

DOI: 10.12264/JFSC2020-0208

温度和盐度对中间球海胆胚胎发育早期进程联合效应

吴洋磊, 甄昊, 王萃, 谭八梅, 裴泓霖, 丁君, 常亚青

大连海洋大学, 农业农村部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 为探讨高温和低盐对中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)早期胚胎发育进程的影响, 本研究利用中心复合设计(CCD)和响应曲面分析法(RSM), 开展不同温度(12~26 °C)和盐度(22~34)对中间球海胆胚胎发育早期进程的联合效应研究, 旨在建立温度和盐度对中间球海胆胚胎发育进程的定量关系模型, 并通过统计优化方法得出温度和盐度的最佳组合。结果显示, 在实验设定的温度和盐度范围内, 随着温度的升高, 中间球海胆早期胚胎发育时间呈现出先缩短后延长的趋势; 随着盐度的降低, 中间球海胆胚胎发育早期时间延长。温度的一次效应、二次效应和盐度的一次效应均显著影响($P < 0.05$)中间球海胆胚胎发育早期进程; 温度一次项系数的绝对值均大于盐度的一次项系数; 温盐的联合效应对中间球海胆胚胎发育早期进程的影响不显著($P > 0.05$)。实验建立的 2 细胞期、8 细胞期、16 细胞期、囊胚期、上浮期和四腕幼虫期发育进程模型方程决定系数分别为 0.9576、0.9508、0.9689、0.9932、0.9681 和 0.9763。模型优化和验证试验得出, 温度 20.47 °C 和盐度 31.46 时, 中间球海胆 2 细胞期、8 细胞期、16 细胞期、囊胚期、上浮期、四腕幼虫期的发育时间最短, 分别为 1.28 h、2.07 h、3.31 h、4.14 h、11.28 h 和 47.31 h。研究结果表明高温和低盐会延长中间球海胆早期胚胎发育时间。

关键词: 中间球海胆; 早期胚胎发育; 温度; 盐度; 联合效应

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0144-13

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)又称虾夷马粪海胆, 属棘皮动物门(Mollusca)、海胆纲(Echinoidea)、正形目(Centrochinoida)、球海胆科(Strongylocentrotidae), 因具有较高的营养价值, 深受消费者青睐^[1]。然而, 受限于苗种规模化培育技术的不完善, 中间球海胆苗种存活率普遍较低, 严重制约着其养殖产业的发展^[2-4]。

盐度和温度是决定水产动物育苗成败的关键环境因子^[5]。Mak 等^[6]研究报道, 大亚湾紫海胆(*Heliocidaris crassispina*)受精卵孵化需要适宜的盐度和温度, 超出胚胎发育适宜的盐和温度范围, 胚胎发育异常, 畸形率升高, 幼虫生存活力下降甚至死亡。同时, 温度的升高可以减弱低盐对海胆四腕幼虫期发育产生的负面影响。孔宁等

^[7]研究显示, 高温和高盐均会对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)早期的胚胎发育产生不利影响, 皱纹盘鲍胚胎发育早期的最佳温度和盐度组合为 23~25 °C 和 30~36。O'Connor 等^[8]研究表明, 水温 18 °C 和盐度 29~32 为珍珠牡蛎(*Pinctada imbricata*)胚胎发育早期最适环境条件。因而, 深入开展温度和盐度联合效应对水产动物早期胚胎发育进程的影响研究, 将有助于提高水产动物早期胚胎成活率和生长发育效率。

目前, 有关于环境因子对海胆生长发育的研究工作主要集中于温度、盐度或 pH 等单一因素对生物产生的环境效应^[9-12], 无法综合考虑各因子之间的互作性, 不能准确反映真实状态下环境胁迫对生物生命活动的影响以及生物在胁迫环境

收稿日期: 2020-07-28; 修订日期: 2020-08-08。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901604); 国家自然科学基金项目(31902395); 辽宁省高等学校创新团队及创新人才支持计划项目(LT2019003); 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)。

作者简介: 吴洋磊(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖。E-mail: 2533657619@qq.com

通信作者: 王萃, 副研究员, 研究方向为水产养殖。E-mail: dlouwangluo@sina.com

中的响应。响应曲面法(response surface methodology, RSM)和中心复合设计(central composite design, CCD)是一种寻找最佳实验条件的方法, 适宜于解决非线性数据处理的相关问题。它包括了试验设计、模型建立、模型检验、实验条件优化等步骤; 通过对回归方程的拟合和响应曲面的绘制, 可预测得到响应最优值以及相应的实验条件, 为研究多种环境因子对生物互作效应提供了有效的手段^[13]。

因此, 本研究采用中心复合设计(CCD)和响应曲面法(RSM), 在实验条件下开展温度(12~26 ℃)和盐度(22~34)对中间球海胆胚胎早期发育进程的联合效应研究, 旨在建立温度和盐度联合效应对中间球海胆胚胎发育进程的定量关系模型, 并通过统计优化方法得出温度和盐度的最佳组合,

为中间球海胆的耐高温、耐低盐品系培养和人工繁育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选取生长指标良好且性腺饱满的中间球海胆亲本(5♀和 2♂), 体重为(37.72± 3.54) g, 壳径(47.74±2.35) mm, 壳高(27.34±4.57) mm。

1.2 实验设计

采用中心复合设计(CCD)和曲面响应法(RSM), 根据我国黄渤海全年水体温度和盐度的波动范围, 在温度 12~26 ℃和盐度 22~34 范围内, 各设置 5 个水平温盐梯度, 由低到高依次编码为 -a、-1、0、1、a, 共计 13 个组合。其中, 中心点重复 5 次, 每个实验 3 个平行(表 1)。

表 1 实验设计与结果
Tab. 1 Experimental design and results

组别 group	编码值 coded value		实际值 actual value		时间/h time					
	温度 T	盐度 S	温度 T	盐度 S	2 细胞期 2-cell	8 细胞期 8-cell	16 细胞期 16-cell	囊胚期 blastula	上浮期 float	四腕幼虫期 four-arm pluteus
1	-a	0	12	28	2.56	4.51	5.57	8.25	19.88	61.28
2	-1	-1	14	24	2.29	4.87	5.41	7.16	19.65	62.03
3	-1	1	14	32	1.95	3.55	4.63	6.37	15.77	55.84
4	0	-a	19	22	1.96	3.45	4.05	4.97	15.72	54.01
5	0	0	19	28	1.65	2.65	3.21	4.83	12.69	50.78
6	0	0	19	28	1.49	2.43	3.17	4.35	12.09	49.25
7	0	0	19	28	1.54	2.88	3.45	4.68	11.86	50.07
8	0	0	19	28	1.63	2.31	3.62	4.56	11.55	49.83
9	0	0	19	28	1.75	2.27	3.38	4.71	12.46	49.61
10	0	a	19	34	1.42	2.36	3.74	5.04	12.81	48.04
11	1	-1	24	24	1.83	2.24	4.37	4.96	12.23	52.95
12	1	1	24	32	1.50	2.03	4.08	4.25	11.44	48.16
13	a	0	26	28	1.68	2.54	4.75	5.12	13.56	49.39

注: 星号臂值 a=1.414, 中心点重复 5 次。
Note: The asterisk arm value a=1.414, and the center point repeats five times.

1.3 实验方法

实验于自动化控温系统中进行, 控温系统温度偏差小于 0.5 ℃。实验容器为 5 L 玻璃烧杯, 其中注入相应盐度的海水, 并置于相应温度的控温系统中。注射 0.5 mol/L KCl 至性腺成熟亲胆, 进行人工催产。将收集到的卵细胞直接加入玻璃烧

杯中, 再放入精子。卵子密度约为 1500 个/mL, 精子所加量应满足每个卵子周围有精子 10~20 个。利用显微镜定期观察受精卵的发育情况, 并记录所需时间。

实验所用海水均经沉淀过滤, 高盐度的海水通过加入相对应的海盐配制, 低盐度的海水通过

加入曝气后的淡水配制。

1.4 数据处理

采用 Design Expert 10.0 软件进行试验模拟与优化,以温度和盐度为自变量,中间球海胆早期胚胎发育时间为因变量,进行了多元回归拟合,建立二次回归模型。即 $Y=R_0+R_1T+R_2S+R_3TS+R_4T^2+R_5S^2$ 。式中, Y 为中间球海胆早期发育时间; R_0 为回归常数; R_1 、 R_4 分别为温度的一次效应和二次效应; R_3 为温度和盐度交互效应; R_2 、 R_5 分别为盐度的一次效应和二次效应。

通过响应曲面方差分析确定回归方程模型的准确性。根据各因素的显著性($P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著)、决定系数和相应的拟合度确定最终的模型方程。

2 结果与分析

2.1 温度、盐度对 2 细胞期发育时间的影响

温度(T)和盐度(S)对中间球海胆 2 细胞期发育时间的回归方程为:

$$Y=9.18630-0.44624T-0.15800S+0.00013TS+0.01023T^2+0.00200S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$),失拟项检验为不显著($P>0.05$),表明温度和盐度对中间球海胆早期胚胎发育时间所建立的拟合方程有效。其中,回归方程模型的决定系数为 0.9576,校正系数为 0.9273,预测系数为 0.8735,表明该模型可以解释 95.76%响应值变化,因此该模型选择恰当。

对 2 细胞期模型各项系数显著性差异检验结果表明,温度的一次及二次效应和盐度的一次效应均显著影响($P<0.05$)2 细胞期的发育时间。其中盐度的二次效应和温盐的联合效应不显著影响($P>0.05$)2 细胞期的发育时间(表 2)。

回归方程中,一次项系数为负,表明单独增加温度或盐度对 2 细胞期发育时间存在负面效应。交互项系数为正,表明温度和盐度的交互效应有利于缩短 2 细胞期发育时间。温度和盐度的二次项系数为正,说明过高或过低的温度和盐度会使 2 细胞期发育时间延长。同时,温度的一次项系数和二次项系数均比盐度大,表明温度相比于盐度对于 2 细胞期发育时间具有更大的影响。

表 2 温度和盐度对中间球海胆 2 细胞期发育时间的回归模型方差分析
Tab. 2 ANOVA analysis of regression model of temperature and salinity to the development time of *Strongylocentrotus intermedius* 2-cell

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	1.27	5	0.25	31.59	0.0001		
A-T	0.58	1	0.58	71.78	<0.0001	-0.34	-0.19
B-S	0.26	1	0.26	31.93	0.0008	-0.26	-0.11
AB	2.50E-5	1	2.50E-5	3.10E-3	0.9572	-0.11	0.11
A ²	0.44	1	0.44	54.24	0.0002	0.17	0.33
B ²	8.58E-3	1	8.58E-3	1.06	0.3368	-0.05	0.12
残差 residual	0.06	7	8.07E-3	—	—	—	—
失拟项 lack of fit	0.02	3	5.21E-3	0.51	0.6970	—	—
纯误差 pure error	0.04	4	0.01	—	—	—	—

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度的二次效应; —表示无数据。

Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity, — means no data.

由图 1 可知,随着温度的升高,中间球海胆 2 细胞期的发育时间呈现先缩短后延长的趋势;随着盐度的降低,中间球海胆 2 细胞期的发育时间

逐渐延长。温度 20.85 ℃和盐度 33.18 条件下,海胆胚胎发育到 2 细胞期所需的时间最短,为 1.38 h。

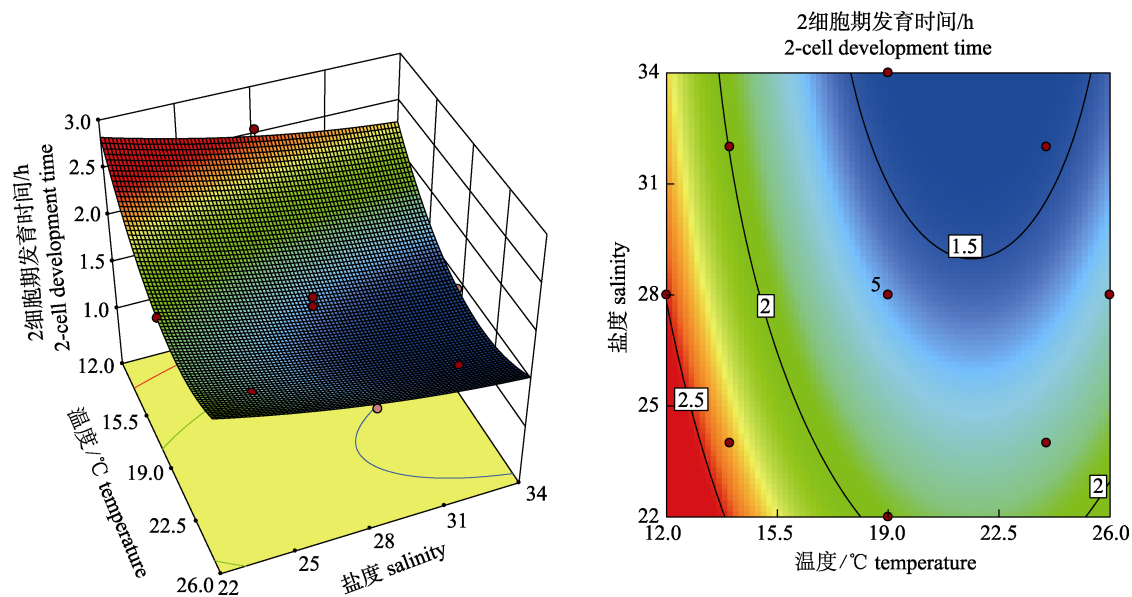


图 1 温度和盐度及交互作用对中间球海胆 2 细胞期发育时间影响的响应曲面和等高线
Fig. 1 Response surface and contour lines of temperature, salinity and interaction effect on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* 2-cell

2.2 温度和盐度对 8 细胞期发育的影响

温度和盐度对中间球海胆 8 细胞期发育时间的回归方程为:

$$Y=31.53316-1.33937T-0.95295S+0.01388TS+0.002043T^2+0.01065S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$), 失拟项检验为不显著($P>0.05$), 表明温度和盐度对中间球海胆的早期发育时间所建立的拟合方程有效。其中, 回归方程模型的决定系数为 0.9508, 校正系

数为 0.9156, 预测系数为 0.8069, 表明该模型可以解释 95.08%响应值变化, 因此该模型选择恰当。

对 8 细胞期模型各项系数显著性差异检验结果表明, 温度的一次和二次效应、盐度的一次效应显著影响($P<0.05$)8 细胞期发育时间。其中盐度的二次效应、温盐度联合效应对 8 细胞期发育时间影响不显著($P>0.05$, 表 3)。

回归方程中, 一次项系数为负, 表明单独增加温度和盐度对 8 细胞期发育时间存在负面作

表 3 温度和盐度对中间球海胆 8 细胞期发育时间的回归模型方差分析
Tab. 3 ANOVA analysis of regression model of temperature and salinity to the development time of *Strongylocentrotus intermedius* 8-cell

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	9.34	5	1.87	27.03	0.0002		
A-T	6.03	1	6.03	87.14	<0.0001	-1.08	-0.64
B-S	1.18	1	1.18	17.04	0.0044	-0.62	-0.17
AB	0.31	1	0.31	4.45	0.0727	-0.04	0.62
A ²	1.75	1	1.75	25.27	0.0015	0.27	0.74
B ²	0.24	1	0.24	3.51	0.1031	-0.05	0.43
残差 residual	0.48	7	0.07	—	—	—	—
失拟项 lack of fit	0.22	3	0.08	1.14	0.4328	—	—
纯误差 pure error	0.26	4	0.06	—	—	—	—

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度二次效应。—表示无数据。
Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity; — means no data

用。交互项系数为正,表明温度和盐度的交互效应有利于缩短 8 细胞期发育时间。温度和盐度的二次项系数为正,说明过高或过低的温度和盐度会使 8 细胞期发育时间延长。同时,温度的一次项系数、二次系数均比盐度的大,表明温度对于 8 细胞期发育时间的影响更大。

由图 2 可知,随着温度的升高,中间球海胆 8 细胞期的发育时间先缩短后延长;随着盐度的降低,中间球海胆 8 细胞期的发育时间逐渐延长。温度为 22.58 °C,盐度为 30.03 时,发育到 8 细胞期所需的时间最短,为 2.10 h。

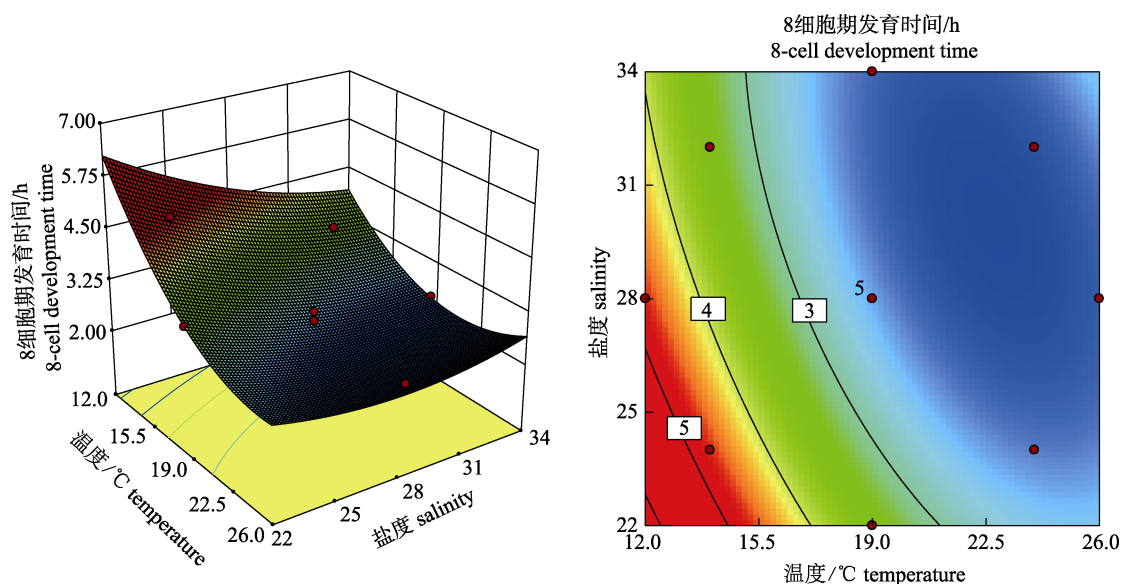


图 2 温度和盐度及交互作用对中间球海胆 8 细胞期发育时间影响的响应曲面和等高线
Fig. 2 Response surface and contour lines of temperature, salinity and interaction effects on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* 8-cell

对 16 细胞期模型各项系数显著性差异检验结果表明,温度的一次效应、二次效应和盐度的一次效应、二次效应显著影响($P<0.05$)16 细胞期的发育时间。其中温度盐度的联合效应不显著影响($P>0.05$)16 细胞期的发育时间(表 4)。

回归方程中,一次项系数为负,表明单独增加温度和盐度对 16 细胞期发育时间存在负面作用。交互项系数为正,表明温度和盐度的交互效应有利于缩短 16 细胞期发育时间。温度和盐度的二次项系数为正,说明过高或过低的温度和盐度会使 16 细胞期发育时间延长。同时,温度的一次项系数、二次项系数均比盐度的大,表明温度对

2.3 温度和盐度对 16 细胞期发育时间的影响

温度和盐度对中间球海胆 16 细胞期发育时间的回归方程为:

$$Y=35.37027-1.67413T-1.05779S+0.00613TS+0.03772T^2+0.01601S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$),失拟项检验为不显著($P>0.05$),表明温度和盐度对中间球海胆的早期发育时间所建立的拟合方程有效。其中,回归方程模型的决定系数为 0.9689,校正系数为 0.9467,预测系数为 0.8742,表明该模型可以解释 96.89%响应值变化,因此该模型选择恰当。

于 16 细胞期发育时间的影响更大。

由图 3 可知,随着温度的升高,中间球海胆 16 细胞期的发育时间先缩短后延长;随着盐度的降低,中间球海胆 16 细胞期的发育时间逐渐延长。温度为 19.81 °C,盐度为 29.25 时,发育到 16 细胞期所需的时间最短,为 3.31 h。

2.4 温度和盐度对囊胚期发育时间的影响

温度和盐度对中间球海胆囊胚期发育时间的回归方程为:

$$Y=48.57522-3.27261T-0.69338S+0.00950TS+0.07513T^2+0.00683S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$),失拟项

表 4 温度和盐度对中间球海胆 16 细胞期发育时间的回归模型方差分析

Tab. 4 ANOVA analysis of regression model of temperature and salinity to the development time of 16-cell

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	7.38	5	1.48	43.62	<0.0001		
A-T	0.95	1	0.95	27.99	0.0011	-0.50	-0.19
B-S	0.28	1	0.28	8.20	0.0242	-0.35	-0.03
AB	0.06	1	0.06	1.77	0.2245	-0.10	0.36
A ²	5.96	1	5.96	176.09	<0.0001	0.76	1.09
B ²	0.55	1	0.55	16.22	0.0050	0.12	0.46
残差 residual	0.24	7	0.03	—	—		
失拟项 lack of fit	0.10	3	0.03	1.01	0.4744		
纯误差 pure error	0.13	4	0.03	—	—		

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度二次效应; — 表示无数据。

Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity; — means no data.

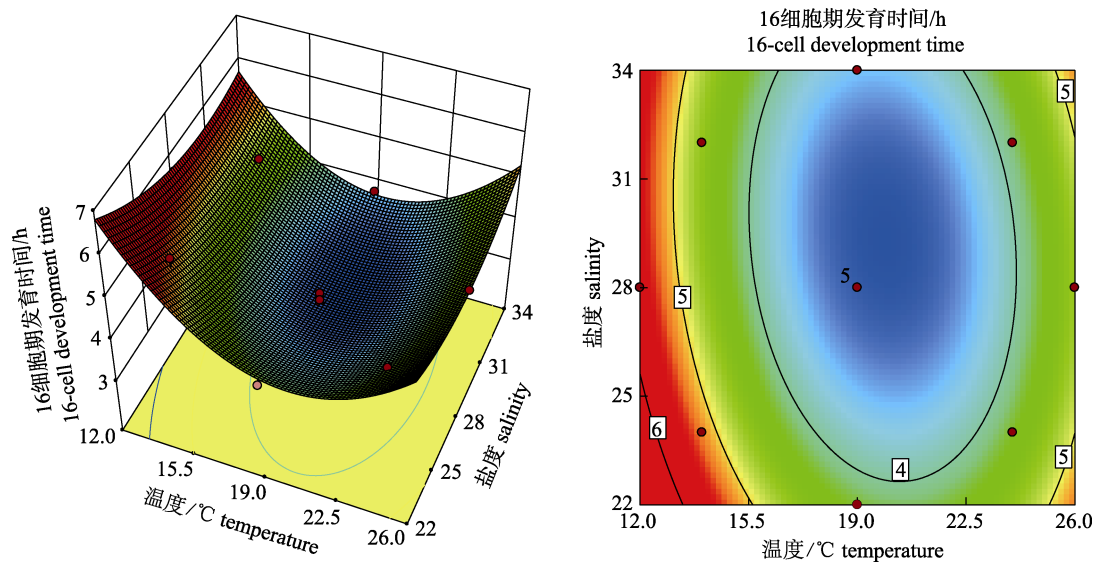


图 3 温度和盐度及交互作用对中间球海胆 16 细胞期发育时间影响的响应曲面和等高线

Fig. 3 Response surfaces and contours of temperature, salinity and interactive effects on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* 16-cell

检验为不显著($P>0.05$), 表明温度和盐度对中间球海胆的早期发育时间所建立的拟合方程有效。其中, 回归方程模型的决定系数为 0.9932, 校正系数为 0.9883, 预测系数为 0.9703, 表明该模型可以解释 99.32%响应值变化, 因此该模型选择恰当。

对囊胚期细胞模型各项系数显著性差异检验结果表明, 温度的一次、二次效应、盐度的一次效应均显著影响($P<0.05$)囊胚期的发育时间。其中

盐度二次效应和温盐联合效应不显著影响($P>0.05$)囊胚期的发育时间(表 5)。

回归方程中, 一次项系数为负, 表明单独增加温度和盐度对囊胚期的发育时间存在负面作用。交互项系数为正, 表明温度和盐度的交互效应有利于缩短囊胚期的发育时间。温度和盐度的二次项系数为正, 说明过高或过低的温度和盐度会使囊胚期的发育时间延长。同时, 温度的一次项系数、二次系数均比盐度的大, 表明温度对于

表 5 温度和盐度对中间球海胆囊胚期发育时间的回归模型方差分析

Tab. 5 ANOVA analysis of temperature and salinity on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* blastula

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	30.82	5	6.16	203.02	<0.0001		
A-T	4.56	1	4.56	150.09	<0.0001	-0.90	-0.61
B-S	2.31	1	2.31	76.04	<0.0001	-0.70	-0.40
AB	0.14	1	0.14	4.76	0.0656	-0.02	0.42
A ²	23.62	1	23.62	777.92	<0.0001	1.68	2.00
B ²	0.10	1	0.10	3.29	0.1125	-0.04	0.28
残差 residual	0.21	7	0.03	—	—		
失拟项 lack of fit	0.11	3	0.04	1.50	0.3435		
纯误差 pure error	0.10	4	0.02	—	—		

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度二次效应; —表示无数据。

Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity; — means no data..

囊胚期发育时间的影响更大。

由图 4 可知, 随着温度的升高, 中间球海胆囊胚期的发育时间先缩短后延长; 随着盐度的降低, 中间球海胆囊胚期的发育时间逐渐延长。温度为 19.82 ℃, 盐度为 33.90 时, 发育到囊胚期所需的时间最短, 为 3.95 h。

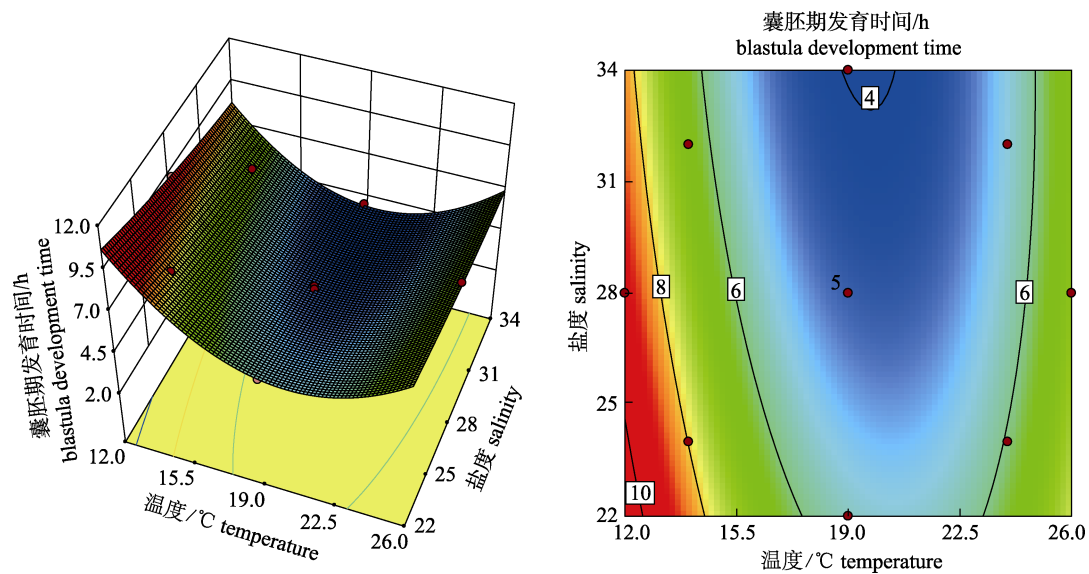


图 4 温度和盐度及交互作用对中间球海胆囊胚期发育时间影响的响应曲和等高线

Fig. 4 Response surfaces and contours of temperature and salinity and interactive effects on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* blastula

2.5 温度和盐度对上浮期发育时间的影响

温度和盐度对中间球海胆上浮期发育时间的回归方程为:

$$Y=121.43981-4.98098T-3.81767S+0.03863TS+0.08922T^2+0.05032S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$), 失拟项

检验为不显著($P>0.05$), 表明温度和盐度对中间球海胆的早期胚胎上浮期发育时间所建立的拟合方程有效。其中, 回归方程模型的决定系数为 0.9681, 校正系数为 0.9452, 预测系数为 0.8234, 表明该模型可以解释 96.81%响应值变化, 因此该模型选择恰当。

对上浮期模型各项系数显著性差异检验结果表明, 温度的一次、二次效应和盐度的一次效应、二次效应均显著影响($P<0.05$)上浮期的发育时间。其中温盐的联合效应不显著影响($P>0.05$)上浮期的发育时间(表 6)。

回归方程中, 一次项系数为负, 表明单独增加温度和盐度对上浮期发育时间存在负面作用。交互项系数为正, 表明温度和盐度的交互效应有利于缩短上浮期发育时间。温度和盐度的二次项

系数为正, 说明过高或过低的温度和盐度会使上浮期发育时间延长。同时, 温度的一次项系数、二次系数均比盐度的大, 表明温度对于上浮期发育时间的影响更大。

由图 5 可知, 随着温度的升高, 中间球海胆上浮期的发育时间先缩短后延长; 随着盐度的降低, 中间球海胆上浮期的发育时间逐渐延长。温度为 21.90 °C, 盐度为 29.58 时, 发育到上浮期所需的时间最短, 为 11.27 h。

表 6 温度和盐度对中间球海胆上浮期发育时间的回归模型方差分析
Tab. 6 ANOVA analysis of regression model of temperature and salinity to the development time of *Strongylocentrotus intermedius* float

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	98.77	5	19.75	42.43	<0.0001		
A-T	51.34	1	51.34	110.28	<0.0001	-3.09	-1.95
B-S	9.60	1	9.60	20.63	0.0027	-1.71	-0.54
AB	2.39	1	2.39	5.13	0.0579	-0.04	1.66
A ²	33.31	1	33.31	71.56	<0.0001	1.57	2.80
B ²	5.42	1	5.42	11.65	0.0112	0.28	1.53
残差 residual	3.26	7	0.47				
失拟项 lack of fit	2.43	3	0.81	3.88	0.1116		
纯误差 pure error	0.83	4	0.21				

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度二次效应; -表示无数据。
Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity; - means no data.

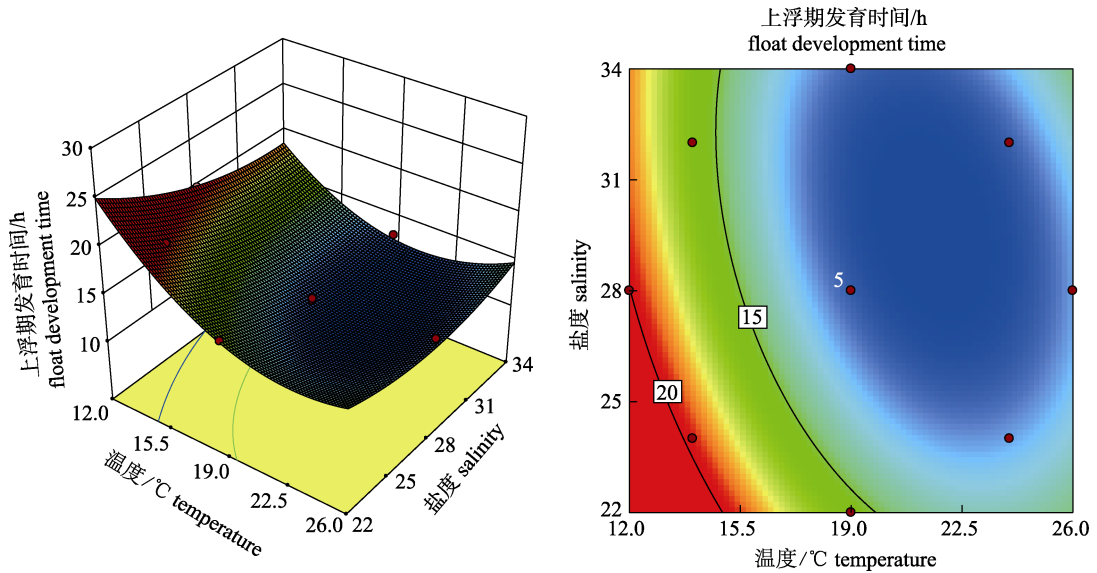


图 5 温度和盐度及交互作用对中间球海胆上浮期发育时间影响的响应曲面和等高线
Fig. 5 Response surface and contour lines of temperature, salinity and interactive effects on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* float

2.6 温度和盐度对四腕幼虫期发育时间的影响

温度和盐度对中间球海胆四腕幼虫期发育时间的回归方程为:

$$Y=167.19964-5.75010T-3.35650S+0.00650TS+0.12491T^2+0.04772S^2$$

所建立的回归模型极显著($P<0.01$), 失拟项检验为不显著($P>0.05$), 表明温度和盐度对中间球海胆的早期胚胎四腕幼虫期发育时间所建立的拟合方程有效。其中, 回归方程模型的决定系数为 0.9763, 校正系数为 0.9594, 预测系数为 0.8602, 表明该模型可以解释 97.63%响应值变化, 因此该模型选择恰当。

对四腕幼虫期模型各项系数显著性差异检验

结果表明, 温度的一次、二次效应和盐度的一次效应、二次效应均显著影响($P<0.05$)四腕幼虫期发育时间, 其中温盐的联合效应不显著影响($P>0.05$)四腕幼虫期发育时间(表 7)。

回归方程中, 一次项系数为负, 表明单独增加温度和盐度对四腕幼虫期发育时间存在负面作用。交互项系数为正, 表明温度和盐度的交互效应有利于缩短四腕幼虫期发育时间。温度和盐度的二次项系数为正, 说明过高或过低的温度和盐度会使四腕幼虫期发育时间延长。同时, 温度的一次项系数、二次系数均比盐度的大, 表明温度对于四腕幼虫期发育时间的影响更大。

由图 6 可知, 随着温度的升高, 中间球海胆

表 7 温度和盐度对中间球海胆四腕幼虫期发育时间的回归模型方差分析
Tab. 7 ANOVA analysis of regression model of temperature and salinity to the development time of *Strongylocentrotus intermedius* four-arm pluteus

来源 source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	P	95%置信下限 95% CI low	95%置信上限 95% CI high
模型 model	242.62	5	48.52	57.73	<0.0001		
A-T	133.58	1	133.58	158.93	<0.0001	-4.83	-3.30
B-S	42.72	1	42.72	50.82	0.0002	-3.17	-1.59
AB	0.06	1	0.06	0.08	0.7849	-1.00	1.27
A ²	65.30	1	65.30	77.69	<0.0001	2.24	3.88
B ²	4.88	1	4.88	5.80	0.0469	0.016	1.70
残差 residual	5.88	7	0.84				
失拟项 lack of fit	4.57	3	1.52	4.63	0.0863		
纯误差 pure error	1.31	4	0.33				

注: A 表示温度的一次效应; B 表示盐度的一次效应; AB 表示温盐的联合效应; A² 表示温度的二次效应; B² 表示盐度二次效应; -表示无数据。
Note: A represents the linear effect of temperature; B represents the linear effect of salinity; AB represents the interactive effect of temperature and salinity; A² represents the quadratic effect of temperature; B² represents the quadratic effect of salinity; - means no data.

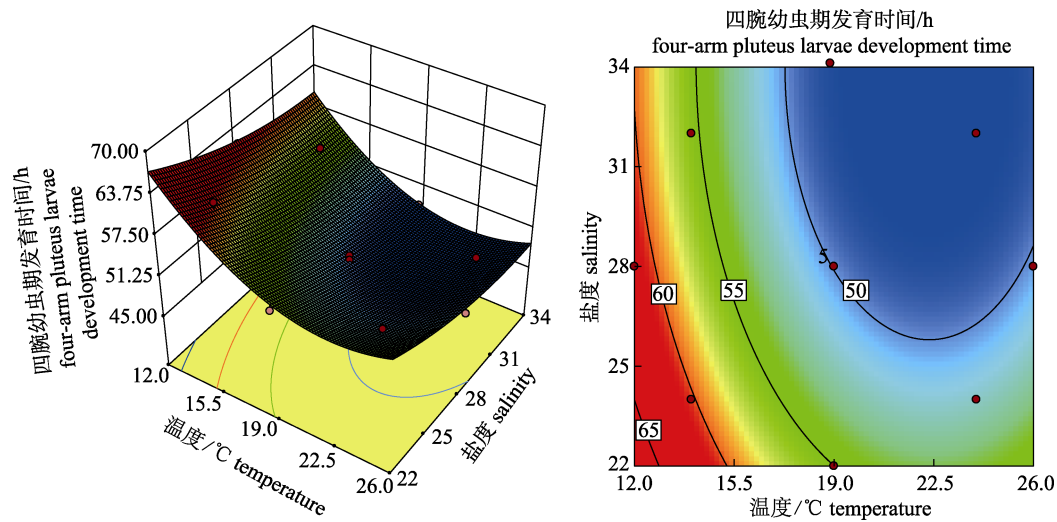


图 6 温度和盐度及交互作用对中间球海胆四腕幼虫期发育时间影响的响应曲面和等高线
Fig. 6 Response surface and contour lines of the influence of temperature, salinity and interactive effects on the development time of *Strongylocentrotus intermedius* four-arm pluteus

四腕幼虫期的发育时间先缩短后延长;随着盐度的降低,中间球海胆四腕幼虫期的发育时间逐渐延长。温度为 22.02 °C,盐度为 33.71 时,发育到四腕幼虫期所需的时间最短,为 46.88 h。

2.7 温度、盐度对海胆胚胎发育进程的优化

本研究所建立的模型方程拟合度较好,通过模型对实验条件进行优化,得出温度 20.47 °C 和盐度 31.46 时,中间球海胆早期胚胎 2 细胞期、8 细胞期、16 细胞期、囊胚期、上浮期、四腕幼虫期发育所需的时间最短,分别为 1.43 h、2.17 h、3.41 h、4.13 h、11.44 h、47.64 h,满意度为 97.00%。为验证响应曲面优化条件的可靠性,按照所得最优条件开展实验验证,实测中间球海胆早期胚胎 2 细胞期、8 细胞期、16 细胞期、囊胚期、上浮期、四腕幼虫期的发育所需时间分别为 1.28 h、2.07 h、3.31 h、4.14 h、11.28 h、47.31 h,与软件优化结果吻合度为 96.75%,表明模型优化条件合理有效。

3 讨论

3.1 温度对中间球海胆早期胚胎发育进程的影响

温度对生物早期胚胎发育进程具有显著的环境效应^[14-15]。Ponce-Palafox 等^[16]研究表明,温度对水生生物早期胚胎发育的影响主要体现在生化反应、能量代谢及某些生物大分子活力方面。Byrne 等^[17]研究显示,白海胆(*Heliocidaris erythrogramma*)对不同热状态具有温度代谢补偿机制,亲代为了适应高温环境积累更多的热休克蛋白,为子代胚胎发育提供保护,从而提高繁殖率。Desrosiers 等^[18]研究认为,温度对海湾扇贝(*Placopecten magellanicus*)早期胚胎发育的影响则是通过调整染色体的移动速度和增强酶的活性来实现的。Virgin 等^[19]研究发现,水生生物主要通过降低新陈代谢和减缓发育以应对温度胁迫,最终导致早期胚胎发育时间的延长。

本研究中间球海胆早期胚胎发育进程与水温存在显著相关性($P<0.05$)。其中,温度的一次效应、二次效应与早期胚胎发育进程均具有显著的正相关($P<0.05$),且随着温度的升高海胆早期胚胎发育时间呈现出先缩短后延长的趋势,这一现

象同样出现在中国珍珠牡蛎(*Pinctada martensii*)^[20]、潮间带螺(*Nassarius festivus*)^[21]、欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)^[22]等水产动物中。造成早期胚胎发育时间随着温度的升高呈现出先缩短后延长的现象,Deepani^[23]认为水温的升高会加速胚胎发育和新陈代谢速率,缩短孵化时间;而当温度超过其耐受范围,高温又会抑制孵化酶(胰蛋白酶、乳酸脱氢酶、糖酵解酶等)的活力,诱导其新陈代谢速度减缓,从而表现出发育延缓的态势。

3.2 盐度对中间球海胆早期胚胎发育进程的影响

盐度通过调节生物细胞离子、酶代谢及渗透压等方面,影响生物早期胚胎发育进程^[24]。同时,在个体发育期间,不同发育阶段对盐度变化的耐受性也有所不同^[25]。因此,深入探究生物生长发育所需的盐度适应范围,将有助于提高中间球海胆早期胚胎发育率。已有的研究表明^[26],当盐度高于或低于生物早期胚胎发育的耐受值,会减弱受精卵和幼虫浮力,降低幼虫上浮率。本实验结果显示,盐度的一次效应和二次效应对中间球海胆胚胎发育进程均具有显著影响($P<0.05$)。在设置的盐度范围内,随着盐度的降低中间球海胆胚胎发育时间逐渐延长,这与 Cowart 等^[27]报道低盐会减缓南极海胆(*Sterechinus neumayeri*)胚胎发育时间的研究结果相一致。低盐环境下,相关生理生化指标改变可能延缓中间球海胆胚胎发育进程。李丽等^[28]研究表明,细胞渗透压、水中溶解气体饱和度、有丝分裂过程中与微管相关合成的蛋白质或纺锤体功能受到改变,均会影响卵裂进程。Cinti 等^[29]研究显示,盐度会影响胚胎的渗透平衡,当超过胚胎的耐受性会导致脱水、萎缩、卵黄囊变小、胚胎发育停滞或胚胎发育时间延长。Ciapa 等^[30]研究认为,在低渗环境下缺少 Na^+ 而使有丝分裂促进因子(MPF)激活量减少或生物在低盐环境中代谢成本增加和 Na^+/K^+ ATP 酶活性减弱,均可导致生物发育停滞。

3.3 温度和盐度对中间球海胆早期胚胎发育进程的联合效应

中间球海胆是生活在寒温带、狭盐性的棘皮动物,受精卵孵化过程对水环境中盐度和温度具有较高要求^[31]。本实验中温度的一次项系数和二

次系数均比盐度大,表明温度相比于盐度对海胆早期胚胎发育进程的影响更为显著($P < 0.05$)。该结果清晰地呈现在响应曲面轮廓图中,表现为等高线沿水平轴(温度)比沿垂直轴(盐度)窄。温度比盐度对其生物生长发育的影响更为重要,这与王慧^[20]和 Tettelbach^[32]研究结果一致。Tettelbach 等^[32]和 Delorme 等^[33]认为高温条件下生物体内多种酶活性减弱甚至丧失,各项生理活动减慢,因而生物通过改变自身的代谢状况以及消耗更多的能量来适应外界环境的变化。Santos 等^[34]认为生物体暴露于各种温度下,它们可能具有更高的适应和调节代谢稳态的能力。此外,温度和盐度的交互作用对中间球海胆早期胚胎发育进程影响不显著($P > 0.05$),这种现象可能是由于幼虫对盐分耐受极值渗透压变化的适应性降低,以及幼虫自身对生物群落的适应性增加所引起^[35-37]。这意味着温度和盐度分别独立作用于中间球海胆早期胚胎发育进程,而并不具有协同或拮抗作用。因此在实际生产实践中早期胚胎发育的最适温度和盐度作为首要考虑因素,而将温度和盐度的联合效应作为次要因素。

4 结论

本研究采用中心复合设计和响应曲面法,在实验条件下开展了温度和盐度对中间球海胆胚胎早期发育进程的联合效应研究,建立了温度和盐度对中间球海胆胚胎发育进程的定量关系模型,并通过统计优化方法得出温度和盐度的最佳组合为温度 20.47 °C 和盐度 31.46。同时得出,温度对中间球海胆早期胚胎发育进程影响大于盐度,温盐的联合效应对中间球海胆早期胚胎发育进程的影响不显著。实验所设置的温度上限和下限之差为 14 °C,盐度上限和下限之差为 12,该范围接近于我国黄渤海全年水体温度和盐度的波动幅度,研究结果将为中间球海胆人工繁育提供理论依据。

参考文献:

[1] Chang Y Q. Biological research and breeding of sea cucumber and sea urchin[M]. Beijing: China Ocean Press, 2004: 5-40. [常亚青. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京:

海洋出版社, 2004: 5-40.]

- [2] Wang Z C, Chang Y Q. Studies on hatching of Japanese sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(1): 60-67. [王子臣, 常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(1): 60-67.]
- [3] Wang Z C, Chang Y Q. Research progress and prospects of economic sea urchin breeding[J]. Marine Sciences, 1997, 21(6): 20-22. [王子臣, 常亚青. 经济类海胆增殖研究进展及前景[J]. 海洋科学, 1997, 21(6): 20-22.]
- [4] Lawrence J M, Zhao C, Chang Y Q. Large-scale production of sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) seed in a hatchery in China[J]. Aquaculture International, 2019, 27(1): 1-7.
- [5] Zhao Y, Tong S Y, Zhang S, et al. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and NH₃ excretion rate in sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(4): 33-36. [赵艳, 童圣英, 张硕, 等. 温度和盐度对虾夷马粪海胆耗氧率和排氨率的影响[J]. 中国水产科学, 1998, 5(4): 33-36.]
- [6] Mak K K Y, Chan K Y K. Interactive effects of temperature and salinity on early life stages of the sea urchin *Heliocidaris crassispina*[J]. Marine Biology, 2018, 165(3): Article No. 57.
- [7] Kong N, Liu X, Li J Y, et al. Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(5): 1248-1258.
- [8] O'Connor W A, Lawler N F. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata Röding*[J]. Aquaculture, 2004, 229(1-4): 493-506.
- [9] Zhan Y Y, Hu W B, Zhang W J, et al. The impact of CO₂-driven ocean acidification on early development and calcification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 112(1-2): 291-302.
- [10] Duan M N, Xiong D Q, Yang M Y, et al. Parental exposure to heavy fuel oil induces developmental toxicity in offspring of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 159: 109-119.
- [11] Johnstone J, Nash S, Hernandez E, et al. Effects of elevated temperature on gonadal functions, cellular apoptosis, and oxidative stress in Atlantic sea urchin *Arbacia punctulata*[J]. Marine Environmental Research, 2019, 149: 40-49.
- [12] Zhao C, Zhang L S, Shi D T, et al. Transgenerational effects of ocean warming on the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 151: 212-219.
- [13] Hill W J, Hunter W G. A review of response surface methodology: A literature survey[J]. Technometrics, 1966, 8(4): 571-590.
- [14] Zhu X W, Wang H, Liu J, et al. Combined effects of tem-

- perature, salinity and pH on the clearance rate of juveniles of *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(12): 3729-3736. [朱晓闻, 王辉, 刘进, 等. 温度、盐度和 pH 对马氏珠母贝稚贝清滤率的联合效应[J]. *生态学报*, 2012, 32(12): 3729-3736.]
- [15] Nande M, Iglesias J, Domingues P, et al. Effect of temperature on energetic demands during the last stages of embryonic development and early life of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) paralarvae[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1951-1961.
- [16] Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios C A, Ross L G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931[J]. *Aquaculture*, 1997, 157(1-2): 107-115.
- [17] Byrne M, Selvakumaraswamy P, Ho M A, et al. Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58(5): 712-719.
- [18] Desrosiers R R, Désilets J, Dubé F. Early developmental events following fertilization in the giant scallop *Placopecten magellanicus*[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(6): 1382-1392.
- [19] Virgin S D S, Sorochan K A, Metaxas A, et al. Effect of temperature on the larval biology of ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and insights on their northern range limit[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019, 512: 31-41.
- [20] Wang H, Zhu X W, Wang Y N, et al. Determination of optimum temperature and salinity for fertilization and hatching in the Chinese pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. *Aquaculture*, 2012, 358-359: 292-297.
- [21] Kang S K, Sung C G, Chung J, et al. Effect of water temperature on embryonic development and larval survival of an intertidal snail, *Nassarius festivus* (Powys, 1835)[J]. *The Korean Journal of Malacology*, 2016, 32(1): 37-43.
- [22] Politis S N, Mazurais D, Servili A, et al. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(8): e0182726.
- [23] Deepani S. Ontogeny of osmoregulation of the embryos of two intertidal crabs *Hemigrapsus edwardsii* and *Hemigrapsus crenulatus*[D]. Christchurch: University of Canterbury, 2003: 5-25.
- [24] Böttger S A, McClintock J B. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 129(4): 307-315.
- [25] Greenwood J G, Jones M B, Greenwood J. Salinity effects on brood maturation of the mysid crustacean *Mesopodopsis slabberi*[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1989, 69(3): 683-694.
- [26] Savoie A, Le François N R, Cahu C, et al. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): Effect of temperature[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(4): 382-389.
- [27] Cowart D A, Ulrich P N, Miller D C, et al. Salinity sensitivity of early embryos of the Antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*[J]. *Polar Biology*, 2009, 32(3): 435-441.
- [28] Li L, Li Q, Sun X J, et al. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival, and development of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2011, 73(3): 296-303.
- [29] Cinti A, Barón P J, Rivas A L. The effects of environmental factors on the embryonic survival of the Patagonian squid *Loligo gahi*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 313(2): 225-240.
- [30] Ciapa B, Philippe L. Intracellular and extracellular pH and Ca are bound to control mitosis in the early sea urchin embryo via ERK and MPF activities[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66113.
- [31] Chang Y Q, Gao X S. Artificial seedling raising and breeding technology of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(10): 45-46. [常亚青, 高绪生. 中间球海胆的人工育苗及增殖技术(之五)[J]. *水产科学*, 2004, 23(10): 45-46.]
- [32] Tettelbach S T, Rhodes E W. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop *Argopecten irradians irradians*[J]. *Marine Biology*, 1981, 63(3): 249-256.
- [33] Delorme N J, Sewell M A. Temperature and salinity: Two climate change stressors affecting early development of the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus*[J]. *Marine Biology*, 2014, 161(9): 1999-2009.
- [34] Santos P M, Albano P, Raposo A, et al. The effect of temperature on somatic and gonadal development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735487.
- [35] Handeland S O, Berge Å I, Björnsson B T, et al. Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater[J]. *Aquaculture*, 1998, 168(1-4): 289-302.
- [36] Barile J, Escudero M, Carreño E. Combined effect of temperature and salinity on embryonic survival of *Galaxias maculatus*[J]. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 2013, 48(3): 641-645.
- [37] Lü W G, Li W D, Ke C H, et al. Reproductive success under the joint influences of temperature and salinity in noble scallop, *Chlamys nobilis* (Reeve)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(2): 686-696.

Interactive effect of temperature and salinity on early embryo development processes of the sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)

WU Yanglei, ZHEN Hao, WANG Luo, TAN Bamei, PEI Honglin, DING Jun, CHANG Yaqing

Dalian Ocean University; Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian 116023, China

Abstract: Using the fertilized eggs and larva of *Strongylocentrotus intermedius*, the effects of high temperatures and low salinity on the early embryonic development of the *S. intermedius* were investigated, and the tolerance of larvae at various stages to temperature and salinity were studied. Central Composite Design and Response Surface Methodology were used to study the interactive effects of temperatures (12–26 °C) and salinity (22–34) on the early embryonic development processes of *S. intermedius*, with the aim of establishing a quantitative relationship model of temperature and salinity on the development processes of embryos, and then through statistical optimization methods obtain the best combination of temperature and salinity. The results showed that the early embryonic development time of *S. intermedius* first shortened and then lengthened with temperature increase. With salinity decreasing, the early embryo development of *S. intermedius* increased. The linear effect and the quadratic effect of temperature, and the linear effect of salinity on the early embryonic development process of *S. intermedius* were significant ($P < 0.05$). The absolute value of the linear coefficient of temperature was greater than the linear coefficient of salinity. The combined effect of temperature and salinity on the early embryonic development of *S. intermedius* was not significant ($P > 0.05$). The model equation of the 2-cell, 8-cell, 16-cell, blastula, float, and four-arm pluteus larvae toward temperature and salinity were established, with the coefficients of determination (R^2) being 0.9576, 0.9508, 0.9689, 0.9932, 0.9681, and 0.9763, respectively. At a temperature of 20.47 °C and a salinity of 31.46, the development time of the 2-cell, 8-cell, 16-cell, blastula, float, and four-arm pluteus larvae of *S. intermedius* were the shortest, which were 1.28 h, 2.07 h, 3.31 h, 4.14 h, 11.28 h and 47.31 h, respectively. The results indicated that a high temperature and low salinity will prolong the early embryonic development processes of *S. intermedius*. The findings provide a theoretical basis for the artificial breeding of *S. intermedius*.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; early embryo development; temperature; salinity; interactive effect

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