

## 仿刺参基因组大小的测定

刘进<sup>1,2</sup>, 张晓军<sup>2\*</sup>, 苏琳<sup>2,3</sup>, 刘石林<sup>2</sup>, 汝少国<sup>1</sup>, 杨红生<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

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. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 仿刺参基因组大小测定采用流式细胞术, 以鸡红血细胞 DNA 含量(2.5 pg/2C)为内标, 用夏眠、正常和野生 3 个群体的仿刺参体腔细胞测定了 52 只刺参的单倍体基因组含量, 其 C-值为(0.90±0.06) pg, 由此得出仿刺参基因组大小为(880.2±58.68) Mb。其中, 夏眠、正常和野生群体 C-值分别为(0.93±0.05)、(0.90±0.05)和(0.84±0.02) pg。运用独立样本 *t* 检验对比分析显示: (1) 夏眠与正常的仿刺参基因组大小之间差异不显著, 说明仿刺参基因组大小与夏眠这一生理因子不具有相关性; (2) 池塘(围堰)养殖环境下与野生环境下的仿刺参基因组大小之间有显著差异, 野生环境下的仿刺参基因组明显小于池塘(围堰)养殖环境下的基因组。据此推测, 环境因子的改变可能对仿刺参乃至整个海参类群基因组 DNA 含量产生影响。实验还对 C-值测定的发展和方法作了详尽的描述, 同时在综合其他种类海参基因组大小研究的基础上, 探讨了 C-值与进化地位之间的关系。

**关键词:** 仿刺参; 基因组大小; 流式细胞术

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

仿刺参(*Apostichopus japonicus*, Selenka), 又称刺参, 属棘皮动物门(Echinodermata), 游在亚门(Elleutherozoa), 海参纲(Holothuroidea), 楯手目(Aspidochirota), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属(*Apostichopus*), 为典型温带种类<sup>[1-3]</sup>, 主要分布于北纬 35°到 44°的西北太平洋沿岸; 北起俄罗斯的海参崴, 经日本海、朝鲜半岛南部到中国黄、渤海<sup>[4]</sup>。据悉, 山东日照和江苏连云港交界处的海州湾前三岛是该物种在中国自然分布的最南界<sup>[2-3,5]</sup>。近年来, 刺参以其公认的医疗保健价值越来越受到关注和认同, 需求量逐年增加, 目前, 刺参养殖经济效益已位列海水养殖单种之冠, 是我国水产养殖业最具经济价值的养殖品种之一。

基因组大小(C-值)指一个物种单倍体的 DNA 含量, 核内 DNA 含量, 是研究基因组序列、结构、组成和进化的重要参考。在真核生物中, 每种生物

的单倍体基因组 DNA 总量是高度恒定的, 因此, 每种生物各有其特定的 C-值, 可作为每个物种的一个特异性参数。然而, 有研究发现物种基因组大小与生理因子<sup>[6-20]</sup>和环境因子<sup>[21-32]</sup>具有一定的相关性; 但到目前为止, 这种现象发生的原因和在进化中的作用还很不明确, 这在很大程度上是由于基因组大小数据的缺乏以及基因组大小检测精度不够所致。在基因组研究迅速发展的今天, 基因组大小方面的研究显然亟待加强。

目前, 有 12 种检测方法<sup>[33]</sup>可用于 DNA 含量(C-值)的测定, 主要有孚尔根染色—显像密度计法(feulgen densitometry, FD)、孚尔根染色—图像分析法(feulgen image analysis densitometry, FIA)、荧光定量分析法(bulk fluorometric assay, BFA), 流式细胞术(flow cytometry, FCM)等, 其中流式细胞术(FCM)以其样品制备方便、分析快速、相对准确、

收稿日期: 2011-09-29

修回日期: 2012-02-06

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A412); 国家自然科学基金项目(41076103,40976089,41176139)

通讯作者: 张晓军, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

数据采集量大等优点在当前基因组大小测定、倍性筛选、细胞周期分析等领域中已成为越来越受欢迎的检测手段。以往对刺参的研究主要集中在生态学、生理学、营养学和增殖学等方面, 而对基因组大小和特征等方面的相关研究比较匮乏, 甚至对于刺参染色体数目仍存在争议<sup>[34-36]</sup>。因此, 测定刺参基因组大小, 不仅对于丰富该物种的细胞遗传学数据具有重要意义, 还可以为刺参基因组文库构建以及基因组学的研究提供不可或缺的资料, 进而为刺参良种选育、病害防治等研究和应用提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**刺参** 取自山东青岛胶南池塘(围堰)养殖夏眠刺参 22 只, 夏眠解除后刺参 15 只, 山东青岛崂山湾自然海区人工底播二年刺参 15 只(苗种来自同一育苗厂), 共计 52 只, 成体刺参体质量平均为(90±5)g, 所有刺参样品暂养于中国科学院海洋研究所生物培育楼实验室备用。

**标准样品** 鸡(*Gallus domesticus*)红血细胞标准样品购自 BD 公司(DNA QC Particles)。

**试剂、仪器和分析软件** 试剂: PI(碘化丙啶)染液购自 Sigma 公司, 其它均为国产常规分析纯试剂;

仪器: 台式离心机(Eppendorf 5804 R)、流式细胞仪(Beckman Coulter Cytomics FC 500 MPL);

分析软件: CXP 软件(Beckman Coulter); SPSS 17.0。

### 1.2 方法

**刺参单细胞悬液的制备** 用注射器取刺参体腔液 2 mL, 如有悬浮物, 用 400 目筛网过滤后 4 ℃ 2 500 r/min 离心 20 min, 再用 PBS 洗涤 2 次。最后, 用 300 μL PBS 重新悬浮细胞。

**细胞的固定和染色** 制备好的单细胞悬液缓缓加入 700 μL 预冷无水乙醇中, 用宽口 tip 轻柔吹打, 充分混匀, 4 ℃ 冰箱中固定过夜。染色前, 用 400 目筛网过滤除去悬浮物, 4 ℃ 5 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 1~2 次, 离心后加入适量鸡红血细胞标准样品, 用 1 mL 碘化丙啶(PI)染液(100 mL 染液中含 PI 5 mg, RNase 2 mg, Triton-X-100 1 mL, 生理盐水 65 mL, 柠檬酸钠 100 mg, pH=7.2~7.4)重悬, 4 ℃ 避光染色 2 h。

### 流式细胞仪检测

基因组大小测量在 Beckman Coulter Cytomics FC 500 MPL 流式细胞仪上进行, 先采用 488 nm 的蓝光激发, 然后用(625±10) nm 的发射波长检测 PI 的发射荧光。PI 是一种荧光染料, 能够均匀地嵌入双链核酸的碱基对中, 对 DNA 进行特异性染色, 在着色过程中的嵌入量与 DNA 的量呈正比, 因而 DNA 的相对含量可以用流式细胞仪检测到的荧光强度来表示。本研究以鸡血标准样品作为外标校准仪器后再作为内标, 通过比较鸡血标准样与刺参样品峰值的倍数关系, 计算出刺参的基因组大小。计算公式如下:

$$2C = X_{AJ} / X_{CH} \times CH$$

式中, C 表示待测刺参样品的单倍体 DNA 含量;  $X_{AJ}$  表示样品的荧光强度;  $X_{CH}$  表示标准样品的荧光强度; CH 为标准样品的 DNA 含量(2.5 pg/2C)。

## 2 结果

### 2.1 样品测定

**单独样品测定** 对比刺参样品与标准样品(鸡)单独测定结果可见(图 1), 刺参样品与鸡红血细胞标准样品峰值无重叠。

**混合样品测定** 混合样品测定散点图(图 2)显示, 混合样品粒子团各自集中、界限明确且分辨清晰, 表明混合样品各细胞群之间区分良好。保证鸡红血细胞标准样品可用作内标测定刺参基因组大小, 使结果更加准确。

**样品 PI 染色后荧光显微检测** 为了更好的确认流式细胞仪所检测到的荧光的确是来自样品细胞核 PI 所发出, 在流式细胞术测定完样品基因组大小后, 接着在荧光显微镜下检测样品所发出的荧光信号。

从图 3 中可看出, 在同一个位置普通光学检测的每个细胞都在荧光检测中检测出荧光信号。因此, 可以确定流式细胞仪测定刺参基因组大小所检测到的荧光信号的确是刺参细胞发出, 并未受它物所干扰, 确保了测定结果的准确性。

**刺参基因组大小测定** 实验共测试 52 组样品, 每组变异系数均控制在 5%以内(图 4)。其中夏眠样品 22 只, 正常样品 15 只, 野生样品 15 只, 其单倍体 DNA 含量(C-值)统计结果见表 1。由表 1 可知, 夏眠群体单倍体 DNA 含量平均值为(0.93±0.05) pg, 正常群体单倍体 DNA 含量平均值为(0.90±0.05) pg, 野生群体单倍体 DNA 含量平均值

为(0.84±0.02) pg, 总平均值为(0.90±0.06) pg。由此计算出各个群体刺参基因组大小分别为(909.54± 48.9)、

(880.2±48.9)、(821.52±19.56)和(880.2±58.68) Mb(1 pg= 978 Mb<sup>[37]</sup>)。

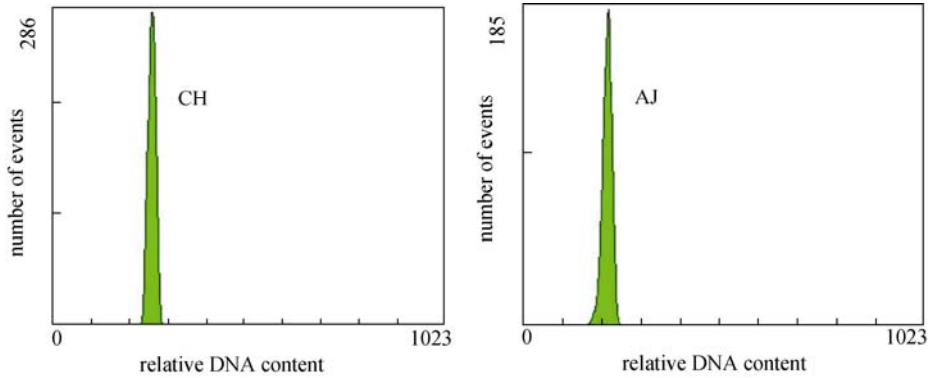


图 1 标准样品(鸡)和刺参样品流式细胞术测试结果

AJ: 刺参样品; CH: 标准样品(鸡)。

Fig. 1 The histogram of *G. domesticus* and *A. japonicus* sample

AJ: *Apostichopus japonicus*; CH: *Gallus domesticus*.

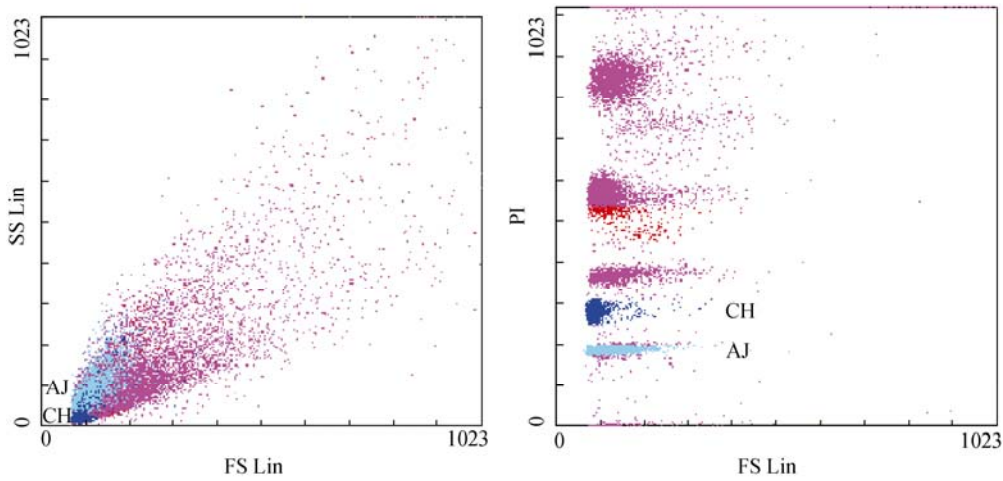
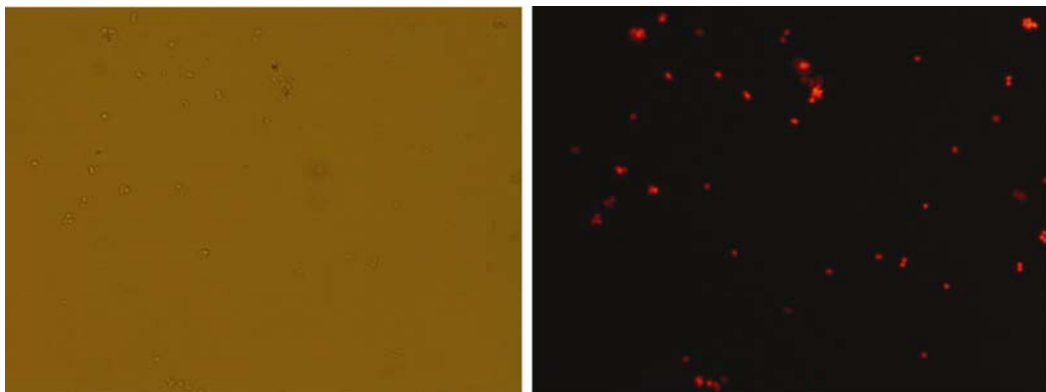


图 2 混合样品制备质量(左)和 PI 染色效果(右)散点图

SS: 侧向角散射; FS: 前向角散射; PI: 碘化丙啶; AJ: 与刺参样品对应的细胞群; CH: 与标准样品(鸡)对应的细胞群。

Fig. 2 Dot plot of the quality preparation(left) and PI dyeing effect(right) of mixed samples

SS: side scatter; FS: forward scatter; PI: propidium iodide; AJ: cell population of *A. japonicus*; CH: cell population of *G. domesticus*.



(a) 可见光检测 optical detection

(b) 荧光检测 fluorescence detection

图 3 可见光和荧光检测流式细胞术样品

Fig. 3 Optical and fluorescence detection for the FCM sample of *A. japonicus*

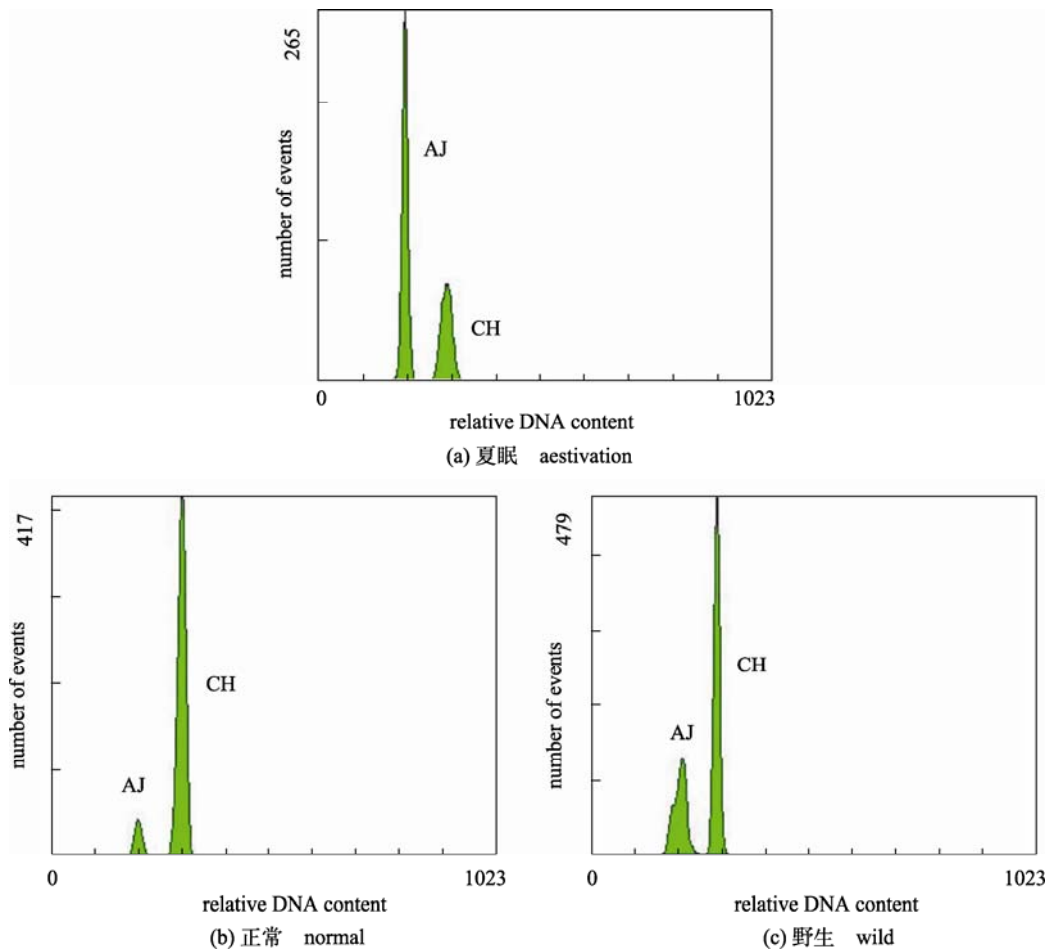


图 4 夏眠、正常和野生刺参样品与标准样品(鸡)流式细胞仪测定结果

AJ: 刺参样品; CH: 标准样品(鸡)。

Fig. 4 The histogram of *A. japonicus*(aestivation, normal and wild) and *G. domesticus* mixed samples  
AJ: *Apostichopus japonicus*; CH: *Gallus domesticus*.

### 2.2 夏眠与正常刺参单倍体 DNA 含量的比较

对夏眠与正常个体 DNA 含量值两个独立样本分析发现, 两个样本都成正态分布, 因此运用独立样本 *t* 检验进行分析。Levene’s 方差齐性检验结果发现两总体方差为齐性 ( $F=0.002, P=0.961$ ), 方差齐性时 *t* 检验结果( $t=1.773, df=35, P=0.085$ )表明, 按  $\alpha=0.05$  的水平, 接受  $H_0$ 。认为两样本之间的差异性不显著, 即夏眠与正常个体基因组大小之间没有明显的差异。

### 2.3 不同环境条件下刺参单倍体 DNA 含量的比较

对野生刺参和池塘(围堰)养殖环境下的刺参 DNA 含量值两个独立样本 *t* 检验分析表明, 两总体方差非齐性( $F=5.810, P=0.023$ ), 方差非齐性时 *t* 检验结果( $t=3.694, df=19.159, P=0.002$ )显示, 按  $\alpha=0.05$  的水平, 拒绝  $H_0$ 。认为两样本之间的差异性显著, 即野生环境下的刺参和池塘(围堰)养殖环

境下的刺参基因组大小存在显著差异, 从样本均值看, 可认为池塘(围堰)养殖环境下的刺参 C-值比野生环境下刺参 C-值大。

### 2.4 不同海参分类单元的 C-值大小比较

在动物基因组大小数据库<sup>[33]</sup>中, 已测定了 47 种棘皮动物 C-值, 海参纲几个主要分类单元的 C-值含量分布列于表 2。尽管由于不同的测定方法、不同的参照标准都可能在不同程度上影响测定结果, 从而削弱物种间基因组大小的可比性。

海参纲各目之间的 C-值存在较大的差异, 被认为进化程度最高的无足目海参<sup>[2]</sup>基因组 C-值并非最大, 反而进化地位相对原始的枝手目海参<sup>[2]</sup>平均 C-值最大。在桶手目和枝手目海参中, 其同目物种间均有较大的 C-值差异, C-值分布较为离散。

表 1 刺参 C-值测定结果  
Tab.1 Test results of C-value of *A. japonicus*

样本号 sample no.	C-值/pg C-value			总平均 C-值大小/pg C-value( $\bar{X} \pm SD$ )
	池塘(围堰)(夏眠) aestivation	池塘(围堰)(正常) normal	野生 wild	
1	0.938679	0.893954	0.831954	
2	0.929245	0.907205	0.877483	
3	1.009434	0.902775	0.852649	
4	0.938679	0.911585	0.831954	0.90±0.06
5	0.919811	0.92037	0.823675	
6	0.863208	0.863014	0.831954	
7	0.966981	0.960162	0.815397	0.93±0.05(夏眠)
8	0.985849	0.843161	0.807119	
9	1.004717	0.849724	0.844371	
10	0.863208	0.988867	0.836093	
11	1.023585	0.838716	0.856788	0.90±0.05(正常)
12	0.929245	1.015353	0.877483	
13	0.853774	0.927026	0.869205	
14	0.84434	0.829801	0.831954	
15	0.95283	0.880609	0.885762	0.84±0.02(野生)
16	0.891509			
17	0.915094			
18	0.943396			
19	0.882075			
20	1.023585			
21	0.948113			
22	0.929245			

表 2 不同海参分类单元 C-值比较  
Tab. 2 Comparison of mean C-value of some different sea cucumbers

纲 Class	目 Order	科 Family	种 Species	测定方法 method	C 值/pg C-value	
海参纲 Holothuroidea	无足目 Apodida	锚参科 Synaptidae	<i>Leptosynapta tenuis</i>	BFA	1.80	
	楯手目 Aspidochirotida	海参科 Holothuriidae	<i>Holothuria floridana</i>	BFA	2.30	
			刺参科 Stichopodidae	<i>Stichopus californicus</i>	BFA	0.79
				<i>Stichopus diaboie</i>	FD	0.99
				<i>Apostichopus japonicus</i>	FCM	0.90
	枝手目 Dendrochirotida	瓜参科 Cucumariidae	<i>Cucumaria rubi</i>	BFA	3.10	
			<i>Thyone briareus</i>	BFA	1.70	
			<i>Thyone mexicana</i>	BFA	1.90	
			<i>Thyone gemmata</i>	BFA	4.40	
			<i>Thyonepsolus nutriens</i>	BFA	2.30	
			硬瓜参科 Psolidae	<i>Eupentacta sp.</i>	BFA	2.00
		芋参目 Molpadida	芋参科 Molpadiidae	<i>Molpadia arenicola</i>	BFA	0.85

### 3 讨论

#### 3.1 基因组含量测定发展历程及方法比较

早期的基因组含量测定运用生化分析法(bio-chemical analysis, BCA), 由于所取样品组织包含细胞周期各阶段的细胞, 而各阶段细胞 DNA 含量是不同的, 因此这种方法估算的 DNA 含量不能代表物种 2C DNA 含量, 因而生化分析法在 C-值测定上的应用已遭淘汰。比生化分析法技术更好, 精度相对更高的依赖 DNA 紫外线吸光值的紫外分光光度法(Ultra-violet spectrophotometry)也曾用来测定过 C-值大小, 但由于其准确性差已不采用。常用来测定基因组 DNA 含量的荧光分析法(BFA)是用荧光试剂 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)与 DNA 二者结合后在特定波长的发射光或激发光条件下, 用荧光分光光度计检测, 得到荧光强度的矩形图表示 DNA 的含量, 由于荧光试剂 DAPI 特异性强, 发出的荧光强度大, 故这种测定方法的灵敏度较其它方法相对较高。随后, 孚尔根特异性染色及染色后可见光吸收值能定量的发现, 直接推动了 C-值测定技术的发展, 其原理是基于显微扫描分光光度技术(scanning microspectrophotometry), 它消除了因细胞核形状不规整和染色质染色不均一导致的误差<sup>[38]</sup>, 检测到 DNA 上每个区域的吸光度并整合, 其准确性大大提高, 这种方法就是孚尔根染色—显像密度计法(FD); 孚尔根染色—图像分析法(FIA)就是用电子流替代显微分光光度计, 其可见光吸收值通过摄影机捕获的图片像素的灰度值来测定<sup>[39]</sup>。不同于孚尔根染色—显像密度计法和孚尔根染色—图像分析法, 流式细胞术(FCM)分析微粒子的原理是激光光束通过透镜聚焦, 用鞘液驱使样品悬液中微粒子呈单列排列, 搜集的散射光脉冲和荧光信号转化为电脉冲信号, 它可以在很短时间内检测大量的微粒子, 不仅如此, 还能在样品悬液中区分不同的微粒子<sup>[40]</sup>。当前, 在动物基因组大小数据库中, 共收录 4 972 种动物的 C-值, 其中使用最多的方法是孚尔根染色—显像密度计法(FD)(测定 2594 个物种, 占 39.78%), 其次是流式细胞仪术(FCM)(测定 1 653 个物种, 占 25.35%)以及孚尔根染色—图像分析法(FIA)(测定 1 232 个物种, 占 18.89%), 采用荧光分析法(BFA)测定的物种仅有 472 种, 占 7.27%。由于流式细胞术测定 C-值区别于其他方法最大的特点就是不需要制备细胞核

悬液, 样品制备方便, 检测速度快, 结果相对更为精确, 使得流式细胞术成为替代孚尔根染色—显像密度计法最有吸引力的一种 C-值测定方法。尽管孚尔根染色—图像分析法可以估算 C-值的同时, 又可以检查染色体数目及其倍性的优点<sup>[41]</sup>, 但是其 C-值是通过图片像素灰度值间接计算所得, 因而其准确性大打折扣, 也限制了它的使用。事实上, 早在十几年前, 就已转而使用流式细胞术测定 DNA 的含量<sup>[42-43]</sup>。最近, 随着新一代测序技术的发展, 通过高通量(20 倍基因组覆盖以上)的 DNA 片段进行 K-mer 分析可以估计基因组的 C-值大小; 然而基因组高通量测序毕竟不是大多数物种可以轻易实现, 而且当 DNA 中存在大量复杂的重复序列或基因组杂合度很高时, K-mer 曲线往往发生偏离, 这样的 C-值大小计算反而更不准确。

综上所述, 基因组大小的测定, 不同的方法、不同的参照标准都会不同程度的影响测定结果。对于采用流式细胞仪测定基因组大小, 影响结果准确性最重要的两个因素是单细胞悬液的制备和内标的选择。一方面, 单细胞悬液的制备中最关键的是实验材料的选取, 实验材料的选取要求是分散系细胞的均一细胞群, 这种材料才能得出完美峰型, 其准确性也大大提高, 这也是脊椎动物做流式时常选取血液中白细胞群的原因。另一方面, 内标选择也是影响流式结果的另一个重要因素, 如果选取的内标基因组远远大于或小于测试样品, 则会产生较大误差; 如果内标基因组与测试样品基因组过于接近, 则不易区分两种样品的荧光峰值, 导致结果同样会产生偏差。理想 DNA 参照标准应该选用与待测物种基因组大小相近又能够相互区分、遗传稳定、基因组大小数据可靠且容易获得足够样品的物种<sup>[44]</sup>。本研究采用刺参体腔液中悬浮的相当于血细胞的体腔细胞作为实验材料, 选取鸡红血细胞作为内标也是基于以上考虑, 从图 1 可看出, 除了刺参峰外, 没有杂峰、杂质存在, 图 2 很直观的反应出刺参样品峰与标准样品(鸡)峰不在同一荧光强度上, 也很清晰地区分出刺参和标准样品(鸡)的细胞群。

#### 3.2 生理因子与 C-值的关系

无论动植物, 已有研究显示, 基因组的大小与生物体的诸多生理参数具有一定相关性, 且具有普遍性。如基因组大小与染色体数目呈正相关<sup>[6-7]</sup>, 与细胞大小呈正相关<sup>[8-13]</sup>, 与细胞分裂速度的关系,

在脊椎动物中呈负相关<sup>[8-10]</sup>, 在植物中呈正相关<sup>[13]</sup>; 与细胞代谢率呈负相关<sup>[14-16]</sup>; 与细胞寿命也呈现出相关性<sup>[17-18]</sup>; 以及与脑容量和体型大小呈负相关<sup>[19-20]</sup>。尽管基因组大小与物种濒危程度的关系尚不明确, 但是有报道表明, 基因组越大的物种其濒危程度越高<sup>[45-47]</sup>。夏眠是在动物界中普遍存在的生理现象, 在夏眠期间, 动物机体新陈代谢水平仅维持最低生存水平, 许多生理现象有异于正常状态, 故假设其 C-值也与夏眠存在一定相关性。但本研究结果表明, 刺参夏眠与正常群体 C-值差异并不显著 ( $P>0.05$ ), 因而推测在仿刺参乃至整个海参类群中基因组大小与夏眠这一生理因子不存在相关性。

### 3.3 环境因子与 C-值的关系

迄今为止, 不论动植物, 其基因组大小在近亲种之间往往也存在显著的差异。对于植物而言, 基因组 DNA 含量的这种差异被认为是由于纬度、经度、海拔、气温和降雨量的差异所造成的, 这可能是 DNA 对环境条件适应的结果<sup>[22]</sup>。已有研究发现, 环境干旱程度、纬度和海拔与 DNA 含量呈正相关<sup>[23-27]</sup>。即使同一物种, 处在不同的环境条件下, 其基因组 DNA 含量也因栖息环境的不同而有所差异, 这在植物中报道比较多, 如亚麻基因组 DNA 含量因环境条件改变引起 16% 的幅度变化<sup>[48]</sup>, 以及在 4 种松柏类中 DNA 含量均表现出高纬度北方高寒地区大于低纬度南方温带地区<sup>[49]</sup>等。

而对于动物来说, 不仅近亲种之间的基因组大小通常变化较大, 就算染色体数目恒定条件下, C-值在不连续改变方面差异也很明显<sup>[50]</sup>, 这种差异往往被认为与动物所处环境因子稳定性和对环境的适应性上存在相关性。在鱼类研究中, 深海底栖和鱼礁区鱼类基因组较小<sup>[20]</sup>, 极地鱼类基因组普遍较小, 是由于他们所处环境尽管极端, 但是却高度稳定, 在热带海洋分类群中也有类似现象<sup>[29]</sup>; 淡水种/溯河产卵种比海水种/入海产卵种有更大的基因组<sup>[20, 29-30]</sup>, 原因在于江河高度分化, 限制了基因自由交流, 很容易形成隔离种群, 而海洋没有地理阻隔, 形成种群隔离的机会小得多, 比江河环境稳定得多, 限制了多倍体物种的形成, 因此基因组较淡水鱼类小<sup>[51]</sup>。基因组相对更大的生物在跨越大范围的环境改变中更能适应生存<sup>[50]</sup>, 如生活在海洋中层能在温暖、饵料丰富的洋面水域和寒冷、饵料贫乏的大洋深处中垂直迁移的鱼类具有更大

基因组<sup>[31]</sup>, 即广适性鱼类比狭适性鱼类有更大基因组<sup>[29]</sup>, 与生态幅度宽的物种拥有更大的基因组研究结果一致<sup>[32,52-53]</sup>, 其原因可能是为了适应各种不同环境的生存, 生物体需要具备与之能相适应的机能, 反应在客观物质上(如多酶系统)需要更多基因的编码, 在跨越环境改变过程中逐步累积了更多的 DNA<sup>[31]</sup>。有研究表明, 在稳定环境下生存鱼类基因组较小<sup>[54-55]</sup>支持了上述观点。这种模式可能同样适用于无脊椎动物, 也就是说, 环境越稳定, 其基因组越小, 环境变化越剧烈, 其基因组也就越大。

自然海区人工底播刺参苗种来自陆上育苗厂, 其亲本也是池塘(围堰)养殖刺参, 底播后经过两年多的完全海洋环境下的野化, 基本可以认为其是在野生环境下的野生状态刺参。刺参池塘(围堰)养殖环境下, 受雨水倾注致海水盐度不稳定、海水年度温差大、病害频发以及高密度养殖导致的种间激烈竞争等外界不稳定环境因素影响很大, 而自然海区人工底播刺参所处完全野生环境无疑稳定的多。本研究结果表明, 野生环境下的刺参比池塘(围堰)养殖环境下的刺参基因组明显要小(821.52 Mb<880.2 Mb), 可见刺参基因组大小与环境因子稳定性存在相关性。刺参从不稳定的池塘(围堰)养殖环境转变到稳定的自然海区野生环境长期生存, 不需要适应环境的剧变, 也就不需要保留因适应环境改变而逐步累积的 DNA。据此, 推测在棘皮动物进化过程中, 基因组大小的变化也与环境因子存在相关性。当然, 确切的结论还需要更多的数据支持。

本研究采用流式细胞术测定了 3 个群体 52 只仿刺参基因组大小, 在实验中从选材到内标选择上都最大限度的避免了实验误差, 因此, 测定的仿刺参基因组大小(880.2±58.68)Mb, 它能够代表仿刺参的基因组大小, 其值介于楯手目刺参科其他种类海参基因组大小之间。对比夏眠与正常的仿刺参 C-值, 发现不存在显著的差异, 即基因组大小与生理因子夏眠之间不存在相关性。同样, 对比池塘(围堰)养殖环境下与野生环境下的仿刺参 C-值, 发现差异显著, 即野生环境下仿刺参的基因组较池塘(围堰)养殖环境下的基因组小, 故推测环境因子的稳定性和棘皮动物基因组大小差异间存在相关性。

感谢中国海洋大学朱明壮老师在流式细胞仪样品分析方面的帮助。

#### 参考文献:

- [1] Liao Y L. The Aspidochirote Holothurians of China with erection of a new genus [C]//Jangoux M. Echinoderms: Present and Past. Rotterdam: AABalkema Publishers. 1980: 115–120.
- [2] 廖玉麟. 中国动物志·棘皮动物门·海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 334–335.
- [3] 廖玉麟. 中国桶手目海参的研究[C]//中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊. 北京: 科学出版社, 1984: 221–247.
- [4] Vannuccini S. Sea cucumbers-A compendium of fishery statistics[C]. Workshop on advances in sea cucumber aquaculture and management(ASCAM). Dalian, 2003.
- [5] Sloan N A. Echinoderm fisheries of the world: A review[C]//Keegan B F, O'Connor B D S. Echinodermata. Rotterdam: AABalkema Publishers, 1984: 109–124.
- [6] Hinegardner R, Rosen D E. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes[J]. American Naturalist, 1972, 106(951): 621–644.
- [7] Mank J E, Avise J C. Cladogenetic correlates of genomic expansions in the recent evolution of actinopterygian fishes[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B: biological Sciences, 2006, 273(1582): 33–38.
- [8] Gregory T R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma[J]. Biological Reviews, 2001, 76(1): 6–101.
- [9] Gregory T R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates[J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2001, 27(5): 830–843.
- [10] Gregory T R. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals[J]. Genome, 2000, 43(5): 859–901.
- [11] Jovtchev G, Schubert V, Meister A, *et al.* Nuclear DNA content and nuclear and cell volume are positively correlated in angiosperms[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2006, 114(1): 77–82.
- [12] Hardie D C, Hebert P D N. The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes[J]. Genome, 2003, 46(4): 683–706.
- [13] Bennett M D. Variation in genomic form in plants and its ecological implications[J]. New Phytologist, 1987, 106(11): 177–200.
- [14] Vinogradov A E. Nucleotypic effect in homeotherm: body-mass-corrected basal metabolic rate of mammals is related to genome size[J]. Evolution, 1995, 49(6): 1249–1259.
- [15] Gregory T R. A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class Aves[J]. Evolution, 2002, 56(1): 121–130.
- [16] Beaulieu J M, Leitch I J, Knight C A. Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited[J]. Annals of Botany, 2007, 99(3): 495–505.
- [17] Monaghan P, Metcalfe N B. Genome size and longevity[J]. Trends in Genetics, 2000, 16(8): 331–332.
- [18] Griffith O L, Moodie G E E, Civetta A. Genome size and longevity in fish[J]. Experimental Gerontology, 2003, 38(3): 333–337.
- [19] Andrews C B, Gregory T R. Genome size is inversely correlated with relative brain size in parrots and cockatoos[J]. Genome, 2009, 52(3): 261–267.
- [20] Smith E M, Gregory T R. Patterns of genome size diversity in the ray-finned fishes[J]. Hydrobiologia, 2009, 625(1): 1–25.
- [21] Charles A K, David D A. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis[J]. Ecology Letters, 2002, 5(1): 66–76.
- [22] 李国旗, 安树青, 陈兴龙, 等. 生物的 C-值矛盾与其生态适应性的关系初探[J]. 大自然探索, 1999, 18(2): 61–66.
- [23] Wakamiya I, Newton R J, Johnston J S, *et al.* Genome size and environmental factor in the genus *Pinus*[J]. American Journal of Botany, 1993, 80(11): 1235–1241.
- [24] Bennett M D. DNA amount, latitude, and crop plant distribution[J]. Environmental and Experimental Botany, 1976, 16(2–3): 93–108.
- [25] Bennett M D, Smith J B, Lewis Smith R I. DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia[J]. Environmental and Experimental Botany, 1982, 22(3): 307–318.
- [26] Grime J P, Mowforth M A. Variation in genome size—an ecological interpretation[J]. Nature, 1982, 299(9): 151–153.
- [27] Hall S E, Dvorak W S, Johnston J S, *et al.* Flow cytometric analysis of DNA content for tropical and temperate New World Pines[J]. Annals of Botany, 2000, 86(6): 1081–1086.
- [28] Xia X. Body temperature, rate of biosynthesis, and evolution of genome size[J]. Molecular Biology and Evolution, 1995, 12(5): 8–842.
- [29] Hardie D C, Hebert P D N. Genome-size evolution in fishes[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2004, 61(9): 1636–1646.
- [30] Yi S, Streelman J T. Genome size is negatively correlated with effective population size in ray-finned fishes[J]. Trends in Genetics, 2005, 21(12): 643–646.
- [31] Ebeling A W, Atkin N B, Setzer P Y. Genome sizes of teleostean fishes: increase in some deep-sea species[J]. American Naturalist, 1971, 105(946): 549–561.



- [32] Beaton M J, Hebert P D N. Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex*[J]. American Naturalist, 1988, 132(6): 837–845.
- [33] Gregory T R. Animal genome size database (2005)[Z]. <http://www.genomesize.com>.
- [34] 许伟定, 隋锡林, 胡庆明,等. 刺参染色体的初步研究分析[J].水产科学, 1997, 16(5): 9–11.
- [35] Okumura SI, Kimura K, Sakai M, *et al.* Chromosome number and telomere sequence mapping of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicas*[J]. Fisheries Science, 2009, 75(1): 249–251.
- [36] 谭杰, 孙慧玲, 高菲,等. 刺参染色体制备的初步研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(3): 8–11.
- [37] Dolezel J, Nuclear D N. A content and genome size of trout and human[J]. Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2003, 51(2): 127–128.
- [38] Deeley E M. An integrating microdensitometer for biological cells[J]. Journal of Scientific Instrument, 1955, 32(7): 263–267.
- [39] Vilhar B, Greilhuber J, DolencKoec J, *et al.* Plant genome size measurement with DNA image cytometry[J]. Annals of Botany, 2001, 87(6): 719–728.
- [40] Shapiro H M. Practical flow cytometry[M]. 4th edn. New York: Wiley-Liss, 2003.
- [41] Hardie D C, Gregory T R, Hebert P D. From pixels to picograms: a beginners'guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry[J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2002, 50(6): 735–749.
- [42] Bennett M D, Leitch I J, Nuclear D N. A amounts in angiosperms[J]. Annals of Botany, 1995, 76(2): 113–176.
- [43] Bennett M D, Bhandol P, Leitch I J, Nuclear D N. A amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimates[J]. Annals of Botany, 2000, 86(4): 859–909.
- [44] Dolezel J, Bartos J, Plant D N. A flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 99–110.
- [45] Vinogradov A E. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red List[J]. Trends in Genetics, 2003, 19(11): 609–614.
- [46] Knight C A, Molinari N A, Petrov D A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype[J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 177–190.
- [47] Vinogradov A E. Genome size and extinction risk in vertebrates[J]. Proceeding of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2004, 271(1549): 1701–1705.
- [48] Evans G M, Durrant A, Rees H. Associated nuclear change in the induction of flax genotrophs[J]. Nature, 1966, 212(5063): 697–699.
- [49] Mergen F, Thielges B A. Intraspecific variation in nuclear volume in four onnifers[J]. Evolution, 1967, 21(4): 720–724.
- [50] Gregory T R, Hebert P D N. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences[J]. Genome Research, 1999, 9(4): 317–324.
- [51] Otto S P, Whitton J. Polyploid incidence and evolution[J]. Annual Review of Genetics, 2000, 34(2000): 401–437.
- [52] Allendorf F W, Thorgaard G H. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes[C]// Turner B J, Ed. Evolutionary genetics of fishes. New York: Plenum Press, 1984: 1–53.
- [53] Nikolsky G. The interrelation between variability of characters, effectiveness of energy utilisation, and karyotype structure in fishes[J]. Evolution, 1976, 30(1): 180–185.
- [54] Banerjee S K, Misra K K, Banerjee S, *et al.* Chromosome numbers, genome sizes, cellvolumes and evolution of snake-head fish (family channidae)[J]. Journal of Fish Biology, 1988, 33(5): 78–789.
- [55] Uyeno T, Smith G R. Tetraploid origin of the karyotype of catostomidfishes[J]. Science, 1972, 175(4022): 644–646.

## Genome size determination of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LIU Jin<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>2\*</sup>, SU Lin<sup>2,3</sup>, LIU Shi-lin<sup>2</sup>, RU Shao-guo<sup>1</sup>, YANG Hong-sheng<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is one of the most important economic aquaculture species in China. The study on the genome size(C-value) is highly significant because it plays an important role in instructing the hybridization breeding and improved variety breeding program, as well as in estimating the cost of the whole genome sequencing project. Previous studies mainly focused on these research areas such as ecology, physiology, nutrition *etc.* However, it is relatively scarce for the accumulation of basic data related to the genome size and characteristics in *A. japonicus*. Therefore, the measure of genome size for enriching cytogenetics data of this species is meaningful. In this paper, the genome size(C-value) of sea cucumber, *A. japonicus* was measured through flow cytometry in 52 individuals, which came from aestivation, normal and wild groups, using erythrocyte DNA content of chicken, *Gallus domesticus*(2.5pg/2C) as internal standard. The result indicates that the C-value of *A. japonicus* is (0.90±0.06) pg, equivalent to (880.2±72.26) Mb. And, the C-values of aestivation, normal and wild are (0.93±0.05) pg, (0.90±0.05) pg and (0.84±0.02) pg, respectively. In addition, analyzed by Independent-Samples T Test, it shows that the C-values have no significant difference in aestivation and normal groups, whereas, the C-values of wild group and that reared in captivity group have significant difference. In other words, there is no correlation between genome size and the physiology factor-aestivation, while the stability of environment factors has certain influences on genome size variation. Moreover, the development of C-value measure method was elucidated in detail, in the meanwhile, the relationship between C-value and the evolution in Holothuroidea was discussed in combination with genome size of other types of sea cucumber.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; genome size; flow cytometry

**Corresponding author:** ZHANG Xiao-jun. E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn