

几种生化信号物质对双壳类催产效应的研究*

刘洪军 相建海

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

提要 采用个体注射的方法,研究不同的信号物质(五羟色胺、肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、 γ -氨基丁酸 GABA、溴化乙酰胆碱)对双壳类催产的效应。结果表明:所选用的六种物质中,只有五羟色胺能有效地诱导菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、贻贝(*Mytilus edulis*)的精卵排放。五羟色胺作用的有效浓度范围为 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ mol/L,最佳作用浓度为 10^{-4} mol/L。五羟色胺诱导的精卵排放具有作用潜伏期短(绝大部分在 30min 以内)、同步性高的特点,为贝类配子的人工操作创造了条件。

关键词 生化信号物质,五羟色胺,双壳类

精卵的排放是受多因子控制的复杂的生理活动,其机制至今仍不十分明了。贝类中有关生殖的神经内分泌调控的研究,主要集中于腹足纲,双壳纲由于实验操作的困难,研究得相对较少^[14]。然而对于双壳类催产方法的探索,自 1938 年 Galstoff 率先用温度刺激牡蛎产卵以来^[6],许多学者作过不懈的努力。相良顺一郎(1958)用氢氧化铵注射菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve)的生殖腺诱发排放精卵^[3]。Loosanoff 等(1963)综合了有关双壳类的培养研究,报道用升温或升温加精卵悬浮液诱发半叉蛤(*Tapes semidecussata*)以及用氨海水浸泡帘蛤(*Mercenaria mercenaria*)产卵^[7]。此后, Morse (1976)^[8]、Backvar (1981)^[4]、Fitt & Trench (1981)^[5]先后报道了过氧化氢诱发海洋腹足类和双壳类的精卵排放;陈隼、相建海等(1991)^[2]用紫外线照射海水诱导贝类产卵成功,这都表明了前列腺素在贝类生殖中的作用。其他方法还包括阴干刺激、流水刺激、电刺激、超声波刺激等^[1]。然而,这些方法均有其局限性,譬如潜伏期波动幅度大、孵化率和稚贝的成活率低,对亲贝的毒性效应大,所以探索其他催产方法仍有其必要性。

1982 年 Matsutani 等^[11]报道了神经递质对虾夷扇贝(*Parnopecten yessoensis*)精卵排放的影响。本实验的目的是筛选类似的生化信号物质控制我国经济价值较大的双壳类的配子排放,以期达到高效、及时获得配子的目的,为进一步的遗传操作如多倍体诱导、杂交、转外源基因等生物技术创造条件。

1 材料和方法

实验用亲贝栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、贻贝(*Mytilus edulis*)等采自青岛海滨。在繁殖季节(8~10月)选性腺发育良好的个体在实验室暂养 1~2d,以适应环境的变化并排除阴干刺激对配子排放的影响。

实验用化学药品:五羟色胺(硫酸肌酸酐复合物)、肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、 γ -氨基丁酸、溴化乙酰胆碱均为 Sigma 公司产品。实验前用过滤海水配成所需浓度,实验时用注射

* 国家自然科学基金资助项目,资助号 39170610。

收稿日期 1994 年 8 月 18 日

器对单个亲贝进行注射,观察它们对配子排放的影响。

亲贝逐个放入直径 15cm 盛有 500ml 海水的结晶皿中,用楔形物将双壳撬开后进行注射。注射部位栉孔扇贝为闭壳肌和性腺,蛤仔和贻贝为性腺。注射药品量,蛤仔为 0.2ml,栉孔扇贝和贻贝为 0.4ml。一定时间后(30 min 和 60 min),观察并计数每组排精和产卵的亲贝数并与对照组进行比较。对照组注射等体积的过滤海水。所有数据均进行 T-检验以确定其相异程度。

实验设计的步骤是:首先观察不同信号物质对菲律宾蛤仔精卵排放的影响,初步筛选对其催产最有效的物质,以及最佳作用浓度,然后再将菲律宾蛤仔初选的药物和浓度应用到贻贝和栉孔扇贝中验证其效应。

2 实验结果

2.1 不同信号物质对菲律宾蛤仔催产的影响

实验结果表明(表 1):所用的 6 种信号物质中,只有五羟色胺对菲律宾蛤仔的催产有效。经五羟色胺诱导所产出的卵,形态与自然产卵相同,胚泡均已破裂达到生理上的成熟,受精后胚胎发育正常,孵化率达到 95% 以上。

2.2 五羟色胺对菲律宾蛤仔催产的浓度要求

五羟色胺诱导菲律宾蛤仔产卵的浓度范围为 $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{mol/L}$,而排精的有效范围为 $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{mol/L}$ 。雄蛤的有效阈值比雌蛤低一个数量级,表现出对五羟色胺的更高的敏感程度。另外,雄蛤的作用潜伏期亦较短,大部分在 15min 之内;雌蛤稍长,但是所有阳性反应个体,90% 以上在 30min 之内即可以排放,约 60min 后,时间再延长,排放的个体数亦不增加。五羟色胺的最佳浓度为 10^{-4}mol/L ,诱导配子排放率高达 90%,高于或低于该浓度排放率均下降。

2.3 五羟色胺对栉孔扇贝和贻贝的催产效应

五羟色胺亦能有效诱导栉孔扇贝和贻贝

精、卵的排放。其诱导率分别为 80% 和 60%。贻贝、菲律宾蛤仔、栉孔扇贝对五羟色胺作用的潜伏期稍有不同,栉孔扇贝的潜伏期与菲律宾蛤仔相似,贻贝稍长,平均为 50min 左右。

表 1 不同信号物质对蛤仔精卵排放的影响

Tab. 1 Effects of various signal molecules on *Ruditapes philippinarum* spawning

物质种类	处理浓度 (mol/L)	产卵亲贝数 (个)	排精亲贝数 (个)	注射总数
五羟色胺	10^{-4}	3	5 ^a	10
	10^{-5}	3	5 ^a	10
	10^{-6}	1	2 ^a	10
多巴胺	10^{-4}	0	0	10
	10^{-5}	0	0	10
	10^{-6}	0	0	10
乙酰胆碱	10^{-4}	0	0	10
	10^{-5}	0	0	10
	10^{-6}	0	0	10
L-氨基丁酸	10^{-4}	0	0	10
	10^{-5}	0	0	10
	10^{-6}	0	0	10
肾上腺素	10^{-4}	0	0	10
	10^{-5}	0	0	10
	10^{-6}	0	0	10
去甲肾上腺素	10^{-4}	0	0	10
	10^{-5}	0	0	10
	10^{-6}	0	0	10
过滤海水		0	0	20

a: T-检验结果表明排放配子的亲贝数与对照组存在显著差异(比对照组明显增加, $P < 0.05$)。

表 2 五羟色胺对蛤仔催产的浓度梯度实验

Tab. 2 Concentration degree experiments of serotonin on *Ruditapes philippinarum* spawning

浓度 (mol/L)	注射总数	产卵个体数 (个)	排精个体数 (个)	诱导率 (%)
1×10^{-2}	10	0	0	0
1×10^{-3}	10	2	2	40
1×10^{-4}	10	4	5	90
1×10^{-5}	10	2	3	50
1×10^{-6}	10	2	2	40
1×10^{-7}	10	0	5	50
1×10^{-8}	10	0	0	0
0	10	0	0	0

表 3 五羟色胺对其他双壳类催产的比较实验

Tab. 3 Spawning induction of other Bivalve species with Serotonine

种类	处理方式	注射个数	产卵亲贝数(个)	排精亲贝数(个)	排放百分率(%)
栉孔扇贝	五羟色胺	20	8	8 ^b	80
	对照	10	0	0	0
紫贻贝	五羟色胺	50	18	12 ^c	60
	对照	30	3	2	17
蛤仔	五羟色胺	40	8	22 ^d	75
	对照	30	0	0	0

b,c,d,与对照组存在显著差异($P < 0.05$)。五羟色胺的注射浓度为 10^{-4} mol/L。

3 讨论

生物信号分子是具有能触发某一生理行为,如配子的排放、胚胎的发育、细胞的分化、幼体的附着变态、成体的交配繁殖等,并通过细胞受体将有关信息传递到体内使后续生物过程正常进行下去的生化分子,包括生物体自身分泌的激素、神经递质以及自然界中存在的形形色色的多种物质。本实验所选用的6种具生化信号功能的神经递质,在诱导哺乳动物的精卵排放过程中都具有不同程度的有效性。不同的学者^[9,10,12]也监测到五羟色胺,儿茶酚胺以及γ-氨基丁酸在贝类神经系统中的存在,为何只有五羟色胺能诱导贝类精卵排放,有待进一步研究。

在有效浓度范围内,五羟色胺的催产率与注射浓度之间并不表现出一定的线性关系,这表明该信号物对贝类的催产浓度具有一个阈值,低于该值就不起作用。但是,当超过一定的限度(如对于蛤仔超过 10^{-2} mol/L),也不能促进精卵的排放反而导致了其他反应,这可以从受试个体强烈的伸足反应来说明。

Matsutani, T. (1982)^[11]发现虾夷扇贝的神经节提取物可引起雄性个体的配子释放而对雌性排卵不起作用。这说明神经系统对贝类生殖的调控起作用。然而,提取物的性质、性别效应差别的原因以及与五羟色胺的关系仍待于进一步澄清。

五羟色胺诱导双壳类精卵排放具有作用潜伏期短、同步性高的优点,克服了对贝类进行人工操作的某些困难,为进一步实现高产、优质、抗逆的遗传改良创造了条件。

参考文献

- [1] 大连水产学院主编,1980.贝类养殖学.农业出版社,36~40.
- [2] 陈 侠、相建海等,1991.中国科学院海洋研究所实验海洋学开放实验室研究年报.青岛海洋大学出版社,122~127.
- [3] 相良顺一郎,1958.日本水产学会志 23(9):505~510.
- [4] Beckvar, N., 1981. *Aquaculture* 24:21-30.
- [5] Fitt, W. K. and Trench, R. K., 1981. *Biol. Bull.* (Woods Hole, Mass.) 161:213-215.
- [6] Galstoff, P. S., 1938. *Biol. Bull.* (Woods Hole, Mass.) 75: 386-307.
- [7] Loosanoff, V. L. & Davis, H. C., 1963. *Advances in Marine Biology* 1: 20 -113.
- [8] Matsutani, T. & T. Nomura, 1982. *Marine Biology Letters* 3:353-358.
- [9] Matsutani, T. & T. Nomura, 1984. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 50(3):425-430.
- [10] Matsutani, T. & T. Nomura, 1986. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 52(9):1 589-1 594.
- [11] Morse, D. E. *et al*, 1976. *Science* 196:298-300.
- [12] Smith, J. R., 1982. *Comp. Biochem. Physiol.* 71C:57-61.
- [13] G. B. Stefano and E. Aiello, 1975. *Biol. Bull.* 148:141-156.
- [14] Wijnand P., *et al.*, 1991. *Bull. Inst. Zool.*, 16:387-400.

STUDIES ON INDUCTION OF SPAWNING BY BIOCHEMICAL SIGNAL MOLECULES IN SEVERAL BIVALVES

Liu Hongjun and Xiang Jianhai

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Received: Aug. 13, 1994

Key Words: Spawning inducing chemicals, Serotonin, Bivalves.

Abstracts

The Spawning in effects of Six biochemicals (Serotonin, Dopamine, Acetylcholine Bromine, GABA, Epinephrine, Norepinephrine) are studied in three bivalve species by injection. Of all these chemicals used in the paper, only Serotonin was proven to be able to induce spawning in *Mytilus edulis*, *Chlamys farreri*, *Ruditapes philippinarum*. Its effective range of concentration was 10^{-3} — 10^{-7} mol and the optimum concentration was 10^{-4} mol.

Serotonin 5-hydroxy tryptamine, creatinine sulfate complex genetic manipulation in bivalve shows some advantages in artificial induction of spawning in bivalves with short latent time and high efficiency and it can serve as an efficient method in obtaining gametes for the purpose of the genetic manipulation and aquaculture of marine bivalve.