

分类号 密级

U D C 编号

厦门大学

博士后研究报告

刺参亲本南方驯化对子代

生长、发育及耐热性的影响及生理机制

王青林

工作完成日期 2014-07

报告提交日期 2014-07

厦门大学

2014年07月

题名页

刺参亲本南方驯化对子代生长、发育及耐热性的影响及生理机制

Effects of parent acclimatization in the south of China on growth,
development and thermotolerance of juvenile sea cucumbers

Apostichopus japonicus

博士后姓名 王青林

流动站（一级学科）名称 海洋科学

专业（二级学科）名称 海洋生物学

研究工作起始时间 2012 年 08 月

研究工作期满时间 2014 年 07 月

厦门大学

2014 年 07 月

厦门大学博士后研究报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

刺参亲本南方驯化对子代生长、发育及耐热性的影响及生理机制

摘要

本文探讨了获得耐高温刺参苗种的可行途径并研究了亲本南方驯化对后代生长以及耐热性的影响，结果总结如下：

1.福建省刺参人工苗种繁育技术研究

为了解决限制福建省刺参养殖产业发展的关键问题——苗种生产，我们以亲本高温驯化和囊胚期浮游幼体高温应激相结合的方法摸索出一套苗种繁育工艺。适应福建省水域条件的耐高温的刺参亲本是成功的前提条件。通过对刺参进行长时间福建省驯化我们获得了一批性状优良的亲本。驯化期间，为了缓解高温对刺参的不利影响，合成了一种用于刺参夏季培育的复合维生素制剂，实际应用效果明显。通过不断尝试，我们摸索出一套成熟的苗种繁育技术，获得了大量耐高温刺参苗种。运用此技术，可在福建省进行刺参苗种大规模生产实践，促进南方刺参产业的可持续健康发展。

2.刺参亲本南方驯化和囊胚期高温应激对浮游幼体生长、发育及变态的影响

本研究探讨了刺参亲本南方驯化和囊胚期高温应激对浮游幼体生长、发育及变态的影响。根据驯化历史的差异，将刺参亲本分为两组：DA组（福建省越冬）和XP组（福建省度夏、越冬）。每组设置对照组C和热激组H，热激组在囊胚期对幼体进行45min 26℃的高温应激，然后分别在18℃和23℃温度下培育至变态。结果表明，培育温度对热激组和对照组幼体的生长有不同的影响，对照组幼体在23℃下的特定生长率高于18℃，而热激组正好相反。这可能是囊胚期热激改变了幼体对温度的需求。此外，从耳状幼体第2天开始，DA组和XP组幼体的最大体长开始出现在热激组，这个转变与幼体对饵料的摄取有关。在

适宜温度范围内，较高温度能够促进幼体发育和变态，但是热激组的变态率要显著低于对照组，这由高温应激导致的畸形率升高导致。考虑到亲本高温驯化所获得对高温耐受能力的遗传性以及囊胚期应激能够提高变态后幼参的热耐受性，我们可以通过囊胚期热激获得一定数量的耐高温幼参，然后用这批个体作为亲本进行苗种繁育研究。幼体培育以及中间养成阶段均在南方进行，经过累代选育固定耐高温性状，最终达到获取耐高温刺参苗种的目的。

3. 刺参亲本南方驯化对稚参代谢及耐热性的影响

驯化所诱导的适应能力能够对后代产生积极的影响。在本研究中，我们假设南方驯化刺参亲本繁育的后代具有比北方苗种更强的耐热性。根据驯化历史的不同，构建了四个不同的群体，并对比四个群体稚参的致死温度、耗氧率以及热休克蛋白基因表达水平。结果表明，四个群体稚参的半致死温度分别为 30.66℃、30.67℃、31.14℃和 31.88℃。在 23℃和 26℃时，群体 4 稚参的耗氧率低于其它三个群体，但是在 29℃，趋势正好相反。当遭受急性温度胁迫的时候，四个群体稚参的耗氧率和基因表达急剧升高，但是群体 4 的升高量要低于其它群体。这说明，稚参的耐热性随着亲本南方驯化时间的延长而提高。

4. 动态能量收支模型在刺参研究的应用前景

动态能量收支模型是研究生物体生态适合度的有效手段，它包含了能量在生物体内的全部流通过程。温度驯化能够影响生物体对温度的适应能力，从而改变其能量利用对策。经过南方驯化，刺参对温度的适应能力以及能量利用方式将会发生改变。构建具有不同温度驯化历史的刺参群体，并应用 DEB 模型对比其能量分配方式并预测生态适合度，不仅会丰富刺参生理生态学理论，还有助于筛选适合南方水域的刺参苗种，为南方刺参产业的发展提供一定理论指导。

关键词：刺参；北参南养；驯化；耐热性；动态能量收支模型

Effects of parent acclimatization in the south of China on growth, development and thermotolerance of juvenile sea cucumbers *Apostichopus japonicus*

Abstract

1. Study on the artificial breeding technology of sea cucumber in the south of China

In order to solve the key problem restricting the development of sea cucumber culture in the south of China, a combination method of parent thermal acclimation with heat-shock at gastrula larvae was applied to explore artificial breeding technology of this species. Adults with high thermotolerance were essential in this study. We got a patch of broodstock through long-time acclimatization in the south of China. During the acclimatization, a mixture of vitamins was synthesized to alleviate the adverse effects of high temperature. After continuous attempt, we explored a set of mature artificial breeding technology, and acquired a large number of sea cucumber juveniles.

2. Effects of parent acclimatization in the south of China on growth, development and setting rate of sea cucumber larvae

This study investigated the effects of parent thermal acclimation and heat-shock at the stage of gastrula on growth, development and setting rate of the larvae. There were two groups of adult sea cucumbers: DA group and XP groups according to the differences of thermal history. In each groups, there were two treatments: control (C) and heat-shock (H). Then, all the larvae reared at 18°C and 23°C separately until metamorphosis. Results showed that the specific growth rate at 23°C was higher than 18°C for the larvae of C, but for the one of H the trend was adverse. This may

attributed to the heat-shock treatment at the stage of gastrula. Moreover, from 2nd auricularia, the maximum body length occurred in the treatment of H for both DA group and XP group. This transition was related to the ingestion of food. The velocity of the embryonic development was accelerated when the temperature increased among the suitable temperature range. Take account of improvement of thermotolerance acquired through parent acclimation and heat-shock at the stage of gastrula, we could get a certain number of high temperature resistant juveniles by means of heat-shock at gastrula, and then use these sea cucumbers as parents for artificial breeding. The culture of larvae and juvenile sea cucumbers was performed in the south of China. After several generations of breeding, we could finally acquire high temperature resistant sea cucumbers.

3. Effects of parent acclimatization in the south of China on metabolism and thermotolerance of juvenile sea cucumbers

Acclimation response of individuals can provide fitness advantages that result in evolutionary change in a population over generations. In the current study, we aim to test the hypothesis that offspring of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* with long-time acclimatization history in the south of China can acquire higher thermal resistance than the ones in its natural range. Four groups with different acclimatization histories were constructed. Upper lethal thermal (LT) limits, oxygen consumption rate and *hsps* gene expression were compared among them. Our results showed that LT₅₀ values of the four groups were 30.66°C, 30.67°C, 31.14°C and 31.88°C, respectively. At temperatures in and nearby the thermal envelope (23 and 26°C), individuals of group 4 had lower OCR than the other groups, but at critical temperature (29°C), the trend was reversed. Juveniles of group 4 expressed higher *hsps* gene levels compared with the other groups at constant temperatures (23, 26 and 29°C). When suffered acute thermal stress, all juveniles showed dramatic increase in both OCR and *hsps* gene expression, but the magnitude in group 4 was less. These results indicated that thermotolerance of juveniles increased with the

elongation of parent acclimatization in southern China, which provided evidence for the intergenerational response of developmental acclimation.

4. Application of DEB model in the research of sea cucumber

Dynamic energy budget (DEB) model is a reliable tool to investigate the extent of fitness in organisms through changes in life history traits. It contains all the energy circulation in vivo. Temperature acclimation can influence the capability of adaptation, and then change the ways of energy utilization. In the context of north-to-south sea cucumber culture, the capability of adaptation and the ways of energy utilization will be changed for the south transferred sea cucumbers. The comparison of energy utilization and fitness among individuals with different thermal histories by DEB model will enrich the physiological ecology theory, and is conducive to artificial breeding technology in the south of China.

Keywords: sea cucumber; north-to-south sea cucumber culture; acclimatization; thermotolerance; dynamic energy budget model

目录

0 前言	1
1 文献综述	2
1.1 北参南养的现状	2
1.1.1 北参南养的兴起	2
1.1.2 北参南养的主要养殖模式	3
1.1.3 北参南养亟待解决的问题	4
1.2 温度驯化对刺参生长和耐热性的影响	5
1.2.1 温度对刺参生长的影响	5
1.2.2 温度驯化对刺参耐热性的影响	6
1.3 刺参对温度驯化的生理反应	7
1.3.1 代谢	8
1.3.2 致死温度 (upper lethal temperature)	8
1.3.3 热休克蛋白 (heat shock proteins, Hsps)	8
1.4 技术路线与研究展望	11
2 南方刺参人工苗种繁育技术研究	21
2.1 研究背景	21
2.2 关键科学问题的解决	22
2.3 刺参人工苗种繁育工艺	23
3 刺参亲本南方驯化和囊胚期高温应激对浮游幼体生长、发育及变态的影响	31
3.1 前言	31
3.2 材料与方法	32
3.3 结果	33
3.4 讨论	39
4 刺参亲本南方驯化对稚参代谢及耐热性的影响	43
4.1 前言	43
4.2 材料与方法	45
4.3 结果	49
4.4 讨论	53

5 动态能量收支模型 (DEB model) 在刺参研究的应用前景	60
5.1 DEB model 简介	60
5.2 DEB model 的构建	62
5.3 刺参相关 DEB model 参数的估算及 DEB model 的应用前景	65
致谢	70
博士生期间发表的学术论文、专著	71
博士后期间发表的学术论文、专著	72
个人简历	72
联系地址	72

厦门大学博硕士学位论文摘要

0 前言

0 Forewords

刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 是我国重要的养殖经济品种。近几年来, 北参南养的大规模开展使福建省的刺参产量由 2007 年的 651 吨增加到 2012 年的 15459 吨, 增长了将近 24 倍, 几乎占了全国产量的 10%。随着养殖规模的不断扩大, 制约产业发展的瓶颈越来越突出。由于南方养殖刺参的苗种几乎全部来自北方, 其对高温耐受性较低, 加上价格因素以及长途运输的不便, 使该项产业的发展受到很大的制约。因此, 开展提高刺参耐热性的相关研究并筛选耐高温品种, 对促进南方刺参产业的发展意义重大。

刺参耐热性具有可塑性。驯化温度是影响刺参耐热性的环境因素之一, 刺参的致死温度会受到前期所经历环境温度的影响。通过高温驯化可以选育具有潜在耐高温的个体, 改良刺参种质, 促进北参南养产业的发展。本文以刺参为研究对象, 围绕亲本高温驯化对后代生长及耐热性的影响展开。主要研究内容包括亲本驯化和高温应激对浮游幼体以及稚幼参生长和耐热性影响。研究结果对耐高温刺参个体筛选以及刺参南移养殖事业的发展具有重要的指导意义。

本论文共包括五部分, 均单独成文。为了保证每篇文章的相对独立性, 本论文的每个章节均按照独立的研究论文格式编排, 因此, 在材料、方法、参考文献等部分有所重复, 望请见谅。

由于作者水平有限, 实验设计与论文撰写难免存在纰漏和不妥之处, 敬请各位专家批评指正, 望不吝赐教。

作者

2014 年 7 月

1 文献综述

Part 1 Literature review

1.1 北参南养的现状

1.1.1 北参南养的兴起

刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka), 属于棘皮动物门 (Echinodermata), 海参纲 (Holothuroidea), 楯手目 (Aspidochirotida), 刺参科 (Stichopodidae), 仿刺参属 (*Apostichopus*), 是分布于西太平洋北部的寒温带底栖海洋动物。其地理分布北起俄罗斯的海参崴, 经日本海、朝鲜半岛南部到我国黄、渤海, 其中山东省平山岛是刺参在我国自然分布的南界 (Sloan, 1984; 廖玉麟, 1997)。这似乎意味着刺参在我国南方不能生存。然而在日本太平洋沿岸的九州鹿儿岛和长崎等周边海域也有刺参的分布, 这些区域海水温度较高, 与我国的浙江和福建沿海的水温类似 (廖玉麟, 2001), 这为刺参南移养殖提供了可能性。

1958 年冬季至 1981 年冬季, 浙江省平阳县海带场曾多次从我国北方引种刺参, 通过投放潮间带石沼养殖, 期间还进行人工育苗试验。虽然限于种种条件, 南移试验被迫中止, 但是试验的结果表明刺参引种平阳县南麂岛已经达到生物学成活的二级结果, 即引种对象繁殖, 且后代成活 (孙建璋等, 2006)。这一结果为刺参的南移工作开辟了广阔的前景。

2002 至 2006 年, 刺参在温州苍南、福建霞浦等地大规模试养成功, 标志着刺参南移技术开始成熟。随后北参南养模式在浙南、闽北以及两广海域迅速推广。南方养殖刺参的产量从 2007 年的 1272 吨增加到 2012 年的 16764 吨, 其中福建省产量从 2007 年的 651 吨增加到 2012 年的 15459 吨, 增长了将近 24 倍, 占全国总产量的 9% (中国渔业统计年鉴, 2008; 2009; 2010; 2011; 2012; 2013) (图 1-1)。北参南养的蓬勃开展带动了南方刺参产业的发展, 刺参已逐渐成为南方冬季一个重要的养殖品种。

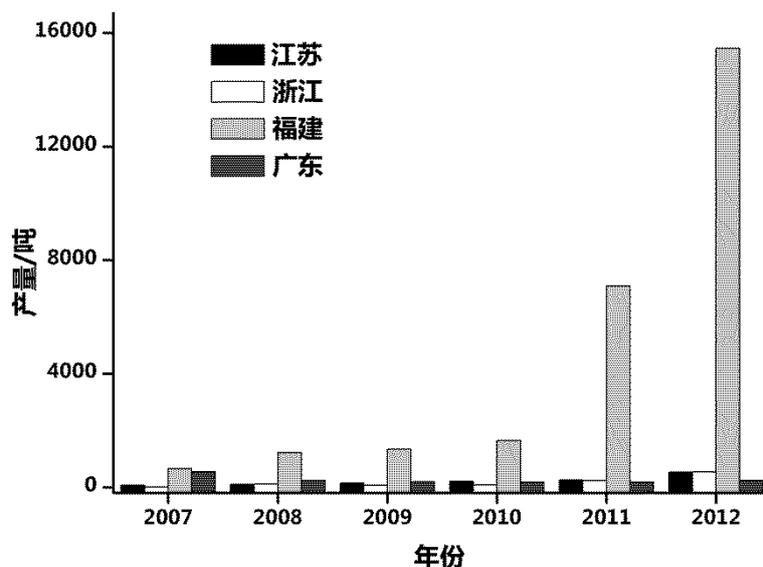


图 1-1 2007-2012 年南方主要养殖海域刺参产量

Fig.1-1 Sea cucumber yields in the south of China from 2007 to 2012

1.1.2 北参南养的主要养殖模式

北参南养主要有三种养殖模式：池塘越冬养殖、海上筏式吊笼养殖、海上筏式网箱养殖。

1.1.2.1 池塘越冬养殖（王林刚等，2012）

由于南方海水养殖池塘主要养殖季节在4月份至10月份，冬季大部分空闲，另外冬季水温适合刺参生长，因此在冬季进行刺参池塘越冬养殖。养殖时间从10月下旬到次年3月中上旬。放苗前需要进行消毒、肥塘、投放人工参礁等操作。根据越冬养殖后苗种的去向，合理选择放苗规格。若是越冬后再运回北方养殖，投放600头/公斤到800头/公斤的小苗；若是越冬后直接销售，则投放40头/公斤到44头/公斤的大规格苗种。日常操作包括换水、投喂饵料等，每周换水30%-60%，每周喂料1次，按体重的2%-5%投喂，饵料为藻粉（马尾藻、鼠尾藻等）和海泥的混合物。定期测量水温、盐度，清除水面杂物等。

1.1.2.2 海上筏式吊笼养殖（余致远，2013）

海上筏式吊笼养殖在浙南、闽北已形成规模，养殖技术日臻成熟。使用聚乙烯材料制成的刺参吊笼，吊笼为圆柱形，高 1 米，每个直径 0.35 米，笼框均匀布满小孔，每笼平均分成 5-6 个小养殖室，每个室有可独立启闭的笼门。悬挂在渔排上，水深 1 米左右。放养 20 头/公斤到 40 头/公斤的大规格苗种，每周投喂饵料 2-3 次，投喂量为体重的 5%左右，饵料为海带和杂鱼的混合物。每次投饵时清理吊笼，保证笼内水体交换通畅。隔 2 个月更换吊笼一次。养殖周期 4-5 个月，从 11 月中旬至次年 4 月上中旬。收获后可直接加工销售。

1.1.2.3 海上筏式网箱养殖

海上筏式网箱养殖针对 500 头/公斤到 1000 头/公斤的小规格刺参苗种，养殖周期 5-6 个月，从 10 月中旬到次年 4 月上中旬。网箱由箱体、框架、沉子组成。使用合成纤维材料网衣缝成长方形箱体，根据渔排规格确定网箱长与宽，网箱高一般 2-3 米，上端系在渔排上，下端用重物悬挂，使网箱在水中展开成型。根据刺参苗种规格确定网箱网目大小，保证苗种不能从网孔逃逸。每周投喂一次，投喂量为体重的 2-5%，饵料为海带和杂鱼的混合物。每周清理网箱保证水流交换通畅。养殖结束后，将苗种运回北方继续养殖。这种养殖模式充分利用南方冬季水温高的优点，有效节省冬季北方刺参苗种升温费用。

1.1.3 北参南养亟待解决的问题

2007 年至 2013 年，短短 7 年时间内，南方的刺参养殖产业经历了探索期、急速扩张期、挫折期、调整发展期 4 个阶段（苏来金等，2014）。北参南养需要大量优质刺参苗种，目前这些苗种几乎全部来自北方，苗种的价格直接影响到南方养殖刺参的成本（最直接的例子就是 2011 年冬季至 2012 年春季，由于苗种价格太高，加上刺参长势不理想，养殖户亏损率达到 50%，使南方刺参养殖也遭受

重创)。因此探索适合南方的刺参苗种繁育新技术,解决苗种本地供应问题显得尤为重要。

1.2 温度驯化对刺参生长和耐热性的影响

1.2.1 温度对刺参生长的影响

1.2.1.1 温度对刺参幼体生长发育的影响

温度是影响刺参幼体发育的重要因子,会影响到幼体的成活率和发育速度(Gaspar 等, 2007)。刺参浮游幼体发育的最适温度是 18~22℃, 温度过低或者过高,都会影响刺参受精卵的孵化、幼体的生长,甚至降低变态率(隋锡林, 1990)。隋锡林等(1988)研究表明刺参受精卵在水温 18~19℃时孵化正常,而当水温为 24~25℃时孵化率仅为 5%。刘广斌(2008)通过比较不同温度下刺参幼体的生长指出在水温 19~24℃范围内刺参幼体生长及发育没有变化,但是在 27℃以上温度条件下成活率降低。这种高温对幼体发育的抑制作用在其它水生生物(蟹, 吴琴瑟, 1992; 中国对虾, 潘鲁青等, 1997)也有相关报道。可能的原因是较高的水温加速了水中致病原生动物以及细菌的滋生,增加了耗氧,同时导致幼虫摄食量的下降(Gruffydd 和 Beaumont, 1972; Cook 等, 2005)。

温度通过影响幼体的摄食来影响其生长。泷口等(1986)指出水温 19℃,刺参幼体的摄食率为 18~35%,当温度超过 20℃时,虽然幼体的摄食量增加,但是吸收量下降,其生长速度也降低。究其原因可能是温度过高,其排泄量增加,耗氧率和排氨率都有显著的增加,不同温度下刺参幼体摄食能量的分配需要进一步研究。

温度会影响幼体的变态率。刘广斌(2008)研究表明在 22~28℃范围内,随着温度的升高,幼体的变态率降低。王丹丽等(2005)指出在温度 18~34℃范围内,青蛤胚胎发育随着温度的升高逐渐加快,但是畸形率也升高,导致幼体变态率降低。刘立明(1996)通过研究不同温度条件下牙鲆变态期生长发育的变化指

出牙鲆仔鱼高温时生长变态耗时短，但是这种促进作用随着温度的升高而减少，超过一定温度时，将对变态起到消极作用。

1.2.1.2 温度对幼参和成参生长的影响

水温是影响刺参生长以及新陈代谢的重要环境因子（李宝泉等，2002；Dong 等，2006；Dong 和 Dong，2006）。有研究表明，刺参可以在 5~30℃ 水温下存活，10-20℃ 为适宜生长温度（王兴章和邢信泽，2000；Chen，2004）。且不同规格的个体有所差异：体长 2cm 的幼参最适生长温度为 18℃，而体长 5~15cm 的幼参最适生长温度则为 10~15℃（安振华，2008）。刺参对低温的耐受性要高于对高温的耐受性，幼体适宜在较高温度下生长，而成体的适温则大大降低。当水温超过 18℃ 时，成体刺参代谢活动减弱，水温升到 20~24.5℃ 时会进入夏眠（Li 等，1996；Yang 等，2006）。此外，变温对刺参的生长也有一定的影响，与相应的恒温相比，平均温度低于最适温度的变温可促进刺参的生长，而平均温度高于最适温度时的变温则会抑制刺参生长（董云伟等，2005）。但是变温促进生物生长的机理尚不清楚，需要进一步研究。

温度对刺参生长的影响与刺参的摄食量以及代谢率变化有关。有研究表明，在最适温度下，刺参的摄食量最高，而在高温下，刺参的摄食率和食物转化率都显著降低（Yang 等，2005）。An 等（2007）通过比较 16~22℃ 范围内幼参的能量收支发现，随着温度的升高刺参的食物转化率逐渐降低，在 22℃ 时已经为负值。温度会对刺参的代谢产生影响，而且不同规格的刺参对温度的反应有差异。温度对体重大于 50g 的刺参代谢的影响相比小于 50g 的个体较为突出（李宝泉等，2002）。在 10~30℃ 范围内，体重小于 50g 的刺参随着温度的升高耗氧率一直缓慢上升，而体重大于 50g 的个体，其耗氧率在 20℃ 出现峰值，而后有所下降（Yang 等，2006）。

1.2.2 温度驯化对刺参耐热性的影响

驯化温度是影响生物耐热性的关键的环境因素之一（Hutchison，1976）。生

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

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

廈門大學博碩士論文摘要庫