

长棘海星(*Acanthaster planci*)幼体特异性 PCR 检测技术与应用*

张颖¹, 杨栋潼², 刘冰^{1,3}, 郑凡昱¹, 罗鹏¹, 陈偿^{1,4}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与重点实验室, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301;

2. 厦门大学马来西亚分校, 中国东盟海洋技术学院, 马来西亚 雪兰莪州 雪邦 43900;

3. 中国科学院大学, 北京 100049;

4. 中国科学院南海海洋研究所, 海南西沙海洋环境国家野外科学观测研究站, 广东 广州 510301

摘要: 长棘海星(*Acanthaster planci*)的暴发是导致我国南海乃至印度—太平洋海域珊瑚礁退化的主要原因之一。浮游幼体的密度是决定成体种群是否暴发的重要指标, 但是由于幼体肉眼不可见且不易分辨, 常规调查和显微镜观察均无法有效检测到自然海域的长棘海星幼体, 因此迫切需要开发一种高灵敏性且特异性的长棘海星幼体检测技术。本研究针对长棘海星幼体线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(*mtCOI*, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I)基因序列, 建立了基于聚合酶链式反应(PCR, polymerase chain reaction)的长棘海星幼体特异性检测技术, 并对西沙七连屿珊瑚礁海域的长棘海星幼体进行了检测。结果表明, 设计筛选的 4 对特异性引物均可以扩增长棘海星 *ApmCOI* 基因片段, 且与蓝指海星(*Linckia laevigata*)、面包海星(*Culcita novaeguineae*)、粒皮海星(*Choriaster granulatus*)和吕宋棘海星(*Echinaster luzonicus*)没有交叉反应。在退火温度为 58.5℃时, 引物 2aooniF/2aooniR 的特异性最佳, 具有较高的灵敏度, 可检测到皮克级的长棘海星基因组 DNA。利用该技术检测了西沙七连屿海域长棘海星幼体分布情况, 发现 10 月底西沙七连屿珊瑚礁海域能检测到长棘海星幼体, 且幼体分布并不均匀。因此, 该检测技术可作为今后长棘海星幼体种群监测的有效方法。

关键词: 长棘海星; 细胞色素氧化酶亚基 I; 聚合酶链式反应; 幼体

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 1009-5470(2022)06-0125-07

Specific PCR detection for *Acanthaster planci* larvae and its application*

ZHANG Ying¹, YANG Litong², LIU Bing^{1,3}, ZHENG Fanyu¹, LUO Peng¹, CHEN Chang^{1,4}

1. CAS 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, China;

2. China-ASEAN College of Marine Sciences, Xiamen University Malaysia, Sepang 43900, Malaysia;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. Xisha Marine Environment National Observation and Research Station, Hainan, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

Abstract: The outbreak of crown-of-thorns seastar (CoTS, *Acanthaster planci*) is one of the main causes to coral reef degradation in the South China Sea and the Indo-Pacific region. The density of CoTS larvae is an important indicator to determine whether the outbreak of CoTS adult population occurs or not. However, as the larvae are not visible and thus difficult to be distinguished, conventional investigation and microscope observation cannot effectively detect the CoTS larvae

收稿日期: 2022-01-19; 修订日期: 2022-05-09。林强编辑

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系

作者简介: 张颖(1992—), 女, 湖南省郴州市人, 助理研究员, 从事海洋生物分子生态学研究。email: zhangy@scsio.ac.cn

通信作者: 陈偿。email: chen.chang@scsio.ac.cn

*感谢中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心提供长棘海星的养殖繁育条件。感谢三沙航迹珊瑚礁保护研究所提供科考船搭载采集样品。感谢编辑和审稿人对文章给予的意见和建议。

Received date: 2022-01-19; **Revised date:** 2022-05-09. Editor: LIN Qiang

Foundation item: China Agriculture Research System of MOF and MARA

Corresponding author: CHEN Chang. email: chen.chang@scsio.ac.cn

in natural seawaters. Therefore, it is needed to develop a sensitive and specific method for detecting CoTS larvae. This study established specific polymerase chain reaction (PCR) method to detect the CoTS larvae based on CoTS mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (*Apm*tCOI), and this method was applied to detect the CoTS larvae in the coral reef around Qilanyu Island, Xisha. The results showed that the designed and screened four pairs of specific primers could succeed in amplifying *Apm*tCOI gene, and had no cross-reaction with *Linckia laevigata*, *Culcita novaeguineae*, *Choriaster granulatus* and *Echinaster luzonicus*. Moreover, the primer 2aooniF/2aonoiR had the best specificity and higher sensitivity when annealing temperature was 58.5°C, which could detect the CoTS genomic DNA in pictogram grade. Furthermore, this method had succeeded in detecting the CoTS larvae in the Qilanyu Island of Xisha at the end of October, and we found that the distribution of CoTS larvae was not uniform. Therefore, this detection technology can be used as an effective method for monitoring CoTS larvae population in the future.

Key words: *Acanthaster planci*; cytochrome oxidase subunit I; polymerase chain reaction; larvae

近几十年来,世界各地的珊瑚礁正在迅速减少(Hughes et al, 2017)。虽然气候引起的周期性白化是全球珊瑚死亡的主要原因(Hughes et al, 2018),但以珊瑚为食的长棘海星(*Acanthaster planci*, 英文名为 crown-of-thorns seastar, 简称 CoTS)数量的激增加剧了印度—太平洋地区的珊瑚礁退化(Baird et al, 2013; Nakamura et al, 2014; Saponari et al, 2015)。例如, 1985 年至 2012 年期间, 澳大利亚大堡礁(Great Barrier Reef, GBR)的珊瑚覆盖面积减少了约 50%, 其中 42% 归因于长棘海星的破坏(De'ath et al, 2012)。目前, 大堡礁正在经历自 20 世纪 60 年代以来有记录的第四次大规模长棘海星暴发(Pratchett et al, 2014, 2017)。与此同时, 印度—太平洋地区的许多其他珊瑚礁也受到长棘海星的严重影响, 包括法属波利尼西亚(Kayal et al, 2012)、印度尼西亚(Baird et al, 2013)和日本冲绳(Nakamura et al, 2014)的珊瑚礁。我国的珊瑚礁也未逃脱这一命运。据报道, 自 2004 年以来, 西沙群岛海域珊瑚礁已经经历了两次长棘海星大规模暴发事件, 其中在第一次暴发期间, 长棘海星的密度每公顷高达 20000 只, 珊瑚的覆盖率从最初的 60% 多退化到不足 10%, 而且经历长棘海星暴发的珊瑚礁至少需要 10~15 年的时间才能逐渐恢复(吴钟解 等, 2011; 李元超 等, 2019)。

尽管在过去 30 年里进行了大量的研究工作, 但制定有效的管理战略以控制长棘海星暴发仍然受到很多不确定性的限制(Pratchett et al, 2017)。其中一部分原因来自对野外原位长棘海星幼虫的了解有限。海洋浮游动物的分类鉴定通常是通过光学显微镜完成的, 要成功进行这项工作, 往往需要丰富的技能和大量的培训。即便如此, 仅根据形态来区分长棘海星幼虫与其他海星及海参的幼虫几乎是不可能的(Uthicke et al, 2015); 而且由于食物可获得性的

不同, 导致长棘海星幼虫发育和形态上的表型可塑性, 使视觉识别更复杂且难度更高(Wolfe et al, 2015)。因此, 研发一种新的识别手段尤为重要, 而遗传鉴定是一种高效且有用的工具。

线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(*mt*COI, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I)基因是一种线粒体基因, 因其具有高度保守以及高拷贝数的特性, 常被用作许多类群的 DNA 条形码(Hebert et al, 2003; 位正鹏 等, 2009), 包括棘皮动物(Ward et al, 2008)和浮游动物(Bucklin et al, 2016)。而且, 相比核 DNA, 线粒体基因具有结构简单、进化速率高和母系遗传等特点(Gérard et al, 2008)。此外, *mt*COI 序列信息在遗传数据库中的可获得性, 使物种特定的遗传序列得以确定。因此本研究以长棘海星 *Apm*tCOI 基因和线粒体基因为靶点, 设计筛选引物, 以建立一种针对我国南海海域长棘海星特异性的 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

成体海星的采集: 蓝指海星(*Linckia laevigata*)、面包海星(*Culcita novaeguineae*)、粒皮海星(*Choriaster granulatus*)和吕宋棘海星(*Echinaster luzonicus*)均采自西沙七连屿赵述岛(16°58.117'N, 112°14.848'E)(图 1)。

长棘海星幼体的采集: 2021 年 9 月初将长棘海星成体采集上岸, 培养在循环水的水族缸中, 使用 1-甲基腺嘌呤进行体内注射催产(Tian et al, 2017), 取 20 只原肠胚期幼虫装入 2mL 冻存管中, 速冻于液氮用于后续基因组 DNA 提取。

浮游生物样品的采集: 基于长棘海星偏食石珊瑚的特性, 我们在西沙群岛七连屿选取 6 个具有不同活珊瑚覆盖率的点作为样品采集站位(表 1)。2021

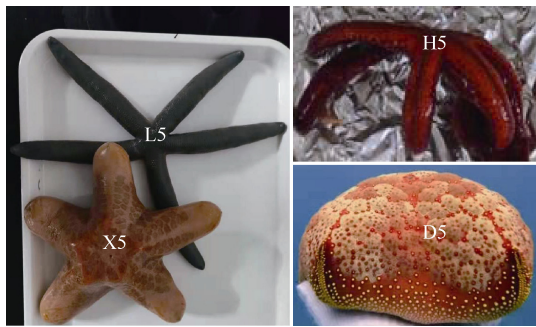


图 1 各种海星样品

D5: 面包海星, L5: 蓝指海星, X5: 粒皮海星, H5: 吕宋棘海星
Fig. 1 Various starfish samples. D5: *Culcita novaeguineae*;
L5: *Linckia laevigata*; X5: *Choriaster granulatus*; H5:
Echinaster luzonicus

年 10 月 21 日, 使用锥形浅水 II 型浮游生物网
(0.5mm 孔径)从水下 10m 至海面进行垂直拖网采样,
每个站位拖网水体积总共为 5m³, 富集为 500mL,

表 1 样品采集的站位
Tab. 1 Sampling stations

站位	坐标	地理位置	样品名
1	16°57.708' N, 112°13.080' E	西沙洲	XSZ
2	16°58.117' N, 112°14.848' E	赵述岛	ZS-1
3	16°58.315' N, 112°16.300' E	赵述岛	ZS-2
4	16°57.112' N, 112°19.432' E	中岛	ZD
5	16°56.794' N, 112°19.801' E	南岛	ND
6	16°56.086' N, 112°20.221' E	北沙洲	BSZ

表 2 PCR 引物
Tab. 2 PCR primers

序号	引物名称	引物序列(5'—3')	熔解温度(T _m)/℃	线粒体基因组上的片段位点	目的片段大小/bp	来源
1	COTS-F-1321	TCCGACTACCCGGACGCC TATAC	62.9	5985—6007	126	Doyle et al, 2017
	COTS-R-1446	AGTGGT TCGCTGGGAAGTGAAGG	62.2	6008—6110		
2	2aooniF	ATTTGGGGCCTGAGCAGGAATG	60.6	4727—4748	301	Suzuki et al, 2016
	2aooniR	GCCTCTTCTACTCCGGCTGATG	60.2	5005—5027		
3	AcanP-TF	GCACGATTGTCTCTGCCAAA	56.1	3074—3094	785	本研究
	AcanP-TR	AGTCCTTCTCTCGCCAGGT	58.4	3840—3858		
4	COTS-F-69	GGCCTGAGCAGGAATGGTTGGAA	62.6	4733—4755	919	Uthicke et al, 2015
	COTS-R-987	GCCTTG TAGCGTTGCCATT CACC	61.9	5629—5651		

目的基因 PCR 扩增的反应总体积为 25μL: 引物 0.6μL, 2×Phanta Max Master Mix(诺唯赞, 南京)12.5μL, DNA 模板(终浓度为 1~10ng·μL⁻¹)1μL, ddH₂O 补足至 25μL。扩增反应条件: 95℃ 3min; 95℃ 15s, 60℃/57℃ 15s, 72℃ 30s/1min, 34 个循环; 72℃ 10min。各引物的退火温度和延伸时间见表 3, 以 ddH₂O 作为阴性对照, 长棘海星幼体基因组 DNA

收集于白色塑料瓶中。将水样立即带回海南西沙海洋环境国家野外科学观测研究站实验室, 0.45μm 滤膜真空抽滤后装入 2mL 冻存管, 速冻于液氮。

1.2 基因组 DNA 的提取

参照 TIANamp Marine Animals DNA Kit 试剂盒(天根, 北京), 分别提取成体海星、长棘海星幼体和浮游生物样品中的基因组 DNA。所有样品均使用 NanoDrop-2000 分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。然后冻存于-20℃, 备用。

1.3 引物来源及海星成体目的基因 PCR 扩增

基于完整的长棘海星线粒体 DNA(16234bp, GenBank 登录号为 AB231475.1), 通过 NCBI 网站中的 Primer-BLAST 根据引物设计原则(Ye et al, 2012)设计了特异性引物对 AcanP-TF/AcanP-TR, 其他引物则来自参考文献(表 2)。各引物由生工生物工程股份有限公司合成。

作为阳性对照。

1.4 长棘海星幼体特异性引物的最佳退火温度

根据 1.3 的实验结果, 选取引物 2aooniF/2aooniR 进一步研究。根据该引物的 T_m 值, 将退火温度分别设置为 56.5、57.5、58.5、59.5、60.5 和 61.5℃, 对长棘海星幼虫样品进行梯度 PCR 扩增。反应体系同 1.3, 其他扩增条件见表 3, 以 ddH₂O 作为阴性对照。

表 3 PCR 反应条件
Tab. 3 PCR reaction conditions

序号	引物名称	PCR 反应条件
1	COTS-F-1321 COTS-R-1446	95℃ 3min; 95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 30s, 34 个循环; 72℃ 10min;
2	2aooniF 2aooniR	95℃ 3min; 95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 30s, 34 个循环; 72℃ 10min;
4	AcanP-TF AcanP-TR	95℃ 3min; 95℃ 15s, 57℃ 15s, 72℃ 1min, 34 个循环; 72℃ 10min;
5	COTS-F-69 COTS-R-987	95℃ 3min; 95℃ 15s, 57℃ 15s, 72℃ 1min, 34 个循环; 72℃ 10min;

1.5 长棘海星幼体特异性引物的灵敏度检测

将长棘海星幼体基因组 DNA 的浓度 $4.17\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 按 10 倍的梯度稀释至 $4.17\times 10^{-8}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 并根据 1.4 的实验结果, 选取引物 2aooniF/2aooniR 在 58.5°C 进行该引物灵敏度的检测, 反应体系和其余扩增条件同 1.4。

1.6 野外浮游生物样品中长棘海星幼体的检测

使用引物 2aooniF/2aooniR, 在退火温度为 58.5°C 时对浮游生物样品基因组 DNA 进行长棘海星幼体目的片段的扩增。反应体系和其余扩增条件同 1.4。

1.7 PCR 反应产物的检测

使用 1.2% 的琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳 (135V , 28min), 260nm 凝胶成像仪下观察拍照, 确认目的条带。利用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(天根, 北京)对目的片段进行回收纯化, 琼脂糖凝胶电泳检

测回收产物, 将纯化产物送往公司进行测序(天一辉远生物科技有限公司, 广州)。利用 NCBI 中的 BLAST 检索, 将测序成功的序列与 GenBank 中已记录长棘海星线粒体基因序列进行相似性比对, 相似性高且 E 值为 0 的序列即为比对成功的序列, 比对成功的样品即为阳性样品。

2 结果

2.1 长棘海星特异性引物

利用 4 对引物对长棘海星幼体和其他成体海星的基因组进行扩增。结果发现, 4 对引物均只能扩增出长棘海星幼体基因组目的片段, 无法扩出其他海星的基因组 DNA, 且扩增的长棘海星目的条带清晰, 无杂带或非特异性扩增产物(图 2)。表明这 4 对引物都可以用于鉴定长棘海星幼体。



图 2 不同引物的特异性检测

M: 2000bp marker; 1—6 分别为 COST-F-1321/COST-R-1446 引物扩增下的样品 D5、H5、X5、L5、阴性、阳性; 7—12 分别为 2aooniF/2aooniR 引物扩增下的样品 D5、H5、X5、L5、阴性、阳性; 13—18 分别为 AcanP-TF/TR 引物扩增下的样品 D5、H5、X5、L5、阴性、阳性; 19—24 分别为 COTS-F-69/COTS-R-987 引物扩增下的样品 D5、H5、X5、L5、阴性、阳性

Fig. 2 Specificity screening of different primers. M: 2000bp marker; 1-6: D5, H5, X5, L5, negative, positive control samples were amplified by COST-F-1321/COST-R-1446 primer; 7-12: D5, H5, X5, L5, negative, positive control samples were amplified by 2aooniF/2aooniR primer; 13-18: D5, H5, X5, L5, negative, positive control samples were amplified by AcanP-TF/TR primer; 19-24: D5, H5, X5, L5, negative, positive control samples were amplified by COTS-F-69/COTS-R-987 primer

2.2 长棘海星幼体特异性检测引物的最佳退火温度

鉴于长棘海星引物特异性检测结果, 我们挑选 2aooniF/2aooniR 引物进行其最佳退火温度的筛选。结果显示, 改变 2aooniF/2aooniR 引物的退火温度, 得到的目的条带清晰且均无非特异性扩增(图 3)。表明退火温度在 56.5~61.5℃之间时, 2aooniF/2aooniR 具有较佳的扩增效果。

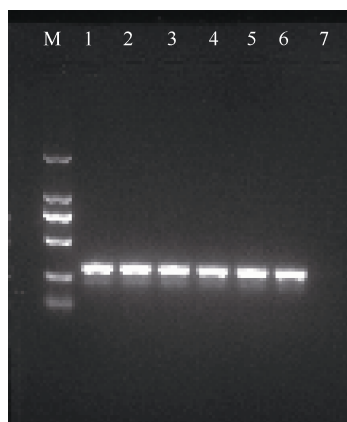


图 3 2aooniF/2aooniR 引物在不同退火温度下对长棘海星幼体的扩增

M: 2000bp marker; 1—6 分别是退火温度为 56.5、57.5、58.5、59.5、60.5、61.5℃下对长棘海星幼体的扩增; 7 为阴性对照

Fig. 3 Amplification of 2aooniF/2aooniR primer at different annealing temperatures on CoTS larvae. M: 2000bp marker; 1-6: the different annealing temperatures which were 56.5, 57.5, 58.5, 59.5, 60.5 and 61.5℃, respectively; 7: negative control sample

2.3 长棘海星幼体特异性引物的灵敏度检测

基于 2.2 的结果, 选取退火温度为 58.5℃进行 2aooniF/2aooniR 引物的灵敏度检测。结果发现, 当 DNA 浓度为 $4.17\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 条带最亮。随着 DNA 浓度的降低, 其扩增的条带亮度也逐渐减弱, 当浓度为 $4.17\times 10^{-4}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 琼脂糖凝胶电泳完全无法检测到目的条带, 而浓度为 $4.17\times 10^{-3}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时可以检测到目的片段(图 4)。表明 2aooniF/2aooniR 引物对长棘海星幼体 DNA 检测的浓度最低限为 $4.17\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 即皮克(pg)级别。

2.4 野外浮游生物样品长棘海星幼体的检测

利用 2.2 筛选的特异性引物 2aooniF/2aooniR 和退火温度 58.5℃对西沙群岛七连屿浮游生物样品进行长棘海星幼体目的片段的扩增。结果发现, 在七连屿的 6 个站位中, 4 号、5 号和 6 号三个站位样品均能成功扩增出目的基因, 而其他站位的样品未扩增出目的片段(图 5)。表明七连屿中岛、南岛和北沙洲存在长棘海星幼体, 且所采集水体中长棘海星幼体的 DNA 浓度高于皮克级别。

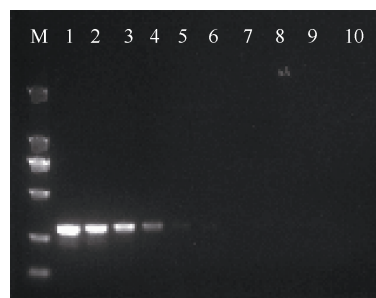


图 4 2aooniF/2aooniR 引物在退火温度为 58.5℃下, 对不同浓度长棘海星幼体的扩增

M: 2000bp marker; 1—9 浓度分别为 4.17 、 4.17×10^{-1} 、 4.17×10^{-2} 、 4.17×10^{-3} 、 4.17×10^{-4} 、 4.17×10^{-5} 、 4.17×10^{-6} 、 4.17×10^{-7} 、 $4.17\times 10^{-8}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 10 为阴性对照

Fig. 4 Amplification of 2aooniF/2aooniR primer at 58.5℃ annealing temperatures on CoTS larvae. M: 2000bp marker; 1-9: 4.17 , 4.17×10^{-1} , 4.17×10^{-2} , 4.17×10^{-3} , 4.17×10^{-4} , 4.17×10^{-5} , 4.17×10^{-6} , 4.17×10^{-7} and $4.17\times 10^{-8}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectively; 10: negative control sample

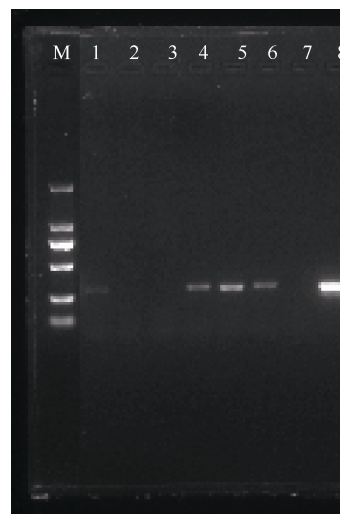


图 5 2aooniF/2aooniR 引物在 58.5℃退火温度下对浮游生物样品的扩增

M: 为 2000bp marker; 1—8 分别为 58.5℃下扩增的 XSZ、ZS-1、ZS-2、ZD、ND、BSZ、阴性、阳性样品

Fig. 5 Amplification of 2aooniF/2aooniR primer at 58.5℃ annealing temperatures on the plankton samples. M: 2000 bp marker; 1-8: XSZ, ZS-1, ZS-2, ZD, ND, BSZ, negative and positive control sample was amplified at 58.5℃ annealing temperatures, respectively

3 讨论

引物与目标 DNA 的成功结合是 PCR 扩增中的关键一步, 主要受到退火温度的影响。本研究通过对引物特异性、灵敏性及其退火温度的摸索, 建立了长棘海星幼体的检测技术, 并应用到南海西沙七连屿长棘海星幼体的检测中。研究发现引物 2aooniF/2aooniR 在退火温度为 58.5℃进行 PCR 扩增

时,其扩增效果最佳,其检测灵敏度可达到皮克级别,并且分别在中岛、南岛和北沙洲检测到长棘海星幼体。Suzuki 等(2016)也得到相似的结果,引物 2aoniF/2aoniR 可以成功扩增出单个长棘海星幼虫的目的片段。这表明 2aoniF/2aoniR 引物的灵敏度高,可应用于环境样品中长棘海星幼虫的监测。

有研究表明长棘海星浮游幼虫孵化时间一般在 9~43d 之间,时长的波动取决于食物和温度等各种因素(Pratchett et al, 2017)。野外研究表明,大堡礁长棘海星产卵幼虫的浮游阶段一般少于 30d (Uthicke et al, 2015)。鉴于本研究所有浮游生物样品均采集 2021 年 10 月 21 日,推测本研究检测到的幼虫可能来自 2021 年 9 月中旬至 10 月中上旬,表明南海长棘海星在 9 月份和 10 月份仍能产卵受精,这进一步拓展了前期关于南海长棘海星的产卵主要发生在 8 月份的推测(Tian et al, 2017)。

海洋建模预测表明长棘海星幼虫一般的旅行距离是 35~75km,最大旅行距离为 150km(Dight et al, 1990)。虽然七连屿诸岛之间最远距离不超 20km,而且各岛之间的距离处于长棘海星幼虫能到达的区域

范围内。但本研究仅在西沙七连屿的北沙洲、南岛和中岛检测到长棘海星幼虫,而赵述岛和西沙洲均未检测到,这可能与其它因素有关,如洋流的速度、方向、强度以及幼虫的食物等(Pratchett et al, 2017)。有研究表明,在较慢的洋流中,长棘海星幼虫可以在单个珊瑚礁尺度上大量滞留(Wooldridge et al, 2015)。中尺度和亚中尺度环流也会减少幼虫的远距离扩散(Wolanski et al, 1988)。此外,浮游植物(如藻类等)会影响幼虫在水体中的分布。Sameoto 等(2008)的研究表明,幼虫遇到藻类时会停止前行,并在该位置发生聚集。由于环境因素的复杂性以及本研究检测环境因子的局限性,无法探明影响长棘海星幼虫地理分布特征的原因。因此要揭示幼虫种群地理分布的驱动机理,需进一步探究环境因子与幼虫种群丰度和分布之间的耦合关系。此外,尽管本研究建立了野外长棘海星幼虫的检测技术,但是要了解幼虫种群的动态变化,对环境样品进行定量分析是必不可少的一步。因此在今后的研究中,需着力开发一套针对长棘海星野外环境中幼虫的定量检测技术。

参考文献 References

- 李元超, 吴钟解, 梁计林, 等, 2019. 近 15 年西沙群岛长棘海星暴发周期及暴发原因分析[J]. 科学通报, 64(33): 3478–3484. LI YUANCHAO, WU ZHONGJIE, LIANG JILIN, et al, 2019. Analysis on the outbreak period and cause of *Acanthaster planci* in Xisha Islands in recent 15 years[J]. Chinese Science Bulletin, 64(33): 3478–3484 (in Chinese with English abstract).
- 位正鹏, 孔晓瑜, 吴相云, 等, 2009. 基于 COI 序列的翡翠股贻贝 *Perna viridis* 线粒体遗传特性分析及其近缘种间的系统关系探讨[J]. 热带海洋学报, 28(6): 72–78. WEI ZHENGPENG, KONG XIAOYU, WU XIANGYUN, et al, 2009. Genetic analysis of the marine mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) based on mitochondrial COI sequence and its phylogenetic relationship with other congeneric species[J]. Journal of Tropical Oceanography, 28(6): 72–78 (in Chinese with English abstract).
- 吴钟解, 王道儒, 涂志刚, 等, 2011. 西沙生态监控区造礁石珊瑚退化原因分析[J]. 海洋学报, 33(4): 140–146. WU ZHONGJIE, WANG DAORU, TU ZHIGANG, et al, 2011. The analysis on the reason of hermatypic coral degradation in Xisha[J]. Acta Oceanologica Sinica, 33(4): 140–146 (in Chinese with English abstract).
- BAIRD A H, PRATCHETT M S, HOEY A S, et al, 2013. *Acanthaster planci* is a major cause of coral mortality in Indonesia[J]. Coral Reefs, 32(3): 803–812.
- BUCKLIN A, LINDEQUE P K, RODRIGUEZ-EZPELETA N, et al, 2016. Metabarcoding of marine zooplankton: Prospects, progress and pitfalls[J]. Journal of Plankton Research, 38(3): 393–400.
- DE'ATH G, FABRICIUS K E, SWEATMAN H, et al, 2012. The 27-year decline of coral cover on the Great Barrier Reef and its causes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(44): 17995–17999.
- DIGHT I J, JAMES M K, BODE L, 1990. Modelling the larval dispersal of *Acanthaster planci* II. Patterns of reef connectivity[J]. Coral Reefs, 9(3): 125–134.
- DOYLE J R, MCKINNON A D, UTHICKE S, 2017. Quantifying larvae of the coralivorous seastar *Acanthaster* cf. *solaris* on the Great Barrier Reef using qPCR[J]. Marine Biology, 164(8): 176.
- GÉRARD K, ROBY C, CHEVALIER N, et al, 2008. Assessment of three mitochondrial loci variability for the crown-of-thorns starfish: A first insight into *Acanthaster* phylogeography[J]. Comptes Rendus Biologies, 331(2): 137–143.
- HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R, 2003. Barcoding animal life: Cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 270(S1): S96–S99.
- HUGHES T P, ANDERSON K D, CONNOLLY S R, et al, 2018. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene[J]. Coral Reefs, 359(6371): 80–83.
- HUGHES T P, BARNES M L, BELLWOOD D R, et al, 2017. Coral reefs in the Anthropocene[J]. Nature, 546(7656): 82–90.

- KAYAL M, VERCELLONI J, LISON DE LOMA T, et al, 2012. Predator crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) outbreak, mass mortality of corals, and cascading effects on reef fish and benthic communities[J]. PLoS One, 7(10): e47363.
- NAKAMURA M, OKAJI K, HIGA Y, et al, 2014. Spatial and temporal population dynamics of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*, over a 24-year period along the central west coast of Okinawa Island, Japan[J]. Marine Biology, 161(11): 2521–2530.
- PRATCHETT M S, CABALLES C F, RIVER-POSADA J A, et al, 2014. Limits to understanding and managing outbreaks of Crown-of-Thorns Starfish (*Acanthaster* spp.)[M]/HUGHES R N, HUGHES D J, SMITH I P. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, Volume 52. Boca Raton: CRC Press: 68.
- PRATCHETT M S, CABALLES C F, WILMES J C, et al, 2017. Thirty years of research on crown-of-thorns starfish (1986–2016): Scientific advances and emerging opportunities[J]. Diversity, 9(4): 41.
- SAMEOTO J A, METAXAS A, 2008. Interactive effects of haloclines and food patches on the vertical distribution of 3 species of temperate invertebrate larvae[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 367(2): 131–141.
- SAPONARI L, MONTANO S, SEVESO D, et al, 2015. The occurrence of an *Acanthaster planci* outbreak in Ari Atoll, Maldives[J]. Marine Biodiversity, 45(4): 599–600.
- SUZUKI G, YASUDA N, IKEHARA K, et al, 2016. Detection of a high-density brachiolaria-stage larval population of crown-of-thorns sea star (*Acanthaster planci*) in Sekisei Lagoon (Okinawa, Japan)[J]. Diversity, 8(2): 9.
- TIAN Y S, YU Z L, LUO P, et al, 2017. Artificial breeding and culture of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758) larvae in China[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 61(3): 157–163.
- UTHICKE S, DOYLE J, DUGGAN S, et al, 2015. Outbreak of coral-eating Crown-of-Thorns creates continuous cloud of larvae over 320 km of the Great Barrier Reef[J]. Scientific Reports, 5: 16885.
- WARD R D, HOLMES B H, O'HARA T D, 2008. DNA barcoding discriminates echinoderm species[J]. Molecular Ecology Resources, 8(6): 1202–1211.
- WOLANSKI E, HAMNER W M, 1988. Topographically controlled fronts in the ocean and their biological influence[J]. Science, 241(4862): 177–181.
- WOLFE K, GRABA-LANDRY A, DWORJANYN S A, et al, 2015. Larval phenotypic plasticity in the boom-and-bust crown-of-thorns seastar, *Acanthaster planci*[J]. Marine Ecology Progress Series, 539: 179–189.
- WOOLDRIDGE S A, BRODIE J E, 2015. Environmental triggers for primary outbreaks of crown-of-thorns starfish on the Great Barrier Reef, Australia[J]. Marine Pollution Bulletin, 101(2): 805–815.
- YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, et al, 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. BMC Bioinformatics, 13(1): 134.