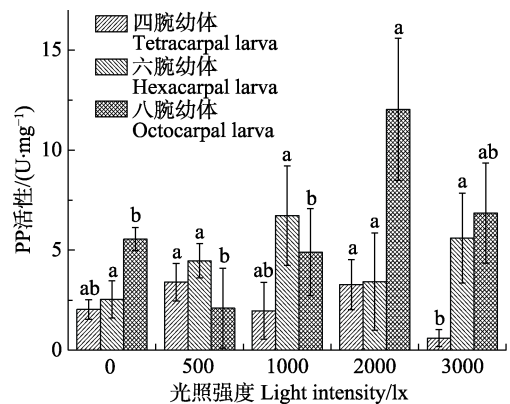


图 4 光照强度对紫海胆浮游幼体胃蛋白酶活性的影响

Fig.4 Effects of light intensity on pepsin activity of sea urchin larvae

3 讨论

3.1 光照强度对紫海胆浮游幼体存活的影响

光照强度对水生生物生长的影响因种类不同而存

在显著差异。瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)适合在光照强度为 0~10 lx 的环境下生活(白艳勤等, 2014)。九孔鲍(*Haliotis diversicolor aquatilis*)幼鲍最适宜的光照强度为 700~1000 lx (严正凜等, 2001)。大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)的生长速度在强光下高于在弱光下。北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)幼体生长速度在 50 lx 的光照强度下最快, 死亡率最低(Minagawa, 1994)。刺参(*Apostichopus japonicus*)幼体生长速度随着光照强度的增加而减慢, 在光照强度为 50 lx 的光照环境下, 生长速度最快(张鹏等, 2013)。参考光照强度对刺参行为特性的影响(张硕等, 2006)及海参大多选择光强强度较低的区域栖息(常亚青等, 2004)等信息, 紫海胆浮游幼体通过调整昼夜活动节律来寻找较弱光照强度更适合其生长发育。经此次实验发现, 光照强度对紫海胆浮游幼体的生长发育影响显著, 在 500 lx 光照环境下生长最快且存活率最高, 全黑暗次之; 在 3000 lx 下生长最慢且存活率最低, 在发育至 11 d 时全部死亡。光照可直接或间接影响同为棘皮动物刺参幼参的摄食等生理活动(魏子仲等, 2014), 分析认为, 3000 lx 光照强度代表自然生长环境中阳光辐射过强或过于靠近水体表层, 超过了紫海胆浮游幼体承受的临界值, 使其摄食效率下降, 不能积蓄充足能量继续生长发育, 最终死亡, 导致存活率下降, 而光照强度对紫海胆浮游幼体摄食效率的影响也有待继续探究。

3.2 光照强度对紫海胆浮游幼体消化酶活性的影响

消化酶的主要功能是消化和分解生物从外界摄取的食物, 为个体提供生长发育、繁殖和昼夜活动等所需的能量, 其活力的大小能够反映水生物消化生理的基本特征, 环境因子的变化会导致身体失去更多的能量, 这在一定程度上就需要消化酶更活跃地消化食物, 以保证能量的正常供应(任晓伟, 2008)。目前, 主要的研究方向为饲料脂肪水平、不同蛋白源、环境因子(温度、pH 等)对消化酶的影响(李俊辉等, 2011; 侯受权等, 2016; 左然涛等, 2017)。

光照是水生生物生长的重要的环境因子, 光照强度对水生生物生理活动的影响体现在多方面(周显青等, 2000)。王芳等(2006)研究发现, 完全黑暗下, 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)稚虾的蛋白酶活力最强。魏子仲等(2014)研究发现, 在 2000 lx 光照强度下, 刺参幼参的消化酶和脂肪酶活性最强; 1000 lx 光照强度下蛋白酶活力最强。本研究结果表明, 在光照强度为 500 lx 时, 紫海胆浮游幼体的脂肪酶和淀粉酶活性最强, 在光照强度为 2000 lx 时, 胃蛋白酶活

性最强, 可见不同消化酶对光照强度的响应存在差异, 且光照强度的增加在一定程度上促进了消化酶活性。光照强度的变化改变了紫海胆浮游幼体的 3 种消化酶活性, 并最终导致其存活率的改变。

3.3 光照强度对紫海胆浮游幼体不同阶段的消化酶活性的影响

研究表明, 生物在不同生长发育阶段的消化酶活性也有所不同。随着大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的发育, 其体内的蛋白酶活性呈逐渐降低趋势, 而脂肪酶和淀粉酶活力呈上升趋势(席峰等, 2003)。随着牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的发育, 其体内的蛋白酶、脂肪酶活性逐渐增强, 而淀粉酶活性呈下降趋势(王宏田等, 2002)。随着刺参从幼体发育到稚参, 体内的蛋白酶和淀粉酶活力呈上升趋势, 而褐藻酸酶的活性呈下降趋势(唐黎等, 2007)。本研究中, 紫海胆不同发育阶段幼体的各种消化酶活性也有所不同, 通过对比发现, 脂肪酶和淀粉酶活性在八腕幼体阶段有所下降, 而胃蛋白酶活性有所上升, 分析认为, 与其生活方式转变和食性变化有关, 这期间由浮游生活转变为底栖附着生活, 食性也由浮游生物逐渐过渡到底栖硅藻及有机碎屑, 食谱中逐渐出现动物性蛋白, 由此表现在其消化酶中胃蛋白酶的活性逐渐优于其他 2 种消化酶。

4 结论

本研究表明, 紫海胆浮游幼体在弱光环境的生长发育过程明显优于强光环境, 光照强度为 500 lx 时, 生长率最佳且能保持良好存活率; 光照强度为 3000 lx 时生长最慢且死亡率最高。特定光照强度对紫海胆浮游幼体不同消化酶的影响不同, 光照强度为 500 lx 时, 脂肪酶、淀粉酶活性最强; 光照强度为 2000 lx 时, 胃蛋白酶活性最强; 光照强度为 1000 lx 时, 脂肪酶活性最低; 光照强度为 3000 lx 时, 淀粉酶、胃蛋白酶活性最低。综上可知, 高光照强度降低了紫海胆浮游幼体的生长率、存活率及消化酶的活性, 是紫海胆浮游幼体生长发育的不利因素。在本实验条件下, 500 lx 的光照强度下, 紫海胆浮游幼体有最高生长率且存活率良好, 总消化酶活性最强且各消化酶活性最均衡, 是其生长发育的最佳光照强度, 结合紫海胆浮游幼体的发育阶段, 在日常生产管理中, 或可通过控制光照强度来提高紫海胆的生长发育效果。目前, 光照强度对紫海胆幼体生长发育影响的相关内容尚不完善, 未来可细化弱光照强度梯度探讨最适宜其生长的弱光环境, 对此方面的研究内容做出补充, 既

能丰富该方面的生理生态学知识,也能继续为紫海胆的人工增养殖提供科学指导和依据。

参 考 文 献

- Bai YQ, Wang X, Liu DF, *et al.* The preferable light intensity and color for darkbarbel catfish and silver carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(2): 216–221 [白艳勤, 王雪, 刘德富, 等. 瓦氏黄颡鱼和鲢对光照强度和颜色的选择. *水生生物学报*, 2014, 38(2): 216–221]
- Chang YQ, Ding J, Song J, *et al.* Biological research and breeding of sea cucumber and sea urchin. Beijing: China Ocean Press, 2004, 245–269 [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004, 245–269]
- Feng X, Chen PM, Qin CX, *et al.* Effects of temperature and weight on respiratory metabolism of wildlife *Anthocidaris crassispina* in South China Sea. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(23): 123–125, 131 [冯雪, 陈丕茂, 秦传新, 等. 温度和体重对南海野生紫海胆呼吸代谢的影响. *广东农业科学*, 2012, 39(23): 123–125, 131]
- Guo WX, Yin JS, Tong GX, *et al.* Effects of water flow and lighting on juvenile *Hucho taimen*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(2): 265–273 [郭文学, 尹家胜, 佟广香, 等. 养殖方式、光照强度对哲罗鱼稚鱼生长与存活的影响. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 265–273]
- Hou SQ, Zuo RT, Chang YQ, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance, digestive enzyme activity and antioxidative capacity after heat stress in juvenile sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(5): 538–543 [侯受权, 左然涛, 常亚青, 等. 饲料脂肪水平对中间球海胆幼胆生长、消化酶和热胁迫后抗氧化酶活力的影响. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(5): 538–543]
- Li BS, Sun YZ, Wang SX, *et al.* Effects of daily photoperiod on feed consumption, digestive enzyme activities and blood hormone of turbot *Scophthalmus maximus* L. juveniles. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(1): 69–77 [李宝山, 孙永智, 王世信, 等. 日光照周期对大菱鲆幼鱼摄食、消化酶活力与血清激素含量的影响. *水生生物学报*, 2019, 43(1): 69–77]
- Li JH, Wang QH, Du XD, *et al.* Effects of temperature and pH on digestive enzyme activities in hepatopancreas of pearl oyster *Pinctada martensii*. *Fisheries Science*, 2011, 30(2): 115–117 [李俊辉, 王庆恒, 杜晓东, 等. 温度和 pH 对马氏珠母贝肝胰脏消化酶活力的影响. *水产科学*, 2011, 30(2): 115–117]
- Liao CY. A preliminary study on the artificial rearing of the larver and juveniles of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1985, 15(4): 71–81 [廖承义. 马粪海胆人工育苗的初步研究. *山东海洋学院学报*, 1985, 15(4): 71–81]
- Minagawa M. Effects of photoperiod on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina*. *Aquaculture*, 1994, 120(1–2): 105–114
- Mo BL, Qin CX, Chen PM, *et al.* Feeding habits of the purple sea urchin *Heliocidaris crassispina* based on stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 566–575 [莫宝霖, 秦传新, 陈丕茂, 等. 基于碳、氮稳定同位素技术的大亚湾紫海胆食性分析. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 566–575]
- Nie YK, Chen PM, Zhou YB, *et al.* Preliminary study on feeding habits of *Anthocidaris crassispina*. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 1–8 [聂永康, 陈丕茂, 周艳波, 等. 南方紫海胆摄食习性的初步研究. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 1–8]
- Ren XW. Effects of environmental and nutritional factors on the activities of digestive enzymes in juvenile tongue-sole *Cynoglossus semilaevis*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 [任晓伟. 环境因子和营养水平对半滑舌鳎消化酶活性的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Sun DW, Zhan Y, Xu ZR. Study on technique of large-scaled culture of the clone of laminarian gametocyte. *Shandong Fisheries*, 2003, 20(5): 35–37 [孙德文, 詹勇, 许梓荣. 光照在水产动物养殖业的作用研究. *齐鲁渔业*, 2003, 20(5): 35–37]
- Tang L, Wang JQ, Xu C, *et al.* Activities of four digestive enzymes in various developmental larvae and in alimentary canals at various sizes of *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 275–277 [唐黎, 王吉桥, 许重, 等. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性. *水产科学*, 2007, 26(5): 275–277]
- Wang F, Song CM, Ding S, *et al.* Effects of light on specific activities of three digestive enzymes in juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 1028–1032 [王芳, 宋传民, 丁森, 等. 光照对中国对虾稚虾 3 种消化酶活力的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 1028–1032]
- Wang HT, Zhang PJ. Activities of digestive enzyme in different tissues of *Paralichthys olivaceus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2002, 33(5): 472–476 [王宏田, 张培军. 牙鲆体内消化酶活性的研究. *海洋与湖沼*, 2002, 33(5): 472–476]
- Wang X, Ren XY, Sheng XZ, *et al.* Effects of different photoperiods on growth, molting and glucose metabolism of *Marsupenaeus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 66–73 [王想, 任宪云, 绳秀珍, 等. 不同光照周期对日本囊对虾生长、蜕皮和糖代谢的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 66–73]
- Wei ZZ, Zhao W. Effect of light intensity on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* under two kinds of culture methods. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(1): 237–242 [魏子仲, 赵文. 光照强度对不同养殖方式下刺参幼参生长和消化酶活性的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(1):

- 237–242]
- Xi F, Lin LM, Wang ZY. Activities of digestive enzymes during development period in *Pseudosciaena crocea*. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(4): 301–304 [席峰, 林利民, 王志勇. 大黄鱼发育进程中消化酶的活力变化. 中国水产科学, 2003, 10(4): 301–304]
- Xi SG, Qin CX, Ma ZH, *et al.* Effects of dietary microalgae on growth and survival of larval development of sea urchin (*Anthocidaris crassispina*). South China Fisheries Science, 2020, 16(2): 115–120 [席世改, 秦传新, 马振华, 等. 微藻饵料对紫海胆浮游幼体生长及存活影响的研究. 南方水产科学, 2020, 16(2): 115–120]
- Xue SY, Fang JG, Mao YZ, *et al.* The influence of different light intensity on growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Marine Fisheries Research, 2007, 28(6): 13–18 [薛素燕, 方建光, 毛玉泽, 等. 不同光照强度对刺参幼参生长的影响. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 13–18]
- Yan ZL, Chen JH, Wu PR, *et al.* The influence of light intensity of the larvae and juvenile abalone on the growth and survival of *Haliotis diversicolor aquatilis*. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(4): 336–341 [严正凇, 陈建华, 吴萍茹, 等. 光照强度对九孔鲍幼虫及幼鲍生长存活的影响. 水产学报, 2001, 25(4): 336–341]
- Yang J, Liu YH, Tian T, *et al.* Behavior and aggregation of sea urchin *Strongylocentrotus nudus* to reefs under the simulated water current and illumination at seafloor. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(2): 219–224 [杨军, 刘永虎, 田涛, 等. 模拟海底水流和光照条件下光棘球海胆行为特征及其聚礁效果的初步研究. 大连海洋大学学报, 2016, 31(2): 219–224]
- Yang ZW, Li ZL, Zheng YY, *et al.* A study on artificial rearing of larvae and juveniles of *Anthocidaris crassispina*. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2001, 20(1): 32–36 [杨章武, 李正良, 郑雅友, 等. 紫海胆人工育苗技术的研究. 台湾海峡, 2001, 20(1): 32–36]
- Zhang P, Dong SL. Effect of light intensity on the growth and energy allocation of green and red variants of *Apostichopus japonicas* Selenka. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 778–784 [张鹏, 董双林. 光照强度对青色系与红色系仿刺参生长与能量分配的影响. 中国水产科学, 2013, 20(4): 778–784]
- Zhang S, Chen Y, Sun MC. Behavior characteristics of *Apostichopus japonicus* and attractive effects of artificial reef models under different light intensities. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 20–27 [张硕, 陈勇, 孙满昌. 光强对刺参行为特性和人工礁模型集参效果的影响. 中国水产科学, 2006, 13(1): 20–27]
- Zhou SJ, Hu J, Yu G, *et al.* Effects of photoperiod on digestive enzyme activity in larval and juvenile barramundi *Lates calcarifer* (Bloch). Marine Sciences, 2018, 42(6): 63–69 [周胜杰, 胡静, 于刚, 等. 光周期对尖吻鲈仔稚鱼消化酶活性的影响. 海洋科学, 2018, 42(6): 63–69]
- Zhou XQ, Niu CJ, Li QF, *et al.* Effects of light on feeding behavior, growth and survival of aquatic animals. Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, 24(2): 178–181 [周显青, 牛翠娟, 李庆芬. 光照对水生动物摄食、生长和存活的影响. 水生生物学报, 2000, 24(2): 178–181]
- Zuo RT, Li G, Wu FX, *et al.* Effects of different protein sources on the growth performance, digestive enzyme activities, gonadosomatic index and amino acid profile in juvenile sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*). Feed Industry Magazine, 2017, 38(22): 17–21 [左然涛, 李广, 吴反修, 等. 饲料中不同蛋白源对中间球海胆生长、消化酶活力、性腺指数及氨基酸组成的影响. 饲料工业, 2017, 38(22): 17–21]

(编辑 冯小花)

Effects of Light Intensity on Growth and Digestive Enzyme Activities of Sea Urchin (*Anthocardis crassispina*) Larvae

CHEN Jishen^{1,2,3}, XI Shigai¹, QIN Chuanxin^{1,2①}, GUO Yu^{1,2}, PAN Wann¹, SHAO Guangyu¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Scientific Observing and Experimental Station of South China Sea Fishery Resources and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300; 2. National Fishery Resources and Environment Dapeng Observation and Experimental Station, Shenzhen 518121; 3. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000)

Abstract In this study, the effects of light intensities on the growth rate (GR) and digestive enzyme activity of purple sea urchin (*Anthocardis crassispina*) larvae were studied by simulating and analyzing the natural light cycle through the flume experiment method, aiming to provide necessary biological parameters for the large-scale breeding of juvenile sea urchins. The sea urchin larvae were exposed to different light intensities (0 lx, 500 lx, 1000 lx, 2000 lx, and 3000 lx) for 18 days (12 h light:12 h dark, 08:00~20:00) and samples were taken on days 8, 11, and 16). The GR was examined to identify the size (larval length, body-rod length, and post-oral arm length). The activities of digestive enzymes (amylase, lipase, and protease) were examined to elucidate their response to light intensities. At the end of the experiment, the GR under different light intensities decreased as follows: 500 lx > 0 lx > 1000 lx > 2000 lx > 3000 lx. The larval length, body-rod length, and post-oral arm length of sea urchin larvae in the 500 lx treatment were the highest among all light intensity treatments ($P < 0.05$), and the activities of lipase and amylase were the strongest. The maximum activity of protease was observed in the 2000 lx treatment ($P < 0.05$). By day 11, all sea urchin larvae died in the 3000 lx treatment. The results showed that the sea urchin larvae could maintain the best GR, digestive enzyme activity, and survival rate under 500 lx light intensity, which was the best light intensity for the growth and development of the sea urchin larvae.

Key words *Anthocardis crassispina*; Light intensity; Growth rate; Digestive enzyme activity

① Corresponding author: QIN Chuanxin, E-mail: qincx@scsfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201215005

http://www.yykxjz.cn/

谭杰, 马添翼, 陈爱华, 周晓群, 刘长琳, 葛建龙, 边力, 陈四清, 王学江. 血清素对刺参繁育效果的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 132-138

Tan J, Ma TY, Chen AH, Zhao XQ, Liu CL, Ge JL, Bian L, Chen SQ, Wang XJ. Effects of serotonin on reproductive performance and offspring quality of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 132-138

血清素对刺参繁育效果的影响*



谭杰^{1,2} 马添翼³ 陈爱华⁴ 周晓群⁵ 刘长琳^{1,2} 葛建龙^{1,2}
边力^{1,2} 陈四清^{1,2} 王学江^{6①}

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 威海市文登区海洋发展局 威海 264400; 4. 山东省乳山市海洋发展局 威海 264500;
5. 烟台市海洋经济研究院 烟台 264006; 6. 五洲丰农业科技有限公司 烟台 264000

摘要 本实验研究了在刺参(*Apostichopus japonicus*)人工促熟期间, 向刺参体内注射血清素对刺参繁育效果的影响。在实验条件下, 设置 20、50、100 和 200 $\mu\text{g/g}$ 亲参体重的 4 种血清素注射剂量, 每种剂量又按每 5、10、15 和 20 d 注射 1 次。以注射生理盐水的刺参为对照组, 不做处理的刺参作为空白组。实验结束时, 对亲参进行阴干流水升温刺激, 诱导亲参排放精卵, 检测雌参的繁殖力指标和子代质量指标。结果显示, 所有注射血清素的实验组雌参排放率均高于注射生理盐水的对照组和未处理的空白组, 其中, 按 50 $\mu\text{g/g}$ 亲参体重的剂量每 10 d 注射 1 次, 雌参排放率和平均产卵量最高, 分别为(33.3 \pm 1.9)%和(637.0 \pm 111.1)万粒/头亲参, 显著高于空白组和对照组。测定该组和空白组的子代质量指标, 该组的卵子卵径、受精率、受精卵孵化率、9 日龄幼体体长和幼体附着变态率分别为(165.0 \pm 3.5) μm 、(93.0 \pm 1.5)%、(82.7 \pm 1.2)%、(856.0 \pm 24.8) μm 和(24.0 \pm 1.9)%, 与空白组之间无显著差异。研究表明, 人工促熟期间向刺参体内注射血清素, 可促进刺参性腺发育, 提高繁育效果。

关键词 刺参; 血清素; 促熟; 排放率; 产卵量

中图分类号 S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0132-07

20 世纪 80 年代, 我国初步建立刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种人工繁育技术, 进入 21 世纪以来, 刺参养殖规模的持续扩大, 拉动了刺参苗种生产的快速发展。21 世纪初, 用于刺参人工繁育的亲参主要来源于养殖池塘或者海区自然成熟的刺参。采用养殖池

塘或自然海区的亲参, 往往因为天气原因, 错过亲参的捕捞时机, 而且自然成熟的亲参成熟时间晚, 苗种上市规格小, 放养后成活率低。为解决这一问题, 刺参亲参人工促熟技术逐步建立, 通过控制亲参培育的水温和营养条件, 来获得性腺发育成熟的亲参。人工

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901603)、农业农村部北方海水增养殖重点实验室基金(2018-KF-01)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0901603), Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2018-KF-01), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD40)]. 谭杰, E-mail: tanjie@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王学江, 高级农艺师, E-mail: zzk1140515379@163.com

收稿日期: 2020-12-15, 收修改稿日期: 2021-01-14

促熟获得的亲参,仍然存在成熟不同步、比自然成熟的亲参怀卵量低等问题,为获得足够的卵子,通常需要培育大量的亲参。

海洋无脊椎动物的中枢神经系统通过释放神经递质来控制繁殖行为(Nagaraju, 2011; Tanabe *et al.*, 2010)。利用此原理,可通过向甲壳动物体内注入外源激素来促进其性腺发育。研究表明,5-羟色胺即血清素能促进斑节对虾(*Penaeus monodon*)的卵巢组织发育(Wongprasert *et al.*, 2006; 温为庚等, 2009)。Meeratana 等(2006)证实,血清素能刺激罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的性腺发育和排放。本研究以刺参为实验对象,研究向人工促熟的刺参体内注射血清素对刺参繁育效果的影响,为进一步完善刺参人工促熟技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验刺参

实验刺参于2018年11月取自山东省乳山市海渊水产养殖公司养殖池塘。挑选2000头体格健壮、活力好的刺参作为亲参进行培育。亲参平均体重为(247.6±52.6)g,暂养于12 m³水泥池,水深为1 m。初始时,以自然水温培育,当水温降至2℃~3℃,保持此水温2~3 d,此后以1℃/d的速率升温至6℃,恒温培育6~8 d,再以0.5℃/d的速率升温至10℃,恒温培育6~8 d后,继续以0.5℃/d的速率升温至15℃后,恒温待产。亲参培育密度为15~20头/m³,培育池内的溶氧浓度≥5 mg/L,培育过程中,每日上午换水1次,每次换水量为池水的50%,所换海水经过砂滤处理,每3~5 d倒池1次,清洗池底残饵及粪便。

培育过程中,投喂粉状饲料和海泥的混合物,其重量比为饲料:海泥=1:6~8,每日饲料投喂量为池中亲参重量的3%~5%,根据摄食情况适当调整。及时将死亡的亲参移出培育池,并记录每个实验组刺参的死亡头数。

1.2 血清素配制及注射

血清素购于Sigma公司。以生理盐水(NaCl为0.85%)溶解血清素,配成浓度为100 mg/ml的工作液。当亲参培育水温升至15℃后,将血清素按照20、50、100和200 μg/g亲参体重的剂量从刺参背部注入体腔,每种注射剂量之后各按每5、10、15和20 d再注射1次,以注射生理盐水的亲参为对照组,以不做处理的为空白组。注射生理盐水的亲参每10 d注射1次,每次注射0.2 ml,实验设置见表1。每个培育

表1 实验设置

Tab.1 Experiment design

实验组 Group	血清素剂量 Serotonin dose (μg/g body weight)	间隔时间 Interval time (d)
A	20	5
B	20	10
C	20	15
D	20	20
E	50	5
F	50	10
G	50	15
H	50	20
I	100	5
J	100	10
K	100	15
L	100	20
M	200	5
N	200	10
O	200	15
P	200	20
对照组 Control	0	10
空白组 Blank	0	0

池设置2个实验组,每组为111头或112头亲参,同一培育池的不同实验组之间用网隔隔开。

1.3 繁殖力性状测定

当夜间观察到大量亲参集中在培育池的池角,部分亲参在水体表层沿池壁活动频繁,躯体上半部离开池壁不停地摇摆或已出现少量雄参排精时,每日升高亲参培育水温0.5℃,升至18℃后待产。在2019年3月下旬,采用阴干流水升温的方法刺激亲参排放精液和卵子。每个实验组设置3个平行,每个平行30头亲参在0.5 m³塑料水槽中排放。观察到有雄参排精后,即将排精的雄参移出水槽,统计每个水槽中产卵的雌参数,计算雌参排放率。待所有雌参停止排卵后,计算雌参平均产卵量。每个实验组随机测量30个卵子的卵径。2 h后,计算受精率。

根据雌参排放率和平均产卵量,挑选F组和空白组测定孵化率、幼体体长和附着变态率。F组和空白组的受精卵分别在21℃水温孵化,孵化密度为3个/ml。受精48 h后,统计孵化率。在统计受精率和孵化率时取样3次,每次统计的个体数为100个。

雌参排放率=(排卵雌参数/催产亲参总数)×100%;
受精率=发生卵裂的受精卵数/总卵子数×100%;

孵化率=小耳幼体数/受精卵数 \times 100%。

受精卵发育到小耳幼体后进行布池, 培育密度为0.15个/ml。幼体培育时期, 投喂由角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)和海洋红酵母(*Rhodotorula benthica*)组成的混合饵料, 日投饵4次, 小耳幼体、中耳幼体和大耳幼体的日投饵量分别为25000~30000、35000和35000~40000 cells/ml。幼体培育期间不换水, 每天加入部分新水, 至受精后第9天池内水深达到1 m, 每组随机抽样30个耳状幼体, 在显微镜下用目微尺测定其体长。

在小耳幼体进行布池的同时, 对F组和空白组进行附着变态实验。实验容器是体积为10 L的消毒处理的塑料桶。实验采用透明塑料薄膜作为附着基。使用前, 塑料薄膜先浸泡于海水中, 经 20×10^{-6} mol/L高锰酸钾消毒30 min, 清水冲洗晾干后使用, 塑料薄膜置于桶底。2个组各设置3个平行。幼体培育密度为0.15个/ml, 充气培育。实验开始时, 桶中加满海水, 以后每天换水1次, 每次换水1/2。耳状幼体期间, 每日投喂饵料量和培育池中相同。授精后第10天, 开始投喂由海带(*Laminaria*)粉和马尾藻(*Sargassum*)粉混合制成的配合饵料。授精后第20天, 观察统计幼体附着变态的情况, 计算幼体附着变态率。

1.4 数据分析

实验结果用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示, 采用SPSS20.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 亲参成活率

各实验组、对照组和空白组的亲参成活率见图1。

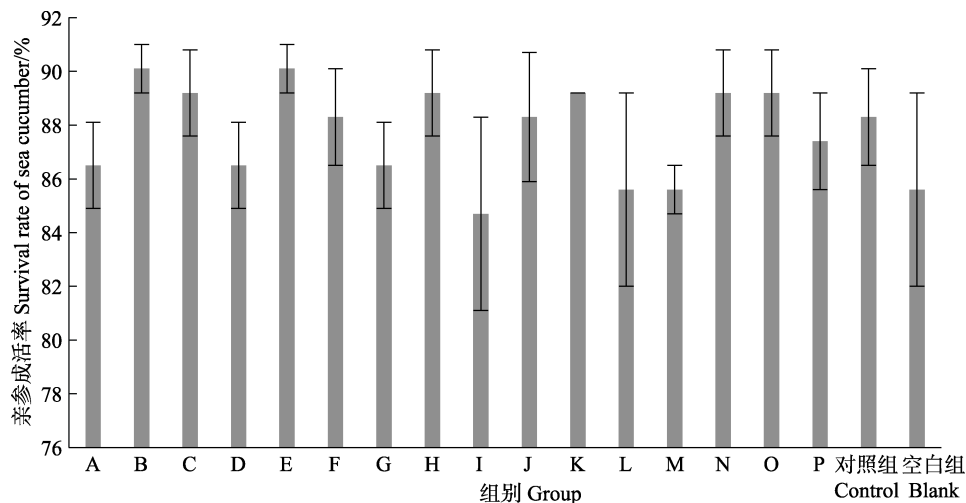


图1 注射血清素对亲参成活率的影响

Fig.1 Effects of serotonin on survival rate of sea cucumbers

从图1可以看出, 各组亲参成活率介于(84.7 \pm 6.2)%和(90.1 \pm 1.6)%之间, 各组之间无显著差异。

2.2 雌参排放率和产卵量

不同实验组雌参排放率和产卵量见图2和图3。由图2和图3可知, 对照组雌参排放率最低, 为(14.4 \pm 1.1)%, 空白组为(15.6 \pm 2.2)%。注射血清素的所有实验组雌参排放率均高于对照组和空白组, 其中, F、J和M组显著高于对照组和空白组, 分别为(33.3 \pm 1.9)%、(32.2 \pm 2.9)%和(31.1 \pm 1.1)%。对照组和空白组雌参排卵量最低, 分别为(302.0 \pm 73.3)万粒和(304.0 \pm 62.7)万粒。E、F、I、J、K、L、M、N、O和P组显著高于对照组和空白组($P<0.05$), 其中F组最高, 平均排卵量为(637.0 \pm 64.2)万粒。

按血清素为20 μ g/g亲参体重进行注射的4个实验组的雌参排放率和平均排卵量2项指标没有显著差异。注射剂量为50 μ g/g的实验组中, 每20 d注射1次的实验组的2项繁殖力指标显著低于每10 d注射1次的实验组。注射剂量为100 μ g/g的实验组中, 每20 d注射1次的实验组的雌参排放率显著低于每10 d注射1次的实验组。注射剂量为200 μ g/g的实验组中, 每20 d注射1次的实验组的雌参排放率显著低于每5 d注射1次的实验组。

2.3 血清素对卵子和幼体质量的影响

F组和空白组卵径、受精率、孵化率、幼体体长和附着变态率见表2。由表2可知, F组卵子卵径为(165.0 \pm 3.5) μ m, 大于空白组[(161.7 \pm 2.6) μ m]。F组的卵子受精率、受精卵孵化率、9日龄幼体体长和幼体附着变态率分别为(93.0 \pm 1.5)%、(82.7 \pm 1.2)%、(856.0 \pm 24.8) μ m和(24.0 \pm 1.9)%, 均低于空白组[分别为(96.3 \pm 1.8)%、

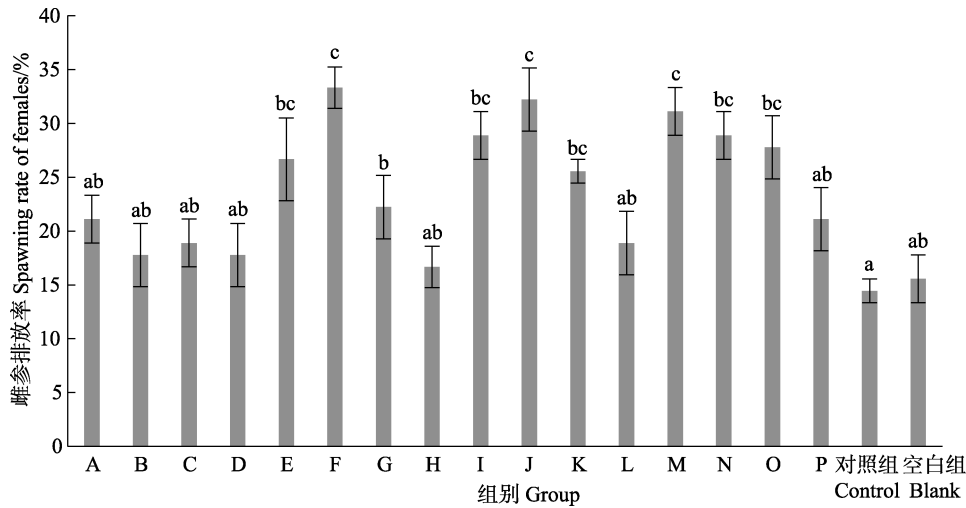


图 2 注射血清素对雌参非放率的影响

Fig.2 Effects of serotonin on spawning rate of female sea cucumbers

不同字母表示差异显著($P<0.5$), 下同

Different letters indicated significant different ($P<0.5$). The same as below

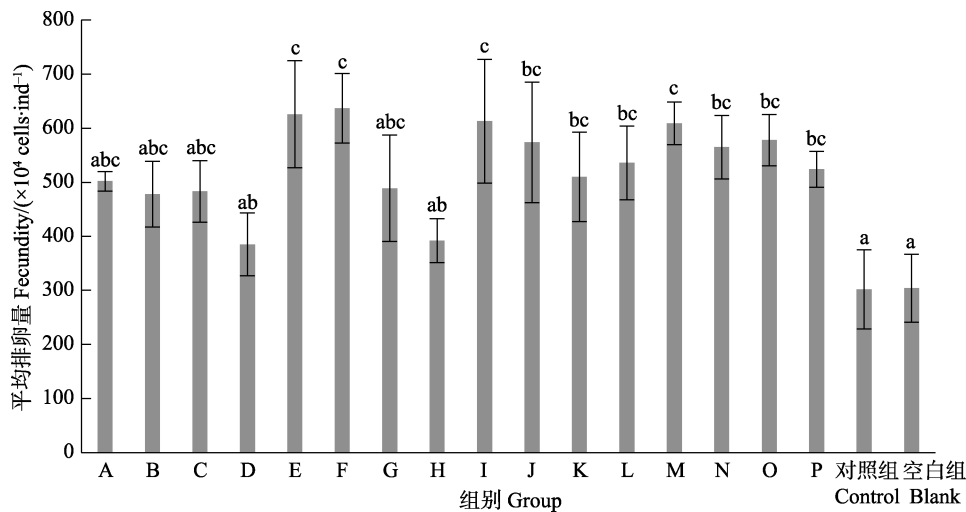


图 3 注射血清素对雌参平均非卵量的影响

Fig.3 Effects of serotonin on fecundity of female sea cucumber

表 2 血清素对刺参卵子与幼体质量的影响

Tab.2 Effects of serotonin on offspring quality of sea cucumber

组别 Group	卵径 Oocyte diameter (μm)	受精率 Fertilization (%)	孵化率 Hatching rate (%)	9 日龄幼体长 Larval body length (μm)	附着变态率 Settlement rate (%)
F 组 F group	165.0±3.5	93.0±1.5	82.7±1.2	856.0±24.8	24.0±1.9
空白组 Blank group	161.7±2.6	96.3±1.8	85.3±1.8	951.3±40.3	26.4±1.0

(85.3±1.8)、(951.3±40.3) μm 和(26.4±1.0)%], 但 2 组的上述指标无显著差异。

3 讨论

刺参亲参在人工促熟过程中能多次产卵, 然而每次是由不同的亲参产卵或者同一头亲参多次产卵, 目

前尚不明确。Liu 等(2015)研究表明, 人工促熟的亲参经过升温刺激, 50%~80%的亲参会排放精卵。谭杰等(2020)的研究表明, 人工促熟的亲参, 雌参排放率为 6%~16%, 结合生产实践的经验, 人工催产中排放的亲参大部分为雄参, 排放的雌参所占比例较小, 说明雌参性腺发育同步性较差。通过注射外源激素促进

刺参性腺发育,提高雌参性腺发育同步性,可减少亲参培育数量,降低生产成本;另一方面,雌参排放率提高,可增加繁殖的有效群体数量,降低近交衰退的风险。

血清素是一种重要的神经递质和神经调节物质,动物通过血清素受体控制着一系列的感觉和运动功能(Wang *et al.*, 2017)。在甲壳动物中,血清素具有促进卵黄发生和卵母细胞成熟的双重作用(Tomy *et al.*, 2016)。Tinikul 等(2009)发现,注射血清素可缩短罗氏沼虾卵巢成熟和胚胎发育的时间,同时增加性腺指数和卵子卵径。在贝类中,血清素可诱导贝类卵细胞成熟和排放(刘洪军等, 1994; Hamida *et al.*, 2004),体外诱导卵子的生发泡破裂,重启减数分裂(王琦等, 2015),使生发泡破裂的卵母细胞进一步成熟(邸炜鹏等, 2011)。刺参和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的卵母细胞相似,在排出体外前处于第1次减数分裂中期。Gianasi 等(2019)研究表明,血清素不能诱导冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)产卵。本研究表明,血清素可有效促进刺参性腺的发育。Gianasi 等(2019)研究通过向性成熟的冰岛刺参注射血清素诱导产卵,本研究是通过注射血清素促进刺参性腺发育成熟,然后通过阴干流水升温刺激诱导刺参产卵。可见,血清素对不同动物繁殖行为的调控效果不同。

在甲壳动物中,血清素可能通过抑制性腺抑制激素的合成和分泌,或者刺激神经系统合成和分泌促性腺激素来促进性腺发育(Wongprasert *et al.*, 2006)。Soonthornsumrith 等(2018)认为,罗氏沼虾脑和卵巢中的血清素能诱导雌性类固醇的分泌,这些类固醇促进卵黄发生,进而引起卵母细胞生长和成熟。血清素在贝类中的作用是通过结合卵母细胞膜表面的G蛋白偶联受体,在细胞内生成第二信使,将细胞外的信号传递到细胞内,诱发细胞行为(王琦等, 2015)。Wang 等(2017)从刺参呼吸树、消化道和肌肉组织中分离出血清素受体的cDNA,启示刺参体内可能存在血清素结合及作用现象。但目前,对于血清素受体是否存在于刺参神经系统或性腺中尚无相关报道。因此,后期需要对血清素促进刺参性腺发育的机理开展进一步研究。

本研究中,按血清素为20 μg/g亲参体重进行注射的4个实验组,雌参排放率和平均排卵量2项指标与对照组和空白组相比没有显著差异,可能是因为注射剂量较小。而在剩余3个剂量中,每20 d注射1次的实验组中,雌参排放率与对照组和空白组没有显著差异,说明注射间隔时间太长时,血清素不能提

高刺参繁殖力。注射血清素的实验组刺参的卵子卵径、受精率、受精卵孵化率、浮游幼体体长和浮游幼体附着变态率与对照组相比无显著差异,说明注射血清素可促进刺参性腺发育,同时对卵子质量并无不良影响。以上结果表明,在亲参培育过程中,当培育水温稳定在15℃以后,按照50 μg/g亲参体重的剂量,每10 d注射1次血清素可显著提高刺参排卵率和产卵量,且不会影响后期受精孵化过程。本研究为优化刺参亲本促熟工艺、建立刺参高效制种技术提供了科学依据。

参 考 文 献

- Di WP, Wang ZP, Yu RH, *et al.* Effect of ammonia seawater and 5-HT on maturation of oocyte stripped from scallop, *Chlamys farreri* (Jones et Preston). *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(4): 46–50 [邸炜鹏, 王昭萍, 于瑞海, 等. 氨海水与5-羟色胺对栉孔扇贝解剖卵的体外促熟作用. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(4): 46–50]
- Gianasi B, Hamel J, Mercier A. Triggers of spawning and oocyte maturation in the commercial sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Aquaculture*, 2019, 498: 50–60
- Hamida L, Medhioub M, Cochard J, *et al.* Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*, 2004, 239(1–4): 413–420
- Liu HJ, Xiang JH. Studies on induction of spawning by biochemical signal molecules in several bivalves. *Marine Sciences*, 1994, 6: 35–38 [刘洪军, 相建海. 几种生化信号物质对双壳类催产效应的研究. *海洋科学*, 1994, 6: 35–38]
- Liu SL, Sun JC, Ru XS, *et al.* Broodstock conditioning and spawning. In: Yang H, Hamel JF, Mercier A. *The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: History, biology and aquaculture*. Cambridge: Academic Press, 2015, 101–110
- Meeratana P, Withyachumnarnkul B, Damrongphol P, *et al.* Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, 2006, 260(1–4): 315–325
- Nagaraju GP. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214: 3–16
- Soonthornsumrith B, Saetan J, Kruangkum T, *et al.* Three-dimensional organization of the brain and distribution of serotonin in the brain and ovary, and its effects on ovarian steroidogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Neuroscience*, 2018, 18(2): 5
- Tan J, Li FH, Chen SQ, *et al.* Effect of temperature and diet on the reproductive condition of sea cucumber *Apostichopus japonicus* broodstock. *Progress in Fishery Sciences*, 2020,

- 41(1): 96–103 [谭杰, 李凤辉, 陈四清, 等. 不同培育水温和饲料对刺参人工促熟效果的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 96–103]
- Tanabe T, Yuan Y, Nakamura S, *et al.* The role in spawning of a putative serotonin receptor isolated from the germ and ciliary cells of the gonoduct in the gonad of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166: 620–627
- Tinikul Y, Soonthornsumrith B, Phoungpetchara I, *et al.* Effects of serotonin, dopamine, octopamine, and spiperone on ovarian maturation and embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Crustaceana*, 2009, 82(8): 1007–1022
- Tomy S, Saikrithi P, James N, *et al.* Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 2016, 452: 239–246
- Wang Q, He MX. Effect of 5-HT on maturation of oocyte stripped from the pearl oyster *Pinctada fucata* and cellular localization of 5-HT receptor. *Marine Science Bulletin*, 2015, 34(1): 89–94, 101 [王琦, 何毛贤. 5-HT对马氏珠母贝卵体外促熟的影响及5-HT受体的细胞学定位. 海洋通报, 2015, 34(1): 89–94, 101]
- Wang TM, Yang Z, Zhou NM, *et al.* Identification and functional characterisation of 5-HT₄ receptor in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Scientific Reports*, 2017, 7: 1–12
- Wen WG, Huang JH, Yang QB, *et al.* Effect of serotonin on ovarian maturation in *Penaeus monodon*. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(1): 59–63 [温为庚, 黄建华, 杨其彬, 等. 血清素在斑节对虾催熟过程中的作用. 南方水产, 2009, 5(1): 59–63]
- Wongprasert K, Asuvapongpatana S, Poltana P, *et al.* Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1447–1454

(编辑 马瑾艳)

Effects of Serotonin on Reproductive Performance and Offspring Quality of Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*

TAN Jie^{1,2}, MA Tianyi³, CHEN Aihua⁴, ZHOU Xiaoqun⁵, LIU Changlin^{1,2}, GE Jianlong^{1,2},
BIAN Li^{1,2}, CHEN Siqing^{1,2}, WANG Xuejiang^{6①}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Wendeng Marine Development Bureau, Weihai 264400;

4. Rushan Marine Development Bureau, Rushan 264500;

5. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264006;

6. Wuzhoufeng Agricultural Science and Technology Co. LTD, Yantai 264000)

Abstract It is well-known that serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) can act as a neurotransmitter as well as a neurohormone to regulate reproduction in marine invertebrates. Serotonin can prompt ovarian and embryonic development in crustaceans and trigger oocyte maturation and sequential spawning in bivalve mollusks. In this study, the effects of serotonin on the reproductive performance and quality of the offspring of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) treated with serotonin were examined. During hatchery broodstock conditioning, sea cucumbers were injected with serotonin at four different doses (20 µg/g, 50 µg/g, 100 µg/g, and 200 µg/g body weight) and four frequencies (every 5, 10, 15, and 20 days). Sea cucumbers injected with physiological saline were used as the control group, and untreated sea cucumbers were used as the blank group. At the end of the experiment, the spawning of sea cucumbers was triggered using a combination of desiccation, running water, and thermal shock. The results revealed that the spawning rate and fecundity of female sea cucumbers injected with serotonin were higher than those of the control and blank groups. The female sea cucumbers injected with serotonin at dose of 50 µg/g body weight every 10 days showed the highest spawning rate and fecundity of (33.3±1.9)% and (637.0±111.1)×10⁴ cells per individual, respectively. The egg diameter, fertilization rate of eggs, hatching rate of larvae, body length of late auricularia larvae, and settlement rate of larvae in the 50 µg/g body weight every 10 days group and blank group were evaluated further. The egg diameter, fertilization rate, hatching rate, larval body length, and settlement rate of the 50 µg/g body weight every 10 days group were (165.0±3.5) µm, (93.0±1.5)%, (82.7±1.2)%, (856.0±24.8) µm, and (24.0±1.9)%, respectively. No significant differences were observed in these parameters between this group and blank group. These results indicate that serotonin, as a neurotransmitter, prompts ovarian development in sea cucumbers, and injecting serotonin during broodstock conditions can improve the reproductive performance of female sea cucumbers.

Key words *Apostichopus japonicus*; Serotonin; Conditioning; Spawning rate; Fecundity

① Corresponding author: WANG Xuejiang, E-mail: zzk1140515379@163.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201210001

http://www.yykxjz.cn/

赵斌, 胡炜, 李成林, 赵洪友, 吴鹏, 韩莎, 姚琳琳, 王琦. 低盐和高盐环境下刺参选育品系生长与摄食性能研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 139–146

Zhao B, Hu W, Li CL, Zhao HY, Wu P, Han S, Yao LL, Wang Q. Growth and feeding performance of selected breeding sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in low and high salt environments. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 139–146

低盐和高盐环境下刺参选育品系 生长与摄食性能研究*



赵斌¹ 胡炜¹ 李成林^{1①} 赵洪友²
吴鹏³ 韩莎¹ 姚琳琳¹ 王琦¹

(1. 山东省海洋生物研究院 青岛 266104; 2. 莱阳市海洋渔业有限公司 烟台 265200;
3. 文登市渔业技术推广站 威海 264400)

摘要 为评价刺参(*Apostichopus japonicus*)耐盐品系选育效果,以 G4、G5 代刺参耐盐选育品系为研究对象,研究了其在低盐度和高盐度环境下的生长、摄食和消化生理的变化。结果显示,30 d 实验期间,G4 代和 G5 代 2 种规格选育刺参在不同盐度环境中的生长情况相似,在低盐环境中的末体重随着实验盐度的降低而下降,在高盐环境中的末体重均随着实验盐度升高而下降;G4 代盐度 35 实验组的特定生长率(SGR)为(0.82±0.06)%/d,摄食率(FR)为(3.54±0.26)%,均与盐度 31 对照组无显著差异($P>0.05$),G5 代实验组刺参呈现相似规律。在盐度为 18~31 时,G4 和 G5 代的不同规格选育刺参蛋白酶活力随着设置盐度的降低而下降,最低值为 G5 代盐度 18 小规格刺参实验组的 1.55 U/mg prot;在盐度 31~39 范围内,各实验组刺参蛋白酶活力随着设置盐度的升高呈降低趋势,但盐度 35、37 实验组的蛋白酶活力与盐度 31 对照组差异不显著($P>0.05$);G4 和 G5 代的不同规格选育刺参淀粉酶活力随着设置盐度的变化总体无太大差异;在盐度 18~31 范围内,G4 和 G5 代选育刺参脂肪酶活力随着设置盐度的降低而下降,其中,盐度 18 和盐度 22 实验组脂肪酶活力显著低于盐度 31 对照组($P<0.05$)。研究表明,选育刺参在适应生长、摄食及激活消化酶活力的盐度值范围与普通刺参具有显著差异;G4 和 G5 代选育刺参选育性状稳定性较强,历代定向选育对刺参群体抗逆性状的遗传改良起到了积极作用。

关键词 刺参;选育;盐度;生长;消化酶

中图分类号 S963.16 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)03-0139-08

刺参(*Apostichopus japonicus*)是目前国内沿海具重要经济价值的棘皮类养殖品种,近年来,养殖区 域不断拓展,取得了显著的经济、社会和生态效益(李成林等,2019)。随着刺参产业的蓬勃发展,部分

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0901602)、山东省泰山产业领军人才工程(LJNY201613)和山东省农业重大应用技术创新项目共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901602), Taishan Industrial Experts Programme (LJNY201613), and Major Agricultural Application Technology Innovation Project in Shandong Province]. 赵斌, E-mail: jm.zb@163.com

① 通讯作者:李成林,研究员, E-mail: lcl_xh@hotmail.com

收稿日期:2020-12-10, 收修改稿日期:2020-12-22

养殖业户长期累代自繁,造成苗种生长迟缓、成活率低等现象,养殖刺参种质退化日趋严重。同时,由于近年来极端天气等灾害频发,当前养殖刺参种质暴露出抗逆性差、应对环境气候突变风险能力薄弱等问题,业内亟待提升优良种质创新水平。鉴于此,国内刺参育种科研与生产单位历经多年,相继选育出具有生长速度快、疣足数量多、耐高温、抗病等优异生产性状的刺参新品种,为国内刺参产业进一步发展奠定了种质基础。

盐度是海水养殖环境中的重要生态因子,其变化对水产动物的生长和消化生理活动有显著影响(李刚等, 2011),刺参的适宜盐度一般在 26~33(王吉桥等, 2009; 孙秀俊等, 2012)。在刺参产业带由传统的自然分布区域向山东省黄河三角洲沿海地区拓展过程中,刺参养殖受到海区盐度偏低或不稳定的影响,本研究课题组经多年选育,培育出耐盐范围广、生长快的刺参新品系,适宜在山东、辽宁、河北和福建等更广阔区域养殖。目前,关于不同盐度环境对刺参新品系生长、摄食影响的研究报道并不多见,本研究以刺参耐盐选育品系子四代(G4)和子五代(G5)群体为研究对象,研究了其在不同盐度环境下的生长、摄食和消化生理的变化,结果可为刺参新品种培育提供基础数据,为刺参耐盐新品种的创制和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用刺参为山东省海洋生物研究院种质资源研究中心培育的耐盐品系子四代(G4)和子五代(G5),2017年3月和2019年4月,分别选取各代选育刺参进行实验。苗种规格分别为[G4(30.1±2.2)g和(60.2±3.8)g],G5[(30.4±2.3)g和(60.8±3.6)g],分别暂养在整理箱中,使其适应实验室环境(pH为8.1~8.3,水温为16℃~18℃)。暂养期间,日投喂刺参专用配合饲料1次,投饵量为刺参总重的3%~5%,同时,按配合饲料与海泥重量比为1:3的比例搭配投喂海泥。选取表现正常、肉刺完整挺直、健康无病的个体作为实验对象。

1.2 实验设计与日常管理

设置18、20、22三个低盐处理组和35、37、39三个高盐处理组,以盐度31的自然海水为对照组。实验开始前,用经自然曝晒的自来水与自然海水混合的方式降低盐度,每天调整2~3个盐度单位,直至达到实验盐度,并在实验盐度条件下对刺参进行驯化养

殖5d。驯化结束后,禁食48h,分别将20头实验刺参放置于整理箱(80cm×60cm×48cm)中,每个处理设置3个平行组。实验期间连续充气,每天全量换水,投喂等管理同上节。实验周期为30d。

1.3 测定方法与数据计算

1.3.1 刺参生长及摄食的测定 实验开始前1d停止投喂,称量刺参初始体重 W_0 (g),实验结束后测其体重最终值 W_t (g)。称重时,先将刺参取出阴干,吸干体表水分后称量。 t 为实验持续的时间(d)。刺参特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)采用以下公式计算:

$$SGR=100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

通过测定摄食率(Feeding rate, FR, %)考察盐度对刺参摄食的影响,计算公式如下:

$$FR=2F/[t(W_t+W_0)] \times 100\%$$

W_0 为体重初始值(g), W_t 为测定值(g), t 为实验时间(d), F 为饲料总摄入量(g)。

1.3.2 刺参消化酶活力的测定 实验结束后,将实验刺参取出并排净体腔内海水,然后沿腹部剪开,取出消化道,剔除呼吸树,用超纯水冲洗干净,在-80℃超低温冰箱中保存。实验时,取肠组织置于玻璃匀浆器中,加入10倍体积预冷的超纯水,在冰浴条件下匀浆20min,在高速冷冻离心机中(0℃~4℃,1000r/min)离心30min,所得上清液于冰箱保存,待测。蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活力分别采用钼酸铵法、比浊法和黄嘌呤氧化酶法测定。

1.3.3 数据统计 实验数据利用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较,以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 低盐和高盐环境对选育刺参生长、存活与摄食的影响

2.1.1 G4代选育刺参生长与摄食情况 耐盐品系G4代选育刺参在高盐环境和低盐环境中的生长摄食情况见表1。30d实验结束时,2种不同规格选育刺参在低盐环境中的末体重均随着盐度的降低而下降,盐度18实验组的选育刺参末体重均显著低于其他盐度组($P<0.05$),且低于初始值,体重呈现负增长,盐度20、22实验组与盐度31实验组差异不显著($P>0.05$)。体重SGR与FR最高的分别为盐度31实验组,分别为(0.83±0.07)%/d、(3.77±0.29)%/d,初始规格30g左右的其他低盐实验组随盐度降低出现显著下

降; 初始规格 60 g 左右的低盐实验组中, 盐度 22 与 31 实验组的 SGR 与 FR 差异不显著, 其他实验组随盐度降低出现显著下降($P<0.05$)。

在高盐实验条件下, 2 种不同规格选育刺参末体重随着实验盐度升高而下降, 其中, 盐度 35、37 实验组与盐度 31 实验组差异不显著($P>0.05$), 盐度 39 实验组 2 种规格刺参均出现负增长。初始规格 30 g

左右的高盐实验组 SGR 与 FR 随盐度升高出现显著下降($P<0.05$), 盐度 39 实验组的 SGR 为 $(-0.17\pm 0.02)\%$, FR 为 $(0.15\pm 0.02)\%$, 均为最低值; 规格 60 g 左右的高盐实验组 SGR 与 FR 呈现类似的规律。

2.1.2 G5 代选育刺参生长与摄食情况 耐盐品系 G5 代选育刺参在高盐环境和低盐环境中的生长摄食情况见表 2。由表 2 可知, 30 d 实验中, G5 代 2 种规

表 1 选育 G4 代刺参在低盐和高盐环境下摄食、生长情况

Tab.1 Growth and feeding of G4 breeding sea cucumber in low and high salinity environments

初体重 Initial body weight (g)	盐度 Salinity	末体重 Final body weight (g)	摄食率 FR (%)	特定生长率 SGR (%/d)	成活率 Survival rate (%)
30.1±2.2	18	30.0±2.9 ^{ab}	0.89±0.07 ^a	-0.01±0.006 ^a	99.3
	20	36.8±2.4 ^c	1.56±0.14 ^b	0.67±0.05 ^b	99.3
	22	37.7±3.6 ^c	2.76±0.30 ^c	0.75±0.06 ^c	100
	31	38.6±2.5 ^c	3.77±0.29 ^d	0.83±0.07 ^d	100
	35	38.5±2.5 ^c	3.54±0.26 ^d	0.82±0.06 ^d	100
	37	34.7±2.5 ^{bc}	1.06±0.14 ^a	0.47±0.03 ^e	100
	39	28.6±2.2 ^a	0.15±0.02 ^e	-0.17±0.02 ^f	98.7
60.2±3.8	18	58.9±3.2 ^a	0.17±0.03 ^a	-0.07±0.02 ^a	100
	20	69.3±3.3 ^b	1.33±0.19 ^b	0.47±0.03 ^b	99.3
	22	74.6±3.7 ^b	2.86±0.18 ^c	0.71±0.05 ^c	100
	31	75.7±3.7 ^b	2.46±0.26 ^c	0.76±0.05 ^c	100
	35	76.4±4.0 ^b	2.96±0.27 ^c	0.79±0.05 ^c	100
	37	68.4±4.2 ^b	1.76±0.21 ^d	0.43±0.05 ^b	100
	39	57.4±3.8 ^a	0.11±0.03 ^a	-0.16±0.03 ^d	100

注: 同列中不同规格上的不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 下同

Note: The data with different letters in the same column are significantly different at the 0.05 probability level, the same as below

表 2 选育 G5 代刺参在低盐和高盐环境下摄食、生长情况

Tab.2 Growth and feeding of G5 breeding sea cucumber in low and high salinity environments

初体重 Initial body weight (g)	盐度 Salinity	末体重 Final body weight (g)	摄食率 FR (%)	特定生长率 SGR (%/d)	成活率 Survival rate (%)
30.4±2.3	18	28.2±2.4 ^a	0.24±0.03 ^a	-0.25±0.02 ^a	100
	20	34.8±3.1 ^{bc}	1.64±0.14 ^b	0.45±0.03 ^b	100
	22	37.3±2.8 ^{bc}	2.33±0.31 ^c	0.68±0.07 ^c	100
	31	38.3±3.1 ^{bc}	3.54±0.32 ^d	0.77±0.08 ^{cd}	100
	35	39.5±3.2 ^c	3.77±0.36 ^d	0.87±0.08 ^d	100
	37	32.2±3.0 ^{ab}	1.25±0.23 ^b	0.19±0.02 ^e	100
	39	29.9±2.6 ^a	0.26±0.03 ^a	-0.06±0.01 ^f	98.7
60.8±3.6	18	58.1±3.4 ^a	0.20±0.03 ^a	-0.15±0.02 ^a	100
	20	64.4±4.2 ^b	1.03±0.09 ^b	0.19±0.02 ^b	100
	22	73.5±4.2 ^c	2.06±0.21 ^c	0.63±0.03 ^c	100
	31	74.9±3.9 ^c	2.42±0.22 ^d	0.69±0.03 ^c	100
	35	74.2±4.0 ^c	2.56±0.20 ^d	0.66±0.03 ^c	100
	37	66.4±3.6 ^b	1.64±0.18 ^e	0.29±0.02 ^d	100
	39	56.8±3.5 ^a	0.18±0.02 ^a	-0.22±0.03 ^e	100

格选育刺参在低盐环境中的生长情况与 G4 代相似, 末体重随着实验盐度的降低而下降, 但仅盐度 18 实验组显著低于其他实验组($P<0.05$)。2 种规格低盐实验组 SGR 与 FR 随盐度降低出现显著下降($P<0.05$), 但盐度 22 实验组中, 初始体重为 60 g 实验组刺参的 SGR 与盐度 31 组无显著差异($P>0.05$)。

在高盐环境中, 2 种不同规格选育刺参末体重均随着实验盐度升高而下降, 其中, 初始体重 30 g 实验组刺参在盐度 35 时末体重最高, 增至(39.5±3.2) g, 但与盐度 31 对照组差异不显著($P>0.05$)。在 2 种不同规格选育刺参高盐环境下 SGR 与 FR 测定结果中, 盐度 35 实验组与盐度 31 对照组无显著差异($P>0.05$), 当盐度升至 37 和 39 时, 其 SGR 和 FR 均随盐度升高而显著降低($P<0.05$)。

2.2 低盐和高盐环境对选育刺参消化酶活力的影响

2.2.1 低盐和高盐环境中 G4 和 G5 代选育刺参蛋白酶活力

盐度对 G4 和 G5 代选育刺参蛋白酶活力的影响如图 1 所示, L 为初始体重 30 g 左右个体, B 为初始体重 60 g 左右个体。在盐度 18~31 范围内,

G4 和 G5 代的不同规格选育刺参消化道蛋白酶活力随着设置盐度的降低而下降, 最低值为 G5 代盐度 18 小规格刺参实验组的 1.55 U/mg prot; 其中, 盐度 18 和盐度 20 实验组蛋白酶活力显著低于盐度 22 实验组和盐度 31 对照组($P<0.05$), 而盐度 22 和盐度 31 对照组之间差异不显著($P>0.05$)。在盐度 31~39 范围内, 各实验组刺参蛋白酶活力随着设置盐度的升高呈降低趋势, 但盐度 35、37 实验组的蛋白酶活力与盐度 31 对照组差异不显著($P>0.05$), G5 代 2 种规格实验刺参在盐度 37 和 39 的蛋白酶活力差异亦不显著($P>0.05$)。

2.2.2 低盐和高盐环境中 G4 和 G5 代选育刺参淀粉酶活力

盐度对 G4 和 G5 代选育刺参淀粉酶活力的影响见图 2, L 为初始体重 30 g 左右个体, B 为初始体重 60 g 左右个体。在盐度 18~39 范围内, G4 和 G5 代的不同规格选育刺参消化道淀粉酶活力随着设置盐度的变化而起伏, 总体无太大差异。在 G4 代实验组中, 盐度 37 实验组小规格刺参淀粉酶活力为 0.36 U/mg prot, 显著高于其他实验组($P<0.05$), 盐度 22 与盐度 37 的小规格刺参淀粉酶活力显著超过大规

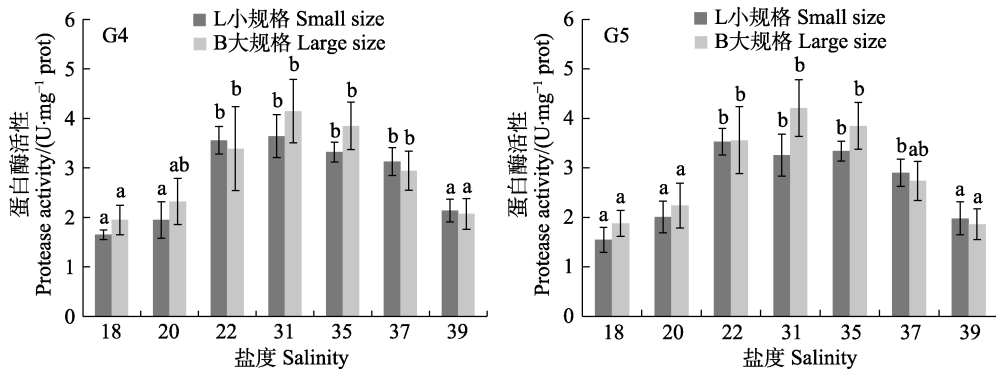


图 1 盐度环境对 G4 和 G5 代选育刺参蛋白酶活力的影响

Fig.1 The effects of different salinity on the protease activity of G4 and G5 breeding sea cucumber

图中标注不同字母表示组内差异显著($P<0.05$), 下同

Different letters on the graph mean significant difference in the same dietary group ($P<0.05$), the same as below

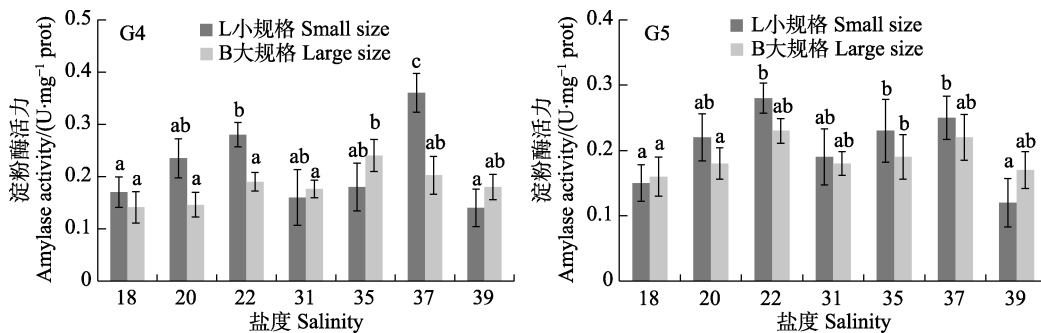


图 2 盐度环境对 G4 代和 G5 代选育刺参淀粉酶活力的影响

Fig.2 The effects of different salinity on the amylase activity of G4 and G5 breeding sea cucumber

格刺参; 在 G5 代实验组中, 淀粉酶活力峰值出现在盐度 22 小规格实验组, 最低值出现在盐度 39 小规格实验组, 为 0.12 U/mg prot, 同一盐度下 2 种规格间的淀粉酶活力均无显著差异($P>0.05$)。

2.2.3 低盐和高盐环境中 G4 和 G5 代选育刺参脂肪酶活力 盐度对 G4 和 G5 代选育刺参脂肪酶活力的影响见图 3, L 为初始体重 30 g 左右个体, B 为初始体重 60 g 左右个体。在盐度 18~31 范围内, G4 和 G5 代的不同规格选育刺参消化道脂肪酶活力随着设

置盐度的降低而下降, 其中, 盐度 18 和盐度 22 实验组脂肪酶活力显著低于盐度 31 对照组($P<0.05$), 而盐度 22 和盐度 31 对照组之间差异不显著($P>0.05$)。在盐度 31~39 范围内, G4 和 G5 代不同规格的盐度 35 实验组的脂肪酶活力与盐度 31 对照组差异均不显著($P>0.05$), 盐度 37 实验组脂肪酶活力值有所下降, 但与对照组无显著差异($P>0.05$), 当盐度环境为 39 时, 各组实验刺参脂肪酶活力出现显著下降, 最低值为 G5 代盐度 39 大规格刺参实验组的 0.18 U/mg prot。

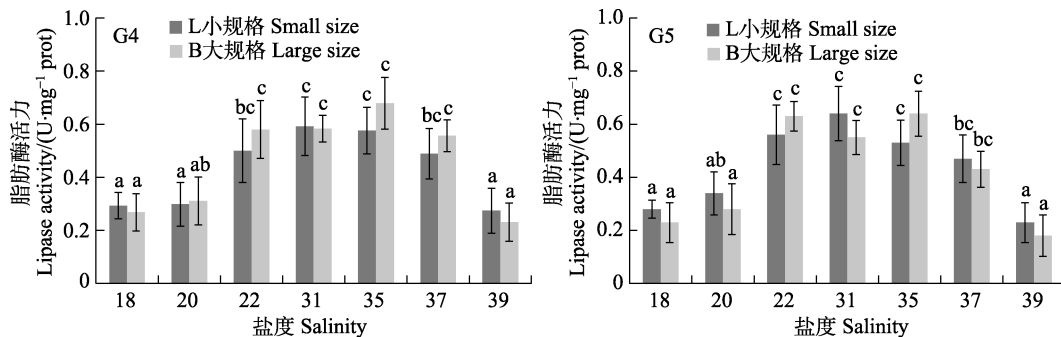


图3 盐度环境对 G4 代和 G5 代选育刺参脂肪酶活力的影响

Fig.3 The effects of different salinity on the lipase activity of G4 and G5 breeding sea cucumber

3 讨论

3.1 刺参选育品系在低盐和高盐环境下的生长与摄食情况

盐度是影响水产动物生理生态学的重要环境因子, 与其生长、发育关系密切(Talbot *et al*, 2002; Dong *et al*, 2008)。刺参属于典型的狭盐性棘皮动物, 盐度的变化对刺参的生长、存活和繁殖等一系列生理活动均有影响(陈勇等, 2007; 郑慧等, 2014; Li *et al*, 2010; 胡炜等, 2012; 于姗姗等, 2012)。研究表明, 盐度变化存在影响刺参生长的拐点, 超过拐点数值刺参生长将大幅降低, 盐度低于 22 时, 刺参 3.5 g 左右幼参出现负增长(王吉桥等, 2009), 盐度 36 时, 规格为 37.5 g 的刺参特定生长率显著低于盐度 31 时(孟雷明等, 2013)。本研究通过 2 代不同规格刺参在低盐和高盐环境中的生长实验发现, 选育刺参品系同样存在生长拐点, 分别在盐度 20 和盐度 37 时, 此条件下的选育刺参虽仍可生长, 但体质量增长与特定生长率均与对照环境下出现显著差异, 当盐度差异继续加剧时, 便会出现负增长。在刺参人工选育品种和其他种内群体品种方面, 包杰等(2015)研究发现, 日本红刺参在盐度升高至 38 或降低至 23 时的能量代谢特征不利于其生长; 朱厚祥等(2013)发现, 白刺参与普通刺参幼虫阶段相同盐度耐受程度相近, 在高盐度 37 下成活率

和生长率均较低。因此, 在养殖盐度的适应性方面, 本研究耐盐选育品系刺参相对普通刺参及部分无耐盐性状的选育品种有优势。

良种是产业健康发展的基础, 连续多代选择可以有效纯化动植物优良性状, 大多可以获得积极的选择反应, 从而培育出良种(刘石林, 2015; 楼允东, 1999)。在良种缺乏和异常气候环境变化背景下, 开展刺参抗逆品种的选育工作是长期以来国内刺参领域研究的热点(李成林等, 2019), 特定性状的定向选育是改善刺参对恶劣环境抗逆能力的有效手段(隋凯港等, 2014)。水产动物选育新品种通过审定一般至少应经过 4 个世代以上, 本研究所采用的 G4、G5 代刺参耐盐选育品系在相同盐度环境下表现出的生长与摄食性能极为相似, 表明新品系的选育性状稳定性较强, 对刺参耐盐新品种的获得及其后的推广应用具有积极的意义。

3.2 刺参选育品系在低盐和高盐环境下的消化生理

消化酶活性与水产动物的营养吸收关联密切, 进而影响水产动物的生长(田宏杰等, 2006)。同时, 盐度对水产动物消化酶的影响已被广泛报道(黄凯等, 2007; 陈品健等, 1998; 庄平等, 2008), 且各类消化酶的最适盐度存在差异(孙双双等, 2009; 范超晶等, 2016)。刺参虽然没有消化腺, 但其消化道内具有多

种重要的消化酶(唐黎等, 2007; 冯丹等, 2014)。本研究表明, 低盐和高盐环境对选育刺参品系的消化酶均存在显著影响, 且蛋白酶与脂肪酶活力的消长规律与个体生长与摄食呈现相关性。3种酶活力中以蛋白酶活力最高, 结果与李刚等(2011)在研究普通刺参时的结论一致。在激活消化酶活力的盐度值方面本研究结果则与已往报道不同。本研究中, 蛋白酶活力最高时的盐度为 31, 而淀粉酶活力的 2 个峰值大致在盐度 22 和 37。孙双双等(2009)研究得出, 普通刺参淀粉酶与蛋白酶最适盐度为 30, 纤维素酶最适盐度为 26, 脂肪酶受盐度影响较小, 而李刚等(2011)在研究 8 g 左右的幼参得出的结果则是蛋白酶活力在盐度 29 时最高, 淀粉酶活力在盐度 32 时最高, 前肠脂肪酶活力在盐度 32 时最高, 中肠在盐度 29 时最高, 均与本研究有所不同, 分析原因主要是由于选育群体经历代几定向选育, 对在不同盐度的生活习性方面可能与普通刺参产生了遗传差异, 而这种差异在子代中保持着较高的稳定性, 虽然 G5 代耐盐刺参品系与 G4 代的遗传进展不明显, 但这种遗传稳定性表现出对更大范围盐度的适应性, 从遗传改良角度上考虑更具有生产应用潜力。

参 考 文 献

- Bao J, Jiang HB, Tian XL, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and ammonia-N excretion rate of red *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 116–121 [包杰, 姜宏波, 田相利, 等. 温度和盐度对红刺参(*Apostichopus japonicus*)耗氧率与排氨率的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 116–121]
- Chen PJ, Wang CG, Zheng SL. Effects of salinity on digestive enzyme activity of *Pagrosomus major* young fish. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1998, 37(5): 754–755 [陈品健, 王重刚, 郑森林. 盐度影响真鲷幼鱼消化酶活力的研究. *厦门大学学报自然科学版(自然科学版)*, 1998, 37(5): 754–755]
- Chen Y, Gao F, Liu GS, *et al.* Effects of temperature, salinity and photoperiod on growth and behavior of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 687–691 [陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度和光照周期对刺参生长及行为的影响. *水产学报*, 2007, 31(5): 687–691]
- Dong YW, Dong SL, Meng XL. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, 2008, 276(1–4): 179–186
- Fan CJ, Chen AH, Tan J, *et al.* A comparative study on high temperature and salinity tolerance of hybrids between Chinese and Korean populations of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 146–152 [范超晶, 陈爱华, 谭杰, 等. 中韩刺参(*Apostichopus japonicus*)杂交子一代高温与盐度耐受性比较. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 146–152]
- Feng D, Gao QF, Dong SL. Effect of feeds with different protein contents on the growth of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) and activity of their digestive enzymes. *Periodical of Ocean University of China*, 2014, 44(2): 35–40 [冯丹, 高勤峰, 董双林. 不同蛋白水平饲料对刺参生长和消化酶活性的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(2): 35–40]
- Hu W, Li CL, Zhao B, *et al.* Effects of low salinity stress on survival, feeding and growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 92–96 [胡炜, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参存活、摄食和生长的影响. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 92–96]
- Huang K, Yang HK, Zhan G, *et al.* Effect of salinities on digestive enzyme activities of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. *Marine Sciences*, 2007, 31(3): 37–40 [黄凯, 杨鸿昆, 战歌, 等. 盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的影响. *海洋科学*, 2007, 31(3): 37–40]
- Li CL, Zhao B. Strategic thoughts on promotion and development of sea cucumber industry in Shandong Province. *Marine Economy in China*, 2019(2): 1–15 [李成林, 赵斌. 山东省刺参产业提升发展的战略思考. *中国海洋经济*, 2019(2): 1–15]
- Li G, Tang XX, Dou Y, *et al.* Effects of salinity on digestive enzyme activities of *Apostichopus japonicus*. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(1): 61–63 [李刚, 唐学玺, 窦勇, 等. 盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)消化酶活力的影响. *海洋环境科学*, 2011, 30(1): 61–63]
- Li L, Li Q. Effects of stocking density, temperature, and salinity on larval survival and growth of the red race of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Aquaculture International*, 2010, 18(3): 447–460
- Liu SL. Selective breeding and performance appraisal in thermotolerant strain of *Apostichopus japonicus*. *Doctoral Dissertation of Ocean University of China*, 2015 [刘石林. 刺参耐高温品系选育及性状评价的基础研究. *中国海洋大学博士研究生学位论文*, 2015]
- Lou YD. *Fish breeding*. Beijing: China Agriculture Press, 1999, 10–19 [楼允东. *鱼类育种学*. 北京: 中国农业出版社, 1999, 10–19]
- Meng LM, Wang LL, Lei Y, *et al.* Effects of salinity on carbon and nitrogen budgets in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(1): 34–38 [孟雷明, 王丽丽, 雷艳, 等. 盐度对刺参碳、氮收支影响的初步研究. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(1): 34–38]
- Sui KG, Zuo M, Liu ZG, *et al.* Salinity tolerance of juvenile sea

- cucumbers *Apostichopus japonicus* in Yellow River delta. Hebei Fisheries, 2014(5): 4–6 [隋凯港, 左明, 刘志国, 等. 黄河口刺参苗种的盐度适宜性研究. 河北渔业, 2014(5): 4–6]
- Sun SS, Zhang Y. Effects of salinity on digestive enzyme activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. China Feed, 2009(24): 28–31 [孙双双, 张云. 盐度对刺参消化酶活力的影响. 中国饲料, 2009(24): 28–31]
- Sun XJ, Li Q. Effects of salinity and stocking density on growth and development of the hybrid larvae of sea cucumber. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(S1): 54–59 [孙秀俊, 李琪. 不同盐度和培育密度对杂交刺参幼体生长发育的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(S1): 54–59]
- Talbot TD, Lawrence JM. The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filigraneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 275(1): 1–14
- Tang L, Wang JQ, Xu C, *et al.* Activities of four digestive enzymes in various developmental larvae and in alimentary canals at various sizes of *Apostichopus japonicus*. Fisheries Science, 2007, 26(5): 275–277 [唐黎, 王吉桥, 许重, 等. 不同发育期的幼体和不同规格刺参消化道中四种消化酶的活性. 水产科学, 2007, 26(5): 275–277]
- Tian HJ, Zhuang P, Gao LJ. Advances on the studies of the effect of ecological factors on activities of digestive enzymes of fish. Marine Fisheries, 2006, 28(2): 158–162 [田宏杰, 庄平, 高露姣. 生态因子对鱼类消化酶活力影响的研究进展. 海洋渔业, 2006, 28(2): 158–162]
- Wang JQ, Zhang XC, Jiang YS, *et al.* Effects of sudden salinity drop on survival and growth of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) at different developmental stages. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(S1): 139–146 [王吉桥, 张筱墀, 姜玉声, 等. 盐度骤降对不同发育阶段仿刺参存活和生长的影响. 大连水产学院学报, 2009, 24(S1): 139–146]
- Yu SS, Wang QL, Meng XL, *et al.* Effects of salinity fluctuation on the expression of hsp70 and hsp90s genes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(9): 22–27 [于姗姗, 王青林, 孟宪亮, 等. 盐度骤变对仿刺参 hsp70 及 hsp90 基因表达的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(9): 22–27]
- Zheng H, Li B, Rong XJ, *et al.* Effects of salinity and dissolved oxygen on non-specific immune enzyme activity in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 118–124 [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 118–124]
- Zhu HX, Kong LF, Li Q, *et al.* Effects of salinity, temperature and stocking density on the growth and survival of white race sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) larvae. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(7): 34–39 [朱厚祥, 孔令锋, 李琪, 等. 盐度、温度和培育密度对白刺参幼虫生长及存活的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(7): 34–39]
- Zhuang P, Zhang LZ, Tian HJ, *et al.* Effects of salinity on digestive enzyme activities of juvenile *Acipenser schrenckii*. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 198–203 [庄平, 章龙珍, 田宏杰, 等. 盐度对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 198–203]

(编辑 陈 辉)

Growth and Feeding Performance of Selected Breeding Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Low and High Salt Environments

ZHAO Bin¹, HU Wei¹, LI Chenglin¹①, ZHAO Hongyou², WU Peng³, HAN Sha¹, YAO Linlin¹, WANG Qi¹

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104; 2. Laiyang Marine Fishery Co., LTD., Yantai 265200; 3. Fishery Technology Extension Station of Wendeng City, Weihai 264400)

Abstract To evaluate the breeding effect of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) salt tolerant strains, the growth, feeding and digestive physiological changes of the fourth generation (G4) and the fifth generation (G5) sea cucumber strains under low and high salinity environments were studied. The results showed that the growth of G4 and G5 were similar in low salt environment during a 30-day experiment. The final body weight in low salt environment decreased with the decrease in experimental salinity, and the final body weight in high salinity environment decreased with the increase in experimental salinity. The specific growth rate (SGR) and feeding rate (FR) of salinity 22 and salinity 35 were not significantly different from those of the control group at salinity 31 ($P>0.05$). In the salinity range of 18~31, the protease activity of G4 and G5 decreased with the decrease in salinity, and the lowest value was 1.55 U/mgprot observed in the G5. In the salinity range of 31~39, the protease activity of each experimental group decreased with the increase in salinity, but there was no significant difference between salinity 35, 37, and control group ($P>0.05$). There was no significant difference in amylase activity between G4 and G5 with the change in salinity; in the range of salinity 18~31, the protease activity of the G4 and G5 was not significantly different. The lipase activity of sea cucumber decreased with the decrease in salinity, and the lipase activity of salinity 18 and salinity 22 was significantly lower than that of salinity 31 ($P<0.05$). The results showed that there were significant differences between selected sea cucumbers and common sea cucumbers in adapting to growth, feeding, and activating digestive enzyme activities under different salinity treatments. The stability of breeding traits was strong in G4 and G5, and the directional breeding played an active role in genetic improvement of stress resistance in sea cucumbers.

Key words *Apostichopus japonicus*; Selective breeding; Salinity; Growth; Digestive enzymes

① Corresponding author: LI Chenglin, E-mail: lcl_xh@hotmail.com

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200326003

http://www.yykxjz.cn/

王凤军, 廖梅杰, 王印庚, 李彬, 秦蕾, 王治平, 范瑞用, 刘毅. 投喂发酵饲料对刺参能量收支、生长、酶活性及其养殖水质的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 147-154

Wang FJ, Liao MJ, Wang YG, Li B, Qin L, Wang ZP, Fan RY, Liu Y. Effect of fermented feed on the energy budget, growth, and enzyme activities of sea cucumber seedlings and its influence on the water quality in the culture system. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 147-154

投喂发酵饲料对刺参能量收支、生长、酶活性及其养殖水质的影响*



王凤军^{1,2} 廖梅杰^{1,2,3} 王印庚^{2,3} 李彬^{2,3①}
秦蕾¹ 王治平^{1,2} 范瑞用⁴ 刘毅⁴

(1. 江苏海洋大学 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 青岛瑞滋集团有限公司 青岛 266409)

摘要 为探究发酵饲料在刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种培育中的效果,本研究测定了投喂发酵饲料对刺参苗种能量收支、生长、非特异性免疫酶和消化酶活性的影响,同时,对比分析了1个倒池周期内投喂发酵和未发酵饲料养殖单元池水的重要水质指标差异。结果表明,在50 d的养殖实验周期内,投喂发酵饲料组刺参苗种的存活率(SR)为(91.51±0.74)%,显著高于未发酵饲料组[(82.35±2.22)%] ($P<0.05$),苗种的特定生长率(SGR)为(1.83±0.01)%/d,与未发酵饲料组无显著差异。投喂发酵饲料刺参的生长能和代谢能占比分别为(13.25±1.01)%和(32.32±2.00)%,表明投喂发酵饲料可显著提高刺参生长能;对重要非特异性免疫酶指标和消化酶指标活性的测定结果表明,投喂发酵饲料组刺参的碱性磷酸酶、溶菌酶和胰蛋白酶活性分别为(0.74±0.04) king U/100 ml、(95.52±14.80) U/ml 和(335.89±13.01) U/mg prot,显著高于投喂未发酵饲料组($P<0.05$);对实验期间一个倒池周期(7 d)内各实验组重要水质指标变化的测定结果表明,第7天投喂发酵饲料组水体氨氮和亚硝酸盐浓度分别为(263.27±32.57)和(315.15±61.41) μg/L,显著低于未发酵饲料组。综合各项指标可以看出,投喂发酵饲料可显著提升刺参苗种的生理代谢水平,并有利于维持养殖池水水质,表明发酵饲料在刺参育苗与养殖中具有广阔的应用前景。

关键词 刺参; 发酵饲料; 能量收支; 生长; 酶活性; 水质

中图分类号 S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)03-0147-08

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901603)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020ZX0101; 2020TD40)、青岛西海岸新区科技项目(2018-19)、山东省农业良种工程重大课题(2017LZGC010)和威海市海洋经济创新发展示范城市产业链协同创新类项目共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901603), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020ZX0101, 2020TD40), Science and Technology Program of Qingdao West Coast New Area (2018-19), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2017LZGC010), and Industrial Chain Collaborative Innovation Project for Marine Economic Innovation and Development Demonstration in Weihai]. 王凤军, E-mail: 1985109522@qq.com

① 通讯作者: 李彬, 副研究员, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-26, 收修改稿日期: 2020-04-04

发酵饲料技术是在2006年欧盟全面禁止在畜禽饲料中添加抗生素后发展起来的一项新技术,发酵饲料作为一种新型饲料,从制作过程和功能上有别于传统饲料,经过微生物发酵可降解饲料中的毒素,分解或转化抗营养因子,将大分子物质分解为小分子物质,使饲料更容易被动物吸收利用(吴业阳等,2018)。同时,发酵饲料可以改善饲料的适口性、风味,并产生促营养因子,改善饲料的营养组成、提高饲料营养价值;此外,发酵饲料中的微生物可以改善动物肠道微生态平衡,增强其免疫力。目前,发酵饲料已广泛应用到畜禽养殖(陶蕾等,2015),在仔猪、泌乳奶牛和蛋鸡的养殖应用中都取得了良好的效果(胡新旭等,2013;吴小燕等,2014;孙汝江等,2012);在水产动物养殖方面,发酵饲料在虾、蟹、鱼的养殖应用中已有诸多报道,对提高养殖对象的饲料利用率和肠道健康有显著效果(钟小群等,2018;袁春营等,2018;Refstie *et al.*, 2005)。

刺参饲料以大型海藻粉为主要成分。目前,对刺参饲料的研究主要集中于饲料组成对刺参生长发育的影响(王晓艳等,2019;谭杰等,2020),对刺参发酵饲料的研究尚处于探索阶段。养殖实验中发现,投喂发酵饲料可促进刺参生长(姜燕,2014;李利华,2013;王世英,2015),而关于发酵饲料对刺参养殖效果的综合性评价较少。本研究以刺参发酵饲料为切入点,从刺参能量收支、生长、酶活性以及对养殖池水水质影响等角度,综合性探究刺参养殖过程中发酵饲料的应用效果,以期对刺参养殖提供理论数据和参考。

1 材料与方法

1.1 刺参苗种来源

本研究所用刺参来源于青岛瑞滋集团有限公司养殖场,选取生长良好、肉刺坚挺、附着力强的健康苗种,苗种规格为(1.79±0.22)g/头,在养殖车间内暂养5d后进行相关实验。

1.2 饲料的来源与制作

本研究所用饲料来源于青岛瑞滋集团有限公司,未发酵饲料的组分比例为海带(*Laminaria japonica*)粉:马尾藻(*Scagassum*)粉:扇贝边粉=3:6:1。在未发酵饲料基础上添加5%的葡萄糖和10%的布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)发酵菌液,30℃恒温发酵2d制成发酵饲料。饲料与海泥按1:4的比例混合,加入适量海水搅拌均匀,经过80目筛绢过滤后投喂。

1.3 投喂发酵饲料对刺参特定生长率和存活率的影响

本研究选取6个容积为12m³的刺参育苗池,育苗池中摆放波纹板附着基,每个育苗池投放刺参苗种30kg。实验分为2组,一组投喂未发酵饲料(未发酵饲料组,CG),一组投喂发酵饲料(发酵饲料组,FG),每组3个平行。实验周期为50d,每日饲料投喂量为刺参体重的2%,根据摄食情况微调投喂量,每天投喂2次,08:00投喂其总量的40%,15:00投喂其总量的60%。每天换水1/2,每7d倒池1次。实验结束后,将实验刺参全部捞出,称取刺参总重,并随机取样,计算刺参的平均体重,计算特定生长率(Specific growth rate, SGR);根据总重和平均体重计算总头数,进而计算其存活率(Survival rate, SR)。

刺参SGR和SR计算公式如下:

$$\text{SGR}(\% \cdot \text{d}^{-1}) = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{SR}(\%) = (N_0 - N_t) / N_0 \times 100\%$$

式中, W_0 、 W_t 分别表示实验刺参的初始体重和终末体重; t 表示养殖周期; N_0 、 N_t 分别表示实验刺参的初始个体数和终末个体数。

1.4 投喂发酵饲料对刺参非特异性免疫酶和消化酶的影响

分别在实验开始和结束时自6个育苗池中随机抽取10头刺参,用无菌注射器抽取体腔液。抽取体腔液后解剖刺参,用3%灭菌NaCl溶液反复冲洗肠道,收集肠道。体腔液和肠道于-20℃冰箱内保存,分别检测刺参的非特异性免疫酶活性和消化酶活性。

选取酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和溶菌酶(Lysozyme, LZM)4个非特异性免疫酶指标,以及淀粉酶(Amylase, AMS)和胰蛋白酶(Trypsin)2个消化酶指标,利用酶活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行测定,测定方法参照试剂盒说明书。

1.5 投喂发酵饲料对养殖池水水质的影响

本研究选取1个倒池周期(7d),采集养殖池水样,测定水体中的氨氮、亚硝酸盐及pH值。利用靛酚蓝分光光度法测定水体中的氨氮,利用萘乙二胺分光光度法测定水体中的亚硝酸盐,详细操作方法参照国标GB 17378.4,利用pH计法测定水体的pH值。

1.6 投喂发酵饲料对刺参能量收支的影响

刺参能量收支测定实验在同一个实验车间选取1个空的养殖池,池内放置6个容量为40L的塑料

水槽, 每个水槽投放刺参苗种 20 头。实验分为 2 组, 一组投喂未发酵饲料, 另一组投喂发酵饲料, 每组设 3 个平行。实验周期为 20 d, 实验开始和结束时分别称重, 计算刺参的增重率, 并随机采集 10 头刺参进行能值测算。每日饲料投喂量为刺参体重的 2%, 每天投喂等量的未发酵饲料和发酵饲料, 收集残饵和粪便。

刺参饲料为粉末状饲料, 投喂后有溶失现象。经实验测算饲料溶失率后, 换算得到摄食饲料总量(汪洋等, 2012)。

0 d 和 20 d 时, 随机采集 10 头刺参烘干, 同时将收集到的所有粪便和残饵烘干, 用氧弹仪测定 0 d 和 20 d 刺参、粪便和残饵的能值。

刺参能量收支方程式:

$$C=G+F+U+R$$

式中, C 表示摄食能; G 表示生长能; F 表示排粪能; U 表示排泄能; R 表示代谢能。

摄食能(C)的计算公式为:

$$C=C \times E_C$$

式中, C 表示实验中刺参消耗的饲料干重总量; E_C 为饲料的能值(J/g)。

生长能(G)的计算公式为:

$$G=W_1 \times E_1 - W_0 \times E_0$$

式中, W_0 、 W_1 分别表示实验刺参的初始和终末干物质重量; E_0 、 E_1 分别表示实验刺参的初始能值和终末能值(J/g)。

排粪能(F)的计算公式为:

$$F=F \times E_F$$

式中, F 表示实验中刺参产生的粪便干重总量; E_F 为粪便的能值(J/g)。

排泄能(U)的计算公式为:

$$U=(C_N - F_N - G_N) \times 24830$$

式中, C_N 表示摄食氮(g); F_N 表示排粪氮(g); G_N 表示生长氮(g); 24830 表示刺参排泄每克氮氮的能值为 24830 J/g。

代谢能(R)的计算公式为:

$$R=C-G-F-U$$

1.7 数据处理

利用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行单因素方差统计分析(One-way ANOVA), 采用 Tukey 检验进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果分析

2.1 投喂发酵饲料对刺参特定生长率和存活率的影响

由表 1 可以看出, 投喂发酵饲料苗种的 SGR 为 $(1.83 \pm 0.01)\%/d$, 略低于未发酵饲料组, 但 2 组间无显著差异($P > 0.05$); 但从 SR 来看, 发酵饲料组 $(91.51 \pm 0.74)\%$, 显著高于未发酵饲料组 $(82.35 \pm 2.22)\%$ ($P < 0.05$)。

表 1 投喂不同饲料刺参的特定生长率和存活率

(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.1 Specific growth rate and survival rate of sea cucumbers fed with different feeds (Mean±SD, $n=3$)

组别 Group	特定生长率 Specific growth rate (%/d)	存活率 Survival rate (%)
CG	1.85 ± 0.01	82.35 ± 2.22
FG	1.83 ± 0.01	$91.51 \pm 0.74^*$

注: CG: 未发酵饲料组; FG: 发酵饲料组; 表中数据为平均值及 3 个重复的标准差; 同一列数据右上角*代表有显著差异($P < 0.05$)。下同

Note: CG: Unfermented feed group; FG: Fermented feed group; The data in the table are the average and standard deviation of 3 replicates; * represents a significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.2 投喂发酵饲料对刺参非特异性免疫酶和消化酶的影响

2.2.1 非特异性免疫酶活性 由表 2 可以看出, 实验开始时发酵饲料和未发酵饲料组的 ACP、SOD、AKP 和 LZM 酶活性差异不显著($P > 0.05$)。经过 50 d 的投喂实验, 2 个实验组刺参苗种的 ACP、SOD、AKP、LZM 酶活性变化呈现出一定的差异。其中, 未发酵

表 2 投喂不同饲料刺参的非特异性免疫酶活性变化(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.2 Changes in non-specific immunoenzyme activity of sea cucumbers fed with different feeds (Mean±SD, $n=3$)

组别 Group	酸性磷酸酶 ACP (king U/100 ml)		碱性磷酸酶 AKP (king U/100 ml)		超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)		溶菌酶 LZM (U/ml)	
	0 d	50 d	0 d	50 d	0 d	50 d	0 d	50 d
CG	0.84 ± 0.03	0.82 ± 0.09	1.47 ± 0.03	0.35 ± 0.04	23.63 ± 0.02	23.28 ± 2.76	22.40 ± 2.96	57.50 ± 7.91
FG	0.81 ± 0.09	0.95 ± 0.13	1.30 ± 0.06	$0.74 \pm 0.04^*$	21.97 ± 0.30	25.64 ± 3.10	22.80 ± 1.92	$95.52 \pm 14.80^*$

饲料组的 ACP 和 SOD 酶活性变化较小, 发酵饲料组的 ACP 和 SOD 酶活性出现增高的趋势, 但与未发酵饲料组差异不显著($P>0.05$); 刺参的 AKP 酶活性发酵饲料组和未发酵饲料组均出现降低的趋势, 投喂 50 d 后发酵饲料组酶活性为(0.74±0.04) king U/100 ml, 显著高于未发酵饲料组($P<0.05$); 发酵饲料组和未发酵饲料组刺参的 LZM 酶活性均出现增高趋势, 投喂 50 d 后发酵饲料组的 LZM 酶活性为(95.52±14.80) U/ml, 显著高于未发酵饲料组($P<0.05$)。

2.2.2 消化酶活性 由表 3 可以看出, 在 50 d 的实验周期内, 发酵饲料组和未发酵饲料组刺参的淀粉酶活性均有提高。虽然发酵饲料组的酶活性高于未发酵饲料组, 但 2 组间差异不显著($P>0.05$)。而投喂发酵饲料组 50 d 后的刺参胰蛋白酶活性为(335.89±13.01) U/mg prot, 显著高于未发酵饲料组[(268.99±2.99) U/mg prot] ($P<0.05$)。

表 3 投喂不同饲料刺参的消化酶活性变化
(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.3 Changes in digestive enzyme activity of sea cucumbers fed with different feeds (Mean±SD, $n=3$)

组别 Group	淀粉酶 Amylase (U/mg prot)		胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	
	0 d	50 d	0 d	50 d
CG	6.14±0.43	8.24±0.80	74.53±5.20	268.99±2.99
FG	6.01±0.38	8.92±1.09	74.44±7.60	335.89±13.01*

2.3 投喂发酵饲料对养殖水体水质的影响

2.3.1 水体中的氨氮变化 由图 1 可以看出, 在 7 d 的倒池周期内, 未发酵饲料组和发酵饲料组水体中的氨氮均呈上升趋势, 且未发酵饲料组的上升趋势明显高于发酵饲料组。投喂 1~3 d, 未发酵饲料组水体中的氨氮略高于发酵饲料组($P>0.05$); 在投喂 4~7 d, 未发酵饲料组水体中的氨氮显著高于发酵饲料组($P<0.05$); 7 d 时, 发酵饲料组的水体氨氮浓度为(263.27±32.57) $\mu\text{g/L}$, 未发酵饲料组的水体氨氮浓度高达(462.86±14.69) $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 水体中的亚硝酸盐变化 由图 2 可以看出, 在 7 d 的倒池周期内, 未发酵饲料组和发酵饲料组水体中的亚硝酸盐均呈上升趋势, 且未发酵饲料组的上升趋势明显高于发酵饲料组。投喂 1~2 d 时, 未发酵饲料组水体中的亚硝酸盐略高于发酵饲料组($P>0.05$); 投喂 3~7 d 时, 未发酵饲料组水体中的亚硝酸盐显著高于发酵饲料组($P<0.05$); 7 d 时, 发酵饲料组的水体亚硝酸盐浓度为(315.15±61.41) $\mu\text{g/L}$, 未发酵饲料组的水体亚硝酸盐浓度高达(572.87±25.75) $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.3 水体 pH 变化 由图 3 可以看出, 在 7 d 的倒池周期内, 未发酵饲料组和发酵饲料组水体的 pH 均呈下降趋势, 发酵饲料组和未发酵饲料组差异不显著($P>0.05$)。0 d 时发酵饲料组 pH 为 7.24±0.06, 未发酵饲料组 pH 为 7.25±0.08, 7 d 时发酵饲料组 pH 为 6.97±0.08, 未发酵饲料组 pH 为 7.02±0.01。

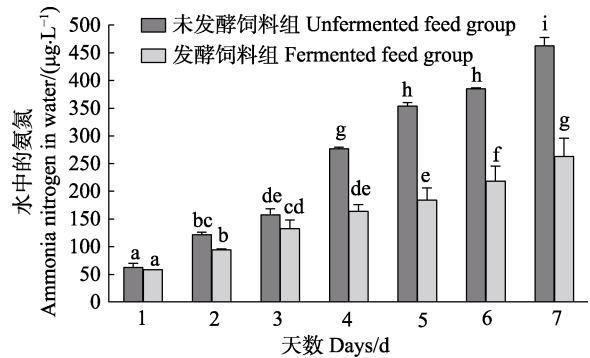


图 1 1 个倒池周期(7 d)内养殖池水氨氮含量的变化
Fig.1 Concentration of ammonia nitrogen in the culture water during the substrate change period

不同的字母标注表示二者间有显著差异($P<0.05$)
(平均值±标准差, $n=3$)。下同

Different letters indicate significant difference between the two groups ($P<0.05$) (Mean±SD, $n=3$). The same as below

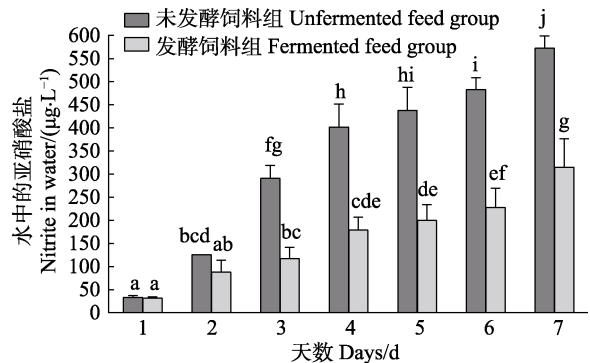


图 2 一个倒池周期(7 d)内养殖池水亚硝酸盐含量的变化
Fig.2 Concentration of nitrite in the culture water during the substrate change period

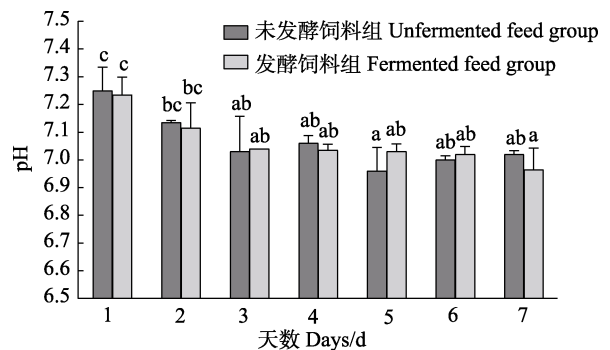


图 3 一个倒池(7 d)周期内养殖池水 pH 的变化
Fig.3 Changes of pH in the culture water during the substrate change period

2.4 投喂发酵饲料对刺参能量收支的影响

通过氧弹仪测定, 0 d 时刺参的能值为 39.34 J/g, 发酵饲料组饲料、残饵、粪便及 20 d 时的刺参能值分别为 34.79、5.35、1.77 和 42.45 J/g, 未发酵饲料组饲料、残饵、粪便及 20 d 时的刺参能值分别为 45.61、6.71、1.50 和 41.25 J/g。根据以上能值计算出发酵饲料组刺参的生长能、排粪能、排泄能以及代谢能的能量分配分别为(13.25±1.01)%、(44.78±0.80)%、(9.65±0.88)%和(32.32±2.00)%, 发酵饲料组刺参生长能占比为(13.25±1.01)%, 略高于未发酵饲料组(11.38±1.05)%; 发酵饲料组的代谢能占比为(32.32±2.00)%, 显著低于未发酵饲料组[(44.12±0.54)%] ($P < 0.05$) (表 4)。

表 4 投喂不同饲料刺参的能量分配(平均值±标准差, $n=3$)

Tab.4 Energy distribution of sea cucumbers fed with different feeds (Mean±SD, $n=3$)

组别 Group	C(%)	G(%C ⁻¹)	F(%C ⁻¹)	U(%C ⁻¹)	R(%C ⁻¹)
CG	100	11.38±1.05	37.29±0.35	7.21±0.43	44.12±0.54
FG	100	13.25±1.01	44.78±0.80	9.65±0.88	32.32±2.00*

注: C: 摄食能; G: 生长能; F: 排粪能; U: 排泄能; R: 代谢能

Note: C: Feeding energy; G: Growth energy; F: Fecal energy; U: Excretory energy; R: Metabolic energy

3 讨论

3.1 投喂发酵饲料对刺参特定生长率和存活率的影响

发酵饲料通过微生物的新陈代谢和菌体繁殖, 将饲料中的大分子物质和抗营养因子分解或转化, 产生更利于动物采食和利用的富含高活性益生菌及其代谢产物的饲料或原料, 促进养殖生物的生长(刘艳新等, 2017)。通过对比投喂发酵饲料和未发酵饲料对刺参特定生长率和存活率的影响看出, 投喂发酵饲料和未发酵饲料刺参的特定生长率无显著差异, 但发酵饲料组的刺参存活率显著高于未发酵饲料组。李利华(2013)和姜燕等(2012)比较发酵饲料和普通饲料对刺参生长的影响, 研究表明, 投喂发酵饲料可以提高刺参的特定生长率和存活率。本研究中, 发酵饲料对刺参存活率的影响与以上研究结果基本一致, 但在特定生长率方面的结果与其存在差别, 这可能与 2 个实验过程中所用苗种的规格以及投放密度存在差异有关。本研究采用了与养殖生产一致的高密度养殖, 在发酵饲料组刺参存活率显著提高, 相同投喂实验期内, 后

期养殖水体中苗种密度较大, 影响了刺参特定生长率的增长。

3.2 投喂发酵饲料对刺参非特异性免疫酶和消化酶的影响

棘皮动物主要依靠细胞免疫和体液免疫来抵抗外界的伤害(Kudriavtsev *et al*, 2004), 非特异性免疫酶在刺参的免疫防御中占据重要地位(王淑娴等, 2012; 孙永欣等, 2007)。发酵饲料可以改善动物肠道微生态平衡, 增强其免疫力, 发酵饲料中的小分子物质更有利于刺参的肠道吸收, 有助于提高刺参的非特异性免疫酶活性, 同时, 饲料在发酵过程中, 益生菌含量不断增加。本研究在投喂 50 d 后, 发酵饲料组刺参的 ACP、AKP、SOD 和 LZM 酶活性均高于未发酵饲料组, 2 组间 ACP 和 SOD 酶活性无显著差异, AKP 和 LZM 酶活性存在显著差异。王世英等(2016)在刺参的配合饲料中添加 30% 的发酵海带, 刺参 LZM、SOD、ACP 酶活性都有显著提高。以上研究均表明, 发酵饲料可显著提高刺参的免疫酶活性, 这也可以解释投喂发酵饲料组存活率显著高于未发酵饲料组。

本研究中发酵饲料对刺参消化酶活性的影响表明, 发酵饲料可以显著提高刺参胰蛋白酶活性, 对淀粉酶活性影响较小。王天神(2012)发现, 饲喂发酵饲料后, 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的胰蛋白酶活性和淀粉酶活性都显著升高; 孙兴(2015)发现, 发酵饲料可以不同程度的提高刺参的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性, 其研究结果在胰蛋白酶活性上与本研究结果相似, 这可能是由于发酵过程可以提高饲料中酵母菌等益生菌, 进而会促进刺参肠道中蛋白酶活性的提升。而本研究中, 发酵饲料对刺参淀粉酶活性影响较小, 可能与养殖动物饲料的组成有关, 本研究所用的刺参饲料主要为海带和马尾藻, 饲料的淀粉含量较低(李来好等, 1997), 发酵饲料对刺参肠道淀粉酶活性影响较小。

3.3 投喂发酵饲料对养殖水体水质的影响

刺参工厂化养殖过程中, 残饵和粪便不断沉积, 并通过微生物降解产生大量的氨氮和亚硝酸盐等有害物质, 且会影响水体的 pH 值, 这些有害物质和 pH 的变化会对刺参的摄食、消化和生长产生不利影响(胡炜等, 2018; 韩莎等, 2018)。本研究通过对比投喂未发酵饲料和发酵饲料对养殖单元池水水质的影响发现, 在 7 d 的倒池周期内, 未发酵饲料组水体的氨氮和亚硝酸盐浓度升高较快, 在第 3 天或第 4 天后显著高于发酵饲料组。王永杰等(2019)发现, 投喂发酵

饲料水体的氨氮、亚硝酸盐、pH 和硫化氢的浓度均低于对照组,本研究与其结果较为相似。总结分析认为,发酵饲料诱食性好、饲料利用率高,并且发酵饲料中含有大量的益生菌,促进了水体的氮循环,从而改善了养殖水体的水质。

3.4 投喂发酵饲料对刺参能量收支的影响

能量收支作为一种能量流动与分配的评估手段,可以用来分析生物体对能量的分配利用情况。通过对比投喂未发酵饲料和发酵饲料刺参的能量分配可以看出,发酵饲料组刺参的生长能、排粪能和排泄能占比均高于未发酵饲料组,两组间无显著差异,发酵饲料组的代谢能占比低于未发酵饲料组,且两组间存在显著差异。郭娜(2011)研究发现,投喂不同饲料刺参的能量分配有所差异,投喂鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)粉的刺参代谢能高于投喂海带粉和浒苔(*Enteromorpha prolifera*)粉刺参的代谢能,刺参的排粪能低于投喂海带粉和浒苔粉刺参的排粪能。本研究所用马尾藻与鼠尾藻同属马尾藻科,据此推断,摄食马尾藻粉刺参会分配更多的能量用于代谢活动,而马尾藻经发酵后大分子物质降解为小分子物质,利于刺参的消化吸收,因此,摄食发酵饲料刺参分配的代谢能减少;而发酵饲料增加刺参摄食量,排粪能和排泄能增加。本研究中未发酵饲料组刺参的生长能占比为(11.38±1.05)%,发酵饲料组刺参的生长能占比为(13.25±1.01)%。虽然两组的特定生长率测定结果无显著差异,但发酵组刺参的生长能占比略高,这可能是由于进行能量收支实验时,投喂等质量的发酵饲料和未发酵饲料,但是发酵过程饲料中的部分能量被发酵菌利用,因此,发酵饲料组刺参摄入的总能(摄食能)低于未发酵饲料组导致。姜燕(2014)研究发现,投喂发酵饲料的刺参用于生长的能量高于未发酵饲料与本研究结果一致,可能是发酵过程将饲料中的大分子物质转化为小分子物质(Jiang *et al.*, 2015),更有利于刺参消化吸收,刺参分配更多能量用于生长,提高了饲料的有效利用率。

为充分验证发酵饲料在工厂化大规模种苗种培育中的养殖效果,本研究采用工厂化养殖模式,在 50 d 的实验周期中,投喂发酵饲料和未发酵饲料,检测刺参的能量收支、生长、酶活性及养殖水质等指标。研究表明,投喂发酵饲料可以显著提高刺参的存活率,并使刺参分配更多的能量用于生长;同时,投喂发酵饲料可以提高刺参的碱性磷酸酶、溶菌酶和胰蛋白酶活性,减缓养殖池水氨氮和亚硝酸盐浓度的增长。综上所述,在刺参工厂化保苗中,发酵饲料的养殖效果

要优于未发酵饲料。本研究结果将对发酵饲料在刺参养殖中的应用提供参考。

参 考 文 献

- Guo N. Studies on the effects of different diets on growth, digestive physiology and energy budget of *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of China Ocean University, 2011 [郭娜. 不同饲料对刺参(*Apostichopus japonicus*)生长、消化生理和能量收支的影响. 中国海洋大学硕士学位论文, 2011]
- Han S, Hu W, Li CL, *et al.* Effects of pH stress on survival rate, growth and antioxidant enzyme activities of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 91–98 [韩莎, 胡炜, 李成林, 等. pH 胁迫对刺参存活、生长及抗氧化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 91–98]
- Hu W, Zhao B, Li CL, *et al.* Effects of chronic ammonia nitrogen stress on the feeding and digestive enzyme activities of sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 137–146 [胡炜, 赵斌, 李成林, 等. 慢性氨氮胁迫对刺参摄食与消化酶活性的影响. *中国水产科学*, 2018, 25(1): 137–146]
- Hu XX, Zhou YH, Liu HZ, *et al.* Effects of fermented feed without antibiotic on growth performance, intestinal flora, blood biochemical parameters and immune function of weaner piglets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(12): 2989–2997 [胡新旭, 周映华, 刘惠知, 等. 无抗发酵饲料对断奶仔猪生长性能、肠道菌群、血液生化指标和免疫性能的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(12): 2989–2997]
- Jiang Y. Study on the processing technology and application of fermentation feed for sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 [姜燕. 刺参(*Apostichopus japonicus*)发酵饲料的制作工艺与应用效果研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014]
- Jiang Y, Wang YG, Xue TS, *et al.* The production and feeding experiment of fermented feed in pond culture system of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 66–71 [姜燕, 王印庚, 薛太山, 等. 刺参池塘养殖系统中发酵饲料的制作与投喂. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 66–71]
- Jiang Y, Wang YG, Mai KS, *et al.* Effects of different microbes on fermenting feed for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Ocean University of China*, 2015, 14(5): 873–880
- Kudriavtsev IV, Polevshchikov AV. Comparative immunological analysis of echinoderm cellular and humoral defense factors. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 2004, 65(3): 218
- Li LH, Yang XQ, Wu YY, *et al.* Analysis of nutritive composition in *Sargassum* and its evaluation in nutriology. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1997(3): 53–59 [李来好, 杨贤庆, 吴燕燕, 等. 马尾藻的营养成分分析和营养学评价. *青岛海洋大学学报*, 1997(3): 53–59]
- Li LH. Process optimization of cucumbers fermented food and

- application in the breeding trials. Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2013 [李利华. 刺参发酵饵料工艺条件优化及养殖试验中的应用. 哈尔滨工业大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Liu YX, Liu ZY, Ni HJ, *et al.* The research progress and prospect of microbial fermentation feed. *Feed Review*, 2017(2): 15–22 [刘艳新, 刘占英, 倪慧娟, 等. 微生物发酵饲料的研究进展与前景展望. 饲料博览, 2017(2): 15–22]
- Refstie S, Sahlström S, Bråthen E, *et al.* Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2005, 246(1–4): 331–345
- Sun RJ, Lu YQ, Gao MF, *et al.* Study on application of microorganism fermentation feed in laying hens. *China Feed*, 2012(15): 12–14, 26 [孙汝江, 吕月琴, 高明芳, 等. 微生物发酵饲料在蛋鸡生产中的应用研究. 中国饲料, 2012(15): 12–14, 26]
- Sun X. Production of solid state fermentation feed and its application in *Apostichopus japonicus* cultivation. Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2015 [孙兴. 刺参固态发酵饲料的制备及应用. 大连工业大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Sun YX, Wang JQ, Wang TT, *et al.* A review: Defense mechanism in sea cucumber. *Fisheries Science*, 2007(6): 358–361 [孙永欣, 王吉桥, 汪婷婷, 等. 海参防御机制的研究进展. 水产科学, 2007(6): 358–361]
- Tan J, Li FH, Chen SQ, *et al.* Effect of temperature and diet on the reproductive condition of sea cucumber *Apostichopus japonicus* broodstock. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 1–9 [谭杰, 李凤辉, 陈四清, 等. 不同培育水温 and 饲料对刺参人工促熟效果的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 1–9]
- Tao L, Zhou YY, Zhao FW, *et al.* Development status and application of microbial fermentation feed in livestock and poultry breeding. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(13): 167–169 [陶蕾, 周玉岩, 赵凤舞, 等. 微生物发酵饲料在畜禽养殖中的发展现状及应用. 安徽农业科学, 2015, 43(13): 167–169]
- Wang SY, Chen ZQ. The effect of fermented seaweed *Laminaria japonica* on growth, immunity and digestion physiology of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2016, 21(6): 410–419 [王世英, 陈政强. 发酵海带对刺参生长和免疫及消化生理的影响. 集美大学学报(自然科学版), 2016, 21(6): 410–419]
- Wang SY. The application of microbial fermented feed in cultivation of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Jimei University, 2015 [王世英. 微生物发酵饲料在刺参养殖中的应用. 集美大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Wang SX, Ye HB, Yu XQ, *et al.* Analysis of sea cucumber immune mechanism. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(25): 12553–12555 [王淑娴, 叶海斌, 于晓清, 等. 海参的免疫机制研究. 安徽农业科学, 2012, 40(25): 12553–12555]
- Wang TS. Effect of fermented biological feed on growth, nutritional components in muscle, digestive enzyme and non-specific immunity of *Procambarus clarkii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [王天神. 生物发酵饲料对克氏原螯虾生长、营养成分、消化酶和免疫酶的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Wang XY, Qiao HJ, Huang BS, *et al.* Application research of five seaweeds in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 160–167 [王晓艳, 乔洪金, 黄炳山, 等. 5种海藻在刺参幼参饲料中的应用研究. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 160–167]
- Wang Y, Zheng ZM, Zhou CS, *et al.* Comparison of growth, energy budget of Southern-China-cultured *Stichopus japonicus* fed with three types of sediment-feeds. *Ecological Sciences*, 2012, 31(6): 613–618 [汪洋, 郑忠明, 周朝生, 等. 南移刺参摄食三种沉积物饵料下的生长和能量收支比较. 生态科学, 2012, 31(6): 613–618]
- Wang YJ, Gan XS, Xu SG, *et al.* Effects of fermented feed on the growth performance, physiological and biochemical indices and aquaculture water quality of black bream × Culter hybrid cultivar “Wanjiang No.1”. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(16): 110–112, 118 [王永杰, 甘小顺, 徐双贵, 等. 发酵饲料对杂交鲂“皖江1号”生长性能、生理生化指标及养殖水质的影响. 安徽农业科学, 2019, 47(16): 110–112, 118]
- Wu XY, Guo CH, Wang ZS, *et al.* Microbiology fermented feed: Effects on performance and nutrient apparent digestibility of lactating dairy cows. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(8): 2296–2302 [吴小燕, 郭春华, 王之盛, 等. 微生物发酵饲料对泌乳奶牛生产性能和饲料养分表观消化率的影响. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2296–2302]
- Wu YY, Sun RJ, Mi HF, *et al.* The current situation and application of biological fermentation feed in aquaculture. *China Feed*, 2018(13): 60–63 [吴业阳, 孙瑞健, 米海峰, 等. 生物发酵饲料现状及在水产养殖上应用. 中国饲料, 2018(13): 60–63]
- Yuan CY, Meng Y, Bi JC, *et al.* Effects of fermented feed on digestive enzyme activities and intestinal microflora of *Penaeus vannamei*. *Feed Industry*, 2018, 39(24): 24–28 [袁春莹, 孟阳, 毕建才, 等. 发酵饲料对南美白对虾消化酶活性与肠道菌群的影响. 饲料工业, 2018, 39(24): 24–28]
- Zhong XQ, Li XF, Cai WC, *et al.* Effects of fermented feed on growth performance, digestive enzyme activity, fillet quality and immunity of juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(1): 154–162 [钟小群, 李向飞, 蔡万存, 等. 发酵饲料对鲤鱼幼鱼生长性能、消化酶活性、肌肉品质和免疫机能的影响. 南京农业大学学报, 2018, 41(1): 154–162]

Effect of Fermented Feed on the Energy Budget, Growth, and Enzyme Activities of Sea Cucumber Seedlings and Its Influence on the Water Quality in the Culture System

WANG Fengjun^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2,3}, WANG Yingeng^{2,3}, LI Bin^{2,3}^①,
QIN Lei¹, WANG Zhiping^{1,2}, FAN Ruiyong⁴, LIU Yi⁴

(1. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Qingdao Ruizi Group Co., Ltd., Qingdao 266409)

Abstract To explore the potential of fermented feed in sea cucumber cultivation, the effects of fermented feed on the energy budget, growth, non-specific immune enzymes, and digestive enzyme activities of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) seedlings were measured, and changes in water quality (including ammonia nitrogen, nitrite, and pH) in the culture ponds during a 7-day substrate change period were measured. The results showed that during the 50 day experimental period, the survival rate of the fermented feed group was $(91.51 \pm 0.74)\%$, which was significantly higher than that of the unfermented feed group $[(82.35 \pm 2.22)\%]$ ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the two groups for specific growth rate. The growth energy ratio and metabolic energy ratio of the fermented feed group was $(13.25 \pm 1.01)\%$ and $(32.32 \pm 2.00)\%$, respectively, whereas the values in the unfermented feed group were $(11.38 \pm 1.05)\%$ and $(44.12 \pm 0.54)\%$, respectively; therefore, the fermented feed enhanced the growth energy of the seedlings. For the nonspecific immune-enzyme and digestive activities fed the different types of feed, the alkaline phosphatase, lysozyme, and pancreatic enzyme activity of the fermented feed group was (0.74 ± 0.04) king U/100 ml, (95.52 ± 14.80) U/ml, and (335.89 ± 13.01) U/mg prot, respectively, which was significantly higher than that of the unfermented feed group ($P < 0.05$). The concentration of ammonia nitrogen and nitrite on the 7th day of the substrate change period in the fermented feed group reached (263.27 ± 32.57) $\mu\text{g/L}$ and (315.15 ± 61.41) $\mu\text{g/L}$, respectively. The values in the unfermented feed group were (462.86 ± 14.69) $\mu\text{g/L}$ and (572.87 ± 25.75) $\mu\text{g/L}$, respectively, which were significantly higher than that of the fermented feed group ($P < 0.05$). All the results showed that the fermented feed improved the physiological metabolism level of the sea cucumber seedlings and maintained the water quality of the culture system; therefore, fermented feed has a broad application prospect for sea cucumber seedling culture.

Key words *Apostichopus japonicus*; Fermented feed; Energy budget; Growth; Enzyme activity; Water quality

① Corresponding author: LI Bin, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201210003

http://www.ykxjz.cn/

汤奎, 刘小林, 张帅, 刘石林, 刘佳亮, 范晓腾, 王在照. 3 种不同体色刺参体壁营养成分的比较研究. 渔业科学进展, 2021, 42(3): 155-162

Tang K, Liu XL, Zhang S, Liu SL, Liu JL, Fan XT, Wang ZZ. Comparative study on the nutrient composition in body walls of three body color variants of the sea cucumbers, *Apostichopus japonicus* (Selenka). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 155-162

3 种不同体色刺参体壁营养成分的比较研究*



汤 奎¹ 刘小林¹ 张 帅¹ 刘石林² 刘佳亮³ 范晓腾¹ 王在照^{1①}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100; 2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071;

3. 山东东方海洋科技股份有限公司 烟台 264003)

摘要 本研究分别对青色、紫色和白色刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁的营养成分, 包括蛋白、脂肪、粗多糖、氨基酸组成、脂肪酸组成及微量元素进行了比较分析。结果显示, 青色刺参蛋白含量显著低于紫色和白色刺参($P<0.05$), 脂肪含量三者无显著差异($P>0.05$), 青色刺参和紫色刺参的粗多糖含量高于白色刺参($P<0.05$)。3 种体色刺参检测出 17 种氨基酸, 白色和紫色刺参氨基酸含量相对较高, 为 48%左右, 而青色刺参体壁氨基酸含量为 44%左右。紫色和白色刺参的赖氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸等氨基酸的含量均显著高于青色刺参($P<0.05$)。亚油酸(LA)、花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)在 3 种刺参占较高比重, 其中, LA 作为重要必需脂肪酸在紫色和白色刺参中均显著高于青色刺参($P<0.05$), 为青色刺参的 4.6 倍左右; 紫色和白色刺参的 AA 含量也显著高于青色刺参($P<0.05$); 而青色刺参中的 EPA 和 DHA 均显著高于紫色和白色刺参($P<0.05$)。在检测的矿物质中, Fe 在 3 种刺参中含量最高, 紫色刺参 Fe 的含量显著低于青色和白色刺参($P<0.05$); 青色刺参 Mn 的含量显著高于紫色和白色刺参($P<0.05$); 白色刺参 Cr 的含量显著高于青色和紫色刺参($P<0.05$)。研究表明, 3 种体色刺参的营养成分存在较大差异, 均具有进一步开发利用价值。

关键词 刺参; 体壁; 营养成分; 氨基酸; 脂肪酸

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)03-0155-08

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 属棘皮动物门 (Echinodermata)、海参纲 (Holothroidea), 主要分布于西太平洋北部, 包括我国黄渤海域、俄罗斯东部海岸、日本和韩国沿岸等, 在我国 20 种的可食用海参中, 以黄渤海沿海生产刺参的食用及药用品质最高 (Chen, 2003; McElroy, 1990; 姜健等, 2004; 廖玉麟, 1997)。日本根据刺参的体色将刺参分为青刺参、红刺参和黑刺参 (Choe *et al*, 1961)。中国刺参一般为青色, 而紫色刺参和白色刺参较为罕见。3 种刺参的形态差异在

稚参体色发生阶段即可区分, 相关研究显示, 不同体色的刺参色素含量存在差异, 并发现在色素早期沉积中, 小眼转录因子 (MITF) 对体色调控可能发挥着重要作用 (邢丽丽, 2019)。3 种刺参在环境适应性方面有所不同, 青色刺参有较好的生长性状及温度、盐度耐受性, 可在低温、低盐环境中生长; 紫色刺参的生长性状与青色刺参无显著差异, 并且对于高盐和高盐的耐受性较好; 白色刺参对温度和盐度的耐受范围则较窄 (柏雨岑, 2016)。

* 国家重点研发计划 (2018YFD0901601) 资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901601)]. 汤 奎, E-mail: tangkuikui1995@163.com

① 通讯作者: 王在照, 教授, E-mail: zzwang@nwsuf.edu.cn

收稿日期: 2020-12-10, 收修改稿日期: 2021-01-25

刺参具有较高的营养和滋补价值,其体壁富含丰富的氨基酸、脂肪酸及微量元素等营养物质,并含有酸多糖、皂苷和胶原蛋白等生物活性物质(孙伟红等, 2010; 李丹彤等, 2006),具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、促进细胞生长和血管再生的功能(Borsig *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2013; Pacheco *et al.*, 2000; Tapon *et al.*, 2000; 李甜甜等, 2014)。此外,刺参营养全面,富含丰富的脂质、维生素以及 Fe、Zn 等微量元素,是一种名贵的滋补品(Sara *et al.*, 2011; 刘小芳等, 2011; 苏秀榕等, 2003; 赵玲等, 2016)。

目前,刺参已成为我国北方重要海洋养殖经济物种,市场需求的增加以及全球范围内刺参资源的过度捕捞,影响了刺参产业的持续发展(常亚青等, 2006)。因此,开发优良品种,增加养殖和加工产品的多样性,是推动刺参产业健康发展的动力,也是恢复资源、维持产业持续发展的重要途径。

在刺参新品系的选育中,除了抗病性、抗逆性和快速生长等常规目标性状外,体色也成为选育的重要经济性状(Kang *et al.*, 2011)。本研究对青色、紫色和白色刺参的蛋白质、氨基酸以及脂肪酸含量进行了测定,旨在探究不同体色刺参的营养成分差异,为刺参新品系的开发利用提供理论依据,进而引导海参市场的科学消费。

1 材料与amp;方法

1.1 刺参样品采集与处理

2019年6月15日,从山东东方海洋科技股份有限公司海阳分公司养殖基地采集2龄青色刺参、紫色刺参和白色刺参样本。其中,青色刺参平均体重为(66.37±2.67)g,紫色刺参为(71.18±3.58)g,白色刺参为(59.99±12.94)g。在冰上解剖刺参样品分离获得体壁组织,将刺参体壁切成小块后,使用冷冻干燥机(Labconco P1J, 美国)进行冷冻干燥,磨成粉后备用。

1.2 粗脂肪、粗蛋白和粗多糖测定

准确称取0.2g的体壁冻干粉样品加入石油醚进行抽提,抽提6h后,放入105℃干燥2h至恒重,用索氏提取法进行粗脂肪的测定。称取0.5g的体壁冻干粉,在消化炉上消解后,使用凯氏定氮仪(FOSS 8400, 丹麦)进行粗蛋白的测定。称取1g体壁冻干粉,加入6ml丙酮溶液,4℃浸泡24h,通风橱挥干后,加入0.1g木瓜蛋白酶和30ml 0.1mol/L的乙酸钠缓

冲液,60℃水浴24h。冷却后,5000r/min离心15min,收集上清液,采用硫酸-苯酚法测定粗多糖。

1.3 氨基酸含量测定

每个刺参样品称量0.3g体壁冻干粉加入10ml 6mol/L的HCl中,充氮气密封好后,在105℃下水解24h。得到的产物在60℃水浴条件下旋转蒸干后,用0.02mol/L的HCl定容,再稀释一定倍数后,用0.22μm的滤膜过滤,取1ml样品用氨基酸分析仪(HITACHI L-8900, 日本)分析。

1.4 脂肪酸测定

称量0.3~0.5g体壁冻干粉样品,在氯仿/甲醇溶液(V:V=2:1)中匀浆,静置1h后,使用滤纸过滤混合物,加入4ml蒸馏水,3000r/min离心5min,弃上清液,下层使用氮吹仪(上海极恒实业有限公司, JHD-003)吹干。甲酯化:在含有样品的离心管中加入1ml正己烷,加入1ml氢氧化钾-甲醇溶液(0.4mol/L),静置30min,加入2ml去离子水,静置分层,上清液经0.22μm滤膜过滤后,使用气相色谱质谱联用仪(Thermo 1310-ISQLT, 美国)分析。气质分析条件:毛细色谱柱为WM-FFAP(30m×0.25mm×0.25μm),进样口温度为250℃,进样量为10μl,载气流速为1ml/min溶剂延迟5min,离子源温度为280℃,分析时间为43.51min。

1.5 微量元素的测定

称取0.5g干体壁冻干粉样品溶于8ml硝酸中过夜,样品经微波消解仪(Milestone Ethos A, 意大利)消解后蒸干,用去离子水稀释后,采用原子吸收光谱(HITACHI Z-2000, 日本)进行分析。

1.6 数据分析

本实验数据采用平均值±标准差(Mean±SD)进行表述,采用SPSS 20软件进行数据分析。显著性分析中,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及LSD多重比较的方法,确定组间差异显著性(P<0.05)。

2 结果

2.1 刺参体壁营养成分的基本组成

如表1所示,紫色和白色刺参的粗蛋白含量显著高于青色刺参(P<0.05),脂肪含量三者无显著差异(P>0.05),青色和紫色刺参的粗多糖含量显著高于白色刺参(P<0.05)。

表1 3种体色刺参体壁营养成分的基本组成
Tab.1 Nutrients composition in the body walls of three body color sea cucumbers (%)

项目 Items	青色刺参 Green sea cucumber	紫色刺参 Purple sea cucumber	白色刺参 White sea cucumber
粗蛋白 Crude protein	46.83±3.01 ^b	54.20±3.20 ^a	54.54±2.90 ^a
粗脂肪 Crude lipid	5.12±1.24	6.54±1.39	5.80±1.04
粗多糖 Crude polysaccharide	10.84±1.15 ^a	10.27±1.55 ^a	8.27±0.93 ^b

注: 组间的不同字母代表存在显著差异($P<0.05$), 下同

Note: The different letters between groups indicate significant differences ($P<0.05$), the same as below

2.2 刺参体壁氨基酸组成

3种刺参的体壁组织均含有17种氨基酸(表2)。不同体色刺参体壁的氨基酸比例在43.98~48.30%之间, 与粗蛋白测定的结果基本保持一致。其中, 青色、紫色和白色刺参的必需氨基酸含量分别为12.44%、13.70%和13.72%; 半必需氨基酸分别为4.09%、4.46%和4.43%; 非必需氨基酸分别为27.45%、29.85%和30.15%, 紫色和白色刺参的必需氨基酸、半必需氨基

表2 3种体色刺参体壁氨基酸组成

Tab.2 Amino acids composition in the body walls of three body color sea cucumbers (%)

氨基酸 Amino acids	青色刺参 Green sea cucumber	紫色刺参 Purple sea cucumber	白色刺参 White sea cucumber
赖氨酸 Lys	2.13±0.18 ^b	2.36±0.11 ^a	2.25±0.15 ^{ab}
苯丙氨酸 Phe	1.79±0.08 ^b	1.96±0.17 ^a	2.08±0.14 ^a
蛋氨酸 Met	0.80±0.04	0.88±0.12	0.89±0.12
苏氨酸 Thr	2.49±0.13 ^b	2.73±0.13 ^a	2.71±0.08 ^a
异亮氨酸 Ile	1.43±0.08 ^b	1.56±0.05 ^a	1.56±0.09 ^a
亮氨酸 Leu	2.09±0.10 ^b	2.31±0.24 ^a	2.34±0.09 ^a
缬氨酸 Val	1.71±0.08 ^b	1.90±0.18 ^a	1.89±0.10 ^a
必需氨基酸 EAA	12.44	13.70	13.72
组氨酸 His	0.85±0.07	0.91±0.09	0.84±0.19
精氨酸 Arg	3.24±0.25 ^b	3.55±0.22 ^a	3.59±0.31 ^a
半必需氨基酸 SEAA	4.09	4.46	4.43
谷氨酸 Glu	6.34±0.50	6.80±0.55	6.86±0.59
丙氨酸 Ala	2.43±0.17 ^b	2.69±0.19 ^a	2.73±0.29 ^a
天冬氨酸 Asp	4.31±0.29 ^b	4.68±0.25 ^a	4.65±0.42 ^{ab}
胱氨酸 Cys	0.18±0.01 ^b	0.26±0.04 ^a	0.25±0.02 ^a
脯氨酸 Pro	5.96±0.52	6.49±0.47	6.56±0.60
丝氨酸 Ser	2.13±0.18	2.33±0.28	2.30±0.25
酪氨酸 Try	1.20±0.13 ^b	1.32±0.16 ^{ab}	1.41±0.21 ^a
甘氨酸 Gly	4.90±0.36 ^b	5.28±0.38 ^{ab}	5.39±0.42 ^a
非必需氨基酸 NEAA	27.45	29.85	30.15

酸和非必需氨基酸含量均高于青色刺参。在紫色刺参的7种必需氨基酸(赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)中, 除蛋氨酸外, 其余6种必需氨基酸含量都显著高于青色刺参($P<0.05$), 而白色刺参有5种必需氨基酸含量显著高于青色刺参(苯丙氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)($P<0.05$)。在包括丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸和天冬氨酸在内的鲜味氨基酸总量方面, 紫色和白色刺参(22.18%和22.34%)高于青色刺参(20.47%)。

2.3 刺参体壁脂肪酸组成

如表3所示, 在这3种体色刺参的体壁组织中, 青色刺参和白色、紫色刺参的脂肪酸含量差异较大。在多不饱和脂肪酸中, 亚油酸(C18:2)属于人体必需脂肪酸, 在紫色和白色刺参中含量均显著高于青色刺参($P<0.05$), 在紫色和白色刺参中其占总脂肪酸的比例分别为7.06%和7.26%, 而青色刺参仅为1.54%。花生四烯酸(C20:4)在紫色和白色刺参中的含量(10.06%和10.67%)也显著高于青色刺参(6.05%)($P<0.05$)。而在青色刺参中EPA(C22:5)含量很高, 达到了10.38%, 为紫色和白色刺参含量的3倍左右; 青色刺参的DHA(C22:6)的含量也显著高于紫色和白色刺参($P<0.05$), 是后2种刺参含量的2.8倍左右。亚麻酸(C18:3)在3种刺参中含量均很低(1.0%左右), 花生三烯酸(C20:3)的含量最低, 为0.1%~0.4%。在单不饱和脂肪酸中, 紫色和白色刺参的十八碳烯酸(C18:1)显著高于青色刺参($P<0.05$), 分别为14.01%、14.64%和8.06%; 二十碳烯酸(C20:1)含量在3种刺参中也较高, 其中, 紫色和白色刺参(8.45%和7.97%)中显著高于青色刺参(4.94%)($P<0.05$); 芥酸(C22:1)含量在3种刺参中相对较低, 但紫色和白色刺参(3.45%和3.03%)中的含量是青色刺参的3倍左右(1.03%); 而棕榈油酸(C16:1)在青色刺参(9.67%)中含量显著高于紫色和白色刺参(4.65%和5.07%)($P<0.05$)。在饱和脂肪酸中, 棕榈酸(C16:0)含量最高, 在3种刺参的含量为7.53%~8.47%, 其次是硬脂酸(C18:0), 在3种刺参的含量为4.93%~6.81%。

2.4 矿物质元素分析

在刺参所检测的5种矿物质中, Fe含量最高, 其中, 青色和白色刺参分别达到58.46和60.24 mg/kg, 紫色刺参相对较低, 为23.59 mg/kg。Cr含量也较高, 3种刺参均超过10.00 mg/kg, 白色刺参显著高于青色和紫色刺参($P<0.05$)。青色刺参体壁的Mn含量显著高于紫色刺参和白色刺参($P<0.05$); 3种刺参的Cu含量均较低, 为0.14~0.16 mg/kg。

表3 3种体色刺参体壁脂肪酸组成

Tab.3 Fatty acid composition in the body walls of three body color sea cucumbers (%)

脂肪酸 Fatty acids	青色刺参 Green sea cucumber	紫色刺参 Purple sea cucumber	白色刺参 White sea cucumber
C14 : 0	1.65±0.05 ^a	1.14±0.28 ^b	1.30±0.01 ^b
C15 : 0	0.28±0.03 ^a	0.12±0.03 ^b	0.09±0.02 ^b
C16 : 0	7.53±0.55 ^b	8.12±0.36 ^{ab}	8.47±0.81 ^a
C17 : 0	1.36±0.03 ^a	1.34±0.10 ^a	1.24±0.07 ^b
C18 : 0	6.81±0.37 ^a	4.93±0.09 ^b	4.96±0.41 ^b
C20 : 0	1.31±0.07	1.36±0.08	1.30±0.05
C21 : 0	0.57±0.07 ^b	0.75±0.07 ^a	0.64±0.04 ^b
C22 : 0	0.93±0.09 ^b	1.12±0.09 ^a	0.80±0.04 ^c
C23 : 0	0.19±0.02 ^a	0.14±0.02 ^b	0.08±0.02 ^c
C24 : 0	0.13±0.03 ^a	0.05±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b
饱和脂肪酸总量 Total saturated fatty acids	20.76	19.07	18.90
C14 : 1	0.75±0.03 ^{ab}	0.72±0.12 ^b	0.84±0.03 ^a
C15 : 1	0.25±0.02 ^a	0.17±0.05 ^b	0.21±0.03 ^b
C16 : 1	9.67±0.87 ^a	4.65±0.17 ^b	5.07±0.14 ^b
C17 : 1	0.88±0.10 ^a	0.45±0.12 ^b	0.42±0.03 ^b
C18 : 1	8.06±0.21 ^b	14.01±0.62 ^a	14.64±1.19 ^a
C20 : 1n9	4.94±0.22 ^c	8.45±0.29 ^a	7.97±0.40 ^b
C22 : 1n9	1.03±0.11 ^c	3.45±0.27 ^a	3.03±0.18 ^b
单不饱和脂肪酸总量 Total monounsaturated fatty acids	25.58	31.90	32.18
C18 : 2	1.54±0.07 ^b	7.06±0.30 ^a	7.26±0.58 ^a
C18 : 3n6	1.40±0.07 ^a	0.90±0.08 ^b	0.85±0.06 ^b
C18 : 3n3	0.85±0.07 ^c	1.42±0.10 ^a	1.15±0.05 ^b
C20 : 2	0.94±0.09 ^c	1.68±0.08 ^a	1.56±0.07 ^b
C20 : 3n6	0.37±0.05	0.41±0.04	0.37±0.04
C20 : 3n3	0.15±0.04 ^a	0.10±0.03 ^b	0.07±0.01 ^b
C20 : 4n6	6.05±0.08 ^b	10.06±1.04 ^a	10.67±1.43 ^a
C20 : 5n3	10.38±0.41 ^a	3.49±0.23 ^b	3.35±0.27 ^b
C22 : 6n3	8.17±0.33 ^a	2.95±0.18 ^b	2.92±0.14 ^b
多不饱和脂肪酸总量 Total polyunsaturated fatty acids	29.85	28.07	28.20

表4 3种体色刺参体壁的矿物质元素分析

Tab.4 Mineral composition in the body walls of three body color sea cucumbers (mg/kg)

元素 Elements	青色刺参 Green sea cucumber	紫色刺参 Purple sea cucumber	白色刺参 White sea cucumber
铬 Cr	10.44±0.64 ^b	10.20±0.55 ^b	12.46±0.25 ^a
铁 Fe	58.46±2.70 ^a	23.59±3.03 ^b	60.24±5.01 ^a
铅 Pb	0.58±0.15	0.32±0.17	0.28±0.04
铜 Cu	0.14±0.01	0.15±0.00	0.16±0.02
锰 Mn	8.30±0.15 ^a	2.61±0.20 ^b	2.30±0.10 ^b

3 讨论

海参是我国最有价值的水产养殖物种之一,不仅

具有较高的营养价值,还具有广泛的药用价值。近年来,海参的营养成分被广泛研究,为海参的开发利用提供参考。海参具有高蛋白、低脂肪的特点(Wen *et al.*, 2010),蛋白质和脂肪的含量决定了其营养价值。在这3种体色的刺参中,青色刺参的蛋白含量显著低于紫色和白色刺参($P<0.05$),脂肪含量三者无显著差异,青色和紫色刺参的粗多糖含量显著高于白色刺参($P<0.05$)。与之前的研究相比,脂肪含量偏高(李丹彤等, 2006; 李忠清等, 2016),可能是取样时正处于刺参夏眠的前期,刺参积累脂肪,储存能量。3种刺参在基本组成上存在很大差异,说明可能存在不同的食疗功效。

氨基酸具有重要的生理功能,除作为合成蛋白质

的主要原料外,还与调控基因表达、抗氧化、调节一氧化氮的合成有关(Hou *et al*, 2013; Wu, 2009)。氨基酸含量充足且种类全面才能满足机体生长发育和健康的需要,而氨基酸缺乏会导致发育受到抑制或产生疾病。在这3种体色刺参中,均有17种氨基酸被检测出。氨基酸含量以白色刺参最高,紫色次之,青色刺参最低。紫色刺参与白色刺参之间相比无显著差异,而青色刺参的氨基酸含量显著低于紫色和白色刺参,包括苯丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸和甘氨酸($P<0.05$)。必需氨基酸指动物自身不能合成,需从食物中补充的氨基酸。必需氨基酸中,紫色刺参和白色刺参的含量达到了13.70%和13.72%,均高于青色刺参的12.44%。因此,这2种体色的刺参可以提供更多的必需氨基酸。赖氨酸是一般谷类和人乳蛋白质的第一限制氨基酸(徐善良等, 2012),紫色刺参和白色刺参的赖氨酸含量显著高于青色刺参,因此,对赖氨酸的补充有更好的效果。丙氨酸、精氨酸是大部分哺乳动物生长发育所必需的氨基酸,同时,精氨酸在大脑、肌肉和肝脏等人体组织中发挥着至关重要的解毒作用(Tong *et al*, 2004)。徐伟风(2016)研究发现,在日粮中添加精氨酸可以减轻4-硝基酚引起的大鼠肝脏损伤。本研究结果显示,紫色和白色刺参的丙氨酸和精氨酸含量显著高于青色刺参($P<0.05$)。因此,紫色和白色刺参比普通青色刺参对肝脏可能具有更好的保护作用 and 食疗作用。氨基酸除了具有各种生理功能外,还在食品呈味中扮演着重要角色(赵亭亭等, 2018)。苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸和酪氨酸作为常见的呈味氨基酸(Fuentes *et al*, 2010),青色刺参中的含量显著低于紫色刺参和白色刺参($P<0.05$),研究表明,紫色刺参和白色刺参在食用风味和功效方面可能更具有优势。青色刺参在氨基酸含量上和紫色、白色刺参相比差异显著,说明就氨基酸成分而言,紫色和白色刺参优于青色刺参。

脂肪酸在动物体内具有十分重要的功能,是维持机体稳态不可缺少的。刺参脂肪酸种类比较丰富,共检测出26种脂肪酸,其中,饱和脂肪酸10种,单不饱和脂肪酸7种,多不饱和脂肪酸9种,三者在组成上有显著差异。在多不饱和脂肪酸(PUFA)中,AA(C20:4)、EPA(C20:5)和DHA(C22:6)含量较高。AA是类花生酸类物质的前体,具有改善视力和记忆力、调节血脂和血糖的生理功能(Attwell *et al*, 1993), Wu等(2007)研究发现,日粮中添加AA可预防高脂饮食引起的早期胰岛素抵抗。紫色和白色刺参的花生四烯酸含量显著高于青色刺参($P<0.05$),因此,食用紫色和白

色刺参可能会增强血管弹性、降低血液粘稠度、减少心脑血管患病的几率。EPA和DHA属于n-3系列PUFA,二者可促进脑发育,还能通过降低三酰甘油,减轻炎症来预防冠状动脉疾病(Sissener *et al*, 2017), Xiao等(2020)研究还发现, EPA和DHA可促进细胞生长,减轻脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)带来的损伤。含量较高的EPA和DHA表明青色刺参在预防冠状动脉疾病方面有更大的潜力。亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)在大多数动物体内不能合成,必须由食物供给,因此,被称为必需脂肪酸(袁鹏, 2012)。必需脂肪酸对维持机体的功能至关重要,亚油酸在人体中可被合成 γ -亚麻酸及花生四烯酸,并具有抗高血压、抗肿瘤、改善骨密度、抗糖尿病等作用, Zhao等(2019)研究发现,亚油酸可通过调控白细胞来治疗哮喘。紫色和白色刺参中亚油酸含量显著高于青色刺参($P<0.05$),表明紫色和白色刺参对人类可能具有更高的营养价值。

刺参富含人体内所需的微量元素,矿物元素通过与蛋白质和其他基因结合,发挥着重要的生理生化功能(刘胜男等, 2019)。Fe一般在氧气运输、细胞周期生长、神经递质和髓磷脂合成方面发挥作用, Cr在血糖调节中发挥着重要功能, Mn在促进骨骼发育,预防贫血方面有重要作用(Peereboom, 1985)。3种刺参体壁均含有所检测的5种微量元素,其中, Fe含量最高。青色刺参和白色刺参 Fe的含量显著高于紫色刺参($P<0.05$),白色刺参 Cr的含量显著高于青色和紫色刺参($P<0.05$),青色刺参 Mn的含量显著高于紫色和白色刺参($P<0.05$)。Fe、Cr和Mn的含量差异可能是3种刺参由Fe、Cr和Mn参与的代谢水平的差异所造成,也可能是3种金属离子在不同刺参的富集能力差异导致。

4 结论

通过对蛋白、脂肪、粗多糖、氨基酸、脂肪酸和微量元素进行分析,比较了3种体色刺参的营养成分及含量。研究表明,紫色刺参和白色刺参的粗蛋白、亚油酸、花生四烯酸以及多种氨基酸含量显著高于青色刺参,而青色刺参的EPA、DHA和Mn含量显著高于紫色和白色刺参。表明3种体色刺参营养成分存在较大差异,为进一步开发和利用海参资源提供了依据。

参 考 文 献

Attwell D, Miller B, Sarantis M. Arachidonic acid as a messenger in the central nervous system. *Seminars in Neuroscience*, 1993,

- 5(3): 159–169
- Bai YC. Research of differences in environmental adaptability, and nutritional requirements of three color morphos of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 [柏雨岑. 不同色型仿刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 环境适应性与营养需求的比较研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2016]
- Borsig L, Wang LC, Cavalcante MCM, *et al.* Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(20): 14984–14991
- Chang YQ, Sui XL, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 198–201 [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增殖养殖业现状、存在问题与展望. *水产科学*, 2006, 25(4): 198–201]
- Chen JX. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 2003, 18: 18–23
- Choe S, Ohshima Y. On the morphological and ecological differences between two commercial forms, “Green” and “Red”, of the Japanese common sea cucumber, *Stichopus japonicus* Selenka. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1961, 27(2): 97–106
- Fuentes A, Fernández-Segovia I, Serra JA, *et al.* Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*, 2010, 119(4): 1514–1518
- Hou YQ, Wang L, Yi D, *et al.* N-acetylcysteine reduces inflammation in the small intestine by regulating redox, EGF and TLR₄ signaling. *Amino Acids*, 2013, 45(3): 513–522
- Jiang J, Yang BL, Tai Y. Studies on resources and bioactive substances of sea cucumber. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 537–540 [姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究. *生物技术通讯*, 2004, 15(5): 537–540]
- Kang JH, Yu KH, Park JY, *et al.* Allele-specific PCR genotyping of the HSP70 gene polymorphism discriminating the green and red color variants sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(8): 351–355
- Li DT, Chang YQ, Chen W, *et al.* Analysis of nutritive composition of bodywall in wild *Apostichopus japonicus* Selenka at Zhangzi Island. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(3): 278–282 [李丹彤, 常亚青, 陈炜, 等. 獐子岛野生刺参体壁营养成分的分析. *大连海洋大学学报*, 2006, 21(3): 278–282]
- Li TT, Wang XH, Lin ZC, *et al.* Research and progression on anti-lung neoplasm activity and the regulation of T cellular immune function by polysaccharide from sea cucumber. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2014, 8(10): 123–125 [李甜甜, 王相海, 林存智, 等. 海参多糖抗肺癌活性及对 T 细胞免疫功能调节研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(10): 123–125]
- Li ZQ, Xia B, Wang JY, *et al.* Comparative study on nutrient composition of body walls of green and white sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 101–107 [李忠清, 夏斌, 王际英, 等. 青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 101–107]
- Lian W, Wu MY, Huang N, *et al.* Anti-HIV-1 activity and structure-activity-relationship study of a fucosylated glycosaminoglycan from an echinoderm by targeting the conserved CD4 induced epitope. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830(10): 4681–4691
- Liao YL. *Fauna sinica Echinodermata Holothuroidea*. Beijing: Science Press, 1997, 148–150 [廖玉麟. 中国动物志 棘皮动物门海参纲. 北京: 科学出版社, 1997, 148–150]
- Liu SN, Cao R, Zhao L, *et al.* Analysis on nutrients of *Isostichopus fuscus*. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(8): 187–191 [刘胜男, 曹荣, 赵玲, 等. 暗色等刺参(*Isostichopus fuscus*)营养成分分析. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(8): 187–191]
- Liu XF, Xue CH, Wang YM, *et al.* Principal component analysis of inorganic elements in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(11): 3119–3122 [刘小芳, 薛长湖, 王玉明, 等. 刺参中无机元素的聚类分析和主成分分析. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(11): 3119–3122]
- McElroy S. Beche-de-mer species of commercial value—an update. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 1990, 2: 2–7
- Pacheco RG, Vicente CP, Zancan P, *et al.* Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2000, 11(6): 563–573
- Peereboom JWC. General aspects of trace elements and health. *Science of the Total Environment*, 1985, 42(1–2): 1–27
- Sara B, Farooq A, Nazamid S, *et al.* High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—A review. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1761–1805
- Sissener NH, Sanden M, Torstensen BE, *et al.* High dietary 18:2n-6/18:3n-3 ratio does not inhibit elongation and desaturation of 18:3n-3 to EPA and DHA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(5): 899–909
- Su XR, Lou YJ, Chang YQ, *et al.* Study on the nutritional components and the antineoplastic activity of polysaccharide of sea cucumber. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2003, 25(2): 181–182 [苏秀榕, 娄永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究. *营养学报*, 2003, 25(2): 181–182]
- Sun WH, Li XC, Han XQ, *et al.* Analysis and evaluation of chief nutrient composition in different parts of *Stichopus japonicus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 212–220 [孙伟红, 李晓川, 韩现琴, 等. 刺参不同部位中主要营养

- 成分分析与评价. 动物营养学报, 2010, 22(1): 212–220]
- Tapon-Bretonnière J, Drouet B, Matou S, *et al.* Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thrombosis and Haemostasis*, 2000, 83(8): 332–337
- Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4(8): 823–832
- Wen J, Hu CQ, Fan DG. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(14): 2469–2474
- Wu GY. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1–17
- Wu MY, Wang XM, Duan QH, *et al.* Arachidonic acid can significantly prevent early insulin resistance induced by a high-fat diet. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007, 51(3): 270–276
- Xiao K, Liu CC, Qin Q, *et al.* EPA and DHA attenuate deoxynivalenol-induced intestinal porcine epithelial cell injury and protect barrier function integrity by inhibiting necroptosis signaling pathway. *FASEB Journal*, 2020, 34(2): 2483–2496
- Xing LL. Basic research on physiological characteristics and regulation mechanism of body color formation in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2019 [邢丽丽. 刺参体色发生生理特征与调控机制的基础研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2019]
- Xu SL, Wang DL, Xu JL, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* from the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 775–782 [徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳(*Pampus argenteus*)、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳(*P. sinensis*)肌肉主要营养成分分析与评价. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 775–782]
- Xu WF. Protective effects of L-arginine on hepatic and ovarian damage in 4-nitrophenol-exposed rats. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 [徐伟风. 精氨酸对4-硝基酚暴露大鼠肝脏和卵巢损伤的缓解作用. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Yuan P. The anti-aging function of curcumin and essential fatty acids. Master's Thesis of Zhejiang University, 2012, 7–26 [袁鹏. 姜黄素与必需脂肪酸的抗衰老功能研究. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2012, 7–26]
- Zhao JV, Schooling CM. The role of linoleic acid in asthma and inflammatory markers: A Mendelian randomization study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 110(3): 685–690
- Zhao L, Ma HW, Cao R, *et al.* Analysis of nutritional component in 10 kinds of sea cucumbers. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(7): 2867–2872 [赵玲, 马红伟, 曹荣, 等. 10种海参营养成分分析. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2867–2872]
- Zhao TT, Zhang Y, Chen C, *et al.* Analysis of nutrient components and evaluation of nutritive quality in flesh of three species of cultured groupers. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 89–96 [赵亭亭, 张岩, 陈超, 等. 3种养殖石斑鱼的肌肉营养成分分析与品质评价. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 89–96]

(编辑 陈辉)

Comparative Study on the Nutrient Composition in Body Walls of Three Body Color Variants of the Sea Cucumbers, *Apostichopus japonicus* (Selenka)

TANG Kui¹, LIU Xiaolin¹, ZHANG Shuai¹, LIU Shilin², LIU Jialiang³, FAN Xiaoteng¹, WANG Zaizhao¹①

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071;

3. Shandong Oriental Ocean Science and Technology Company, Yantai 264003)

Abstract In the present study, the concentrations of protein, fat, and crude polysaccharide were determined in the body wall of three body color variants of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), along with the composition of fatty acids and amino acid microelements. The results showed that the protein content in green sea cucumbers was significantly lower than in purple and white sea cucumbers ($P < 0.05$), the fat content showed no significant differences ($P > 0.05$), and the crude polysaccharide contents in green and purple sea cucumbers were higher than in white sea cucumbers ($P < 0.05$). A total of 17 amino acids were determined in the sea cucumbers, with the purple and white sea cucumbers containing higher amino acid contents (about 48%), while the contents in the green sea cucumber was about 44%. The contents of amino acids such as lysine, phenylalanine, threonine, and valine in purple and white sea cucumbers were significantly higher than in green sea cucumbers. The linoleic acid (LA), arachidonate (ARA), timnodonic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) had higher proportions than other polyunsaturated fatty acids in the three sea cucumbers. As an important polyunsaturated fatty acid, LA in both the purple and white sea cucumbers was significantly higher than in green sea cucumbers (by 4.6 times, $P < 0.05$). The ARA contents in purple and white sea cucumbers were also significantly higher than in green sea cucumbers, while the EPA and DHA contents were significantly lower ($P < 0.05$). Additionally, we found that iron was the highest among the inorganic elements in all sea cucumbers, but was significantly lower in purple sea cucumbers than in green and white sea cucumbers. The manganese content in green sea cucumbers was significantly higher than in purple and white sea cucumbers, and chromium was significantly higher in white sea cucumbers than in green and purple sea cucumbers. Therefore, the nutritional composition of the three body color variants of sea cucumbers were quite different, and all of them have values for further development and utilization.

Key words *Apostichopus japonicus*; Body wall; Nutrient Compositions; Amino acid; Fatty acid

① Corresponding author: WANG Zaizhao, E-mail: zzwang@nwsuf.edu.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主任委员 Chairman 唐启升 TANG Qisheng

副主任委员 Vice-Chairman 麦康森 MAI Kangsen 桂建芳 GUI Jianfang 包振民 BAO Zhenmin 金显仕 JIN Xianshi

委员 Editorial Committee (以姓名笔画为序)

王清印 WANG Qingyin	王鲁民 WANG Lumin	王新鸣 WANG Xinming	戈贤平 GE Xianping
孔杰 KONG Jie	叶乃好 YE Naihao	曲克明 QU Keming	任胜民(新西兰) REN Shengmin
危起伟 WEI Qiwei	庄平 ZHUANG Ping	刘英杰 LIU Yingjie	关长涛 GUAN Changtao
江世贵 JIANG Shigui	严小军 YAN Xiaojun	李军(美) LI Jun	李纯厚 LI Chunhou
李健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	李琪 LI Qi	杨红生 YANG Hongsheng
何建国 HE Jianguo	邹桂伟 ZOU Guiwei	宋林生 SONG Linsheng	张国范 ZHANG Guofan
陈松林 CHEN Songlin	陈勇(美) CHEN Yong	邵长伟 SHAO Changwei	林洪 LIN Hong
周永灿 ZHOU Yongcan	单秀娟 SHAN Xiujuan	赵宪勇 ZHAO Xiaoyong	俞志明 YU Zhiming
秦启伟 QIN Qiwei	秦松 QIN Song	徐跑 XU Pao	徐皓 XU Hao
黄捷 HUANG Jie	常亚青 CHANG Yaqing	崔利锋 CUI Lifeng	董云伟 DONG Yunwei
解绶启 XIE Shouqi	谭志军 TAN Zhijun	薛长湖 XUE Changhu	薛清刚 XUE Qinggang

主编 Editor-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi

副主编 Associate Editor-in-Chief 孔杰 KONG Jie

编辑部主任 Editorial Director 常青 CHANG Qing

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第42卷 第3期 2021年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.42 No.3 Jun. 2021

主管单位 中华人民共和国农业农村部
主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会

出版单位 **科学出版社**
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.yyqxjz.cn>
E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 金显仕
印 刷 青岛国彩印刷股份有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京399信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Editor-in-Chief Jin Xianshi

Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.

Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China

Overseas Distributed by China International Book Trading
Corporation

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

ISSN 2095-9869



9 772095 986217

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发行

定 价: 40.00元