

刺参高温定向选育群体子一代耐温性状的分析

赵欢¹, 刘石林², 杨红生², 赵鹤凌³, 林承刚²

(1. 大连海洋大学 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院 成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 在室内控温条件下测定了定向选育获得的刺参(*Apostichopus japonicus*)耐高温群体子一代高温胁迫下的存活率及热休克蛋白(Hsp90和Hsp26)基因表达特征, 从生理及分子水平分析了刺参耐高温群体子一代对高温胁迫的响应特征, 确定高温耐受性的可遗传性。结果表明: 与野生刺参群体子一代相比, 定向选育刺参群体子一代在高温胁迫下表现出较高的存活率, 32℃高温刺激下定向选育群体和野生群体稚参的存活率分别为80%和56.67%。高温胁迫下两个群体子一代的热休克蛋白90及26基因表达特征也存在差异, 定向选育刺参群体子一代在高温刺激条件下热休克蛋白基因表达水平低于野生群体, 且表达出现滞后现象。结果表明定向选育刺参群体子一代对高温具有一定的耐受能力, 一定程度上验证了高温耐受性的可遗传性, 该实验所获得的结果可以为后续刺参良种培育提供一定的理论依据和技术支撑。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); 定向选育; 存活率; 热休克蛋白; 耐温性

中图分类号: Q346 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)09-0001-06

doi: 10.11759/hyxx20121105001

刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属于棘皮动物门、海参纲、楯手目、刺参科。其富含蛋白质, 黏多糖和微量元素, 具有很高的营养和药用价值^[1-2]。近年来随着刺参的药用和保健价值逐步得到全球化认识, 刺参需求量不断增加, 刺参的苗种繁育和养殖业迅速发展, 养殖规模不断扩大, 养殖产量日益提高。2011年我国刺参的养殖面积约为15万hm², 产量约11万t, 产值约为200亿元人民币, 刺参已经成为我国北方沿海主要的海水养殖经济种类。

刺参属于温带种类, 主要分布于西太平洋北部, 包括中国黄渤海海域、俄罗斯东部海岸、日本和韩国沿岸等区域。水温对刺参的生长影响显著, 刺参生长的适宜温度为5~20℃, 最适生长温度为10~16℃^[3], 当水温升高到一定温度, 刺参会停止活动, 进入“夏眠”状态。随着纬度的增加刺参进入夏眠的时间而推迟, 刺参的夏眠期最短2个月, 最长4个月, 一般在100d左右。在夏眠期间刺参消化道萎缩, 靠消耗自身的能量维持生存, 体重明显减轻。这一特殊习性延缓刺参生长速度, 延长养殖周期, 影响刺参养殖业的效益。近年来养殖业摸索出刺参南移养殖模式^[4], 一定程度上加速刺参生长, 获得较好的结果, 但是由于春末到秋末的高温限制, 养殖周期一般为冬季。

为此利用育种技术培育具有高温耐受性的刺参是缩短刺参养殖周期, 提高刺参养殖业经济效益的有效途径之一, 也是刺参良种培育的重要方向之一。本实验室近年来利用高温选育和定向培育获得具有耐高温性状的群体, 对其高温耐受性状进行了初步检测, 确定其对于高温的耐受性与普通群体相比提高1℃。

温度是影响刺参生长、发育、繁殖的重要因素之一, 刺参对温度变化响应机理的研究已逐步开展。Yang等^[5]研究发现在一定恒温(10~30℃)范围内, 随温度的升高, 刺参耗氧率呈上升趋势; 随着温度的升高刺参体内能量分配发生变化, 呼吸能显著增加而生长能下降; 温度变化会引起刺参消化酶及抗氧化酶等生理活性发生改变^[6-7]。随着刺参分子生物学的展开, 已经建立了温度胁迫下刺参的消减文库并对热刺激下刺参热休克蛋白表达量差异进行分析^[8-9]。通过上述研究初步建立了温度胁迫对刺参影响的生

收稿日期: 2013-12-28; 修回日期: 2014-03-06

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA01A412); 农业科技成果转化资金项目(2012GB24910656); 山东省农业良种课题速生、抗病、耐高温刺参良种选育; 国家自然科学基金项目(40976089)

作者简介: 赵欢(1983-), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事海洋生态分子生物学研究, 电话: 0411-84762290, E-mail: zhaohuan@dlou.edu.cn; 杨红生, 通信作者, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

理生化及分子生物学研究方法,但目前尚未见将这些测定方法用于耐温群体性状分析的报道。为此本研究利用存活率和功能基因表达两个检测指标,对比不同群体子代高温存活率及热休克蛋白基因表达量的变化,对定向选育耐温群体子代的耐温性进行探索,初步验证选育群体耐温性状的可遗传性,为刺参耐温良种选育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2009年6月在山东烟台东方海洋科技股份有限公司海参育苗场随机选取定向选育刺参群体子一代幼参100头,另选取相同数量的同期烟台野生群体幼参作为对照组,幼参平均体长为1~2cm,体质量为 $1.8\text{g}\pm 1.03\text{g}$ 。其中定向选育刺参为本实验室2006年经过高温选育并经3年南移池塘养殖获得的耐高温群体。实验前,幼参置于 0.5m^3 水槽中暂养7d,水温维持在 $23\text{C}\pm 0.5\text{C}$,每天按时定量投喂自行配制的人工饵料(由鼠尾藻粉、马尾藻粉、活性干泥各1/3组成)。

1.2 不同群体幼参温度耐受性实验

从两个群体幼参中随机选择30只个体混合进行预实验,实验在容积为 0.35m^3 的水箱中进行,设置4个温度,每个温度设置3个重复。实验采取缓慢升温方法,温度从 23C 缓慢升至 28C 、 30C 、 32C 、 34C ,平均升温幅度 $0.5\text{C}/\text{h}$;到达最高温度后维持24h,后缓慢降温恢复到常温,另设置常温对照组。恢复温度后每隔6h观察一次,并及时捞出死亡幼参,待稳定后统计存活幼参数目,确定正式实验温度。

于2009年7月6日至7月23日进行正式实验。设置高温实验组(32C)和对照组(23C),每个处理组设置3个重复,每个重复放置10头幼参。高温实验组首先快速从 23C 升温至 30C ,并在 30C 维持5d,随后以每天升温 0.5C 的速度缓慢升温至达到 32C 后保持在此温度8d(图1)。水箱温度由实验室温度控制系统控制,在温度实验期间各组保持正常饲养、充气和换水,水温变化幅度控制在 0.1C 。实验期间每天进行观测,记录并捞出死亡个体,实验结束后记录最后死亡及存活的刺参数量。

1.3 不同群体幼参热休克蛋白基因表达量的差异

在自然水温为 23C 时,从不同群体中随机选择

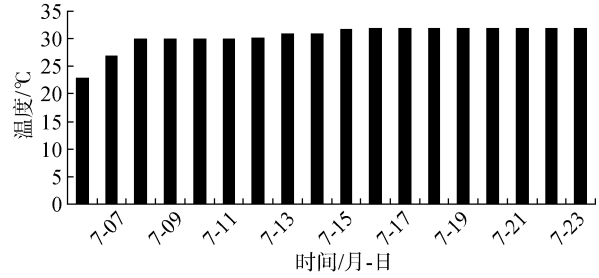


图1 高温刺激实验温度变化趋势

Fig.1 The trend of temperature variation in this experiment

40只幼参直接放入 28C 水体中进行急性温度刺激,在1、2、4、10、24、48h随机取出5只个体,迅速保存于液氮中待测。

取刺参体壁参照Trizol说明书进行总RNA的提取,并反转成cDNA模板。反转反应体系如下:1 μL 总RNA,0.5 μL oligo dT(10mmol/L),0.25 μL RNase Inhibitor(40 U/ μL),0.5 μL NTP(2.5mmol/L),1 μL M-MLV反转录酶(200U)加水至10 μL 。反转录条件如下:42 C 1h,94 C 90s,4 C 10min。

利用Real time PCR扩增反应(Mastercycler® ep realplex, Eppendorf)测定Hsp90及Hsp26基因表达量。根据Genebank中已有的刺参Hsp90序列(HQ-689677),Hsp26序列(HQ689678)及 β -actin序列信息(EU668024)合成引物(表1)。反应体系包括:12.5 μL SYBR Green PCR Master Mix(Takara),0.5 μL Forward primer(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),0.5 μL Reverse primer(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),2 μL cDNA,用水补充至终体积25 μL 。反应条件如下:95 C 变性10s,然后95 C 5s,59 C 20s,72 C 30s进行40个循环。溶解反应的条件为65~92 C ,每升0.2 C 保持1s读板记录荧光量。获得的溶解曲线都为单一峰,确定产物特异性扩增。Hsp90及Hsp26基因表达水平计算以 β -actin为内参,对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 确定不同温度应激时间的Hsp90及Hsp26基因的相对含量(表1)。

表1 引物序列信息

Tab.1 Primer information in this experiment

引物名	序列
Hsp90F	5'-CTGAACAAAACCAAGCCCATCTG-3'
Hsp90R	5'-CAAGAGTGCACGGAAGTCCAAC-3'
Hsp26F	5'-TCCATCATTTGGCCTTCAGCGTA-3'
Hsp26R	5'-CATCAAACCTCGTCATCGGCAAGC-3'
Actin F	5'-CATTCAACCCTAAAGCCAACA-3'
ActinR	5'-TGGCGTGAGGAAGAGCAT-3'

1.4 数据处理

运用 SPSS13.0 软件统计不同群体刺参幼参存活率及基因表达相对量的平均值和标准差, 并进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P < 0.05 表示有差异显著性。所有的结果均以平均值±标准差来表示。

2 结果

2.1 不同群体子一代幼参耐高温性能比较

在预实验中采用 4 个不同的温度梯度对幼参进行温度刺激, 整个过程及时捞出死亡个体, 记录存活数量, 计算存活率。结果显示: 28℃和 30℃刺激条件下混合群体刺参幼参存活率在 95%和 90%以上, 而温度达到 34℃时刺参幼参大量死亡, 在 32℃时刺参幼参的存活率为 60%, 接近半数致死温度, 故选择 32℃作为刺参幼参高温存活率检测温度, 进行下一步大规模的实验。

通过缓慢升温 and 维持高温的方式进行慢性实验, 实验结果表明在缓慢升温至 30℃并维持在 30℃这段时间里各群体子一代幼参没有出现死亡, 但是明显出现幼参黏附能力弱, 活动能力差的现象, 这与预实验中获得的结果相一致。随着温度逐步升高至 32℃, 两个群体子一代幼参都开始出现不同程度的个体死亡现象, 存活率不断下降。定向选育群体子一代幼参在高温胁迫下表现出与其亲体相同的温度耐受性, 在 30℃至 32℃的温度变化过程中存活率始终高于野生群体。随着时间的延长, 两个群体不断有幼参死亡, 待稳定后计算存活率。结果显示, 定向选育群体子一代幼参存活率为 80.00±10.00, 与野生群体存活率(56.67±5.77)存在显著性差异(P<0.05, 图 2)。

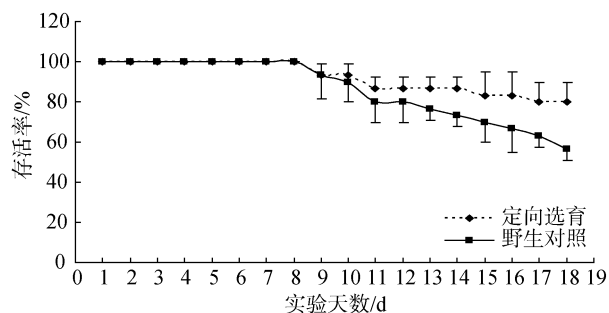


图 2 高温刺激条件下不同群体存活率变化趋势

Fig. 2 Survival trend of different population of *A. japonicus* under heat stress

2.2 高温刺激下不同群体子一代幼参 Hsp90 及 Hsp26 基因表达量的变化

利用荧光定量 PCR 检测发现在热刺激过程中刺参 β-actin 基因表达没有明显变化, 故选择其作为内参基因评价热休克蛋白基因表达量变化。实验结果显示随着热刺激时间的增加, 各个群体子一代幼参热休克蛋白基因表达都呈现先升高后下降的趋势, 野生群体在热刺激 1 h 时 Hsp90 及 Hsp26 基因表达达到最高峰, 而定向选育群体则在热刺激 2 h 时 Hsp90 及 Hsp26 基因表达达到最大。随着时间的延长各群体子一代幼参热休克蛋白基因表达逐渐下降, 24 h 时各群体基因的表达量几乎恢复到刺激前水平。对比不同群体基因表达特征发现, 在常温状态下, 定向选育群体热休克蛋白基因含量略高于野生群体, 但两个群体差异不显著; 高温刺激诱导两个群体子一代幼参热休克蛋白基因表达量增加, 但是定向选育群体子一代幼参 Hsp90 及 Hsp26 基因最大表达量低于野生群体(P < 0.05, 图 3)。

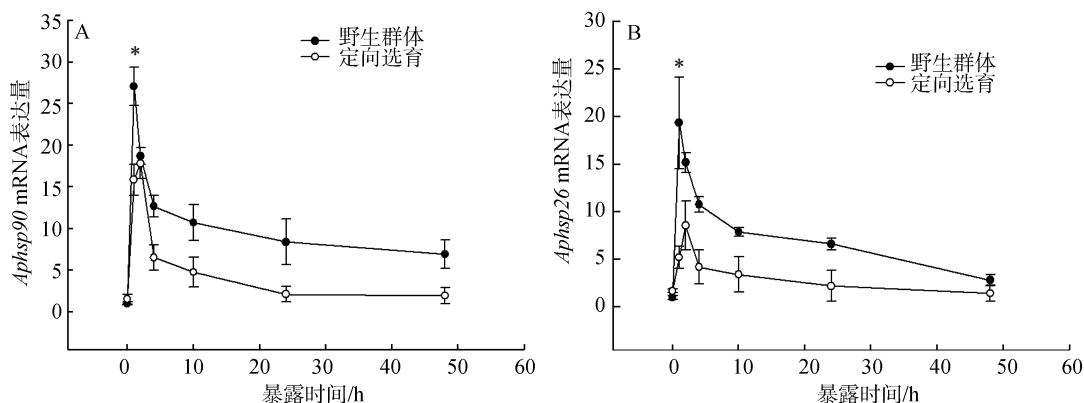


图 3 高温刺激下不同群体子一代幼参 Hsp90(A)和 Hsp26(B)基因表达量比较

Fig.3 Comparison of Hsp90 (A) and Hsp26 (B) mRNA expression in different populations of *A. japonicus* under heat stress

*代表不同组间差异显著 P<0.05

* indicates the difference between group P<0.05

3 讨论

为了推进刺参养殖业的健康快速发展,利用选育种技术开展优质高产抗逆品种的选育已经受到国内外学者的广泛关注。目前国内关于刺参选育种的工作已起步,常亚青等获得中俄杂交群体,并发现该群体具有较好的耐低温能力^[10]。魏玉峰等^[11]对烟台和青岛海域的野生刺参群体进行选种繁育,对不同选育组合稚幼参生长情况进行分析,表明选育组合的稚幼参生长率高于自交对照组。

耐高温群体的选育研究目前已经在鱼类等海洋经济物种中已广泛开展, Brett 等^[12]在高温条件下选育了虹鳟(*Salmo gairdneri* Richard)群体,发现其体长、体重高于对照组。作为中国主要经济养殖品种之一,刺参耐温群体选育的研究目前较少。黄大宏等^[13]选育获得速生耐温群体,对其生长性状进行检测。崔静等^[14]研究了刺参南移养殖过程中的各项生理生化指标的变化,并构建了南移养殖刺参 cDNA 文库。本实验室在近年来开展了部分高温定向选育工作,利用高温胁迫定向选育获得了部分耐高温刺参群体,对该群体的耐温性状亦进行检测,发现选育群体比普通群体高温耐受性提高了 1℃。为了验证该群体耐温性状是否稳定遗传,本实验对定向选育群体子代的耐温性进行验证。

群体耐高温性能的不同会受到内部因素和外部因素的双重影响,为了消除外部因素(包括盐度、饲料的投喂等)对实验的影响,本实验尽量使养殖条件达到一致,从而减少这些环境因子对实验造成的误差,以确保实验获得的耐温性能差异主要来自于不同群体之间的差异。本实验对比两个群体子一代幼参高温耐受性,结果发现高温胁迫条件下定向选育群体子一代幼参存活率高于野生群体幼参,表现对高温较好的耐受性。已有研究表明耐热性与驯化温度有相关性,一定范围内,提高驯化温度可以提高其耐热性。在 20℃驯化 0.5 g 的幼参亚致死温度为 30℃,致死温度为 34℃^[8]。在 18℃驯化 2~3 d, 1.8 g 幼参的起始致死温度(TL₅₀)上限为 25℃, 190 g 成参为 26.8℃,成参临界热最大值(CTM)为 29.2℃。在 22℃驯化后幼参 TL₅₀ 上限为 27.2℃,成参为 28℃,成参 CTM 为 29.5℃^[15]。驯化是可逆的非遗传性的转变,其引起的致死温度的改变不能遗传。而定向选育群体经历了高温选育,筛选出的亲体是对高温具有耐受性的个体,且该群体又经历南移养殖定向培育,

其不再是简单的驯化,因此其耐温性状存在遗传的可能性。

热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)是生物体在不利环境因素刺激下应激合成的一类具有重要生理功能的蛋白质分子伴侣,异常温度下生物体内 Hsps 的变化情况及功能研究是研究温度胁迫的一个重要指标。大量研究表明 Hsps 水平的变化可以反映应激物的存在。温度变化可导致襟疣海葵 *Anthopleura elegantissima*、海胆 *Paracentrotus lividus*、贝类 Hsps 表达量显著变化^[16-18]。刺参遭受温度急性变化时, Hsps 也会做出快速积极响应。骤然升温会导致刺参 Hsp70 的表达迅速升高,在 3 h 时达到最大值,在 12 h 后持续下降,直到恢复到接近初始水平^[19]。本实验室对定向选育群体在高温及常温条件下 Hsp70 的基因表达进行测定,初步确定了 Hsp70 基因表达与群体耐温性能的相关性^[20]。前期由于刺参分子研究背景的缺乏,温度胁迫应激蛋白的研究主要集中于 Hsp70,在获得刺参 Hsp90 和 Hsp26 基因全长的基础上,本实验选取这两个基因作为检测指标来分析不同群体子一代个体耐温性状。结果表明在高温刺激下各群体子一代幼参 Hsp90 和 Hsp26 基因表达量都增加,变化趋势中的相同性说明在高温刺激下各群体的生理平衡都受到破坏,诱导热休克蛋白基因大量表达,修复受损的蛋白质,维持机体稳定性。但不同群体 Hsp90 和 Hsp26 基因表达存在差异,定向选育群体基因表达最高峰出现的时间晚于野生群体,并且定向选育群体基因转录水平较野生对照组低。定向选育群体刺参经过高温选育和南移养殖,其体内 Hsps 可能存在一定的积累,子一代具有同亲代刺参相同的 Hsps 组织积蓄性,因此 Hsps 合成有滞后现象。

参考文献:

- [1] 沈鸣. 海参的化学成分和药理研究进展[J]. 中成药, 2001, 23(10): 758-761.
- [2] 樊绘曾. 海参: 海中人参[J]. 中国海洋药物, 2001, 4(1): 37-44.
- [3] Chen J. Present status and prospects of sea cucumber industry in China[J]. FAO Fisheries technical paper, 2005, 25-38.
- [4] 孙建璋, 庄定根, 陈兰涛, 等. 刺参南移养殖技术研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2006, 25(2): 148-153.

- [5] Yang H S, Yuan X T, Zhou Y, et al. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation[J]. *Aquaculture Res*, 2005, 36: 1085-1092.
- [6] Wang F, Yang H, Gao F, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2008, 151: 491-498.
- [7] Gao F, Yang H, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 714-722.
- [8] Dong Y W, Dong S L. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka [J]. *Fish Sci*, 2008, 74: 573-578.
- [9] Zhao H, Yang H, Zhao H, et al. Heat stress-mediated gene expression in the body wall of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquat Biol*, 2011, 12: 23-31.
- [10] 于明志, 常亚青. 低温对不同群体仿刺参幼参某些生理现象的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(1): 22-63.
- [11] 魏玉峰, 李成林, 张金盛, 等. 选育刺参的生长发育优势比较与分析[J]. *齐鲁渔业*, 2009, 26(3): 9-11.
- [12] Brett W M, Anthony R C, Greg B M. A comparison of the heat tolerance and growth of a selected and non-selected line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Western Australia[J]. *Aquaculture*, 2004, 241: 655-665.
- [13] 黄大宏, 刘广斌, 孙圆圆, 等. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka)耐温速生群体比较实验初报[J]. *现代渔业信息*, 2008, 23(8): 22-25.
- [14] 崔静, 李太武, 苏秀榕, 等. 南移养殖的刺参(*Apostichopus japonicus*)cDNA 文库的构建及原肌球蛋白基因的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(6): 850-856.
- [15] 李明全, 徐镜波. 10种海洋动物温度耐受值的研究[J]. *海洋环境科学*, 1992, 11(4): 29-32.
- [16] Snyder M J, Ross S. Stress protein (HSP70 family) expression in intertidal benthic organisms: the example of *Anthopleura elegantissima* (Cnidaria: Anthozoa)[J]. *Sci Mar*, 2004, 68: 155-162.
- [17] Matranga V, Toia G, Bonaventura R, et al. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes[J]. *Cell Stress Chaperon*, 2000, 5: 113-120.
- [18] Halpin P M, Menge B A, Hofmann G E. Experimental demonstration of plasticity in the heat shock responses of the intertidal mussel *Mytilus californianus*[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2004, 276: 137-145.
- [19] Dong Y W, Ji T T, Dong S L. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *J Ocean Univ China*, 2007, 6: 275-280.
- [20] 刘广斌, 杨红生, 刘石林. 温度选择对刺参群体在不同温度下生长及热休克蛋白表达的影响[J]. *海洋科学*, 2010, 34(7): 25-30.

The study on thermo tolerance of juvenile offspring *Apostichopus japonicus* (Selenka) with directive breeding

ZHAO Huan¹, LIU Shi-lin², YANG Hong-sheng², ZHAO He-ling³, LIN Cheng-gang²

(1. Ocean University of Dalian, Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian 116023, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Received: Dec., 28, 2013

Key words: *Apostichopus japonicus*; directive breeding; survival rate; heat shock proteins; thermo-tolerance

Abstract: The survival rate of the juvenile offspring *Apostichopus japonicus* in directive breeding population and the Hsp90 and Hsp26 gene expression were determined and compared under the condition of indoor temperature control. which were used to detect the heritability of thermo-tolerance in directive breeding population. It was found that the offspring in directive breeding population exhibited high survival rate compared to wild population with exposure to high temperature. The survival rate of offspring in directive breeding population and wild population was 80% and 56.67%, respectively when exposed to 32°C. The transcripts of Hsp90 and Hsp26 in these two populations were also different. Throughout the experiment, the Hsp90 and Hsp26 gene expressions in directive breeding population were lower than those in wild population, and in directive breeding population the maximum transcripts of Hsp90 and Hsp26 appeared at 2 h, however the peak of Hsp90 and Hsp26 gene expression reached at 1 h in wild population. It is indicated that the juvenile offspring of directive breeding population also possess the ability of thermo-tolerance. The results of this study will provide information for further research on selective breeding of sea cucumber.

(本文编辑: 梁德海)